



# Étude de la balance transcriptionnelle du rétrovirus HTLV-1 : identification d'un nouveau mécanisme de répression de la transcription antisens du rétrovirus HTLV-1 par la transcription sens

Armelle Tollenaere

## ► To cite this version:

Armelle Tollenaere. Étude de la balance transcriptionnelle du rétrovirus HTLV-1 : identification d'un nouveau mécanisme de répression de la transcription antisens du rétrovirus HTLV-1 par la transcription sens. Microbiologie et Parasitologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2019. Français. NNT : 2019USPCB030 . tel-03129983

**HAL Id: tel-03129983**

**<https://theses.hal.science/tel-03129983>**

Submitted on 3 Feb 2021

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

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

Thèse de doctorat de l'université Paris Descartes  
Spécialité : Virologie  
Ecole doctorale N°562 (Bio-SPC)  
Préparée à l'Institut Cochin  
Sous la direction du Dr Claudine Pique

Par

Mme Armelle Tollenaere

Pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université Paris Descartes

---

Etude de la balance transcriptionnelle du rétrovirus HTLV-1 :  
identification d'un nouveau mécanisme de répression de la  
transcription antisens du rétrovirus HTLV-1 par la transcription sens.

---

Date de soutenance prévue le 12 mars 2019

Devant le jury composé de :

Pr Sylvie Van der Werf  
Dr Franck Mortreux  
Dr Luc Willems  
Pr Uriel Hazan  
Dr Aurore Vidy-Roche  
Dr Claudine Pique

Présidente du Jury  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examinatrice  
Directrice de thèse



# Table des matières

|                                                                                                                                                             |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>TABLE DES MATIÈRES .....</b>                                                                                                                             | <b>1</b>  |
| <b>ABRÉVIATIONS.....</b>                                                                                                                                    | <b>3</b>  |
| <b>LISTE DES FIGURES ET ANNEXES .....</b>                                                                                                                   | <b>5</b>  |
| <b>RÉSUMÉ – ABSTRACT .....</b>                                                                                                                              | <b>7</b>  |
| <b>INTRODUCTION .....</b>                                                                                                                                   | <b>9</b>  |
| I) HTLV-1, LE SEUL RÉTROVIRUS ONCOGÈNE HUMAIN .....                                                                                                         | 10        |
| A) Découverte du virus et épidémiologie .....                                                                                                               | 10        |
| B) Pathologies associées au rétrovirus HTLV-1 .....                                                                                                         | 12        |
| C) Transmission du rétrovirus HTLV-1 .....                                                                                                                  | 14        |
| D) Le devenir du virus HTLV-1 dans l'organisme : établissement de l'infection<br>chronique .....                                                            | 15        |
| II) ONCOGÈNE ASSOCIÉE À HTLV-1 .....                                                                                                                        | 22        |
| A) Tax, une oncoprotéine pléiotrope .....                                                                                                                   | 22        |
| B) L'oncoprotéine HBZ .....                                                                                                                                 | 29        |
| C) Les différents facteurs influençant la leucémogénèse associée à HTLV-1 .....                                                                             | 37        |
| III) RÉGULATION DE LA BALANCE TRANSCRIPTIONNELLE DU RÉTROVIRUS HTLV-1 .....                                                                                 | 44        |
| A) La transcription sens du HTLV-1 est fortement transactivée par Tax .....                                                                                 | 44        |
| B) Régulation de la transcription antisens du HTLV-1 .....                                                                                                  | 55        |
| C) Balance transcriptionnelle du HTLV-1 : vers une interdépendance des deux<br>transcriptions ? .....                                                       | 57        |
| <b>PROBLÉMATIQUE.....</b>                                                                                                                                   | <b>61</b> |
| <b>MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>                                                                                                                          | <b>62</b> |
| I) DÉTECTION SPÉCIFIQUE DES TRANSCRITS SENS ET ANTISENS DU HTLV-1 .....                                                                                     | 63        |
| II) DÉTERMINATION DE LA CHARGE PROVIRALE .....                                                                                                              | 64        |
| III) IMMUNOPRÉCIPITATIONS DE CHROMATINE (CHIP) .....                                                                                                        | 65        |
| <b>RÉSULTATS.....</b>                                                                                                                                       | <b>67</b> |
| PARTIE 1 : LE DETOURNEMENT DU COMPLEXE D'O-GLCNAC PAR L'ONCOPROTEINE TAX DU<br>HTLV-1 FACILITE LA TRANSCRIPTION VIRALE.                                     |           |
| I) LA PROTÉINE TAX AUGMENTE LE NIVEAU D'O-GLCNACYLATION DU FACTEUR DE<br>TRANSCRIPTION CREB.....                                                            | 68        |
| II) L'AUGMENTATION DU NIVEAU D'O-GLCNACYLATION DE CREB FAVORISE SON<br>RECRUTEMENT AU NIVEAU DU LTR ET AMÉLIORE L'EFFICACITÉ DE LA TRANSACTIVATION. ....    | 70        |
| PARTIE 2 : LA FORME EPISSEE DU TRANSCRIT HBZ EST REPRIMÉE PAR LA TRANSCRIPTION<br>VIRALE SENS DANS LES LYMPHOCYTES T INFECTÉS PAR LE HTLV-1                 |           |
| I) LE NIVEAU DE TRANSCRIPTION DE SHBZ EST DIMINUÉ DANS LES LYMPHOCYTES T AVEC<br>UN LTR5' ACTIF. ....                                                       | 75        |
| A) Mise au point de la détection spécifique des différents transcrits du HTLV-1. ....                                                                       | 75        |
| B) Dans les lignées présentant un LTR5' actif, le niveau de production de sHBZ est<br>fortement diminué contrairement à celui d'usHBZ. ....                 | 76        |
| II) LA DIMINUTION DE LA TRANSCRIPTION SENS S'ACCOMPAGNE D'UNE LEVÉE DE LA<br>RÉPRESSION EXERCÉE SUR L'EXPRESSION DE SHBZ. ....                              | 78        |
| A) La Chaetocine et la Spironolactone peuvent être utilisées pour inhiber la<br>transcription dépendante du LTR5'. ....                                     | 78        |
| B) Les traitements à la Chaetocine et la Spironolactone entraînent une augmentation<br>de la quantité d'ARN sHBZ dans les lignées avec un LTR5' actif. .... | 80        |

|                                                                                                                                                                        |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| C) <i>Les effets de la SP et de la Chaetocine sur la transcription de sHBZ sont dépendants de l'existence de la transcription sens.</i> .....                          | 83         |
| III) LA DIMINUTION DE LA TRANSCRIPTION SENS A UN EFFET DIFFÉRENTIEL SUR LES TRANSCRITS S ET USHBZ .....                                                                | 84         |
| IV) LA RÉPRESSION ÉTABLIE PAR LA TRANSCRIPTION SENS SUR L'EXPRESSION DE SHBZ EST UN PHÉNOMÈNE TRÈS DYNAMIQUE. ....                                                     | 85         |
| V) L'EXISTENCE DES TRANSCRITS SENS SEMBLE ÊTRE RESPONSABLE DE L'INHIBITION DE LA TRANSCRIPTION DE SHBZ PAR INTERFÉRENCE TRANSCRIPTIONNELLE.....                        | 87         |
| A) <i>L'inhibition de la transcription sens et non la diminution de la quantité de protéine Tax précède la levée de la répression exercée sur sHBZ.</i> .....          | 87         |
| B) <i>Le traitement à la Chaetocine provoque une levée de l'inhibition exercée sur sHBZ retardée par rapport au traitement par la SP.</i> .....                        | 88         |
| VI) L'ANALYSE DU NIVEAU DE MARQUES ACTIVATRICES ET DU RECRUTEMENT DE CERTAINS FACTEURS DE TRANSCRIPTION PERMET DE DÉTERMINER LE NIVEAU D'ACTIVATION DES DEUX LTR. .... | 90         |
| A) <i>Dans les cellules avec un LTR5' actif, le LTR3' présente un niveau plus faible de marques épigénétiques caractéristiques des promoteurs actifs.</i> .....        | 90         |
| B) <i>L'analyse du recrutement de Sp1 ne permet pas de mettre en évidence l'inhibition de la transcription de sHBZ dans les lignées avec un LTR5' actif.</i> .....     | 92         |
| VII) CONSTRUCTION D'UN NOUVEAU MODÈLE POUR LA COMPRÉHENSION DE LA RÉPRESSION EXERCÉE SUR LE PROMOTEUR DE SHBZ. ....                                                    | 92         |
| <b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>                                                                                                                                | <b>95</b>  |
| <b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>                                                                                                                                             | <b>111</b> |
| <b>ANNEXE .....</b>                                                                                                                                                    | <b>125</b> |

## Abréviations

AD : Activation Domain  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
AP-1 : Activator Protein 1  
ARN : Acide ribonucléique  
ATF : Activating Transcription Factor  
ATL : Adult T-cell Leukaemia  
BER : Base Excision Repair  
BLV : Bovine Leukaemia Virus  
CBP : CREB binding protein  
CCR4 : C-C Chemokine Type 4  
CDK : Cyclin Dependant Kinase  
Chae : Chaetocine  
ChIP : Immunoprécipitation de chromatine  
CMV : Cytomegalovirus  
CRE : cyclic AMP response element  
CREB : cyclic-AMP response element binding protein  
CTCF : CCCTC-binding Factor  
CTD : C-terminal Domain  
C-ter : Carboxy-terminal  
Env : Enveloppe  
EPL : Eplérénone  
EZH2 : Enhancer of Zeste Homolog 2  
GLUT-1 : Glucose Transporter 1  
HAM : HTLV-1 Associated Myelopathy  
HAT : Histone Acétyltransférase  
HBP : Hexosamine Biosynthetic Pathway  
HBZ : HTLV-1 b-Zip Factor  
HDAC : Histone Deacétylase  
HSPG : Heparan Sulfate Proteoglycans  
hTERT : Human Telomerase Reverse Transcriptase  
HTLV-1 : Human T cell Leukemia/Lymphoma Virus Type 1  
HTLV-2 : Human T cell Leukemia/Lymphoma Virus Type 2  
IFN- $\alpha$  : Interferon alpha  
IgG : Immunoglobuline G  
I $\kappa$ B : Inhibitors of  $\kappa$ B  
IKK : I $\kappa$ B Kinase  
IL-2 : interleukine 2  
LT : Lymphocytes T  
LTR : Long Terminal Repeat  
MAPK : Mitogen-activated Protein Kinases  
miR : Micro RNA  
MMR : Mismatch Repair  
NER : Nucleotide Excision Repair  
NES : Nuclear Export Signal  
NF- $\kappa$ B : Nuclear Factor Kappa B  
NHEJ : Non-Homologous End Joining  
NLS : Nuclear Localisation Signal

NRP-1 : Neuropiline 1  
 N-ter : amino-terminal  
 OGA : O-linked-N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase ou O-GlcNAcase  
 O-GlcNAc : O-linked-N-Acetyl-glucosaminylation  
 OGT : O-linked-N-Acetylglucosaminyltransférase  
 ORF : Open Reading Frame  
 PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells (Cellules mononuclées du sang périphérique)  
 PCAF : p300/CBP Associated Factor  
 PCR : Polymerase Chain Reaction  
 PI3K : Phosphatidyl-inositol-3-Kinase  
 PKA : Protein Kinase A  
 PRC : Polycomb Repressive Complex  
 P-TEFb : Positive Transcription Elongation Factor b  
 PVL : Proviral Load (Charge provirale)  
 ROS : Reactive Oxygen Species  
 RT : Reverse Transcription  
 sHBZ : Spliced HTLV-1 b-Zip Factor  
 SP : Spironolactone  
 Sp1 : Specific Protein 1  
 SRE : Serum Response Element  
 SRF : Serum Response Factor  
 Suv39H1 : Suppressor of variegation 3-9 homolog 1  
 SWI/SNF : Switch/Sucrose Non Fermentable  
 TAF : TBP-Associated Factor  
 Tax : Transactivator of pX region  
 TBP : TATA box Binding Protein  
 TET2 : Ten-eleven-translocation 2  
 TFIID : Transcription Factor II D  
 TFIIH : Transcription Factor II H  
 TNF -  $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor alpha  
 TORC : Transducer of regulated CREB activity  
 TRE : Tax Responsive Element  
 TSP : Tropical Spastic Paraparesis  
 UDP-GlcNAc : Uridine 5-diphospho N-acetylglucosamine  
 usHBZ : Unspliced HTLV-1 b-Zip Factor  
 vCRE : Viral cyclicAMP Responsive Element  
 WGA : Wheat Germ Lectin

## Liste des figures et annexes

- Figure 1 : Répartition mondiale des principaux foyers d'infection par HTLV-1.
- Figure 2 : Le génome intégré du rétrovirus HTLV-1 : un génome rétroviral de type complexe.
- Figure 3 : Cycle viral simplifié du rétrovirus HTLV-1.
- Figure 4 : Les différentes voies de transmission cellulaire du HTLV-1.
- Figure 5 : Le virus HTLV-1 se propage par expansion clonale puis les clones sont sélectionnés.
- Figure 6 : Structure de la protéine Tax.
- Figure 7 : Tax cible de nombreux acteurs du cycle cellulaire.
- Figure 8 : Organisation en domaine des protéines HBZ.
- Figure 9 : HBZ présente une localisation nucléaire.
- Figure 10 : Actions antagonistes de Tax et HBZ vis à vis de certaines voies cellulaires
- Figure 11 : HBZ active la transcription dépendante de JunD.
- Figure 12 : L'expression de Tax est réprimée de différentes façons dans les cellules ATL
- Figure 13 : Il existe un site de liaison viral de la protéine CTCF dans le génome du HTLV-1.
- Figure 14 : Perturbations en cis de la transcription cellulaire par la transcription virale HTLV-1.
- Figure 15 : Organisation du LTR du HTLV-1.
- Figure 16 : Les facteurs impliqués dans la transcription basale du LTR5'.
- Figure 17 : Le complexe vCRE/CREB/Tax/CBP-p300 permet la transactivation du LTR5' par Tax.
- Figure 18 : Tax interagit avec certains facteurs généraux de transcription pour faciliter la transactivation du LTR5' initiée de manière CREB-dépendante.
- Figure 19 : Les transcrits antisens présentent une régulation distincte et des promoteurs différents.
- Figure 20 : Effets réciproques des transcriptions sens et antisens du HTLV-1.
- Figure 21 : L'expression de Tax dans les cellules TL-Om1 entraîne une augmentation du niveau global d'O-GlcNAcylation ainsi qu'une augmentation de l'O-GlcNAcylation de la protéine CREB.
- Figure 22 : L'expression de Tax dans les cellules HEK-293T ainsi que l'inhibition de l'OGA entraînent une augmentation du niveau global d'O-GlcNAcylation et de l'O-GlcNAcylation de la protéine CREB.
- Figure 23 : La mutation de la Sérine 40 de CREB abolit son O-GlcNAcylation.
- Figure 24 : L'O-GlcNAcylation de CREB est nécessaire à une transactivation efficace du LTR du HTLV-1.
- Figure 25 : Le recrutement de p-CREB au niveau du LTR du HTLV-1 est augmenté suite à l'inhibition chimique de l'OGA.
- Figure 26 : Le complexe O-GlcNAcZYME est recruté au niveau du LTR dans les cellules infectées par HTLV-1.
- Figure 27 : Mise au point d'une RTqPCR permettant la détection spécifique de l'ARN usHBZ.
- Figure 28 : Les lignées HTLV-1 avec une transcription sens active présentent un plus faible niveau de sHBZ.
- Figure 29 : La Chaetocine par la dégradation de Tax et la Spironolactone par la dégradation de XPB induisent une inhibition de la transcription sens du HTLV-1.
- Figure 30 : Le niveau de transcrit sHBZ augmente suite au traitement par la SP ou la Chae.
- Figure 31 : La Spironolactone entraîne une diminution de tous les transcrits sens et une augmentation de sHBZ à des doses supérieures dans les MT2 ou les MT4.

Figure 32 : Le niveau de transcrit sHBZ n'est pas modifié par le traitement par la SP ou la Chae dans les cellules TL-Om1 et peu augmenté dans la lignée MT1.

Figure 33 : Le transcrit usHBZ suit l'évolution de la transcription sens suite au traitement à la SP ou la Chae dans les cellules avec un LTR5' actif.

Figure 34 : L'inhibition de la production de sHBZ est rétablie après levée du traitement à la SP.

Figure 35 : Le traitement par la SP entraîne en premier lieu une diminution de la transcription sens puis une augmentation de l'expression de sHBZ.

Figure 36 : La levée de la répression sur sHBZ consécutive au traitement par la Chae se produit suite à la diminution de la transcription sens.

Figure 37 : Le niveau de marques d'histone activatrices ainsi que le recrutement du facteur de transcription Sp1 permettent de discriminer les deux LTR du HTLV-1

Figure 38 : Représentation schématique de la portion du génome du HTLV-1 présente dans les plasmides CMV-Env-LTR et Sp6-Env-LTR.

Tableau 1 : Voies de signalisation cellulaire activées par la protéine Tax du HTLV-1

Tableau 2 : Voies de réparation de l'ADN perturbées par Tax

**Annexe : Hijacking of the O-GlcNAcZYME complex by the HTLV-1 Tax oncoprotein facilitates viral transcription.** Groussaud, Khair, Tollenaere et al. *Plos Pathogens* 2017

## **Résumé – Abstract**

Le rétrovirus HTLV-1, qui infecte principalement les lymphocytes T CD4+, est responsable du développement de la leucémie T de l'adulte et d'une pathologie inflammatoire du système nerveux central, appelée Paraparésie Spastique Tropicale. Le pouvoir oncogène de ce virus est dû à l'expression de deux oncoprotéines virales, les protéines Tax et HBZ. La production de Tax, ainsi que de toutes les autres protéines du virus à l'exception d'HBZ, est contrôlée par le promoteur localisé dans le LTR5' (Long Terminal Repeat) du virus. La transcription antisens, régulée par le LTR3' donne naissance à deux transcrits l'un épissé, sHBZ, l'autre non, usHBZ. Alors que Tax et HBZ provoquent la prolifération accrue des lymphocytes infectés, l'accumulation d'anomalies génétiques, l'immortalisation des lymphocytes, etc..., paradoxalement, l'expression de Tax est perdue dans la plupart des cas de leucémie T de l'adulte. Cette perte d'expression passe souvent par la répression de l'expression sens du virus. Ainsi, alors que Tax et HBZ participent activement à l'émergence des clones leucémiques, la balance transcriptionnelle est dérégulée en faveur de HBZ, au stade final de la transformation par le HTLV-1.

Afin de mieux comprendre la pathogenèse associée à HTLV-1, il est donc primordial de comprendre comment la balance entre transcription sens et antisens du virus est régulée dans les premiers temps de l'infection.

Dans une première étude, nous avons mis en évidence que le détournement de la machinerie d'O-GlcNAcylation par la protéine Tax augmente l'efficacité de la transcription sens.

Dans une seconde étude, nous montrons que dans le contexte de provirus intégrés, le promoteur de sHBZ est moins actif en présence d'une transcription sens. Afin de confirmer ce phénomène, nous avons utilisé deux inhibiteurs pharmacologiques de la transcription sens, la Spironolactone et la Chaetocine, pour analyser l'effet d'une diminution du niveau de transcription sens sur la production de sHBZ et usHBZ. Il est montré que l'inhibition de la transcription sens entraîne une diminution de la transcription d'usHBZ et une augmentation de la transcription de sHBZ. Les deux transcrits antisens présentent donc une évolution opposée vis à vis de la transcription sens.

Pour mieux définir le mécanisme de perturbation de la transcription antisens par la transcription sens, ainsi que la régulation des promoteurs du LTR3', un nouveau modèle a été mis au point. Des lignées stables de Jurkat ont été constituées soit avec un plasmide au sein duquel la transcription sens est contrôlée par le promoteur CMV, soit ne permettant pas de transcription sens. Ce modèle permettra l'analyse précise des promoteurs du LTR3' et la caractérisation du mécanisme d'inhibition de la transcription de sHBZ par la transcription sens.

Mots clés : HTLV-1, LTR, balance transcriptionnelle, interférence transcriptionnelle

HTLV-1 retrovirus infects mainly T CD4 lymphocytes and is the causative agent of Adult T cell Leukemia and an inflammatory pathology targeting the central nervous system named Tropical spastic paraparesis. The oncogenic properties of this virus lay in the expression of two oncoproteins, Tax and HBZ. Tax and all viral products except for HBZ are produced from the sense promoter of the virus located in the 5'LTR (Long Terminal Repeat). HTLV-1 antisense transcription leads to the synthesis of two transcripts : one spliced, sHBZ, the other one unspliced, usHBZ.

Tax and HBZ induce T lymphocytes proliferation, genomic abnormalities, lymphocytes immortalisation, ... Yet in leukemic cells, most of the time, Tax expression is lost, often by epigenetic repression of the 5'LTR. Thus, even if Tax and HBZ actively take part in leukemic

clones emergence, HTLV-1 transcriptional balance is deregulated in favor of HBZ at the final stage of transformation.

Therefore, in order to better comprehend how HTLV-1 leads to the development of leukemia, it is essential to understand how HTLV-1 transcriptional balance is regulated in the first steps of HTLV-1 infection.

In a first study, we have deciphered that the hijacking of the O-GlcNAcylation machinerie by Tax leads to an increase in sense transcription efficiency.

In the second study, it has been shown that sHBZ promoter is less active in HTLV-1 infected lymphocytes with an active sense transcription. To confirm this observation, two pharmacological inhibitors of sense transcription have been characterized and used to analyze the effect of a change in sense transcription level on sHBZ and usHBZ production. The inhibition of sense transcription is shown to inhibit usHBZ expression and enhance sHBZ transcription. The two antisense transcripts thus exhibit opposite patterns regarding sense transcription.

To better define how this repression is established and how the two promoters in the 3'LTR are regulated, a new model has been built. Jurkat T cells are stably transfected with a plasmid allowing the expression of sense transcripts under the control of the CMV promoter or a plasmid without sense transcription. These models will allow a precise characterization of sHBZ and usHBZ promoter and of the inhibition initiated by sense transcription on sHBZ expression.

Keywords : HTLV-1, LTR, transcriptional balance, transcriptional interference

# **INTRODUCTION**

## **I) HTLV-1, le seul rétrovirus oncogène humain**

### **A) Découverte du virus et épidémiologie**

#### **1) Historique de la découverte du premier oncorétrovirus humain**

Alors même que l'existence de rétrovirus ayant des propriétés oncogènes chez des espèces de mammifères et d'oiseaux avait été démontrée précocement au XXème siècle, la découverte de rétrovirus humains n'a débuté qu'au tout début des années 1980. Elle a en effet été permise par deux avancées techniques : d'une part l'amélioration de la détection de l'activité transcriptase inverse propre aux rétrovirus et d'autre part la découverte de l'IL-2 (Morgan et al., 1976) qui a permis la mise en culture de lymphocytes primaires. En 1981, forte de ces découvertes, l'équipe de Robert Gallo a été la première à mettre en évidence, à partir de cellules d'un patient atteint d'un lymphome cutané à cellules T, l'existence d'un rétrovirus humain jusqu'à lors jamais décrit (Gallo, 2005) et baptisé HTLV pour Human T lymphotropic virus.

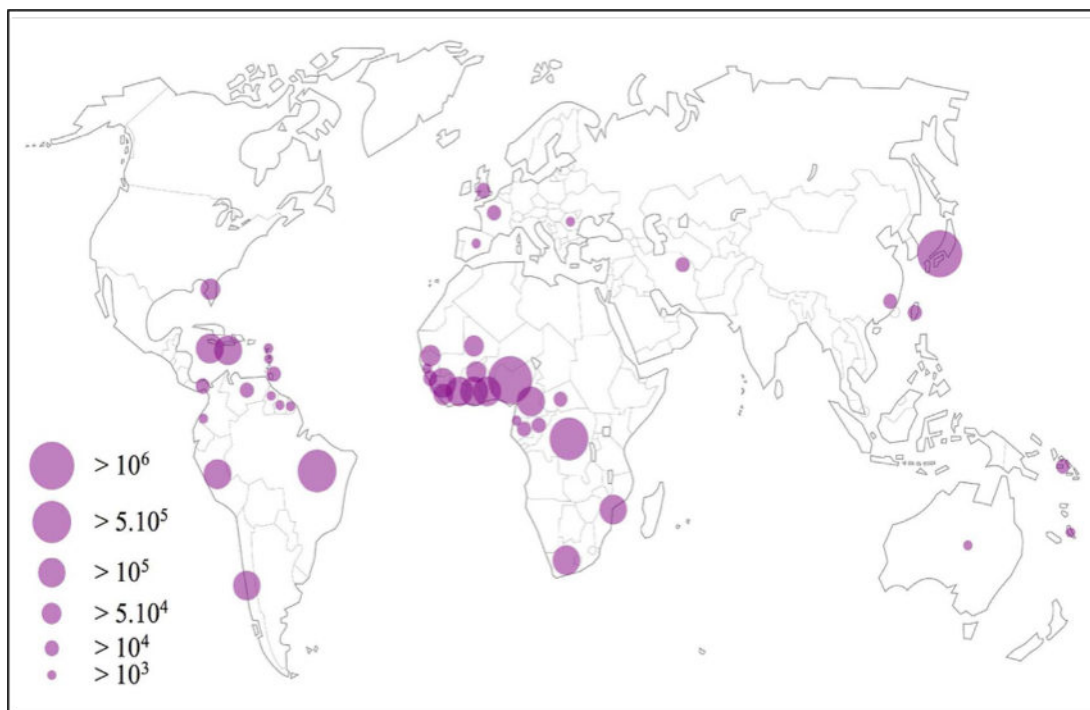
En parallèle, au Japon, l'équipe du Dr Kiyashi Takatsuki remarquait l'existence d'une forme spécifique de prolifération lymphocytaire, dans une région très localisée du sud-ouest du Japon et plus particulièrement autour de la ville de Kyushu (Uchiyama et al., 1977). Tous les patients atteints présentaient des caractéristiques communes et atypiques qui venaient s'ajouter à la localisation géographique : développement des symptômes à l'âge adulte, atteintes cutanées, cellules T avec des noyaux polylobés de forme caractéristique, etc... L'ensemble de ces caractéristiques les a conduits à la description d'une nouvelle pathologie, nommée Leucémie T de l'adulte (ATL pour Adult T Cell Leukemia).

La similitude de ces caractéristiques avec celles des patients décrits par Robert Gallo, comme étant atteints d'une pathologie associée au rétrovirus nouvellement décrit et le fait que ce virus soit retrouvé dans les cellules de patients atteints de leucémie T de l'adulte ont conduit les deux équipes à la conclusion commune que le virus HTLV était l'agent responsable du développement de la leucémie T de l'adulte. En 1981, était donc établie la première description d'un rétrovirus humain, découverte qui a conduit quelques années plus tard à la description du rétrovirus HTLV-2 (Kalyanaraman et al., 1982) et du virus de l'immunodéficience humaine VIH (Barré-Sinoussi et al., 1983).

A ce jour, HTLV-1 reste le seul rétrovirus oncogène décrit avec certitude chez l'Homme et son implication dans le développement d'une leucémie en fait un modèle de choix pour l'étude et la compréhension de la leucémogénèse.

## 2) Epidémiologie et répartition mondiale du virus

Actuellement, on considère qu'au moins 5 à 10 millions de personnes sont infectées par le virus HTLV-1 dans le monde (Gessain and Cassar, 2012). La répartition du virus n'est pas homogène, avec des zones de fortes endémies, comme la partie sud-ouest du Japon, certaines zones des Caraïbes, certaines régions d'Amérique du Sud, du Moyen-Orient et d'Afrique sub-saharienne et quelques zones localisées en Océanie (Figure 1). En Europe, le principal foyer continental d'infection est situé en Roumanie, avec une prévalence du HTLV-1 chez les individus donnant leur sang pour la première fois de 0,05% contre 0,0048% pour le reste de l'Europe (Laperche et al., 2009).



**Figure 1 : Répartition mondiale des principaux foyers d'infection par HTLV-1**

Les estimations du nombre de cas représentées sur cette carte ont été déterminées suite à une étude menée sur 1,5 milliards d'individus originaires de régions d'endémie connues et basée sur des données concernant les femmes enceintes, les donneurs de sang ou différentes populations d'adultes.

(Gessain et Cassar 2012)

## **B) Pathologies associées au rétrovirus HTLV-1**

### **1) La leucémie T de l'adulte**

La leucémie T de l'adulte ou ATL (Adult T cell Leukemia) est une lymphoprolifération maligne et agressive de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infectés. Elle se développe chez environ 5% des individus infectés, après une longue phase asymptomatique pouvant durer plusieurs dizaines d'années. Elle se caractérise par différentes manifestations cliniques : lymphadénopathie, splénomégalie, hépatomégalie, hypercalcémie, lésions cutanées et pulmonaires, infiltrations de différents organes, ... Cette pathologie est subdivisée en différentes formes, selon la classification de Shimoyama (Shimoyama, 1991). Les formes aiguës et lymphomateuses constituent les formes les plus agressives d'ATL, avec une médiane de survie d'environ 7 mois. Les formes chroniques et indolentes présentent une médiane de survie bien supérieure, de l'ordre d'une quarantaine de mois mais peuvent évoluer vers une forme aiguë.

Les traitements des ATL restent malheureusement peu efficaces. Pour les formes agressives d'ATL, l'utilisation de combinaisons de chimiothérapies conventionnelles, utilisées principalement au Japon, n'offre qu'une faible augmentation de l'espérance de vie des patients. La chimiothérapie reste cependant le traitement de référence des formes lymphomateuses d'ATL (Marçais et al., 2013). La transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques, en complément de la chimiothérapie, permet d'augmenter davantage l'espérance de vie des patients et présente l'avantage d'un effet durable dans le temps. Le nombre de patients pouvant bénéficier de telles greffes reste néanmoins faible. En France, au Royaume Uni et aux Etats-Unis, le traitement plébiscité dans les formes leucémiques d'ATL est une combinaison de Zidovudine (aussi appelé AZT), un inhibiteur de la transcriptase inverse des rétrovirus et d'interféron alpha. Ce traitement, utilisé en première intention chez les patients atteints de formes aiguës, donne des résultats plutôt satisfaisants mais s'avère inefficace pour les formes lymphomateuses (Marçais et al., 2013).

De nouveaux traitements, basés sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre des marqueurs moléculaires spécifiques des ATL, sont également en développement. L'immunothérapie la plus prometteuse à l'heure actuelle semble le Mogamulizumab, un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur aux chimiokines CCR4, marqueur exprimé par les cellules d'ATL (Ishida et al., 2004).

Des essais sont en cours au Japon et aux Etats-Unis, notamment dans le traitement de certaines formes agressives, en complément ou non d'une chimiothérapie classique (Motohashi et al., 2013; Sekiguchi et al., 2014).

D'autres thérapies visent à inhiber la prolifération des cellules tumorales ou à induire leur apoptose, comme les inhibiteurs de Bcl2 ou la combinaison arsenic, AZT et interféron alpha (Kchour et al., 2009).

## 2) La paraparésie spastique tropicale, myélopathie associée au HTLV-1

La paraparésie spastique tropicale (TSP Tropical Spastic Paraparesis) est une pathologie inflammatoire du système nerveux central entraînant des lésions de la moelle épinière, dans la région thoracique et des pertes de la gaine de myéline des nerfs, qui se traduisent par une faiblesse des membres inférieurs, des douleurs dans le bas du dos, mais aussi des dysfonctionnements de la vessie et de l'intestin. Son association avec l'infection par le rétrovirus HTLV-1 a été décrite pour la première fois en Martinique en 1985 par une équipe française (Gessain et al., 1985) et elle se développe chez 0,2 à 3,8% des personnes infectées par le HTLV-1 avec une incidence plus forte chez les femmes (Osame et al., 1986).

Les symptômes sont liés à des effets cytopathiques sur les neurones, induits directement ou indirectement (effet bystander) par l'infection virale ou médiés par la réponse immunitaire. Par exemple, le passage de la barrière hémato-encéphalique par les lymphocytes T infectés par le HTLV-1 induit la sécrétion de chimiokines par les cellules résidentes du système nerveux central et ainsi le recrutement de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> spécifique des antigènes du HTLV-1. L'inflammation produite induit alors des dommages importants (Osame, 2002).

La plupart des traitements existants visent à diminuer les symptômes et ralentir la progression des dommages affectant le système nerveux central. Le principal traitement est ainsi l'administration d'anti-inflammatoires et principalement de corticostéroïdes comme la Prednisolone bien que leur efficacité n'ait pas pu être formellement démontrée et que les effets secondaires associés à un traitement à long terme soient nombreux (Nakagawa et al., 1996).

Une autre approche consiste en l'administration d'antiviraux. Le traitement par l'interféron alpha semble être efficace à court terme (Izumo et al., 1996). Les inhibiteurs de la transcriptase inverse, comme la zidovudine, s'avèrent inefficaces sur la charge provirale et sur les symptômes cliniques (Taylor et al., 2006).

Les thérapies ciblant directement les cellules infectées par HTLV-1 pourraient constituer des traitements prometteurs pour diminuer la charge provirale et ainsi les symptômes associés à l'inflammation. Par exemple, le récepteur aux chimiokines CCR4 est non seulement exprimé sur les cellules de patients atteints d'ATL, mais aussi sur les cellules infectées de patients atteints de TSP et les anticorps monoclonaux dirigés contre CCR4 pourraient constituer une alternative aux traitements classiques (Yamano et al., 2009).

### 3) Les autres pathologies associées au rétrovirus HTLV-1

L'infection par le rétrovirus HTLV-1 entraîne aussi le développement de pathologies inflammatoires et auto-immunes touchant d'autres organes que le système nerveux central, comme des uvéites, des dermatites, des arthrites, des myosites, des thyroïdites, le syndrome de Sjögren etc... De plus, du fait de leur statut immunitaire, on note aussi que certains patients atteints de leucémie T de l'adulte développent des infections opportunistes, comme des infections à *Strongyloides stercoralis* (Gonçalves et al., 2010).

## **C) Transmission du rétrovirus HTLV-1**

Les principales voies de contamination par le HTLV-1 sont la transmission materno-foetale, la transmission parentérale et la transmission par voie sexuelle. Quel que soit le mode de transmission, la contamination s'effectue par l'intermédiaire d'un fluide contenant des cellules infectées par HTLV-1.

### 1) La transmission materno-foetale

Dans le cas de la transmission verticale, le principal risque de contamination réside dans un allaitement prolongé, l'infection transplacentale étant limitée par le faible nombre de cellules qui passent à travers la barrière placentaire (Fujino and Nagata, 2000).

Les premiers liens entre allaitement et transmission du HTLV-1 ont été mis en évidence par des analyses épidémiologiques ; au Japon, le taux de séroconversion, suite à un allaitement supérieur à un an, était de 15,7% contre 3,6% pour des enfants nourris au biberon (Ando et al., 1987). De plus, la décision prise par l' « ATLL prevention program », dans le canton de Nagasaki, de limiter le recours à l'allaitement pour les mères infectées par HTLV-1, a permis

une diminution drastique de la transmission materno-foetale de 20,3% à 2,5% (Hino et al., 1997). La charge provirale dans le lait maternel constitue ainsi un excellent indicateur du risque de transmission materno-fœtale (Li et al., 2004).

## 2) La transmission par voie sexuelle

Le second mode d'infection est la transmission par voie sexuelle. Le risque de transmission est plus élevé d'homme à femme et d'homme à homme. Cela pourrait être lié à une plus grande concentration de lymphocytes infectés dans le sperme que dans les sécrétions vaginales. A nouveau, une charge provirale élevée constitue le facteur de risque majeur de transmission par voie sexuelle (Paiva and Casseb, 2014).

## 3) La transmission parentérale

L'infection par HTLV-1 peut se produire à la suite de transfusions sanguines de composants cellulaires sanguins infectés. Le taux de séroconversion est alors de 40%, à comparer à une absence de séroconversion après transfusion de plasma (Manns et al., 1992). La transmission par transfusion a été presque éliminée dans les pays développés suite à l'analyse systématique des produits sanguins, mise en place depuis 1986 au Japon et depuis 1991 en France par exemple (Laperche et al., 2009).

La prévalence des infections au HTLV-1 est également plus élevée chez les consommateurs de drogues injectables, signe que l'usage de drogues, injectées avec du matériel contaminé, constitue un risque de transmission élevé du HTLV-1 (Futsch et al., 2017).

Des cas de développements rapides de leucémies T de l'adulte ou de paraparésie spastique tropicale ont été signalés après des transplantations d'organes solides, issus de donneurs infectés par le HTLV-1 (Taylor, 2018).

# **D) Le devenir du virus HTLV-1 dans l'organisme : établissement de l'infection chronique**

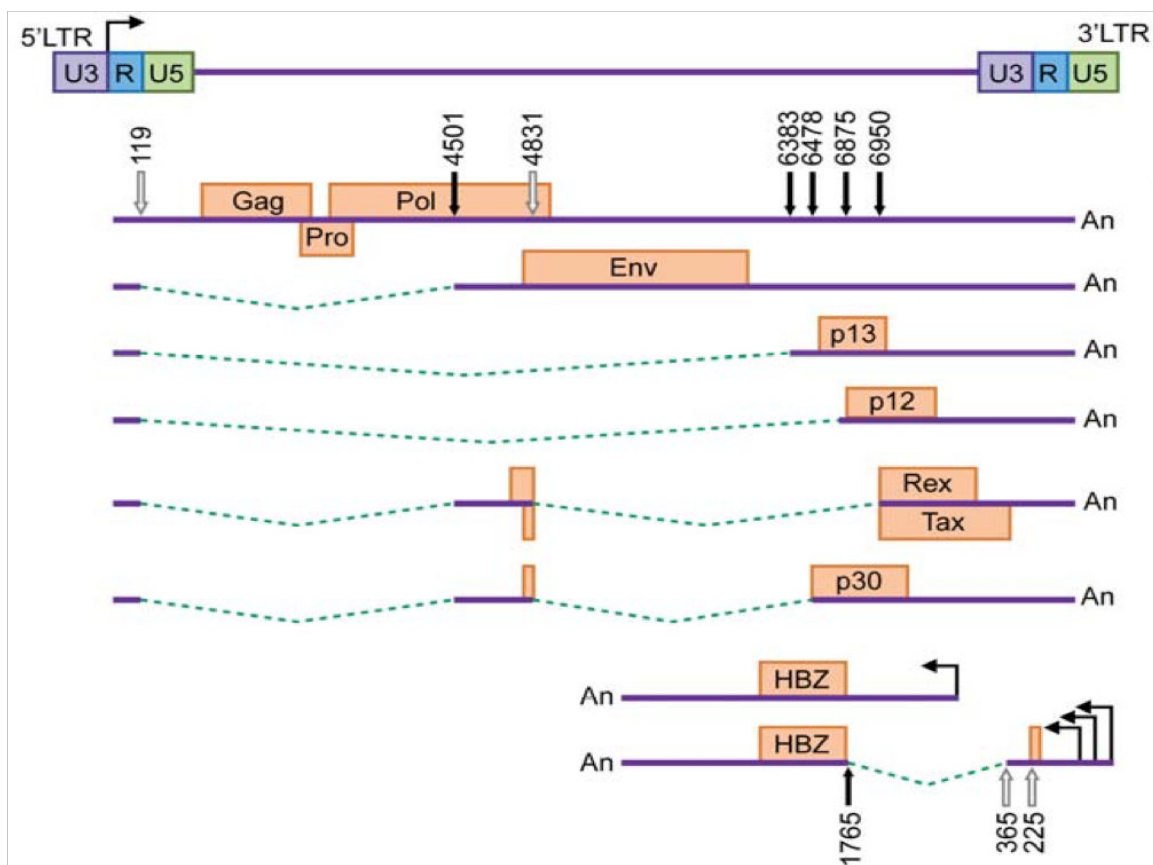
## 1) Entrée du virus et intégration du HTLV-1

L'entrée du virus HTLV-1 dans ses cellules cibles est permise, en premier lieu, par l'interaction de la glycoprotéine d'enveloppe du virus avec les molécules d'héparane sulfate

du protéoglycane qui facilitent l'adhérence du virus à la cellule (Jones et al., 2005) et la neuropiline 1 (NRP-1), le récepteur de liaison (Ghez et al., 2006). Puis dans un deuxième temps, l'interaction avec le transporteur de glucose GLUT-1 qui agit comme récepteur de fusion se met en place (Manel et al., 2003). Le caractère quasi-ubiquitaire des héparane sulfate et du récepteur GLUT1 explique peu le tropisme du virus HTLV-1, qui infecte majoritairement les lymphocytes T CD4+, mais aussi les lymphocytes T CD8+, lymphocytes B, monocytes (Koyanagi et al., 1993), macrophages, cellules dendritiques, mégakaryocytes et cellules gliales (Grant et al., 2002). La neuropiline 1, exprimée quant à elle, en surface des cellules endothéliales, des cellules dendritiques et des lymphocytes T activés, constitue en revanche un déterminant primordial du tropisme cellulaire du HTLV-1 (Pique and Jones, 2012).

Une fois dans la cellule, le génome ARN simple brin du virus est rétro-transcrit en ADN double brin et intégré. L'intégration du rétrovirus HTLV-1 dans le génome cellulaire se fait de manière relativement aléatoire (Derse et al., 2007), avec cependant un biais d'intégration dans les régions activement transcrites du génome et au niveau des sites d'initiation de la transcription et ainsi une association avec des marques épigénétiques indiquant une activation de la transcription (Niederer and Bangham, 2014).

Sous forme intégrée, le génome HTLV-1 se présente sous la forme d'un ADN double brin d'environ 9000 paires de bases encadré par deux séquences terminales répétées (LTR Long-Terminal-Repeat), contenant les régions de régulation de la transcription du provirus et divisées en trois parties : U3, R et U5. Le génome est composé des phases ouvertes de lecture (ORF Open Reading frame) classiques des rétrovirus, mais aussi d'une région spécifique du genre *deltaretrovirus*, appelée région pX et codant pour des protéines régulatrices et auxiliaires du virus (Figure 2). La transcription sens du rétrovirus HTLV-1 contrôlée par le LTR5' du virus donne naissance à des transcrits coiffés et poly-adénylés, le site de poly-adénylation de la transcription sens étant présent dans le LTR3', au début de la région U5 (Kannian and Green, 2010).



**Figure 2 : Le génome intégré du rétrovirus HTLV-1 : un génome rétroviral de type complexe**

Une fois intégré dans la cellule hôte, le génome du rétrovirus HTLV-1 se présente sous la forme d'une séquence d'ADN encadrée par deux répétitions, les LTR identiques en séquence et comportant les promoteurs contrôlant la transcription des ARN viraux ainsi que le signal de polyadénylation utilisé pour la terminaison des ARN sens. Ce génome présente les phases ouvertes de lecture classiques des rétrovirus : Gag, Pro, Pol et Env mais aussi une région pX caractéristique des deltarétrovirus et codant pour des protéines auxiliaires et régulatrices. Ce génome présente également une phase ouverte de lecture codée sur le brin antisens.

Un premier ARN non épissé et de longueur totale, appelé ARN génomique, va pouvoir être encapsidé et servir à l'infection de nouvelles cellules. Cet ARN présente également les phases ouvertes de lecture Gag Pol et Pro qui vont pouvoir être traduites et donner naissance aux protéines de capsid, de matrice et aux enzymes rétrovirales par glissement du ribosome.

Les ARN codant pour les protéines d'enveloppe, les protéines p13, p12 sont mono-épissés tandis que les ARNs codant pour les protéines régulatrices Tax et Rex ainsi que la protéine p30 sont doublement épissés.

La transcription antisens du HTLV-1, contrôlée par le LTR3', donne naissance à deux transcrit, l'un épissé, l'autre non.

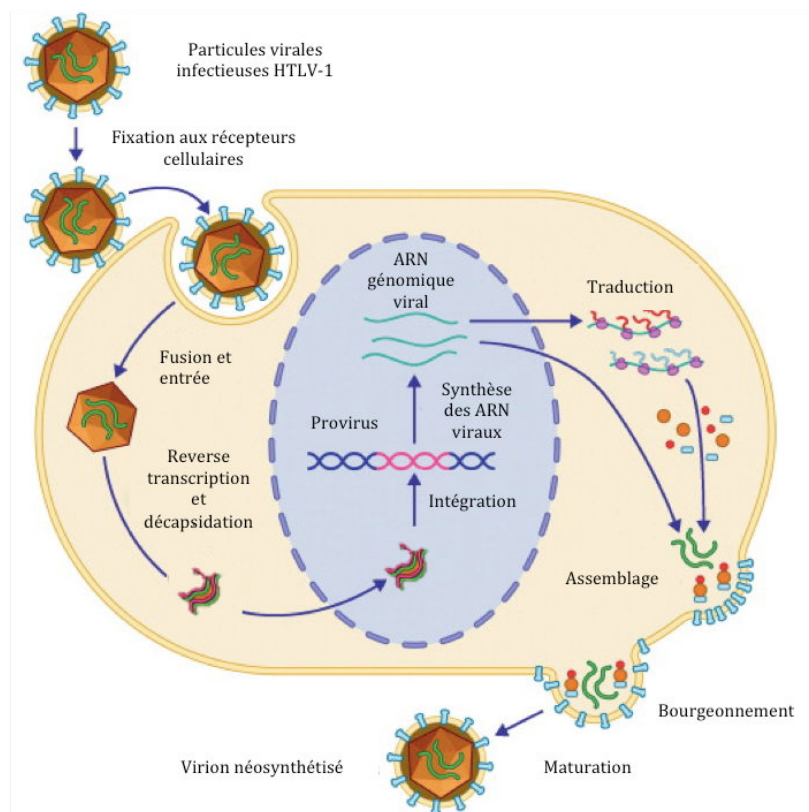
Adaptée de Kannian et Green 2010

L'ARN couvrant l'intégralité du génome (ARN génomique viral) code pour la protéine Gag p55 clivée par la suite en protéines de matrice p19, de capsid p24 et de nucléocapsid p15. Ce transcrit donne également naissance à la protéase, à l'intégrase et à la transcriptase inverse du HTLV-1, suite à deux changements de phase de lecture du ribosome (Johnson et al., 2001). Un ARN simplement épissé conduit à la production de la protéine d'enveloppe. Les protéines régulatrices, Tax et Rex sont elles traduites à partir de transcrits doublement épissés et codées,

respectivement, par les ORF IV et III. La région pX code également pour les protéines auxiliaires du virus : p30, p13, p12 et p8.

En 1989, Larocca et ses collaborateurs suspectent l'existence d'une transcription anti-sens chez le rétrovirus HTLV-1 (Larocca et al., 1989), mais ce n'est qu'en 2002 que son existence est confirmée et que les transcrits HBZ (HTLV-1 b-Zip Factor) sont décrits (Gaudray et al., 2002). La transcription anti-sens du HTLV-1 consiste en deux transcrits distincts, l'un épissé (sHBZ, SI-HBZ ou SP1) et l'autre non (usHBZ), partageant le même deuxième exon et permettant, après traduction, la production de deux protéines différant de 7 acides aminés dans leur partie amino-terminale.

Une fois toutes les protéines structurales du virus produites et le génome ARN synthétisé, de nouvelles particules virales peuvent être formées (Figure 3).



**Figure 3 : Cycle viral simplifié du rétrovirus HTLV-1**

Les particules virales libres interagissent par l'intermédiaire de leurs protéines d'enveloppe avec les récepteurs du virus (Molécules d'Héparane sulfate, Neuropiline 1 et GLUT-1). L'enveloppe lipidique du virus fusionne ensuite avec la membrane plasmique de la cellule cible, libérant dans le cytoplasme la capside contenant les deux molécules d'ARN du virus et les protéines non structurales. Suivent ensuite la décapsidation et la transcription inverse du génome viral ARN en génome ADN double brin qui pourra ensuite être intégré dans le génome de la cellule hôte grâce à l'activité intégrase. Une fois intégré, la transcription des ARNs viraux se produit. Les ARNs sont ensuite traduits en protéines structurales et non structurales. L'ARN génomique viral, de longueur totale ainsi que les protéines structurales sont acheminées à la membrane et forment de nouvelles particules virales par bourgeonnement à la membrane plasmique.

Adaptée de Lairmore et al. 2012

## 2) Evolution de l'infection *in vivo* et devenir des cellules infectées

Chez les individus infectés, on ne détecte pas ou peu de particules virales libres (Demontis et al., 2015) et il a été montré, de plus, que ces particules virales sont peu infectieuses *in vitro*. Le virus se propage donc selon deux mécanismes majoritaires : la transmission de cellule à cellule, privilégiée lors de la primo-infection puis l'expansion clonale (Mortreux et al., 2001).

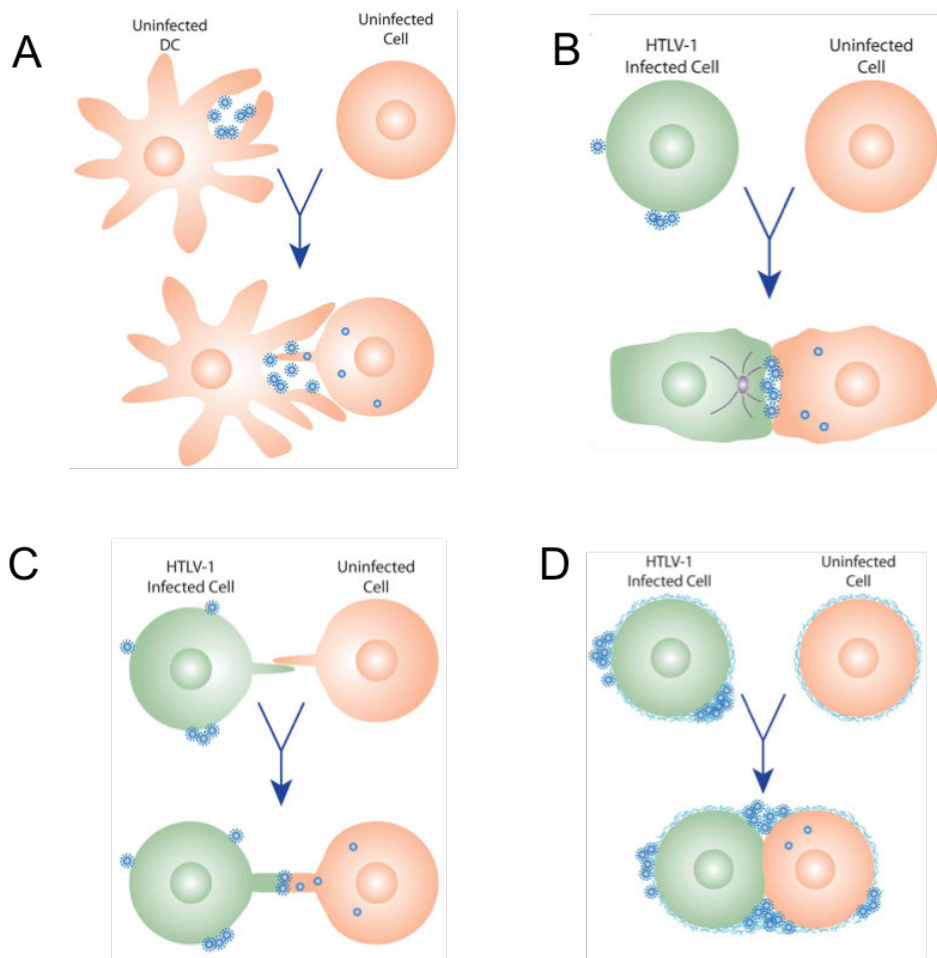
### *a) La transmission cellule-cellule des particules virales HTLV-1*

Dans un premier temps, il avait été montré que des virions libres HTLV-1 pouvaient infecter certains types cellulaires et en particulier les cellules dendritiques qui rendraient ensuite possible l'infection des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Jones et al., 2008). Ces résultats ont depuis été remis en cause. Il a en effet été montré que l'infection efficace des cellules dendritiques nécessitait la présence de biofilms contenant des particules virales (Alais et al., 2015).

Pour les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, une infection efficace nécessite la transmission de particules virales d'une cellule infectée au lymphocyte.

Il existe différents modes de transmissions virales d'une cellule à l'autre. La formation d'une synapse virologique, entre un lymphocyte T infecté et un lymphocyte T non infecté, se traduit par une réorganisation du cytosquelette et une accumulation des protéines de capsid, d'enveloppe et de l'ARN génomique au niveau de la zone de contact (Igakura et al., 2003). La formation de cette synapse permet d'accroître l'efficacité de la transmission, en concentrant les particules virales dans l'espace inter-synaptique, augmentant ainsi la probabilité de rencontre entre la protéine d'enveloppe du virus et ses récepteurs (Pique and Jones, 2012).

Le virus peut également se propager par l'intermédiaire de filopodes ; protrusions membranaires qui présentent des particules virales à leur surface, ou de nanotubes, qui se forment naturellement entre deux cellules immunitaires à la suite d'un contact et peuvent contenir des particules virales (Pique and Jones, 2012). L'existence de biofilms, matrices extracellulaires spécifiques, synthétisées en surface des cellules et pouvant contenir des virions, facilite également la transmission du virus d'une cellule à l'autre (Figure 4).



**Figure 4 : Les différentes voies de transmission cellulaire du HTLV-1**

A : L'infection directe des cellules dendritiques par des particules virales libres au sein de virofilms est possible. Les cellules dendritiques en leur qualité de cellules présentatrices de l'antigène peuvent aussi transporter des particules libres à leur surface et faciliter l'infection de lymphocytes.

B: La formation d'une synapse virologique entre un lymphocyte T infecté et un lymphocyte non infecté s'accompagne d'une polarisation du cytosquelette en direction de la synapse. Au niveau de la synapse, les protéines virales se concentrent, facilitant la transmission efficace de nouvelles particules virales.

C : L'établissement de filopodes et de nanotubes entre des lymphocytes, processus normalement observé après contact entre deux lymphocytes, permet le passage de particules virales portées en surface des filopodes ou contenues dans les nanotubes.

D : L'existence de virofilms, matrices extracellulaires riches en glycoprotéines et contenant des particules virales constitue un autre mode de transmission cellule-cellule

Adaptée de Pique et Jones 2012

Cependant, la grande stabilité de la séquence du génome HTLV, ainsi que le fait que des inhibiteurs de la transcriptase inverse n'ont que peu d'effet sur la charge provirale *in vivo* (Taylor et al., 2006), laissent supposer que la dissémination du virus dans l'organisme s'effectue principalement par prolifération des lymphocytes T infectés, phénomène permis par leur immortalisation.

