



HAL
open science

Implication de la protéine Cep63 dans les altérations centrosomales induites par l'oncoprotéine Tax du rétrovirus HTLV-1 au cours de l'oncogénèse viro-induite

Janelle Gauthier

► **To cite this version:**

Janelle Gauthier. Implication de la protéine Cep63 dans les altérations centrosomales induites par l'oncoprotéine Tax du rétrovirus HTLV-1 au cours de l'oncogénèse viro-induite. Microbiologie et Parasitologie. Université de Lyon, 2022. Français. NNT : 2022LYSEN029 . tel-04416228

HAL Id: tel-04416228

<https://theses.hal.science/tel-04416228v1>

Submitted on 25 Jan 2024

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.



Numéro National de Thèse : 2022LYSEN029

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée par

l'Ecole Normale Supérieure de Lyon

Ecole Doctorale N° 340

Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Soutenue publiquement le 12/07/2022, par :

Janelle GAUTHIER

Implication de la protéine Cep63 dans les altérations centrosomales induites par l'oncoprotéine Tax du rétrovirus HTLV-1 au cours de l'oncogénèse viro-induite

Devant le jury composé de :

GUICHARD, Paul	Professeur	Université de Genève	Rapporteur
PIQUE, Claudine	Directrice de recherche	CNRS	Rapporteuse
DURAND, Bénédicte	Professeure des universités	Université Lyon 1	Examinatrice
AFONSO, Philippe	Chargé de recherche	Institut Pasteur	Examineur
JOURNO, Chloé	Maître de Conférences	ENS de Lyon	Directrice de thèse

RESUME

Implication de la protéine Cep63 dans les altérations centrosomales induites par l'oncoprotéine Tax du rétrovirus HTLV-1 au cours de l'oncogénèse viro-induite

Le virus HTLV-1 est l'agent étiologique de la Leucémie T de l'Adulte (ATL). L'instabilité génomique des cellules leucémiques pourrait être favorisée par la désorganisation du centrosome, une structure qui contrôle la répartition des chromosomes lors de la mitose et dont la perturbation de la structure et/ou du nombre est fréquemment associée au processus oncogène. L'oncoprotéine virale Tax, dont une fraction localise au centrosome des cellules infectées, est suffisante pour induire des aberrations centrosomales. Cependant, leurs mécanismes d'induction ne sont que partiellement élucidés à ce jour.

Nous nous sommes intéressés à la protéine centrosomale Cep63, un partenaire de Tax que nous avons nouvellement identifié, qui joue un rôle central dans la régulation du cycle du centrosome. Par des approches de microscopie confocale combinées à des analyses en microscopie super-résolutive, nous montrons que l'expression de Tax induit la dispersion de Cep63 du centrosome. Par l'utilisation de mutants de Tax capables ou non d'interagir avec Cep63, nous montrons que cette dispersion résulte de l'interaction de Tax, et non d'un effet indirect de Tax. Nous corrélons enfin cette dispersion à la déstructuration d'autres marqueurs centrosomaux, la Centrine et la Péricentrine, ce qui soutient un rôle de l'interaction Tax / Cep63 dans la mise en place d'aberrations centrosomales dans les cellules infectées.

Ces analyses apportent donc de nouveaux éléments de compréhension des mécanismes de perturbations du centrosome induites par le rétrovirus HTLV-1 et permettront à terme de mieux comprendre l'impact des perturbations centrosomales dans le processus d'oncogénèse virale.

ABSTRACT

Involvement of the Cep63 protein in the centrosomal alterations induced by the retrovirus HTLV-1 Tax oncoprotein in connexion with HTLV-1-induced oncogenesis

HTLV-1 is the causative agent of Adult T-cell Leukemia (ATL). Genomic instability observed in leukemic cells could be favored by the disorganisation of the centrosome, which regulates the chromosomal segregation during mitosis, and alterations of which, either in numbers or structure, have been frequently associated with oncogenesis. Viral oncoprotein Tax, a fraction of which localizes at the centrosome of infected cells, has been shown to trigger centrosomal aberrations. However, the mechanisms underlying the onset of these aberrations remains elusive.

We focused on the centrosomal protein Cep63, a partner of Tax that we recently identified, that plays a key role in the centrosome cycle regulation. Using confocal microscopy and super-resolution microscopy approaches, we were able to show that expression of Tax induces the dispersion of Cep63 from the centrosome. We then used mutants of Tax retaining or not their ability to interact with Cep63 to show that the dispersion of Cep63 is a consequence of its interaction with Tax rather than an indirect effect. Finally, we correlated this dispersion to a disorganization of other centrosomal markers, Centrin and Pericentrin, which suggests a key role of the Tax / Cep63 interaction in the Tax induced centrosomal aberrations observed in HTLV-1 infected cells.

This study brings a new understanding to the mechanisms by which the retrovirus HTLV-1 alters the centrosome, which contributes to a better global understanding of the importance of centrosomal alterations in the process of viral oncogenesis.

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier chaleureusement l'ensemble des membres de mon jury pour l'intérêt porté à ce travail et pour avoir accepté de l'évaluer, en particulier les rapporteur-es M. Paul Guichard et Mme Claudine Pique.

Merci également aux membres de mon comité de suivi de thèse, M. Philippe Afonso et Mme Marie Delattre, pour les échanges scientifiques et l'aide qu'ils m'ont apportée.

Je remercie également tout particulièrement Chloé Journo, dont les conseils m'ont été précieux depuis le début de ce travail, et jusqu'à la fin de la rédaction du manuscrit. Je te remercie d'avoir accepté de m'encadrer dans cette thèse dont le parcours, dès le début, ne s'annonçait ni des plus simples ni des plus linéaires. Tu as accepté de me soutenir et de me conseiller à une période où, après un début de thèse pour le moins difficile dans une autre équipe, je ne savais plus si je souhaitais continuer ma thèse et la recherche, et tu m'as donné envie de retenter cette aventure et donné la chance de pouvoir le faire avec toi. Un grand merci également à Hélène Dutartre, qui aux côtés de Chloé m'a accueillie dans l'équipe, et m'a apporté un soutien important avec ses conseils précieux et son enthousiasme. J'ai bien sûr une pensée émue pour Renaud Mahieux, qui malheureusement n'a que peu pu accompagner directement le chemin de cette thèse, mais dont la silhouette et le rire se dessinent encore dans l'équipe avec nous, et qui a grandement participé à forger l'équipe telle qu'elle est aujourd'hui, tant scientifiquement qu'humainement.

Merci également à tous les membres actuels et passés de l'équipe qui m'ont accompagnée quotidiennement scientifiquement et humainement. Sans vous, pour le meilleur ou pour le pire, les journées auraient certainement beaucoup moins été remplies de rires, de memes, de gâteaux, de craquages et de coups de gueule, de musiques de Noël, de photos de lapins, de courses de tabouret à roulettes, de parties d'échec, de chocolat, de projets de podcast de vulgarisation, de fromage fondu, de thé et de café, et j'en oublie certainement. AUriane, SamOuel, Karim, Thomas, Julien, Inés, Elise, Thomy, Lucas, Florence, Sandrine, Maria João, Gustave, Coline, Brenda, Brice, Alicia, Laurine, merci pour ce que chacun-e d'entre vous m'a apporté.

Merci aussi aux fauvelles, qui ont été à mes côtés pendant la première année de ma thèse, qui m'ont formée, aidée, soutenue. Gaëllus, tu es et tu resteras toujours ma Thésarde Aînée. Manon et Mariette, camarades de galère de CFU. Soizic, je pense qu'on se souviendra toujours de cette production de rougeole. Océane, peu de science avec toi, mais des bons moments et des coups de

gueule partagés. Malgré les difficultés, je suis vraiment heureuse d'avoir pu travailler avec vous et surtout de vous avoir rencontrés, vous m'avez chacune énormément apporté.

Un énorme merci aux personnels des plateformes techniques que j'ai eu l'occasion de côtoyer parfois pendant de longues heures d'acquisitions. En particulier, Sébastien pour la cytométrie d'image, qui m'a accompagnée dans la préparation, l'acquisition et l'analyse de mes expériences, toujours avec bonne humeur. Toute l'équipe du PLATIM également, et particulièrement Jacques et Elodie que j'ai le plus eu l'occasion de côtoyer : pour votre aide régulière bien sûr, mais aussi et surtout votre formidable gentillesse, que ce soit dans les discussions scientifiques ou informelles à l'occasion de formations ou lorsque vous veniez vérifier que j'étais encore vivante derrière « mon » microscope avant de partir le soir. Merci à Elodie pour la relecture et les retours sur la partie microscopie de ce manuscrit, qui a permis de l'enrichir.

Je souhaite également remercier tous les personnels techniques et administratifs, notamment du secrétariat du CIRI et de BMIC, du bureau du 3^e cycle de l'ENS et de la laverie du CIRI qui m'ont permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions possibles.

Cette thèse aura aussi été l'occasion pour moi de découvrir et de m'épanouir dans l'enseignement, et de confirmer mon envie d'y consacrer la suite de ma carrière. Au sein de l'équipe enseignante du département de biologie de l'ENS de Lyon, j'ai côtoyé de formidables personnes et enseignant-es, que je ne citerai pas tous-tes ici car la liste serait bien trop longue. Je pense tout de même particulièrement à mes camarades du Pôle Bien-être, Amaury, Corentin, Lucie et Amélie, avec qui j'ai partagé la majorité de mes jeudis midi, et avec qui les permanences se transformaient régulièrement autant en « Pôle Bien-être des thésard-es » qu'en « Pôle Bien-être des étudiant-es ».

Parmi les enseignant-es du département, Nathalie mérite également une place particulière dans ces remerciements. Je pourrais bien sûr te remercier pour les bonnes rigolades en TP ou pendant les cours alter, pour l'organisation du service des moniteurs (qui nous facilite tellement la vie !) et l'animation des échanges entre nous avec des sorties, ou globalement pour tout ton investissement pour le département. Je pourrais aussi simplement te remercier pour ce que tu m'as apporté lors de ma formation, quand j'étais de l'autre côté de l'amphi. Mais ce pourquoi j'ai le plus envie de te remercier aujourd'hui, c'est pour avoir été présente à mes côtés tout au long de ma thèse, et particulièrement lorsque ça n'allait pas. Tu as été une oreille attentive et bienveillante, et tu m'as conseillée et accompagnée dans mon changement d'équipe et de sujet de thèse, et dans tous les moments difficiles. Je ne suis pas sûre que sans toi ce manuscrit existerait aujourd'hui, alors du fond du cœur, merci.

Sur un plan plus personnel, je tiens à remercier toutes les personnes formidables dont j'ai croisé le chemin et qui m'ont entourée pendant ces nombreuses années, d'abord d'étudiante à l'ENS puis en thèse. La liste complète serait interminable, et serait certainement pleine de trous, alors je ne m'essaierai pas à l'exercice, mais je ne pourrai pas m'empêcher de citer quelques noms.

Ma famille d'abord, et particulièrement mes parents Aline et Thierry, mes frères Florent et Rémi, Dana, Sarah, et bien sûr les petits derniers Gabriel et Loé et leurs sourires charmeurs. Merci pour votre soutien depuis toutes ces années, et pour tous les précieux moments partagés ensemble. Merci aussi à Rémi pour sa relecture de ce manuscrit.

Les ami-es de longue date, Jennifer, Chloé et rencontrés plus récemment, Juliette avec qui j'ai partagé une incroyable aventure à l'autre bout du monde, et Beverley que j'ai rencontrée là-bas.

Mes camarades et ami-es de promo, Charline bien sûr, avec qui j'ai compté des heures de vidéos de fourmis pour notre TIPE et survécu à l'épreuve du TP β -gal, Mathieu, Agnès, Théo, Noémie, Estelle, Nathalie, Yann, Loïc. Je retiens des longues heures en amphi, des fous-rires, et une obsession certaine pour la prononciation de « determine » suite aux oraux de L3.