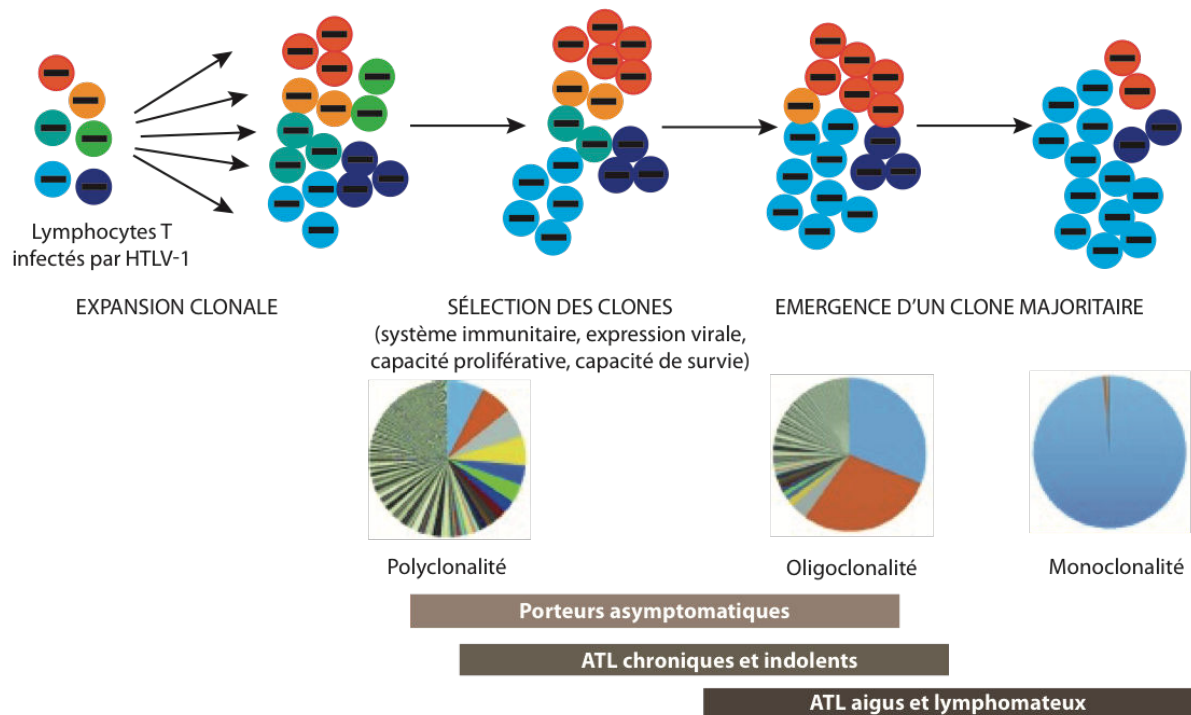
### *b) Expansion clonale et réponse immunitaire dirigée contre le HTLV-1*

Une fois le génome du virus intégré dans le génome cellulaire, sous forme d'ADN double brin, celui-ci va être dupliqué en même temps que l'ADN cellulaire, lors de la phase S puis divisé entre deux cellules filles identiques, lors de la mitose. Ce mécanisme explique la prolifération clonale des lymphocytes T infectés par le HTLV-1. Les différents clones vont ensuite se propager et survivre selon une pression de sélection exercée entre autres par le système immunitaire.

Chez les individus infectés par le HTLV-1, on observe la mise en place d'une réponse humorale composée d'immunoglobulines IgG, IgA et IgM, dirigée principalement contre les protéines Tax, Gag et Env (Kira et al., 1992). La concentration en anticorps dirigés contre HTLV-1 est, par ailleurs, corrélée avec la charge provirale (Ishihara et al., 1994).

En plus de cette réponse humorale, une réponse T cytotoxique efficace est mise en place. Les lymphocytes T cytotoxiques identifiés reconnaissent principalement des épitopes de l'antigène Tax, protéine la plus immunogène du virus vis-à-vis des LT cytotoxiques (Goon et al., 2004). Des réponses humorales et cellulaires dirigées contre la protéine HBZ ont pu également être mises en évidence, chez certains individus infectés (Enose-Akahata et al., 2013; Macnamara et al., 2010). L'ensemble de ces réponses ne permet pas l'éradication du virus *in vivo* mais entraîne une sélection des clones de lymphocytes T infectés potentiellement les moins immunogènes. Par ailleurs, l'expression même des deux oncoprotéines virales Tax et HBZ (effets qui seront détaillés ultérieurement) participe également à la sélection clonale.

Selon la pathologie développée, on observe une abondance et une répartition des clones de lymphocytes infectés, différentes. En effet, alors que l'on observe un grand nombre de clones différents, chez les patients asymptomatiques et atteints de TSP, dans 80% des cas d'ATL, un seul clone malin domine avec l'existence d'une sous population de clones d'abondance moindre, formant une répartition oligoclonale des lymphocytes T infectées (Firouzi et al., 2017; Watanabe, 2017) (Figure 5).



**Figure 5 : Le virus HTLV-1 se propage par expansion clonale puis les clones sont sélectionnés**

Une fois les lymphocytes T infectés par le HTLV-1 on observe leur forte prolifération qui permet la propagation du virus par expansion clonale. La réponse immunitaire dirigée contre les protéines virales et notamment Tax, l'expression virale elle-même ainsi que les capacités des lymphocytes T à proliférer et à survivre favorisent l'émergence de certains clones par rapport à d'autres. A ce stade, observé chez les patients asymptomatiques, la population de lymphocytes T infectés par HTLV-1 est polyclonale avec de très nombreux clones.

Dans certains cas on observe qu'un petit nombre de clones, voire un seul clone, deviennent largement majoritaires. C'est ce qu'on observe dans les cas d'ATL avec une association entre la monoclonalité et les formes les plus sévères de leucémie T de l'adulte.

Adaptée de Watanabe 2017

Le rétrovirus HTLV-1 constitue l'unique rétrovirus oncogène, décrit à ce jour chez l'Homme. Son pouvoir oncogène s'explique principalement par l'expression de deux oncoprotéines virales, Tax et HBZ, dont les effets cellulaires sont détaillés dans la section suivante.

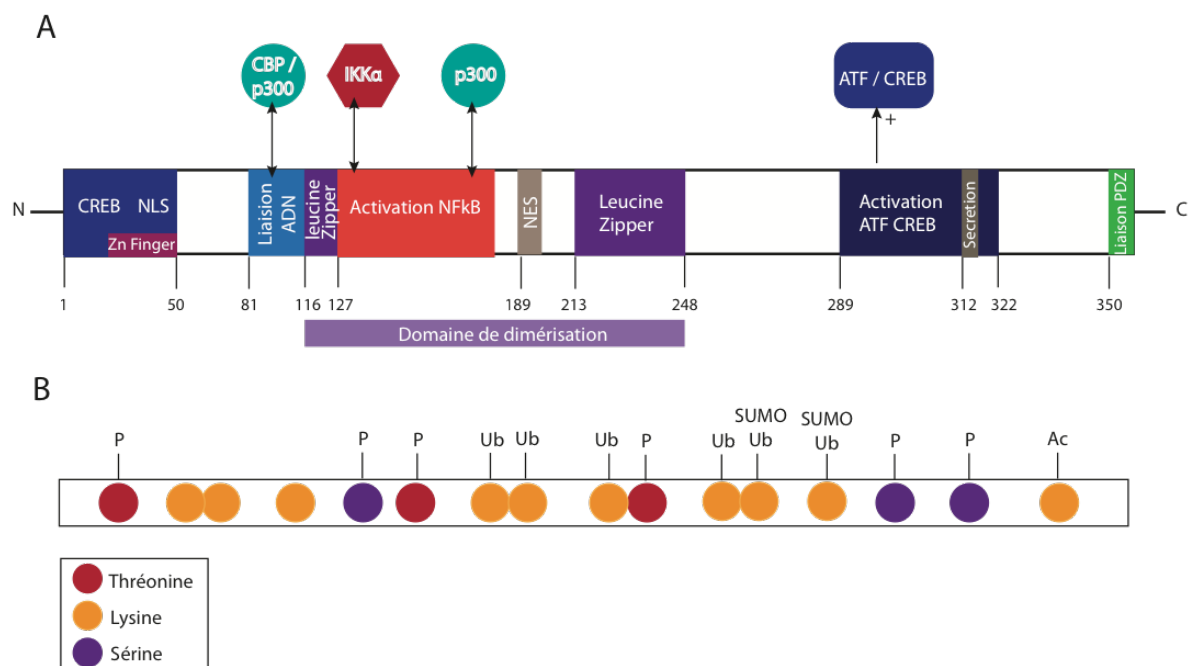
## II) Oncogenèse associée à HTLV-1

### A) Tax, une oncoprotéine pléiotrope

#### 1) La protéine Tax : structure, localisation subcellulaire et modifications post-traductionnelles

La protéine Tax est une protéine de 353 acides aminés et 40kDa, affectant le fonctionnement de nombreuses voies cellulaires et modulant l'expression de nombreux gènes.

Elle présente plusieurs domaines permettant son interaction avec de nombreuses protéines. Dans sa partie centrale, sont présents deux domaines leucine zipper, permettant son homodimérisation. La protéine Tax présente, à la fois, un signal de localisation nucléaire NLS, dans sa partie amino-terminale (des acides aminés 18 à 52) (Smith and Greene, 1992) et un signal d'export nucléaire NES entre les acides aminés 188 à 202 (Alefantis et al., 2003) (Figure 6A).



**Figure 6 : Structure de la protéine Tax**

**A :** Organisation en domaines fonctionnels de la protéine Tax. La protéine Tax présente des signaux de localisation nucléaire et d'export nucléaire qui vont favoriser une localisation nucléaire ou cytoplasmique selon les conditions. Un peptide responsable de sa sécrétion extracellulaire est présent à l'extrémité C-terminale de la protéine. Les domaines leucine zipper vont permettre la dimérisation de la protéine nécessaire à son fonctionnement. Plusieurs domaines fonctionnels interviennent dans l'interaction de Tax avec de nombreux partenaires cellulaires et lui offrent la possibilité d'interférer avec de multiples voies cellulaires.

**B :** Les modifications post-traductionnelles de la protéine Tax. Tax possède un certain nombre de résidus d'acides aminés qui peuvent subir des phosphorylations, acétylations, ubiquitylations et sumoylations. Ces modifications vont réguler la localisation subcellulaire de Tax, sa capacité à interagir avec différentes protéines et donc son activité.

Adaptée de Shirinian et al. 2013

On observe ainsi une navette nucléo-cytoplasmique de la protéine Tax, en fonction de différents stimuli et de ses modifications post-traductionnelles (Burton et al., 2000).

Dans le noyau, Tax est retrouvée au niveau de structures, appelées corps nucléaires (Semmes and Jeang, 1996), au sein desquelles sont présents des éléments de la machinerie d'épissage, de transcription comme l'ARN polymérase II et CDK8, ainsi que des ARNs et des protéines

de la voie NF-kappaB (p50, RelA) (Bex et al., 1997). Un signal de localisation, nécessaire et suffisant pour l'adressage de Tax au sein de ces corps nucléaires, appelé TSLS (Tax speckles structures localisation signal) et présent entre les acides aminés 50 et 75, a été mis en évidence.

Au sein du cytoplasme, Tax se trouve au niveau du cytosol et des éléments de la voie sécrétoire (reticulum endoplasmique, appareil de Golgi).

Dans certaines conditions, Tax peut être activement sécrétée dans le milieu extracellulaire (Alefantis et al., 2005).

La protéine Tax peut subir un certain nombre de modifications post-traductionnelles, comme des phosphorylations, acétylations, ubiquitinylation ou sumoylation. (Figure 6B) La phosphorylation de Tax est possible au niveau de trois résidus Thréonine et trois résidus Sérine. Les résidus Sérine en position 300 et 301 constituent le site majeur de phosphorylation de Tax. La phosphorylation d'un de ces résidus au moins est requise pour la localisation de Tax dans les corps nucléaires, ainsi que l'ajout des autres types de modifications post-traductionnelles. En particulier, cette modification permet l'interaction de Tax avec l'acétyltransférase p300 et ainsi l'acétylation de Tax au niveau de la lysine 346 (Lodewick et al., 2009). Les autres phosphorylations possibles interviennent dans la capacité de Tax à activer la voie NF-kappaB ou dans sa stabilité (Jeong et al., 2009). La protéine Tax présente dix résidus Lysine, que l'on peut numéroté de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale. Les résidus Lysine K4, K5, K6, K7 et K8 peuvent être ubiquitinylés alors que les résidus K7 et K8 peuvent être sumoylés. L'ubiquitinylation de Tax régule à la fois sa localisation subcellulaire et sa capacité d'activation de la voie NF-kappaB (Nasr et al., 2006; Shirinian et al., 2013). La sumoylation de Tax est également impliquée dans la régulation de la localisation subcellulaire de Tax mais n'est pas nécessaire à l'activation de la voie NF-kappaB (Pène et al., 2014).

L'interaction de Tax avec la protéine chaperonne Hsp90 permet, par ailleurs, d'augmenter la durée de vie de la protéine, en empêchant sa dégradation par le protéasome (Gao and Harhaj, 2013).

L'oncogénicité de la protéine Tax a été démontrée *in vitro*, par sa capacité à induire l'immortalisation de lymphocytes T humains activés et transduits avec un vecteur codant pour la région pX (Grassmann et al., 1989). De plus, Bellon et al. sont parvenus à immortaliser des PBMC suite à l'expression de la protéine Tax seule, bien que cet événement soit rare (Bellon

et al., 2010). *In vivo*, des souris, exprimant Tax sous contrôle d'un promoteur spécifique des thymocytes, ont développé des tumeurs s'accompagnant de symptômes cliniques, proches de ceux observés chez les patients atteints de leucémie T de l'adulte (Hasegawa et al., 2006), confirmant ainsi le caractère oncogène de Tax dans un modèle murin.

## 2) Tax induit l'activation et la prolifération des lymphocytes T infectés conduisant à leur immortalisation

Par ses capacités à interagir avec de nombreux partenaires cellulaires, la protéine Tax module l'activité de voies de signalisation cellulaires impliquées dans la prolifération et la survie des cellules. La principale voie activée par la protéine Tax est la voie NF- $\kappa$ B (Tableau 1). Il a été montré que le mutant TaxM22, déficient pour l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, n'est plus capable d'immortaliser des lymphocytes dans un modèle d'infection *in vitro* (Robek and Ratner, 1999). Tax induit également une activation constitutive des voies PI3kinase et MAP (Mitogen Associated Protein) kinase et de la transcription SRF (Serum Responsive Factor) -dépendante (Tableau 1).

Tableau 1 : Voies de signalisation cellulaire activées par la protéine Tax du HTLV-1

| <b>Voies modulées par Tax</b>             | <b>Référence</b>                          | <b>Cibles de Tax</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                  | <b>Conséquences cellulaires</b>                                                                                                            |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><u>Voie NF<math>\kappa</math>B</u></b> | Pour revue voir : (Harhaj and Giam, 2018) | <b><u>Voie canonique :</u></b><br>Favorise la translocation nucléaire de RelA/p50 par l'activation de la kinase IKK et la dégradation protéasomale des protéines I $\kappa$ B<br><br><b><u>Voie non canonique</u></b><br>Favorise le clivage de p100 en p52 et la translocation nucléaire de p52/RelB | Activation de la transcription de gènes impliqués dans l'inhibition de la mort cellulaire et favorisant la prolifération des lymphocytes T |
| <b><u>Voie PI3kinase</u></b>              | (Peloponese et al., 2006)                 | Tax active la PI3 kinase par son interaction avec p85<br><br>Tax inhibe la phosphatase PTEN<br>→ Activation constitutive de                                                                                                                                                                           | Inhibition de l'apoptose, activation de hTERT                                                                                              |

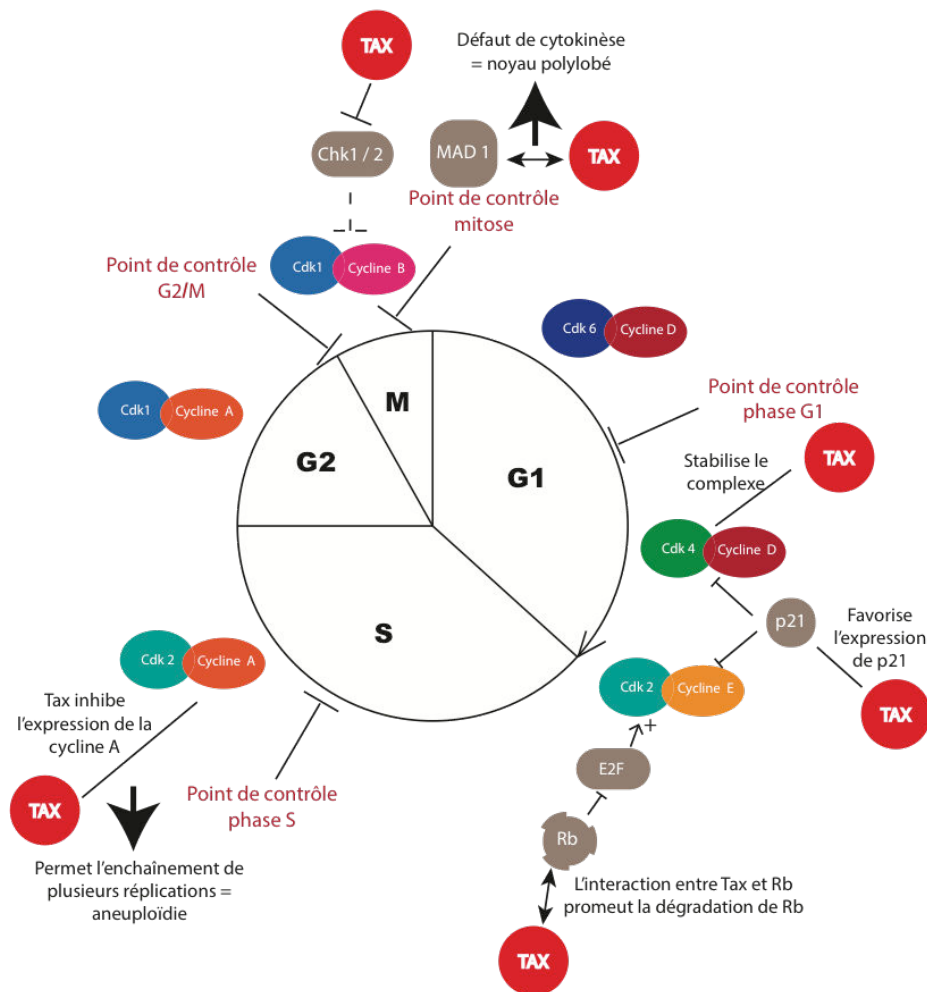
|                                                  |                                       |                                                                                                                  |                                                                     |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
|                                                  |                                       | Akt                                                                                                              |                                                                     |
| <b><u>Voie des MAPkinases</u></b>                | (Saggiaro, 2011; Suzuki et al., 2007) | Activation de la kinase TAK1<br>→ Activation voie JNK<br>Interaction Tax-RasGTP →<br>Activation voie Raf/MEK/Erk | Inhibition de l'apoptose et prolifération cellulaire                |
| <b><u>Voie SRF (Serum responsive factor)</u></b> | (Winter and Marriott, 2007)           | Augmentation liaison SRF à l'ADN et modification de l'affinité pour ses séquences cibles                         | Activation des gènes c-fos, Egr-1, Egr-2, c-Jun- Fra1- JunD, etc... |
| <b><u>Voie AP-1</u></b>                          | (Gazon et al., 2017)                  | Régulation post-traductionnelle de la liaison des facteurs AP-1 à l'ADN et de leur activité                      | Augmentation de la transcription des cibles des facteurs AP-1       |
| <b><u>Voie Wnt</u></b>                           | (Ma et al., 2013)                     | Interaction de Tax avec DAPLE ce qui a pour effet d'activer la voie canonique Wnt                                | Prolifération cellulaire accrue                                     |

L'activation constitutive de ces voies entraîne une prolifération importante des lymphocytes T infectés et leur résistance à l'apoptose. En effet, l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et de Akt entraîne l'expression de protéines inhibitrices de l'apoptose, les IAPs qui vont limiter l'activation des caspases, mais aussi de la protéine Bcl-XL qui inhibe Bax-Bak. Indépendamment de l'activation de la voie NF- $\kappa$ B, Tax inhibe l'activité de la protéine p53 capable d'induire l'entrée en apoptose (Taylor and Nicot, 2008). Cependant, l'hyperactivation de la voie NF- $\kappa$ B a aussi pour effet d'induire la sénescence des cellules exprimant Tax (Ho et al., 2012) et seules les cellules qui dépassent ce stade de sénescence, parviennent à survivre. Nous verrons par la suite que la protéine HBZ participe à la résistance à la sénescence induite par Tax.

### 3) Tax dérégule le cycle cellulaire et favorise l'apparition d'anomalies génétiques

L'expression de Tax entraîne une instabilité chromosomique ainsi qu'une augmentation des altérations génétiques. Cela peut s'expliquer, à la fois par la dérégulation par Tax de la progression dans le cycle cellulaire et de ses différents points de contrôle (checkpoint), mais aussi par l'action de Tax sur les voies de réparations de l'ADN. Tax agit sur les différentes phases du cycle cellulaire, que ce soit par la stabilisation de certains complexes Cycline / Cdk (Cyclin-dependant-kinase), l'activation transcriptionnelle des gènes codant certaines cyclines

ou Cdk ou l'inhibition de protéines, exerçant un frein sur la progression du cycle cellulaire (Marriott and Semmes, 2005). Un certain nombre des effets de Tax sur le cycle cellulaire sont résumés en figure 7.



**Figure 7 : Tax cible de nombreux acteurs du cycle cellulaire**

Afin d'accélérer la progression dans le cycle cellulaire, Tax favorise la formation de complexes Cycline/Cdk :

- Tax stabilise le complexe Cycline D/Cdk4
- En inhibant Chk1/Chk2, Tax favorise la formation du complexe Cycline B/Cdk1
- Tax induit la dégradation de Rb ce qui favorise la formation du complexe Cycline E/Cdk2

Paradoxalement, Tax défavorise également l'existence de certains complexes :

- Tax augmente l'expression de p21 inhibant la formation des complexes Cycline D/Cdk4 et Cycline E/Cdk2
- Tax inhibe l'expression de la cycline A. Cela permet la réalisation de plusieurs réplifications successives et participe à l'aneuploïdie des cellules infectées par HTLV-1

Enfin Tax perturbe le fonctionnement des points de contrôle du cycle cellulaire notamment les points de contrôle de la mitose, de la phase S et de la transition G2/M

D'après Marriott 2005

Pour résumer, l'action de Tax sur le cycle cellulaire entraîne une progression accélérée en phase G1, ainsi qu'un défaut des points de contrôle G1/S, de la phase S, G2/M et de la mitose. Cela a pour conséquence, une aneuploïdie des cellules, une instabilité chromosomique accrue, passant par la formation de micronuclei, ainsi qu'un défaut de réparation des lésions de

l'ADN. Par sa capacité à inhiber la transcription de la télomérase hTERT, effet paradoxal pour une oncoprotéine, Tax pourrait également entraîner une augmentation de l'instabilité chromosomique (Gabet et al., 2003).

De plus, Tax inhibe la plupart des voies de réparation des dommages à l'ADN (Tableau 2).

Tableau 2 : Voies de réparation de l'ADN perturbées par la protéine Tax

| <b>Voies de réparation perturbées</b>           | <b>Références</b>                        | <b>Cibles de Tax</b>                                                                                                                                                  | <b>Conséquences fonctionnelles</b>                                                                                                                                          |
|-------------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b><u>Base Excision Repair (BER)</u></b>        | (Jeang et al., 1990)                     | Inhibition de l'expression de l'ADN polymérase $\beta$                                                                                                                | Défaut de réparation des mésappariements                                                                                                                                    |
| <b><u>Nucleotide Excision Repair (NER)</u></b>  | (Kao and Marriott, 1999)                 | Transactivation du promoteur du gène PCNA ce qui permet le fonctionnement de l'ADN polymérase $\delta$ et ce malgré la présence de lésions de l'ADN                   | Augmentation de l'incorporation de nucléotides erronés                                                                                                                      |
| <b><u>Recombinaison homologue</u></b>           | (Baydoun et al., 2012)                   | Séquestration des facteurs BRCA1, MDC1 (Mediator of DNA damage checkpoint protein 1), Chk2, etc... au niveau de foci non associés à des cassures double brin de l'ADN | Diminution de 80% de la réparation des cassures double brin par recombinaison homologue.<br>→ Réparation des cassures double brin par NHEJ favorisée bien que moins fidèle. |
| <b><u>Non Homologous End Joining (NHEJ)</u></b> | (Ducu et al., 2011; Durkin et al., 2008) | Inhibition de l'expression de la sous-unité Ku80 de la DNA-PK<br>Mais augmentation de l'activité de la DNA-PK par phosphorylation                                     | Réparation par NHEJ moins ciblée                                                                                                                                            |

En plus d'inhiber la réparation de cassures, potentiellement induites par des facteurs exogènes, Tax favorise également l'apparition de lésions de l'ADN, en augmentant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et donc le stress oxydant (Baydoun et al., 2015; Kinjo et al., 2010).

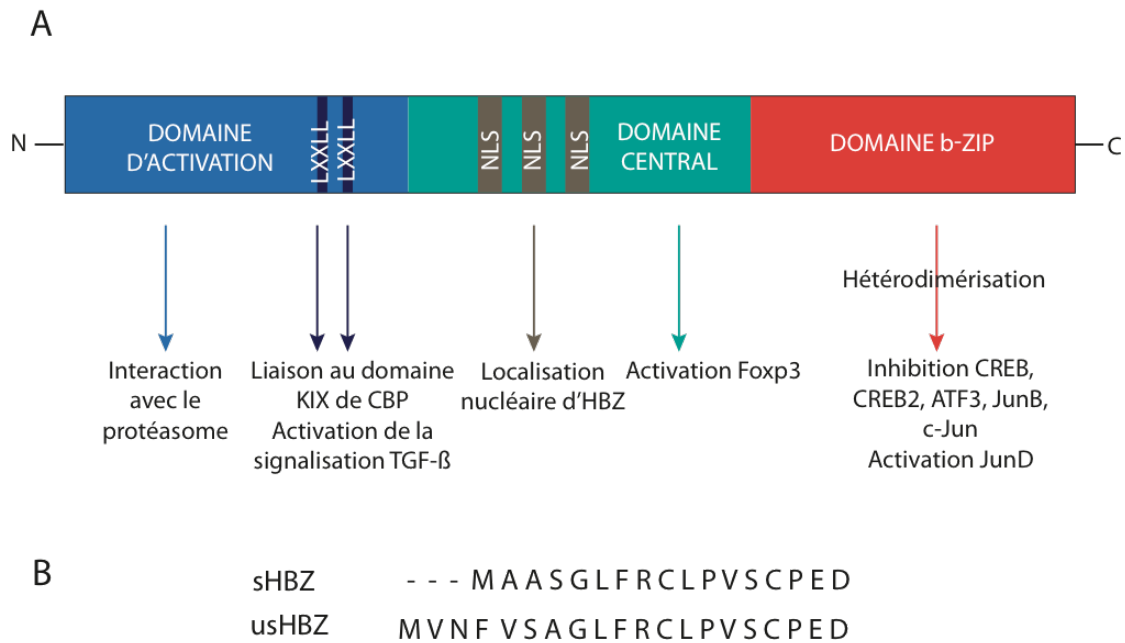
## **B) L'oncoprotéine HBZ**

### **1) Généralités sur la protéine HBZ**

Même si l'existence d'une transcription anti-sens pour HTLV-1 avait été supposée depuis 1989 (Larocca et al., 1989), la description de la protéine HBZ n'a été formellement réalisée qu'en 2002 (Gaudray et al., 2002). En effet, Gaudray et al. caractérisent alors une protéine de 31kDa, capable d'interagir avec le facteur CREB2 et présentant toutes les propriétés d'un facteur b-Zip. La protéine décrite alors, est principalement le produit de la transcription de la forme épissée du transcrit HBZ, appelé maintenant sHBZ.

Il existe deux ARN messagers HBZ majoritaires, l'un épissé, sHBZ, l'autre non, usHBZ, qui une fois transcrits, permettent la formation de deux protéines de respectivement 206 et 209 acides aminés, ne différant que de 7 acides aminés dans leur partie N-terminale (MAAS pour sHBZ contre MVNFSVA pour usHBZ, voir figure 8). Le transcrit usHBZ semblant être moins produit et la protéine en résultant, moins stable, la plupart des études sur les propriétés d'HBZ s'intéressent à la forme épissée de l'ARN et à la protéine qui en découle (Yoshida et al., 2008). Ainsi les fonctions qui seront décrites, par la suite, sont celles de la protéine issue du transcrit sHBZ.

HBZ, pour HTLV-1 bZip, possède un domaine leucine zipper, composé de résidus hydrophobes formant une hélice  $\alpha$ , permettant la dimérisation avec les facteurs b-Zip cellulaires. Cette structure leucine zipper s'accompagne d'un domaine basique, riche en résidus Arginine, facilitant la liaison à l'ADN. Enfin, à l'extrémité amino-terminale de la protéine, se trouve un domaine d'activation de la transcription (figure 8) (Ma et al., 2016).



**Figure 8 : Organisation en domaine des protéines HBZ**

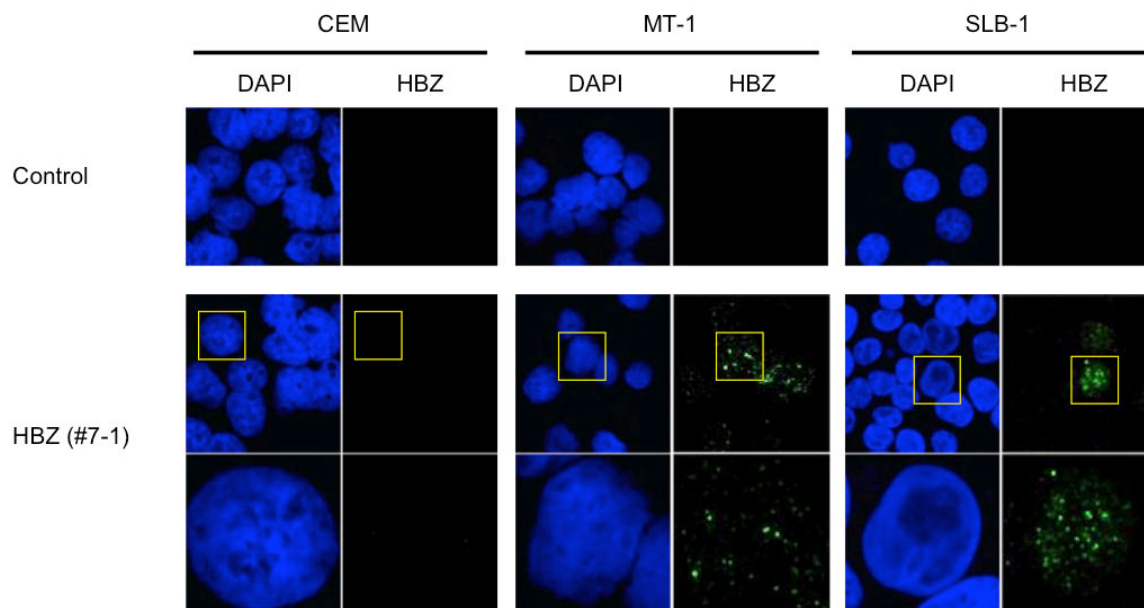
A : Représentation schématique des domaines des protéines HBZ. La protéine HBZ qu'elle soit issue du transcrit sHBZ ou usHBZ se compose de trois domaines fonctionnels distincts. A l'extrémité N-ter, le domaine d'activation intervient dans l'interaction avec la sous-unité 26S du protéasome et avec le domaine KIX de CPB grâce à deux motifs LXXLL. Ce domaine est également indispensable pour l'activation de la voie TGF- $\beta$ . Le domaine central comporte les trois signaux de localisation nucléaire (NLS) et participe à l'activation de Foxp3. Le domaine b-Zip caractéristique des facteurs b-Zip cellulaires est localisé en C-ter de la protéine. Il permet l'hétérodimérisation d'HBZ avec les facteurs b-Zip cellulaires ce qui a pour effet de diminuer leur liaison à l'ADN. L'hétérodimérisation avec JunD augmente au contraire son activité.

B : Séquence en acides aminés de l'extrémité N-terminale des protéines s et usHBZ

Adaptée de Ma et al. 2016

Peu de modifications post-traductionnelles d'HBZ ont pu être caractérisées et impliquées dans la régulation de sa fonction (Dissinger et al., 2014). Cependant, l'interaction d'HBZ avec l'ubiquitine ligase UBR5 et l'ubiquitinylation d'HBZ semble directement impliquées dans la régulation de sa stabilité (Panfil et al., 2018).

HBZ possède trois signaux de localisation nucléaire (NLS) dans son domaine central (Hivin et al., 2005). Le développement d'anticorps, permettant sa détection en imagerie de fluorescence, a permis de mettre en évidence l'accumulation nucléaire d'HBZ et sa distribution granulaire (Shiohama et al., 2016) (figure 9).



**Figure 9 : HBZ présente une localisation nucléaire**

Par immunofluorescence dans des lignées dérivées de cellules ATL (MT-1 et SLB-1), il est montré qu'HBZ (en vert sur les images) présente une distribution nucléaire ponctuelle laissant supposer qu'HBZ s'accumule au sein de structures granulaires particulières, au niveau nucléaire (le noyau étant repéré par marquage au DAPI).  
Issue de Shiohama et al. 2016

Plus récemment, l'équipe de Roberto Accolla a montré que si dans les cellules de patients atteints de leucémie T de l'adulte, HBZ est bien localisée de manière nucléaire, dans les cellules de patients atteints de TSP, HBZ semble présenter une distribution cytoplasmique (Baratella et al., 2017). Ces résultats suggéreraient que la localisation subcellulaire d'HBZ pourrait partiellement expliquer le développement des différentes pathologies associées au rétrovirus HTLV-1.

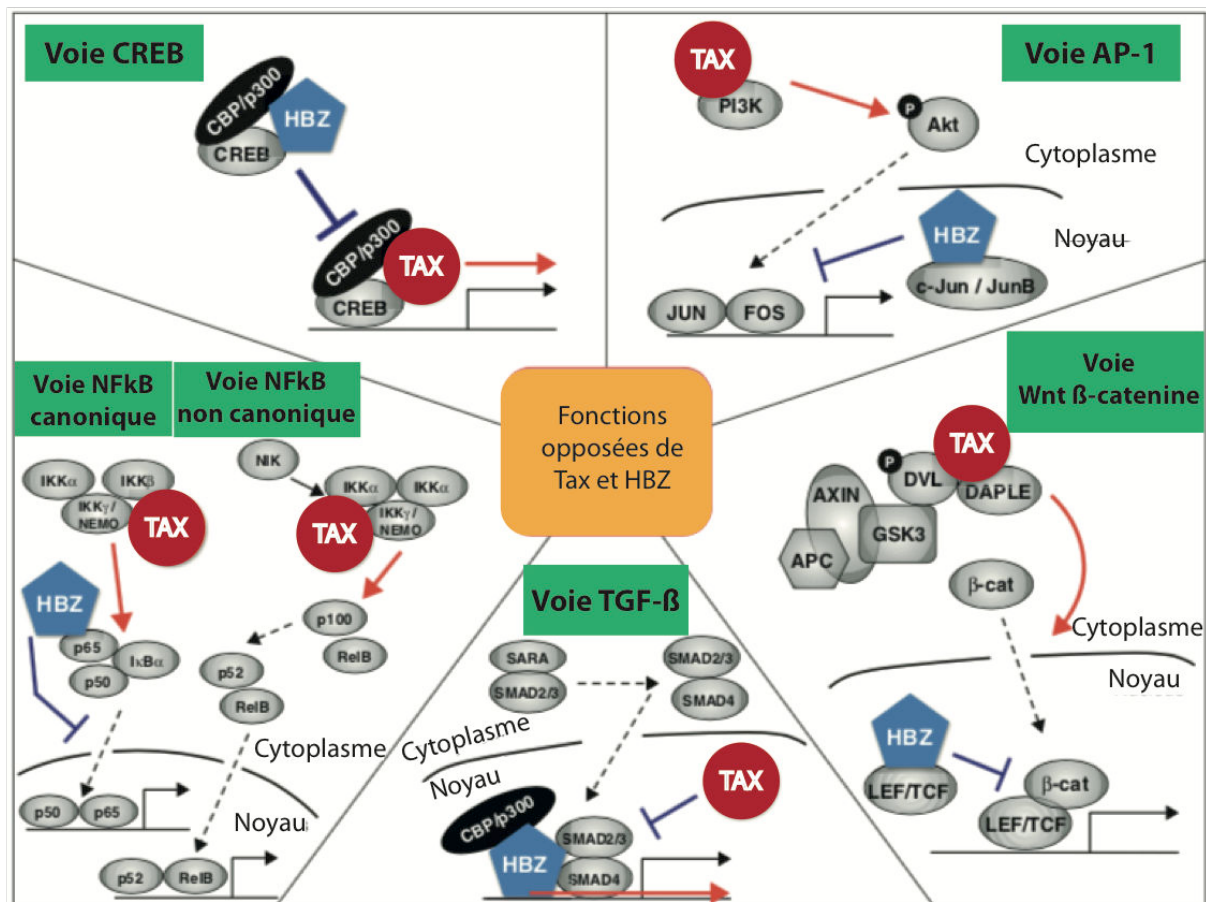
Chez la souris, il a été montré que l'induction de l'expression d'HBZ, dans les lymphocytes T CD4+, entraîne l'apparition rapide de dermatites et d'alvéolites et à long terme, le développement de lymphomes, présentant un phénotype semblable à celui observé dans les cas d'ATL (Satou et al., 2011).

HBZ constitue ainsi la deuxième oncoprotéine du HTLV-1 et par l'induction d'une prolifération accrue des lymphocytes, l'inhibition de leur apoptose, la modulation de la réponse immunitaire, ainsi que son action opposée à celle de Tax sur certaines voies cellulaires, cette protéine joue un rôle primordial dans l'oncogenèse associée à HTLV-1.

## 2) HBZ favorise la croissance et la survie des lymphocytes T infectés

### a) HBZ antagonise les effets de la protéine Tax sur certaines voies cellulaires

Un des premiers effets démontrés d'HBZ consiste en l'inhibition de la transactivation du LTR5' du virus par Tax, effet qui sera détaillé dans la suite de cette introduction. HBZ s'oppose également à certains effets cellulaires de la protéine Tax (Figure 10).



**Figure 10 : Actions antagonistes de Tax et HBZ vis à vis de certaines voies cellulaires**

Alors que Tax active la transcription dépendante des facteurs CREB et AP-1, HBZ interagit avec le domaine b-Zip de CREB, JunB et c-Jun et inhibe leur action.

HBZ contrecarre l'hyperactivation de la voie canonique NF-κB par la protéine Tax. En revanche, HBZ ne semble pas agir sur la voie non-canonique.

HBZ s'oppose également à l'activation par Tax des voies Wnt β-caténine et de la voie du TGF-β.

D'après Matsuoka et Yasunaga 2013

L'hyperactivation de la voie NF- $\kappa$ B, par la protéine Tax, entraîne l'entrée en sénescence des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infectés par le HTLV-1. La protéine HBZ, en inhibant la voie canonique NF- $\kappa$ B, permet de limiter l'entrée en sénescence des cellules (Zhi et al., 2011).

En effet, HBZ agit à différents niveaux sur la protéine p65. Ces deux protéines interagissent, ce qui a pour conséquence la diminution de la liaison à l'ADN et de l'acétylation de p65. De plus, HBZ est capable d'induire la dégradation de p65 consécutive à son ubiquitinylation par PDLIM (Fochi et al., 2018). Cette inhibition entraîne la diminution de l'expression de certaines cibles cellulaires de NF- $\kappa$ B et notamment certaines cyclines et CDK.

HBZ s'oppose de plus à l'activation par Tax de la voie Wnt, par son interaction avec un partenaire nucléaire de la  $\beta$ -caténine, LEF, et la diminution de la liaison à l'ADN de ce facteur (Ma et al., 2013).

HBZ est par ailleurs, capable de contrecarrer l'action des facteurs de transcription CREB-2, c-Jun et JunB dont l'activité est favorisée par Tax. A la suite de l'expression d'HBZ, les protéines JunB et c-Jun sont séquestrées dans des corps nucléaires, ce qui empêche leur action. La transcription des gènes codant pour JunB et c-Jun, est directement inhibée par HBZ et la protéine issue du transcrit usHBZ pourrait faciliter la dégradation de c-Jun, en l'ancrant à la sous-unité 26S du protéasome (Gazon et al., 2017).

#### *b) HBZ active la prolifération des lymphocytes et augmente l'instabilité génomique*

L'implication d'HBZ dans la prolifération des lymphocytes T infectés, a pu être mise en évidence, *in vitro*, par l'utilisation de shRNA (short-hairpin RNA) ciblant HBZ ; une diminution de la viabilité et de la prolifération a alors été observée (Arnold et al., 2008). Par ailleurs, en mutant le codon initiateur de sHBZ, Satou et al. ont montré que l'ARN sHBZ seul suffisait à induire la prolifération des lymphocytes T, alors même que la protéine HBZ ne semblait pas impliquée dans cette fonction (Satou et al., 2006). L'ARN sHBZ, par sa structure particulière, interagirait avec le facteur E2F1, modulant alors l'activation de ses gènes cibles et accélérant ainsi la transition G1/S.

Il a été également montré qu'HBZ facilite la prolifération de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> infectés, en ciblant différents micro-RNA. HBZ augmente notamment, de manière post-transcriptionnelle, la quantité des miR 17 et 21. Cet effet sur les miR 17 et 21 entraîne une

augmentation des anomalies génétiques et en particulier des cassures de l'ADN. En effet, les miR 17 et 21 inhibent l'expression de la protéine hSSB2 impliquée dans la maintenance du génome (Vernin et al., 2014).

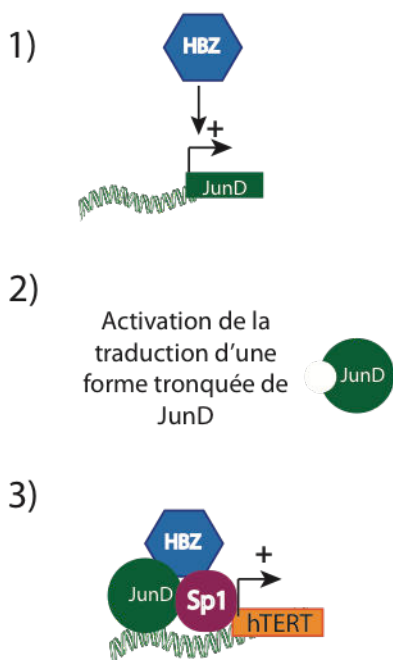
De plus, HBZ est capable d'affecter certaines voies de réparation de l'ADN. HBZ interagit, par exemple, avec les protéines Ku70 et Ku80 de la voie du NHEJ (Non Homologous End Joining), par l'intermédiaire de son domaine b-Zip, ce qui a pour conséquence de diminuer l'efficacité de la réparation des cassures double brin par NHEJ (Rushing et al., 2018). Contrairement à ce qui était supposé, HBZ pourrait donc directement participer à l'instabilité génomique, observée dans les cas d'ATL.

*c) HBZ possède un effet paradoxal sur l'apoptose des lymphocytes T*

Le rôle d'HBZ vis à vis de l'induction de la mort cellulaire ou de la résistance à l'apoptose se révèle assez complexe.

Il a été montré, tout d'abord, qu'HBZ permettrait l'activation de la télomérase. La télomérase, complexe ribonucléoprotéique qui prolonge les télomères afin de protéger l'extrémité des chromosomes, est normalement inactive dans la plupart des cellules humaines différenciées. Son activation dans de nombreux cas de cancers, participe à l'immortalisation des cellules ; le raccourcissement des télomères étant un des facteurs entraînant une mort cellulaire programmée. Par son interaction avec JunD, HBZ facilite le recrutement du complexe HBZ/JunD/Sp1 sur le promoteur du gène hTERT, codant pour la sous-unité catalytique de la télomérase et donc l'activation de sa transcription (Kuhlmann et al., 2007) (Figure 11).

Activation de la transcription dépendante de JunD par HBZ



**Figure 11 : HBZ active la transcription dépendante de JunD**

HBZ favorise l'activité de la protéine JunD en activant la transcription de son gène, en favorisant l'existence d'une seconde forme tronquée de la protéine et en facilitant notamment la formation et le recrutement de complexes contenant JunD, Sp1 et HBZ au niveau de certains promoteurs et notamment du promoteur du gène hTERT.

Inspirée de Gazon et al. 2017

De plus, HBZ est capable d'interagir avec le facteur de transcription FoxO3a et de diminuer sa liaison à l'ADN, ce qui a pour conséquence une diminution de la transcription, entre autres, des gènes Bim, FasL et TRAIL et donc une résistance à l'induction de l'apoptose (Tanaka-Nakanishi et al., 2014).

Par ailleurs, HBZ diminue l'induction de l'apoptose p53-dépendante induite par le facteur ATF3. Dans les cellules d'ATL, on observe en effet une hyperactivation d'ATF3. Selon son niveau d'activation, ATF3 peut être considéré à la fois comme un gène suppresseur de tumeur, par sa capacité à induire l'entrée en apoptose, mais aussi comme un oncogène en favorisant la prolifération cellulaire. HBZ inhibe le rôle d'ATF3 dans l'induction de l'apoptose (Hagiya et al., 2011).

Il a, en outre, été montré qu'HBZ est capable de diminuer l'activité de la protéine p53, en inhibant son acétylation par p300/CBP (Wright et al., 2016).

Cependant, certaines voies ciblées par HBZ favorisent l'apoptose des cellules. Si l'hyperactivation de la protéine E2F par HBZ favorise la prolifération des cellules, en accélérant la transition G1/S, elle a aussi pour conséquence d'augmenter l'entrée en apoptose des cellules, de manière p53 dépendante (Kawatsuki et al., 2016).

Un rôle différentiel de l'ARN et de la protéine HBZ pourrait expliquer cet effet paradoxal d'HBZ vis à vis de l'apoptose. En dissociant l'ARN de la protéine, Mitobe et al. ont pu

montré que l'ARN d'HBZ facilite à la fois la prolifération des lymphocytes T CD4 et leur résistance à l'apoptose, alors que la protéine HBZ augmente la prolifération des lymphocytes, mais aussi leur apoptose. Le rôle protecteur de l'ARN d'HBZ vis à vis de l'apoptose, pourrait s'expliquer par l'inhibition des gènes p53, Rb et l'activation de la survivin, un inhibiteur de l'apoptose (Mitobe et al., 2015).

### 3) HBZ présente un rôle immunomodulateur.

Dans les souris transgéniques exprimant HBZ, spécifiquement dans les lymphocytes T CD4+, un fort niveau d'inflammation est observé. Cela s'accompagne d'une modification du phénotype des lymphocytes T CD4+, en faveur d'un phénotype proche de celui des lymphocytes T régulateurs (Treg), exprimant le facteur de transcription Foxp3 (Satou et al., 2011). Il a été en effet montré qu'HBZ pouvait induire l'expression de Foxp3, d'une manière dépendant de la signalisation TGF- $\beta$  (Zhao et al., 2011). Cependant, les nouveaux lymphocytes T régulateurs induits par HBZ, sont affectés dans leur fonction immunomodulatrice, HBZ ayant pour effet, dans ce modèle, de diminuer l'expression de molécules co-inhibitrices comme CTLA-4 (Satou et al., 2011).

Par ailleurs, il a aussi été mis en évidence qu'HBZ est capable d'induire la transcription de la molécule co-inhibitrice TIGIT (T cell immunoglobulin and ITIM domain), en surface des cellules infectées par HTLV-1. Dans les cellules TIGIT+, HBZ favorise également la production de la cytokine immunomodulatrice IL-10 (Yasuma et al., 2016).

De plus, dans un modèle de souris transgéniques exprimant HBZ, la réponse immunitaire cellulaire dirigée contre certaines infections (HSV-2 et *Listeria monocytogenes* dans l'étude), est moins efficace, avec une diminution de la production de cytokines de type Th1 comme l'IFN $\gamma$ , l'IL-2 ou le TNF- $\alpha$ . Cette inhibition passe par un effet transcriptionnel, dépendant de la signalisation NFAT et AP-1 (Sugata et al., 2012).

Toutes ces données tendent à montrer qu'HBZ pourrait favoriser l'inflammation tout en affectant l'efficacité de la réponse immunitaire contre les cellules infectées par HTLV-1 et contre d'autres pathogènes opportunistes, ce qui pourrait expliquer la susceptibilité des patients atteints d'ATL vis à vis des infections opportunistes.

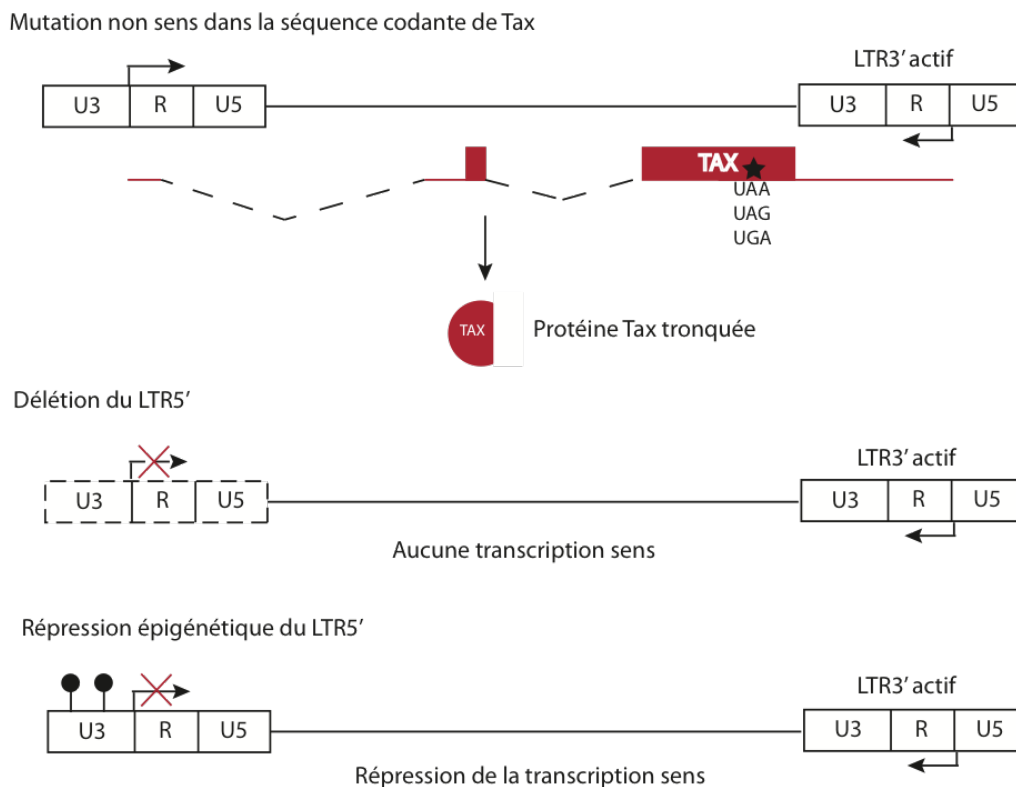
### **C) Les différents facteurs influençant la leucémogénèse associée à HTLV-1**

L'importance des effets oncogéniques des protéines Tax et HBZ semble, paradoxalement, difficilement expliquer le faible pourcentage de patients infectés qui développent une leucémie T de l'adulte, ainsi que la longue période asymptomatique observée avant l'apparition des clones leucémiques.

#### **1) Extinction de l'expression de Tax au stade ATL**

Il apparaît que l'expression de la protéine Tax est supprimée, dans environ 60% des clones leucémiques, ce qui en fait un cas unique pour une oncoprotéine virale (Takeda et al., 2004) (Kataoka et al., 2015).

Dans certains cas, l'absence de l'expression de Tax s'explique par des mutations dans la séquence codante faisant, par exemple, apparaître un codon stop prématuré ou par une grande délétion dans la région pX (Furukawa et al., 2001). Dans d'autres cas, toute l'expression sens du virus est supprimée à la suite de la délétion complète du LTR5' (Tamiya et al., 1996). Enfin, dans certaines cellules, l'absence d'expression de Tax s'explique par une répression épigénétique du LTR5' qui fait intervenir une hyperméthylation des îlots CpG des régions U3 et R du LTR5', sans affecter le LTR3'. Dans ce dernier cas, il a pu être montré, *in vitro*, sur des lignées cellulaires dérivées d'ATL (ED, MT-1 et TL-Om1), que cette répression pouvait être levée par un traitement par la 5-Azadeoxycytidine, analogue non méthylable de la deoxycytidine (Koiwa et al., 2002; Takeda et al., 2004) (Figure 12).



**Figure 12 : L'expression de Tax est réprimée de différentes façons dans les cellules ATL**

Des mutations ponctuelles dans la séquence codante de Tax faisant apparaître un codon stop entraîne la synthèse d'une protéine Tax tronquée. Cette protéine n'est en général pas fonctionnelle donc la transactivation du LTR5' est abolie ainsi que tous les effets cellulaires de Tax.

Dans certains cas, on observe une délétion complète du LTR5' empêchant toute transcription sens.

L'inhibition de la production de Tax passe aussi par une répression épigénétique du LTR5'. Les îlots CpG du LTR 5' sont alors hyperméthylés. Une déacétylation des histones semble amplifier la répression observée.

Dans tous les cas, le LTR3' reste actif dans tous les clones leucémiques.

Il se pourrait donc que, dans un contexte plus physiologique, cette répression ne soit pas établie de manière permanente dans toutes les cellules mais puisse être levée, en réponse à certains stimuli. En effet, récemment, Mahgoub et al. ont montré que, dans la lignée MT-1, une réactivation transitoire de la transcription sens, dans certaines cellules, pouvait se produire et qu'une suppression de l'expression transitoire de Tax, par des shRNA, entraînait l'apoptose de la population cellulaire (Mahgoub et al., 2018), laissant supposer l'importance d'une expression minimale de la protéine Tax pour la survie de la population de clones leucémiques.

La simple existence de deux oncoprotéines virales ne semble donc pas suffisante, pour expliquer le développement de la leucémie T de l'adulte et il apparaît primordial d'analyser les anomalies d'expression génique, observées dans les cas d'ATL.

## 2) Anomalies génétiques et épigénétiques dans les cellules ATL

### *a) Des gènes appartenant à certaines voies sont préférentiellement affectés*

Une étude par séquençage haut débit du génome ou de l'exome cellulaire, sur des échantillons issus d'une cohorte de 426 patients, a permis de mettre en évidence une signature génétique particulière associée aux cas d'ATL (Kataoka et al., 2015).

Il a été montré que certaines voies sont particulièrement représentées en terme d'anomalies génétiques dans les ATL, avec en général une inactivation biallélique des gènes ciblés. Parmi ces gènes, intervenant majoritairement dans la voie de signalisation du TCR et dans la voie NF- $\kappa$ B, on trouve de nombreux membres de l'interactome de la protéine Tax.

L'activation des lymphocytes T est également ciblée par le biais de formation de transcrits de fusion cellulaires donnant naissance à des protéines présentant, par exemple, le domaine cytoplasmique de CD28, fusionné aux éléments régulateurs de CTLA-4, conduisant à une signalisation co-stimulatrice prolongée et incontrôlée.

Enfin des anomalies génétiques ont également été décrites dans des gènes codant pour des protéines responsables de la modulation de la réponse immune.

### *b) Le paysage épigénétique des cellules ATL est profondément remanié*

En plus de l'existence de mutations, délétions et réarrangements chromosomiques de grande ampleur, l'expression génique dans les cellules ATL est également affectée par la perturbation du fonctionnement de régulateurs épigénétiques.

Deux équipes ont ainsi, par exemple, mis en évidence un défaut du processus d'hydroxyméthylation dans les cellules leucémiques des patients ATL. L'hydroxyméthylation consiste en l'ajout d'un résidu hydroxyl sur les cytosines méthylées, ajout catalysé par les protéines TET (Ten-Eleven Translocation) et constituant la première étape de la déméthylation des cytosines, de même qu'une marque épigénétique à part entière.

Notre équipe a récemment montré que le niveau d'hydroxyméthylation, ainsi que l'expression de TET2, sont fortement diminués dans les cellules leucémiques ATL et l'importance de cette réduction semble associée à la gravité de la pathologie et à un mauvais pronostic (Marçais et al., 2017).

De plus, Yeh et al. ont caractérisé l'existence de mutations inactivatrices de TET2, au sein de leur cohorte de patients ATL. Un fort taux de mutation non sens dans le gène codant MLL3, une histone lysine méthyltransférase responsable de la méthylation sur la lysine 4 de l'histone H3, a également pu être mis en évidence dans cette étude (Yeh et al., 2016).

Une autre histone lysine méthyltransférase, Ezh2, est fortement affectée dans les cellules ATL. Ezh2, pour Enhancer of Zeste Homolog 2, est la protéine porteuse de l'activité histone lysine méthyltransférase au sein du complexe PRC2 (Polycomb repressive complex 2), qu'elle constitue avec les protéines Suz12 et Eed notamment.

Il a été montré qu'Ezh2 est surexprimée dans les cellules ATL, ce qui entraîne une augmentation du niveau de marque répressive H3K27me3, au niveau de régions de l'ADN normalement associées à la marque activatrice H3K4me3 dans les lymphocytes T naïfs. Cette modification du paysage épigénétique, qui entraîne la répression de certains gènes normalement exprimés, semble indispensable à la survie des cellules ATL, puisque le traitement avec un inhibiteur d'Ezh2 induit une forte mortalité de ces cellules (Fujikawa et al., 2016). L'origine de cette surexpression d'Ezh2 pourrait être liée à l'inhibition de la production de certains miRNA, comme les miR101 et miR128a (Sasaki et al., 2011). Elle pourrait aussi être provoquée par l'hyperactivation constitutive de la voie NF-κB ou dans les cellules où Tax est exprimée, à une activation transcriptionnelle du promoteur du gène ezh2 par Tax (Fujikawa et al., 2016).

En plus de toutes les anomalies génétiques qui pourraient être associées à une expression de Tax et HBZ pendant une longue période, et des perturbations du paysage épigénétique constatées dans les cellules leucémiques, de nouvelles études semblent montrer un rôle direct du génome HTLV-1, dans la modification de l'expression d'un certain nombre de gènes impliqués dans le développement des cancers.

### 3) L'intégration du génome HTLV-1 semble susceptible d'affecter l'expression de gènes cellulaires

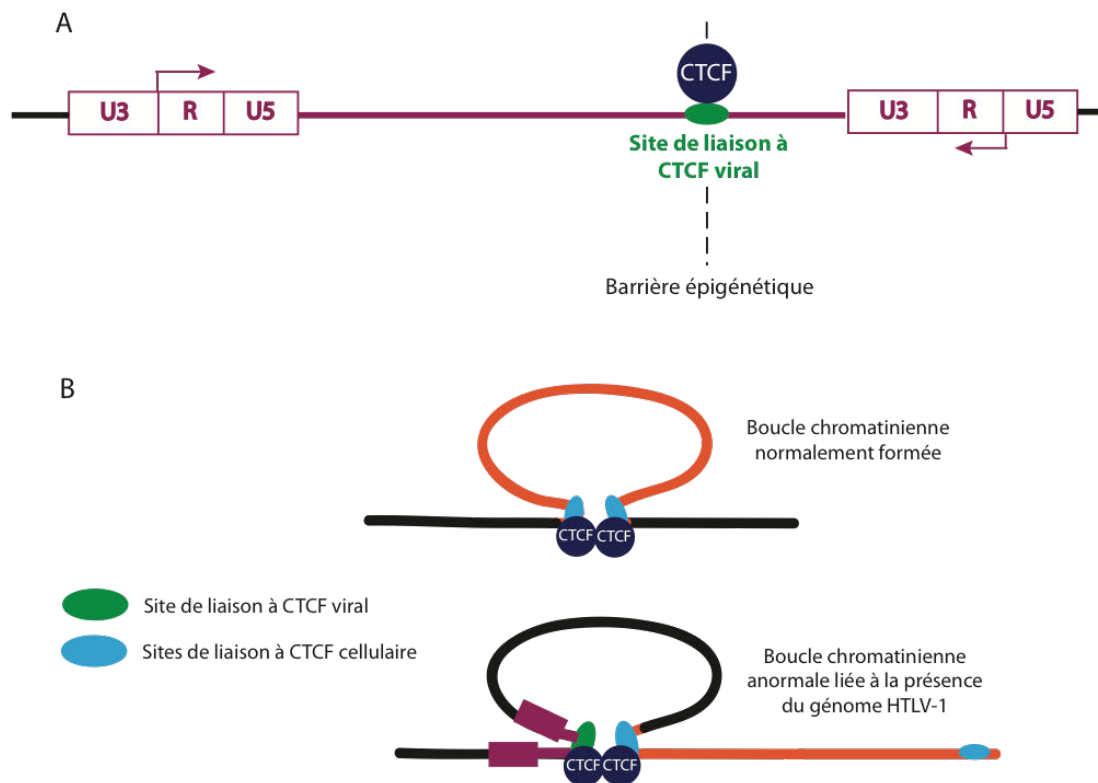
Certains rétrovirus sont responsables d'une mutagenèse dite insertionnelle ; dans ce cas c'est l'intégration du provirus, qui, en elle-même, entraîne l'apparition d'anomalies dans l'expression de gènes cellulaires. C'est, par exemple, le cas du rétrovirus MLV (Murine Leukemia Virus) qui présente un fort biais d'intégration dans les régions « enhancer » et peut donc induire une dérégulation de l'expression de certains gènes (De Ravin et al., 2014).

Dans le cas d'HTLV-1, l'intégration semblant se faire au hasard, l'hypothèse d'une mutagenèse insertionnelle a rapidement été exclue. Cependant, les nouvelles techniques haut débit d'analyse des génomes ont permis de déterminer, que dans les cellules leucémiques, l'intégration virale présentait un biais, en faveur des régions activement transcrites (Melamed et al., 2013). Dès lors, la sélection de clones, ayant une intégration dans les régions actives, pourrait indiquer que la présence du génome HTLV-1 dans certaines régions du génome, pourrait favoriser le développement de la leucémie et donc que le génome HTLV-1 pourrait, par sa simple présence, induire des anomalies dans l'expression des gènes.

*a) Le génome HTLV-1 peut induire la formation de boucles chromatinienne*

En 2016, Satou et al. ont caractérisé dans la séquence du génome HTLV-1 un site viral de liaison à la protéine CTCF (CCCTC binding factor). La protéine CTCF se lie avec la cohésine sur ses sites de liaison et induit la formation de larges boucles, dans l'ADN génomique, permettant de rapprocher des régions génomiques distantes (Ghirlando and Felsenfeld, 2016).

L'existence d'un site de liaison à CTCF, dans le génome du HTLV-1, constitue un insulateur qui permet une régulation épigénétique différentielle des LTR 5' et 3' (Satou et al., 2016). De plus, le recrutement démontré de la protéine CTCF au niveau de ce site, entraîne la formation de boucles anormales entre le site de liaison à CTCF viral et des sites cellulaires, induisant des perturbations de l'expression des gènes, au niveau de ces boucles d'ADN (Cook et al., 2017) (Figure 13).



**Figure 13 : Il existe un site de liaison viral de la protéine CTCF dans le génome du HTLV-1**

A : Une séquence permettant la liaison de la protéine CTCF a été décrite dans le génome du rétrovirus HTLV-1. La liaison de CTCF à ce site forme une barrière épigénétique entre les deux extrémités du génome permettant une régulation épigénétique différentielle des deux LTR.

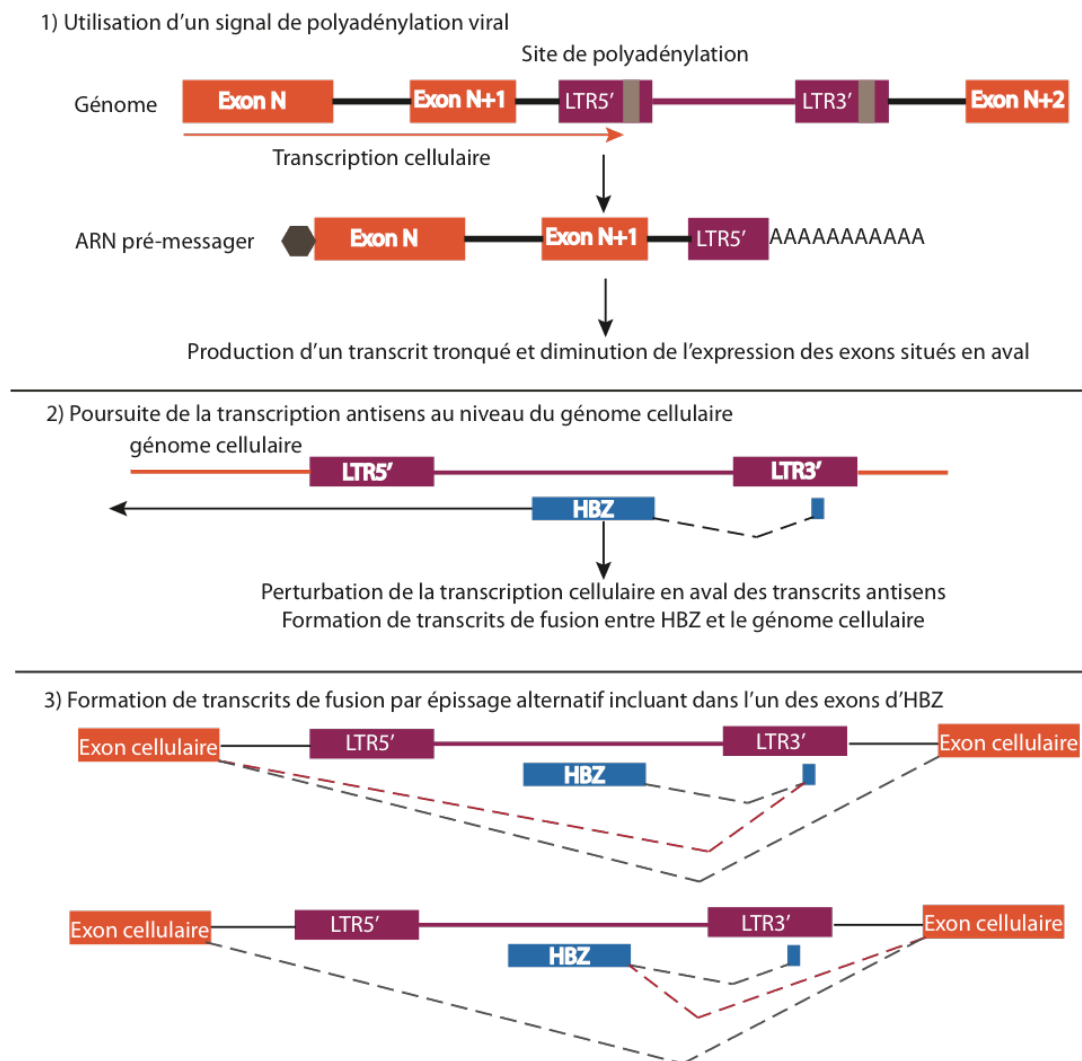
B: Le site de liaison à CTCF présent dans le génome HTLV-1 permet la formation de larges boucles chromatinienne par interaction avec des sites de liaison à CTCF cellulaires et ce au détriment de boucles normalement formées. Cela a pour conséquence de perturber la régulation des gènes au sein et au voisinage de ces boucles.  
D'après Melamed et al. 2018

*b) Le génome HTLV-1 perturbe l'expression des gènes adjacents par l'existence de transcrits de fusion*

L'intégration du génome HTLV-1, dans des régions activement transcrites, donne également naissance à des transcrits cellulaires anormaux, présentant des portions du génome HTLV-1. Le génome HTLV-1 comporte, en effet, des sites de poly-adénylation, ainsi que des sites donneurs et accepteurs d'épissage qui, utilisés dans la transcription de gènes cellulaires, engendreraient des transcrits alternatifs anormaux.

Rosewick et al. ainsi que Kataoka et al. ont démontré l'existence de ces transcrits anormaux. (Rosewick et al., 2017) (Kataoka et al., 2015). Non seulement HTLV-1 semble, *in vivo*, présenter un biais d'intégration dans certains gènes associés au développement des cancers, mais lorsque HTLV-1 est intégré dans le même sens que le gène cellulaire, on observe l'utilisation du signal de polyadénylation présent dans le LTR5', lors de la transcription du gène situé en amont. Cela aboutit à la synthèse d'un transcrit tronqué et à une expression

diminuée de moitié des transcrits en aval du provirus. Parmi les gènes concernés par ce phénomène, on trouve notamment des anti-oncogènes. Lorsque l'expression sens du rétrovirus est réprimée et que le LTR3' est actif, on observe différents types de transcrits de fusion, présentant à la fois des séquences codantes HBZ et un gène cellulaire (Figure 14). Dans la plupart des cas, ce phénomène concerne des gènes favorisant l'apparition des cancers. (Rosewick et al., 2017).



**Figure 14 : Perturbations en cis de la transcription cellulaire par la transcription virale HTLV-1**

1) Lorsque le provirus HTLV-1 est intégré dans un sens concordant par rapport à la transcription cellulaire, le site de polyadénylation localisé dans la région U5 du LTR5' peut être utilisé comme site de polyadénylation et de terminaison de la transcription pour certains transcrits cellulaires, alors tronqués. Les exons situés en aval du provirus sont donc moins exprimés.

2) La transcription antisens du HTLV-1 peut ne pas s'interrompre au niveau du site de terminaison situé dans le provirus mais se poursuivre dans le génome cellulaire en amont du LTR5'. Ce phénomène pourrait interférer avec la transcription des gènes adjacents et également donner naissance à des transcrits de fusion.

3) L'utilisation des sites donneurs ou accepteurs d'épissage viraux lors de la transcription de certains gènes cellulaires conduit à l'existence de transcrits de fusion comportant le premier ou le second exon d'HBZ fusionné à des exons cellulaires.

D'après Rosewick et al. 2017

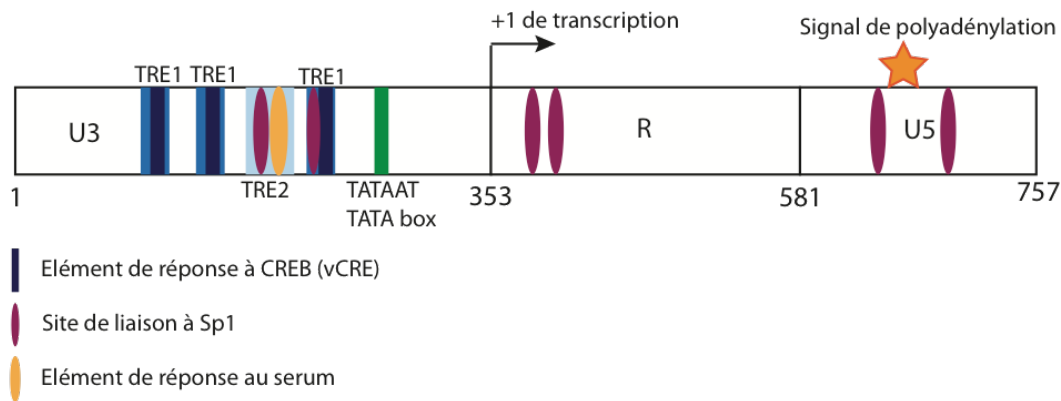
Ainsi l'existence des deux oncoprotéines, Tax et HBZ, ne semble pas être le seul déterminant de la leucémogenèse associée à HTLV-1. Cependant, les anomalies génétiques et épigénétiques, induites par ces oncoprotéines, leur rôle actif dans la sélection clonale, conduisant à l'émergence d'un clone leucémique, ainsi que l'importance de la transcription antisens dans l'apparition de transcrits de fusion, rendent capitale la nécessité de comprendre comment l'expression de ces deux oncoprotéines est régulée, dans les étapes précoces de l'infection et tout au long du développement de la leucémie T de l'adulte.

### **III) Régulation de la balance transcriptionnelle du rétrovirus HTLV-1**

#### **A) La transcription sens du HTLV-1 est fortement transactivée par Tax**

##### **1) Structure du LTR du HTLV-1**

La transcription sens du rétrovirus HTLV-1 est contrôlée au niveau du LTR5' du virus. Les LTR du HTLV-1 mesurent 757 paires de bases et sont divisés comme tous les LTR viraux en trois régions U3, R et U5. Le site d'initiation de la transcription (+1 de transcription) est localisé entre les régions U3 et R, la région U3 représentant le promoteur du virus. On y trouve, en effet, une TATA box consensus en amont du +1 de transcription, ainsi que des éléments régulateurs (Lever et al., 2010) (Figure 15).



**Figure 15 : Organisation du LTR du HTLV-1**

Le LTR d'HTLV-1 est divisé en trois parties : U3 (353 pb), R (228 pb) et U5 (176 pb). Le site d'initiation de la transcription est localisé entre U3 et R. En amont se trouve une TATA box consensus. Le signal de polyadénylation du LTR5' n'est pas fonctionnel pour les transcrits initiés entre U3 et R. Dans les trois séquences TRE1, on trouve trois éléments de réponse à CREB (vCRE). La séquence TRE2 comporte un site de liaison à Sp1 et un élément de réponse au sérum. D'autres sites Sp1 sont décrits dans le TRE-1 proximal (un site), dans la région R (deux sites) et dans la région U5 (deux sites). Les sites Sp1 localisés dans U3 sont impliqués dans l'activation de la transcription basale sens. Le premier site Sp1 localisé dans U5 semble l'inhiber. Enfin les deux sites Sp1 localisés dans U5 sont activateurs de la transcription de sHBZ au niveau du LTR3'.  
Adaptée de Fauquenoy et al. 2017

Il existe deux types d'éléments régulateurs, appelés TRE pour Tax Responsive Element. Les TRE de type 1, contenant la séquence vCRE (viral cyclic AMP response element), sont au nombre de trois. Il s'agit d'éléments de 21 paires de bases subdivisés en trois domaines A, B et C. Le domaine B présente une séquence proche du site cellulaire consensus de réponse à CREB (les cinq premiers nucléotides sont identiques) et les domaines A et C sont riches en bases G et C, ce qui facilite le recrutement de Tax.

L'élément de réponse à Tax de type 2, TRE2 comporte quand à lui un élément de réponse au Serum (SRE pour Serum Responsive Element) et un site de liaison à Sp1.

## 2) Régulation de la transcription basale

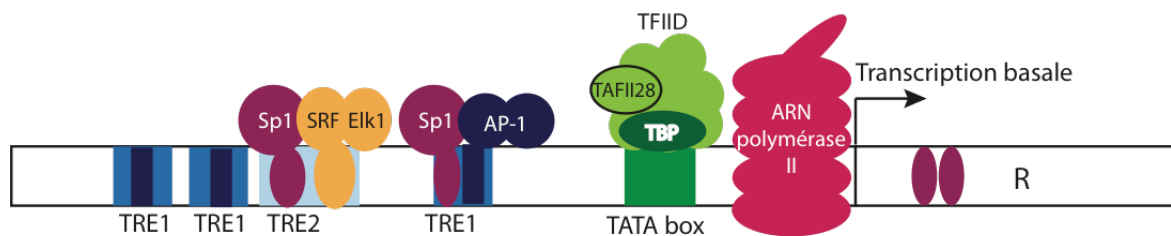
La protéine Tax n'étant pas présente dans la particule virale, la transcription sens basale du virus s'effectue donc de manière indépendante de Tax et repose sur l'action de facteurs cellulaires (Figure 16).

Les facteurs de transcription de la famille AP-1, classiquement composés de dimères c-Jun/c-Fos, sont capables de se lier au niveau des séquences vCRE et d'activer la transcription basale du HTLV-1 (Jeang et al., 1991).

La protéine Sp1, en se liant au site de liaison de haute affinité présent dans la séquence TRE2, active légèrement la transcription basale du LTR5'. Cependant, une mutation de ce site de

liaison, rendant impossible le recrutement de Sp1, abolit presque totalement la transcription basale du LTR5' (Livengood and Nyborg, 2004). En plus du site Sp1 localisé dans la séquence TRE-2, il existe cinq sites Sp1 supplémentaires dans le LTR du HTLV-1, un au niveau du dernier TRE-1, deux dans la région R et deux dans la région U5 (Fauquenoy et al., 2017). La liaison de la protéine Sp3 sur le site Sp1 localisé dans le TRE-1 proximal inhibe la transcription basale du LTR5' (Yao et al., 2006).

Le facteur de transcription SRF (Serum Responsive Element) intervient normalement dans la réponse transcriptionnelle immédiate à certains facteurs de croissance. La liaison de SRF et de l'activateur transcriptionnel Elk1 au niveau de l'élément viral de réponse au sérum (vSRE), localisé dans le TRE2, participe également à l'activation de la transcription basale (Winter and Marriott, 2007).



**Figure 16 : Les facteurs impliqués dans la transcription basale du LTR5'**

Le recrutement de Sp1 sur les sites localisés au niveau du TRE-2 et du troisième TRE1 ainsi que des facteurs SRF/Elk1 sur le TRE-2 et de dimères AP-1 assure la transcription basale du LTR5'. Cette transcription suit les mécanismes impliqués dans la transcription de gènes cellulaires par l'ARN polymérase II.

Si la transcription basale initiée par le LTR5' reste peu efficace, elle permet cependant la production des transcrits Tax/Rex et donc de la protéine Tax qui va réaliser la transactivation du LTR5' et favoriser ainsi une transcription sens efficace.

### 3) Mécanismes de la transactivation par Tax

a) *Tax recrute le facteur de transcription CREB et ses co-facteurs au niveau des vCRE.*

La transactivation efficace du LTR5' par Tax nécessite l'existence des éléments de réponse vCRE au sein des TRE (Giam and Xu, 1989).

Le facteur de transcription CREB est impliqué dans la transcription de nombreux gènes, présentant des éléments de réponse cellulaires à l'AMP avec la séquence TGACGTCA. CREB se fixe, sous forme de dimère, au niveau de ces sites, sa dimérisation étant permise par l'existence de motifs basic leucine zipper. Par son domaine CAD (CREB-Activation Domain), CREB interagit avec la sous-unité hTAFII135, aussi appelée TAF4, du facteur général de transcription TFIID. Cette interaction permet le recrutement du complexe de pré-initiation de la transcription et l'ARN polymérase II (Quinn, 2002). CREB joue donc un rôle dans la transcription basale de certains gènes.

En cas d'activation de la voie de l'AMP cyclique, CREB est phosphorylée au niveau de la Serine 133. L'augmentation de la concentration cellulaire en AMPc permet, en effet, sa fixation sur les sous-unités régulatrices de la PKA et par un changement de conformation, l'activation de ses unités catalytiques. La PKA phosphoryle alors CREB. La phosphorylation du domaine KID (Kinase Inducible Domain) de CREB rend possible son interaction avec les histone acétyltransférases (HAT) CBP/p300 (Johannessen et al., 2004).

Dans le cadre de la transactivation du LTR5' du HTLV-1, il a été montré que Tax, sous forme de dimères, semble faciliter la dimérisation de CREB et son recrutement au niveau des séquences vCRE, en stabilisant le complexe vCRE/CREB (Yin and Gaynor, 1996). Au sein des TRE, Tax liée à CREB établit des contacts au niveau des petits sillons de l'ADN, dans les régions riches en GC, localisées de part et d'autre des vCRE (Lenzmeier et al., 1998) (Figure 17).

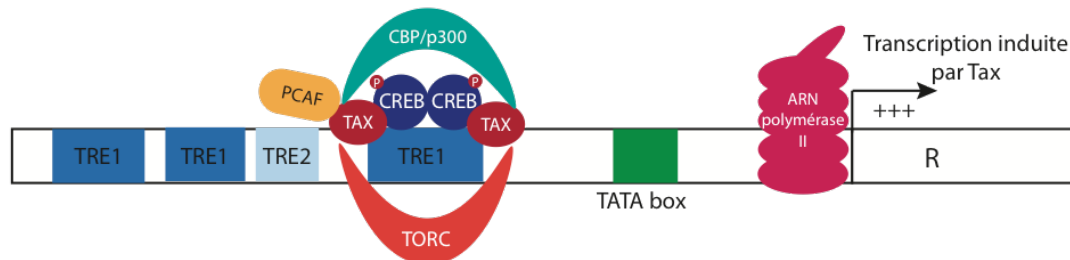
Tax facilite également le recrutement de CBP/p300. En temps normal, la phosphorylation de CREB, au niveau de la Serine 133 de son domaine KID (Kinase Inducible Domain), permet son interaction avec le domaine KIX de CBP/p300. Dans le contexte du LTR5', Tax est capable d'interagir avec le domaine KIX de CBP/p300, ce qui permettrait le recrutement de ces facteurs, indépendamment de l'activation de la voie de l'AMPc (Harrod et al., 1998).

Tax interagit également avec deux autres domaine de CBP, C/H1 et le domaine CR2 (Carboxy-terminal region 2), qui constitue le domaine d'interaction de CBP avec SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator 1) (Scoggin et al., 2001).

La phosphorylation de CREB, bien que non nécessaire au recrutement de CBP/p300 dans ce contexte, jouerait cependant un rôle dans la stabilisation du complexe quaternaire CREB/Tax/CBP/p300 (Kim et al., 2007).

CBP/p300 possède une activité histone acétyltransférase (HAT), permettant l'acétylation des histones H3 et H4 et nécessaire à la transactivation du LTR5' par Tax. De plus, CBP et non

p300, possède un domaine d'activation localisé à son extrémité N-terminale, permettant d'augmenter l'efficacité de la transcription du HTLV-1, à partir d'un ADN dépourvu de nucléosome et donc indépendamment de son activité HAT (Lu et al., 2002).



**Figure 17 : Le complexe vCRE/CREB/Tax/CBP-p300 permet la transactivation du LTR5' par Tax**

Tax stabilise les dimères de CREB recrutés au niveau des vCRE. L'interaction de Tax avec le domaine KIX de CBP/p300 permet son recrutement indépendamment de la phosphorylation de CREB même si celle-ci stabilise le complexe quaternaire alors formé. L'interaction de Tax avec TORC augmente l'efficacité de la transactivation. L'interaction de TORC avec CREB permet par exemple de recruter plus efficacement des facteurs généraux de transcription (non visibles sur la figure). L'interaction de Tax avec PCAF augmente encore davantage l'efficacité de la transactivation.

D'après Polakowski et Lemasson Chapitre 5 Recent Advances in Human Retroviruses

Certains facteurs cellulaires favorisent la transcription médiée par CREB.

Les protéines TORC (Transducer of regulated CREB activity) facilitent, par exemple, la transcription CREB-dépendante, par leur interaction avec le domaine b-Zip de CREB, ce qui facilite l'interaction de CREB avec TFIID. Tax est capable de recruter les trois isoformes de TORC, TORC1/2 et 3 en se liant au domaine coiled-coil de TORC et augmente ainsi l'efficacité de la transactivation du LTR5' (Siu et al., 2006).

En outre, Tax peut former un complexe avec les protéines TORC et Pak (p21-associated kinase). Les protéines Pak sont des Serine Threonine kinases impliquées dans la régulation de la transcription, la progression dans le cycle cellulaire et l'organisation du cytosquelette. Dans le cadre de la transactivation du LTR, elles interviennent indépendamment de leur activité kinase, lorsque la quantité de protéine Tax est limitante, pour faciliter le recrutement du facteur TORC (Chan et al., 2013).

Il a également été montré que Tax interagit, via son domaine carboxy-terminal, avec la protéine P/CAF (p300/CBP associated factor) et permet ainsi son recrutement au niveau des TRE. Bien que P/CAF possède une activité histone acétyltransférase, elle intervient dans l'augmentation de la transactivation de manière indépendante de son domaine HAT (Jiang et al., 1999).

*b) Tax interagit également avec des facteurs généraux de transcription*

En plus du recrutement de CREB, considéré comme l'événement primordial de la transactivation du LTR5', la protéine Tax semble faciliter la transcription dépendante du LTR5', à différentes étapes de la transcription. Tax est ainsi capable d'interagir avec un certain nombre de facteurs généraux de transcription, pour faciliter sa propre production.

*α) Mécanisme d'initiation de la transcription cellulaire*

Dans le cadre de la transcription réalisée par l'ARN polymérase II, à partir d'un promoteur présentant une TATA box, la liaison du complexe TFIID au niveau de la TATA box constitue le premier événement conduisant à la formation du complexe de pré-initiation.

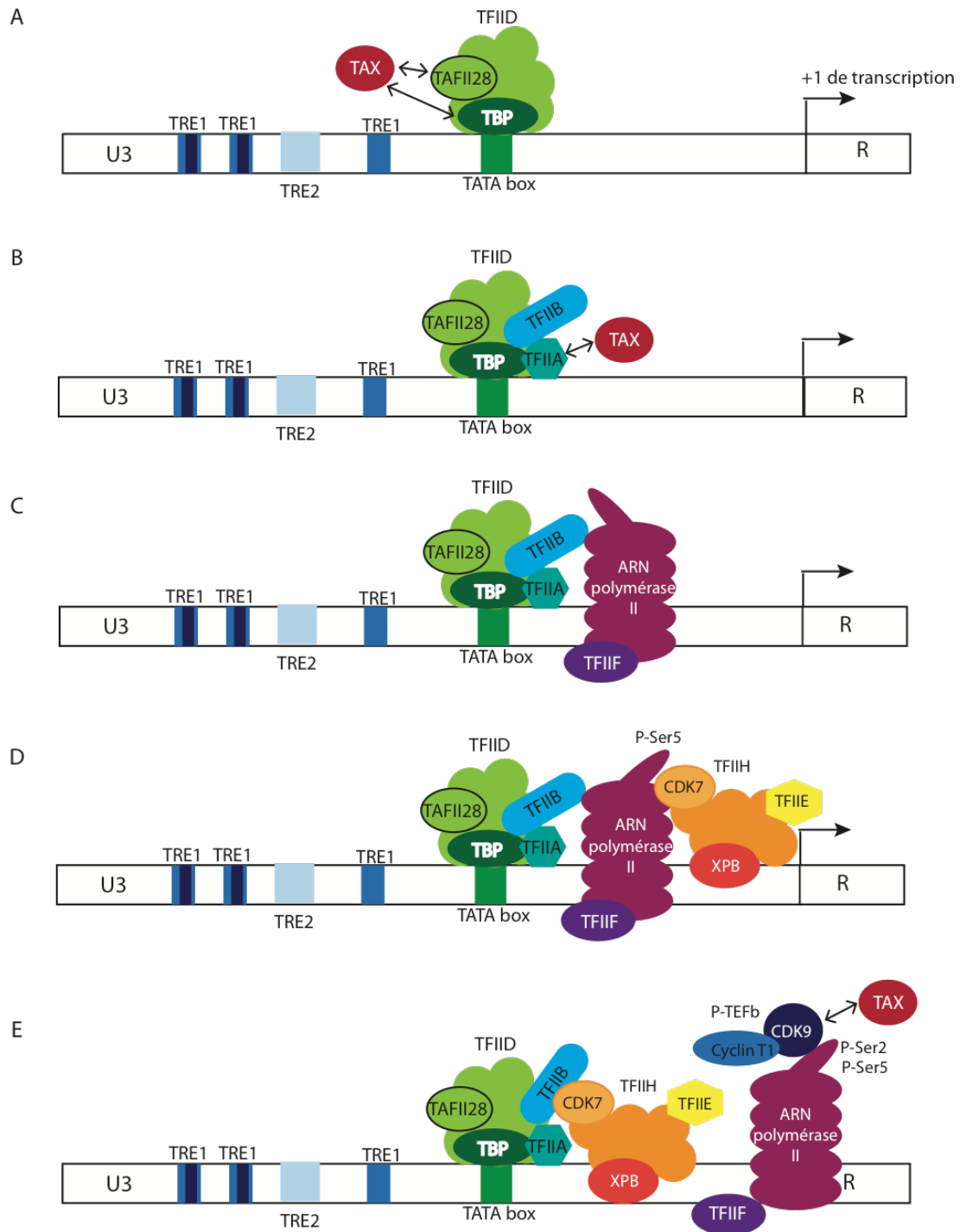
TFIID est constitué d'éléments TAF (TBP-Associated Proteins) et de la sous-unité TBP (TATA binding protein). Les complexes TFIIA et TFIIB s'associent ensuite au complexe déjà formé entre TFIID et l'ADN. TFIIA stabilise ce complexe, tandis que TFIIB est nécessaire au recrutement de l'ARN polymérase II et interagit avec TBP. Un complexe, formé de TFIIF et de l'ARN polymérase II, est alors recruté.

Les facteurs TFIIIE et TFIIH, ajoutés par la suite, facilitent l'ouverture de la double hélice d'ADN au niveau du promoteur. Au sein du complexe TFIIH, la protéine XPB qui possède une activité hélicase non conventionnelle et une activité ATPase, permet à la fois l'ouverture de l'ADN et une torsion de l'ADN qui entraîne un changement de conformation de l'ARN polymérase II. Ce changement de conformation provoque le rapprochement de la kinase CDK7 associée à TFIIH et de domaine carboxy-terminal (CTD) de l'ARN polymérase II. CDK7 phosphoryle ainsi le résidu sérine 5 du CTD, de même que la kinase CDK9, membre du complexe P-TEFb, ce qui induit son activation.

L'ARN polymérase II est maintenue en pause par son interaction avec les facteurs DSIF et NELF. L'activation de la kinase CDK9 permet la phosphorylation, non seulement de la sérine 2 du CTD de l'ARN polymérase II, mais aussi de DSIF et NELF. Cela provoque la fin de la pause de l'ARN polymérase II et donc la poursuite de la transcription (Sainsbury et al., 2015).

*β) Détournement de la machinerie de transcription par Tax*

Afin de faciliter la transcription dépendante du LTR5', la protéine Tax intervient à plusieurs étapes de l'initiation de la transcription (Figure 18).



**Figure 18 : Tax interagit avec certains facteurs généraux de transcription pour faciliter la transactivation du LTR5' initiée de manière CREB-dépendante**

A : L'interaction de Tax avec TBP et TAFII28 augmente le recrutement de TFIID au niveau de la TATA box  
 B : Tax interagit avec TFIIA ce qui stabilise l'interaction de TFIID avec l'ADN  
 C : L'ARN polymérase II est recrutée indépendamment de Tax  
 D : La protéine XPB membre du complexe TFIIH phosphoryle la Ser5 de l'ARN pol II  
 E : L'interaction de Tax avec P-TEFb inhibe la kinase CDK9 temporisant ainsi la poursuite de la transcription.  
 Adaptée de Sainsbury 2015

Il a ainsi été montré que Tax interagit directement avec la protéine TBP et avec hTAFII28, augmentant ainsi le recrutement de TFIID au niveau de la TATA box du LTR5' et l'efficacité

de la transcription Tax-dépendante (Caron et al., 1993, 1997). Tax interagit également avec le facteur TFIIA (Clemens et al., 1996). Ainsi sur une matrice ADN, *in vitro*, la présence du complexe complet TFIID, ainsi que de TFIIA, est indispensable à la transcription contrôlée par les TRE (Duvall et al., 1995).

Concernant les étapes plus tardives de la transcription, Tax interagit avec le complexe P-TEFb, composé entre autres de CDK9 et cyclinT1. Si CDK9 est nécessaire à la transactivation du LTR par Tax, paradoxalement, Tax semble inhiber l'activité kinase de CDK9 par autophosphorylation au niveau de la thréonine 29. Tax pourrait donc jouer un rôle dans la régulation temporelle de la transition initiation – élongation (Zhou et al., 2006).

### *c) Tax modifie la structure chromatinienne au niveau du LTR5'*

La régulation de l'expression génique est fortement dépendante de la structure chromatinienne, au niveau du promoteur et du site d'initiation de la transcription. Plus la chromatine est compactée au niveau de ces sites, moins les sites de liaison des différents acteurs de la transcription seront accessibles. Il semble alors primordial pour assurer une transcription efficace à partir du LTR5' que Tax soit en mesure de modifier la structure de la chromatine au niveau du LTR5'.

La compaction de la chromatine est assurée par des facteurs de remodelage de la chromatine présentant une activité ATPase.

Au sein du complexe SWI/SNF, aussi appelé PBAF (BRG1-associated factors), l'activité ATPase est portée par la protéine BRG1. Il a été montré, par différentes équipes, que Tax est capable d'interagir avec BRG1 (Easley et al., 2010; Lemasson et al., 2006; Wu et al., 2004). Cependant, les conséquences de l'interaction de Tax avec le complexe SWI/SNF restent controversées. Zhang et al. montrent, en effet, sur une séquence indicatrice intégrée dans le génome, que l'expression à partir du LTR5', en présence de Tax, est complètement indépendante de l'activité de SWI/SNF (Zhang et al., 2006). En revanche, dans les études de Wu et al. et Easley et al., l'interaction Tax/BRG1 est nécessaire à une ouverture de la chromatine au niveau du promoteur viral et augmente l'efficacité de la transactivation. Enfin, les résultats obtenus par une autre équipe, montrent qu'en absence de Tax, BRG1 est détectée au niveau du promoteur et que le complexe SWI/SNF est déplacé en dehors du promoteur viral en présence de Tax (Lemasson et al., 2006).

Dans cette même étude, il est montré que Tax permet le déplacement des nucléosomes et de l'histone H1 hors du promoteur viral et que cela est associé à une augmentation du

recrutement de l'ARN polymérase II. Cette éviction des nucléosomes semble dépendante de l'acétylCoA et de la protéine chaperonne Nap1 (Nyborg et al., 2010). De plus, il a été montré que l'inhibition, exercée par la présence de l'histone H1 sur l'activité acétyltransférase de CBP/p300, est levée en présence de Tax (Konesky et al., 2006).

Les histones des nucléosomes peuvent subir des modifications post-traductionnelles, au niveau de leur queue N-terminale, ces modifications constituant le code histone. Dans les cellules présentant un LTR5' actif, il a été montré que les histones H3 et H4 localisées au niveau du LTR5' étaient acétylées (Lemasson et al., 2002; Satou et al., 2016), ce qui est cohérent avec le recrutement des histone acétyltransférases p300 et CBP par Tax. Cependant, des histone déacétylases (HDAC) de type I ont pu également être retrouvées, au niveau du LTR, en absence de Tax (Lu et al., 2004), mais aussi en présence de Tax (Lemasson et al., 2002). Il a également été montré que Tax peut interagir avec HDAC1 et HDAC3 et que ces deux protéines peuvent inhiber la transcription médiée par Tax.

La triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 est assurée par l'histone lysine méthyltransférase Suv39H1 (Suppressor of Variegation 3-9 Homolog 1) et constitue une marque répressive. Il a été montré que Tax est capable d'interagir directement avec Suv39H1, recrutant ainsi cette protéine au niveau du LTR, ce qui a pour conséquence de diminuer le niveau d'activation du LTR (Kamoi et al., 2006).

La marque H3K27me3 constitue une autre marque répressive, synthétisée par le complexe PRC2 (Polycomb repressive complex 2) dont l'activité catalytique est portée par la protéine Ezh2 (Enhancer of Zeste Homolog 2). Tax est capable d'interagir avec cette protéine et on observe, au niveau génomique, un chevauchement entre les régions de liaison de Tax et les régions présentant un fort recrutement d'Ezh2 et un fort niveau de marques H3K27me3 (Fujikawa et al., 2016).

Cela pose la question d'une éventuelle implication du complexe PRC2 dans une répression médiée par Tax du LTR5', d'autant plus que des études ont montré la présence de marques H3K27me3 au niveau des LTR du HTLV-1 (Kulkarni et al., 2017), sans que cela n'ait été démontré pour l'instant.

Ainsi, il n'est pas à exclure que Tax détourne des mécanismes de répression épigénétique, pour limiter la transcription sens du HTLV-1 et donc sa propre production.

Tax détourne d'autres méthyltransférases, afin de favoriser sa propre production. En effet, la protéine CARM1, capable de méthyler des résidus arginine de l'histone H3, interagit avec la protéine Tax et s'associe au LTR5' du HTLV-1, ce qui s'accompagne notamment de la présence de la marque H3R2me3. CARM1 est, par cet effet, indispensable à une transactivation efficace du LTR (Jeong et al., 2006).

Ainsi, Tax semble permettre l'établissement d'une structure chromatinienne au niveau du LTR5' propice à une transcription efficace, tout en recrutant certains facteurs capables de réprimer l'expression sens du HTLV-1. Par cette double fonction, Tax pourrait jouer un rôle actif dans la sélection de clones de lymphocytes immortalisés progressant vers la transformation.

#### 4) De nombreux facteurs cellulaires influencent l'efficacité de la transcription sens

Outre le recrutement par Tax d'un certain nombre de facteurs cellulaires, afin d'optimiser la transactivation du LTR5', il est à noter que certaines voies cellulaires interviennent, indépendamment de Tax, dans la régulation de la transcription sens du HTLV-1.

Il a ainsi été montré que l'activation du TCR (T Cell Receptor) augmentait la transcription du HTLV-1, en présence de Tax. En effet, des traitements par la PHA (phytohemagglutinine), la PMA (phorbol miristate acétate) ou à l'aide de billes recouvertes d'anticorps anti-CD2, CD3 et CD28, traitements qui induisent l'activation du TCR, entraînent une augmentation du niveau des ARN sens du HTLV-1 (Lin et al., 2005).

Par ailleurs, la protéine MEF-2 (Myocyte Enhancer Factor 2) située en aval de nombreuses voies de signalisation (signalisation Ca<sup>2+</sup>-dépendante, voie des MAP kinases, voie Wnt, voie PI3 kinase) et impliquée dans le développement de certains tissus, ainsi que dans des processus de tumorigenèse, est recrutée sur le LTR du HTLV-1. MEF-2 est, de plus, surexprimée dans les cellules infectées par le HTLV-1 et semble nécessaire à une transactivation efficace du LTR, puisqu'une inhibition de MEF-2 entraîne une diminution de la transcription sens du HTLV-1 (Jain et al., 2015).

Certains stimuli peuvent également affecter le niveau de transcription sens. Le stress oxydant est ainsi capable d'augmenter le niveau d'activation du LTR5'. En effet, en réponse à des traitements par le peroxyde d'hydrogène ou le cisplatine, qui entraînent la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS pour Reactive oxygen species), il a été observé une

augmentation du niveau d'ARN sens issus du HTLV-1, alors qu'un traitement par la N-acétylcystéine, un inhibiteur de la production de ROS, diminue la transcription de Tax (Mahgoub et al., 2018).

Par ailleurs, il a été montré que le niveau d'activation du LTR5' variait en fonction de l'organe dont était issu les cellules étudiées. Ainsi, dans un modèle de macaques japonais infectés par l'équivalent simien du HTLV-1, STLV-1, l'organe présentant le plus haut niveau d'expression de Tax était la moelle osseuse (Furuta et al., 2017). Or dans la moelle osseuse, le niveau d'hypoxie est plus élevé que dans certains tissus. Kulkarni et al. ont ainsi montré qu'un taux de dioxygène d'environ 1-2% induisait une activation de la transcription sens, par rapport à une situation de normoxie (Kulkarni et al., 2017).

Dans la même étude, il est également démontré qu'une forte concentration en glucose est associée à une augmentation de la transcription sens du HTLV-1 et que ce phénomène peut être inversé, en présence d'inhibiteurs de la glycolyse et de la chaîne mitochondriale de transport des électrons (Kulkarni et al., 2017). Cet effet du glucose pourrait s'expliquer par un phénomène décrit au sein de notre équipe. Nous avons, en effet, démontré que Tax augmentait le niveau d'O-N-acétylglucosamination (O-GlcNAc) dans les cellules infectées par le HTLV-1 et détournait la machinerie de O-GlcNAc, afin d'augmenter le recrutement du complexe associé à CREB, au niveau du LTR5', favorisant ainsi la transactivation du LTR5' (Groussaud, Khair, Tollenaere et al., 2017). Or le précurseur de cette modification synthétisée par l'OGT (O-GlcNAc transférase), l'UDP-GlcNAc est un produit dérivé de la glycolyse et sa concentration dépend donc de la quantité de glucose disponible. D'autres explications, concernant par exemple la quantité d'ATP disponible dans la cellule et utilisable par les complexes de remodelage de la chromatine ou la concentration en acétyl-coA nécessaire à l'acétylation des histones, toutes deux dépendantes de l'efficacité de la glycolyse, sont envisageables même si non entièrement satisfaisantes (Kulkarni and Bangham, 2018).

Un dernier facteur identifié comme pouvant réguler l'efficacité de la transcription sens, est le sens d'intégration du HTLV-1, par rapport à l'orientation de la transcription des gènes adjacents. En effet, il a pu être montré que lorsque le HTLV-1 est intégré avec la même orientation que les gènes cellulaires, la transcription contrôlée par le LTR5' est alors diminuée, à cause d'une interférence de la transcription du gène localisé en amont du provirus (Cook et al., 2014).

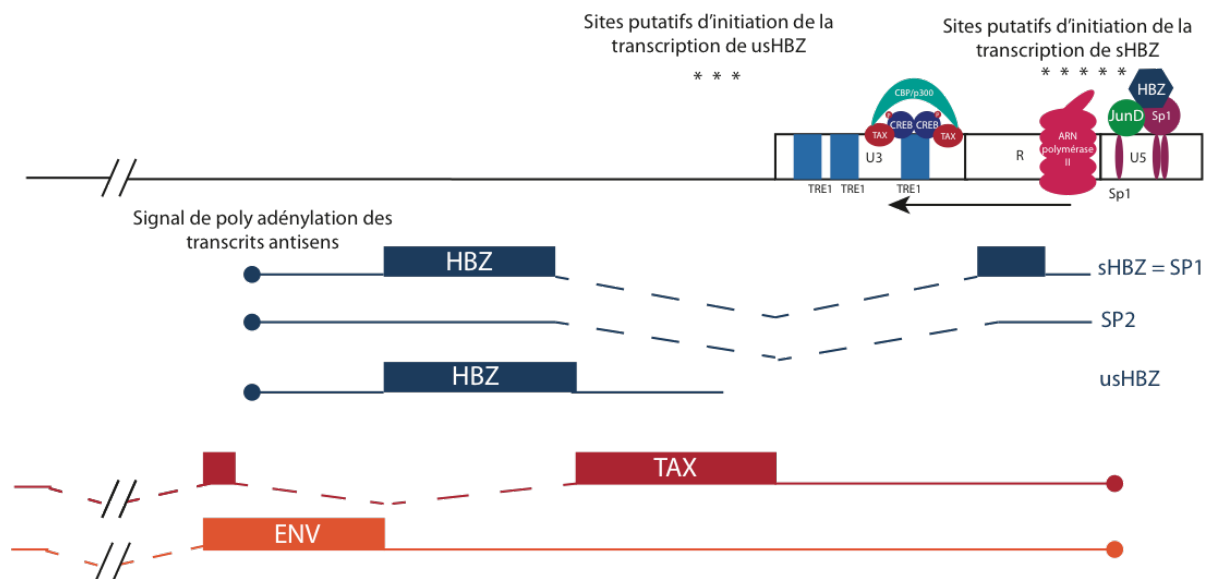
Nous l'avons vu, la transcription initiée au niveau du LTR5' présente une régulation complexe et multifactorielle. La régulation de la transcription contrôlée par le LTR3' bien que moins étudiée sera développée dans la partie suivante.

### **B) Régulation de la transcription antisens du HTLV-1**

Peu de temps après la découverte du HTLV-1, l'existence de phases ouvertes de lecture, codées sur le brin antisens du virus, a été supposée et confirmée par la détection de transcrits antisens, contrôlés par le LTR3', dans la lignée SLB-1 (Larocca et al., 1989). L'existence de la protéine HBZ a ensuite été décrite, un peu plus d'une décennie plus tard (Gaudray et al., 2002), ouvrant un nouveau champ de recherche dans le domaine HTLV-1 et conduisant à la caractérisation progressive de la transcription antisens du virus HTLV-1.

Au cours des différentes études plusieurs transcrits HBZ ont pu être caractérisés.

Deux transcrits épissés alternativement et appelés SP1 ou sHBZ et SP2 ont été décrits (Cavanagh et al., 2006; Murata et al., 2006). Ces transcrits épissés sont initiés à partir d'un site d'initiation de la transcription, localisé à la jonction R-U5 sur LTR3'. Le site donneur d'épissage est localisé, respectivement, à 367 et 227 du démarrage du brin antisens, pour SP1 et SP2. Le site accepteur d'épissage est identique pour les deux transcrits et situé juste en aval du codon initiateur utilisé pour la forme non épissée, usHBZ. Le transcrit non épissé est initié dans la région pX (Yoshida et al., 2008). Les transcrits HBZ sont tous polyadénylés et leur site de polyadénylation commun est localisé juste avant le premier exon de Tax (Figure 19).



**Figure 19 : Les transcrits antisens présentent une régulation distincte et des promoteurs différents**

Trois transcrits différents coexistent en antisens. Les transcrits épissés SP1 ou sHBZ et SP2 sont initiés au niveau de la jonction R-U5 du LTR3' et leur transcription est dépendante du facteur Sp1 et semble augmentée par le recrutement de dimères HBZ-JunD. Le transcript non épissé, usHBZ est initié au niveau de la fin de la région pX et pourrait faire l'objet d'une régulation dépendante des TRE et donc semblable à la transactivation du LTR5'.

Tous les transcrits présentent un signal de polyadénylation commun situé juste en aval du premier exon de Tax. Les séquences codantes de s et usHBZ ne sont pas chevauchantes avec les séquences codantes de Tax et Env. En revanche, le signal de polyadénylation des transcrits se situe après l'initiation de sHBZ ce qui pourrait entraîner une interférence entre les transcriptions sens et antisens.

D'après Yoshida et al. 2008

Dans les lignées de lymphocytes infectés par HTLV-1, le transcrit SP2 est exprimé très faiblement. De plus, aucun codon initiateur AUG n'a pu être localisé en phase dans l'ARN de SP2. L'existence d'une protéine traduite à partir de SP2 nécessiterait donc le recours à un autre codon initiateur (Cavanagh et al., 2006). Pour ces raisons, l'isoforme SP2 n'est que peu étudiée et on peut résumer la transcription antisens du HTLV-1 aux deux transcrits sHBZ et usHBZ. Les deux formes sHBZ et usHBZ sont détectables dans les PBMC de patients atteints d'ATL mais aussi de patients atteints de TSP et de patients asymptomatiques, ainsi que dans toutes les lignées de lymphocytes T (LT) transformées par le HTLV-1.

Du fait de sites d'initiation de la transcription différents, la régulation de sHBZ et usHBZ dépend de deux promoteurs différents.

La transcription de sHBZ semble contrôlée par la région U5 du LTR. Cette région contient des sites de liaison au facteur de transcription Sp1 et ces éléments régulent positivement le niveau de sHBZ (Yoshida et al., 2008). La protéine HBZ, en interagissant avec JunD, par l'intermédiaire de son domaine bZip, favorise la formation d'un complexe HBZ/JunD/Sp1 au

niveau des sites de liaison à Sp1, dans la région U5 du LTR3'. Par cet effet, il a été montré qu'en condition de déprivation en sérum, HBZ augmente ainsi l'efficacité de la transcription de sHBZ (Gazon et al., 2012). Le fait que cet effet ne soit visible que dans des cellules cultivées avec une faible quantité de sérum, pourrait être lié à une augmentation de la quantité de protéine JunD observée dans de telles conditions mais pose cependant la question de la pertinence de cette régulation en contexte physiologique.

La forme non épissée, usHBZ, quant à elle, semble davantage contrôlée par la région U3 du LTR au sein de laquelle sont localisés les sites TREs. L'étude du recrutement des facteurs de transcription, au niveau de la région U3 du LTR3', a permis de mettre en évidence le recrutement des facteurs CREB, CBP/p300 et de la protéine Tax (Lemasson et al., 2004). Ces résultats suggèrent que la régulation de la transcription de usHBZ pourrait être semblable à celle de la transcription dépendante du LTR5'.

Ainsi puisque Tax favorise la transcription sens du HTLV-1 et que HBZ semble favoriser sa propre production, il semble intéressant d'étudier les effets réciproques d'une transcription sur l'autre.