La troupe d'incroyables et incroyablement talentueux-ses comédien-nes de la Brabâ avec qui j'ai eu la chance de monter de formidables projets, *Amadeus* et *L'Opéra de Quat'sous* pour ne citer qu'eux. Aliénor, Andrea, Ferdinand, Lola, Maëlis, Mary, Romain, Sarah, Théo, Ulysse, Valentin et bien sûr Nadine sans qui rien de tout cela n'aurait été possible. Je ne sais toujours pas vraiment comment on a réussi à monter un si bel *Opéra de Quat'sous* en moins de six mois, mais je sais que j'ai une chance incroyable de vous avoir rencontrés, d'avoir pu participer à ces aventures avec vous et de vous avoir rencontrés, et de vous compter parmi mes amis encore aujourd'hui.

Toutes les personnes formidables que j'ai rencontrées et appris à connaître au Foyer autour de café / bière / coinche / jeux vidéo / discussions scientifiques et politiques, en murder ou ailleurs, et qui constituent aujourd'hui un incroyable groupe d'ami-es. Je ne pourrai pas tous-tes vous citer, mais je voudrais quand même donner quelques noms. Les rhenhouzes Alix, Baptiste, Corentin, Malo et Simon, avec qui j'ai partagé les meilleures soirées jeux de société, les meilleures blagues et jeux de mots (mouais), et surtout les meilleurs tartes à la ratatouille et cookies aux poivrons. Bertrand et Laureline, pour les multiples soirées cuisine and chill et Mario-pompes. KT pour la bonne humeur du matin. Nattes pour les pauses café salutaires et tout ton soutien. Xavier pour les nombreuses discussions et les heures de coinche au Foyer. Aaren, Adrien, Alban, Alice, Alid, Alexandre, Antoine, Arthur, Avril, Bastien, Charline, Colin, Danaé, Elodie, Florine, Gabrielle, Georges, Guillaume, Joël, Juliette, Lambert, Léo, Maïne, Marie, Mathieu, Morgan, Olivier, et tous-tes les autres. Merci d'ailleurs à Alexandre, Avril, Laureline, Mathieu, Nattes et Simon pour la relecture de ce manuscrit. Je suis

vraiment heureuse de vous avoir tous·tes rencontré·es, vous m'avez énormément apporté et vous continuez à le faire. Merci tout particulièrement à mon incroyable coloc, qui a partagé mon quotidien, ma fatigue et mes craquages, et qui m'a apporté une double ration de bonne humeur et de soutien, et de nombreux tacos. Et enfin, merci infiniment à Simon, inlassable soutien et meilleur ami possible. Merci d'avoir été là pour moi dans les meilleurs moments et les pires, et d'avoir su trouver les mots pour m'aider quand j'en avais besoin (en guise de preuve de pertinence totale, je retiendrai une seule citation : « Ta thèse est plus importante que mes patates. Mais je vais les manger quand même ! »). Merci d'avoir accepté mon parasitage total pendant la rédaction de ce manuscrit. Merci pour les câlins, et les meilleures gratouilles. Et surtout, merci d'être une personne aussi formidable et de m'apporter autant de bonheur.

Enfin, pour terminer, j'ai une pensée particulière pour toutes les personnes infectées par HTLV en France et dans le monde, souffrant d'une maladie associée à HTLV, souffrant de l'incertitude de développer une forme pathologique ou encore dans l'errance médicale. En tant que chercheur·euses, il est souvent facile de rester éloigné·es de notre objet d'étude, de parler de virus, de cellules, de molécules, et de perdre de vue la réalité représentée pour les patient·es qui en souffrent. Réalité qui m'a été rappelée au cours de ma thèse grâce au témoignage frappant d'Ulriche qui a choisi de partager son vécu dans un épisode du podcast *Les enfants du bruit et de l'odeur*. Son témoignage est frappant par la difficulté de son parcours de soin. Il questionne la méconnaissance généralisée de cette maladie et le peu de moyens d'information et de prévention disponibles à l'heure actuelle pour lutter contre celle-ci. En France, HTLV infecte en grande partie des personnes racisées issues de l'immigration depuis les zones endémiques : ces maladies auraient-elles la même place dans les politiques de santé publique si elles touchaient principalement des populations blanches et aisées ? Tout cela questionne aussi sur notre place de chercheur·euses et notre rapport avec le reste de la société. Merci Ulriche, et merci à toutes les personnes qui luttent en France et dans le monde pour rendre visible cette maladie.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	15
INTRODUCTION	17
I – Le rétrovirus HTLV-1	19
A. HTLV-1, un rétrovirus oncogène.....	19
1. Découverte historique d’HTLV-1, le premier rétrovirus humain pathogène	19
2. Epidémiologie de l’infection par HTLV-1	19
3. Structure du virus et cycle de réplication.....	24
4. De la prolifération clonale au développement de l’ATL.....	30
B. Rôle central de la protéine Tax dans la transformation cellulaire	33
1. Structure et localisation subcellulaire de Tax.....	33
2. La protéine Tax joue de nombreux rôles essentiels lors de l’infection et favorise la transformation cellulaire.....	34
II – Des altérations centrosomales à la transformation cellulaire	45
A. Le centrosome	45
1. Organisation du centrosome.....	45
2. Cycle du centrosome	47
B. Un lien étroit entre perturbations du centrosome, instabilité génomique et oncogenèse..	49
1. Instabilité génomique et oncogenèse	49
2. Des anomalies centrosomales à l’instabilité génomique	50
3. Mécanismes d’induction des altérations centrosomales.....	51
C. Rôle central de Cep63 dans la régulation du centrosome et l’oncogenèse.....	53
1. Structure et localisation de la protéine Cep63.....	53
2. Cep63 joue un rôle central de régulateur du cycle du centrosome et du cycle cellulaire	54
3. Des perturbations de Cep63 sont associées à l’amplification centrosomale et à l’oncogenèse.....	56

D. Des altérations centrosomales sont observées lors de l'infection par HTLV-1.....	58
III – Résultats préliminaires et problématique du travail de thèse.....	62
A. Identification par Bio-ID de partenaires potentiels de Tax au centrosome.....	62
B. Identification de Cep63 comme un partenaire de Tax au centrosome.....	63
C. Problématique du travail de thèse et stratégie expérimentale.....	64
MATERIEL ET METHODES.....	67
Culture cellulaire :.....	69
Plasmides :.....	69
Transfection des cellules Jurkat par microporation :.....	69
Clonage des JK iTax :.....	70
Synchronisation cellulaire en mitose :.....	70
Anticorps :.....	71
Western Blot :.....	71
Immunofluorescence et microscopie :.....	72
Cytométrie de flux et d'image :.....	73
Analyse statistique :.....	74
RESULTATS.....	75
I – L'interaction de Tax avec Cep63 corrèle avec sa dispersion au centrosome.....	77
A. Validation de l'expression de Tax et de ses mutants en lignée T.....	77
B. Tax induit la dispersion de Cep63 du centrosome.....	79
C. La dispersion de Cep63 du centrosome par Tax ne dépend pas de la voie NF- κ B.....	81
II – La dispersion de Cep63 du centrosome induite par Tax est associée à d'autres altérations centrosomales.....	85
A. La dispersion de Cep63 est associée à des altérations de Centrine.....	85
B. La dispersion de Cep63 est associée à des altérations de PCNT.....	86
C. Caractérisation des altérations centrosomales induites par Tax par microscopie super-résolutive.....	88

III – Tax induit des altérations surnuméraires de Cep63 indépendamment de son interaction avec Cep63, partiellement associées avec des altérations de Centrine et PCNT.....	90
A. Tax induit des spots surnuméraires de Cep63 indépendamment de son interaction avec Cep63.....	90
B. Les altérations surnuméraires de Cep63 sont partiellement associées à des altérations de Centrine et PCNT	91
IV – Caractérisation des altérations centrosomales induites par Tax en mitose	94
A. Mise au point de la synchronisation cellulaire en mitose	94
B. Clonage de lignées de cellules Jurkat inductibles pour l’expression de Tax	97
C. Séparation des cellules selon leur phase du cycle cellulaire en cytométrie d’image	98
D. Induction d’altérations centrosomales au cours du cycle cellulaire par Tax	101
DISCUSSION	105
I – Utilisation de la cytométrie d’image pour l’étude du centrosome	109
A. L’acquisition à haut débit permet d’accéder à des sous-populations rares	109
B. La cytométrie d’image est particulièrement adaptée pour étudier des cellules épaisses..	110
C. Enjeux liés à l’analyse automatisée des images	110
D. Une variabilité importante liée à notre étude	113
II – Caractérisation des altérations centrosomales induites par Tax	114
A. Comment Tax induit-elle la dispersion de Cep63 ?.....	114
1. Implication de la voie NF-κB.....	114
2. Implication du niveau protéique de Tax au centrosome	115
3. Hypothèse d’une fragilisation de l’ancrage de Cep63 au centrosome	116
4. Implication de l’autophagie.....	116
5. Dispersion de Cep63 ou recrutement péri-centrosomal augmenté ?	117
B. Comment la dispersion de Cep63 peut-elle contribuer à l’altération d’autres marqueurs centrosomaux, et quelles peuvent être leurs conséquences ?.....	118
1. Implication possible de la protéine Cep57	118
2. Implication possible de la protéine CCDC57	120

C. Comparaison des altérations du centrosome induites par Tax avec des altérations similaires induites par d'autres virus.....	120
1. Comparaison avec les altérations du centrosome induites par le virus Zika	120
2. Comparaison avec les altérations du centrosome induites par le virus HBV.....	121
D. Quelle est l'importance des altérations surnuméraires de Cep63, et comment sont-elles induites ?	122
III – Vers une compréhension plus globale des mécanismes d'oncogenèse induits par la protéine Tax d'HTLV-1	122
CONCLUSION	125
Références bibliographiques	129
ANNEXES.....	151

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : L'infection par HTLV-1 est associée au développement de différentes maladies.	22
Figure 2 : Structure de la particule virale d'HTLV-1.....	25
Figure 3 : Organisation du génome proviral d'HTLV-1.	26
Figure 4 : Cycle viral d'HTLV-1.	28
Figure 5 : Réplication virale par infection <i>de novo</i> ou expansion clonale.	31
Figure 6 : De la prolifération cellulaire à l'émergence d'un clone leucémique	32
Figure 7 : Structure et modifications post-traductionnelles de la protéine Tax.	34
Figure 8 : Activation des voies NF-κB canonique et non canonique.	37
Figure 9 : Modulation de la voie NF-κB canonique par Tax.	39
Figure 10 : Modulation de la voie NF-κB non-canonique par Tax.	40
Figure 11 : Tax accélère la progression du cycle cellulaire.....	42
Figure 12 : Tax favorise l'apparition et le maintien de dommages à l'ADN.	44
Figure 13 : Organisation du centrosome.....	46
Figure 14 : Cycle du centrosome.	47
Figure 15 : Des altérations centrosomales induisent des mitoses anormales qui favorisent l'aneuploïdie et la transformation cellulaire.....	51
Figure 16 : Structure de la protéine Cep63.	53
Figure 17 : Cep63 participe à la régulation du cycle cellulaire et du cycle du centrosome.	55
Figure 18 : Association d'altérations centrosomales à l'infection par HTLV-1.....	60
Figure 19 : Principe de la technique de BioID.	63
Figure 20 : Validation de l'expression et localisation subcellulaire de Tax et de ses mutants en lignée de cellules Jurkat.	78
Figure 21 : Tax WT et le mutant M47 induisent une dispersion de Cep63 du centrosome.....	80
Figure 22 : La dispersion de Cep63 du centrosome induite par Tax ne dépend pas de l'activation de la voie NF-κB.....	83
Figure 23 : La dispersion de Cep63 est associée à des altérations de Centrine.....	86
Figure 24 : La dispersion de Cep63 est associée à des altérations de PCNT.	87
Figure 25 : Caractérisation des altérations centrosomales induites par Tax par microscopie super-résolutive SIM.....	89
Figure 26 : Tax et ses mutants M47, M22 et KOR induisent des altérations surnuméraires de Cep63. 91	
Figure 27 : Les altérations surnuméraires de Cep63 induites par Tax sont partiellement associées à des altérations de Centrine et PCNT.....	92