### **C) Balance transcriptionnelle du HTLV-1 : vers une interdépendance des deux transcriptions ?**

#### **1) Effets respectifs des protéines HBZ et Tax sur les transcriptions sens et antisens**

La protéine HBZ, issue des transcrits sHBZ mais aussi usHBZ, par l'intermédiaire de son domaine b-Zip, est capable d'interagir avec de nombreux facteurs de transcription possédant eux-mêmes un domaine b-Zip, dont ceux impliqués dans la transcription sens du HTLV-1. Les effets décrits ci-dessous ont été observés pour la protéine issue du transcrit épissé sHBZ mais pourraient également concerner la protéine issue d'usHBZ.

Il a ainsi été montré que la protéine HBZ interagit avec c-Jun, ce qui entraîne la diminution de la transcription basale du LTR5', en absence de Tax (Basbous et al., 2003).

En plus de la transcription basale, HBZ est capable d'inhiber la transactivation du LTR5' par Tax, en se liant à CREB et en empêchant son recrutement au niveau des vCRE (Lemasson et al., 2007). Par ailleurs, indépendamment de son domaine b-Zip mais par l'intermédiaire de

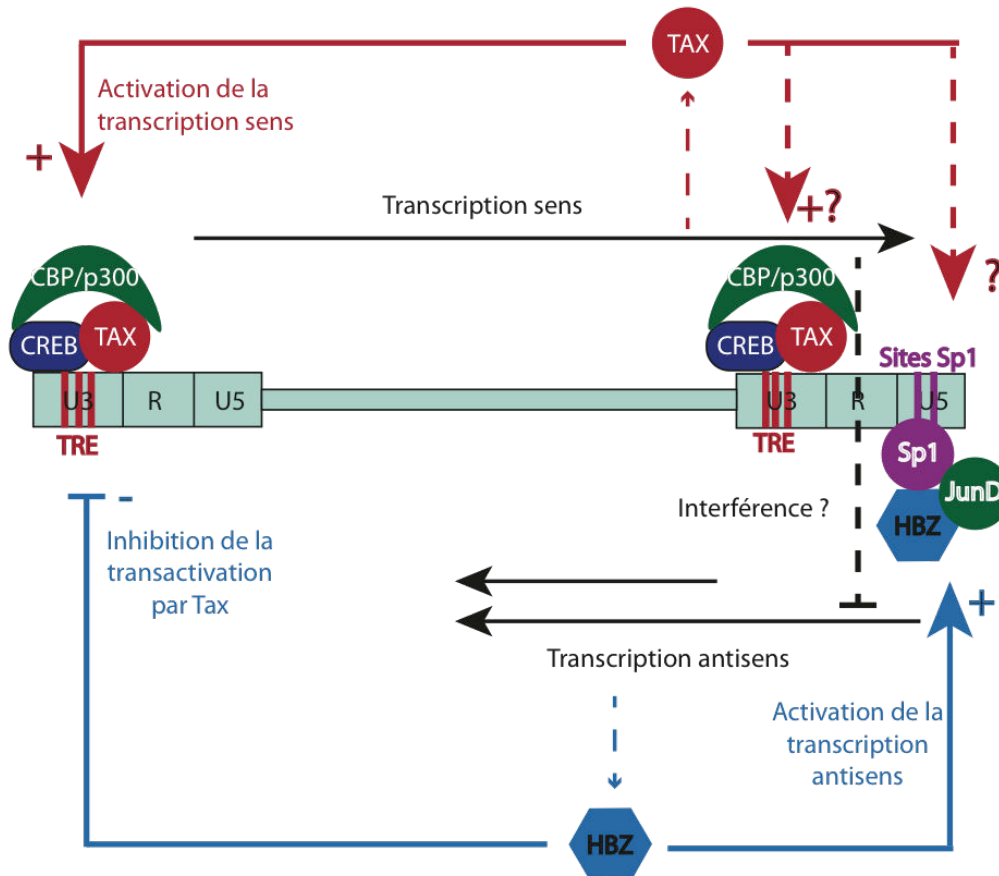
motifs LXXLL, localisés en N-ter de la protéine HBZ, HBZ entre en compétition avec Tax pour la liaison du domaine KIX de CPB/p300 (Clerc et al., 2008) et inhibe son activité histone acétyltransférase (Wurm et al., 2012). HBZ inhibe donc la transcription sens basale et transactivée par Tax.

L'effet de la protéine Tax sur la transcription antisens du HTLV-1 est moins clair.

Sur des modèles plasmidiques, il a été montré que Tax était capable d'augmenter la transcription d'HBZ, de manière dépendante de CREB et des éléments de réponse à Tax, localisés dans la région U3 (Landry et al., 2009). Cependant, la construction utilisée, présentant le gène de la luciférase à la place du second exon d'HBZ, ne permet pas de discriminer les transcrits issus du promoteur de sHBZ et de usHBZ.

Dans une autre étude, il a été montré que Tax n'avait que peu d'effet sur un gène indicateur, placé sous contrôle du promoteur de sHBZ et augmentait la transcription du même gène, sous contrôle du promoteur de usHBZ (Yoshida et al., 2008). Tax semble donc n'avoir un effet direct que sur le promoteur de usHBZ et non de sHBZ. De plus, il a été montré, par des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine, que la protéine Tax pouvait être détectée au niveau de la région U3 du LTR3' (Lemasson et al., 2004).

Ces études ayant été menée sur des constructions indicatrices et avec la protéine Tax uniquement, il serait intéressant de voir si, dans un contexte proviral, il existe ou non une interférence transcriptionnelle entre les transcriptions sens et antisens (Figure 20).



**Figure 20 : Effets réciproques des transcriptions sens et antisens du HTLV-1**

L'effet des protéines Tax et HBZ sur la transcription sens est clairement démontré ; Tax augmente la transcription sens et HBZ l'inhibe. HBZ est aussi capable d'augmenter la transcription de sHBZ en favorisant le recrutement de JunD. En revanche, les éventuels effets de la transcription sens sur la transcription antisens sont moins bien décrits. Tax semble capable d'augmenter la transcription de usHBZ par le recrutement de CREB et CBP/p300 mais son impact sur le fonctionnement du promoteur de sHBZ est mal connu. De plus, on ignore si, dans le contexte du provirus HTLV-1 complet, les ARN sens peuvent interférer avec la transcription antisens, leur signal de poly-adénylation étant localisé en aval des sites d'initiation de la transcription de sHBZ et usHBZ.

Adaptée de Matsuoka et Yasunaga 2013

## 2) Existe t'il une interférence transcriptionnelle entre les transcriptions sens et antisens du HTLV-1 ?

Chez d'autres rétrovirus, comme l'Avian Leukemia Virus (ALV), il a été supposé que la transcription antisens à partir du LTR3' devait forcément être réprimée par interférence des ARN issus de la transcription sens, notamment par un encombrement stérique, empêchant le recrutement efficace de l'ARN polymérase au niveau du LTR3' (Cullen et al., 1984).

Si dans le cas du HTLV-1, l'existence d'une transcription issue du LTR3' n'est plus à débattre, la possibilité que cette transcription subisse une interférence, résultant de la transcription sens, a été peu étudiée.

Une étude menée sur un plasmide, permettant une transcription bidirectionnelle à partir de chacun des LTR et contrôlant deux gènes indicateurs, a permis de conclure qu'il n'existait pas d'interférence transcriptionnelle entre les transcriptions sens et antisens, que ce soit dans un contexte plasmidique ou intégré (Laverdure et al., 2016). Cependant, dans cette étude, les sites d'initiation de la transcription d'usHBZ étant absents, il semblerait que l'activité du gène rapporteur en antisens ne dépende que du promoteur de sHBZ. Ainsi, il n'existe pas d'interférence transcriptionnelle directe entre les transcriptions sens et antisens dans un système simple présentant deux gènes rapporteurs sous contrôle de chacun des LTR. Malgré tout, cette étude permet difficilement de conclure sur une éventuelle interférence entre les transcriptions sens et antisens, dans le contexte du provirus HTLV-1, compte tenu de l'existence de deux transcrits antisens, contrôlés par le LTR3' et du chevauchement éventuel des transcrits sens et antisens du virus.

## Problématique

*Au cours du développement de la leucémie T de l'adulte, les clones de lymphocytes T infectés par HTLV-1 prolifèrent anormalement et accumulent des anomalies génétiques et épigénétiques. Ces deux processus sont étroitement liés à l'expression des deux oncoprotéines virales, Tax et HBZ. En parallèle, on observe une sélection des clones, aboutissant chez les patients atteints de leucémie T de l'adulte, à l'existence d'un clone ou quelques clones dominants. Cette sélection fait intervenir, à la fois une sélection par le système immunitaire qui a tendance à défavoriser les clones exprimant fortement la protéine Tax, la sénescence induite par la protéine Tax, et les qualités d'adaptation, de prolifération et de survie intrinsèques des clones, qualités liées aux mutations et anomalies accumulées, au cours du temps. De plus, si l'on considère le pourcentage de clones leucémiques ne présentant plus de transcription sens, il apparaît que la suppression de la transcription sens, au cours du processus oncogénique, procure un avantage sélectif aux clones de lymphocytes T infectés et immortalisés. Paradoxalement, l'expression de Tax semble, malgré tout, nécessaire aux étapes précoces de l'infection et à l'émergence de clones présentant une hyperactivation de certaines voies, la suppression de l'activité de gènes suppresseurs de tumeurs et les anomalies génomiques observées dans les clones leucémiques.*

*Dès lors, il semble que la régulation de l'expression des deux oncoprotéines au cours du temps, pourrait favoriser ou défavoriser certains clones et jouer un rôle actif dans la leucémogénèse et dans l'agressivité de la pathologie. Il apparaît donc primordial de progresser dans notre connaissance des mécanismes de régulation de la balance transcriptionnelle du HTLV-1.*

*L'organisation complexe et imbriquée des transcrits sens et antisens du rétrovirus HTLV-1 ainsi que l'influence de facteurs cellulaires comme les sites d'intégration, rendent nécessaire l'étude de cette régulation, dans le contexte de provirus HTLV-1 complets et intégrés. L'influence de la transcription antisens sur la transcription sens étant plutôt bien décrite, je me suis focalisée sur l'impact de la transcription sens sur la transcription antisens du HTLV-1. Afin d'analyser ce phénomène, j'ai identifié de nouvelles manières de moduler la transcription sens et étudié les conséquences de ces traitements sur la transcription antisens.*

## **Matériels et Méthodes**

Seules les expériences que j'ai nouvellement mises au point lors de ma thèse sont détaillées dans la section ci-dessous.

## **I) Détection spécifique des transcrits sens et antisens du HTLV-1**

La détection spécifique des transcrits épissés est permise par l'utilisation de sondes Taqman, localisées à la jonction entre les exons et donc la séquence est présentée ci-dessous.

| Transcrit détecté | Amorce sens              | Amorce antisens             | Sonde Taqman                            |
|-------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------------------|
| Tax               | ATCCCGTGGAGA<br>CTCCTCAA | CCAAACACGTAGA<br>CTGGGTATCC | TCCAACACCATGGC<br>CCACTTCCC             |
| sHBZ              | AGAACGCGACTC<br>AACCGG   | TGACACAGGCAAG<br>CATCGA     | TGGATGGCGGCCTC<br>AGGGCT                |
| p30               | ACCAACACCATG<br>GCACTA   | AGGAGCGCCGTGA<br>GCGCAAGT   | FAM-<br>TTCGCCTTCTCAGCC<br>CCTTGTCT-TAM |

Pour les transcrits sens non épissés, les amorces sont choisies dans une région non chevauchante avec la transcription antisens. Les amorces utilisées sont les suivantes :

| Nom et transcrits détectés     | Amorce sens                | Amorce antisens            | Position au niveau du génome HTLV |
|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| Gag : ARN viral génomique      | CAGAGGAAGATG<br>CCCTCCTATT | GTCAACCTGGGCT<br>TTAATTACG | 2037-2202                         |
| Env : Tous les transcrits sens | GCTAGTTCTGCC<br>CAGTGGAT   | TTGGTGGTCTTTTT<br>CTTTGG   | 5100-5179                         |

Afin de détecter spécifiquement le transcrit usHBZ en s'affranchissant de la contamination par le brin sens et l'auto-amorçage, on réalise une transcription inverse avec l'oligonucléotide suivant composé d'une séquence reconnaissant le second exon d'HBZ (en position 70 du second exon soit en position 7220 sur le génome HTLV-1) et d'une séquence Tag (en orange) **GGCAGTATCGTGAATTCGATGCT**CCAAGGATAATAGCCCGTCCA.

Cette transcription inverse (RT) est effectuée sur 1µg d'ARN à l'aide de l'enzyme Maxima H-minus (Thermo Fisher Scientific) selon le protocole du fabricant. Des concentrations en oligonucléotide spécifique de 2,5µM et en oligo dT de 5µM finales sont utilisées. Après une

étape de digestion par une DNase, spécifique de l'ADN double brin et une pré-incubation avec les oligonucléotides et les dNTPs, la reverse transcription est réalisée à 65°C, pendant 30 minutes, et suivie d'une inactivation de l'enzyme, 5 minutes à 85°C. La PCR permettant la détection du transcrit usHBZ est ensuite réalisée, sur une dilution au 1/10<sup>ème</sup> de la réaction de RT, avec un oligonucléotide sens spécifique de usHBZ : CAGTAGGGCGTGACGATGTA et un oligonucléotide antisens spécifique du Tag : GGCAGTATCGTGAATTCGATGC à l'aide de SYBR Green (Roche) (voir figure 27 de la partie résultats).

Les résultats sont normalisés sur les gènes de ménage EEF1G Fw AGATGGCCCAGTTTGATGCTAA Rev GCTTCTCTTCCCGTGAACCCT et HPRT Fw TGACACTGGCAAAACAATGCA et Rev GGTCCCTTTTCACCAGCAAGCT.

## II) Détermination de la charge provirale

Afin de normaliser les résultats sur la quantité de provirus présents dans chaque lignée cellulaire, la charge provirale est déterminée par PCR. L'ADN des lignées est extrait à partir de 3 à 5 millions de cellules, à l'aide du kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen), selon le protocole du fabricant, en ajoutant une étape de digestion à la RNase A. Les ADN obtenus sont dosés et une PCR est réalisée sur une solution d'ADN à 10ng/μL. Des cellules Jurkat sont utilisées comme contrôle négatif. Pour chaque lignée, une PCR quantitative est effectuée avec les oligonucléotides suivants.

| Nom de l'oligonucléotide | Amorce sens                  | Amorce antisens             | Position de l'amplicon sur le génome HTLV |
|--------------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------|
| Beta-globine             | AGGACAGGTACGG<br>CTGTCATC    | TTTATGCCCAGC<br>CCTGGCTC    |                                           |
| vCRE proximal            | ATCATAAGCTCAGA<br>CCTCCGGGAA | CCTGAGGACGGC<br>TTGACAAACAT | 180-231                                   |
| LTR5'                    | GACAGCCCATCCTA<br>TAGCACTC   | CTAGCGCTACGG<br>GAAAAGATT   | 733-832                                   |
| LTR3'                    | AATACACCAACATC<br>CCCATTTC   | GTTTTTCACTGG<br>GAGGCTCTAA  | 8251-8338                                 |

La charge provirale est ensuite déterminée selon le calcul suivant : exemple pour vCRE

$$PVL = \frac{\text{Efficacité PCR Beta Globine}^{(Ct \text{ lignée} - Ct \text{ Jurkat})}}{\text{Efficacité PCR vCRE}^{(Ct \text{ lignée} - Ct \text{ Jurkat})}}$$

### III) Immunoprécipitations de chromatine (ChIP)

La chromatine est préparée à partir de 5 millions de cellules, fixées dans une solution de formaldéhyde 1% diluée en PBS, pendant 8 minutes à température ambiante, pour les ChIP dirigées contre les histones ou les marques d'histones. Pour les immunoprécipitations dirigées contre des facteurs de transcription, des enzymes de modification de la chromatine ou la protéine Tax, les cellules sont fixées dans une solution de disuccinimidylglutarate (DSG) 0,8% dans du PBS pH=8, pendant 30 minutes et de formaldéhyde 1%, pendant 8 minutes, afin d'obtenir des pontages plus longs qu'avec la formaldéhyde seule. Dans les deux cas, la fixation est neutralisée par ajout d'une solution de glycine à 1%, pendant 5 minutes à température ambiante. Après des lavages en PBS froid, les cellules sont lysées dans 1mL de tampon de lyse 1 (50mM Hepes-KOH pH=7,5 ; 140mM NaCl ; EDTA 1mM ; Glycérol 10% ; NP-40 0,5% ; Triton X-100 0,25%) puis après centrifugation 1mL de tampon de lyse 2 (10mM Tris pH=8 ; 200mM NaCl ; 1mM EDTA ; 0,5mM EGTA) est ajouté. La chromatine est ensuite soniquée dans 200µL de tampon de lyse 3 (50mM Tris pH = 8 ; 150mM NaCl ; 1% SDS ; 1% NP-40 ; 0,1% sodium deoxycholate ; 10mM EDTA).

La sonication est réalisée à l'aide du sonicateur Bioruptor Pico (Diagenode), jusqu'à obtenir des fragments d'environ 200 à 300 paires de bases. La chromatine obtenue est contrôlée sur gel d'agarose 1,5% en TAE1X après digestion à la RNase A, à la protéinase K et retrait des pontages (decrosslink) par incubation sur la nuit à 65°C en présence de 0,2M NaCl. L'immunoprécipitation est réalisée selon le protocole du kit ChIP-IT High Sensitivity (Active Motif) sur 1µg de chromatine pour les ChIP dirigées contre les histones et 10µg de chromatine pour les autres ChIP.

Listes des anticorps et quantités utilisés pour les ChIP

| Nom et référence de l'anticorps                    | Espèce | Quantité utilisée pour les ChIP |
|----------------------------------------------------|--------|---------------------------------|
| Anti histone H3 C-term<br>Merck Millipore 17-10254 | Lapin  | 2µg                             |
| Anti H3K9me3<br>Merck Millipore 17-625             | Lapin  | 4µg                             |
| Anti H3K27me3<br>Merck Millipore 17-622            | Lapin  | 4µg                             |
| Anti H3K4me3<br>Merck Millipore 17-614             | Lapin  | 4µg                             |

|                                                         |        |     |
|---------------------------------------------------------|--------|-----|
| Rabbit polyclonal IgG<br>Merck Millipore                | Lapin  | 4µg |
| Anti Tax (1A3)<br>Santa Cruz Biotechnology sc-57872     | Souris | 4µg |
| Mouse IgG<br>Santa Cruz Biotechnology                   | Souris | 4µg |
| P-CREB                                                  | Lapin  | 4µg |
| Sp1 ChIP grade<br>Abcam ab13370                         | Lapin  | 4µg |
| Anti-KMT6 / EZH2 ChIP grade<br>Abcam ab3748             | Lapin  | 4µg |
| Rabbit IgG polyclonal – Isotype Control<br>Abcam 171870 | Lapin  | 4µg |
| EZH2 (AC22)<br>Active Motif 39875                       | Souris | 4µg |
| Suv39h1 (MG44)<br>Active Motif 39785                    | Souris | 4µg |
| XPB<br>Novus Bio NB100-61060                            | Lapin  | 4µg |

Après élution, digestions des ARN et des protéines, réversion des pontages et purification des fragments d'ADN immunoprécipités, une PCR est réalisée avec les amorces vCRE, LTR3', LTR5', décrites dans la partie détermination de la charge provirale, mais aussi sur des régions cellulaires contrôle (ZNF554, MyoD, alphasatellite, GAPDH).

| Région contrôle reconnue | Amorce Sens              | Amorce Antisens         |
|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| ZNF554                   | CGGGGAAAAGCCCT<br>ATAAAT | TCCACATTCACTGCATTTCGT   |
| MyoD                     | CCTCTTTCGGTCCCT<br>CTTTC | TTCCAAACCTCTCCAACACC    |
| Alpha-satellite          | CTGCACTACCTGAA<br>GAGGAC | GATGGTTCAACACTCTTACA    |
| GAPDH                    | TACTAGCGGTTTTAC<br>GGGCG | TCGAACAGGAGGAGCAGGAGCGA |

## **Résultats**

## **Partie 1 : Le détournement du complexe d'O-GlcNAc par l'oncoprotéine Tax du HTLV-1 facilite la transcription virale.**

Groussaud, Khair, Tollenaere et al. PLOS Pathogens 2017

Au cours de ma première année de thèse, j'ai participé à l'analyse du rôle d'une modification post-traductionnelle, appelée O-N-acétylglucosamination (O-GlcNAc) dans la régulation de la transactivation du LTR5' du HTLV-1 par Tax. Cette étude a donné lieu à une publication, dans la revue PLOS Pathogens, sous le titre : « Hijacking of the O-GlcNAcZYME complex by the HTLV-1 Tax oncoprotein facilitates viral transcription » (voir annexe).

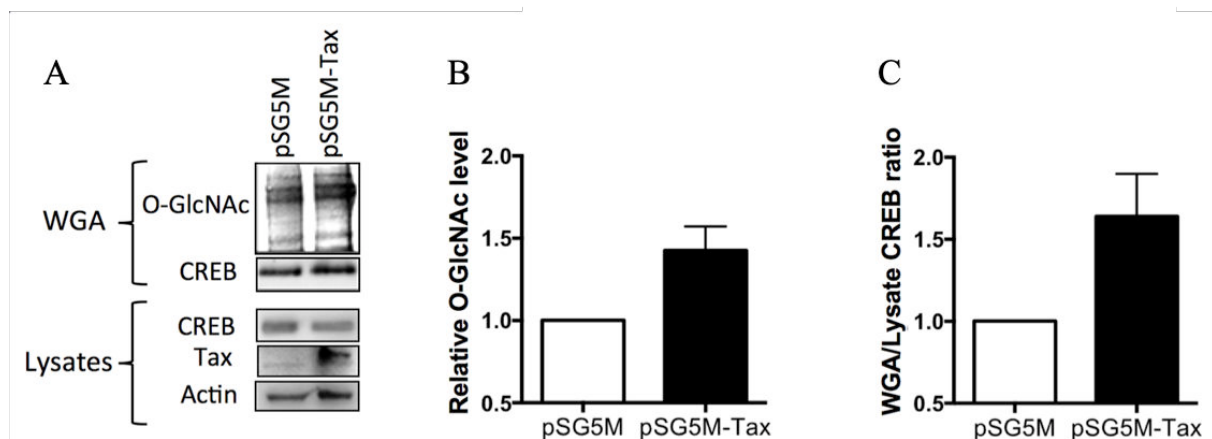
L'O-GlcNAc est une modification post-traductionnelle réversible, consistant en l'ajout de N-acétylglucosamine sur des résidus Thréonine ou Sérine des protéines. Cet ajout est catalysé par une enzyme appelée OGT (O-GlcNAc transférase), formant un complexe avec l'enzyme capable de retirer les O-GlcNAcylations, c'est-à-dire l'OGA (OGlcNAcase).

Ma contribution à ce travail a été, d'une part, d'analyser l'impact de Tax sur l'O-GlcNAcylation de la protéine CREB et d'autre part, d'étudier l'effet d'une augmentation de l'O-GlcNAcylation sur l'activation du promoteur du HTLV-1 et le recrutement de CREB sur celui-ci.

### **I) La protéine Tax augmente le niveau d'O-GlcNAcylation du facteur de transcription CREB.**

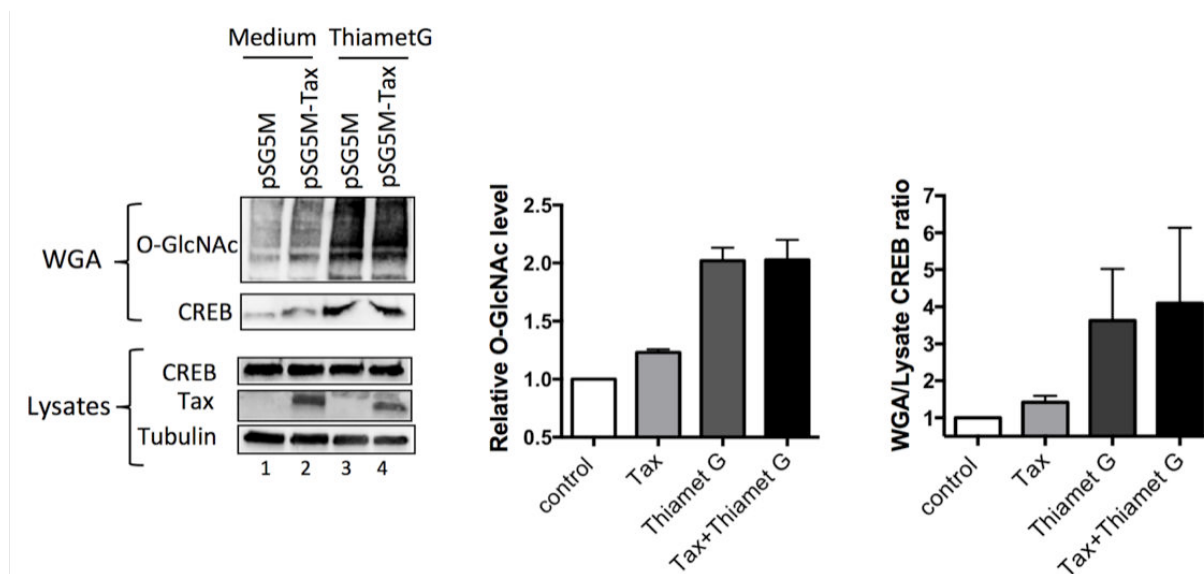
Nous avons montré que, dans les lignées de lymphocytes T transformés par le rétrovirus HTLV-1 et exprimant la protéine Tax, le niveau d'O-GlcNAcylation total est augmenté. Tax est en effet capable d'interagir avec le complexe OGT-OGA, ce qui a pour conséquence d'inhiber l'activité de l'OGA.

Lorsque l'on exprime la protéine Tax par transfection dans des lymphocytes T transformés par le HTLV-1, mais n'exprimant pas Tax (lignée TL-Om1) ou dans des cellules non infectées par HTLV-1 (HEK293T) et que l'on purifie les protéines O-GlcNAcylées à l'aide de billes de lectine de blé (WGA Wheat Germ Lectin), on observe une augmentation du niveau global d'O-GlcNAc (Figures 21A et 21B et Figures 22A et B).



**Figure 21 : L'expression de Tax dans les cellules Tlom-1 entraine une augmentation du niveau global d'O-GlcNacylation ainsi qu'une augmentation de l'O-GlcNacylation de la protéine CREB.** Des cellules Tlom-1 ont été transfectées avec un vecteur permettant l'expression de la protéine Tax (pSG5M-Tax) ou un vecteur contrôle (pSG5M). Les protéines OGlcNAcylées ont ensuite été purifiées à l'aide de billes de lectine. A. Les lysats totaux ou les protéines retenues sur la lectine sont révélées par Western Blot à l'aide d'anticorps reconnaissant les O-GlcNAcylation, la protéine CREB ou la protéine Tax. La normalisation de la quantité totale de protéine est réalisée par marquage de l'actine. Le Western Blot présenté est représentatif des résultats de deux expériences indépendantes. B Quantification du niveau d'OGlcNAcylation totale dans deux expériences indépendantes. C Quantification du niveau de protéine CREB retenues sur les billes de lectine par rapport à la quantité totale de protéine CREB présente dans les lysats dans deux expériences indépendantes.

Parmi les multiples protéines susceptibles d'être O-GlcNAcylées, se trouve le facteur de transcription CREB. Lorsque l'on exprime la protéine Tax dans les cellules TL-Om1, on observe que la quantité de protéine CREB, retenue sur les billes de lectine, est augmentée, par rapport au contrôle. Tax semble donc favoriser l'O-GlcNAcylation du facteur de transcription CREB. Afin de s'affranchir de l'éventuel impact de la protéine HBZ, exprimée dans les cellules TL-Om1, ces résultats ont été confirmés dans des cellules HEK-293T dépourvues de provirus HTLV-1 (Figure 22). De plus, dans ces cellules, l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de l'OGA, le Thiamet G, permet d'augmenter encore davantage le niveau d'O-GlcNAcylation de CREB.



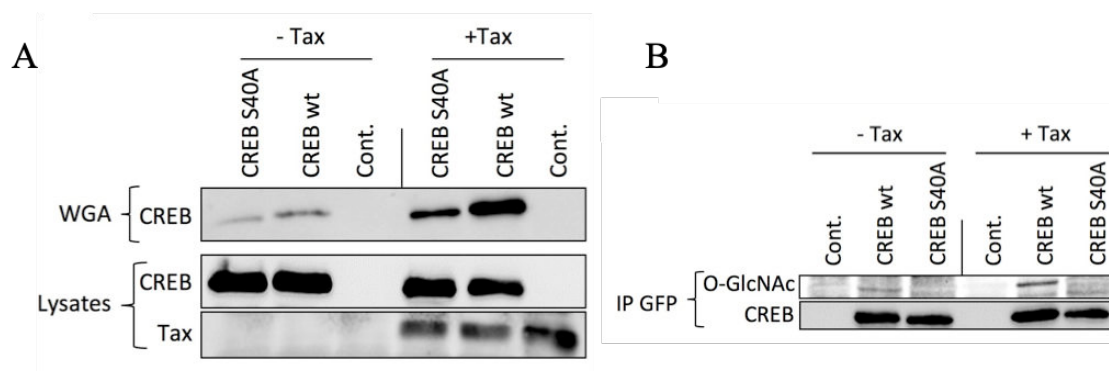
**Figure 22 : L'expression de Tax dans les cellules HEK-293T ainsi que l'inhibition de l'OGA entraînent une augmentation du niveau global d'O-GlcNAcylation et de l'O-GlcNAcylation de la protéine CREB.** Des cellules HEK-293T ont été transfectées avec un vecteur permettant l'expression de la protéine Tax (pSG5M-Tax) ou un vecteur contrôle (pSG5M) et traitées ou non avec 10 $\mu$ M de Thiamet G, un inhibiteur de l'OGA. Les protéines OGlcNAcylées ont ensuite été purifiées à l'aide de billes de lectine. A. Les lysats totaux ou les protéines retenues sur la lectine sont révélées par Western Blot à l'aide d'anticorps reconnaissant les O-GlcNAcylation, la protéine CREB ou la protéine Tax. La normalisation de la quantité totale de protéine est réalisée par marquage de l'actine. Le Western Blot présenté est représentatif des résultats de deux expériences indépendantes. B. Quantification du niveau d'OGlcNAcylation totale dans deux expériences indépendantes. C. Quantification du niveau de protéine CREB retenue sur les billes de lectine par rapport à la quantité totale de protéine CREB présente dans les lysats dans deux expériences indépendantes.

## **II) L'augmentation du niveau d'O-GlcNAcylation de CREB favorise son recrutement au niveau du LTR et améliore l'efficacité de la transactivation.**

Dans des cellules HEK-293T, transfectées avec une construction indicatrice présentant le gène de la luciférase, sous contrôle du LTR du HTLV-1, l'effet transactivateur de la protéine Tax est accentué par l'inhibition chimique de l'OGA. Ces résultats ont été confirmés dans la lignée de lymphocytes transformés par HTLV-1, C8166, exprimant de manière endogène la protéine Tax. L'augmentation du niveau global d'O-GlcNAcylation par Tax semble donc favoriser la transactivation du LTR5'.

La protéine CREB étant l'une des protéines dont le niveau d'O-GlcNAcylation augmente, en réponse à l'expression de la protéine Tax ou l'inhibition chimique de l'OGA, j'ai ensuite étudié l'influence du niveau d'O-GlcNAcylation de CREB sur l'efficacité de la transactivation par Tax du LTR5'.

Le site majeur d'O-GlcNAcylation de la protéine CREB est le résidu Sérine 40. L'O-GlcNAcylation de la Sérine 40 empêche l'interaction de CREB avec son co-facteur CRTC/TORC et diminue donc l'activité transcriptionnelle de CREB, dans un modèle de cerveau de rat (Rexach et al., 2012). *In vitro*, l'O-GlcNAcylation de CREB empêche également son interaction avec la protéine du complexe TFIID, TAFII130 (Lamarre-Vincent and Hsieh-Wilson, 2003). Afin de diminuer l'O-GlcNAcylation de CREB, j'ai utilisé un mutant de CREB, au sein duquel le résidu Sérine 40 est remplacé par un résidu Alanine, incapable de subir une O-GlcNAcylation.



**Figure 23 : La mutation de la Sérine 40 de CREB abolit son O-GlcNAcylation**

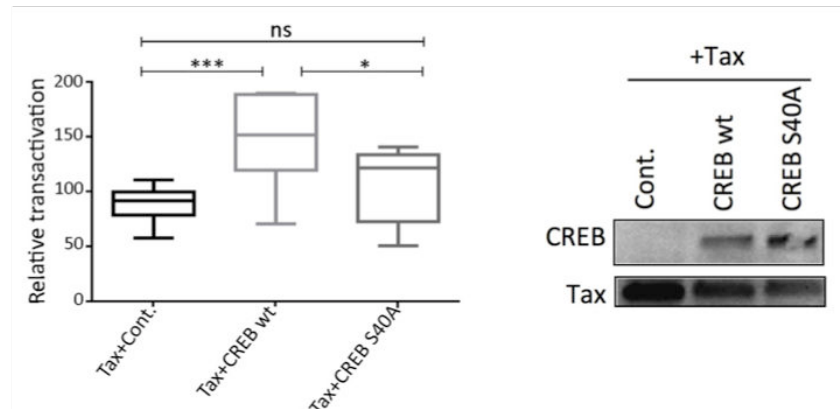
A. Des cellules HEK-293T sont transfectées avec des plasmides permettant l'expression de la protéine CREB sauvage ou mutée S40A ainsi que de la protéine Tax. Les protéines sont ensuite purifiées à l'aide de billes de lectine et révélées par Western Blot à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines CREB et Tax. B. Des cellules HEK-293T sont transfectées avec des plasmides permettant l'expression de la protéine CREB sauvage ou mutée S40A fusionnées à la GFP ainsi que de la protéine Tax. CREB est ensuite purifiée par immunoprécipitation dirigée contre la GFP. Les protéines sont révélées par Western Blot à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine CREB et l'O-GlcNAc.

En surexprimant la protéine CREB sauvage ou S40A dans des cellules HEK-293T, il apparaît que la protéine CREB S40A est moins retenue sur les billes de lectine que la protéine CREB sauvage. La liaison de CREB S40A à la lectine n'est pas complètement abolie, bien que diminuée (Figure 23A). Cela peut s'expliquer par le fait que les billes de lectine permettent la liaison de protéines présentant différents types de glycosylation, dont la O-GlcNAcylation, mais pas uniquement de cette dernière.

Afin d'analyser précisément le niveau d'O-GlcNAcylation de CREB et CREBS40A, j'ai immunoprécipité ces deux protéines, après surexpression dans des cellules HEK-293T. Le niveau d'O-GlcNAcylation est ensuite étudié, par Western Blot, à l'aide d'un anticorps spécifique de cette modification. On observe alors que la protéine CREBS40A perd la capacité à être O-GlcNAcylée et ce, même lorsque la protéine Tax est surexprimée (Figure

23B). Tax permet ainsi bien d'augmenter l'O-GlcNAcylation de la protéine CREB, au niveau de la Sérine 40 de cette protéine.

Afin d'analyser l'effet d'une augmentation du niveau d'OGlcNAcylation de CREB sur la transcription du HTLV-1, j'ai étudié l'influence des protéines CREB et CREBS40A sur le niveau de transactivation du LTR. Dans ce but, l'activité luciférase d'un système indicateur, présentant le gène de la luciférase sous contrôle du LTR du HTLV-1 est quantifiée.



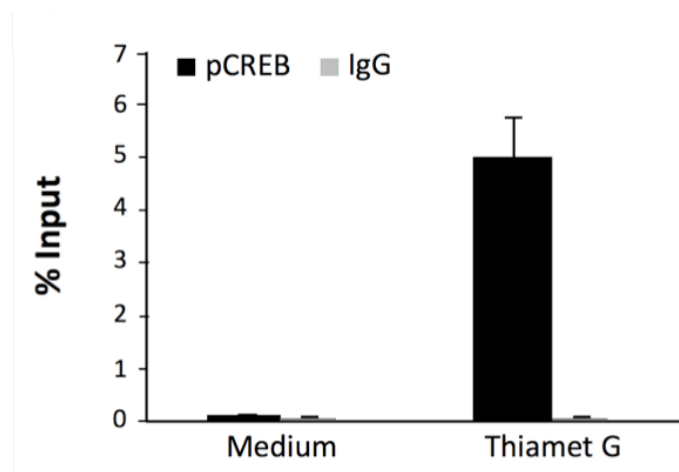
**Figure 24 : L'O-GlcNAcylation de CREB est nécessaire à une transactivation efficace du LTR du HTLV-1**

Les protéines Tax, CREB WT et CREBS40A sont surexprimées dans des cellules HEK293T transfectées avec un plasmide indicateur présentant le gène de la luciférase de Luciole sous contrôle des séquences promotrices du LTR du HTLV-1. Un plasmide présentant le gène de la luciférase de Renille sous contrôle du promoteur ubiquitaire de la thymidine kinase du HSV (Herpes Simplex Virus) est utilisé pour normaliser les résultats. L'activité relative de la luciférase de Luciole sur celle de la luciférase de Renille est ensuite mesurée. Le niveau d'expression des protéines CREB et Tax est contrôlé par Western Blot.

Comme attendu, la surexpression du facteur de transcription CREB favorise la transactivation du LTR du HTLV-1 par Tax. En revanche, la protéine CREBS40A, bien que mieux surexprimée que CREB sauvage dans les HEK-293T, n'augmente pas le niveau d'activité luciférase et n'a donc pas d'effet sur l'efficacité de la transactivation (Figure 24). Contrairement aux effets précédemment décrits de l'O-GlcNAcylation de CREB, dans le contexte du LTR du HTLV-1, l'O-GlcNAcylation de CREB semble favoriser son activité.

Afin de confirmer l'effet de l'O-GlcNAcylation de CREB dans le contexte d'un provirus intégré, j'ai étudié le recrutement de la forme phosphorylée, active de CREB au niveau du LTR du HTLV-1, par immunoprécipitation de chromatine, dans la lignée de lymphocytes transformés par HTLV-1, C8166, dans le contexte d'une inhibition chimique de l'OGA (Figure 25). Le recrutement de p-CREB, au niveau des séquences vCRE du LTR, est

fortement augmenté en réponse à l'inhibition chimique de l'OGA, ce qui s'accompagne d'une augmentation du niveau d'O-GlcNacylation de CREB (Figure 22).

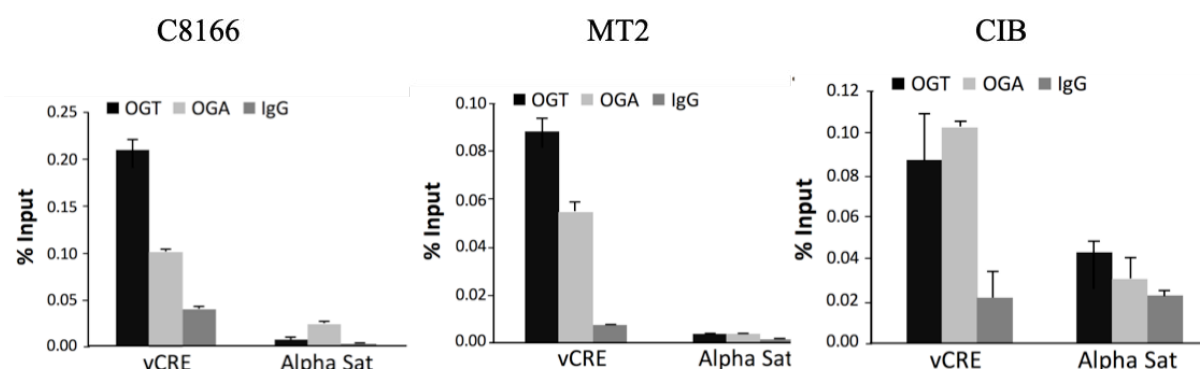


**Figure 25 : Le recrutement de p-CREB au niveau du LTR du HTLV-1 est augmenté suite à l'inhibition chimique de l'OGA.**

Des lymphocytes T C8166 ont été traités avec 10 $\mu$ M de Thiamet G pendant 48h avant préparation de la chromatine et immunoprécipitation avec un anticorps dirigé contre la forme phosphorylée sur la Sérine 133 de CREB ou un anticorps contrôle non spécifique, de même isotype et espèce que l'anti p-CREB. Les fragments d'ADN immunoprécipités sont amplifiés avec un couple d'amorces spécifiques des vCRE. Les résultats sont exprimés en pourcentage de l'Input.

Finalement, j'ai voulu étudier si la protéine Tax était capable, par son interaction avec le complexe OGT-OGA, de recruter ce complexe au niveau du LTR, pour faciliter l'O-GlcNacylation de facteurs impliqués dans la transcription sens du HTLV-1, dont CREB.

Dans les lignées de lymphocytes T transformés par HTLV-1 (C8166 et MT2), ainsi que dans des lymphocytes immortalisés mais non transformés par HTLV-1 (CIB), on note le recrutement de l'OGT et de l'OGA au niveau des séquences vCRE du LTR (Figure 26).



**Figure 26 : Le complexe O-GlcNacZYME est recruté au niveau du LTR dans les cellules infectées par HTLV-1.**

La chromatine de lymphocytes T transformés par HTLV-1 (C8166 et MT2) ou de lymphocytes immortalisés par HTLV-1 (CIB) est immunoprécipitée avec des anticorps dirigés contre l'OGT, l'OGA ou un anticorps non spécifique de même espèce et isotype. Les fragments d'ADN immunoprécipités sont amplifiés avec des amorces spécifiques des vCRE ou des amorces reconnaissant des séquences alpha-satellite.

**Ainsi nous avons montré que Tax, par sa capacité à interagir avec le complexe OGT-OGA, inhibe l'activité de l'OGA et recrute ce complexe, au niveau des séquences promotrices dans le LTR. Cela a pour conséquence d'accroître le niveau d'OGlcNAcylation, entres autres, du facteur de transcription CREB et d'augmenter son recrutement. Nous avons donc mis en évidence un nouveau mécanisme par lequel Tax augmente le niveau de transcription sens dans les lignées de lymphocytes T immortalisées par le HTLV-1.**

## **Partie 2 : La forme épissée du transcrit HBZ est réprimée par la transcription virale sens dans les lymphocytes T infectés par le HTLV-1**

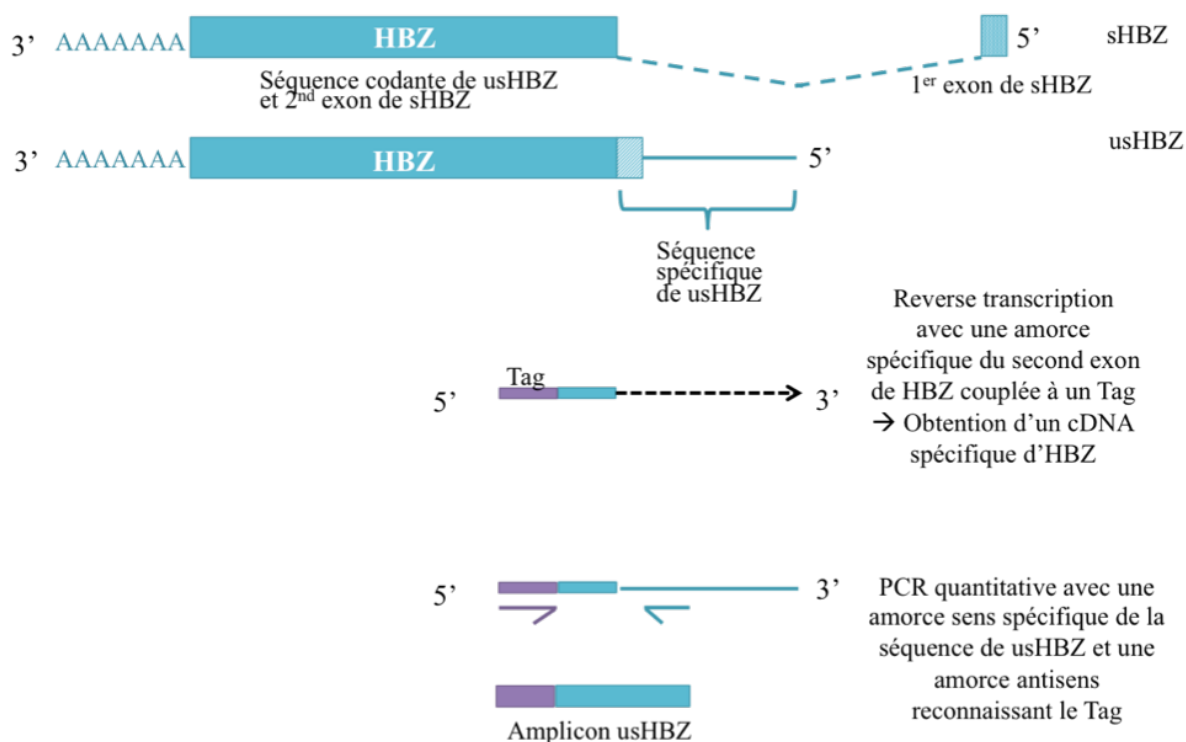
### **I) Le niveau de transcription de sHBZ est diminué dans les lymphocytes T avec un LTR5' actif.**

#### **A) Mise au point de la détection spécifique des différents transcrits du HTLV-1.**

J'ai tout d'abord, souhaité déterminer quels étaient les niveaux des transcrits Tax, sHBZ et usHBZ, dans différentes lignées de lymphocytes transformés par HTLV-1. Afin de détecter avec précision ces différents transcrits et de ne pas subir de contamination par les transcrits issus de l'autre brin, j'ai quantifié les ARNm messagers Tax et sHBZ à l'aide d'une sonde Taqman, chevauchant les sites d'épissage de ces deux transcrits.

Pour usHBZ, cette approche étant impossible puisque le transcrit n'est pas épissé, je me suis inspirée d'une technique utilisée pour la détection spécifique des différents ARN du virus Influenza (Kawakami et al., 2011) et ai mis au point une RTqPCR spécifique de la transcription antisens du HTLV-1. La transcription inverse est effectuée avec une amorce spécifique du deuxième exon d'HBZ, fusionnée à une amorce Tag, ce qui permet la synthèse spécifique d'ADN complémentaires, issus des transcrits HBZ (Figure 27). Afin de s'affranchir de l'auto-amorçage observé lors de l'étape de RT, la PCR quantitative est réalisée en utilisant le Tag comme amorce antisens et une amorce sens spécifique de la région non traduite en 5' de l'ARN usHBZ.

Cette approche m'a permis de détecter spécifiquement et de quantifier précisément chacun des ARN étudiés.



**Figure 27 : Mise au point d'une RTqPCR permettant la détection spécifique de l'ARN usHBZ**

L'étape de transcription inverse (Reverse Transcription RT) est réalisée à l'aide d'une amorce présentant une séquence spécifique d'HBZ et une séquence Tag non retrouvée dans le génome HTLV-1 ni dans le génome cellulaire. Cette étape est effectuée avec une reverse transcriptase stable et fonctionnelle à 65°C pour augmenter la spécificité de l'amorce. On procède ensuite à la PCR quantitative avec une amorce sens spécifique de la séquence 5' non traduite de usHBZ et une amorce antisens correspondant à la séquence Tag. Afin de normaliser les résultats, des oligodT sont ajoutés lors de la RT et les transcrits EEF1G et HPRT sont amplifiés lors de la PCR.

**B) Dans les lignées présentant un LTR5' actif, le niveau de production de sHBZ est fortement diminué contrairement à celui d'usHBZ.**

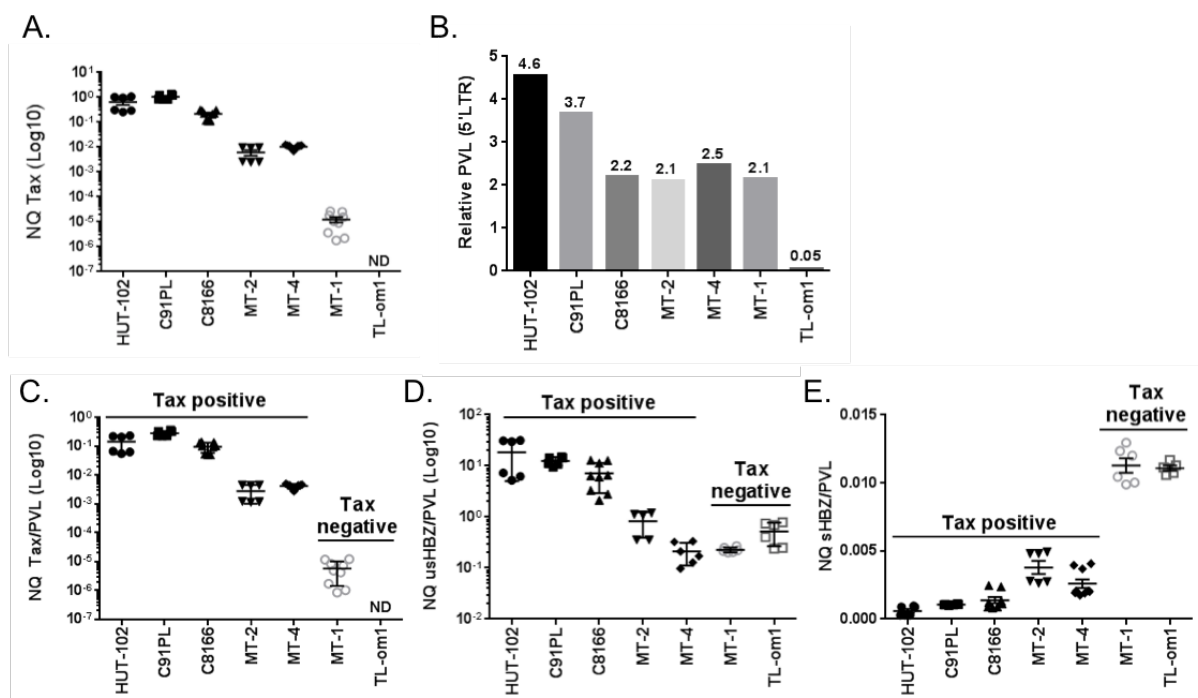
Comme attendu, l'ARNm de Tax est fortement exprimé dans les lignées présentant un LTR5' actif (HUT102, C91PL, C8166, MT2, MT4) et indétectable dans la lignée TL-Om1 dont le LTR5' est réprimé (Figure 28A) (Koiwa et al., 2002). Dans les MT1, on détecte un faible niveau d'ARNm de Tax, ce qui est en adéquation avec l'existence d'une réactivation ponctuelle de la transcription sens, dans certaines cellules de cette lignée (Mahgoub et al., 2018).

Les lignées de LT transformés par HTLV-1, utilisées au laboratoire, présentent un nombre différent de provirus. Le niveau des transcrits observé dans les différentes lignées ne reflète donc pas l'activité directe des différents promoteurs d'un unique provirus.

Afin d'étudier le niveau de production des différents ARN par provirus, j'ai déterminé la charge provirale dans chacune des lignées.

Pour cela, sur l'ADN de chaque lignée, des PCR ont été réalisées avec des couples d'amorces spécifiques du LTR5', du LTR3' ou de la région vCRE, présente dans les deux LTR. Les résultats obtenus ont ensuite été normalisés, par rapport à l'amplification du gène de la beta-globine et à une lignée lymphocytaire non infectée, les LT Jurkat.

Les résultats étant semblables pour les différentes régions amplifiées, j'ai déterminé la charge provirale, à partir de l'amplification réalisée au niveau du LTR5' (Figure 28B). Les quantités d'ARNm de Tax, usHBZ et sHBZ, mesurées par RT-qPCR ont ensuite été normalisées sur la charge provirale relative obtenue.



**Figure 28 : Les lignées HTLV-1 avec une transcription sens active présentent un plus faible niveau de sHBZ**

A. Quantification de l'expression de l'ARNm de Tax dans les différentes lignées étudiées. Après extraction des ARN et transcription inverse, l'ARNm de Tax est quantifié par qPCR à l'aide d'une sonde Taqman. Les résultats obtenus sont normalisés sur le niveau d'ARN d'EEF1G et de HPRT. Dans la lignée TL-Om1, le niveau d'ARNm de Tax n'est pas détectable. B. Détermination de la charge provirale dans les lignées HTLV-1. Une PCR avec des amorces spécifiques des LTR est réalisée sur l'ADN des différentes lignées. Les résultats sont normalisés sur le gène de la Beta-globine et sur une lignée de lymphocytes négative pour HTLV-1, les Jurkat. C. Quantification du niveau d'ARNm de Tax par rapport à la charge provirale. D. Quantification du niveau d'ARN usHBZ par rapport à la charge provirale. Après extraction des ARNs et transcription inverse avec une amorce spécifique de la séquence d'HBZ et contenant un Tag, l'ARN de usHBZ est amplifié spécifiquement et quantifié par rapport au niveau d'EEF1G et HPRT. Les résultats sont normalisés sur la charge provirale. E. Quantification de l'ARN sHBZ par rapport à la charge provirale. Après extraction des ARN et transcription inverse, l'ARN de sHBZ est quantifié à l'aide d'une sonde Taqman. Le niveau d'ARN détecté est rapporté au niveau d'EEF1G et HPRT avant d'être normalisé sur la charge provirale.

Une fois cette normalisation effectuée, on observe que les cellules avec une transcription sens active (HUT102, C91PL, C8166, MT2 et MT4) présentent de faibles quantités d'ARNm sHBZ en comparaison des lignées avec un LTR5' réprimé. Il semble, par ailleurs, que les lignées exprimant les plus grandes quantités d'ARN de Tax (HUT102, C91PL, C8166) soient celles qui présentent les niveaux les plus faibles de sHBZ (Figure 28 C et E).

Concernant le transcrit usHBZ, il est à noter que, si un niveau basal de transcription d'usHBZ est bien détectable dans les cellules dépourvues de transcription sens, la production d'usHBZ est augmentée dans les cellules produisant la protéine Tax (Figure 28 D). Il n'existe, pour autant, aucune corrélation directe entre le niveau d'ARNm de Tax et celui d'usHBZ.

## **II) La diminution de la transcription sens s'accompagne d'une levée de la répression exercée sur l'expression de sHBZ.**

Afin de démontrer que la répression exercée sur l'expression de sHBZ ne dépendait pas de la nature des lignées et pouvait être levée en absence de transcription sens, j'ai mis à profit l'existence de deux drogues inhibant la transcription sens du HTLV-1.

### **A) La Chaetocine et la Spironolactone peuvent être utilisées pour inhiber la transcription dépendante du LTR5'.**

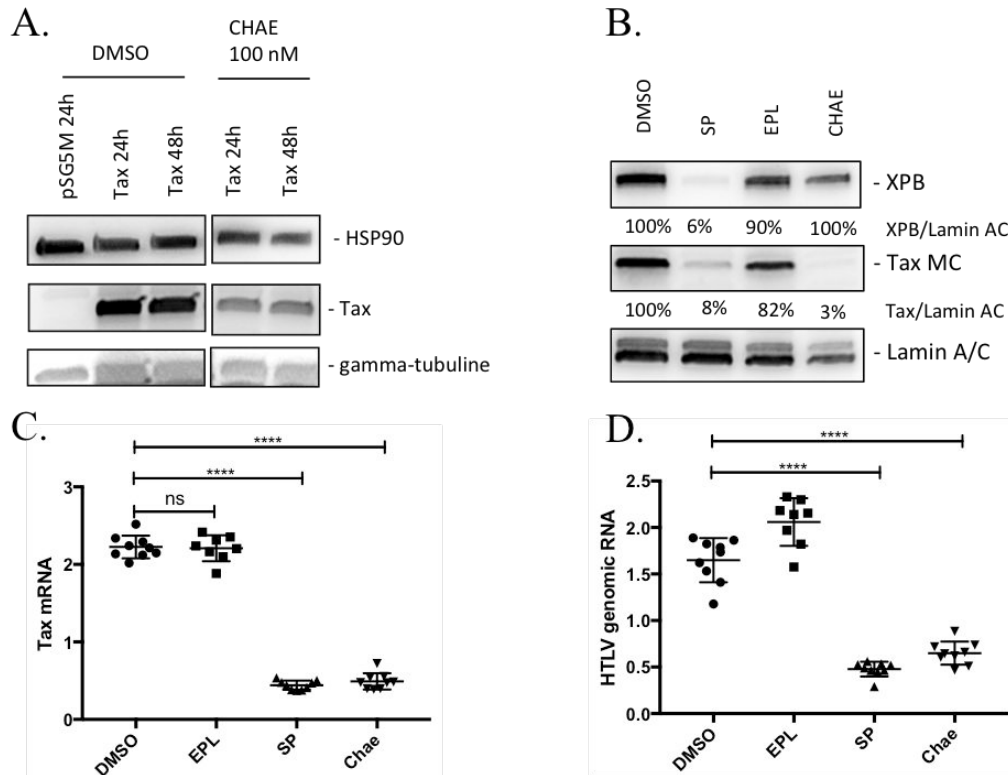
La Chaetocine (Chae) est un inhibiteur de la protéine chaperonne Hsp90 (Song et al., 2015). Or la protéine Tax est une protéine cliente d'Hsp90 (Gao and Harhaj, 2013). L'inhibition de la protéine Hsp90 par la Chaetocine devrait donc conduire à une dégradation de la protéine Tax et ainsi à une inhibition de la transactivation par Tax. Afin de vérifier cet effet, j'ai étudié les conséquences d'un traitement à 100nM de Chaetocine sur le niveau de protéine Tax surexprimée dans des cellules HEK-293T ou endogène dans les LT C8166 (Figure 28A et B). Dans les deux cas, le traitement par la Chae induit bien, à la dose utilisée, la dégradation de la protéine Tax. Dans les C8166, la déplétion en protéine Tax entraîne, de plus, une diminution de la transactivation du LTR5' et donc une diminution de la quantité de tous les transcrits sens (Figure 28C).

L'autre composé utilisé est la Spironolactone (SP). Décrite comme un antagoniste de l'aldostérone, cette drogue présente également la propriété d'induire la dégradation de

l'hélicase XPB du complexe TFIIH (Alekseev et al., 2014). Il a été montré, par une partie de mon équipe, que cet effet induisait l'inhibition de la transcription Tat-dépendante du rétrovirus VIH-1 (Lacombe et al., 2016). J'ai donc souhaité vérifier si la SP pouvait avoir le même effet inhibiteur sur la transcription Tax-dépendante du HTLV-1. Afin de s'affranchir de l'effet d'antagoniste de l'aldostérone que possède la SP, j'ai systématiquement comparé son effet à celui d'un antagoniste de l'aldostérone, n'induisant pas la dégradation d'XPB, l'Eplérénone (EPL).

Après traitement des cellules C8166 par la SP pendant 24h à 10 $\mu$ M, on observe bien une dégradation de la protéine XPB, non obtenue avec l'EPL (Figure 29B). En analysant le niveau de l'ARN de Tax et le niveau de l'ARN génomique viral, à l'aide d'un couple d'amorces situées à la jonction gag/pol, on obtient une diminution significative de la transcription sens, en réponse au traitement par la SP (Figure 28C et D). Cette inhibition a pour conséquence secondaire, d'entraîner une diminution de la quantité de protéine Tax, constatée par Western Blot (Figure 28B).

L'utilisation de ces deux drogues permet donc de diminuer la quantité de transcrits sens et en particulier de l'ARNm de Tax. J'ai ainsi eu deux outils pharmacologiques à disposition, pour étudier l'effet de l'inhibition de la transcription sens sur le niveau de transcription antisens du HTLV-1.

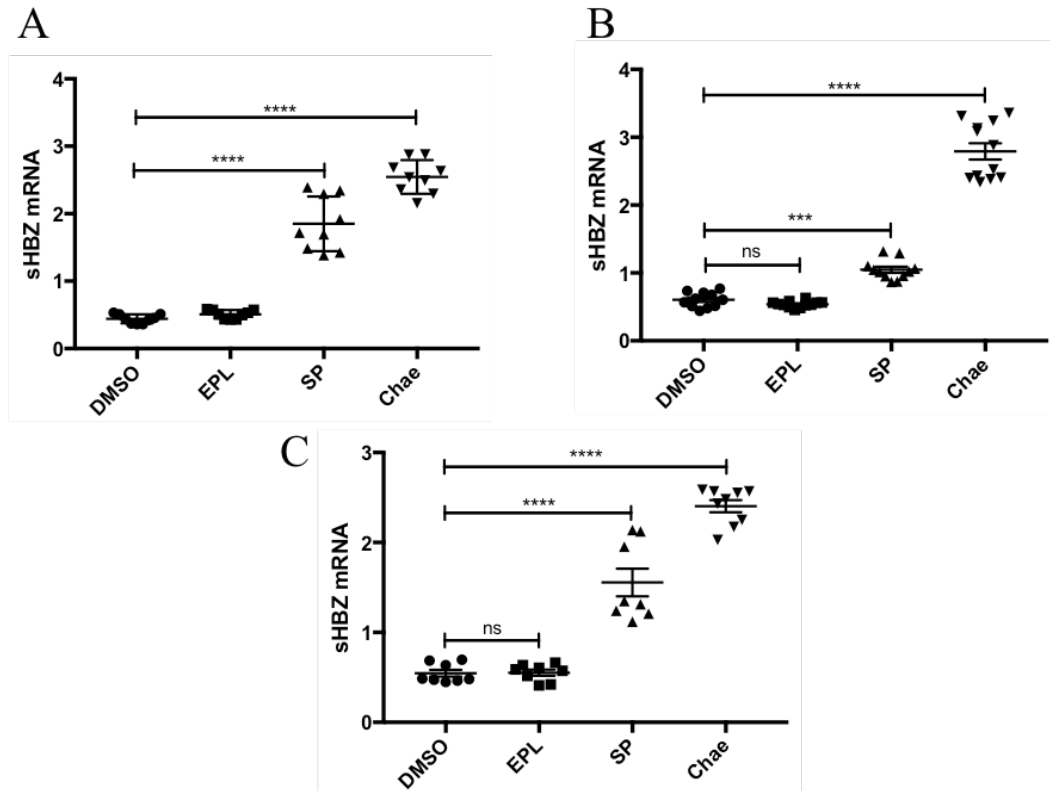


**Figure 29 : La Chaetocine par la dégradation de Tax et la Spironolactone par la dégradation de XPB induisent une inhibition de la transcription sens du HTLV-1.**

A: La Chaetocine induit la dégradation de Tax. Des cellules HEK-293T ont été transfectées avec un plasmide contrôle (pSG5M) ou permettant l'expression de Tax (pSG5M-Tax) et les cellules ont été traitées pendant 24 ou 48h avec 100nM de Chaetocine. Les protéines sont ensuite révélées par Western Blot à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine Hsp90, la protéine Tax ou la gamma-tubuline. B: Dans les cellules transformées par le HTLV-1, la Chaetocine et la Spironolactone entraînent une diminution de la quantité de protéine Tax. Des LT C8166 ont été traités pendant 24h à 10µM de SP ou d'EPL ou 100nM de Chae. Le niveau des protéines est analysé par Western Blot à l'aide d'anticorps dirigés contre XPB, Tax ou les Lamines A/C. C: La quantité de transcrits Tax diminue après traitement pendant 24h à la SP ou la Chae dans des C8166. D: Le niveau de l'ARN génomique viral est réduit après traitement pendant 24h à la SP ou la Chae dans des C8166. ns : non significatif, \*\*\*\* p<0,0001

## **B) Les traitements à la Chaetocine et la Spironolactone entraînent une augmentation de la quantité d'ARN sHBZ dans les lignées avec un LTR5' actif.**

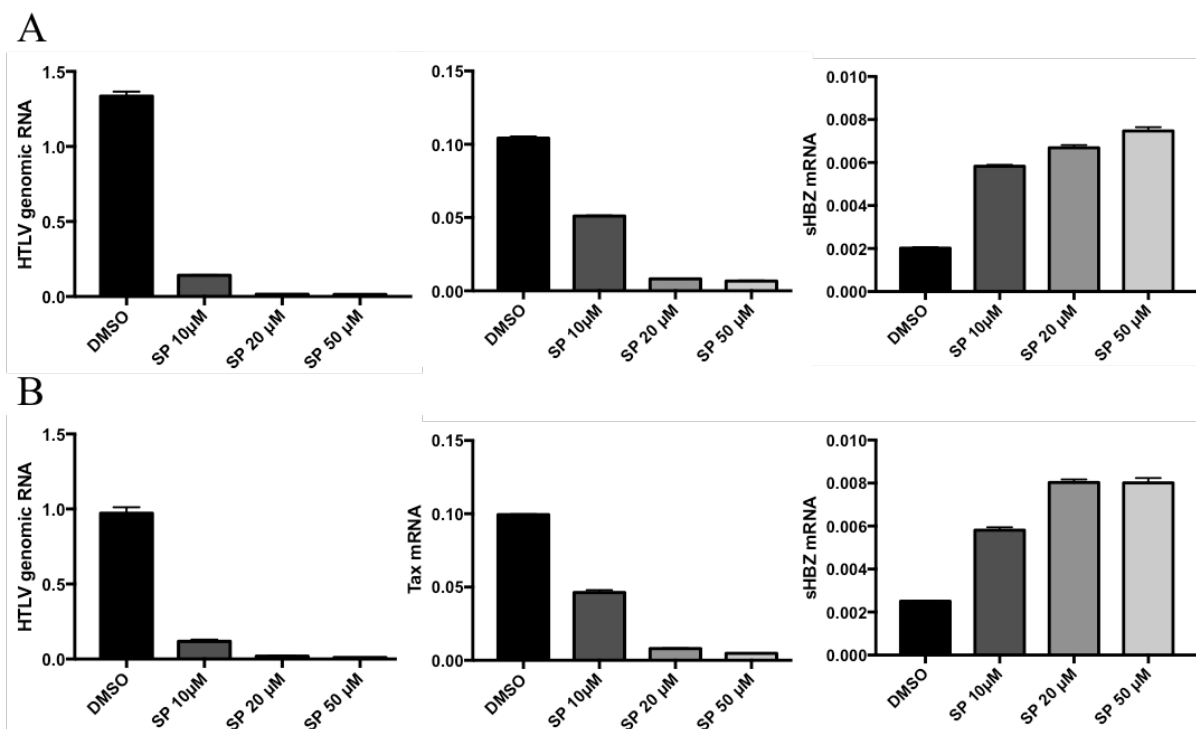
Dans les LT C8166, après traitement pendant 24h à 10µM de SP ou 100nM de Chae, on note une forte augmentation du niveau d'ARN de sHBZ (Figure 30A). Cet effet est confirmé dans deux autres lignées transformées par HTLV-1, les MT2 et les MT4 (Figure 30 B et C).



**Figure 30 : Le niveau de transcrit sHBZ augmente suite au traitement par la SP ou la Chae.**

Des LT C8166 (A), MT2 (B) et MT4 (C) ont été traités avec 10 $\mu$ M de SP, 10 $\mu$ M d'EPL ou 100nM de Chae pendant 24h avant lyse, extraction des ARNs et RTqPCR. \*\*\*  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$

L'augmentation, obtenue en réponse au traitement par la Chaetocine, est comparable dans ces trois lignées. En revanche, dans les lignées MT2 et MT4, l'ampleur de l'augmentation de la quantité de transcrit sHBZ obtenue après traitement par la SP est faible, en comparaison de l'effet observé dans les C8166. Cela s'explique par une diminution moindre de la transcription sens obtenue avec 10 $\mu$ M de SP pendant 24h. Afin de confirmer l'augmentation de la transcription antisens, consécutive au traitement SP dans ces lignées, j'ai testé l'effet d'un traitement à des doses plus élevées de SP, soit 20 $\mu$ M ou 50 $\mu$ M.



**Figure 31 : La Spironolactone entraine une diminution de tous les transcrits sens et une augmentation de sHBZ à des doses supérieures dans les MT2 et MT4.**

Des LT des lignées MT2 (A) ou MT4 (B) ont été traités pendant 24h avec 10µM, 20µM ou 50µM de SP puis les niveaux de l'ARN génomique du HTLV-1, de l'ARNm de Tax et de l'ARN sHBZ ont été quantifiés par RTqPCR.

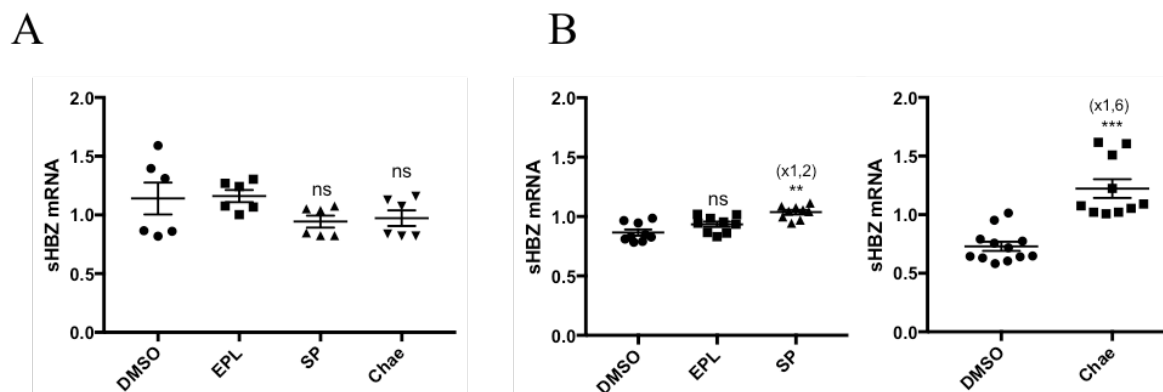
On constate qu'à la dose de 20µM de SP pendant 24h, la quantité de transcrits sens (ARN génomique viral ou ARNm Tax) est négligeable, dans ces deux lignées, alors que le niveau d'ARNm de Tax n'était faiblement que diminué, à une dose de 10µM. Cette forte diminution de la transcription sens s'accompagne d'un quadruplement du niveau de transcrit sHBZ (Figure 31A et B). Le niveau d'ARN sens étant déjà minimal à la dose de 20µM, aucun effet supplémentaire sur le niveau de sHBZ n'est obtenu à la dose de 50µM. Dans ces deux lignées, on obtient donc un effet comparable à celui obtenu dans les C8166 mais à une dose plus élevée de SP.

En conclusion, la diminution de la transcription sens, engendrée par les traitements à la SP et à la Chae, est donc associée à une augmentation de la quantité de transcrit sHBZ.

**C) Les effets de la SP et de la Chaetocine sur la transcription de sHBZ sont dépendants de l'existence de la transcription sens.**

J'ai ensuite vérifié que l'augmentation de sHBZ, consécutive aux traitements par la SP ou la Chae, n'était pas due à un effet de ces deux drogues sur un facteur cellulaire, mais bien à l'inhibition de la transcription sens du HTLV-1. En effet, la Chae est, par exemple, capable de dégrader l'histone lysine méthyltransférase, Suv39h1, impliquée dans la répression épigénétique par la synthèse de marques répressives H3K9me3 (Greiner et al., 2005).

Pour cela, j'ai répété les mêmes expériences de traitement à la SP ou la Chae, dans des lignées TL-Om1 et MT1, présentant une transcription sens réprimée épigénétiquement (Figure 32). Dans la lignée TL-Om1, après traitement à la SP ou la Chae, aucune augmentation du niveau de sHBZ n'est à noter. En revanche dans la lignée MT1, on observe un léger effet de la SP et de la Chaetocine. Ces résultats sont cohérents avec le fait, qu'au sein d'une population de cellules de la lignée MT1, certaines cellules présentent ponctuellement une réactivation de la transcription sens (Mahgoub et al., 2018). La faible augmentation observée pourrait ainsi être liée à une inhibition de la transcription sens, dans ces cellules, et donc à une levée de la répression exercée sur l'expression de sHBZ par la transcription sens.



**Figure 32 : Le niveau de transcrit sHBZ n'est pas modifié par le traitement par la SP ou la Chae dans les cellules Tlom-1 et peu augmenté dans la lignée MT1**

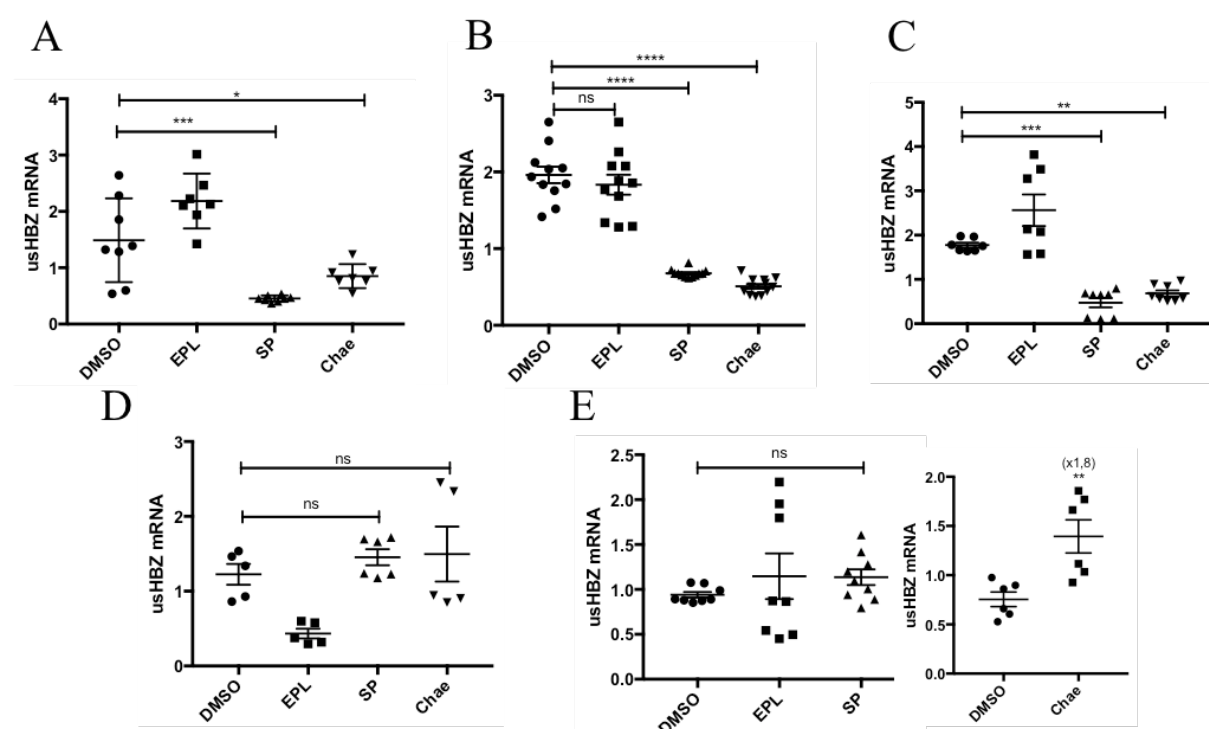
Des cellules Tlom1 (A), MT1 (B) ont été traitées avec 10µM de SP, 10µM d'EPL ou 100nM de Chae pendant 24h avant lyse, extraction des ARN et RTqPCR. \*\* p<0,01 ; \*\*\* p<0,001

Les traitements par la SP ou la Chae semblent donc augmenter la production de sHBZ, uniquement dans les LT présentant une transcription sens.

### III) La diminution de la transcription sens a un effet différentiel sur les transcrits s et usHBZ

Puisque dans les lignées de LT transformés par HTLV-1, les transcrits s et usHBZ semblent ne pas adopter le même comportement vis à vis de la transcription sens, je me suis interrogée sur l'effet qu'aurait une inhibition de la transcription sens sur le niveau de production de usHBZ. Pour cela, dans les expériences de traitement à la SP et la Chae, j'ai analysé par RTqPCR, le niveau du transcrit usHBZ en utilisant le protocole de détection spécifique décrit précédemment.

Contrairement à sHBZ, le niveau du transcrit usHBZ diminue en réponse aux traitements par la SP ou la Chae dans les lignées C8166, MT2 et MT4 avec une transcription sens active (Figure 33). En revanche, dans les lignées avec un LTR5' réprimé, le niveau de transcrit usHBZ ne présente aucune diminution significative après traitement à la SP ou à la Chae (Figure 33).



**Figure 33 : Le transcrit usHBZ suit l'évolution de la transcription sens suite au traitement à la SP ou la Chae dans les cellules avec un LTR5' actif**

Des LT C8166 (A), MT2 (B), MT4 (C), TLom1 (D), MT1 (E) ont été traités avec 10µM de SP, 10µM d'EPL ou 100nM de Chae pendant 24h avant lyse, extraction des ARN et RTqPCR. ns non significatif ; \*\* p<0,01 ; \*\*\* p<0,001 ; \*\*\*\* p<0,0001.

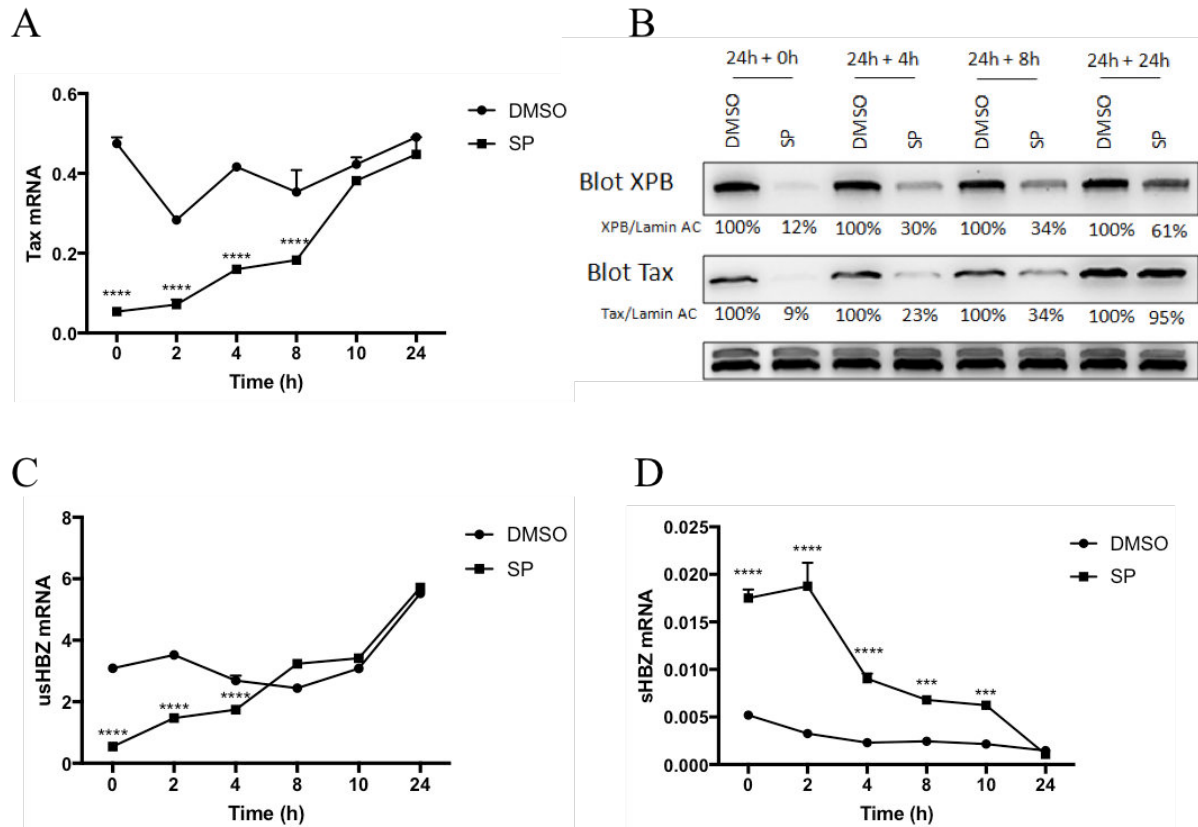
Les traitements à la SP n'induisent aucune variation du niveau d'usHBZ, dans les TL-Om1 et les MT-1. Concernant la Chae, si l'inhibition d'Hsp90 n'a aucun effet dans les TL-Om1, elle est suivie d'une augmentation du niveau d'usHBZ dans les MT-1. Cet effet pourrait être du à la dégradation d'un facteur cellulaire inhibiteur et donc indépendant de la transcription sens.

Les résultats obtenus avec la SP pourraient s'expliquer par l'existence d'une transcription XPB-dépendante, conduisant à la production de usHBZ. Cependant, dans la mesure où les mêmes résultats sont obtenus avec la Chae, il semblerait davantage que cet effet puisse être expliqué par une régulation positive de la production d'usHBZ par la protéine Tax.

Le transcrit usHBZ présentant la même évolution que la transcription sens après traitement par la SP ou la Chae, l'inhibition de la production de sHBZ pourrait être liée à une interférence de promoteurs entre les séquences régulatrices de la production de sHBZ et usHBZ. Cependant, l'absence de répression observée dans les TL-Om1, dépourvues de transcription sens et présentant un niveau d'usHBZ comparable aux MT2 ou MT4 (Figure 28D), me conduit davantage à faire l'hypothèse d'une répression liée à la production des transcrits sens ou d'une des protéines issues de leur traduction.

#### **IV) La répression établie par la transcription sens sur l'expression de sHBZ est un phénomène très dynamique.**

Afin d'étudier la dynamique d'établissement de la répression, exercée par la transcription sens sur la transcription antisens, j'ai mis à profit le traitement par la SP pour lever l'inhibition sur la transcription de sHBZ puis après suppression du traitement, j'ai suivi l'évolution des transcrits Tax, usHBZ et sHBZ.



**Figure 34 : L'inhibition de la production de sHBZ est rétablie après levée du traitement à la SP**

Des cellules C8166 ont été traitées pendant 24h à 10 $\mu$ M de SP. Après suppression du traitement et lavage, l'évolution des ARN est suivie à 2h, 4h, 8h, 10h et 24h. A. Evolution de l'ARNm Tax après levée du traitement à la SP. B. Evolution des protéines XPB et Tax après levée du traitement à la SP. C. Evolution de l'ARN usHBZ après levée du traitement. D. Evolution de sHBZ après la levée du traitement à la SP. \*\*\*  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Après levée du traitement, la transcription sens augmente à nouveau progressivement (Figure 34A), pour revenir à son niveau de départ, environ 10 heures après interruption du traitement à la SP et cette augmentation s'accompagne du retour de la protéine Tax. Ce résultat s'explique par la hausse progressive du niveau de la protéine XPB qui, n'étant plus dégradée, s'accumule à nouveau après néosynthèse (Figure 34B). En parallèle de l'augmentation du niveau d'ARN sens, on observe une augmentation du niveau du transcrit usHBZ. (Figure 34C). L'accroissement progressif du niveau de la transcription sens s'accompagne d'une diminution marquée de la transcription de sHBZ, à partir de 2h, jusqu'à un retour, à 24h, à la quantité obtenue en absence de traitement (Figure 34D). Le rétablissement d'un niveau élevé de transcription sens et d'ARN usHBZ semble donc être un préalable à l'établissement de la répression exercée sur le promoteur de sHBZ. En revanche, l'inhibition de sHBZ peut être mise en œuvre alors même que la quantité de protéine Tax est encore faible, ce qui semble exclure un rôle direct de la protéine Tax dans l'inhibition de l'expression de sHBZ.

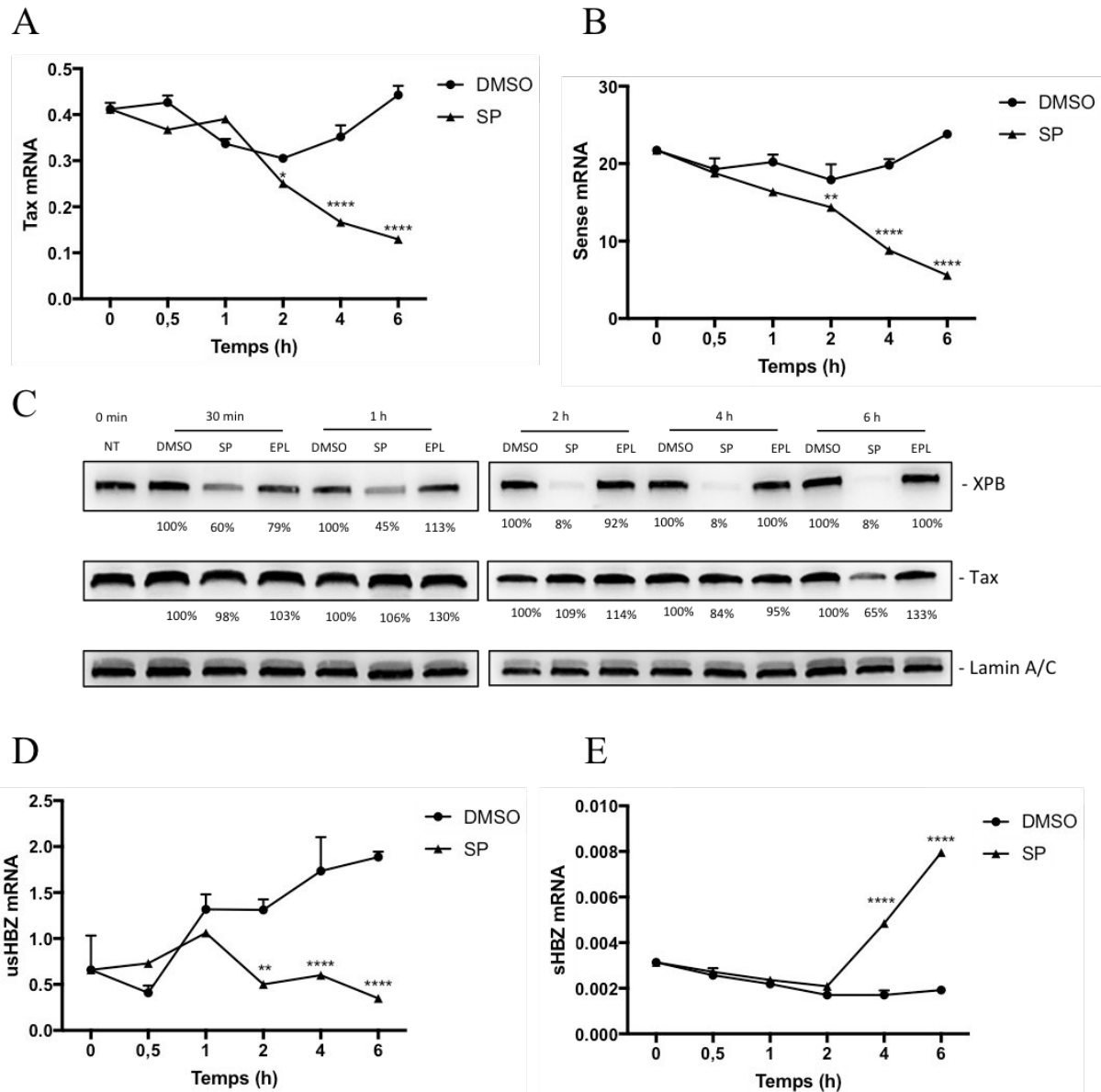
La répression exercée sur la production de sHBZ, par la transcription sens du HTLV-1, constitue par ailleurs un phénomène dynamique, pouvant être établi en quelques heures.

**V) L'existence des transcrits sens semble être responsable de l'inhibition de la transcription de sHBZ par interférence transcriptionnelle.**

Afin de déterminer, quels éléments dépendants de la transcription sens pourraient être responsables de la répression exercée sur la transcription de sHBZ, j'ai tout d'abord souhaité étudier la séquence d'événement se produisant lors du traitement à la SP ou à la Chae. Une cinétique de traitement à la SP ou la Chae a donc été réalisée.

**A) L'inhibition de la transcription sens et non la diminution de la quantité de protéine Tax précède la levée de la répression exercée sur sHBZ.**

Lors d'un traitement à la SP, une diminution significative de la transcription sens est obtenue à partir de 2h et se poursuit ensuite (Figure 35 A et B). A la suite de cette diminution, on observe que la quantité de protéine Tax décroît significativement à partir de 6h (Figure 35C). Le niveau d'usHBZ est significativement réduit, par rapport au traitement contrôle, à partir de 2h (Figure 35D). Concernant sHBZ, on note une augmentation significative de la production de ce transcrit, 4h après le début du traitement, c'est à dire alors que le niveau de protéine Tax n'a pas commencé à diminuer (Figure 35E). Ainsi, ces résultats semblent indiquer que la diminution de la quantité de protéine Tax n'est pas nécessaire à la levée de la répression exercée sur sHBZ, même si, à des temps de traitements plus longs, l'absence de protéine Tax pourrait amplifier la levée de l'inhibition de l'expression de sHBZ.



**Figure 35 : Le traitement par la SP entraîne en premier lieu une diminution de la transcription sens puis une augmentation de l'expression de sHBZ**

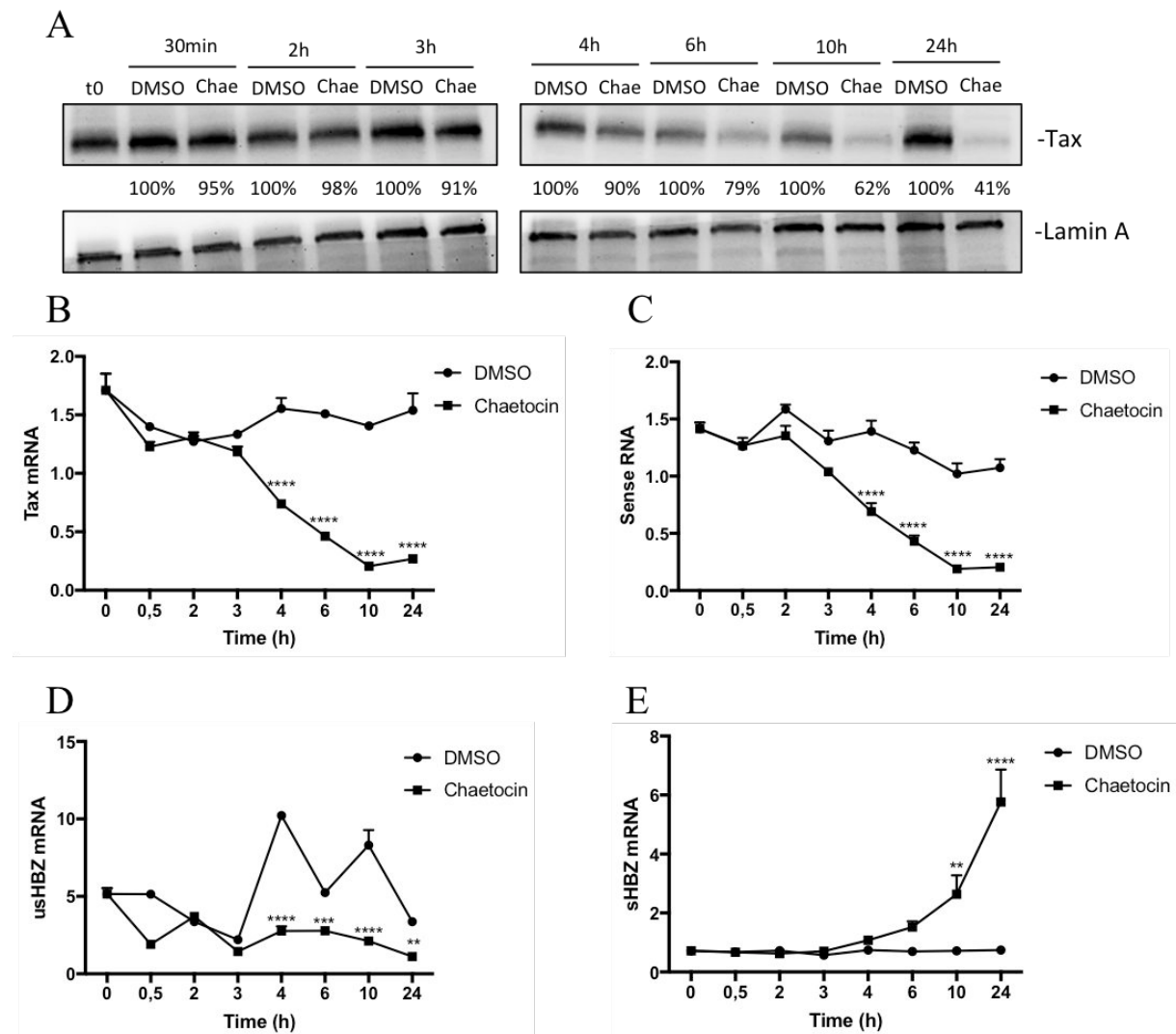
Des cellules C8166 ont été traitées avec 10 $\mu$ M de SP puis des cellules ont été prélevées après 30min, 1h, 2h, 4h et 6h de traitement. Les protéines et les ARN ont été extraits. Les niveaux d'ARN de Tax (A), des ARN sens (B), de usHBZ (D) et de sHBZ (E) sont quantifiés. Les protéines sont analysées par Western Blot à l'aide d'anticorps dirigés contre les protéines XPB, Tax et les Lamines A et C pour normalisation.

\* p<0,05 ; \*\* p<0,01 ; \*\*\*\* p<0,001.

## **B) Le traitement à la Chaetocine provoque une levée de l'inhibition exercée sur sHBZ retardée par rapport au traitement par la SP.**

Dans la cinétique de traitement par la Chaetocine, on observe que le niveau de protéine Tax commence à diminuer, 4h après le début du traitement (Figure 36A). La transcription sens est significativement affectée à partir de 4h (Figure 36 B et C) mais le niveau d'ARN de sHBZ

n'est significativement augmenté qu'à partir de 10h, après le début du traitement (Figure 36E).



**Figure 36 : La levée de la répression sur sHBZ consécutive au traitement par la Chae se produit suite à la diminution de la transcription sens.**

Des cellules C8166 ont été traitées avec 100nM de Chaetocine ou une dose correspondante de DMSO puis des cellules ont été prélevées à 30 minutes, 2h, 3h, 4h, 6h, 10h et 24h. A. Le niveau de protéine Tax est analysé par Western Blot et normalisé par rapport au niveau de Lamine A. B. Niveau de l'ARNm de Tax quantifié par RTqPCR. C. Niveau de transcription sens quantifié par amplification par RTqPCR au niveau de la région codante de Tax. D. Niveau de l'ARN usHBZ quantifié par RTqPCR suite à une RT spécifique. E. Niveau de l'ARN sHBZ quantifié par RTqPCR. \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

L'ensemble des résultats permettent de conclure que la levée de la répression exercée sur sHBZ a lieu quelques heures, après l'inhibition de la transcription sens et ce, alors même que la protéine Tax peut encore être présente, en même quantité qu'au début du traitement. La cinétique de levée de l'inhibition exercée sur sHBZ semble donc incompatible avec l'existence d'une répression épigénétique de son promoteur mais favorise l'hypothèse d'une

répression transcriptionnelle, exercée par la transcription sens. L'implication directe de la protéine Tax dans le recrutement de répresseurs épigénétiques ou transcriptionnels sur le promoteur de sHBZ semble également à exclure.

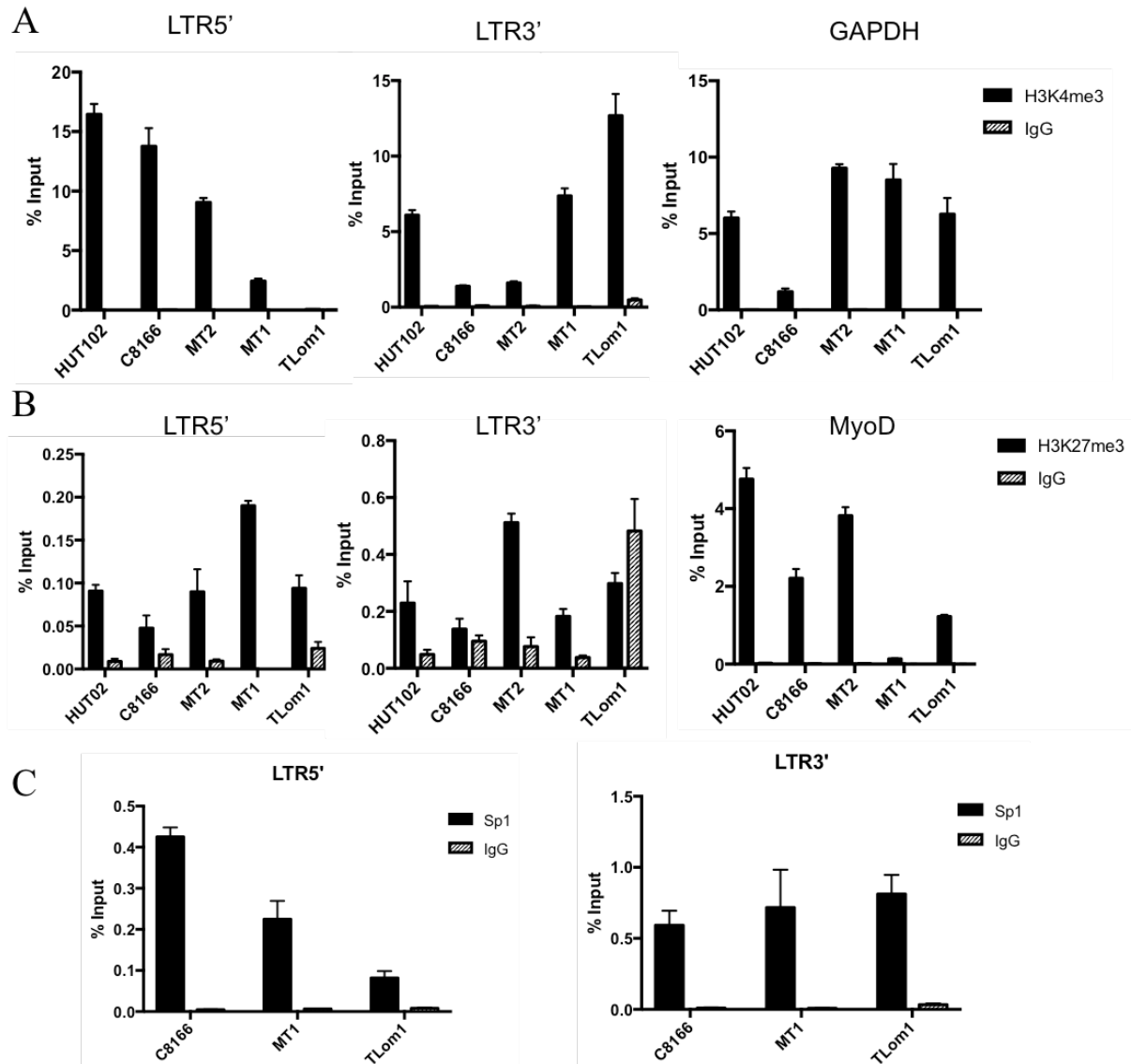
Afin de mieux comprendre la répression exercée sur le promoteur de sHBZ, j'ai souhaité étudier, si celle-ci pouvait s'accompagner d'un recrutement différentiel de certains facteurs de transcription, par rapport au LTR5' ou à des niveaux distincts de marques épigénétiques activatrices ou répressives différents.

## **VI) L'analyse du niveau de marques activatrices et du recrutement de certains facteurs de transcription permet de déterminer le niveau d'activation des deux LTR.**

### **A) Dans les cellules avec un LTR5' actif, le LTR3' présente un niveau plus faible de marques épigénétiques caractéristiques des promoteurs actifs.**

J'ai étudié le niveau de la marque H3K4me3, caractéristique des promoteurs actifs et des régions « enhancer », ainsi que le niveau de la marque répressive H3K27me3, déposée par le complexe PRC2, dont l'interaction avec la protéine Tax a pu être démontrée (Fujikawa et al., 2016). La marque H3K9me3, caractéristique des régions et gènes réprimés épigénétiquement, n'a pu être détectée sur aucun LTR, dans les lignées avec un LTR5' actif et son analyse a donc été abandonnée.

Dans les lignées HUT102, C8166 et MT2, on observe un fort niveau de marque H3K4me3 au niveau du LTR5' qui reflète le niveau d'activation de ce LTR. En revanche, au niveau du LTR3', le niveau de marques activatrices H3K4me3 est plus élevée dans les lignées avec un LTR5' réprimé ou peu actif, c'est à dire les TL-Om1 et les MT1 (Figure 37A). Ces résultats reflètent parfaitement le niveau des transcrits Tax et sHBZ normalisés sur la charge provirale (Figure 28C et E).



**Figure 37 : Le niveau de marques d'histone activatrices ainsi que le recrutement du facteur de transcription Sp1 permettent de discriminer les deux LTR du HTLV-1**

Des cellules HUT102, C8166, MT2, MT1 et TLom1 ont été fixées avant préparation de la chromatine et immunoprécipitation avec différents anticorps. Des PCR spécifiques de chacun des LTR du HTLV-1 ou de régions contrôle ont été réalisées. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la chromatine de départ (% Input). A. Analyse par ChIP de la marque activatrice H3K4me3 au niveau des LTR. La chromatine a été précipitée avec un anticorps dirigé contre la lysine 4 triméthylée de l'histone H3 ou un anticorps contrôle de même espèce et isotype. Le promoteur de la GAPDH est amplifié comme contrôle positif de la présence de H3K4me3. B. Analyse par ChIP de la marque H3K27me3 au niveau des LTR. La chromatine a été précipitée avec un anticorps dirigé contre la lysine 27 triméthylée de l'histone H3 ou un anticorps contrôle de même espèce et isotype. Une séquence du gène MyoD est amplifiée comme contrôle positif de la présence de H3K27me3. C. Analyse par ChIP du recrutement de Sp1 au niveau des LTR. La chromatine a été précipitée avec un anticorps dirigé contre la protéine Sp1 ou un anticorps contrôle de même espèce et isotype.

Concernant le niveau de la marque H3K27me3, on constate que cette marque est présente au niveau des deux LTR, dans la plupart des lignées et ne semble donc pas en lien avec le niveau de répression, exercée sur la transcription de sHBZ (Figure 37B).

Les marques d'histone ont la propriété d'être propagées à l'ensemble d'une région d'ADN et en particulier, ici, à l'ensemble du promoteur. Cela permet de conclure que, dans les lignées avec un LTR5' actif, les promoteurs localisés au sein du LTR3' et en particulier le promoteur de sHBZ, sont moins actifs que dans les lignées avec un LTR5' réprimé.

**B) L'analyse du recrutement de Sp1 ne permet pas de mettre en évidence l'inhibition de la transcription de sHBZ dans les lignées avec un LTR5' actif.**

Dans un second temps, j'ai voulu déterminer si le recrutement du facteur de transcription Sp1 différait entre les différents types de lignées. Alors que l'on observe une nette différence de recrutement au niveau du LTR5', la protéine Sp1 étant davantage présente sur le LTR5' des C8166, par rapport aux MT1 et aux TL-Om1, le niveau de Sp1, observé sur le LTR3' est comparable entre les trois lignées et ne semble donc pas associé avec le niveau d'activation des promoteurs.

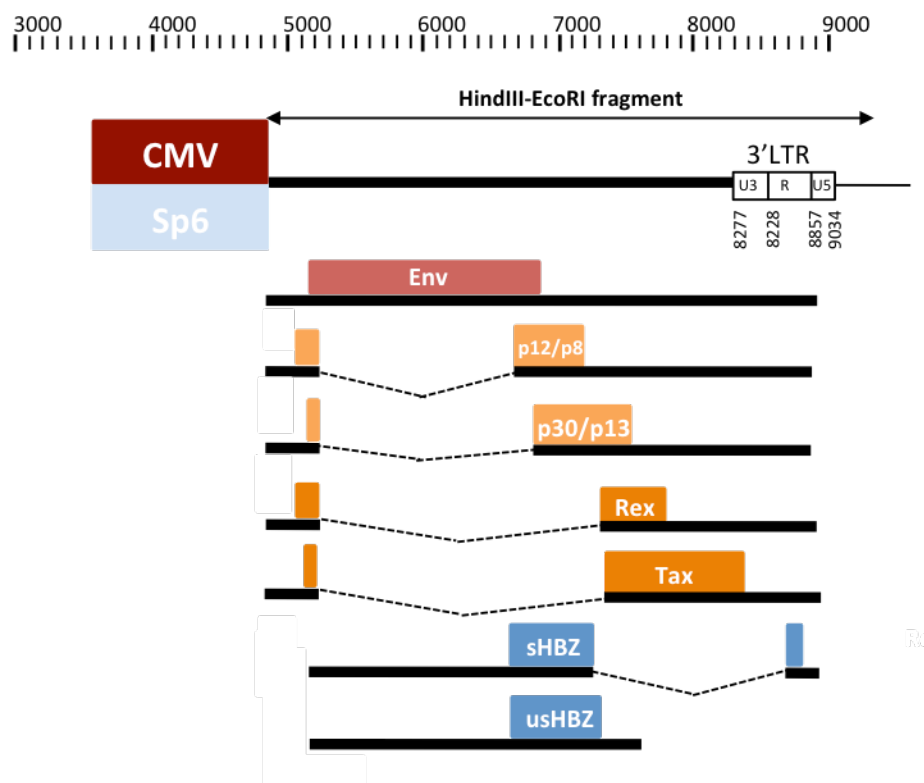
Cependant, afin d'amplifier spécifiquement le LTR3', le couple d'amorces utilisé est localisé entre la région pX et la région U3 du LTR3'. Les fragments de chromatine analysés présentant entre 200 et 300 paires de bases, la PCR réalisée ne permet pas d'analyser le recrutement de Sp1, sur les deux éléments de réponse à Sp1, localisés dans la région U5 et contrôlant la production de sHBZ. Afin de pouvoir analyser précisément le recrutement de Sp1 sur ces sites, il faudrait pouvoir amplifier uniquement la région U5 du LTR3', c'est à dire caractériser tous les sites d'intégration dans les lignées utilisées et mettre au point des amorces PCR antisens dans les régions cellulaires flanquantes. Cependant, devant la complexité d'un tel système, j'ai opté pour une autre approche, consistant à établir des lignées dans lesquelles seul le LTR3' est présent et la transcription sens est contrôlée par un autre promoteur.

**VII) Construction d'un nouveau modèle pour la compréhension de la répression exercée sur le promoteur de sHBZ.**

Afin de s'affranchir de la présence du LTR5' et de mieux analyser les mécanismes impliqués dans la régulation négative de sHBZ par la transcription sens, j'ai mis à profit la disponibilité de deux plasmides au sein de l'équipe. Le premier de ces plasmides (CMV-Env-LTR) présente, sous contrôle du promoteur CMV, la partie 3' du génome HTLV-1, à partir de la

séquence codante de Env jusqu'au LTR3' complet. Cette construction permet donc l'expression des transcrits de la région pX et de Env, mais aussi de usHBZ et sHBZ, puisque la séquence de polyadénylation de ces ARN a été conservée et que leurs promoteurs sont présents en totalité.

Au sein du deuxième plasmide utilisé (Sp6-Env-LTR), le promoteur CMV a été remplacé par un promoteur procaryote, le promoteur Sp6, ne permettant pas de transcription sens dans les cellules eucaryotes. Ce plasmide permet toutefois l'existence d'une transcription antisens, sous contrôle du LTR3' (Figure 38) et donc la production des ARN sHBZ et usHBZ.



**Figure 38 : Représentation schématique de la portion du génome du HTLV-1 présente dans les plasmides CMV-Env-LTR et Sp6-Env-LTR**

Le plasmide CMV-Env-LTR permet l'expression des transcrits Env, Tax, Rex et des transcrits donnant naissance à p12/p8 et p30/p13 sous contrôle d'un promoteur CMV. Les transcrits us et sHBZ peuvent être exprimés à partir du plasmide CMV-Env-LTR mais aussi du plasmide Sp6-Env-LTR sous contrôle du LTR3'.

Ces deux constructions ont été introduites dans des cellules Jurkat, pour la constitution de lignées stables, après sélection à la puromycine. Une fois ces lignées obtenues, j'analyserai le niveau de transcription sens et antisens, dans le contexte d'une transcription sens sous contrôle du promoteur CMV ou en absence de transcription sens, afin de reproduire les résultats obtenus dans les lignées transformées par le HTLV-1.

Dans l'hypothèse où l'inhibition de la production de sHBZ, en présence de transcription sens serait confirmée, j'étudierai précisément la présence des marques d'histones ainsi que le recrutement de différents facteurs de transcription et de l'ARN polymérase II au niveau des différentes régions du LTR3'. Ce modèle devrait donc permettre de faciliter notre compréhension de l'établissement de la répression exercée sur la production de sHBZ ainsi que sur la régulation différentielle de la transcription de sHBZ et usHBZ.