Figure 28 : Mise au point de la synchronisation cellulaire avec du RO-3306 ou du Monastrol.....	96
Figure 29 : Clonage de lignées iCT et iTax depuis les cellules parentales hétérogènes.....	98
Figure 30 : La cytométrie d'image permet d'analyser une sous-population de cellules en mitose. ..	100
Figure 31 : Analyse des altérations de PCNT par cytométrie d'image.....	104
Figure 32 : Enjeu du placement d'un seuil d'intensité correcte pour le signal lors de l'analyse automatisée du nombre de centrosomes.....	111

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique	IκB : Inhibitor of nuclear factor κB
APC : Anaphase Promoting Complex	IKK : IκB Kinase
ARN : Acide Ribo-Nucléique	IL : Interleukine
ATL : Adult T-cell Leukemia	IL-1R : Interleukin-1 receptor
	ISX : ImageStream X (cytométrie d'image)
BAFF : B Cell-Activating Factor	
BioID : Proximity-dependent Biotinylation	JK : Jurkat
BER : Base Excision Repair	
	LTR : Long Terminal Repeats
Cdc : Cell division control protein	LZR : Leucine Zipper-like Region
CDK : Cyclin-Dependent Kinase	
Cep : Centrosomal protein	MMR : Mismatch Repair
CKI : CDK Inhibitor	MTOC : MicroTubule-Organising Center
CRE : CREB Response Element	
CREB : C-AMP Response Element-Binding protein	NEMO : NF-κB Essential Modulator
	NER : Nucleotide Excision Repair
DSB : Double Strand Break	NES : Nuclear Export Signal
	NF-κB : Nuclear Factor -κB
GLUT-1 : Glucose Transporter-1	NIK : NF-κB Interacting Kinase
GF-R : Growth Factors receptor	NLS : Nuclear Localisation Signal
	NRP-1 : Neuropiline-1
HAM/TSP : HTLV-1 Associated Myelopathy / Tropical Spastic Paraparesis	OPTN / NRP : Optineurine / NEMO-Related Protein
HBV : Hepatitis B Virus	ORF : Open Reading Frame
HBZ : HTLV-1 Basic Leucine Zipper	
HSPG : Héparane Sulfate Protéoglycanes	PCNT : Péricentrine
hTERT : human telomerase reverse transcriptase	PBM : PDZ-Binding Motif
HTLV : Human T-Lymphotropic Virus	PCM : PeriCentriolar material

PDZ : Post synaptic density protein (PSD95),
Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1)
and Zonula occludens-1 protein (zo-1))

PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase

PLK1/4 : Polo-Like Kinase 1 / 4

pRb : Retinoblastoma protein

PTEF : Positive Transcription Elongation Factor

RanBP1 : Ran-Binding Protein 1

RNF8 : RiNg Finger protein 8

ROS : Reactive Oxygen Species

SAS-6 : Spindle ASsembly abnormal protein 6

STIL : SCL-interrupting locus protein

SUMO : Small Ubiquitin-like MODifier

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TAK1 : Transforming growth factor β Activating
Kinase 1

TAX1BP1/2 : Tax-1 Binding Protein 1/ 2

TCR : T-Cell Receptor

TF : Transcription Factor

TLR : Toll-like receptor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TNFR : TNF Receptor

TRE : Tax Responsive Elements

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

INTRODUCTION

I – Le rétrovirus HTLV-1

A. HTLV-1, un rétrovirus oncogène

1. Découverte historique d'HTLV-1, le premier rétrovirus humain pathogène

Le Virus Humain T-Lymphotrope de Type 1 (HTLV-1, pour Human T-Lymphotropic Virus Type 1) est le premier rétrovirus humain pathogène à avoir été identifié, dans les années 1970 à 1980. A l'époque, d'autres rétrovirus animaux ont déjà été identifiés et associés au développement de leucémies. En particulier, William Jarrett identifie en 1964 le Feline Leukemia Virus qu'il observe dans des échantillons de chats ayant développé une forme de leucémie (Jarrett *et al.*, 1964), et la transmissibilité du virus et de la leucémie associée est rapidement démontrée (Jarrett *et al.*, 1973). Suite à la découverte en 1970 de l'ADN polymérase portant une activité de reverse transcriptase chez tous les rétrovirus (Baltimore, 1970; Temin and Mizutani, 1970), une première description de cette activité de reverse transcriptase dans des échantillons de leucémies humaines est faite en 1972 (Sarngadharan *et al.*, 1972), même si à l'époque les tentatives d'isolation du virus depuis ces échantillons ne furent pas concluantes. A la fin des années 1970, après la découverte d'un rétrovirus causant des leucémies chez des primates non humains (Kawakami *et al.*, 1972; Gallo *et al.*, 1978), HTLV-1 est enfin détecté et isolé en 1980 à partir de lignées dérivées de cellules primaires d'un-e patient-e présentant un lymphome cutané (Poiesz *et al.*, 1980). Dans les années qui suivent, le lien est fait entre HTLV-1 et une forme particulière de leucémie décrite au Japon quelques années auparavant appelée Leucémie T de l'adulte (ATL, pour Adult T-cell Leukemia) (Uchiyama *et al.*, 1977; Yoshida, Miyoshi and Hinuma, 1982).

2. Epidémiologie de l'infection par HTLV-1

a) Distribution géographique d'HTLV-1

Suite à la découverte d'HTLV-1 et de son association avec l'ATL, le Japon a été rapidement identifié comme une zone endémique majeure pour HTLV-1. Cependant, d'autres zones géographiques endémiques ont également été rapidement décrites comme les Caraïbes et certaines zones d'Afrique. A ce jour la prévalence mondiale du virus reste encore mal évaluée dans de nombreuses régions et les estimations du nombre de personnes infectées relativement imprécises : en effet, les études épidémiologiques actuelles se basent principalement sur des données hétérogènes issues de dons de sang ou de dépistages réalisés sur des femmes enceintes, qui peuvent présenter des biais d'échantillonnage sociologiques et démographiques selon les pays. De plus, certaines régions du monde n'ont jusqu'à présent pas fait l'objet d'études épidémiologiques larges. Les données sont par

exemple encore manquantes dans de nombreux pays d'Asie du sud-est, d'Afrique de l'est et du nord, d'Amérique du sud et d'Europe de l'est.

Toutefois, Antoine Gessain et Olivier Cassar ont réalisé en 2012 un bilan des données épidémiologiques disponibles (Gessain and Cassar, 2012) qui leur a permis d'estimer qu'au moins 5 à 10 millions de personnes étaient infectées par HTLV-1 dans le monde. Les zones endémiques majeures semblent être l'Afrique de l'Ouest (de 0,2 à 5,5 % de prévalence) et Centrale (de 0,3 à 10 % de prévalence, et jusqu'à 25 % localement), l'Amérique du Sud (de 0,2 à 5,3 % de prévalence), les Caraïbes (de 1,7 à 17,4 % de prévalence sur certaines îles comme la Jamaïque, Haïti ou la République Dominicaine, et une quasi absence sur d'autres îles comme Cuba), l'Australie (avec une prévalence globale de moins de 0,1 % mais très forte chez les populations aborigènes, pouvant atteindre localement 40 % (Einsiedel *et al.*, 2021)) ainsi que le Japon (de 0,1 à 6 % de prévalence). En Europe et notamment en France, la grande majorité des personnes infectées sont originaires ou sont descendantes de personnes originaires des zones fortement endémiques (Gessain and Cassar, 2012).

On peut également noter que malgré une grande stabilité génétique, HTLV-1 présente différents sous-types possédant une répartition géographique différente, reflétant l'évolution du virus : le sous-type A, dit cosmopolite, et qui correspond au génotype le plus étudié, est réparti sur tous les continents. En revanche, les sous-types B, C et D ont une localisation géographique plus restreinte, respectivement en Afrique centrale et sub-saharienne pour les sous-type B et D (ainsi que les sous-types plus rares E, F et G), et en Australie pour le sous-type C (Gessain and Cassar, 2012; Afonso, Cassar and Gessain, 2019). Il n'y a à l'heure actuelle pas d'association claire entre l'infection par différents sous-types et des évolutions cliniques particulières, néanmoins la question de l'impact de ces variations génotypiques sur l'infection et ses conséquences mériterait des études plus poussées.

b) Modes de transmission

Les modes de transmissions du virus ont également fait l'objet de nombreuses études, et il est désormais clair que la transmission d'HTLV-1 se produit de façon importante par voie verticale, de la mère à l'enfant lors de l'allaitement (Kinoshita *et al.*, 1984; Hino *et al.*, 1985; Kajiyama *et al.*, 1986). Cette transmission semble de plus en plus importante avec la durée de l'allaitement, avec un effet protecteur des anticorps maternels lors des premiers mois qui décroît petit à petit, conduisant à une transmission dans environ 4% des cas après moins de 6 mois d'allaitement, augmentée à environ 14% lorsque l'allaitement est prolongé au-delà de 7 mois (Takahashi *et al.*, 1991). Cette tendance est également confirmée par une étude rétrospective plus récente (Hino, 2011). A noter également que les campagnes de prévention développées au Japon visant à promouvoir une réduction de la durée

d'allaitement pour les mères séropositives semblent de façon encourageante démontrer une certaine efficacité (Nerome *et al.*, 2014).

La transmission peut également se faire de façon horizontale. Cette transmission a lieu par voie sexuelle, principalement mais non exclusivement de l'homme vers la femme (Kajiyama *et al.*, 1986; Murphy, Figueroa, *et al.*, 1989; Roucoux *et al.*, 2005). Ce mode de transmission joue probablement un rôle important au niveau des zones endémiques. La transmission horizontale peut également passer par des produits sanguins contaminés, aiguilles (Jögeda *et al.*, 2016), transfusions sanguines (Okochi, Sato and Hinuma, 1984; Gout *et al.*, 1990; Manns *et al.*, 1992; Inaba *et al.*, 1999) ou transplantation d'organes contaminés (Toro *et al.*, 2003; Yamauchi, Yamano and Yuzawa, 2019).

De façon générale, les campagnes de dépistage et de prévention de la transmission ont démontré leur efficacité pour prévenir l'infection, et des tests à la fois sensibles et spécifiques sont disponibles. Notamment, au Japon, la mise en place d'un dépistage systématique des dons de sang a permis la réduction du nombre de patient-es développant la maladie HAM / TSP (HTLV-1 Associated Myelopathy / Tropical Spastic Paraparesis) de 16 % en seulement quelques années (Osame *et al.*, 1990). Malgré cela, seule une vingtaine de pays ont actuellement mis en place un dépistage systématique des dons de sang (World Health Organization, 2021). Une autre stratégie consiste en un dépistage prénatal chez les personnes enceintes, afin de limiter la transmission verticale. Néanmoins la mise en place de ce dépistage fait également face à des réticences en raison du coût financier impliqué, qui ont récemment été adressées par une étude au Royaume-Unis qui prédisant la viabilité financière d'une telle approche (Malik and Taylor, 2019). L'Organisation Mondiale de la Santé a récemment émis des recommandations concernant HTLV-1, soulignant l'importance des campagnes de prévention et de test, et la nécessité d'obtenir des données épidémiologiques plus complètes afin de pouvoir guider des politiques de santé publique (World Health Organization, 2021).

c) Maladies associées à l'infection par HTLV-1

L'infection par HTLV-1 commence par une phase asymptomatique de durée variable, qui peut se poursuivre pendant des dizaines d'années. Chez un faible pourcentage des individus infectés, cette phase de latence clinique est suivie du développement de graves pathologies (Figure 1).

La première pathologie ayant été associée à HTLV-1 est une leucémie de l'adulte particulièrement sévère, appelée Leucémie T de l'Adulte (ATL, pour Adult T-cell Leukemia). Celle-ci se manifeste généralement des dizaines d'années après l'infection, chez 2 à 3% des femmes et 6 à 7% des hommes infecté-es d'après des études épidémiologiques réalisées au Japon (Iwanaga, Watanabe and Yamaguchi, 2012). L'âge moyen de développement de cette leucémie varie selon les zones endémiques, entre 40 ans en Amérique du sud et centrale et 60 ans pour le Japon (Iwanaga, Watanabe

and Yamaguchi, 2012). Il semble également que l'ATL se développe principalement chez des individus ayant été infectés par HTLV-1 lors de leur enfance par transmission verticale et plus rarement chez des individus ayant été infectés à l'âge adulte (Hino, 1989; Murphy, Hanchard, *et al.*, 1989).