**Nous avons ainsi mis en évidence une répression de la transcription de sHBZ, dans les lignées de lymphocytes T CD4+ transformés par le HTLV-1 et présentant une transcription sens active. Cette répression peut être levée par des traitements inhibant la transcription sens et dépend directement de l'existence de cette transcription. Le mécanisme exact permettant d'expliquer la moindre production de sHBZ dans ces lignées reste à caractériser.**

## **Discussion et perspectives**

## **Partie 1 : Le détournement du complexe d'O-GlcNAc par l'oncoprotéine Tax du HTLV-1 facilite la transcription virale.**

L'O-GlcNAcylation est une modification post-traductionnelle, impliquée dans le développement de nombreuses pathologies telles que le diabète, les cancers et certaines pathologies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer (Banerjee et al., 2016).

Dans cette étude, nous montrons, pour la première fois, que l'oncoprotéine virale Tax du HTLV-1 est capable de détourner la machinerie d'O-GlcNAcylation, pour favoriser la transcription sens de ce rétrovirus. Ces résultats établissent un lien entre métabolisme du glucose et transcription sens du HTLV-1. En effet, le niveau d'O-GlcNAcylation est directement corrélé à la concentration de son précurseur, l'UDP-GlcNAc, un des produits de la voie de biosynthèse des Hexosamines qui est régulée par la disponibilité en glucose. Ainsi, plus la concentration en glucose est forte, plus la transcription sens du HTLV-1 sera activée. Ces résultats sont en accord avec les constatations de Kulkarni et al. qui ont montré par la suite, qu'une augmentation de la disponibilité en glucose, favorise la transcription sens du HTLV-1 et qu'au contraire, l'absence de glucose la diminue (Kulkarni et al., 2017).

### **L'augmentation du niveau d'O-GlcNAcylation de CREB favorise la transactivation du LTR5' par Tax.**

Dans les cellules exprimant la protéine Tax, le niveau d'O-GlcNAcylation global des protéines est augmenté, par l'intermédiaire de l'inhibition de l'OGA. Une des protéines ciblées par cette augmentation est la protéine CREB. En mutant le site majeur d'O-GlcNAc de CREB, c'est-à-dire la Sérine 40 de cette protéine, nous sommes parvenus à abolir l'O-GlcNAcylation de CREB, ce qui a été confirmé par une expérience d'immunoprécipitation de la protéine CREB puis une révélation avec un anticorps spécifique des O-GlcNAc. Cependant, cette mutation n'empêche pas l'existence d'autres types de glycosylations de CREB, puisque la protéine S40A est toujours retenue sur les billes de lectine de blé.

Nous avons ainsi montré qu'une augmentation de l'O-GlcNAc de CREB, en réponse à l'inhibition chimique de l'OGA, facilitait la transactivation du LTR5' du HTLV-1 par Tax et que cet effet passait par une augmentation du recrutement de la forme phosphorylée de CREB, au niveau des éléments vCRE.

Il a pu être décrit dans la littérature, l'existence d'un antagonisme entre O-GlcNAcylation et phosphorylation, dans la mesure où ces modifications ciblent toutes deux, des résidus Sérine ou Thréonine. Dans le cas de la protéine CREB, le site principal de phosphorylation se situe sur la Sérine 133 et le site principal d'O-GlcNAcylation sur la Sérine 40. Ces deux modifications peuvent donc coexister, ce que nous observons dans cette étude.

Dans la littérature, l'O-GlcNAcylation de CREB est décrite comme ayant un effet inhibiteur de son activité transcriptionnelle, en empêchant l'interaction de CREB avec TORC et avec TAFII130. Dans notre étude, l'O-GlcNAcylation de CREB semble, au contraire, favoriser son activité transcriptionnelle. Ce phénomène est décrit dans des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> humains, contrairement aux études précédentes réalisées *in vitro* ou dans des cellules de cerveau de rat et la différence de résultats pourrait s'expliquer par un effet dépendant du type cellulaire étudié.

De plus, le mécanisme CREB-dépendant d'activation de transcription par Tax se trouve être redondant. En effet, la protéine Tax est capable de recruter les facteurs TORC et d'interagir avec TBP et TAFII28, deux sous-unités du complexe TFIID. Ces interactions pourraient donc se substituer à l'interaction de CREB avec TORC et avec le complexe TFIID via TAFII130, dans le contexte de la transactivation du LTR5' par Tax. De plus, dans ce contexte, il n'est pas à exclure que l'O-GlcNAcylation de CREB facilite sa liaison à l'ADN ou l'interaction avec certains partenaires cellulaires, encore non identifiés.

Ainsi, alors qu'au niveau de gènes cellulaires l'O-GlcNAcylation de CREB pourrait être plutôt inhibitrice, dans le contexte du LTR5' transactivé par Tax, cette modification post-traductionnelle favorise son activité transcriptionnelle.

Par ailleurs, nous observons une très forte augmentation du recrutement de la forme phosphorylée de CREB, en réponse au traitement par le Thiamet G. Il n'est donc pas à exclure que l'augmentation du niveau d'O-GlcNAcylation puisse entraîner une augmentation du niveau de phosphorylation de CREB.

En effet, dans un modèle de cerveau murin, il a été montré que l'O-GlcNAcylation de deux sous-unités de la PKAc, entraînait une augmentation de l'activité kinase de la PKA et qu'en parallèle, une diminution du niveau d'O-GlcNAc était suivie d'une diminution du niveau de phosphorylation de CREB (Xie et al., 2016). Ainsi, l'augmentation du recrutement de p-CREB pourrait s'expliquer par une augmentation de l'O-GlcNAcylation de la PKAc et donc du niveau de phosphorylation de CREB. Il serait donc intéressant de voir si, dans les cellules

traitées au Thiamet G ou surexprimant Tax, le niveau global de p-CREB est augmenté et si l'OGlcNAcylation de la PKAc est favorisée, en analysant sa rétention sur des billes de lectine de blé.

### **L'augmentation du niveau global d'O-GlcNAcylation médiée par Tax pourrait affecter d'autres protéines cellulaires.**

Au sein des complexes de transcription impliqués dans la transcription sens du HTLV-1, d'autres protéines peuvent être O-GlcNAcylées.

Ainsi, il a par exemple été montré que l'O-GlcNAcylation du domaine C-terminal de l'ARN Polymérase II (ARN Pol II) était nécessaire à la formation du complexe de pré-initiation et, en particulier, au recrutement optimal de l'ARN polymérase II, au niveau des promoteurs (Lewis et al., 2016). Les résidus Sérine 5 et 2 du CTD de l'ARN Pol II peuvent subir une O-GlcNAcylation entrant en compétition avec la phosphorylation de ces résidus par CDK7 et CDK9 respectivement et donc l'O-GlcNAcylation pourrait participer activement à la régulation temporelle de l'initiation de la transcription et de l'échappement à la pause de l'ARN Pol II.

Il serait donc intéressant d'étudier le niveau d'O-GlcNAcylation de l'ARN Pol II, dans les cellules exprimant Tax, et d'analyser si cela affecterait le recrutement de l'ARN Pol II, au niveau du génome et l'efficacité transcriptionnelle, lorsque le niveau d'O-GlcNAc est augmenté.

Ainsi en plus de favoriser l'O-GlcNAcylation de CREB, Tax pourrait par l'inhibition de l'OGA augmenter l'O-GlcNAcylation d'autres facteurs, permettant alors d'augmenter l'efficacité de la transactivation du LTR5'.

### **Le détournement de la machinerie d'O-GlcNAcylation par Tax pourrait influencer la pathogenèse associée au HTLV-1.**

Dans les pathologies inflammatoires associées au HTLV-1, l'analyse du niveau d'O-GlcNAcylation et de ses conséquences sur l'ampleur de l'inflammation, pourrait améliorer notre compréhension de la pathogenèse associée au HTLV-1. En effet, les cellules des patients atteints de HAM/TSP expriment la protéine Tax et il serait donc attendu que le niveau d'O-GlcNAcylation global soit augmenté dans ces cellules. Or l'implication de l'O-

GlcNAcylation dans l'induction ou l'inhibition de l'inflammation fait encore débat. En effet, dans certains modèles, l'O-GlcNAcylation de la protéine p65 de la voie NF- $\kappa$ B favorise sa translocation nucléaire et sa liaison à l'ADN, donc l'activation de la voie NF- $\kappa$ B impliquée dans l'inflammation (Yang et al., 2015). Cependant dans d'autres modèles, l'O-GlcNAcylation semble jouer un rôle protecteur vis à vis de l'inflammation (Baudoin and Issad, 2014). Il serait donc intéressant de confirmer l'augmentation du niveau global d'O-GlcNAc induite par Tax, dans des cellules de patients atteints de HAM/TSP et d'analyser les éventuelles conséquences sur l'inflammation.

### **L'augmentation du niveau d'O-GlcNAcylation pourrait affecter la transcription antisens du HTLV-1.**

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés au détournement du complexe O-GlcNAcylase par la protéine Tax en faveur de la transcription sens du HTLV-1. Il serait donc pertinent de voir, si l'augmentation du niveau global d'O-GlcNAcylation a des conséquences sur la transcription antisens du rétrovirus HTLV-1.

En premier lieu, nous pourrions étudier l'impact de l'augmentation du niveau global d'O-GlcNAcylation sur le niveau de transcription d'usHBZ. L'augmentation du recrutement de p-CREB a été démontrée au niveau des séquences vCRE. Or ces séquences sont présentes aussi bien dans le LTR5', qu'au niveau de la région U3 du LTR3', supposée contenir les éléments de régulation contrôlant la production d'usHBZ. Il a par ailleurs, d'ores et déjà été montré que p-CREB ainsi que CBP/p300 peuvent être détectées, au niveau de la région U3 du LTR3'. Nous pourrions donc nous attendre à ce que le mécanisme identifié au niveau du LTR5', concerne également le promoteur d'usHBZ et que le détournement du complexe O-GlcNAcylase puisse tout autant favoriser la transcription d'usHBZ.

La transcription de sHBZ est dépendante du facteur de transcription Sp1 et peut être favorisée par le recrutement de JunD. Alors qu'aucune O-GlcNAcylation de JunD n'a été décrite dans la littérature, il a été montré que l'O-GlcNAcylation de Sp1 inhibait son activité transcriptionnelle (Yang et al., 2001). De plus, l'O-GlcNAcylation de Sp1 diminue la transcription du rétrovirus HIV-1 (Jochmann et al., 2009). Ainsi, il serait intéressant d'étudier si l'augmentation du niveau global d'O-GlcNAcylation s'accompagne d'une accumulation de forme O-GlcNAcylée de Sp1 et ainsi d'une inhibition de la transcription Sp1-dépendante et

en particulier de sHBZ. Si cette hypothèse était vérifiée, elle pourrait constituer un mode d'inhibition de la transcription de sHBZ par la protéine Tax.

Enfin, dans cette étude nous nous sommes concentrés sur l'analyse de cellules présentant un LTR5' actif et exprimant la protéine Tax. Or dans la plupart des clones leucémiques de patients atteints d'ATL, l'expression de Tax est abolie, alors que l'expression d'HBZ est maintenue. Même si HBZ ne semble pas influencer le fonctionnement de la machinerie d'O-GlcNAcylation (résultats non présentés), d'autres facteurs cellulaires, propres aux clones leucémiques, pourraient modifier l'activité du complexe O-GlcNAcylase, comme cela a pu être démontré dans d'autres cas de cancers.

## **Partie 2 : La forme épissée du transcrit HBZ est réprimée par la transcription virale sens, dans les lymphocytes T infectés par le HTLV-1**

Lors de la progression de l'infection et de la pathogenèse associée au HTLV-1, les niveaux d'expression des protéines Tax et sHBZ jouent un rôle important dans la sélection clonale en influençant la prolifération des clones infectés, leur survie, mais aussi l'ampleur de la réponse immunitaire. De plus, l'accumulation d'anomalies génétiques, observée au sein du clone leucémique est imputable à l'expression des oncoprotéines Tax et HBZ.

Bien que l'expression sens du HTLV-1 soit réprimée dans la plupart des clones leucémiques, l'expression de Tax, pendant un certain laps de temps lors de l'infection, intervient dans la nature des clones sélectionnés et donc dans l'émergence des clones leucémiques. Ainsi, il apparaît indispensable de comprendre la régulation temporelle de la balance transcriptionnelle du HTLV-1.

Alors que l'inhibition de la transcription sens par HBZ est bien décrite, l'effet de la transcription sens sur la transcription antisens du HTLV-1, ne fait pas l'objet d'un consensus. Dans cette étude, en analysant l'impact de la transcription sens sur la production de sHBZ dans le contexte de provirus intégré, nous montrons avec certitude l'existence, dans les lignées transformées par HTLV-1, d'une inhibition de la production du transcrit sHBZ, lorsque le LTR5' est actif.

### **Le niveau d'ARNm de sHBZ est diminué dans les lignées avec un LTR5' actif**

Cette étude nous a permis de mettre en évidence une moindre production du transcrit sHBZ dans les cellules avec un LTR5' actif. L'acquisition de ces résultats a été permise par la mise en œuvre d'un protocole strict pour la détection spécifique des transcrits. Les ARNm de Tax et sHBZ sont quantifiés à l'aide d'une sonde Taqman chevauchant la jonction exonique et la détection spécifique d'usHBZ est permise par la mise au point d'une RT et d'une PCR, réalisées avec une amorce spécifique, permettant d'éviter l'auto-amorçage et la contamination des résultats par les transcrits issus du brin sens. Ce protocole, permettant l'amplification unique d'usHBZ lors de la PCR, diffère des études préalablement menées, dans les lignées HTLV-1 ou les cellules de patients infectés, au sein desquelles, la contamination par les transcrits du brin sens ne pouvait être exclue lors de l'amplification d'usHBZ voire de sHBZ.

Nous avons, par ailleurs, choisi de normaliser les résultats sur une charge provirale relative, déterminée par amplification des LTR.

Nous montrons ainsi que dans les lignées présentant un LTR5' actif, le niveau d'activation du promoteur de sHBZ est plus faible que dans les lignées TL-om1 et MT1 avec un LTR5' réprimé. Il aurait été intéressant de voir si ces résultats pouvaient être confirmés au niveau des protéines. Cependant, nous ne disposons pas d'anticorps assez sensibles, pour permettre la visualisation de la protéine HBZ en Western Blot et la discrimination des protéines, issues des transcrits sHBZ et usHBZ.

Par ailleurs, nous avons pu montrer, en analysant, par ChIP, le niveau de la marque d'histone activatrice H3K4me3, au niveau des LTR5' ou 3' de cinq de nos lignées, que le LTR3' des lignées, présentant un LTR5' actif, présente un niveau d'activation épigénétique moindre que celui des lignées au sein desquelles le LTR5' est réprimé.

Nos résultats concernant la quantité de transcrits Tax et sHBZ peuvent être confrontés à ceux d'Usui et al. en 2008, publication dans laquelle sont quantifiés les niveaux de Tax et HBZ dans des PBMC de patients, infectés par HTLV-1, ainsi que dans huit lignées, chroniquement infectées par HTLV-1 dont les MT2, HUT102 et les MT1 (Usui et al., 2008). Les résultats présentés ne sont pas entièrement en cohérence avec nos résultats. En effet, bien que les HUT102 et MT2 présentent des niveaux de sHBZ plus faibles que les MT1 et que l'ensemble des lignées ressemblant aux ATL testées, certaines lignées Tax positives, mais avec un niveau de transcription sens intermédiaire, présentent des niveaux en sHBZ équivalents à ceux observés pour les lignées ATL et les cellules de patients ATL. L'effet de répression de sHBZ pourrait donc ne s'exercer qu'à partir d'un certain niveau d'activation de la transcription sens.

Afin de confirmer nos résultats, il serait intéressant de voir si, dans des PBMC de patients asymptomatiques, atteints de TSP ou d'ATL, une telle répression de sHBZ est observable, en présence de transcription sens, lorsque les résultats obtenus sont normalisés sur la charge provirale. Cependant, dans les PBMC, il est indispensable de noter que la charge provirale dépend à la fois du nombre de provirus par cellule, mais aussi du pourcentage de cellules infectées et pourrait donc ne pas aussi bien refléter le niveau d'activation des promoteurs.

Une autre approche qui pourrait s'avérer extrêmement intéressante, serait d'analyser les niveaux de transcrits dans les cellules de patients, cellule par cellule. Cela pourrait être réalisé en cytométrie en flux, à l'aide de sondes spécifiques des jonctions d'exons des ARN de Tax et

sHBZ (ne permettant malheureusement pas la détection spécifique d'usHBZ), afin de déterminer si nous obtenons des profils d'expression opposés entre Tax et sHBZ, dans l'ensemble des cellules de nos lignées, mais aussi dans des PBMC de patients asymptomatiques ou atteints de TSP.

Récemment, une approche comparable a été mise en œuvre par Billman et al. pour permettre la détection des transcrits du HTLV-1, en cellule unique, à partir de PBMC de patients asymptomatiques, par hybridation *in situ* en fluorescence d'ARN (RNA-FISH) et observation en microscopie de fluorescence (Billman et al., 2017). Dans cette étude, les sondes utilisées permettent, soit la détection de tous les transcrits sens (sonde reconnaissant la séquence du second exon de Tax), soit la détection de sHBZ et usHBZ (sonde spécifique du second exon d'HBZ), ce qui limite l'interprétation des résultats. Cette publication montre cependant l'existence de niveaux opposés de transcription sens et d'HBZ. En effet, dans les cellules subissant une augmentation soudaine de la transcription sens (qualifiée de « burst » par les auteurs de l'étude), le niveau de transcrit antisens est faible et peut même aller jusqu'à une absence de détection de transcrits antisens. Ce qui confirme l'intérêt de vérifier nos résultats dans des cellules de patients.

### **Les traitements à la Chaetocine et à la Spironolactone permettent de lever l'inhibition exercée sur sHBZ en inhibant la transcription sens du HTLV-1.**

Afin de moduler le niveau de transcription sens dans les lignées avec un LTR5' actif, nous aurions pu tenter de diminuer la quantité de protéine Tax, en utilisant des siRNA dirigés contre l'ARN de Tax. Cependant, la faible efficacité de ces siRNA dans notre modèle ne nous a pas permis de procéder de cette manière.

Nous avons donc mis à profit l'existence de deux drogues, la Spironolactone et la Chaetocine, dont nous soupçonnions l'effet inhibiteur sur la transcription sens. En effet, la Chaetocine a été décrite comme un inhibiteur de la protéine chaperonne Hsp90 dont Tax est une protéine cliente et la Spironolactone entraîne la dégradation de l'hélicase XPB, effet préalablement impliqué dans l'inhibition de la transcription Tat-dépendante du VIH-1.

Nous avons tout d'abord confirmé que ces drogues inhibaient bien la transcription sens, dans les lignées transformées par HTLV-1, soit directement pour la SP, soit par l'intermédiaire de la dégradation de Tax pour la Chae.

Alors que l'effet de la Chae sur la transcription sens est similaire dans toutes les lignées avec un LTR5' actif, on observe que l'effet de la SP sur la transcription sens est plus faible pour une même dose, dans les MT2 et les MT4 en comparaison des C8166. Cet effet est observé, alors même que la dégradation de la protéine XPB est effectuée après 24h de traitement avec la même efficacité dans ces lignées, que dans les C8166. Une hypothèse pour expliquer ces résultats pourrait être que le niveau de transcription sens étant plus faible dans ces cellules, par rapport aux C8166, une plus faible quantité de XPB est nécessaire pour l'obtention de ce niveau de transcription et la diminution de la transcription sens, consécutive à la dégradation de XPB est donc moins marquée à 24h. A une dose plus élevée de SP, on observe un effet plus marqué sur la transcription sens qui pourrait s'expliquer par une dégradation plus rapide de la protéine XPB.

L'obtention d'une inhibition de la transcription sens ayant pu être obtenue pour ces deux drogues, nous les avons donc utilisées pour étudier l'effet d'une diminution de la transcription sens sur les niveaux de sHBZ et usHBZ.

En réponse au traitement par la SP ou la Chae, on observe que la diminution du niveau des transcrits sens s'accompagne d'une augmentation de la quantité de transcrits sHBZ. L'importance de l'effet sur sHBZ semble d'ailleurs corrélé à l'ampleur de la diminution de la transcription sens. En effet, lorsque l'on traite des MT2 et MT4 à 20µM de SP, on observe une diminution plus forte du niveau de transcrits sens et une augmentation plus importante de la quantité de sHBZ, en comparaison d'un traitement à 10µM. Il semble donc qu'il y ait une corrélation entre le niveau de transcrits sens et l'ampleur de la répression exercée sur sHBZ.

De plus, les traitements à la Chaetocine, à la dose utilisée, ont un effet inhibiteur plus important que la SP sur la transcription sens. Cet effet pourrait être du à une dégradation totale de la protéine Tax et donc une abolition complète de la transactivation du LTR5', obtenue avec la Chae et non la SP. De ce fait, les traitements à la Chae entraînent systématiquement une augmentation plus forte de la transcription de sHBZ que les traitements à la SP.

Nous pouvons également supposer qu'une protéine impliquée dans la répression de la transcription de sHBZ et recrutée par Tax au niveau du promoteur de sHBZ, pourrait être stabilisée par interaction avec Hsp90 et donc que l'inhibition d'Hsp90 par la Chae aurait pour conséquence, la dégradation de cette protéine et une accentuation de la levée de la répression. Parmi les protéines clients d'Hsp90, dont l'interaction avec Tax a été démontrée, nous pouvons citer les histones lysine méthyltransférase (KMT) Suv39h1, responsable de la

triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3 et Ezh2, portant l'activité catalytique du complexe PRC2 et apposant la marque H3K27me3 (Isaacs, 2016). L'absence de la marque H3K9me3 au niveau du LTR3' permet d'exclure un rôle direct de Suv39h1 dans la répression du promoteur de sHBZ. En revanche, il serait intéressant de voir si, après un traitement par la Chaetocine, le niveau de marques H3K27me3, détectées au niveau du LTR3' est diminué. En outre, il n'est pas à exclure que le traitement par la Chaetocine puisse modifier le paysage épigénétique de la cellule, en ciblant ces KMT, mais aussi certaines enzymes responsables de la synthèse de marques activatrices, comme MLL1 (Tariq et al., 2009).

S'il est confirmé, cet effet ne pourrait cependant pas expliquer la totalité de l'augmentation de sHBZ, observée en réponse au traitement par la Chaetocine. En effet il est à noter qu'aucune des drogues n'a un effet direct sur la transcription de sHBZ, puisque dans la lignée TL-om1, dépourvue de transcription sens, les traitements à la SP ou la Chae n'ont aucune conséquence sur le niveau de sHBZ. Cela suppose, par ailleurs, qu'aucun des facteurs impliqués dans la transcription de sHBZ c'est à dire Sp1, JunD et HBZ, ni aucun facteur général de transcription n'est une protéine cliente d'Hsp90.

De plus, il est étonnant de voir que la SP n'a pas d'effet direct sur la transcription de sHBZ, ce qui suppose qu'XPB ne serait pas impliquée dans la transcription de sHBZ. Ceci est compatible avec le fait que la déplétion en XPB n'affecte pas la transcription de l'ensemble des gènes et n'empêche pas l'ouverture des promoteurs nécessaire à la transcription (Alekseev et al., 2017). Ainsi la transcription de sHBZ ne nécessiterait pas obligatoirement la présence de la protéine XPB.

L'antagonisme entre transcription sens et production de sHBZ a pu être mis en évidence dans d'autres études. Kulkarni et al. ont pu mettre en évidence, en 2017, que lors de la mise en culture de PBMC de patients infectés par HTLV-1, les variations des transcriptions sens et antisens pouvaient être opposées. Le traitement avec un inhibiteur des 2-oxoglutarate oxygénases, le DMOG entraîne par exemple, une inhibition du niveau d'ARN sens, avec un effet dose, qui s'accompagne d'une augmentation de la quantité d'ARN sHBZ, suivant le même effet dose. De même, la culture de PBMC de patients, en absence de glucose, induit une faible inhibition de la transcription sens du HTLV-1, en comparaison d'une concentration à 5,5mM de glucose. En parallèle de cette faible inhibition, on observe une tendance à la hausse de la quantité d'ARN de sHBZ (Kulkarni et al., 2017).

Plus récemment, une étude de la même équipe a mis en évidence que le LTR5' présentait à la fois, la marque activatrice H3K4me3 et la marque répressive H2AK119ub1 et que l'utilisation d'un inhibiteur de débiquitinylation, conduisait à une forte répression de la transcription sens et en parallèle, à une forte augmentation du niveau de transcription de sHBZ, marquée par une accumulation de marques H3K4me3, au niveau du LTR3' (Kulkarni et al., 2018).

Enfin, une étude dans des lymphocytes T CD4+ issus de patients atteints de TSP, a permis de montrer qu'un traitement au Valproate, un inhibiteur d'histone déacétylases provoque une augmentation du niveau d'ARN de Tax, accompagnée d'une diminution de la détection des transcrits sHBZ (Belrose et al., 2011). Ces résultats ont été interprétés par les auteurs comme un effet sélectif du Valproate, sur les HDACs présentes au niveau du LTR5' ou comme un effet de compétition entre les transcriptions sens et antisens.

Tous ces résultats prennent un nouvel éclairage en s'ajoutant à nos résultats et confirment que, dans le cas d'une variation importante du niveau de transcription sens, et ce quel que soit la méthode utilisée pour obtenir cette variation, on obtient systématiquement une variation opposée du niveau d'ARN sHBZ.

### **La transcription d'usHBZ suit l'évolution de la transcription sens du HTLV-1**

Le transcrit usHBZ est initié dans la région pX et pourrait donc être contrôlé par les éléments régulateurs localisés dans la région U3 du LTR3', bien que cela ne puisse être affirmé avec certitude, au vue du peu de résultats concernant la régulation de la transcription d'usHBZ dans un contexte proviral. La mise au point d'un protocole permettant la détection précise d'usHBZ, sans risque de contamination par les transcrits du brin sens, nous a permis d'étudier la régulation de la transcription de usHBZ, dans nos différentes expériences.

Lorsqu'on analyse le niveau de l'ARN usHBZ dans les différentes lignées transformées par HTLV-1, il est à noter que, dans les lignées dérivées d'ATL (TL-Om1 et MT1), le niveau d'usHBZ est loin d'être négligeable, comme cela a pu être décrit dans certaines études. Cependant, ce niveau augmente fortement dans les lignées où la transcription sens est active avec dans ces lignées, l'existence d'une bonne corrélation entre le niveau de Tax et le niveau d'ARN d'usHBZ.

Ainsi, la protéine Tax pourrait favoriser la production d'usHBZ, par l'intermédiaire des éléments vCRE de la région U3 du LTR3', dans le contexte d'un provirus intégré, comme mis en évidence sur un modèle plasmidique par Landry et al. (Landry et al., 2009) et suggéré par

la présence du facteur de transcription CREB et de CBP/p300 au niveau du LTR3' (Lemasson et al., 2004).

La comparaison du niveau d'activation du promoteur d'usHBZ dans les lignées MT2 et MT4, par rapport aux HUT102, C8166 et C91PL, laisse cependant supposer que la transactivation du promoteur d'usHBZ ne peut se produire qu'à partir d'une certaine accumulation de protéine Tax, faisant donc potentiellement intervenir des sites de liaison de Tax et des différents facteurs de transcription, de moindre affinité que ceux localisés au niveau du LTR5'.

En absence de Tax, il existe ainsi une transcription basale, permettant la production d'usHBZ et lorsque la transcription sens est activée, la transactivation du promoteur d'usHBZ pourrait être permise par Tax. L'étude par ChIP, des facteurs de transcription, recrutés au niveau de la région U3 du LTR3' dans différentes lignées pourrait nous permettre de mieux comprendre, quels facteurs sont impliqués dans la transcription basale et dans la transactivation de ce promoteur.

Dans les expériences de traitements à la Chaetocine et à la Spironolactone, on constate que la diminution de la transcription sens, s'accompagne toujours d'une diminution de la quantité de transcrit usHBZ, dans les lignées où le LTR5' est actif. En revanche, dans les TL-Om1 et les MT-1, la Chaetocine ou la Spironolactone n'entraînent aucune diminution directe de la production d'usHBZ, favorisant l'hypothèse d'une transactivation du promoteur d'usHBZ par la protéine Tax.

### **L'existence des transcrits sens est nécessaire à l'induction de l'inhibition de la transcription de sHBZ.**

De nombreux éléments dépendent de la transcription sens et pourraient être responsables de l'inhibition de la production de sHBZ.

Les transcrits sens pourraient, en premier lieu, gêner l'initiation de la transcription de sHBZ, dans la mesure où, le signal de polyadénylation des ARN sens est localisé en aval du +1 de transcription de sHBZ.

Une autre hypothèse serait qu'un ARN sens en particulier se comporte comme un ARN interférent pour l'ARN sHBZ. Cependant, si un tel phénomène se produisait, il impacterait probablement également la transcription d'usHBZ.

On pourrait également envisager qu'une protéine traduite à partir d'un transcrit sens, soit responsable de l'inhibition observée, en recrutant des facteurs répresseurs ou en séquestrant des facteurs activateurs de la transcription de sHBZ.

Enfin, le dernier élément, dépendant de la transcription sens, qui pourrait être incriminé dans l'inhibition de sHBZ serait usHBZ, soit par compétition de promoteur, soit par gêne stérique lors de la transcription, cette interférence ne se produisant qu'à partir d'une certaine quantité d'ARN usHBZ.

On pourrait enfin envisager que l'inhibition de la production de sHBZ, dans les cellules avec un LTR5' actif, résulte d'une action synergique de différents éléments cités ci-dessus.

Afin de déterminer plus précisément le mécanisme impliqué dans l'inhibition de la production de sHBZ, nous avons tout d'abord souhaité analyser la séquence d'événements se succédant lors d'un traitement par la SP ou la Chae. Des expériences de cinétiques de traitements à la SP ou à la Chae, nous ont ainsi permis de montrer que le niveau d'ARNm de sHBZ ne commence à augmenter, que lorsque les niveaux de tous les transcrits sens et d'usHBZ ont commencé à décroître. Une forte diminution de la quantité de protéine Tax n'est, en revanche, pas requise pour permettre la levée de l'inhibition de la transcription de sHBZ. Ainsi, l'implication directe de la protéine Tax dans la répression du promoteur de sHBZ semble peu probable. De plus, toutes nos tentatives de surexpression de la protéine Tax dans des cellules TL-om1 n'ont entraîné aucune conséquence sur la production des transcrits sHBZ.

Les expériences dans lesquelles nous supprimons le traitement à la SP après 24h et suivons ensuite l'évolution des différents ARNm, nous ont permis de constater que l'établissement de l'inhibition de la production de sHBZ est un phénomène extrêmement dynamique et rapide, puisque l'inhibition de la production de sHBZ s'établit en seulement quelques heures, après augmentation de la quantité de transcrits sens. Dans ces expériences, à nouveau, la protéine Tax ne semble pas directement impliquée dans la répression exercée sur sHBZ.

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués et de pouvoir analyser précisément le recrutement de facteurs de transcription, de marques épigénétiques et de la machinerie de transcription au niveau du promoteur de sHBZ, en présence ou en absence de transcription sens, le recours à un modèle plus simple semble indispensable. C'est pourquoi nous mettons au point des lignées de Jurkat, présentant un plasmide stablement intégré. Les deux plasmides utilisés comportent la partie 3' du provirus HTLV-1 de Env au LTR3' et en amont, les

promoteurs CMV ou Sp6 permettant ou non l'expression des transcrits sens. Ainsi, la construction CMV-Env-LTR permet l'expression de transcrits sens, mais aussi de sHBZ et usHBZ alors que le plasmide Sp6-Env-LTR ne permet que l'expression des ARN sHBZ et usHBZ.

Une fois validé le fait que dans ce modèle, la transcription sens permet toujours l'inhibition de la production de sHBZ, nous pourrions analyser les promoteurs de sHBZ et usHBZ, dans les deux constructions, pour voir si leur fonctionnement et les protéines recrutées diffèrent entre les différentes conditions. Nous pourrions ensuite introduire des mutations, au niveau du promoteur d'usHBZ ou des différents sites d'initiation d'usHBZ, afin d'étudier l'implication de la transcription d'usHBZ dans la répression de sHBZ. Enfin, nous pourrions surexprimer les protéines issues de la transcription sens ou apporter des ARN sens en trans dans la construction Sp6-Env-LTR pour valider ou invalider nos différentes hypothèses permettant d'expliquer l'inhibition de la production de sHBZ.

### **L'inhibition de la transcription de antisens par la transcription sens existe t'elle *in vivo* et pour d'autres deltaretrovirus ?**

Ainsi, nos résultats dans des lignées transformées par le HTLV-1, ainsi que ceux d'autres équipes dans des PBMC de patients remis en culture, permettent de mettre en évidence une inhibition de la transcription de sHBZ dans les lignées avec une transcription sens active.

Il serait donc intéressant d'analyser, si une telle répression peut exister pour des cellules de patients *in situ*. Cette répression n'étant, par ailleurs, bien visible qu'à partir d'un certain niveau de transcription sens et les cellules de patients atteints de TSP ayant tendance à avoir des niveaux de transcription sens plus élevés, des PBMC de patients atteints de TSP pourraient constituer un bon modèle. Afin de ne pas remettre les cellules en culture, on pourrait essayer de visualiser les niveaux des différents transcrits par FACS, avec des sondes spécifiques de Tax et sHBZ ou par microscopie de fluorescence, pour permettre une analyse en cellule unique.

Dans le cas où l'inhibition de sHBZ par la transcription sens serait confirmée *in vivo*, l'implication de cette inhibition dans la sélection des clones, la réponse immunitaire dirigée contre HTLV-1 et la pathogenèse associée à HTLV-1 seraient à envisager. En effet, dans les premiers temps de l'infection, l'expression sens pourrait être favorisée et inhiber la production de sHBZ, tout en favorisant la transcription d'usHBZ. En réponse à la pression de

sélection exercée par le système immunitaire, les clones avec un plus faible niveau de transcription sens et donc un plus fort niveau de sHBZ vont être sélectionnés. Parmi ces clones, si la transcription sens est complètement réprimée après un certain temps, l'avantage sélectif alors acquis peut conduire à l'émergence d'un clone dominant, avec un risque accru de développement de la leucémie. A l'inverse, lorsque la transcription sens reste dominante et l'expression de sHBZ limitée, le risque de développement de pathologies inflammatoires pourrait être augmenté. Ainsi, une meilleure compréhension de la régulation de la balance transcriptionnelle du HTLV-1, chez les patients, pourrait constituer une aide pour le suivi de l'évolution de l'infection.

Tous les rétrovirus de la famille des *deltaretrovirus* présentent à la fois une transcription sens et une transcription antisens (Barbeau and Mesnard, 2011). Il serait par conséquent, intéressant de voir si, dans le cas d'autres deltaretrovirus comme le BLV pour Bovine Leukemia Virus, la transcription antisens est inhibée par la transcription sens.

Dans le cas de BLV, la transcription antisens consiste majoritairement en l'existence de deux transcrits épissés, nommés AS1-S pour la forme courte et AS1-L pour la forme longue, même si d'autres transcrits épissés, plus minoritaires, ont aussi pu être décrits (Durkin et al., 2016). La forme longue AS1-L est chevauchante, vis à vis du cluster de miRNA localisé dans le génome du BLV. Une interférence entre l'expression de AS1-L et les miRNA de BLV a pu ainsi être mise en évidence et expliquée par une interférence entre l'ARN Polymérase II, synthétisant l'ARN AS1-L et l'ARN Polymérase III, responsable de la transcription des miRNA de BLV (Durkin et al., 2016). Cependant, il est important de noter que, dans le cas de BLV, le niveau de transcription sens est faible en comparaison de la transcription antisens. (Van Driessche et al., 2016). Ainsi dans le cadre de ce virus, il serait peu probable d'observer une interférence de la transcription sens sur la transcription antisens, du fait du faible niveau de transcription sens. Néanmoins, il n'est pas à exclure qu'une diminution du niveau de transcription sens puisse être assurée via la transcription du cluster de miRNA.

**Les deux études présentées dans ma thèse, mettent ainsi en lumière deux mécanismes distincts affectant la balance transcriptionnelle du HTLV-1. Nous mettons en évidence un nouveau mécanisme d'amplification de la transcription sens, par la protéine Tax, par le détournement de la machinerie d'O-GlcNAc, ainsi qu'un phénomène d'inhibition de la transcription de sHBZ par la transcription sens du HTLV-1.**

## **Bibliographie**

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.

Alefantis, T., Barmak, K., Harhaj, E.W., Grant, C., and Wigdahl, B. (2003). Characterization of a nuclear export signal within the human T cell leukemia virus type I transactivator protein Tax. *J. Biol. Chem.* 278, 21814–21822.

Alefantis, T., Mostoller, K., Jain, P., Harhaj, E., Grant, C., and Wigdahl, B. (2005). Secretion of the human T cell leukemia virus type I transactivator protein tax. *J. Biol. Chem.* 280, 17353–17362.

Alekseev, S., Ayadi, M., Brino, L., Egly, J.-M., Larsen, A.K., and Coin, F. (2014). A small molecule screen identifies an inhibitor of DNA repair inducing the degradation of TFIIH and the chemosensitization of tumor cells to platinum. *Chem. Biol.* 21, 398–407.

Alekseev, S., Nagy, Z., Sandoz, J., Weiss, A., Egly, J.-M., Le May, N., and Coin, F. (2017). Transcription without XPB Establishes a Unified Helicase-Independent Mechanism of Promoter Opening in Eukaryotic Gene Expression. *Mol. Cell* 65, 504–514.e4.

Ando, Y., Nakano, S., Saito, K., Shimamoto, I., Ichijo, M., Toyama, T., and Hinuma, Y. (1987). Transmission of adult T-cell leukemia retrovirus (HTLV-I) from mother to child: comparison of bottle- with breast-fed babies. *Jpn. J. Cancer Res. Gann* 78, 322–324.

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.

Banerjee, P.S., Lagerlöf, O., and Hart, G.W. (2016). Roles of O-GlcNAc in chronic diseases of aging. *Mol. Aspects Med.* 51, 1–15.

Baratella, M., Forlani, G., Raval, G.U., Tedeschi, A., Gout, O., Gessain, A., Tosi, G., and Accolla, R.S. (2017). Cytoplasmic Localization of HTLV-1 HBZ Protein: A Biomarker of HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0005285.

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

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.

Baudoin, L., and Issad, T. (2014). O-GlcNAcylation and Inflammation: A Vast Territory to Explore. *Front. Endocrinol.* 5, 235.

Baydoun, H.H., Bai, X.T., Shelton, S., and Nicot, C. (2012). HTLV-I tax increases genetic instability by inducing DNA double strand breaks during DNA replication and switching repair to NHEJ. *PloS One* 7, e42226.

Baydoun, H.H., Cherian, M.A., Green, P., and Ratner, L. (2015). Inducible nitric oxide synthase mediates DNA double strand breaks in Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-induced leukemia/lymphoma. *Retrovirology* 12, 71.

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., Lezin, 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.

Bex, F., McDowall, A., Burny, A., and Gaynor, R. (1997). The human T-cell leukemia virus type 1 transactivator protein Tax colocalizes in unique nuclear structures with NF-kappaB proteins. *J. Virol.* 71, 3484–3497.

Billman, M.R., Rueda, D., and Bangham, C.R.M. (2017). Single-cell heterogeneity and cell-cycle-related viral gene bursts in the human leukaemia virus HTLV-1. *Wellcome Open Res.* 2, 87.

Burton, M., Upadhyaya, C.D., Maier, B., Hope, T.J., and Semmes, O.J. (2000). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax shuttles between functionally discrete subcellular targets. *J. Virol.* 74, 2351–2364.

Caron, C., Rousset, R., Béraud, C., Moncollin, V., Egly, J.M., and Jalinot, P. (1993). Functional and biochemical interaction of the HTLV-I Tax1 transactivator with TBP. *EMBO J.* 12, 4269–4278.

Caron, C., Mengus, G., Dubrowskaya, V., Roisin, A., Davidson, I., and Jalinot, P. (1997). Human TAF(II)28 interacts with the human T cell leukemia virus type I Tax transactivator and promotes its transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3662–3667.

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.

Chan, C.-P., Siu, Y.-T., Kok, K.-H., Ching, Y.-P., Tang, H.-M.V., and Jin, D.-Y. (2013). Group I p21-activated kinases facilitate Tax-mediated transcriptional activation of the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeats. *Retrovirology* 10, 47.

Clemens, K.E., Piras, G., Radonovich, M.F., Choi, K.S., Duvall, J.F., DeJong, J., Roeder, R., and Brady, J.N. (1996). Interaction of the human T-cell lymphotropic virus type 1 tax transactivator with transcription factor IIA. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4656–4664.

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

Cook, L., Melamed, A., Yaguchi, H., and Bangham, C.R. (2017). The impact of HTLV-1 on the cellular genome. *Curr. Opin. Virol.* 26, 125–131.

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

Cullen, B.R., Lomedico, P.T., and Ju, G. (1984). Transcriptional interference in avian retroviruses--implications for the promoter insertion model of leukaemogenesis. *Nature* 307, 241–245.

Demontis, M.A., Sadiq, M.T., Golz, S., and Taylor, G.P. (2015). HTLV-1 viral RNA is detected rarely in plasma of HTLV-1 infected subjects. *J. Med. Virol.* 87, 2130–2134.

Derse, D., Crise, B., Li, Y., Princler, G., Lum, N., Stewart, C., McGrath, C.F., Hughes, S.H., Munroe, D.J., and Wu, X. (2007). Human T-cell leukemia virus type 1 integration target sites in the human genome: comparison with those of other retroviruses. *J. Virol.* 81, 6731–6741.

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.

Van Driessche, B., Rodari, A., Delacourt, N., Fauquenoy, S., Vanhulle, C., Burny, A., Rohr, O., and Van Lint, C. (2016). Characterization of new RNA polymerase III and RNA polymerase II transcriptional promoters in the Bovine Leukemia Virus genome. *Sci. Rep.* 6, 31125.

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

Durkin, K., Rosewick, N., Artesi, M., Hahaut, V., Griebel, P., Arsic, N., Burny, A., Georges, M., and Van den Broeke, A. (2016). Characterization of novel Bovine Leukemia Virus (BLV) antisense transcripts by deep sequencing reveals constitutive expression in tumors and transcriptional interaction with viral microRNAs. *Retrovirology* 13, 33.

Durkin, S.S., Guo, X., Fryrear, K.A., Mihaylova, V.T., Gupta, S.K., Belgnaoui, S.M., Haoudi, A., Kupfer, G.M., and Semmes, O.J. (2008). HTLV-1 Tax oncoprotein subverts the cellular DNA damage response via binding to DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 283, 36311–36320.

Duvall, J.F., Kashanchi, F., Cvekl, A., Radonovich, M.F., Piras, G., and Brady, J.N. (1995). Transactivation of the human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax1-responsive 21-base-pair repeats requires Holo-TFIID and TFIIA. *J. Virol.* 69, 5077–5086.

Easley, R., Carpio, L., Guendel, I., Klase, Z., Choi, S., Kehn-Hall, K., Brady, J.N., and Kashanchi, F. (2010). Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Transcription and Chromatin-Remodeling Complexes. *J. Virol.* 84, 4755–4768.

Enose-Akahata, Y., Abrams, A., Massoud, R., Bialuk, I., Johnson, K.R., Green, P.L., Maloney, E.M., and Jacobson, S. (2013). Humoral immune response to HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) in HTLV-1-infected individuals. *Retrovirology* 10, 19.

Fauquenoy, S., Robette, G., Kula, A., Vanhulle, C., Bouchat, S., Delacourt, N., Rodari, A., Marban, C., Schwartz, C., Burny, A., et al. (2017). Repression of Human T-lymphotropic virus type 1 Long Terminal Repeat sense transcription by Sp1 recruitment to novel Sp1 binding sites. *Sci. Rep.* 7, 43221.

Firouzi, S., Farmanbar, A., Nakai, K., Iwanaga, M., Uchimaru, K., Utsunomiya, A., Suzuki, Y., and Watanabe, T. (2017). Clonality of HTLV-1-infected T cells as a risk indicator for development and progression of adult T-cell leukemia. *Blood Adv.* 1, 1195–1205.

Fochi, S., Mutascio, S., Bertazzoni, U., Zipeto, D., and Romanelli, M.G. (2018). HTLV Deregulation of the NF- $\kappa$ B Pathway: An Update on Tax and Antisense Proteins Role. *Front. Microbiol.* 9, 285.

Fujikawa, D., Nakagawa, S., Hori, M., Kurokawa, N., Soejima, A., Nakano, K., Yamochi, T., Nakashima, M., Kobayashi, S., Tanaka, Y., et al. (2016). Polycomb-dependent epigenetic landscape in adult T-cell leukemia. *Blood* 127, 1790–1802.

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

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.

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

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

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

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

Gao, L., and Harhaj, E.W. (2013). HSP90 protects the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) tax oncoprotein from proteasomal degradation to support NF- $\kappa$ B activation and HTLV-1 replication. *J. Virol.* 87, 13640–13654.

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., Cesaire, 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., Barbeau, B., Mesnard, J.-M., and Peloponese, J.-M. (2017). Hijacking of the AP-1 Signaling Pathway during Development of ATL. *Front. Microbiol.* 8, 2686.

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

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.

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

Ghirlando, R., and Felsenfeld, G. (2016). CTCF: making the right connections. *Genes Dev.* 30, 881–891.

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

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

Goon, P.K.C., Biancardi, A., Fast, N., Igakura, T., Hanon, E., Mosley, A.J., Asquith, B., Gould, K.G., Marshall, S., Taylor, G.P., et al. (2004). Human T cell lymphotropic virus (HTLV) type-1-specific CD8<sup>+</sup> T cells: frequency and immunodominance hierarchy. *J. Infect. Dis.* 189, 2294–2298.

Grant, C., Barmak, K., Alefantis, T., Yao, J., Jacobson, S., and Wigdahl, B. (2002). Human T cell leukemia virus type I and neurologic disease: events in bone marrow, peripheral blood, and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. *J. Cell. Physiol.* 190, 133–159.

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.

Greiner, D., Bonaldi, T., Eskeland, R., Roemer, E., and Imhof, A. (2005). Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9. *Nat. Chem. Biol.* 1, 143–145.

Groussaud, D., Khair, M., Tollenaere, A.I., Waast, L., Kuo, M.-S., Mangeney, M., Martella, C., Fardini, Y., Coste, S., Souidi, M., et al. (2017). Hijacking of the O-GlcNAcZYME complex by the HTLV-1 Tax oncoprotein facilitates viral transcription. *PLOS Pathog.* 13, e1006518.

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.

Harhaj, E.W., and Giam, C.-Z. (2018). NF- $\kappa$ B signaling mechanisms in HTLV-1-induced adult T-cell leukemia/lymphoma. *FEBS J.* 285, 3324–3336.

Harrod, R., Tang, Y., Nicot, C., Lu, H.S., Vassilev, A., Nakatani, Y., and Giam, C.Z. (1998). An exposed KID-like domain in human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax is responsible for the recruitment of coactivators CBP/p300. *Mol. Cell. Biol.* 18, 5052–5061.

Hasegawa, H., Sawa, H., Lewis, M.J., Orba, Y., Sheehy, N., Yamamoto, Y., Ichinohe, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Katano, H., Takahashi, H., et al. (2006). Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat. Med.* 12, 466–472.

Hino, S., Katamine, S., Miyata, H., Tsuji, Y., Yamabe, T., and Miyamoto, T. (1997). Primary prevention of HTLV-1 in Japan. *Leukemia 11 Suppl 3*, 57–59.

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.

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- $\kappa$ B and depends on chronically activated IKK $\alpha$  and p65/RelA. *J. Virol.* 86, 9474–9483.

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.

Isaacs, J.S. (2016). Hsp90 as a “Chaperone” of the Epigenome: Insights and Opportunities for Cancer Therapy. *Adv. Cancer Res.* 129, 107–140.

Ishida, T., Iida, S., Akatsuka, Y., Ishii, T., Miyazaki, M., Komatsu, H., Inagaki, H., Okada, N., Fujita, T., Shitara, K., et al. (2004). The CC chemokine receptor 4 as a novel specific molecular target for immunotherapy in adult T-Cell leukemia/lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 10, 7529–7539.

Ishihara, S., Okayama, A., Stuver, S., Horinouchi, H., Shioiri, S., Murai, K., Kubota, T., Yamashita, R., Tachibana, N., and Tsubouchi, H. (1994). Association of HTLV-I antibody profile of asymptomatic carriers with proviral DNA levels of peripheral blood mononuclear cells. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 7, 199–203.

Izumo, S., Goto, I., Itoyama, Y., Okajima, T., Watanabe, S., Kuroda, Y., Araki, S., Mori, M., Nagataki, S., Matsukura, S., et al. (1996). Interferon-alpha is effective in HTLV-I-associated myelopathy: a multicenter, randomized, double-blind, controlled trial. *Neurology* 46, 1016–1021.

Jain, P., Lavorgna, A., Sehgal, M., Gao, L., Ginwala, R., Sagar, D., Harhaj, E.W., and Khan, Z.K. (2015). Myocyte enhancer factor (MEF)-2 plays essential roles in T-cell transformation associated with HTLV-1 infection by stabilizing complex between Tax and CREB. *Retrovirology* 12.

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

Jeang, K.T., Chiu, R., Santos, E., and Kim, S.J. (1991). Induction of the HTLV-I LTR by Jun occurs through the Tax-responsive 21-bp elements. *Virology* 181, 218–227.

Jeong, S.-J., Lu, H., Cho, W.-K., Park, H.U., Pise-Masison, C., and Brady, J.N. (2006). Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 enhances transcriptional activity of the human T-cell lymphotropic virus type 1 long terminal repeat through direct interaction with Tax. *J. Virol.* 80, 10036–10044.

Jeong, S.-J., Ryo, A., and Yamamoto, N. (2009). The prolyl isomerase Pin1 stabilizes the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax oncoprotein and promotes malignant transformation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381, 294–299.

Jiang, H., Lu, H., Schiltz, R.L., Pise-Masison, C.A., Ogryzko, V.V., Nakatani, Y., and Brady, J.N. (1999). PCAF interacts with tax and stimulates tax transactivation in a histone acetyltransferase-independent manner. *Mol. Cell. Biol.* 19, 8136–8145.

Jochmann, R., Thureau, M., Jung, S., Hofmann, C., Naschberger, E., Kremmer, E., Harrer, T., Miller, M., Schaft, N., and Sturzl, M. (2009). O-Linked N-Acetylglucosaminylation of Sp1 Inhibits the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Promoter. *J. Virol.* 83, 3704–3718.

Johannessen, M., Delghandi, M.P., and Moens, U. (2004). What turns CREB on? *Cell. Signal.* 16, 1211–1227.

Johnson, J.M., Harrod, R., and Franchini, G. (2001). Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukaemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1). *Int. J. Exp. Pathol.* 82, 135–147.

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

Jones, K.S., 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.

Kalyanaraman, V.S., Sarngadharan, M.G., Robert-Guroff, M., Miyoshi, I., Golde, D., and Gallo, R.C. (1982). A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* 218, 571–573.

Kamoi, K., Yamamoto, K., Misawa, A., Miyake, A., Ishida, T., Tanaka, Y., Mochizuki, M., and Watanabe, T. (2006). SUV39H1 interacts with HTLV-1 Tax and abrogates Tax transactivation of HTLV-1 LTR. *Retrovirology* 3, 5.

Kannian, P., and Green, P.L. (2010). Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular Biology and Oncogenesis. *Viruses* 2, 2037–2077.

Kao, S.Y., and Marriott, S.J. (1999). Disruption of nucleotide excision repair by the human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *J. Virol.* 73, 4299–4304.

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.* 47, 1304–1315.

Kawakami, E., Watanabe, T., Fujii, K., Goto, H., Watanabe, S., Noda, T., and Kawaoka, Y. (2011). Strand-specific real-time RT-PCR for distinguishing influenza vRNA, cRNA, and mRNA. *J. Virol. Methods* 173, 1–6.

Kawatsuki, A., Yasunaga, J.-I., Mitobe, Y., Green, P.L., and Matsuoka, M. (2016). HTLV-1 bZIP factor protein targets the Rb/E2F-1 pathway to promote proliferation and apoptosis of primary CD4(+) T cells. *Oncogene* 35, 4509–4517.

Kchour, G., Tarhini, M., Kooshyar, M.-M., El Hajj, H., Wattel, E., Mahmoudi, M., Hatoum, H., Rahimi, H., Maleki, M., Rafatpanah, H., et al. (2009). Phase 2 study of the efficacy and safety of the combination of arsenic trioxide, interferon alpha, and zidovudine in newly diagnosed chronic adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL). *Blood* 113, 6528–6532.

Kim, Y.-M., Ramírez, J.A., Mick, J.E., Giebler, H.A., Yan, J.-P., and Nyborg, J.K. (2007). Molecular characterization of the Tax-containing HTLV-1 enhancer complex reveals a prominent role for CREB phosphorylation in Tax transactivation. *J. Biol. Chem.* 282, 18750–18757.

Kinjo, T., Ham-Terhune, J., Peloponese, J.-M., and Jeang, K.-T. (2010). Induction of reactive oxygen species by human T-cell leukemia virus type 1 tax correlates with DNA damage and expression of cellular senescence marker. *J. Virol.* 84, 5431–5437.

Kira, J., Nakamura, M., Sawada, T., Koyanagi, Y., Ohori, N., Itoyama, Y., Yamamoto, N., Sakaki, Y., and Goto, I. (1992). Antibody titers to HTLV-I-p40tax protein and gag-env hybrid protein in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: correlation with increased HTLV-I proviral DNA load. *J. Neurol. Sci.* *107*, 98–104.

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.

Konesky, K.L., Nyborg, J.K., and Laybourn, P.J. (2006). Tax Abolishes Histone H1 Repression of p300 Acetyltransferase Activity at the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Promoter. *J. Virol.* *80*, 10542–10553.

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.

Kulkarni, A., and Bangham, C.R.M. (2018). HTLV-1: Regulating the Balance Between Proviral Latency and Reactivation. *Front. Microbiol.* *9*, 449.

Kulkarni, A., Mateus, M., Thinnies, C.C., McCullagh, J.S., Schofield, C.J., Taylor, G.P., and Bangham, C.R.M. (2017). Glucose Metabolism and Oxygen Availability Govern Reactivation of the Latent Human Retrovirus HTLV-1. *Cell Chem. Biol.* *24*, 1377–1387.e3.

Kulkarni, A., Taylor, G.P., Klose, R.J., Schofield, C.J., and Bangham, C.R. (2018). Histone H2A monoubiquitylation and p38-MAPKs regulate immediate-early gene-like reactivation of latent retrovirus HTLV-1. *JCI Insight* *3*.