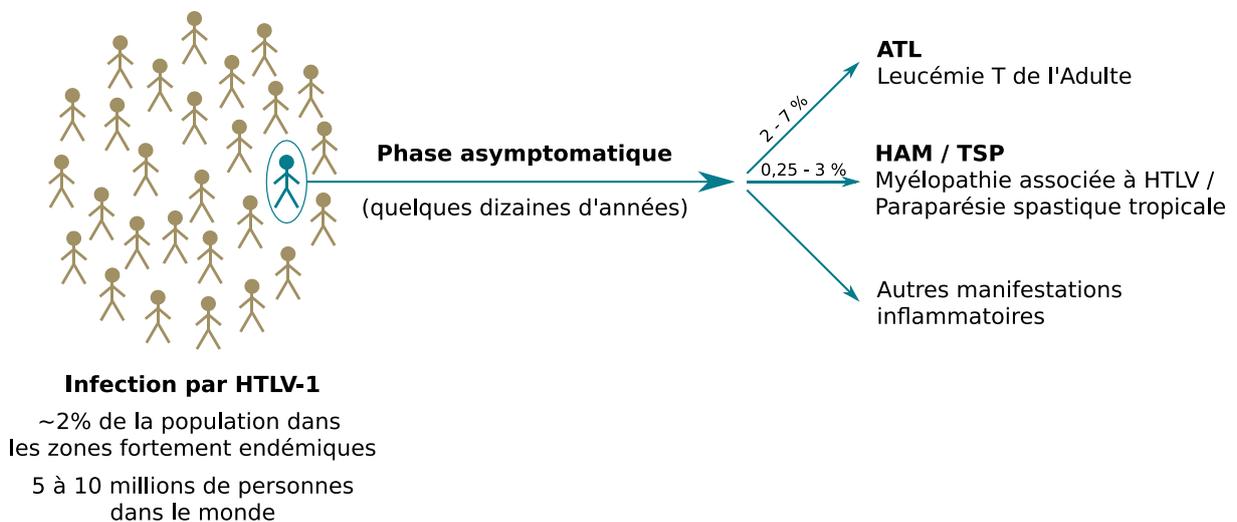


Figure 1 : L'infection par HTLV-1 est associée au développement de différentes maladies.

Suite à l'infection par HTLV-1, une phase asymptomatique peut durer de quelques mois à quelques années pour les cas à la progression la plus rapide, ou jusqu'à plusieurs dizaines d'années pour les évolutions les plus longues. Suite à cette phase asymptomatique, quelques pourcents des personnes infectées développeront des pathologies associées à HTLV-1, principalement une leucémie grave de l'adulte appelée ATL dans 2 à 7% des cas, ou une maladie neuro-inflammatoire dégénérative appelée HAM/TSP dans 0,25 à 3 % des cas. D'autres manifestations inflammatoires diverses peuvent également être associées à l'infection.

Les manifestations cliniques de l'ATL comprennent des lymphomes, caractérisés par une prolifération cellulaire anormale au niveau des organes lymphoïdes secondaires, et des leucémies caractérisées par une prolifération cellulaire anormale au niveau de la moelle osseuse associée à un taux important de lymphocytes anormaux circulants caractérisés notamment par une forme caractéristique plurilobée de leur noyau, dite « en fleur » (Matsuoka, 2005). Différents sous-types ont été décrits en fonction des manifestations cliniques (détaillés dans Shimoyama, 1991) :

- L'ATL indolent (ou lancinant) est caractérisé par un nombre total de lymphocytes normal, mais avec plus de 5 % de lymphocytes anormaux dans le sang périphérique. Il peut être associé à des lésions pulmonaires ou cutanées.
- L'ATL chronique est caractérisé par un nombre anormalement élevé de lymphocytes dans le sang périphérique, fréquemment associé à des anomalies de plus de 5 % de ces lymphocytes. Une lymphadénopathie (atteinte des ganglions périphériques) peut être présente, ainsi que des manifestations au niveau des poumons, de la peau, du foie et de la rate.
- L'ATL lymphomateux est caractérisé par une lymphadénopathie associée à moins d'1 % de lymphocytes anormaux dans le sang périphérique

- L'ATL aigu regroupe les autres patients, avec généralement à la fois des manifestations leucémiques, des lésions tumorales et une lymphadénopathie.

Le pronostic vital pour les patient-es atteint-es des formes les plus agressives est très mauvais. La médiane de survie en l'absence de traitement est de 6 mois pour la forme aiguë et 10 mois pour la forme lymphomateuse, et atteint 24 mois pour la forme chronique (Shimoyama, 1991). Il n'existe à ce jour aucun traitement permettant une rémission complète pour les patient-es, les formes les plus sévères ayant une réponse faible à la chimiothérapie. Des essais de thérapie ont été réalisés et offrent des perspectives enthousiasmantes, par exemple l'utilisation d'une combinaison d'interféron α , de zidovudine et d'arsenic (Kchour *et al.*, 2013), mais celle-ci ne permet pas de conserver une efficacité à long terme. Une étude rétrospective récente a permis de faire un bilan sur l'évolution clinique des différentes formes d'ATL au Japon, en réponses aux différents traitements proposés. Elle met notamment en évidence une amélioration du pronostic vital en cas de traitement précoce avec une transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques (Imaizumi *et al.*, 2020). La recherche de nouvelles cibles cliniques demeure toutefois un enjeu majeur.

Une deuxième pathologie fréquemment associée à l'infection par HTLV-1 est la myélopathie associée à HTLV-1 / paraparésie spastique tropicale (HAM/TSP), qui se développe chez 0,25 à 3% des individus infectés (Kaplan *et al.*, 1990; Gessain and Mahieux, 2012), généralement autour de la cinquantaine et plus fréquemment chez les femmes (Olindo *et al.*, 2018). Le développement de HAM/TSP a été plutôt associé à une transmission horizontale d'HTLV-1, et est notamment fréquemment observé avec un développement rapide dans le cas d'une transmission par produits sanguins ou greffe d'organes contaminés (Osame *et al.*, 1990; Yamauchi, Yamano and Yuzawa, 2019).

D'un point de vue clinique, la HAM/TSP correspond à une maladie neuro-inflammatoire du système nerveux central. L'évolution de la myélopathie est progressive et irréversible, commençant avec une faiblesse et des raideurs musculaires des membres inférieurs, des douleurs lombaires et des problèmes urinaires, mais sans atteinte des fonctions cognitives. Après quelques années d'évolution de la maladie, une majorité des patient-es présente une spasticité des membres inférieurs, des perturbations sensorielles et une incontinence, et après 10 ans d'évolution de la maladie, environ 50% des patient-es sont grabataires (Gessain and Mahieux, 2012), et la qualité de vie des patient-es est gravement dégradée (Rosadas *et al.*, 2020). A l'heure actuelle, les pistes de traitements existantes demeurent assez insatisfaisantes, et permettent essentiellement des améliorations provisoires. Les principales thérapies proposées visent uniquement à soulager les symptômes associés à la maladie, ce qui participe à l'amélioration des conditions de vie des patient-es mais n'impacte pas la progression de la maladie. Parmi les thérapies à l'étude actuellement qui visent à limiter cette progression, l'utilisation

de prednisolone ou de methyl prednisolone semble fournir l'amélioration clinique la plus notable (Araujo *et al.*, 2021).

En plus de ces deux maladies graves associées de façon majeure à l'infection par HTLV-1, celle-ci peut également conduire à diverses manifestations inflammatoires au niveau de différents tissus : uvéites, conjonctivites, thyroïdites, manifestations pulmonaires, dermatites ou encore arthrite (pour revue, voir Martin, Taylor and Jacobson, 2014).

3. Structure du virus et cycle de réplication

a) *Structure de la particule virale*

HTLV-1 est un rétrovirus de la sous-famille des *Orthoretrovirinae* et plus précisément du genre des Deltaretrovirus. La particule virale est recouverte d'une enveloppe lipidique issue du bourgeonnement de la membrane plasmique cellulaire dans laquelle sont enchâssées des glycoprotéines virales, composées d'une sous-unité transmembranaire (TM, ou gp21) et d'une sous-unité de surface (SU, ou gp46). La matrice (composée des protéines MA, ou p19) établit le lien entre l'enveloppe et la capsid (composée des protéines CA, ou p24). Dans la capsid, on retrouve le génome viral, constitué de deux copies d'un ARN simple brin de polarité positive protégées par la nucléocapsid (composée des protéines NC, ou p15), ainsi que différentes enzymes virales : la protéase (PRO), l'intégrase (IN) et la transcriptase inverse (RT) (Figure 2).

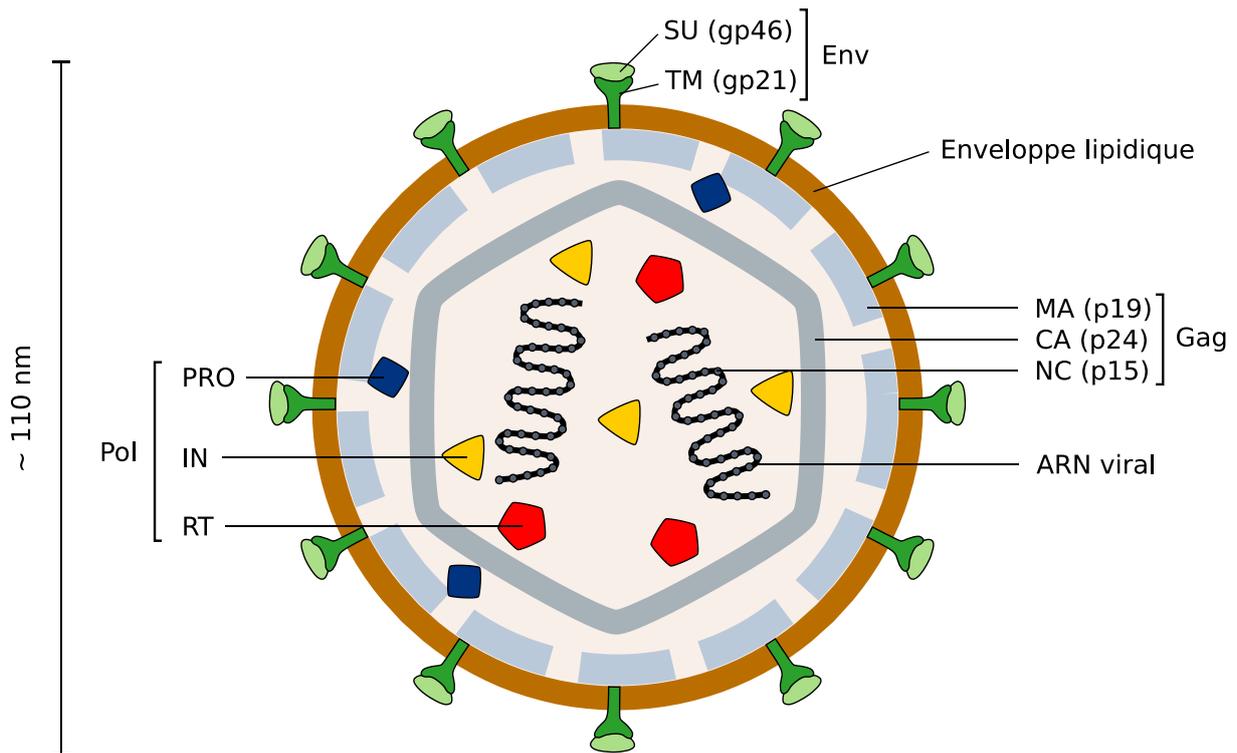


Figure 2 : Structure de la particule virale d'HTLV-1.

La particule virale d'HTLV-1 présente les caractéristiques classiques des rétrovirus. Les protéines structurales correspondent aux protéines SU (gp46, protéine de surface) et TM (gp21, protéine transmembranaire) dérivées du précurseur Env (enveloppe) et aux protéines MA (p19, protéine de matrice), CA (p24, protéine de capsid) et NC (p15, protéine de nucléocapsid) dérivées du précurseur Gag. La particule virale contient également des enzymes virales : PRO (protéase), IN (intégrase) et RT (transcriptase inverse) dérivées du précurseur Pol. Le génome viral est constitué de deux copies d'un ARN simple brin de polarité positive, associées à la nucléocapsid.

b) Organisation du génome viral

Comme de nombreux virus, HTLV-1 possède un génome de taille relativement réduite (8,5 kb), mais qui code pour un nombre important de protéines, avec une forte compaction génique permise notamment par des chevauchements de cadres de lectures et différents épissages des transcrits (Figure 3).

Aux extrémités du génome proviral, qui correspond à la forme du génome viral intégré dans le génome cellulaire, on trouve les séquences LTR (Long Terminal Repeats) en 5' et en 3', qui jouent un rôle important dans l'intégration du provirus (voir section suivante) et contiennent les séquences régulatrices permettant l'expression du génome (séquences promotrices, signaux de terminaison de transcription, de polyadénylation, etc) (Klaver and Berkhout, 1994).

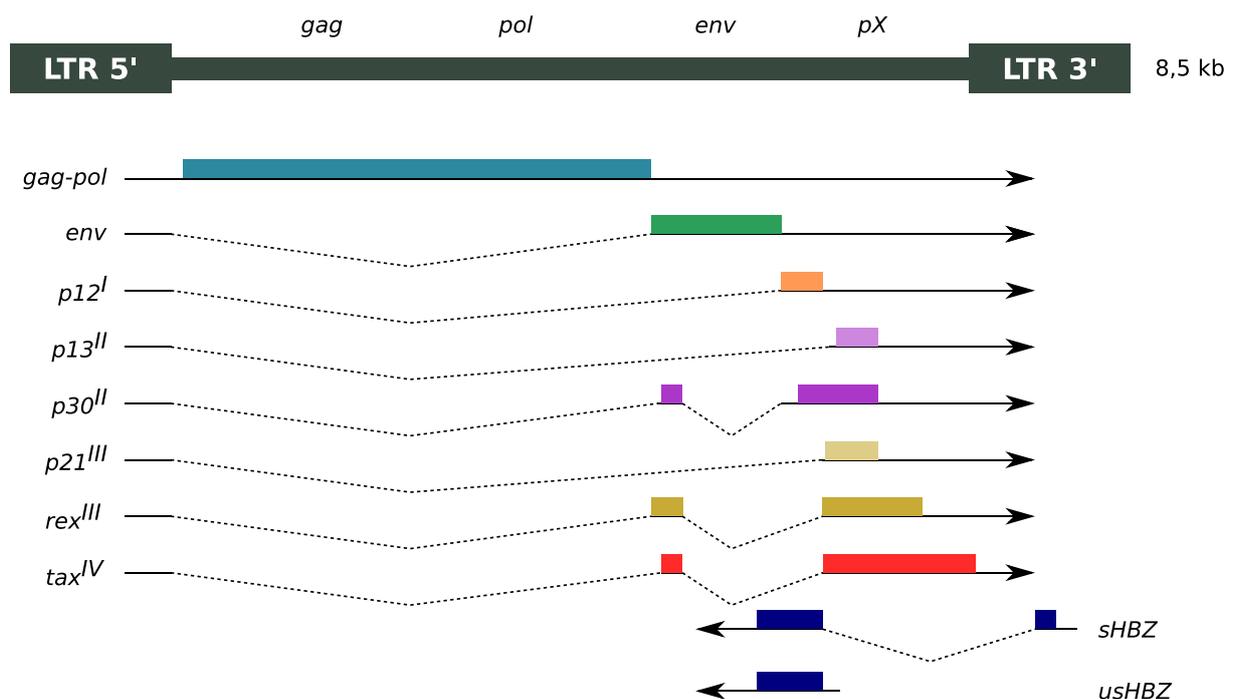


Figure 3 : Organisation du génome proviral d'HTLV-1.

Le génome proviral d'HTLV-1 code pour les protéines structurales et enzymatiques Gag, Pol et Env, mais aussi en 3' pour des protéines dites auxiliaires dans la région pX. Ces protéines sont codées sur quatre cadres de lecture différents (notés de I à IV ci-dessus), dont les transcrits sont épissés à différents degrés (l'épissage est représenté par les lignes pointillées). La protéine HBZ présente la particularité d'être codée en antisens depuis le LTR (Long Terminal Repeats) 3'. Deux transcrits sont produits à partir du gène *HBZ*, une forme épissée (*sHBZ*, pour spliced *HBZ*) et une forme non épissée (*usHBZ*, pour unspliced *HBZ*). Schéma inspiré de (Matsuoka and Jeang, 2007).

Dans le génome proviral, on retrouve les séquences codant pour les protéines structurales et enzymatiques essentielles. Le gène *gag-pol* est transcrit en un seul ARNm non épissé, et code pour les protéines de matrice, capsid et nucléocapsid ainsi que les enzymes virales. Le gène *env* est transcrit en un ARNm simplement épissé, et code pour les glycoprotéines d'enveloppe. En plus de ces séquences essentielles conservées chez tous les rétrovirus, on trouve en 3' une région pX qui code pour les protéines régulatrices et auxiliaires sur différents cadres de lecture (ORF, pour Open Reading Frame) : l'ORF I code pour la protéine p12 après un épissage simple, l'ORF II code pour la protéine p13 après un épissage simple et la protéine p30 après un épissage complet, l'ORF II code pour la protéine p21 après un épissage simple et la protéine Rex après un épissage complet, l'ORF IV code pour la protéine Tax après un épissage complet. Enfin, un dernier ORF est codé en antisens depuis le LTR 3' et code pour la protéine HBZ, qui existe sous deux formes, traduites à partir d'un transcrit épissé (*sHBZ*, pour spliced *HBZ*) ou non épissé (*usHBZ*, pour unspliced *HBZ*) (Yoshida *et al.*, 2008).

c) Cycle viral d'HTLV-1

HTLV-1 infecte principalement les lymphocytes T CD4+ *in vivo*, dans lesquels on retrouve plus de 90% de l'ADN proviral détectable chez les patient-es asymptomatiques ou atteint-es de HAM/TSP

(Richardson *et al.*, 1990). Néanmoins, HTLV-1 est capable dans une moindre mesure d'infecter d'autres types cellulaires, notamment les lymphocytes T CD8+ (Hanon *et al.*, 2000; Melamed *et al.*, 2015) et les cellules immunitaires de la lignée myéloïde comme les monocytes (Koyanagi *et al.*, 1993; de Castro-Amarante *et al.*, 2015) et les cellules dendritiques conventionnelles et plasmacytoïdes (Hishizawa *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2008). Il a également été montré que dans le cas de patient-es atteint-es de HAM/TSP, les astrocytes pouvaient être infectés (Lehky *et al.*, 1995), ainsi que les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (Afonso *et al.*, 2008).

Ce tropisme relativement large s'explique par les récepteurs cellulaires d'HTLV-1, qui permettent son entrée dans les cellules cibles, le récepteur de fusion étant le transporteur de glucose GLUT-1 (*Glucose Transporter-1*) (Manel *et al.*, 2003; Coskun and Sutton, 2005) qui est exprimé de façon ubiquitaire dans la plupart des tissus (avec toutefois des variations de niveau d'expression). D'autres corécepteurs, les Héparane Sulfate Protéoglycanes (HSPG) et la Neuropiline-1 (NRP-1), agissent de façon coordonnée avec GLUT-1. En effet, les HSPG permettent l'attachement du virus par l'interaction avec la protéine de surface SU. Les HSPG interagissent également avec NRP-1, ce qui permet la liaison de SU à NRP-1. Cela permet, probablement suite à des changements conformationnels, la liaison de SU et de la sous-unité transmembranaire TM à GLUT-1 et la fusion (Jones *et al.*, 2005; Ghez *et al.*, 2006; Lambert *et al.*, 2009). Malgré le tropisme d'entrée potentiellement large d'HTLV-1, la spécificité d'infection des lymphocytes T CD4+ observée *in vivo* peut s'expliquer par la surexpression de NRP-1 et des HSPG à la surface des lymphocytes T activés (Ghez *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2006), ainsi que par la prolifération massive des lymphocytes T CD4+ infectés induite par des facteurs viraux, comme nous le verrons par la suite.

Suite à l'interaction entre les récepteurs cellulaires et les glycoprotéines d'enveloppe, l'enveloppe de la particule virale fusionne avec la membrane plasmique, et la capside contenant l'ARN et les enzymes virales est libérée dans le cytoplasme. Comme pour les autres rétrovirus, l'ARN viral passe ensuite par une étape de transcription inverse qui permet la synthèse d'un ADN viral, qui entre dans le noyau sans doute à la faveur de la rupture de l'enveloppe nucléaire en mitose. Le déroulé ces étapes est encore mal connu pour HTLV-1. L'ADN viral est ensuite intégré dans le génome cellulaire grâce à l'intégrase virale (Figure 4). A ce stade, on parle de provirus pour désigner le génome viral intégré.

Infection par contact cellule - cellule

Infection par des particules virales libres

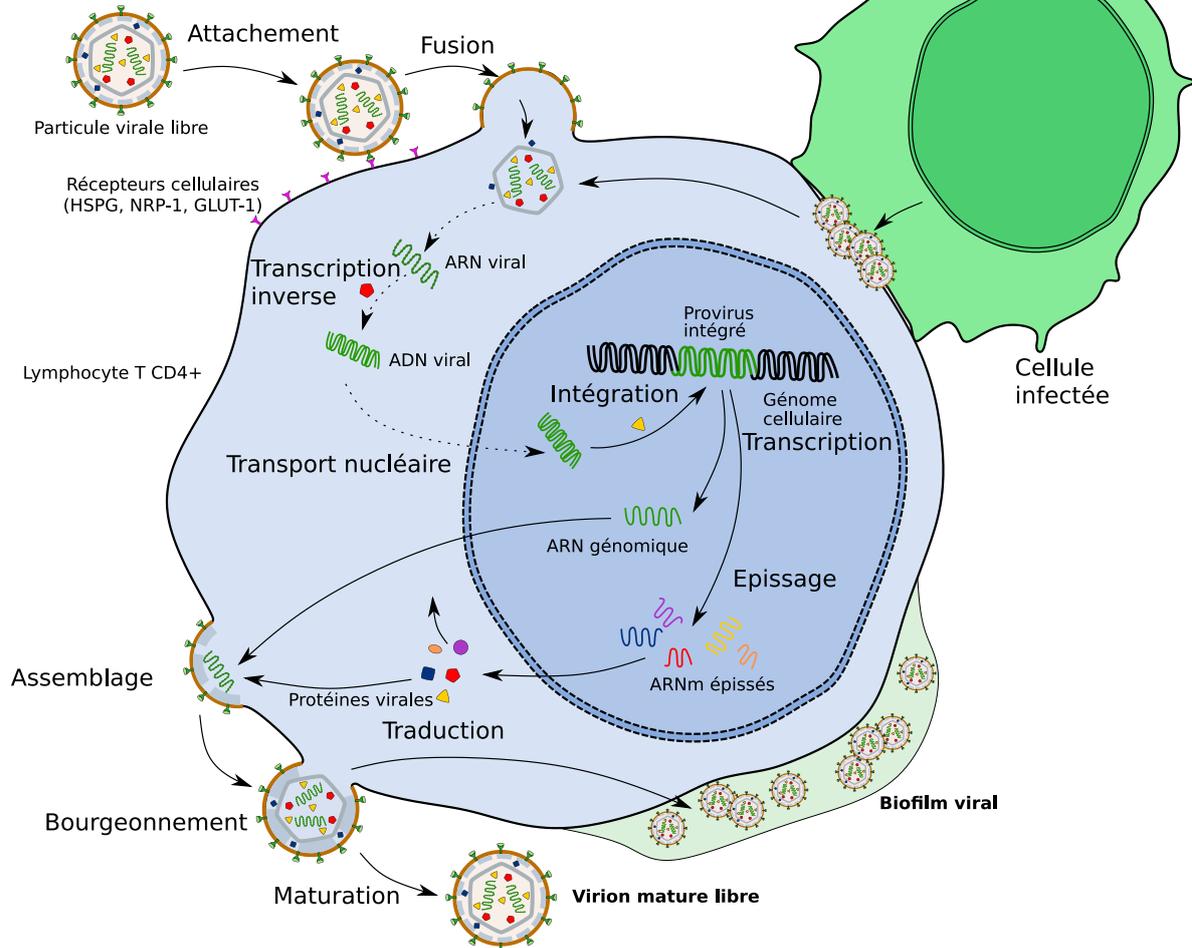


Figure 4 : Cycle viral d'HTLV-1.