Lacombe, B., Morel, M., Margottin-Goguet, F., and Ramirez, B.C. (2016). Specific Inhibition of HIV Infection by the Action of Spironolactone in T Cells. *J. Virol.* *90*, 10972–10980.

Lamarre-Vincent, N., and Hsieh-Wilson, L.C. (2003). Dynamic glycosylation of the transcription factor CREB: a potential role in gene regulation. *J. Am. Chem. Soc.* *125*, 6612–6613.

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.

Laperche, S., Worms, B., Pillonel, J., European Network of Transfusion Medicine Societies, and Steering Committee (2009). Blood safety strategies for human T-cell lymphotropic virus in Europe. *Vox Sang.* *96*, 104–110.

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.

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.

Lemasson, I., Polakowski, N.J., Laybourn, P.J., and Nyborg, J.K. (2002). Transcription factor binding and histone modifications on the integrated proviral promoter in human T-cell leukemia virus-I-infected T-cells. *J. Biol. Chem.* *277*, 49459–49465.

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., Polakowski, N.J., Laybourn, P.J., and Nyborg, J.K. (2006). Tax-dependent Displacement of Nucleosomes during Transcriptional Activation of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1. *J. Biol. Chem.* *281*, 13075–13082.

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.

Lenzmeier, B.A., Giebler, H.A., and Nyborg, J.K. (1998). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax requires direct access to DNA for recruitment of CREB binding protein to the viral promoter. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 721–731.

Lever, A.M.L., Jeang, K.-T., and Berkhout, B. (2010). Recent Advances in Human Retroviruses: Principles of Replication and Pathogenesis : Advances in Retroviral Research (World Scientific).

Lewis, B.A., Burlingame, A.L., and Myers, S.A. (2016). Human RNA Polymerase II Promoter Recruitment in Vitro Is Regulated by O-Linked N-Acetylglucosaminyltransferase (OGT). *J. Biol. Chem.* *291*, 14056–14061.

Li, H.-C., Biggar, R.J., Miley, W.J., Maloney, E.M., Cranston, B., Hanchard, B., and Hisada, M. (2004). Provirus load in breast milk and risk of mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type I. *J. Infect. Dis.* *190*, 1275–1278.

Lin, H.-C., Hickey, M., Hsu, L., Medina, D., and Rabson, A.B. (2005). Activation of human T cell leukemia virus type 1 LTR promoter and cellular promoter elements by T cell receptor signaling and HTLV-1 Tax expression. *Virology* *339*, 1–11.

Livengood, J.A., and Nyborg, J.K. (2004). The high-affinity Sp1 binding site in the HTLV-1 promoter contributes to Tax-independent basal expression. *Nucleic Acids Res.* *32*, 2829–2837.

Lodewick, J., Lamsoul, I., Polania, A., Lebrun, S., Burny, A., Ratner, L., and Bex, F. (2009). Acetylation of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein by p300 promotes activation of the NF-kappaB pathway. *Virology* *386*, 68–78.

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

Lu, H., Pise-Masison, C.A., Linton, R., Park, H.U., Schiltz, R.L., Sartorelli, V., and Brady, J.N. (2004). Tax Relieves Transcriptional Repression by Promoting Histone Deacetylase 1 Release from the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Long Terminal Repeat. *J. Virol.* *78*, 6735–6743.

Ma, G., Yasunaga, J., Fan, J., Yanagawa, S., and Matsuoka, M. (2013). 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., and Matsuoka, M. (2016). Multifaceted functions and roles of HBZ in HTLV-1 pathogenesis. *Retrovirology* *13*.

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.

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

Manel, N., Kim, F.J., Kinet, S., Taylor, N., Sitbon, M., and Battini, J.-L. (2003). The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell* *115*, 449–459.

Manns, A., Wilks, R.J., Murphy, E.L., Haynes, G., Figueroa, J.P., Barnett, M., Hanchard, B., and Blattner, W.A. (1992). A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion. *Int. J. Cancer* *51*, 886–891.

Marçais, A., Suarez, F., Sibon, D., Frenzel, L., Hermine, O., and Bazarbachi, A. (2013). Therapeutic options for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Curr. Oncol. Rep.* 15, 457–464.

Marçais, A., Waast, L., Bruneau, J., Hanssens, K., Asnafi, V., Gaulard, P., Suarez, F., Dubreuil, P., Gessain, A., Hermine, O., et al. (2017). Adult T cell leukemia aggressiveness correlates with loss of both 5-hydroxymethylcytosine and TET2 expression. *Oncotarget* 8, 52256–52268.

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.

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.

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.

Morgan, D.A., Ruscetti, F.W., and Gallo, R. (1976). Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193, 1007–1008.

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.

Motohashi, K., Suzuki, T., Kishimoto, K., Numata, A., Nakajima, Y., Tachibana, T., Ohshima, R., Kuwabara, H., Tanaka, M., Tomita, N., et al. (2013). Successful treatment of a patient with adult T cell leukemia/lymphoma using anti-CC chemokine receptor 4 monoclonal antibody mogamulizumab followed by allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int. J. Hematol.* 98, 258–260.

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.

Nakagawa, M., Nakahara, K., Maruyama, Y., Kawabata, M., Higuchi, I., Kubota, H., Izumo, S., Arimura, K., and Osame, M. (1996). Therapeutic trials in 200 patients with HTLV-I-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis. *J. Neurovirol.* 2, 345–355.

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

Niederer, H.A., and Bangham, C.R.M. (2014). Integration site and clonal expansion in human chronic retroviral infection and gene therapy. *Viruses* 6, 4140–4164.

Nyborg, J.K., Egan, D., and Sharma, N. (2010). The HTLV-1 Tax protein: revealing mechanisms of transcriptional activation through histone acetylation and nucleosome disassembly. *Biochim. Biophys. Acta* 1799, 266–274.

Osame, M. (2002). Pathological mechanisms of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy (HAM/TSP). *J. Neurovirol.* 8, 359–364.

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.

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

Panfil, A.R., Al-Saleem, J., Howard, C.M., Shkriabai, N., Kvaratskhelia, M., and Green, P.L. (2018). Stability of the HTLV-1 Antisense-Derived Protein, HBZ, Is Regulated by the E3 Ubiquitin-Protein Ligase, UBR5. *Front. Microbiol.* 9, 80.

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.

Pène, S., Waast, L., Bonnet, A., Bénit, L., and Pique, C. (2014). A non-SUMOylated tax protein is still functional for NF-κB pathway activation. *J. Virol.* 88, 10655–10661.

Pique, C., and Jones, K.S. (2012). Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. *Front. Microbiol.* 3, 378.

Quinn, P.G. (2002). Mechanisms of basal and kinase-inducible transcription activation by CREB. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 72, 269–305.

De Ravin, S.S., Su, L., Theobald, N., Choi, U., Macpherson, J.L., Poidinger, M., Symonds, G., Pond, S.M., Ferris, A.L., Hughes, S.H., et al. (2014). Enhancers are major targets for murine leukemia virus vector integration. *J. Virol.* 88, 4504–4513.

Rexach, J.E., Clark, P.M., Mason, D.E., Neve, R.L., Peters, E.C., and Hsieh-Wilson, L.C. (2012). Dynamic O-GlcNAc modification regulates CREB-mediated gene expression and memory formation. *Nat. Chem. Biol.* 8, 253–261.

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

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

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

Saggioro, D. (2011). Anti-apoptotic effect of Tax: an NF-κB path or a CREB way? *Viruses* 3, 1001–1014.

Sainsbury, S., Bernecky, C., and Cramer, P. (2015). Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 129–143.

Sasaki, D., Imaizumi, Y., Hasegawa, H., Osaka, A., Tsukasaki, K., Choi, Y.L., Mano, H., Marquez, V.E., Hayashi, T., Yanagihara, K., et al. (2011). Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 with trimethylation of lysine 27 on histone H3 in adult T-cell leukemia/lymphoma as a target for epigenetic therapy. *Haematologica* 96, 712–719.

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

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

Satou, Y., Miyazato, P., Ishihara, K., Yaguchi, H., Melamed, A., Miura, M., Fukuda, A., Nosaka, K., Watanabe, T., Rowan, A.G., et al. (2016). The retrovirus HTLV-1 inserts an ectopic CTCF-binding site into the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 3054–3059.

Scoggin, K.E., Ulloa, A., and Nyborg, J.K. (2001). The oncoprotein Tax binds the SRC-1-interacting domain of CBP/p300 to mediate transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5520–5530.

Sekiguchi, Y., Shimada, A., Ichikawa, K., Wakabayashi, M., Sugimoto, K., Kinoshita, A., Suga, Y., Tomita, S., Izumi, H., Nakamura, N., et al. (2014). A case of post-mogamulizumab relapse of acute-type adult T-cell leukemia/lymphoma successfully treated with mogamulizumab and etoposide. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7, 6278–6290.

- 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.
- Shimoyama, M. (1991). Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br. J. Haematol.* 79, 428–437.
- Shiohama, Y., Naito, T., Matsuzaki, T., Tanaka, R., Tomoyose, T., Takashima, H., Fukushima, T., Tanaka, Y., and Saito, M. (2016). 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* 13.
- Shirinian, M., Kfoury, Y., Dassouki, Z., El-Hajj, H., and Bazarbachi, A. (2013). Tax-1 and Tax-2 similarities and differences: focus on post-translational modifications and NF- $\kappa$ B activation. *Front. Microbiol.* 4, 231.
- Siu, Y.-T., Chin, K.-T., Siu, K.-L., Yee Wai Choy, E., Jeang, K.-T., and Jin, D.-Y. (2006). TORC1 and TORC2 coactivators are required for tax activation of the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeats. *J. Virol.* 80, 7052–7059.
- Smith, M.R., and Greene, W.C. (1992). Characterization of a novel nuclear localization signal in the HTLV-I tax transactivator protein. *Virology* 187, 316–320.
- Song, X., Zhao, Z., Qi, X., Tang, S., Wang, Q., Zhu, T., Gu, Q., Liu, M., and Li, J. (2015). Identification of epipolythiodioxopiperazines HDN-1 and chaetocin as novel inhibitor of heat shock protein 90. *Oncotarget* 6, 5263–5274.
- 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.
- Suzuki, S., Singhirunnusorn, P., Mori, A., Yamaoka, S., Kitajima, I., Saiki, I., and Sakurai, H. (2007). Constitutive activation of TAK1 by HTLV-1 tax-dependent overexpression of TAB2 induces activation of JNK-ATF2 but not IKK-NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* 282, 25177–25181.
- Takeda, S., Maeda, M., Morikawa, S., Taniguchi, Y., Yasunaga, J.-I., Nosaka, K., Tanaka, Y., and Matsuoka, M. (2004). Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int. J. Cancer* 109, 559–567.
- 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-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.
- Tariq, M., Nussbaumer, U., Chen, Y., Beisel, C., and Paro, R. (2009). Trithorax requires Hsp90 for maintenance of active chromatin at sites of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 1157–1162.
- Taylor, G.P. (2018). Human T-lymphotropic virus type 1 infection and solid organ transplantation. *Rev. Med. Virol.* 28.
- Taylor, J.M., and Nicot, C. (2008). HTLV-1 and apoptosis: role in cellular transformation and recent advances in therapeutic approaches. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 13, 733–747.
- 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.
- 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.

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.

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.

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

Winter, H.Y., and Marriott, S.J. (2007). Human T-cell leukemia virus type 1 Tax enhances serum response factor DNA binding and alters site selection. *J. Virol.* 81, 6089–6098.

Wright, D.G., Marchal, C., Hoang, K., Ankney, J.A., Nguyen, S.T., Rushing, A.W., Polakowski, N., Miotto, B., and Lemasson, I. (2016). 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.

Wu, K., Bottazzi, M.E., de la Fuente, C., Deng, L., Gitlin, S.D., Maddukuri, A., Dadgar, S., Li, H., Vertes, A., Pumfery, A., et al. (2004). Protein Profile of Tax-associated Complexes. *J. Biol. Chem.* 279, 495–508.

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.

Xie, S., Jin, N., Gu, J., Shi, J., Sun, J., Chu, D., Zhang, L., Dai, C.-L., Gu, J.-H., Gong, C.-X., et al. (2016). O-GlcNAcylation of protein kinase A catalytic subunits enhances its activity: a mechanism linked to learning and memory deficits in Alzheimer's disease. *Aging Cell* 15, 455–464.

Yamano, Y., Araya, N., Sato, T., Utsunomiya, A., Azakami, K., Hasegawa, D., Izumi, T., Fujita, H., Aratani, S., Yagishita, N., et al. (2009). Abnormally high levels of virus-infected IFN-gamma+ CCR4+ CD4+ CD25+ T cells in a retrovirus-associated neuroinflammatory disorder. *PloS One* 4, e6517.

Yang, X., Su, K., Roos, M.D., Chang, Q., Paterson, A.J., and Kudlow, J.E. (2001). O-linkage of N-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6611–6616.

Yang, Y.R., Kim, D.H., Seo, Y.-K., Park, D., Jang, H.-J., Choi, S.Y., Lee, Y.H., Lee, G.H., Nakajima, K., Taniguchi, N., et al. (2015). Elevated O-GlcNAcylation promotes colonic inflammation and tumorigenesis by modulating NF-κB signaling. *Oncotarget* 6, 12529–12542.

Yao, J., Grant, C., Harhaj, E., Nonnemacher, M., Alefantis, T., Martin, J., Jain, P., and Wigdahl, B. (2006). Regulation of human T-cell leukemia virus type 1 gene expression by Sp1 and Sp3 interaction with TRE-1 repeat III. *DNA Cell Biol.* 25, 262–276.

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.

Yeh, C.-H., Bai, X.T., Moles, R., Ratner, L., Waldmann, T.A., Watanabe, T., Tshiki, W., and Nicot, C. (2016). Mutation of epigenetic regulators TET2 and MLL3 in patients with HTLV-I-induced acute adult T-cell leukemia. *Mol. Cancer* 15, 15.

Yin, M.J., and Gaynor, R.B. (1996). HTLV-1 21 bp repeat sequences facilitate stable association between Tax and CREB to increase CREB binding affinity. *J. Mol. Biol.* 264, 20–31.

- Yoshida, M., Satou, Y., Yasunaga, J.-I., Fujisawa, J.-I., and Matsuoka, M. (2008). Transcriptional control of spliced and unspliced human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ) gene. *J. Virol.* 82, 9359–9368.
- Zhang, L., Liu, M., Merling, R., and Giam, C.-Z. (2006). Versatile Reporter Systems Show that Transactivation by Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Occurs Independently of Chromatin Remodeling Factor BRG1. *J. Virol.* 80, 7459–7468.
- Zhao, T., Satou, Y., Sugata, K., Miyazato, P., Green, P.L., Imamura, T., and Matsuoka, M. (2011). HTLV-1 bZIP factor enhances TGF- $\beta$  signaling through p300 coactivator. *Blood* 118, 1865–1876.
- Zhi, H., Yang, L., Kuo, Y.-L., Ho, Y.-K., Shih, H.-M., and Giam, C.-Z. (2011). NF- $\kappa$ B hyperactivation by HTLV-1 tax induces cellular senescence, but can be alleviated by the viral anti-sense protein HBZ. *PLoS Pathog.* 7, e1002025.
- Zhou, M., Lu, H., Park, H., Wilson-Chiru, J., Linton, R., and Brady, J.N. (2006). Tax interacts with P-TEFb in a novel manner to stimulate human T-lymphotropic virus type 1 transcription. *J. Virol.* 80, 4781–4791.

## **Annexe**

**Hijacking of the O-GlcNAcZYME complex by the HTLV-1 Tax oncoprotein facilitates viral transcription.** Groussaud, Khair, Tollenaere et al.  
*Plos Pathogens* 2017

RESEARCH ARTICLE

# Hijacking of the O-GlcNAcZYME complex by the HTLV-1 Tax oncoprotein facilitates viral transcription

Damien Groussaud<sup>1,2,3</sup>✉, Mostafa Khair<sup>1,2,3</sup>✉, Armelle I. Tollenaere<sup>1,2,3</sup>✉, Laetitia Waast<sup>1,2,3</sup>, Mei-Shiue Kuo<sup>1,2,3</sup>, Marianne Mangeney<sup>1,2,3</sup>, Christophe Martella<sup>1,2,3</sup>, Yann Fardini<sup>1,2,3</sup>, Solène Coste<sup>1,2,3</sup>, Mouloud Souidi<sup>1,2,3</sup>, Laurence Benit<sup>1,2,3</sup>, Claudine Pique<sup>1,2,3</sup>‡\*, Tarik Issad<sup>1,2,3</sup>‡\*

**1** INSERM, U1016, Institut Cochin, Paris, France, **2** CNRS, UMR8104, Paris, France, **3** Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

✉ These authors contributed equally to this work.

‡ These authors share equal, senior co-authorship on this work.

\* [claudine.pique@inserm.fr](mailto:claudine.pique@inserm.fr) (CP); [tarik.issad@inserm.fr](mailto:tarik.issad@inserm.fr) (TI)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Groussaud D, Khair M, Tollenaere AI, Waast L, Kuo M-S, Mangeney M, et al. (2017) Hijacking of the O-GlcNAcZYME complex by the HTLV-1 Tax oncoprotein facilitates viral transcription. *PLoS Pathog* 13(7): e1006518. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006518>

**Editor:** Susan R. Ross, University of Illinois at Chicago College of Medicine, UNITED STATES

**Received:** June 19, 2017

**Accepted:** July 7, 2017

**Published:** July 24, 2017

**Copyright:** © 2017 Groussaud et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by a grant from the Plan Cancer INSERM (CP and TI; grant number ASC13096KSA; url: <https://www.eva2.inserm.fr/EVA/jsp/AppelsOffres/CANCER/>). DG was a recipient of a PhD grant from the Ligue Nationale contre le Cancer (url: <https://www.ligue-cancer.net/>). The funders had no role in study design, data

## Abstract

The viral Tax oncoprotein plays a key role in both Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-replication and HTLV-1-associated pathologies, notably adult T-cell leukemia. Tax governs the transcription from the viral 5'LTR, enhancing thereby its own expression, via the recruitment of dimers of phosphorylated CREB to cAMP-response elements located within the U3 region (vCRE). In addition to phosphorylation, CREB is also the target of O-GlcNAcylation, another reversible post-translational modification involved in a wide range of diseases, including cancers. O-GlcNAcylation consists in the addition of O-linked-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) on Serine or Threonine residues, a process controlled by two enzymes: O-GlcNAc transferase (OGT), which transfers O-GlcNAc on proteins, and O-GlcNAcase (OGA), which removes it. In this study, we investigated the status of O-GlcNAcylation enzymes in HTLV-1-transformed T cells. We found that OGA mRNA and protein expression levels are increased in HTLV-1-transformed T cells as compared to control T cell lines while OGT expression is unchanged. However, higher OGA production coincides with a reduction in OGA specific activity, showing that HTLV-1-transformed T cells produce high level of a less active form of OGA. Introducing Tax into HEK-293T cells or Tax-negative HTLV-1-transformed TL-om1 T cells is sufficient to inhibit OGA activity and increase total O-GlcNAcylation, without any change in OGT activity. Furthermore, Tax interacts with the OGT/OGA complex and inhibits the activity of OGT-bound OGA. Pharmacological inhibition of OGA increases CREB O-GlcNAcylation as well as HTLV-1-LTR transactivation by Tax and CREB recruitment to the LTR. Moreover, overexpression of wild-type CREB but not a CREB protein mutated on a previously described O-GlcNAcylation site enhances Tax-mediated LTR transactivation. Finally, both OGT and OGA are recruited to the LTR. These findings reveal the interplay between Tax and the O-GlcNAcylation pathway and identify new key molecular actors involved in the assembly of the Tax-dependent transactivation complex.

collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

## Author summary

Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is the only human retrovirus associated to a cancer. Indeed, HTLV-1 is responsible for adult T-cell leukemia, an aggressive malignant proliferation of CD4+ T lymphocytes. The regulatory protein Tax governs HTLV-1 transcription from the 5'LTR, driving expression of all viral proteins, including itself, at the exception of the antisense product HBZ. Besides this critical role in HTLV-1 expression, Tax acts as an oncoprotein able to induce T-cell immortalization *in vitro* and tumor formation in mice. In this study, we report that Tax interacts with the O-GlcNAcylase OGT/OGA complex that catalyzes O-GlcNAcylation, a post-translational modification often deregulated in cancers. We found that Tax interacts with the OGT/OGA complex and inhibits the activity of OGA, increasing thereby cellular O-GlcNAcylation. Strikingly, we found that O-GlcNAcylation of CREB, the cellular transcription factor recruited by Tax on the viral promoter, is increased in a Tax-dependent manner. Moreover, increased CREB O-GlcNAcylation strongly enhances Tax-induced LTR transactivation as well as CREB binding to the viral promoter. Finally, both OGT and OGA are part of the transactivation complex. These findings shed new light on the mechanism of Tax-dependent LTR transactivation and may open the way to new molecular interventions targeting HTLV-1 expression.

## Introduction

Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is the only retrovirus associated to a cancer in humans. HTLV-1 is indeed the etiologic agent of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL), a very aggressive malignant proliferation of CD4+ T lymphocytes, which appears in 2–5% of infected individuals (reviewed in [1]). In addition, HTLV-1 is also associated with various inflammatory disorders, including HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) [2].

The oncogenic power of HTLV-1 is due in large part to the properties of the viral oncoprotein Tax. Tax is a powerful inducer of T-cell proliferation through its ability to activate a broad range of cellular promoters, promote cell cycle and inhibit apoptosis and repair machineries (reviewed in [3]). As a consequence, Tax has been shown to induce immortalization of primary T cells *in vitro* [4] as well as tumor formation in transgenic animals [5]. Tax is also critical for HTLV-1 gene expression by virtue of its capacity to transactivate the 5' LTR that controls the transcription of all HTLV-1 structural, enzymatic and regulatory genes, including Tax itself, and auxiliary genes with the exception of the antisense product HBZ [6].

The transactivation of the 5'LTR depends on Tax interaction with the cellular transcription factor cAMP response element binding protein (CREB) that, together with Tax, binds to three conserved copies of a cyclic AMP-response element (CRE) located in the LTR U3 region (viral CRE/vCRE). CREB-mediated activation of cellular promoters has been shown to critically depend on CREB phosphorylation at Ser133 [7, 8]. It was initially proposed that CREB phosphorylation was dispensable in the context of Tax transactivation of the HTLV-1 promoter [9, 10]. However, further studies demonstrated on the one hand that the transactivation complex contains Ser133-phosphorylated CREB and on the other hand, that Tax is able to increase CREB phosphorylation [11–13]. The binding of Tax/CREB complexes to the vCRE then allows the recruitment of the CREB-Regulated Transcription Coactivator/Transducer Of Regulated CREB-Binding Protein (CRTC/TORC) [14], the CREB binding protein (CBP) [15] and CBP-

associated factor (p/CAF) [16] general co-activators and ultimately, of components of the basal transcription machinery (reviewed in [17]).

O-GlcNAcylation is a reversible post-translational modification [18] that has been shown to regulate stability, sub-cellular localisation and/or activity of a large set of proteins, notably transcription factors or co-factors [19], including CREB [20–22]. O-GlcNAcylation consists in the addition of N-acetyl glucosamine (GlcNAc) on Serine and Threonine residues. Only a unique couple of enzymes controls O-GlcNAc level on proteins: OGT (O-GlcNAc transferase), which adds the GlcNAc motif on proteins, and OGA (O-GlcNAcase), which removes it [19]. OGT and OGA are known to be physically associated in a molecular complex (the O-GlcNAc-enzyme complex), and this association was shown previously to be important for their regulatory activity on cell signaling and transcriptional processes [23]. Numerous studies have reported alterations in OGT, OGA and O-GlcNAc levels in solid tumors as well as hematopoietic cancers [24]. O-GlcNAcylation may promote tumor development through perturbation of signaling pathways and cell cycle regulators [24, 25]. In addition, major oncogenic factors were shown to be directly O-GlcNAcylated [24, 25]. Finally, O-GlcNAcylation has been recently recognized as a novel epigenetic mark (reviewed in [26]).

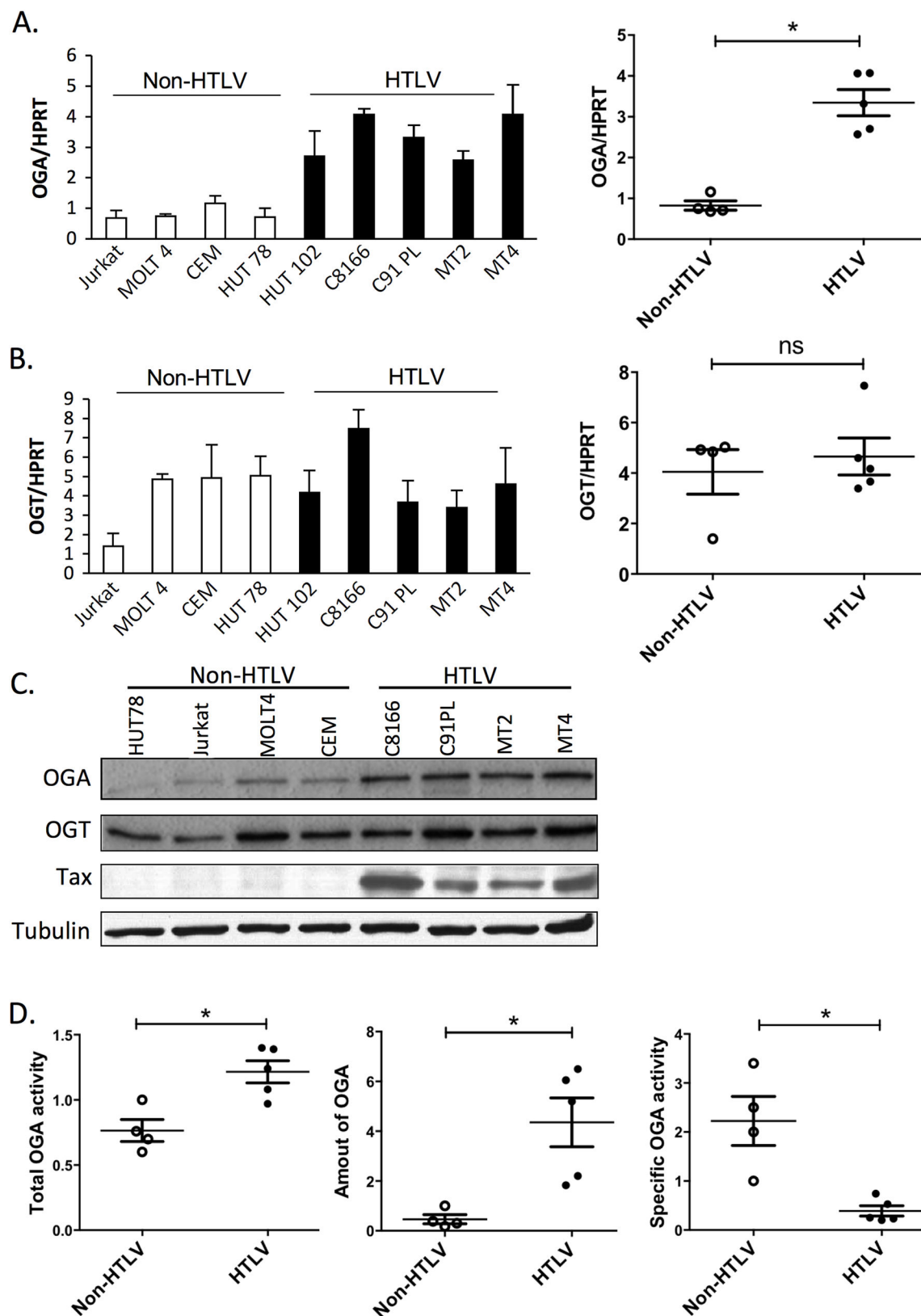
O-GlcNAcylation of CREB was initially described in rat brain [20]. Serine 40 of CREB was identified as a major O-GlcNAcylation site and found to function as a negative signal by preventing CREB association with CRTC/TORC [21]. CREB can be simultaneously O-GlcNAcylated at Ser40 and phosphorylated at Ser133 and indeed, CREB O-GlcNAcylation was shown to preferentially occur on the population of Ser133-phosphorylated CREB [21, 22].

In this study, we explore for the first time the status of O-GlcNAcylation in HTLV-1-transformed T cells. By using a combination of BRET, enzymatic and biochemical assays, we report that the HTLV-1 Tax protein binds to the O-GlcNAc-enzyme complex, blocks the activity of OGA and increases total O-GlcNAcylation in both adherent cells and HTLV-1-transformed T cells. Moreover, we show on the one hand that Tax increases CREB O-GlcNAcylation and on the other hand that increasing O-GlcNAcylation through OGA inhibition enhances both Tax-induced LTR transactivation and CREB recruitment to the promoter. We also report that in contrast to wild-type CREB, the CREB S40A mutant fails to enhance Tax-mediated LTR transactivation. Finally, we show that both OGT and OGA are recruited to the HTLV-1 LTR. These findings identify new functional interacting partners of Tax and shed new light on the composition of the transactivation complex assembled by Tax on the HTLV-1 5' LTR promoter.

## Results

### HTLV-1-transformed T cells accumulate a less active form of OGA

To determine the status of O-GlcNAcylation in T cells upon HTLV-1-induced transformation, the levels of OGT and OGA were compared between T cells transformed or not by HTLV-1. Greater level of OGA mRNA was found in four HTLV-1-transformed T cell lines, compared to four non-HTLV-1 transformed T cells (Fig 1A), whereas OGT mRNA expression was not affected (Fig 1B). To determine whether increased OGA mRNA expression could be related to the activated phenotype of HTLV-1 transformed T cells, we evaluated the levels of OGA and OGT mRNA upon T-cell activation. In contrast to HTLV-1-induced transformation, activation of peripheral blood mononuclear cells with PHA and IL-2 strongly reduced the level of OGA mRNA, while increasing OGT mRNA expression (S1 Fig). Hence, HTLV-1-induced T-cell transformation and T-cell activation differentially modulate OGA and OGT mRNA expression. As shown in Fig 1C, western blot analysis confirmed increased OGA protein expression with no change in OGT protein expression in HTLV-1-transformed compared to non-HTLV-1 transformed T cells.



**Fig 1. OGA and OGT status in HTLV-1-transformed T cells and control transformed T cells.** (A, B) RT-qPCR experiments comparing the amount of OGA (A) or OGT (B) mRNA in non-HTLV-1 (white bars) or in HTLV-1-transformed T

cells (black bars) normalized to the level of HPRT mRNA. Results are means  $\pm$  SEM of two independent experiments performed in triplicates. Statistical analyses are shown in right panels. **(C)** Western blot experiments showing the amount of OGA, OGT, Tax and tubulin in non-HTLV-1 or in HTLV-1-transformed T cells extracts. **(D)** OGA activity in non-HTLV-1 (empty circle) or HTLV-1 (black circle) transformed T cell extracts. Total OGA activity (left panel) was normalized to the OGA protein level in the extract determined by densitometric analysis of the OGA band detected on western-blot (middle panel), in order to estimate OGA specific activity (right panel). Results correspond to 3 independent experiments. Statistical significance was analyzed using the student's t test (ns: not significant; \*:  $p < 0.05$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006518.g001>

The enzymatic activity of OGA in each T cell line was then quantified. Cells were lysed and equal amounts of total proteins were used to measure either total OGA enzymatic activity or OGA protein level (Fig 1D). A statistically significant increase in total OGA activity ( $p = 0.0317$ ) was found in HTLV-1-transformed T cells as compared to control transformed T cells (Fig 1D, left panel). Because OGA protein expression level was higher in HTLV-1-transformed T cells, OGA activities were normalized to the amount of OGA protein present in each assay, determined by quantification of the signal obtained by western-blotting using the same cell extracts (Fig 1D, middle panel). To validate this procedure, we verified that a linear relationship exists between OGA activity and the OGA signal obtained by western-blot (S2 Fig). When corrected for OGA expression levels, OGA specific activity was much lower ( $p = 0.0159$ ) in HTLV-1-transformed T-cells than in control transformed T cells (Fig 1D, right panel).

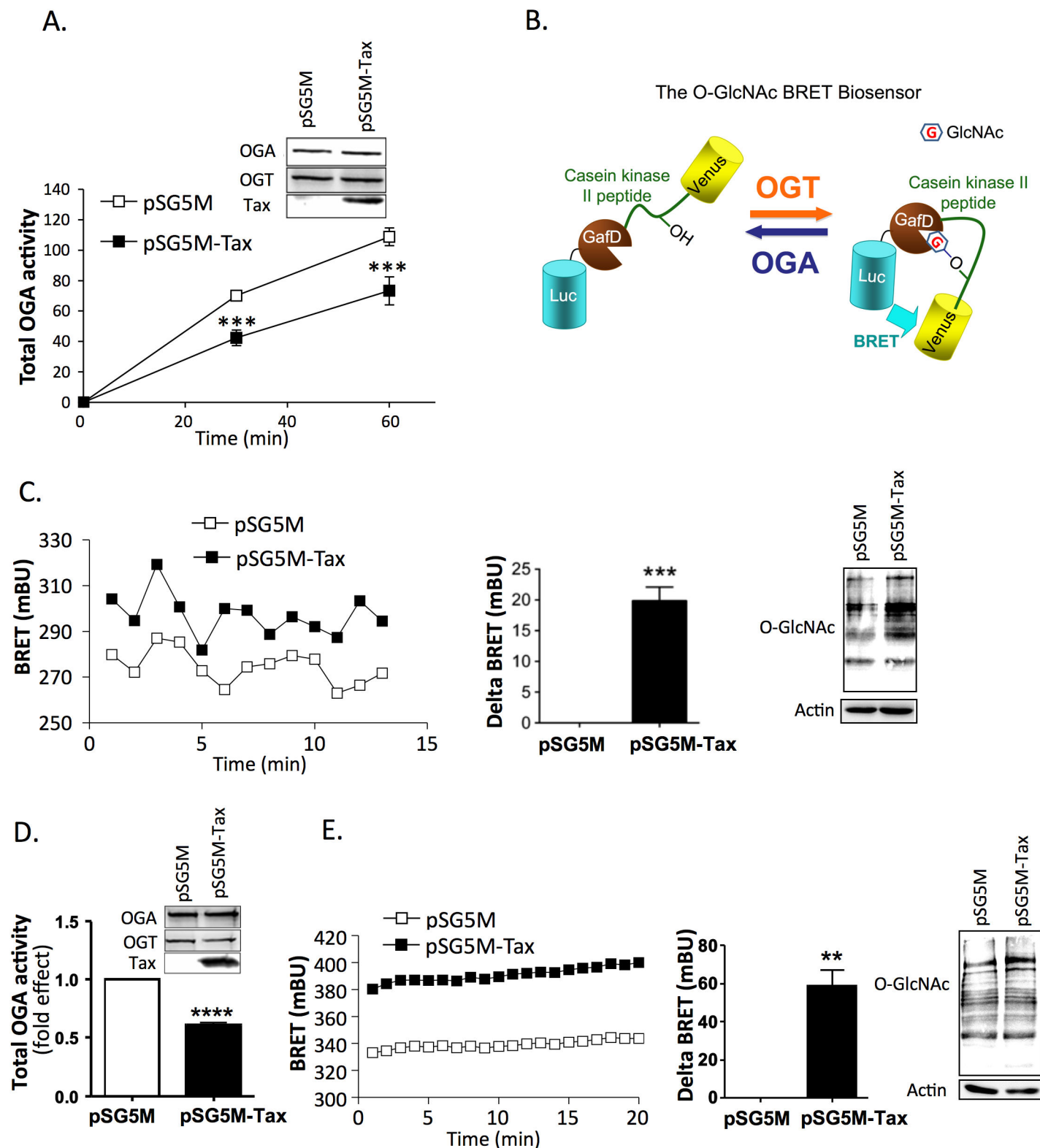
These findings show that OGT and OGA expression levels are differentially affected by HTLV-1 transformation. They also show that OGA production is increased at both mRNA and protein levels in HTLV-1-transformed T cells but that the activity of the enzyme is impaired in these cells.

## Tax inhibits OGA activity and increases cellular O-GlcNAcylation

The HTLV-1 Tax protein is capable of interacting with and deregulating numerous cellular proteins and machineries [3]. We therefore evaluated the impact of Tax on OGA activity using a Tax-negative HTLV-1 transformed T cell line (TL-om1), which allowed us to study Tax activity in an HTLV-1-transformed T cell context. A Tax expressor plasmid was transfected into TL-om1 T cells and OGA activity was measured 24 hours post-transfection. We observed that Tax-expressing TL-om1 T cells exhibited lower OGA activity than TL-om1 T cells transfected with the control plasmid (Fig 2A). This reduction in OGA activity was not due to a change in OGA expression level (Fig 2A, insert).

In order to determine whether Tax-induced OGA inhibition was associated with a change in O-GlcNAcylation, we developed a BRET biosensor based on a previously described FRET O-GlcNAc biosensor (Fig 2B)[27]. This BRET O-GlcNAc biosensor is composed of Rluc8 fused to a lectin domain (GafD), a known OGT substrate peptide derived from casein kinase II, followed by the Venus variant of the yellow fluorescent protein. Upon O-GlcNAcylation, the casein kinase peptide binds to the lectin, resulting into a conformational change detected as an increased BRET signal (Fig 2B). We observed higher BRET signal in TL-om1 cells expressing Tax compared to control cells (Fig 2C, left panel and statistical analysis of Tax-induced delta BRET in middle panel). This result was confirmed by western-blotting with an anti-O-GlcNAc antibody, which showed increased O-GlcNAcylation of proteins in Tax-transfected cells (Fig 2C, right panel).

Since TL-om1 T cells still express the viral antisense product HBZ, we investigated the effect of Tax in an HTLV-1-independent context. In transfected HEK-293T cells, Tax expression also resulted in a marked reduction in OGA enzymatic activity, as compared to control cells (Fig 2D). Again, this effect was not due to a change in OGA expression level (Fig 2D, insert). In contrast to OGA, OGT activity was not affected by Tax expression (S3 Fig). Inhibition of



**Fig 2. Effect of Tax on OGA activity and O-GlcNAcylation.** (A) Total OGA activity was measured at two different time-points in extracts from TL-om1 T cells transfected with either the control or Tax plasmid. Results are means  $\pm$  SEM of 4 independent experiments. The insert shows the expression of OGA, OGT and Tax in the cell extracts. (B) The BRET O-GlcNAc-biosensor is composed of Rluc8 fused to the fimbrial adhesin lectin domain GafD, a known OGT substrate peptide derived from casein kinase II placed between two flexible linkers (GGSGG), followed by the Venus variant of the yellow fluorescent protein (Adapted from [27]). (C) TL-om1 cells were transfected with the O-GlcNAc BRET biosensor and either the control or Tax plasmid. BRET

experiments were performed 24h after transfection. BRET measurements were started 5 min after the addition of coelenterazine. Left panel: typical BRET experiment. Middle panel: mean delta BRET (increased BRET signal induced by Tax expression). Results are means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. Right panel: level of O-GlcNAc proteins evaluated by western-blotting with an anti-O-GlcNAc antibody. (D) Total OGA activity was measured in extracts from HEK-293T cells transfected with either the control or Tax plasmid. Cells were extracted and OGA activity was measured at 30 min. Results are means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. The insert shows the expression of OGA, OGT and Tax in the cell extracts. (E) HEK-293T cells were transfected with the O-GlcNAc BRET biosensor and either the control or Tax plasmid. BRET experiments were performed 48h after transfection. BRET measurements were started 5 min after the addition of coelenterazine. Left panel: typical BRET experiment. Middle panel: mean delta BRET (increased BRET signal induced by Tax expression). Results are means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments. Right panel: level of O-GlcNAc proteins evaluated by western-blotting with an anti-O-GlcNAc antibody. Statistical significance was calculated using the student's t test (\*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006518.g002>

OGA activity coincided with a significant increase in the BRET signal of the biosensor (Fig 2E left panel and statistical analysis of Tax-induced delta BRET in middle panel). An increase in O-GlcNAcylation level of HEK-293T cell proteins was also detected by western-blotting using the anti-O-GlcNAc antibody (Fig 2E, right panel).

These results suggest that Tax inhibits OGA activity independently of the HTLV-1 context, and that this inhibition results in increased cellular O-GlcNAcylation.

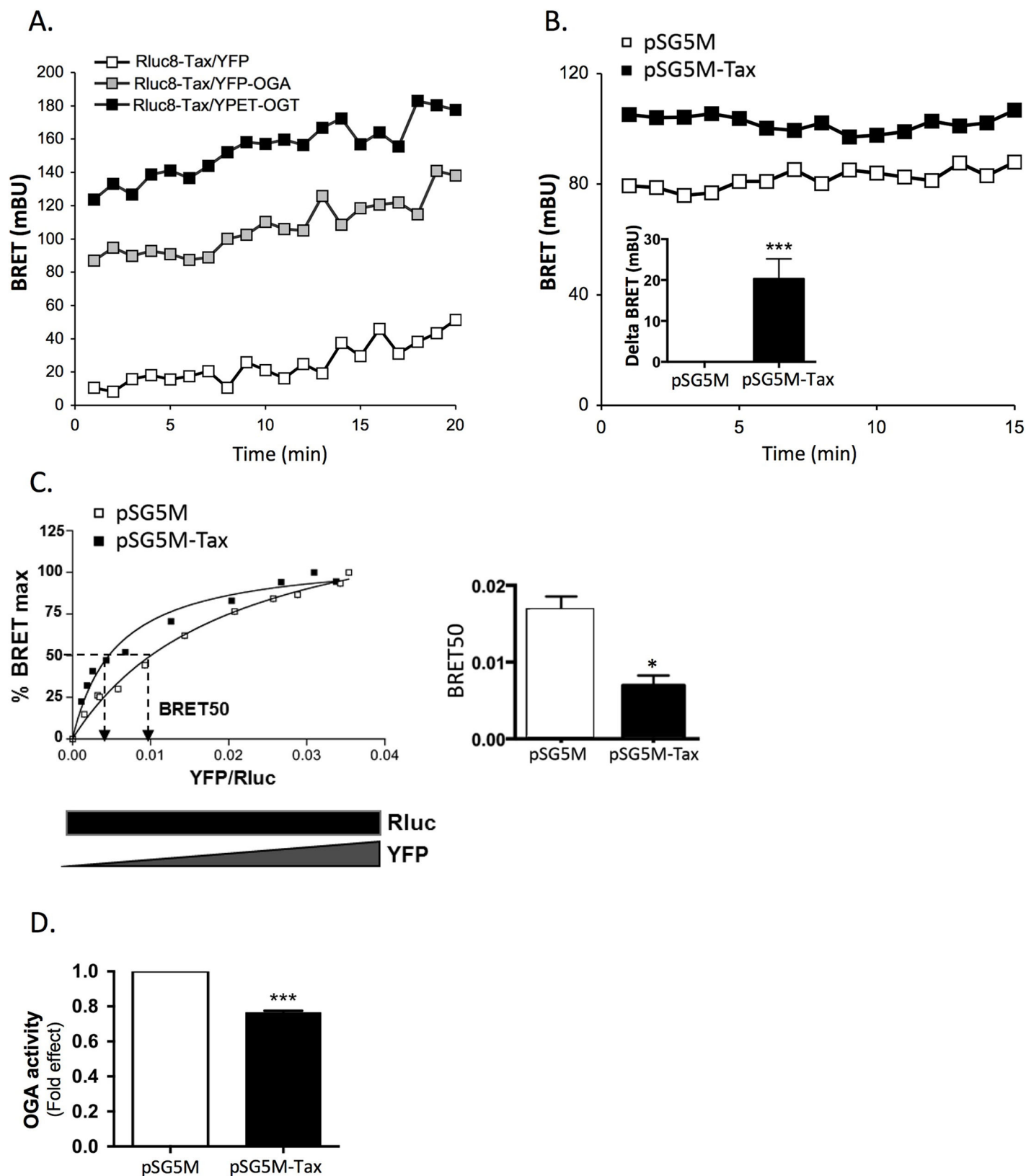
### Tax interaction with the O-GlcNAcylase complex

OGT and OGA have been previously shown to form a molecular complex, referred to as the O-GlcNAcylase, which plays an important role in their biological functions [23]. To determine whether Tax may alter O-GlcNAcylation by interacting with this complex, we first evaluated by BRET the interaction of Tax with either OGA or OGT. HEK-293T cells were transfected with a cDNA coding for a luciferase-tagged Tax (Rluc8-Tax) together with YPET-OGT, YFP-OGA, or YFP alone. Western blot analysis showed correct expression of each of these fusion proteins at their expected molecular weights (S4 Fig). A much higher BRET signal was observed with YPET-OGT or YFP-OGA than with YFP, indicating a specific interaction of Tax with the O-GlcNAc cycling enzymes (Fig 3A).

We then studied the effect of Tax expression on the formation of the OGT/OGA complex by BRET in HEK-293T cells co-transfected with OGT-Rluc and OGA-YFP constructs. As shown in Fig 3B, such complex could be readily detected as a BRET signal between OGT-Rluc and OGA-YFP. A higher BRET signal was found upon Tax expression, suggesting that Tax modulates OGT/OGA interaction (Fig 3B and statistical analysis of Tax-induced delta BRET in the insert). To further analyze the effect of Tax on OGT/OGA interaction, BRET saturation assays were performed (Fig 3C). This analysis permits to determine whether a change in BRET signal between two partners corresponds to an increased affinity between the two partners (reflected by decreased BRET<sub>50</sub>) [28] or, rather, a conformational change within the complex that modifies the relative orientation between the luciferase and the YFP, resulting in a higher efficiency of energy transfer, without change in BRET<sub>50</sub> [29]. Analysis of the saturation curves using Prism software indicated that Tax expression reduces the BRET<sub>50</sub> (Fig 3C left panel and statistical analysis of BRET<sub>50</sub> in the right panel), suggesting that Tax may regulate O-GlcNAcylation by increasing the affinity between OGA and OGT.

We next measured the enzymatic OGA activity in the OGT/OGA complex after immunoprecipitation of OGT. HEK-293T cells were co-transfected with OGT-Luc, OGA-YFP and either the Tax or control plasmid. OGA activity was measured on the immune complex and normalized to YFP fluorescence of the precipitated proteins. We found that Tax significantly reduced the activity of OGA co-immunoprecipitated with OGT (Fig 3D).

Taken together, these data support the notion that Tax regulates O-GlcNAcylation by modulating OGT/OGA interaction, resulting in inhibition of OGA activity in the O-GlcNAcylase complex.



**Fig 3. Tax interacts with the O-GlcNAcylase complex.** (A) HEK-293T cells were co-transfected with Rluc8-Tax and YFP, YFP-OGA or YPET-OGT. BRET experiments were performed 48h after transfection. BRET measurements were started 5 min after the addition of coelenterazine. (B) HEK-293T

cells were co-transfected with YFP-OGA and Rluc8-OGT and either the control or Tax plasmid, and BRET experiments were performed 48h after transfection. Tax-induced increase in BRET is shown in the insert. **(C)** For BRET saturation assays, HEK-293T cells were co-transfected with a constant amount of cDNA coding for Rluc8-OGT (300 ng/well) and increasing amount of cDNA coding for OGA-YFP (10 to 1000 ng/well) and either the control or Tax plasmid. BRET signal, luciferase and fluorescence levels were measured 48h post-transfection. Left panel: A typical BRET saturation experiment is shown. BRET signals were plotted as a function of the ratio of YFP-OGA fluorescence to Rluc8-OGT luminescence. The curves were fitted using non-linear regression equation assuming a single binding site (GraphPad Prism). Right panel: Effect of Tax expression on the BRET50 derived from BRET saturation curves using GraphPad Prism. **(D)** HEK-293T cells were co-transfected with the control or Tax plasmid, Rluc8-OGT, YFP-OGA, or both. After immunoprecipitation with the anti-OGT antibody, the OGA activity present in the immune complex was measured and normalized to the amount of YFP fluorescence recovered in the immune complex. Results are mean  $\pm$  SEM of 3 to 4 independent experiments. Statistical significance was analyzed using the Student's *t* test (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006518.g003>

## Pharmacological inhibition of OGA enhances LTR activation in Tax expressing cells

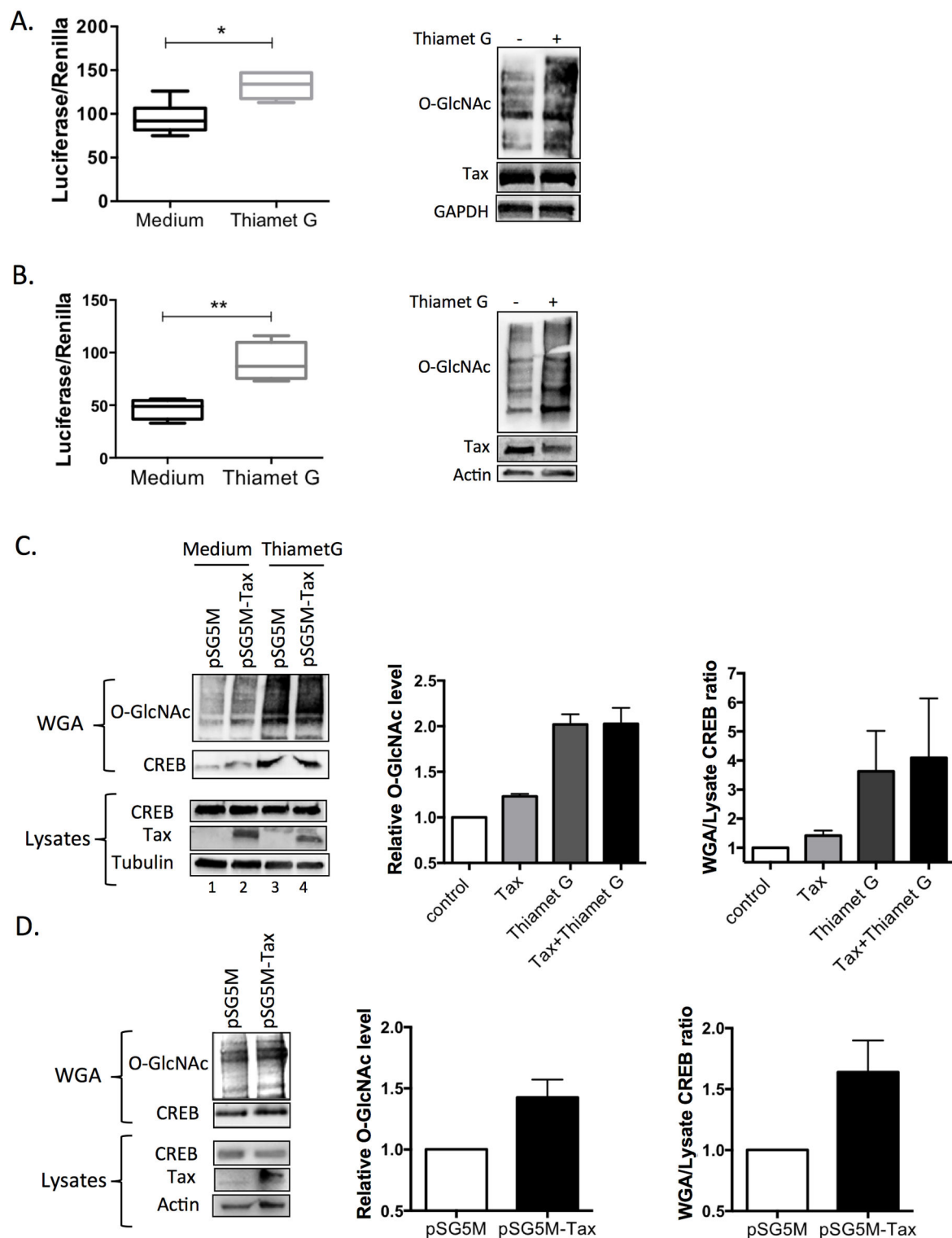
We next studied the impact of increasing O-GlcNAcylation by using the specific OGA inhibitor Thiamet G on the activity of the HTLV-1 LTR in Tax expressing cells. C8166 T cells transfected with the HTLV-1-U3R-Firefly Luciferase construct (U3R-Luc) and the pRL-TK normalisation plasmid were cultured for 2 days with or without Thiamet G. As shown in Fig 4A, increased protein O-GlcNAcylation induced by Thiamet G (right panel) was associated with a significant increased activity of the U3R-Luc reporter construct compared to untreated cells (left panel), while comparable amount of Tax was produced in each condition (right panel). Importantly, similar results were obtained in HEK-293T cells transfected with the Tax plasmid (Fig 4B).

Hence, enhancing O-GlcNAcylation by pharmacological inhibition of OGA, to mimic the effect of Tax on OGA activity, significantly increases Tax-mediated LTR transactivation.

## Tax increases CREB O-GlcNAcylation

Tax activates the viral LTR via the recruitment of CREB, which has been shown previously to be modified by O-GlcNAcylation [20–22]. This raises the hypothesis that the higher level of LTR transactivation upon OGA inhibition was linked to higher O-GlcNAcylation of CREB. To investigate this point, the impact of Tax on CREB O-GlcNAcylation was studied using capture on wheat germ agarose (WGA), as previously described [30]. HEK-293T cells were transfected or not with the Tax plasmid and were also treated or not with Thiamet G. Two-days after transfection, cells were lysed and same amounts of total proteins were incubated with WGA. O-GlcNAcylated proteins captured on WGA were analyzed by western blot using an anti-O-GlcNAc antibody. As expected, Thiamet G treatment dramatically increased the amount of WGA-bound O-GlcNAcylated proteins (Fig 4C left panel, compare lanes 1 and 3 and quantification on middle panel). Expression of Tax in HEK-293T cells also increased the binding of O-GlcNAcylated protein on WGA (Fig 4C, left panel, compare lanes 1 and 2), albeit at a much lower level than in cells treated with 10  $\mu$ M Thiamet G. In agreement with this observation, we found that the inhibitory effect of Tax on OGA enzymatic activity in HEK-293T cells corresponds to the inhibitory effect of a much lower concentration of Thiamet G (0.01  $\mu$ M, S5 Fig). Adding N-acetylglucosamine during incubation of cell lysates with WGA almost completely abolished the anti-O-GlcNAc signal, showing the specificity of the enrichment method (S6 Fig).