Les particules virales libres ou libérées par une cellule infectée au contact de la cellule cible reconnaissent à la membrane plasmique des récepteurs spécifiques (HSPG, NRP-1, GLUT-1) qui permettent l'attachement et la fusion de la particule virale. La capsid est libérée dans le cytoplasme, et l'ARN viral est rétro-transcrit en ADN viral qui est importé dans le noyau de la cellule (ces étapes sont encore mal connues). L'ADN viral est alors intégré dans le génome cellulaire. La transcription du génome proviral en ARNm permet la synthèse des protéines virales. L'ARN génomique est également synthétisé. L'assemblage des particules virales à la membrane plasmique suivi de leur bourgeonnement permet leur libération dans le milieu extracellulaire, ou dans le biofilm viral exposé à la surface des cellules infectées. Une dernière étape de maturation protéolytique permet l'infectiosité des particules virales néoformées. Afin de rendre la lecture plus facile, l'échelle n'est pas respectée sur cette figure.

Le génome proviral est alors transcrit à l'aide de la machinerie cellulaire. Une fois la protéine Tax exprimée, celle-ci favorise à son tour l'expression du génome proviral en jouant un rôle de transactivateur au niveau du LTR 5' qui contient des séquences régulatrices dépendant de Tax (TRE, pour Tax Responsive Elements) (Giam and Xu, 1989; Beimling and Moelling, 1992). Les ARN pré-messagers synthétisés sont épissés par la machinerie cellulaire et exportés dans le cytoplasme,

permettant notamment la synthèse rapide des protéines virales Tax et Rex. Rex permet alors la stabilisation et l'export nucléaire des ARNm non épissés ou partiellement épissés, évitant ainsi leur épissage total par la machinerie cellulaire (Gröne, Koch and Grassmann, 1996), et ainsi la traduction des protéines structurales et enzymatiques Gag, Pro et Pol. L'expression et l'activité de ces protéines virales sont également la cible de rétroactions négatives, médiées par la protéines p13 qui réduit l'activité transactivatrice de Tax (Andresen *et al.*, 2011), la protéine p30 qui inhibe l'activité de Tax et Rex dans le noyau (Nicot *et al.*, 2004), et la protéine antisens HBZ qui inhibe la transcription médiée par Tax (Clerc *et al.*, 2008).

L'ARN génomique est également transcrit. La protéine Gag s'oligomérisse au niveau de la membrane plasmique et s'associe avec l'ARN génomique, permettant ainsi le bourgeonnement de nouvelles particules virales. Les particules virales formées sont initialement immatures, mais la protéase virale permet rapidement le clivage des polyprotéines Gag et Pol, rendant les particules virales matures et infectieuses (Martin *et al.*, 2016).

De façon générale, les protéines virales auxiliaires p12, p13, p30 et p21 jouent de nombreux rôles importants pour la mise en place et le maintien de l'infection *in vivo*, bien qu'elles soient non essentielles pour le cycle de réplication *in vitro*. Elles participent à la régulation de la transcription, la modulation de l'apoptose et de la prolifération cellulaire, l'infectiosité et la transmission virale et la modulation de la réponse immunitaire (pour revue, voir Edwards *et al.*, 2011).

d) Transmission virale de cellule à cellule

Comme nous l'avons décrit précédemment, des particules virales libres d'HTLV-1 peuvent reconnaître des cellules cibles et les infecter. Cependant, contrairement à de nombreux autres virus et notamment au rétrovirus VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), l'efficacité de la transmission par particules virales libres est extrêmement faible dans le cas d'HTLV-1, bien que les cellules dendritiques puissent être infectées par ce biais (Jones *et al.*, 2008). Pour les autres types cellulaires, la transmission intercellulaire se fait principalement par contact d'une cellule infectée avec une cellule non infectée (Figure 4).

Différents modes de transmission par contact cellule-cellule ont été décrits pour HTLV-1, et participent probablement de façon conjointe à cette transmission : la formation d'une synapse virologique et un bourgeonnement localisé au niveau de la zone de contact (Igakura *et al.*, 2003), le transfert d'un biofilm viral formé à la surface des cellules infectées et contenant notamment de nombreuses particules virales infectieuses (Pais-Correia *et al.*, 2010), et enfin la formation de conduits cellulaires entre les deux cellules (Van Prooyen *et al.*, 2010). Tous ces modes de transmission

impliquent des modifications importantes du cytosquelette d'actine et de tubuline ainsi que des propriétés d'adhésion cellulaire (pour revue, voir Gross and Thoma-Kress, 2016).

Lors de la transmission d'HTLV-1 entre les individus, cette transmission préférentielle par contact cellule-cellule explique que la transmission virale implique des fluides corporels contenant des cellules (sang, sperme, lait maternel), bien que les types cellulaires impliqués dans cette transmission ne soient pas encore précisément identifiés (Pique and Jones, 2012).

4. De la prolifération clonale au développement de l'ATL

a) Réplication virale par expansion clonale

Comme nous l'avons décrit dans la partie précédente, lorsqu'une cellule est infectée par HTLV-1, elle peut produire à son tour des particules virales et infecter des cellules saines *de novo*, que ce soit via des particules virales libres ou surtout via des contacts cellule-cellule. Cependant, un autre mode de réplication majeur d'HTLV-1 est la prolifération par expansion clonale (Wattel *et al.*, 1995; Cavrois *et al.*, 1996; Melamed *et al.*, 2015). En effet, lorsqu'une cellule infectée se divise, le provirus est répliqué avec l'ADN génomique dans lequel il est intégré, et chaque cellule fille possède une copie du provirus intégré. On définit alors un clone comme l'ensemble des cellules filles descendant de la division d'une cellule mère infectée. Toutes les cellules descendant de la même cellule mère infectée ont le même site d'intégration du provirus dans leur génome (Figure 5).

L'expansion clonale semble jouer un rôle prépondérant dans la réplication d'HTLV-1 : en effet, la grande stabilité génétique d'HTLV-1 par rapport à d'autres rétrovirus (Van Dooren *et al.*, 2004) suggère que la réplication virale se produit majoritairement via l'ADN polymérase cellulaire sur le génome intégré plutôt qu'avec des cycles d'infection *de novo* complets impliquant la transcriptase inverse virale, qui a un taux d'erreurs de réplication beaucoup plus élevé (Mansky, 2000; Overbaugh and Bangham, 2001). Il a été suggéré que la réplication par infection *de novo* pourrait jouer un rôle particulièrement important lors des phases précoces de l'infection, avec l'établissement d'un grand nombre de clones dont une grande partie sera ensuite maintenue pendant des années par expansion clonale, avec toutefois une émergence progressive de clones majoritaires suggérant une compétition entre les clones (Gillet *et al.*, 2011). De plus des estimations récentes montrent que l'infection *de novo* persiste lors de l'infection chronique, et crée probablement une centaine de nouveaux clones par jour, dont une partie importante est éliminée par le système, mais qui pourraient aussi participer au développement de l'ATL (Laydon *et al.*, 2020).

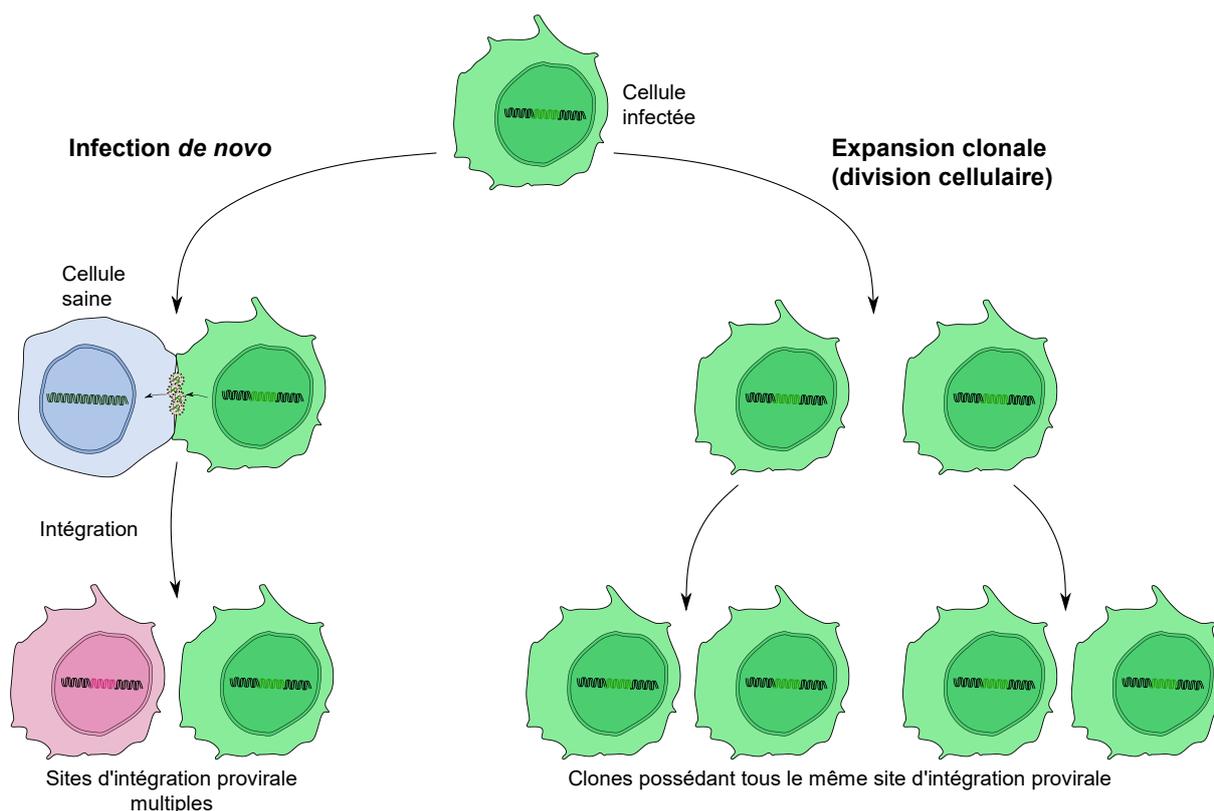


Figure 5 : Réplication virale par infection *de novo* ou expansion clonale.

Lorsqu'une cellule est infectée par HTLV-1, elle peut participer à la réplication virale de deux façons. D'une part, elle peut infecter des cellules saines *de novo* par la production de particules virales libres et surtout par contact cellule-cellule, conduisant à une nouvelle intégration du provirus dans le génome de la cellule cible. D'autre part, lorsqu'elle se divise, le génome proviral intégré est également répliqué, et les deux cellules filles possèdent chacune une copie intégrée. Les protéines virales contribuent à stimuler la prolifération cellulaire, favorisant ce mode de réplication. On parle d'expansion clonale.

b) La prolifération cellulaire est entretenue par des facteurs viraux

Cette expansion clonale des lymphocytes infectés par HTLV-1 est à mettre en relation avec la capacité de protéines virales d'activer la prolifération cellulaire et d'inhiber l'apoptose (Figure 6). Les deux protéines virales qui semblent jouer ce rôle de façon importante sont la protéine Tax et la protéine HBZ. En outre, les protéines auxiliaires p12 et p30 semblent également pouvoir favoriser la prolifération cellulaire : pour p12 en favorisant l'activation de la voie de signalisation JAK-STAT associée à la prolifération cellulaire, et pour p30 en favorisant la progression du cycle cellulaire (Edwards *et al.*, 2011). La protéine Tax semble jouer un rôle particulièrement important lors des phases précoces de l'infection, mais son expression est ensuite rapidement limitée par l'action de la protéine HBZ (Gaudray *et al.*, 2002) et par divers mécanismes d'inactivation génétique et épigénétique (mutations, méthylation) (Takeda *et al.*, 2004), en lien avec son fort pouvoir immunogène (Hanon *et al.*, 2000; Harashima *et al.*, 2004; Rowan *et al.*, 2014) qui conduit probablement à une sélection des cellules l'exprimant à bas niveau. Cependant, même dans les phases tardives, l'expression de Tax peut

subsister de façon transitoire sous forme de pics d'expression temporaires d'expression (expression en « burst ») (Billman, Rueda and Bangham, 2017; Mahgoub *et al.*, 2018). HBZ est exprimée de façon plus fréquente et durable dans les cellules infectées, néanmoins contrairement à ce qui a été longtemps pensé, son expression n'est pas non plus continue : si la protéine peut être détectée de façon continue chez les individus infectés dans la population globale de cellules, la protéine n'est pas exprimée dans chaque cellule individuelle à tout moment (Billman, Rueda and Bangham, 2017).

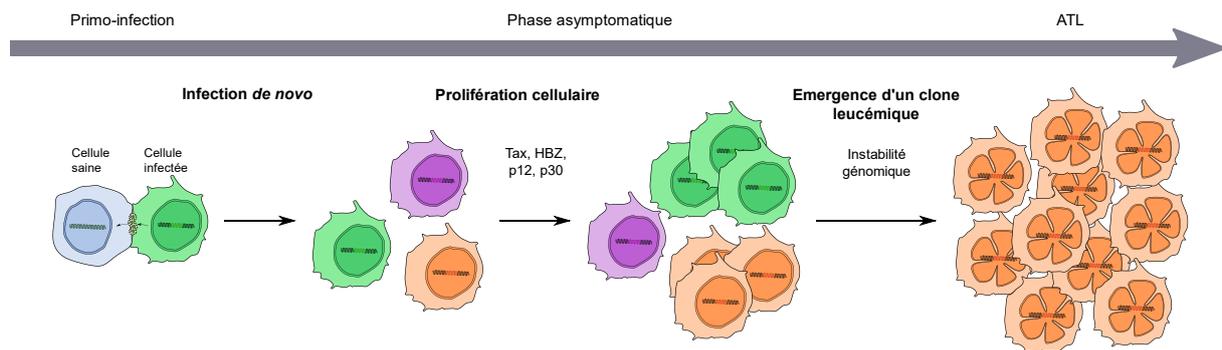


Figure 6 : De la prolifération cellulaire à l'émergence d'un clone leucémique

Lors des étapes précoces de l'infection, l'infection *de novo* permet l'infection de différentes cellules, avec des intégrations virales à différents endroits du génome cellulaire. L'expression de protéines virales (Tax, HBZ, p12, p30) va stimuler la prolifération cellulaire et inhiber l'apoptose, conduisant à l'émergence de populations clonales issues de la division d'une même cellule infectée. Avec le temps, l'instabilité génomique favorisée par l'infection peut conduire à l'émergence d'un clone leucémique qui va devenir majoritaire et sera responsable du développement de l'ATL.

Les voies de signalisation ciblées par les protéines Tax et HBZ sont multiples. Comme nous le reverrons plus en détail dans la partie suivante, Tax active fortement la voie NF- κ B, ce qui favorise la prolifération cellulaire. En outre, elle interagit également avec des kinases cycline-dépendantes (CDK, pour Cyclin-Dependent Kinase) et accélère la transition G1-S (Suzuki and Yoshida, 1997; Fraedrich, Müller and Grassmann, 2005), active la signalisation phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) / Akt (Liu *et al.*, 2001; Peloponese and Jeang, 2006), active la production de TGF β -1 (Transforming Growth Factor β -1) qui peut participer à la régulation de la prolifération des lymphocytes T (Kim *et al.*, 1990) et réprime la trans-activation médiée par p53, un gène suppresseur de tumeur essentiel (Suzuki, Uchida-Toita and Yoshida, 1999; Ariumi *et al.*, 2000; Zane *et al.*, 2012). HBZ quant à elle a l'originalité d'avoir des effets différents sous sa forme ARN ou protéique. En effet, l'ARN d'*hbz* semble inhiber l'apoptose via l'activation de la transcription de la Survivine, un inhibiteur de caspases impliquées dans l'apoptose, alors que sous sa forme protéique, HBZ semble plutôt promouvoir l'apoptose par ses effets pro-inflammatoires. A la fois l'ARN et la protéine semblent activer la prolifération cellulaire en favorisant le passage en phase S (Satou *et al.*, 2006; Mitobe *et al.*, 2015). HBZ a également été associée avec

d'autres protéines et voies de signalisation pouvant réguler la prolifération cellulaire, notamment ATF-3 et les membres de la famille Jun (pour revue, voir Martin *et al.*, 2016).

Cette activation dérégulée de la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose induites par Tax et HBZ contribuent certainement au processus d'oncogenèse. Il a d'ailleurs été montré que la seule expression de ces deux protéines de façon conjointe dans des souris transgéniques est suffisante pour induire une leucémie, même en l'absence des autres facteurs viraux (Zhao, Satou and Matsuoka, 2014), soulignant leur importance dans l'oncogenèse induite par HTLV-1. Dans cette étude, les auteurs ont également montré que l'expression de la protéine HBZ seule, mais pas de la protéine Tax seule, conduit au développement d'une pathologie similaire dans ce modèle, suggérant que les rôles de chacune de ces protéines et leurs interactions sont complexes *in vivo*. Nous allons maintenant nous intéresser plus particulièrement à la protéine Tax.

B. Rôle central de la protéine Tax dans la transformation cellulaire

1. Structure et localisation subcellulaire de Tax

Tax est une protéine composée de 353 acides aminés. Si sa structure n'a pas encore été élucidée à ce jour, de nombreux domaines fonctionnels de la protéine ainsi que ses modifications post-traductionnelles ont été largement décrites.

Parmi les domaines structuraux de la protéine, on retrouve un signal de localisation nucléaire (NLS) qui correspond à un motif en doigt de Zinc et un signal d'export nucléaire (NES), une région de liaison à l'ADN, ainsi que deux régions en leucine zipper (LZR, pour Leucine Zipper-like Region) impliquées dans la dimérisation de la protéine ainsi que dans des interactions protéine-protéine. On trouve également des domaines fonctionnels impliqués dans l'activation du LTR viral et les interactions avec les facteurs CREB et CBP/p300 ainsi que dans l'activation de la voie NF- κ B. Enfin, le motif PBM (PDZ-Binding Motif) situé à l'extrémité C-terminale permet l'interaction de Tax avec divers partenaires protéiques contenant un motif PDZ (Post synaptic density protein (PSD95), *Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1) and Zonula occludens-1 protein (zo-1)*) (Figure 7).

La localisation subcellulaire de Tax est variable selon les types cellulaires. Elle localise dans deux régions principales : au niveau du noyau des cellules, où elle forme des corps nucléaires ou « speckles » où a lieu une transactivation importante du génome cellulaire (Semmes and Jeang, 1996), ou au niveau du cytoplasme, dans une région péri-nucléaire correspondant à l'appareil de Golgi et au centrosome (Nejmeddine *et al.*, 2005).

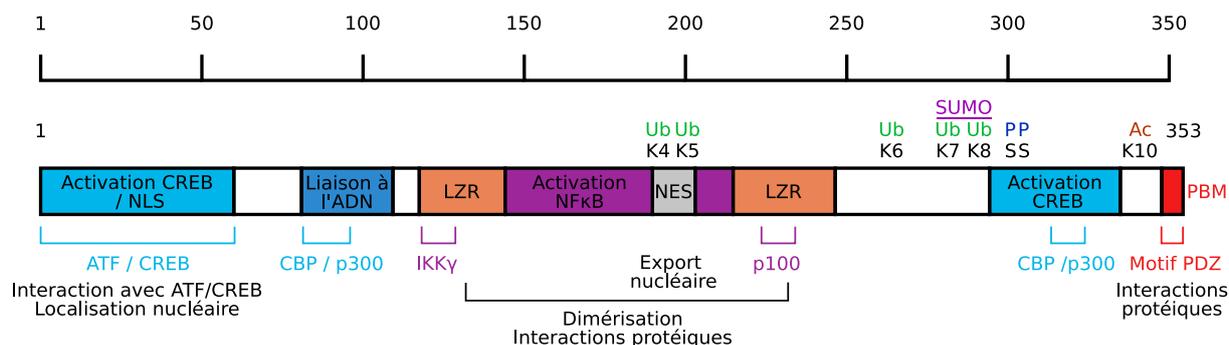


Figure 7 : Structure et modifications post-traductionnelles de la protéine Tax.

La protéine Tax possède différents domaines fonctionnels qui ont été décrits comme étant impliqués dans l'activation du LTR viral, l'activation de la voie NF- κ B, la localisation cellulaire et les interactions protéine-protéine. Certains résidus de la protéine peuvent également être la cible de modifications post-traductionnelles, dont les principales ont été représentées ici : ubiquitination (Ub), SUMOylation (SUMO), phosphorylation (P) et acétylation (Ac). NLS : Nuclear Localisation Signal ; LZR : Leucine Zipper-like motif Region ; NES : Nuclear Export Signal ; PBM : PDZ-Binding Motif. Inspiré de (Romanelli *et al.*, 2013).

Tax est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles (Figure 7) qui modulent sa localisation et ses fonctions. Notamment, sa phosphorylation sur les résidus sérine en position 300 et 301 contrôle sa localisation au niveau des corps nucléaires et est nécessaire pour ses fonctions transactivatrices et la modulation de la voie NF- κ B (Bex *et al.*, 1999). L'ubiquitination de Tax sur ses résidus lysine 4 à 8 (en position 189, 197, 263, 280 et 284) est impliquée dans son interaction avec le protéasome (Chiari *et al.*, 2004) et dans l'activation cytoplasmique de la voie NF- κ B, en association avec la SUMOylation des résidus lysine 7 et 8 (Lamsoul *et al.*, 2005; Nasr *et al.*, 2006). L'ubiquitination et la SUMOylation de Tax semblent également contribuer à la régulation de sa localisation cellulaire entre les corps nucléaires et le centrosome (Kfoury *et al.*, 2011). Enfin, l'acétylation de Tax sur son résidu lysine 10 (en position 346) semble également participer à l'activation de la voie NF- κ B (Lodewick *et al.*, 2009).

2. La protéine Tax joue de nombreux rôles essentiels lors de l'infection et favorise la transformation cellulaire

a) Tax est un transactivateur viral

Un des rôles importants de Tax lors de l'infection est celui de transactivateur viral : en effet, Tax permet d'augmenter l'expression du génome proviral intégré à partir du LTR 5'. Tax est recrutée au niveau de séquences spécifiques, les TRE (Tax Responsive Elements), qui ont la particularité de contenir un motif CRE (CREB Response Element). C'est l'interaction de Tax avec des facteurs CREB qui permet sa fixation au niveau des TRE (Giam and Xu, 1989; Ching *et al.*, 2004). Tax favorise également la O-GlcNAcylation de CREB, ce qui augmente la fixation des facteurs CREB et la transactivation du LTR (Groussaud *et al.*, 2017). Tax permet ensuite le recrutement de coactivateurs de la famille de p300 et

TORC (Transducers of regulated CREB) (Harrod *et al.*, 1998; Siu *et al.*, 2006), qui favorisent le remodelage de la chromatine et une augmentation de l'activité transcriptionnelle.

Des facteurs de transcription sont alors recrutés au niveau de la boîte TATA adjacente. Tax favorise et stabilise la fixation des facteurs de transcription TFIIA (Transcription Factor II A), TFIID (Transcription Factor II D) et TFIIH (Transcription Factor II H) (Caron *et al.*, 1993; Clemens *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 2000; Martella *et al.*, 2020) et du facteur PTEF (Positive Transcription Elongation Factor) (Cho *et al.*, 2007), ce qui favorise également la transcription.

b) Tax module des voies de survie et de prolifération cellulaire

- Activation de la voie Akt

La voie Akt est une voie de signalisation cellulaire impliquée notamment dans la prolifération et la survie cellulaire. Akt est une kinase dont l'activité est régulée par sa phosphorylation par la kinase PI3K, en réponse à des facteurs de croissance (Song *et al.*, 2005). Elle régule l'activité de facteurs de transcription comme AP1 (Activator Protein 1).