Reprobing the membrane with the anti-CREB antibody indicated a massive increase in binding of CREB to WGA upon Thiamet G treatment, confirming CREB as a target of O-GlcNAcylation (Fig 4C, left panel, compare lanes 1 and 3 and quantification on right panel). Expression of Tax also significantly increased CREB retention on WGA, as demonstrated by the higher WGA/lysate ratio for CREB (Fig 4C left panel, compare lanes 1 and 2 and



**Fig 4. Effect of OGA inhibition on LTR activation and CREB O-GlcNAcylation in Tax expressing cells.** (A, B) Effect of OGA inhibition on Tax-mediated LTR transactivation in (A) C8166 T cells or (B) HEK-293T cells. Left panels: Cells were transfected with the U3R-LTR-luciferase and pRL-TK plasmid and in the case of HEK-293T cells, the Tax plasmid, and were incubated or not with the OGA inhibitor Thiamet G for 24h. Luciferase production was then measured using the dual luciferase assay. Results are means  $\pm$  SEM of 4 independent experiments performed in duplicates. Right panels: level of O-GlcNAcylation and Tax expression in each condition. (C) Effect of Tax on CREB O-GlcNAcylation in HEK-293T cells. HEK-293T cells were

transfected with either the control or Tax plasmid and treated or not with the OGA inhibitor Thiamet G. Cell extracts were prepared two days post-transfection. Left panel: total proteins (lysates) or WGA-bound proteins (WGA) were separated by SDS-PAGE and blotted with either an anti-O-GlcNAc or an anti-CREB antibody. Tax expression in cell lysates is also shown. Middle and right panel: Total O-GlcNAc signal (middle panel) or WGA/lysate ratio for CREB signal (right panel) in two independent experiments. (D) Effect of Tax on CREB O-GlcNAcylation in TL-om1 T cells. TL-om1 T cells were transfected with either the control or Tax plasmid. Left panel: Total proteins (lysates) or WGA-bound proteins (WGA) were separated by SDS-PAGE and blotted with either an anti-O-GlcNAc or anti-CREB antibody. Tax expression in cell lysates is also shown. Middle and right panels: Total O-GlcNAc signal (middle panel) or WGA/lysate ratio for CREB signal (right panel) in two independent experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006518.g004>

quantification on right panel) suggesting that Tax may induce CREB O-GlcNAcylation. In contrast, Tax was detected in the lysates but not among WGA-bound proteins, neither in absence or presence of Thiamet G. This suggests that Tax does not induce its own O-GlcNAcylation and is unlikely to be an O-GlcNAcylation target, as it is not retained on WGA even in conditions where a major general increase in protein O-GlcNAcylation is induced by pharmacological inhibition of OGA (S7 Fig).

We also evaluated in TL-om1 cells the effect of Tax on CREB retention on WGA (Fig 4D). Same amounts of total proteins were incubated with WGA. Immunodetection were performed on WGA-bound proteins (WGA) or total proteins (Lysates) with either the anti-O-GlcNAc or anti-CREB antibody. First, we observed that the level of total O-GlcNAcyated proteins retained on WGA was higher in lysates from Tax-transfected than in control cells (Fig 4D, left panel and quantification on middle panel). Importantly, the amount of CREB retained on WGA was also higher in Tax-transfected TL-om1 cells than in control cells (Fig 4D, left panel and quantification on right panel).

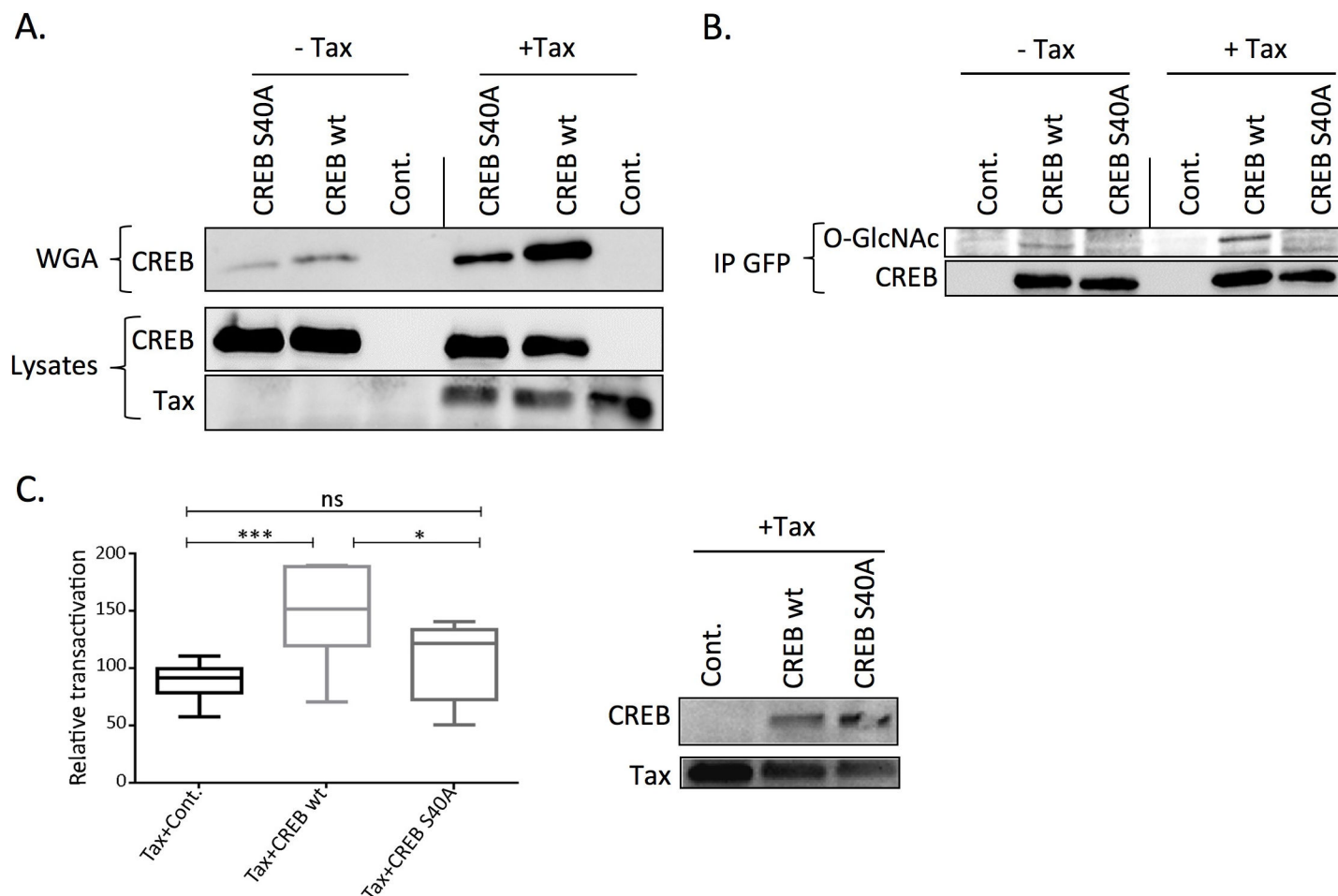
These data strongly suggest that Tax expression is sufficient to enhance CREB O-GlcNAcylation both in T cells and adherent HEK-293T cells.

## Tax-mediated CREB O-GlcNAcylation on Serine 40 facilitates LTR activation

Serine 40 was previously described as a CREB O-GlcNAcylation site [21]. To determine whether Tax induces CREB O-GlcNAcylation on this particular residue, we used YFP-tagged wild-type (wt) and S40A mutant versions of CREB. HEK-293T cells were transfected with Tax and either wt or S40A YFP-tagged CREB and lysed 48 hours post-transfection. After normalization for equivalent amount of YFP-CREB fluorescence, cell lysates were incubated with WGA beads. Western-blotting with the anti-CREB antibody indicated that Tax expression significantly increased the amount of YFP-CREB retained on WGA (Fig 5A). However, residual binding of mutated CREB on WGA suggests that either other O-GlcNAcylation sites still exists on S40A mutant, or that part of this binding occurs through O-GlcNAcylation of some CREB partner.

As a complementary approach, Tax-mediated O-GlcNAcylation of Serine 40 of CREB was analyzed by immunoprecipitation (Fig 5B). Cell lysates from HEK-293T cells transfected or not with Tax and either wt or S40A YFP-tagged CREB were normalized for YFP fluorescence and then immunoprecipitated with an anti-GFP antibody. Western-blotting using the anti-O-GlcNAc antibody revealed that mutation of S40 totally abolished Tax-induced O-GlcNAcylation of CREB, indicating that Serine 40 is indeed the main glycosylation site regulated by Tax. These findings also confirm that WGA binding of CREB mainly depends on O-GlcNAcylation of CREB itself.

We then investigated the effect of expressing either wt or S40A YFP-CREB on Tax-induced LTR transactivation. As expected, transfection of wt YFP-CREB into HEK-293T cells significantly enhanced Tax-mediated transactivation (Fig 5C, left panel). CREB S40A was produced



**Fig 5. Mutation of CREB Serine 40 inhibits both Tax-mediated increase in CREB O-GlcNAcylation and LTR activation.** (A) HEK-293T cells were transfected with the control (- Tax) or Tax plasmid (+ Tax) and either the wild-type (wt) or S40A mutant YFP-CREB construct and lysed 48h post-transfection. The amounts of wt and S40A YFP-CREB in the lysate were evaluated by measuring fluorescence emission at 530 nm after excitation at 480 nm. After normalization for fluorescence, O-GlcNAcylated proteins were captured on wheat germ lectin agarose (WGA) beads. Total proteins (Lysates) or WGA-bound proteins (WGA) were separated by SDS-PAGE and blotted with an anti-CREB antibody. Tax expression in cell lysates is also shown. (B) HEK-293T cells were transfected and cell extracts were normalized as in (A), but wt and mutant YFP-CREB proteins were immunoprecipitated using an anti-GFP antibody. The level of O-GlcNAcylation of wt and S40A YFP-CREB was evaluated using an anti-O-GlcNAc antibody. The membranes were then stripped and reprobed with an anti-CREB antibody. (C) Effect of wt or S40A mutant YFP-CREB on Tax-mediated LTR activation. Left panel: HEK-293T cells were transfected with U3R-LTR-luciferase and pRL-TK plasmids along with Tax and either a control plasmid or the plasmid coding for wt or S40A YFP-CREB. Luciferase production was then measured two days post-transfection using the dual luciferase assay. Results are from 4 independent experiments performed in duplicates. Statistical significance was analyzed using the Tukey's multiple comparison test (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ; ns: not significant). Right panel: levels of Tax and CREB expression in the transactivation experiments.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006518.g005>

at higher level than wt CREB (Fig 5C, right panel), as previously reported [21]. However, despite this higher expression level, significantly less transactivation was found in cells expressing the S40A mutant than in those producing wt CREB (Fig 5C, left panel).

These findings provide direct evidence that CREB O-GlcNAcylation, especially at Serine 40, is involved in Tax-mediated LTR activation.

## O-GlcNAcylation regulates CREB binding to the LTR

Since CREB activity on the HTLV-1 LTR is linked to its recruitment to the vCRE regions, we directly analyzed the impact of increasing O-GlcNAcylation on protein recruitment to the

vCRE LTR sequences by chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments. As CREB phosphorylated at Serine 133 was shown to be preferentially recruited to the vCRE, ChIP experiments were performed using an anti-phospho CREB (Ser 133) and primers specific for the distal U3 vCRE sequence. Thiamet G treatment of C8166 T cells dramatically increased the amount of amplified vCRE products as compared to untreated cells (Fig 6A).

Whether the O-GlcNAcylase complex was also recruited to the vCRE region was finally investigated by ChIP in C8166 T cells. Both anti-OGT and anti-OGA ChIP allowed the amplification of vCRE-specific products to levels significantly higher than the control IgG (Fig 6B). Moreover, very low amplification signals were detected with primers targeting alpha-satellite (alpha-sat) regions, showing the specificity of the anti-OGT and anti-OGA ChIPs. Importantly, similar results were obtained with another HTLV-1-transformed T cell line (MT2, Fig 6C) as well as with HTLV-1-immortalized T cells (CIB, Fig 6D).

Hence, CREB recruitment to the LTR is facilitated by O-GlcNAcylation and the OGT/OGA O-GlcNAcylase complex is recruited to the vCRE sequences of the HTLV-1 LTR.

## Discussion

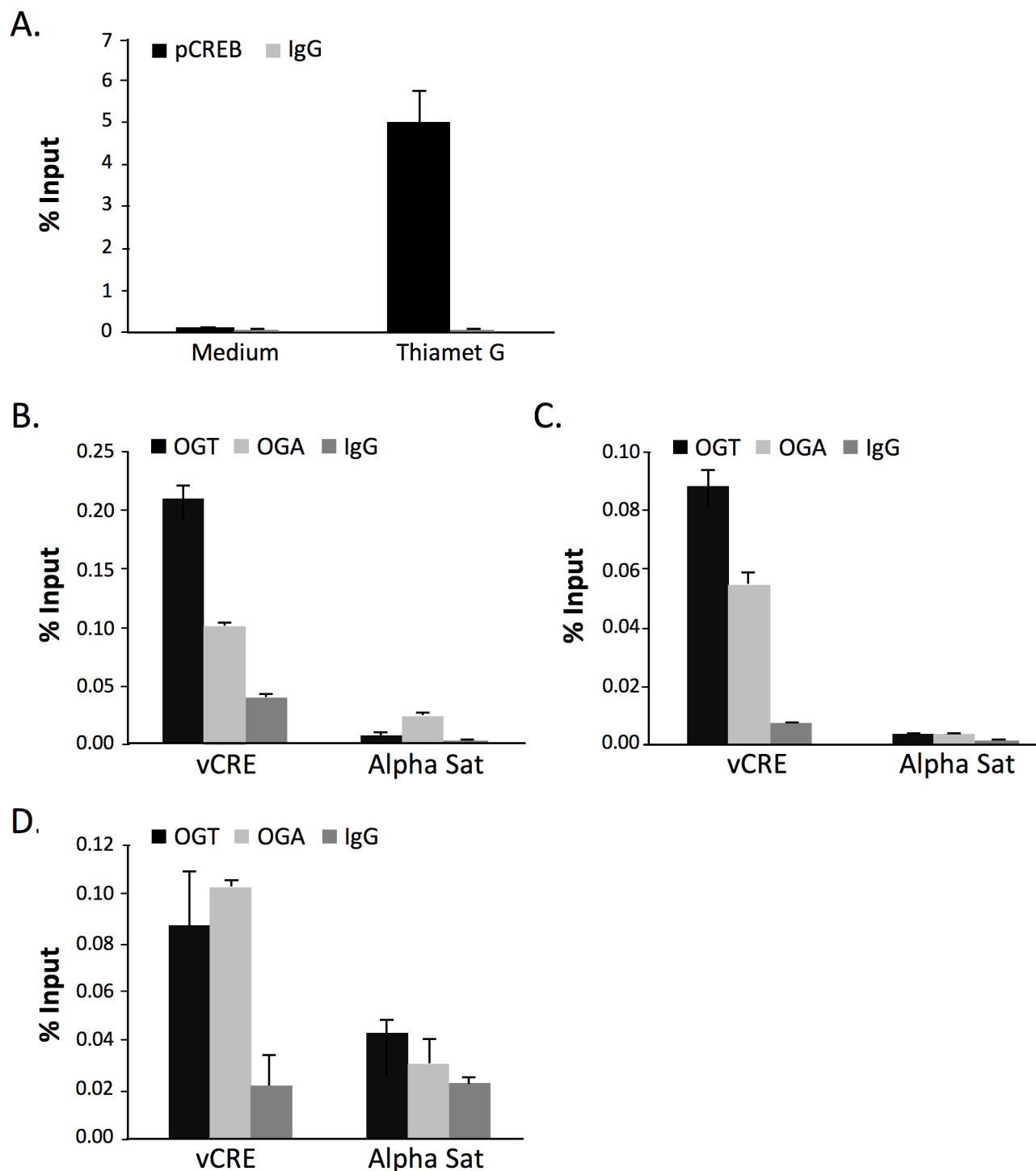
The HTLV-1 Tax oncoprotein is critical for both HTLV-1 expression and HTLV-1-mediated T-cell immortalization. Therefore, the characterization of activators or co-factors responsible for the transactivation of the HTLV-1 5' LTR is an important issue. In this study, we provide the first demonstration that a novel molecular actor, the O-GlcNAcylase complex, interacts with Tax and is recruited to the LTR as a positive co-factor in both HTLV-1 immortalized and transformed T cells.

We first documented that HTLV-1-transformed T cells express higher level of OGA than control transformed T cells but that this coincides with a dramatic reduction in the specific activity of OGA. Furthermore, expressing only Tax was sufficient to inhibit OGA activity (Fig 2A and 2D) and to increase O-GlcNAcylation of a BRET-based biosensor (Fig 2C and 2E) in both Tax-negative HTLV-1-transformed TL-om1 T cells and HTLV-1-negative HEK-293T cells. This suggests that the ability of Tax to inhibit OGA and increase O-GlcNAcylation is independent of HBZ, as this inhibition is observed in HEK-293T cells which do not express any HTLV-1 protein. However, a potential blocking effect of HBZ on Tax-induced inhibition of OGA activity cannot be ruled-out and should be investigated in future studies. The inhibitory effect of Tax appeared to be specific for OGA activity, as OGT enzymatic activity was not affected by Tax transfection (S3 Fig).

Increased OGA expression associated with impaired OGA activity is not unprecedented. Indeed, previous studies reported that pharmacological inhibition of OGA also leads to OGA accumulation, presumably as the result of a regulatory feedback mechanism compensating for loss of enzymatic activity [31, 32]. We propose therefore that the increased OGA expression found in HTLV-1 transformed T cells is an adaptive response, operating through a yet unknown mechanism, to counteract the inhibition of OGA activity by Tax.

Previous studies have indicated that OGA and OGT associate into a molecular assembly denominated O-GlcNAcylase [23]. Using BRET experiments, we found on the one hand that Tax interacts with both OGT and OGA (Fig 3A), and on the other hand, that Tax expression significantly increases the affinity between OGT and OGA (Fig 3C). This was associated with a significant reduction of OGA enzymatic activity in the complex (Fig 3D). Further experiments are needed to unravel the mechanism by which Tax regulates OGA activity within the O-GlcNAcylase complex, resulting in increased protein O-GlcNAcylation.

Our data also provided evidence that an important consequence of Tax-induced OGA inhibition is the higher O-GlcNAcylation of CREB. Indeed, we showed that expressing Tax in



**Fig 6. Effect of O-GlcNAcylation on the HTLV-1 LTR.** (A) Effect of Thiamet G on Ser133 phospho-CREB recruitment to the vCRE LTR region. C8166 T cells were cultured with or without Thiamet G for 48h before chromatin preparation. Chromatin was precipitated with either control IgG or an anti-Ser133 phospho-CREB and recovered DNA was amplified using a pair of primers specific for the vCRE sequence. Results correspond to means  $\pm$  SEM of triplicate determinations obtained in a representative experiment out of 2. (B-D) Detection of OGA or OGT on the vCRE sequence by ChIP in C8166 (B) and MT2 (C) HTLV-1-transformed T cells or in HTLV-1-immortalized CIB T cells (D). Cells were treated as above and chromatin was precipitated using anti-OGT, anti-OGA or control (IgG) antibody. Recovered DNA was amplified using pairs of primers specific for the vCRE sequence or for alpha-satellite sequences as negative control. Results correspond to means  $\pm$  SEM of triplicate determinations obtained in a representative experiment out of 2.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006518.g006>

either HEK-293T cells or TL-om1 T cells significantly increased the amount of WGA-bound CREB (Fig 4C and 4D). Strikingly, higher WGA-bound CREB was also found upon pharmacological inhibition of OGA by Thiamet G, and Tax expression did not further increase CREB binding to WGA in Thiamet G-treated cells (Fig 4C). This confirms that Tax effect on O-GlcNAcylation is mediated by inhibition of OGA, as it is not anymore detectable in cells in which OGA activity is maximally inhibited by the drug. O-GlcNAcylation of CREB was confirmed in experiments showing that CREB binding to WGA was markedly reduced by mutation of Serine 40, a previously identified O-GlcNAcylation site on CREB (Fig 5A). Importantly, the effect of Tax on O-GlcNAcylation of CREB was directly shown by immunoprecipitation of CREB followed by western-blotting using anti-O-GlcNAc antibody (Fig 5B). Moreover, these experiments demonstrated that Tax induced O-GlcNAcylation of wt but not of S40A CREB (Fig 5B).

Regarding the functional impact of CREB O-GlcNAcylation, we found that treating cells with the selective OGA inhibitor Thiamet G increased Tax-mediated LTR transactivation both in C8166 T cells and adherent HEK-293T cells (Fig 4A and 4B). Moreover, Thiamet G treatment strongly enhanced the recruitment of Ser133-phosphorylated CREB to the vCRE region of the LTR (Fig 6A). This finding suggests that CREB O-GlcNAcylation and phosphorylation are not mutually exclusive, in agreement with a previous report [21]. Hence, our results indicate that OGA inhibition upon Tax expression or Thiamet G treatment increases CREB O-GlcNAcylation and thereby its activity on the LTR. In agreement with this hypothesis, we showed that Tax-mediated transactivation was enhanced upon expression of wt CREB but not of O-GlcNAcylation-defective S40A CREB mutant (Fig 5C), directly linking CREB O-GlcNAcylation, notably at Serine 40, and Tax-induced LTR activation. Interestingly, O-GlcNAcylation of CREB at Serine 40 was previously shown to block CREB transcriptional activity in neuronal cells by preventing CREB association with CRTC [21]. In contrast, we report here that CREB S40A is impaired for Tax-mediated transactivation, indicative of an activating role of this O-GlcNAcylation site in our model. This suggests that interaction with CRTC required for CREB function in neuronal cells is not a key determinant in the case of Tax-mediated LTR activation. CRTC/TORC was described as a coactivator of Tax-mediated LTR transactivation [14, 33]. However, Siu and collaborators showed that silencing all three CRTC/TORC family members only partially reduced Tax-mediated LTR activation [14], indicating that Tax can still activate the LTR without CRTC/TORC. Moreover, ATF4/CREB2, which does not need CRTC as coactivator [14], is able to activate the LTR in presence of Tax [34, 35]. Hence, depending of the promoter context, CREB O-GlcNAcylation at Serine 40 may mediate either activating or repressive functions. Interestingly, such opposite effect of O-GlcNAcylation has previously been reported for other transcription factors, notably RelA and Sp1 [19, 36–40].

OGT is now considered as an epigenetic regulator by virtue of its capacity to add O-GlcNAcylation on epifactors and histones (reviewed in [26, 41]). Consequently, OGT binding to promoters has been described [42]. We show here that not only OGT but also OGA are recruited to the vCRE region of the HTLV-1 LTR, suggesting the presence of the O-GlcNAcylase complex at the promoter and its involvement in HTLV-1 gene regulation. Our data therefore support a model in which, *via* the deposition of the O-GlcNAcylase complex onto the vCRE region, Tax facilitates the O-GlcNAcylation of CREB and possibly other transcription factors and co-factors while concomitantly modulating local chromatin architecture. This ultimately increases promoter activation, as documented here by the positive effect of OGA inhibition on the transactivation by Tax of the HTLV-1-U3R-Luc reporter construct. Importantly, recruitment of OGT and OGA to the 5'LTR was found in both HTLV-1-immortalized primary T cell and HTLV-1-transformed T cell lines. This provides the notion that the O-GlcNAcylase complex may play a key role in both HTLV-1-replication *in vivo* and HTLV-1-induced pathologies.

Only few studies have investigated the impact of O-GlcNAcylation on virus transcription. It has been shown that enhancing O-GlcNAcylation inhibits the expression of human immunodeficiency virus type 1 or herpes virus simplex [43, 44]. In these cases, the effect was linked to the modification of transcriptional regulators, Sp1 and HCF-1 respectively, involved in virus expression. Our data showing that O-GlcNAcylation increases the transactivation of the HTLV-1 LTR provide therefore the first example of a positive impact of the O-GlcNAcylation machinery on viral transcription via the recruitment of the O-GlcNAcylase complex to the viral promoter.

## Materials and methods

### Cells and transfections

HEK-293T cells (American Type Culture Collection CRL-3216) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum (Dutcher, S1402851810) and with 2 mM glutamine, 1 mM pyruvate and antibiotics (Invitrogen) and were transfected using the Eugene 6 reagent (Invitrogen). The non-infected CD4<sup>+</sup> T-cell lines Jurkat (kindly provided by Dr. Schwartz, Institut Pasteur, Paris, France), Molt4 (American Type Culture Collection CRL-1582), CEM (American Type Culture Collection CRL-1992) and HUT-78 (American Type Culture Collection TIB-161) and the HTLV-1-transformed CD4<sup>+</sup> T-cell lines C8166 and MT2 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, USA) and TL-om1 (kindly provided by Dr. Harhaj, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, USA) were grown in RPMI 1640 medium containing 25mM glucose and supplemented as above but with the addition of 20 mM HEPES and 5mL of 100X non-essential aminoacid solution (Invitrogen). TL-om1 T cells were transfected by nucleofection using the cell line nucleofector kit V (Lonza, France) and the program O-017. The HTLV-1-immortalized CIB T cells described in [45] were generated from peripheral blood mononuclear cells of a TSP/HAM patient. These cells were grown in supplemented RPMI medium in the presence of 50U/ml of IL-2 (Roche, France).

### Plasmids

The pSG5M empty vector, pSG5M-Tax and pRL-TK plasmids have been described elsewhere [46]. The U3R-Luc construct described in [47] was kindly provided by Dr. A. Kress (Erlangen, Germany). The YFP-CREB wild-type plasmid was kindly provided by Prof. Montminy (La Jolla, USA). YFP-CREB S40A was generated by PCR-mediated mutagenesis using the following primers: Fw: TGCCACATTAGCCCAGGTAGCCATGCCAGCAGCTCATG and Rev: CATGAGCTGCTGGCATGGcTACCTGGGCTAATGTGGCA and the presence of the mutation was verified by sequencing. The pcDNA3Rluc8 plasmid was a kind gift of Prof. Gambhir [48]. The pcDNA3.1 Rluc8-Tax plasmid was generated following PCR amplification of the Tax sequence from the pSG5M-Tax vector using primers creating NheI restriction sites at both extremities of Tax cDNA (forward: GGCGCTAGCCACCATGGCCCACTTCCCAGGG; reverse: GCCGCTAGCTCCGA-CTTCTGTTTCTCGGAAATG). The PCR product was then inserted into the pcDNA3.1 RLuc8 after NheI digestion. YFP-OGA has been described previously [30]. Rluc8-OGT was generated by inserting OGT coding sequence [49] into the pcDNA3.1 Rluc8 vector after HindIII/ BamHI digestion. YPet-OGT was obtained by insertion of cDNA OGT sequence into YPet-pcDNA3 vector after digestion with EcoRV-ApaI.

To monitor O-GlcNAcylation in living cells, we developed a BRET-biosensor based on the previously described FRET OS2-O-GlcNAc biosensor [27] by replacing the CFP by an Rluc8 sequence. The BRET biosensor is composed of Rluc8 fused to the fimbrial adhesin lectin domain GafD, a known OGT substrate peptide derived from casein kinase II placed between

two flexible linkers (GGSGG) followed by a variant of the yellow fluorescent protein Venus ([Fig 2B](#)).

## Antibodies and reagents

Tax was detected using sera from HTLV-1 infected individuals (kindly provided by Dr Ges-sain, Institut Pasteur, Paris, France) or the anti-Tax monoclonal antibody (mab) 168-A51 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, USA). The following primary anti-bodies were used: anti-GFP recognizing GFP as well as the YFP and YPET variants (Roche Applied Science), anti-OGT (Sigma, DM-17 06264), anti-OGA (Santa Cruz, sc135093 or Sigma, SAB4200311), anti-O-GlcNAc (Abcam, RL2), anti-CREB (Millipore, CS 203204), anti-phospho CREB ser133 (Millipore, CS 204400), anti-actin (Santa Cruz, sc1616), anti-tubulin (GeneTex, GT114) and GAPDH (Santa Cruz, sc32233). HRP-conjugated anti-human, anti-mouse and anti-rabbit IgG (Promega) were used as secondary antibodies. Thiamet G (Sigma, SML 0244) was used at 10 $\mu$ M concentration.

## Luciferase assays

C8166 T cells (2x10<sup>6</sup>/12 well in duplicates) were cotransfected by nucleofection with 700 ng of the U3R-Luc reporter plasmid and 200 ng of the Renilla reporter plasmid pRL-TK. 293T cells seeded in duplicates in 24-well (3x10<sup>4</sup>/well) were co-transfected with 500 ng of the U3R-Luc plasmid and 50 ng of pRL-TK, and with 500 ng of the control or the Tax plasmids with or without 200 ng of the YFP-CREB constructs. Luciferase activity was determined using the Dual Luciferase Assay System (Promega) and values were normalized with Renilla activity.

## Cell lysis, immunoprecipitation, wheat germ lectin precipitation and immunoblot

Cells were lysed in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH8, 1% NP40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS and 150 mM NaCl) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Roche). Immunoprecipitations were carried out as follow: cell lysates were incubated overnight with primary antibodies at 4°C, and antibody complexes were captured on protein G-sepharose beads (GE Healthcare) 1h at 4°C. Sepharose beads were then washed 5 times in washing buffer (120 mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH8, 0.2 mM NaF, 0.2 mM EGTA, 0.2% deoxycholate, 0.5% NP40) before elution in Laemmli buffer. O-GlcNAcylated proteins were precipitated on 40  $\mu$ L of WGL-agarose (WGA) beads (Vector Laboratories, Paris, France) for 2h at 4°C. WGA beads were then washed 5 times in washing buffer and captured proteins then eluted in Laemmli buffer as described in [\[50\]](#). In some experiments, N-acetylglucosamine (500 mM) was added during incubation with WGA beads as a control for non-specific binding of protein to WGA. Immunoprecipitated, WGA-precipitated proteins, and total cell lysates were separated by SDS-PAGE, transferred to membranes and blotted with specific antibodies.

## RNA extraction and qRT-PCR

Total RNAs were prepared with the Nucleospin RNAII kit (Macherey Nagel, France) and 1 $\mu$ g of RNA was reverse transcribed using the Maxima first strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific, France), according to the manufacturer's procedure. Real-time-PCR was performed in the Lightcycler 2.0 (Roche, France) on 10 ng of reverse transcribed RNA using the following primers: OGT (forward: GCCCTGGGTCGCTTGAAGA, reverse: TGC CAC AGC TCT GTCAAAAA), OGA (forward: TCTGCGGTGTGGTGAAGGA, reverse: TGGGGTTAGA AAAAGTGATA) and the housekeeping gene HPRT (forward: 5'TGACACTGGCAAAACA

ATGCA3', reverse: 5'GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT3') for normalization. PCR was conducted using the Sybr Green method with the following conditions: a first step of denaturation at 95°C for 8 min, followed by 40 cycles of denaturation (95°C for 10 sec), annealing (60°C for 10 sec), and extension (72°C for 8 sec) and a final step of melting curve (95°C for 5 sec, then 65°C for 15 sec. and finally 95°C for 10 sec).

## CHIP experiments

Before the experiment, 10<sup>7</sup> C8166, MT2 or CIB cells were crosslinked using first 0,08% Disuccinimidylglutarate (SantaCruz Biotechnologies) during 30 min at room temperature and 1% Formaldehyde (Electron Microscopy Sciences) for 10 minutes at room temperature. Chromatin was then sheared using a Bioruptor Pico sonicator to obtain fragments of around 300 bp. Ten µg of chromatin were used for each condition. ChIP experiments were performed using the ChIP-IT high sensitivity kit from active motif. Primer pairs that specifically amplify the distal vCRE (position 201–275: Forward 5'ATCATAAGCTCAGACCTCCGGGAA3', reverse 5'CCTGAGGACGGCTTGACAAACAT3') were used for PCR.

## BRET measurements

HEK-293T cells were transfected in 12 well plates as described previously [51] using 300 ng of each cDNA construct, unless otherwise stated in the figure legend. One day after transfection, cells were transferred into 96-well microplate, and BRET measurements were carried out on the following day. TL-om1 T cells were transfected by nucleofection in 12 well plates. On the following day, cells were distributed into 96 well microplate and BRET measurements were performed.

For BRET measurements, cells were pre-incubated for 5 min in PBS in the presence of 5 µM coelenterazine. Light-emission acquisition at 485 nm and 530 nm was then started, and signal acquisition was performed every minute during 20–30 min using TECAN Infinite F200 Pro apparatus. BRET signal was expressed in milliBRET units (mBU). The BRET unit has been defined previously as the ratio 530 nm/485 nm obtained when the two partners are present, corrected by the ratio 530 nm/485 nm obtained under the same experimental conditions, when only the partner fused to Renilla luciferase is present in the assay [52]. Each measurement corresponded to the signal emitted by the whole population of cells present in a well (i.e., approximately 4x10<sup>4</sup> HEK 293 cells or 10<sup>6</sup> TL-om1 T cells).

## OGA and OGT activities

OGA activity was measured using 4-methylumbellifery-N-acetylβ-D-glucosamine (MU-GlcNAc, Sigma), which is converted into fluorescent 4-methylumbelliferon upon hydrolysis by OGA and other hexosaminidase [53]. 4-methylumbelliferon fluorescence was measured at 448 nm after excitation at 362 nm after 30 min and 60 min incubation at 37°C, to ensure that the determination was performed during the linear phase of the reaction. To determine the concentration of 4-methylumbelliferon, a standard curve was performed in each experiment using commercial 4-methylumbelliferon (Sigma). To specifically determine OGA activity versus other glycosydases, all reactions were performed in absence or presence of the highly specific OGA inhibitor Thiamet G. The difference of the fluorescent signal obtained in absence and presence of Thiamet G reflected the amount of 4-methylumbelliferon produced by OGA.

To measure OGT activity, OGT was immunoprecipitated using an anti-OGT antibody (Sigma-Aldrich) for 2h at 4°C. Precipitation was performed by incubating 50µL equilibrated protein G-sepharose beads (GE Healthcare) for 30 min at 4°C. After 3 washes, the precipitated proteins were submitted to an additional wash in OGT assay buffer containing 50 mM Tris-

HCl and 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH7.5 and 1μM Thiamet G. OGT assay was then performed on protein-G sepharose bound OGT using the bioluminescent UDP-GloTM glycosyltransferase assay (Promega) exactly as described in the manufacturer instructions [54].

## Ethics statement

The use of peripheral blood mononuclear cells from patient CIB was approved by the French Comité Consultatif de Protection des Personnes dans la Recherche Biomédicale (CCPPRB) and the patient provided a written informed consent.

## Supporting information

**S1 Fig. Effect of T-cell activation on the expression of OGT and OGA transcripts.** Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from 2 different donors were stimulated with phytohemagglutinin (1 μg/mL) in the presence of interleukin 2 (50 U/mL) and cultured for 3 days. The levels of OGT and OGA transcripts were then quantified by RT-qPCR and normalized to the level of the housekeeping gene HPRT. Results are the means of triplicates determination for each donor.

(PDF)

**S2 Fig. Linear relationship between the amount of OGA quantified by western-blot and the level of OGA activity measured by the fluorescent assay.** HEK-293T cells were lysed and protein concentration in the lysate was determined. Increasing amounts of total proteins were loaded on a SDS-PAGE for evaluation of OGA expression level by western-blotting using an anti-OGA antibody. In parallel, OGA activity was measured using the 4-methylumbelliferyl-N-acetylβ-D-glucosamine fluorescent assay. The signal obtained by densitometric analysis of the 130 kDa band was plotted against OGA activity and analysed using Pearson correlation analysis.

(PDF)

**S3 Fig. Tax expression does not affect OGT activity in HEK-293T cells.** HEK-293T cells were transfected with either the Tax or control plasmid. 48h after transfection, cells were lysed and OGT was immunoprecipitated using an anti-OGT antibody. The enzymatic activity was measured on OGT bound to protein-G sepharose using the bioluminescent UDP-GloTM glycosyltransferase assay (Promega). Results are the mean ± SEM of 3 independent experiments and are expressed as fold effect of the control condition (pSG5M transfected cells). Statistical analysis was performed using a t test for unpaired values (ns: not significant).

(PDF)

**S4 Fig. Expression of the proteins used in the BRET assay.** HEK-293T cells plated in 12-well plates were co-transfected with Rluc8-Tax and either YFP-OGA or YPET-OGT. Protein expression was analyzed by western blot 48h after transfection. Proteins were detected using an anti-Tax or anti-GFP (which also recognizes the YFP or YPET variants) antibody. Given the molecular weight of Tax (40 kDa), Rluc8 (37 kDa), YFP/YPET (27 kDa), OGA (130 kDa) and OGT (110 kDa) the expected molecular weight of Rluc8-Tax, YFP-OGA or YPET-OGT are 77 kDa, 157 kDa and 137 kDa, respectively.

(PDF)

**S5 Fig. Comparison of OGA inhibition by Thiamet G and by Tax expression in HEK 293 T cells.** To compare the potency of Tax inhibition to that of Thiamet G, a dose-response of Thiamet G effect on OGA activity was performed. OGA assay was performed as described in the method section using HEK 293-T cell lysates (30 μg of proteins), in absence or presence of

increasing concentrations of Thiamet G. For comparison of these data with the effect of Tax on OGA activity in HEK-293T (shown in Fig 2D), basal OGA activities in the two experiments were set at 100%. The inhibitory effect obtained with Tax transfection on OGA activity measured on the same amount of protein lysate was similar to the inhibitory effect obtained with 0.01  $\mu$ M Thiamet G (about 60% of residual activity).

(PDF)

**S6 Fig. N-acetylglucosamine blocks binding of O-GlcNAcylated proteins to WGA.** HEK-293T cells were transfected with either the control or Tax plasmid and treated or not with Thiamet G and cell extracts were prepared two days post-transfection. Cell lysates were incubated with WGA beads in presence or absence of 500 mM of N-acetylglucosamine (which competes with O-GlcNAcylated proteins for WGA binding). Proteins were then separated by SDS-PAGE and blotted with an anti-O-GlcNAc specific antibody (RL2).

(PDF)

**S7 Fig. Tax is not detected among WGA-bound proteins in transfected HEK-293T cells.**

HEK-293T cells were transfected with either the control or Tax plasmid and treated or not with Thiamet G, and cell extracts were prepared two days post-transfection. O-GlcNAcylated proteins were purified via binding to wheat germ lectin agarose beads (WGA), separated by SDS-PAGE and blotted with either an anti-O-GlcNAc or anti-Tax antibody. Tax could be readily detected in lysates from Tax transfected cells while it is not detectable in WGA eluates.

(PDF)

## Acknowledgments

We thank the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH, for the C8166 and MT2 transformed T-cell lines and the anti-Tax mab, S.S Gambhir for the Rluc8 cDNA, L.K. Mahal for the OS2-O-GlcNAc biosensor cDNA and E. Harhaj for the TL-om1 T cells. We thank Camille Kostmann for some of the experiments presented as supplementary material.

This work was performed within the Département Hospitalo-Universitaire AUTOimmune and HORMonal diseases (AUTHORS).

## Author Contributions

**Conceptualization:** Damien Groussaud, Mostafa Khair, Laurence Benit, Claudine Pique, Tarik Issad.

**Funding acquisition:** Claudine Pique, Tarik Issad.

**Investigation:** Damien Groussaud, Mostafa Khair, Armelle I. Tollenaere, Laetitia Waast, Mei-Shiue Kuo, Marianne Mangeney, Christophe Martella, Yann Fardini, Solène Coste, Mouloud Souidi, Claudine Pique, Tarik Issad.

**Supervision:** Claudine Pique, Tarik Issad.

**Validation:** Damien Groussaud, Mostafa Khair, Armelle I. Tollenaere, Laetitia Waast, Mei-Shiue Kuo, Marianne Mangeney, Laurence Benit, Claudine Pique, Tarik Issad.

**Writing – original draft:** Claudine Pique, Tarik Issad.

**Writing – review & editing:** Claudine Pique, Tarik Issad.

## References

1. Gessain A, Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol.* 2012; 3: 388. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00388> PMID: [23162541](#)
2. Martin F, Taylor GP, Jacobson S. Inflammatory manifestations of HTLV-1 and their therapeutic options. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014; 10: 1531–1546. <https://doi.org/10.1586/1744666X.2014.966690> PMID: [25340428](#)
3. Curren R, Van Duyne R, Jaworski E, Guendel I, Sampey G, Das R, et al. HTLV tax: a fascinating multi-functional co-regulator of viral and cellular pathways. *Front Microbiol.* 2012; 3: 406. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00406> PMID: [23226145](#)
4. Bellon M, Baydoun HH, Yao Y, Nicot C. HTLV-I Tax-dependent and -independent events associated with immortalization of human primary T lymphocytes. *Blood.* 2010; 115: 2441–2448. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-241117> PMID: [20093405](#)
5. Hasegawa H, Sawa H, Lewis MJ, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, et al. Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat Med.* 2006; 12: 466–472. <https://doi.org/10.1038/nm1389> PMID: [16550188](#)
6. Barbeau B, Mesnard JM. Making sense out of antisense transcription in human T-cell lymphotropic viruses (HTLVs). *Viruses.* 2011; 3: 456–468. <https://doi.org/10.3390/v3050456> PMID: [21994742](#)
7. Naqvi S, Martin KJ, Arthur JS. CREB phosphorylation at Ser133 regulates transcription via distinct mechanisms downstream of cAMP and MAPK signalling. *Biochem J.* 2014; 458: 469–479. <https://doi.org/10.1042/BJ20131115> PMID: [24438093](#)
8. Parker D, Ferreri K, Nakajima T, LaMorte VJ, Evans R, Koerber SC, et al. Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. *Mol Cell Biol.* 1996; 16: 694–703. PMID: [8552098](#)
9. Anderson MG, Dynan WS. Quantitative studies of the effect of HTLV-I Tax protein on CREB protein—DNA binding. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22: 3194–3201. PMID: [8065935](#)
10. Kwok RP, Laurance ME, Lundblad JR, Goldman PS, Shih H, Connor LM, et al. Control of cAMP-regulated enhancers by the viral transactivator Tax through CREB and the co-activator CBP. *Nature.* 1996; 380: 642–646. <https://doi.org/10.1038/380642a0> PMID: [8602268](#)
11. Geiger TR, Sharma N, Kim YM, Nyborg JK. The human T-cell leukemia virus type 1 tax protein confers CBP/p300 recruitment and transcriptional activation properties to phosphorylated CREB. *Mol Cell Biol.* 2008; 28: 1383–1392. <https://doi.org/10.1128/MCB.01657-07> PMID: [18070920](#)
12. Kim YM, Ramirez JA, Mick JE, Giebler HA, Yan JP, Nyborg JK. Molecular characterization of the Tax-containing HTLV-1 enhancer complex reveals a prominent role for CREB phosphorylation in Tax transactivation. *J Biol Chem.* 2007; 282: 18750–18757. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700391200> PMID: [17449469](#)
13. Kim YM, Geiger TR, Egan DI, Sharma N, Nyborg JK. The HTLV-1 tax protein cooperates with phosphorylated CREB, TORC2 and p300 to activate CRE-dependent cyclin D1 transcription. *Oncogene.* 2010; 29: 2142–2152. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.498> PMID: [20101207](#)
14. Siu YT, Chin KT, Siu KL, Yee Wai Choy E, Jeang KT, Jin DY. TORC1 and TORC2 coactivators are required for tax activation of the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeats. *J Virol.* 2006; 80: 7052–7059. <https://doi.org/10.1128/JVI.00103-06> PMID: [16809310](#)
15. Georges SA, Giebler HA, Cole PA, Luger K, Laybourn PJ, Nyborg JK. Tax recruitment of CBP/p300, via the KIX domain, reveals a potent requirement for acetyltransferase activity that is chromatin dependent and histone tail independent. *Mol Cell Biol.* 2003; 23: 3392–3404. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.10.3392-3404.2003> PMID: [12724399](#)
16. Harrod R, Kuo YL, Tang Y, Yao Y, Vassilev A, Nakatani Y, et al. p300 and p300/cAMP-responsive element-binding protein associated factor interact with human T-cell lymphotropic virus type-1 Tax in a multi-histone acetyltransferase/activator-enhancer complex. *J Biol Chem.* 2000; 275: 11852–11857. PMID: [10766811](#)
17. Nyborg JK, Egan D, Sharma N. The HTLV-1 Tax protein: revealing mechanisms of transcriptional activation through histone acetylation and nucleosome disassembly. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1799: 266–274. <https://doi.org/10.1016/j.bbaggm.2009.09.002> PMID: [19782779](#)
18. Hart GW, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature.* 2007; 446: 1017–1022. <https://doi.org/10.1038/nature05815> PMID: [17460662](#)
19. Issad T, Kuo M. O-GlcNAc modification of transcription factors, glucose sensing and glucotoxicity. *Trends Endocrinol Metab.* 2008; 19: 380–389. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.09.001> PMID: [18929495](#)

20. Lamarre-Vincent N, Hsieh-Wilson LC. Dynamic glycosylation of the transcription factor CREB: a potential role in gene regulation. *J Am Chem Soc.* 2003; 125: 6612–6613. <https://doi.org/10.1021/ja028200t> PMID: [12769553](#)
21. Rexach JE, Rogers CJ, Yu SH, Tao J, Sun YE, Hsieh-Wilson LC. Quantification of O-glycosylation stoichiometry and dynamics using resolvable mass tags. *Nat Chem Biol.* 2010; 6: 645–651. <https://doi.org/10.1038/nchembio.412> PMID: [20657584](#)
22. Rexach JE, Clark PM, Mason DE, Neve RL, Peters EC, Hsieh-Wilson LC. Dynamic O-GlcNAc modification regulates CREB-mediated gene expression and memory formation. *Nat Chem Biol.* 2012; 8: 253–261. <https://doi.org/10.1038/nchembio.770> PMID: [22267118](#)
23. Whisenhunt TR, Yang X, Bowe DB, Paterson AJ, Van Tine BA, Kudlow JE. Disrupting the enzyme complex regulating O-GlcNAcylation blocks signaling and development. *Glycobiology.* 2006; 16: 551–563. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwj096> PMID: [16505006](#)
24. Fardini Y, Dehennaut V, Lefebvre T, Issad T. O-GlcNAcylation: A New Cancer Hallmark? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013; 4: 99.
25. Kanwal S, Fardini Y, Pagesy P, N'Tumba-Byn T, Pierre-Eugène C, Masson E, et al. O-GlcNAcylation-inducing treatments inhibit estrogen receptor  $\alpha$  expression and confer resistance to 4-OH-Tamoxifen in human breast cancer-derived MCF-7 cells. *PloS one.* 2013; 8(7): e69150: 9539–9544. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069150> PMID: [23935944](#)
26. Gambetta MC, Muller J. A critical perspective of the diverse roles of O-GlcNAc transferase in chromatin. *Chromosoma.* 2015; 124: 429–442. <https://doi.org/10.1007/s00412-015-0513-1> PMID: [25894967](#)
27. Carrillo LD, Froemming JA, Mahal LK. Targeted in vivo O-GlcNAc sensors reveal discrete compartment-specific dynamics during signal transduction. *J Biol Chem.* 2011; 286: 6650–6658. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.191627> PMID: [21138847](#)
28. Nouaille S, Blanquart C, Zilberfarb V, Boute N, Perdureau D, Burnol AF, et al. Interaction between the insulin receptor and Grb14: a dynamic study in living cells using BRET. *Biochem Pharmacol.* 2006; 72: 1355–1366. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.07.018> PMID: [16934761](#)
29. Lacasa D, Boute N, Issad T. Interaction of the insulin receptor with the receptor-like protein tyrosine phosphatases PTPalpha and PTPepsilon in living cells. *Mol Pharmacol.* 2005; 67: 1206–1213. <https://doi.org/10.1124/mol.104.009514> PMID: [15630078](#)
30. Fardini Y, Masson E, Boudah O, Ben Jouira R, Cosson C, Pierre-Eugene C, et al. O-GlcNAcylation of FoxO1 in pancreatic beta cells promotes Akt inhibition through an IGFBP1-mediated autocrine mechanism. *Faseb J.* 2014; 28: 1010–1021. <https://doi.org/10.1096/fj.13-238378> PMID: [24174424](#)
31. Slawson C, Zachara NE, Vosseller K, Cheung WD, Lane MD, Hart GW. Perturbations in O-linked beta-N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *J Biol Chem.* 2005; 280: 32944–32956. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503396200> PMID: [16027160](#)
32. Zhang Z, Tan EP, VandenHull NJ, Peterson KR, Slawson C. O-GlcNAcase Expression is Sensitive to Changes in O-GlcNAc Homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014; 5: 206.
33. Jiang S, Inada T, Tanaka M, Furuta RA, Shingu K, Fujisawa J. Involvement of TORC2, a CREB co-activator, in the in vivo-specific transcriptional control of HTLV-1. *Retrovirology.* 2009; 6: 73. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-6-73> PMID: [19664292](#)
34. Reddy TR, Tang H, Li X, Wong-Staal F. Functional interaction of the HTLV-1 transactivator Tax with activating transcription factor-4 (ATF4). *Oncogene.* 1997; 14: 2785–2792. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201119> PMID: [9190894](#)
35. Gachon F, Devaux C, Mesnard JM. Activation of HTLV-I transcription in the presence of Tax is independent of the acetylation of CREB-2 (ATF-4). *Virology.* 2002; 299: 271–278. PMID: [12202230](#)
36. Ma Z, Vocadlo DJ, Vosseller K. Hyper-O-GlcNAcylation Is Anti-apoptotic and Maintains Constitutive NF-kappaB Activity in Pancreatic Cancer Cells. *J Biol Chem.* 2013; 288: 15121–15130. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.470047> PMID: [23592772](#)
37. Xing D, Gong K, Feng W, Nozell SE, Chen YF, Chatham JC, et al. O-GlcNAc modification of NF-kappaB p65 inhibits TNF-alpha-induced inflammatory mediator expression in rat aortic smooth muscle cells. *PloS one.* 2011; 6: e24021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024021> PMID: [21904602](#)
38. Baudoin L, Issad T. O-GlcNAcylation and Inflammation: A Vast Territory to Explore. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2015; 5: 235.
39. Yang X, Su K, Roos MD, Chang Q, Paterson AJ, Kudlow JE. O-linkage of N-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98: 6611–6616. <https://doi.org/10.1073/pnas.111099998> PMID: [11371615](#)
40. Goldberg HJ, Whiteside CI, Hart GW, Fantus IG. Posttranslational, reversible O-glycosylation is stimulated by high glucose and mediates plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and Sp1

- transcriptional activity in glomerular mesangial cells. *Endocrinology*. 2006; 147: 222–231. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0523> PMID: 16365142
41. Dehennaut V, Leprince D, Lefebvre T. O-GlcNAcylation, an Epigenetic Mark. Focus on the Histone Code, TET Family Proteins, and Polycomb Group Proteins. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014; 5: 155.
  42. Allison DF, Wamsley JJ, Kumar M, Li D, Gray LG, Hart GW, et al. Modification of RelA by O-linked N-acetylglucosamine links glucose metabolism to NF-kappaB acetylation and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109: 16888–16893. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208468109> PMID: 23027940
  43. Daou S, Mashtalir N, Hammond-Martel I, Pak H, Yu H, Sui G, et al. Crosstalk between O-GlcNAcylation and proteolytic cleavage regulates the host cell factor-1 maturation pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011; 108: 2747–2752. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013822108> PMID: 21285374
  44. Jochmann R, Thureau M, Jung S, Hofmann C, Naschberger E, Kremmer E, et al. O-linked N-acetylglucosaminylation of Sp1 inhibits the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *J Virol*. 2009; 83: 3704–3718. <https://doi.org/10.1128/JVI.01384-08> PMID: 19193796
  45. Ozden S, Cochet M, Mikol J, Teixeira A, Gessain A, Pique C. Direct evidence for a chronic CD8+-T-cell-mediated immune reaction to tax within the muscle of a human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1-infected patient with sporadic inclusion body myositis. *J Virol*. 2004; 78: 10320–10327. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10320-10327.2004> PMID: 15367598
  46. Nasr R, Chiari E, El-Sabban M, Mahieux R, Kfoury Y, Abdulhay M, et al. Tax ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of NF-kappaB activation. *Blood*. 2006; 107: 4021–4029. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3572> PMID: 16424386
  47. Gross C, Wiesmann V, Millen S, Kalmer M, Wittenberg T, Gettemans J, et al. The Tax-Inducible Actin-Bundling Protein Fascin Is Crucial for Release and Cell-to-Cell Transmission of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1). *PLoS pathogens*. 2016; 12: e1005916. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005916> PMID: 27776189
  48. De A, Loening AM, Gambhir SS. An improved bioluminescence resonance energy transfer strategy for imaging intracellular events in single cells and living subjects. *Cancer Res*. 2007; 67: 7175–7183. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4623> PMID: 17671185
  49. Kuo M, Zilberfarb V, Gangneux N, Christeff N, Issad T. O-glycosylation of FoxO1 increases its transcriptional activity towards the glucose 6-phosphatase gene. *FEBS Lett*. 2008; 582: 829–834. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.02.010> PMID: 18280254
  50. Issad T, Combettes M, Ferre P. Isoproterenol inhibits insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of the insulin receptor without increasing its serine/threonine phosphorylation. *Eur J Biochem*. 1995; 234: 108–115. PMID: 8529629
  51. Blanquart C, Achi J, Issad T. Characterization of IRA/IRB hybrid insulin receptors using bioluminescence resonance energy transfer. *Biochem Pharmacol*. 2008; 76: 873–883. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.07.027> PMID: 18718450
  52. Pierre-Eugene C, Pagesy P, Nguyen TT, Neuillé M, Tschank G, Tennagels N, et al. Effect of insulin analogues on Insulin/IGF1 hybrid receptors: Increased activation by glargine but not by its metabolites M1 and M2. *PloS one*. 2012; 7(7): e41992. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041992> PMID: 22848683
  53. Kim EJ, Kang DO, Love DC, Hanover JA. Enzymatic characterization of O-GlcNAcase isoforms using a fluorogenic GlcNAc substrate. *Carbohydr Res*. 2006; 341: 971–982. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2006.03.004> PMID: 16584714
  54. Rodriguez AC, Yu SH, Li B, Zegzouti H, Kohler JJ. Enhanced transfer of a photocross-linking N-acetylglucosamine (GlcNAc) analog by an O-GlcNAc transferase mutant with converted substrate specificity. *J Biol Chem*. 2015; 290: 22638–22648. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.667006> PMID: 26240142