Tax active la voie Akt en se liant directement à PI3K et en favorisant la phosphorylation d'Akt (Liu *et al.*, 2001; Peloponese and Jeang, 2006), ce qui induit l'activation de la voie NF- κ B, l'inhibition de p53 et donc la résistance à l'apoptose, et la survie cellulaire de façon générale (Jeong *et al.*, 2005). L'activation de cette voie semble importante pour le maintien de la prolifération des cellules ATL (Ikezoe *et al.*, 2007).

- Activation de la voie NF- κ B

La voie NF- κ B est une voie de signalisation cellulaire extrêmement importante, impliquée dans la survie et la prolifération cellulaire, la production de cytokines ou encore de molécules d'adhésion. Elle est présente de façon ubiquitaire dans les cellules, mais joue un rôle particulièrement important dans les cellules immunitaires.

NF- κ B est une famille de facteurs de transcription comprenant cinq protéines appelées p50, p52, RelA / p65, RelB et c-Rel, qui régulent l'expression de gènes cibles en se liant aux séquences régulatrices sous forme d'hétéro- ou d'homodimères.

L'activité de ces facteurs de transcription est régulée par leur localisation cellulaire : en effet, en l'absence de stimulus, ils sont séquestrés dans le cytoplasme par leur association avec des protéines inhibitrices I κ B (I κ B α , I κ B β et I κ B ϵ). Plus précisément, l'association avec I κ B α n'empêche pas l'import nucléaire des facteurs de transcription, qui possèdent une séquence de localisation nucléaire (NLS, pour Nuclear Localisation Signal), néanmoins I κ B α porte une séquence d'export nucléaire (NES, pour Nuclear Export Signal) plus forte que le signal d'import nucléaire. Cela mène à une localisation

nucléaire seulement transitoire des facteurs de transcription, trop courte pour induire l'expression de gènes cibles (Birbach *et al.*, 2002). Dans le cas de l'association à d'autres I κ B, au contraire, c'est directement l'import nucléaire qui est bloqué, l'association aux inhibiteurs masquant les séquences NLS (Tam and Sen, 2001).

En présence de signaux d'activation, les I κ B subissent des modifications post-traductionnelles (phosphorylations, ubiquitination), généralement induites par des I κ B kinases (IKK), ce qui conduit à leur dégradation et à la libération des facteurs de transcription NF- κ B qui sont alors transloqués dans le noyau où ils modulent l'expression de leurs gènes cibles.

Les signaux d'activation et intermédiaires de signalisation impliqués sont divers, et permettent classiquement de distinguer une voie NF- κ B dite « canonique », qui correspond à la première voie décrite historiquement, et une voie dite « non-canonique ». Néanmoins, il existe également des voies alternes qui varient légèrement par rapport à ces deux principales voies, même si nous nous concentrerons ici sur celles-ci.

Les signaux d'activation de la voie canonique sont divers et peuvent être détectés par un grand nombre de cellules. Il s'agit principalement de l'activation de récepteurs de cytokines, comme les récepteurs au TNF α (TNFR, pour Tumor Necrosis Factor Receptor), de récepteurs de la famille des Toll-like receptor (TLR) / récepteurs à l'IL-1 (IR-1R), de récepteurs aux facteurs de croissance (GF-R, pour Growth Factors receptor) ou de l'engagement du TCR (T-Cell Receptor) pour les lymphocytes T (Napetschnig and Wu, 2013). Suite à l'activation de ces récepteurs, des cascades de signalisation sont activées, impliquant notamment le recrutement d'E3 ubiquitine ligases telles que TRAF6 ou LUBAC qui synthétisent des chaînes d'ubiquitine qui permettent le recrutement des complexes IKK et TAK1 via leurs domaines de liaison à l'ubiquitine. Le complexe IKK est formé par IKK β / IKK2, IKK α / IKK1 et IKK γ / NEMO (pour NF- κ B Essential MOdulator). IKK β / IKK2 est une sous-unité catalytique, qui est activée par phosphorylation par TAK1 ou par autophosphorylation. IKK γ / NEMO joue un rôle régulateur, et favorise notamment le recrutement de TAK1 (Hinz and Scheidereit, 2014). Suite à son activation, IKK β / IKK2 phosphoryle I κ B α , ce qui permet alors la libération du dimère RelA / p65 – p50 caractéristique de la voie canonique et son import nucléaire (Fochi *et al.*, 2019) (Figure 8).

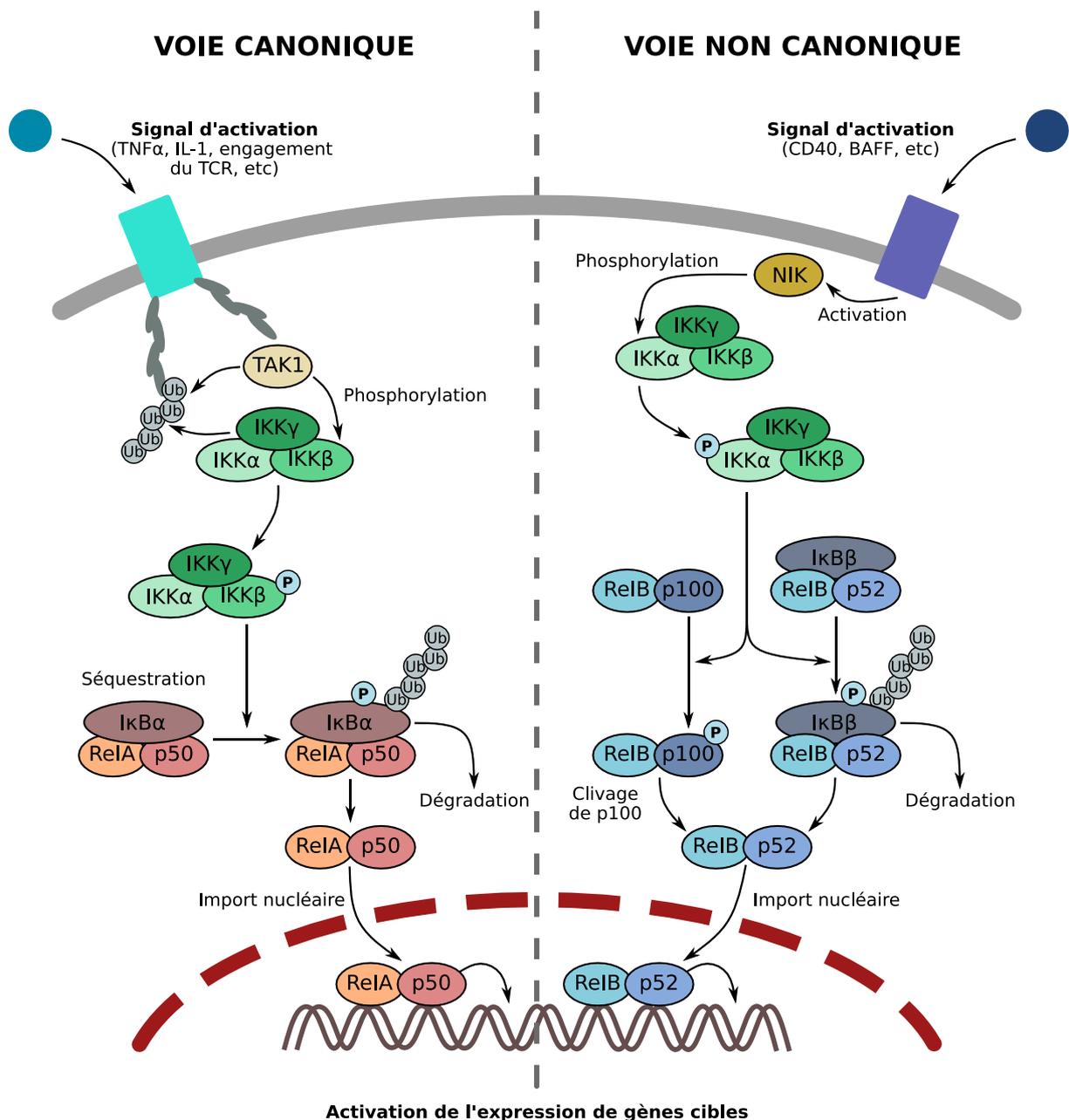


Figure 8 : Activation des voies NF- κ B canonique et non canonique.

Suite à un signal extracellulaire, des kinases permettent la phosphorylation de protéines IKK. Celles-ci induisent à leur tour la phosphorylation et l'ubiquitination des protéines inhibitrices I κ B et leur dégradation. Cela permet la libération des facteurs de transcription NF- κ B qui étaient séquestrés dans le cytoplasme et leur import nucléaire, conduisant à l'activation de l'expression de leurs gènes cibles.

La voie non-canonique est activée par d'autres stimuli, comme par exemple l'engagement de CD40 avec CD40L, ou des cytokines de la famille du TNF comme BAFF (pour B Cell-Activating Factor), qui conduisent à la stabilisation de la kinase NIK (pour NF- κ B Interacting Kinase), qui phosphoryle alors IKK α . IKK α va à son tour phosphoryler p100, qui joue un rôle d'I κ B et est associée en complexe avec RelB. Suite à cette phosphorylation, p100 est clivée en p52, et le complexe p52 / RelB transloque dans le noyau et active l'expression de gènes cibles (Vallabhapurapu *et al.*, 2008) (Figure 8).

Un lien entre la transformation cellulaire médiée par HTLV-1 et la capacité de Tax à induire la voie NF- κ B a été suggéré assez tôt (Ballard *et al.*, 1988). Cette hypothèse a été validée par l'observation que des mutants capables de transactiver le LTR mais pas d'activer la voie NF- κ B perdaient leur capacité à induire la transformation de fibroblastes de rat (Yamaoka *et al.*, 1996). Depuis, les modalités de l'activation de la voie NF- κ B par Tax ont fait l'objet de nombreuses études, qui mettent en évidence des mécanismes d'activation complexes des voies canonique et non canonique, comme nous allons le voir.

Dans le cas de la voie canonique, il semble que Tax est impliquée de façon importante dans l'activation des kinases IKK, conduisant à la dégradation de l'inhibiteur I κ B α et à la translocation nucléaire du complexe RelA / p65 – p50 (Sun *et al.*, 1994; Geleziunas *et al.*, 1998). Plus précisément, Tax semble activer le complexe IKK en interagissant avec IKK γ / NEMO et en favorisant ainsi le recrutement du complexe au niveau de radeaux lipidiques associés à l'appareil de Golgi, en région péri-centrosomale (Huang *et al.*, 2009). Ce recrutement nécessite l'ubiquitination de Tax, médiée notamment par l'E2-ubiquitine-ligase Ubc13 (Shembade *et al.*, 2007; Kfoury *et al.*, 2008), et le niveau d'activation de la voie NF- κ B semble directement corrélé au niveau d'ubiquitination de Tax (Bonnet *et al.*, 2012). L'enzyme E3-ubiquitine ligase RNF8 (RING Finger protein 8) semble jouer un rôle important dans cette activation en catalysant la synthèse de chaînes libres d'ubiquitine de type K63, non fixées sur une protéine, qui recrutent et activent TAK1 et le complexe IKK (Ho *et al.*, 2015). Le complexe LUBAC pourrait également être recruté par ces chaînes libres d'ubiquitine de type K63, et induire la formation de chaînes d'ubiquitine linéaires de type M1, favorisant à leur tour le recrutement de IKK γ / NEMO (Shibata *et al.*, 2017) (Figure 9). Cette ubiquitination est également stabilisée par l'interaction de Tax avec des facteurs cellulaires tels que TAX1BP1 (Tax-1 Binding Protein) et OPTN / NRP (Optineurine / NEMO-Related Protein) (Jouno *et al.*, 2009).

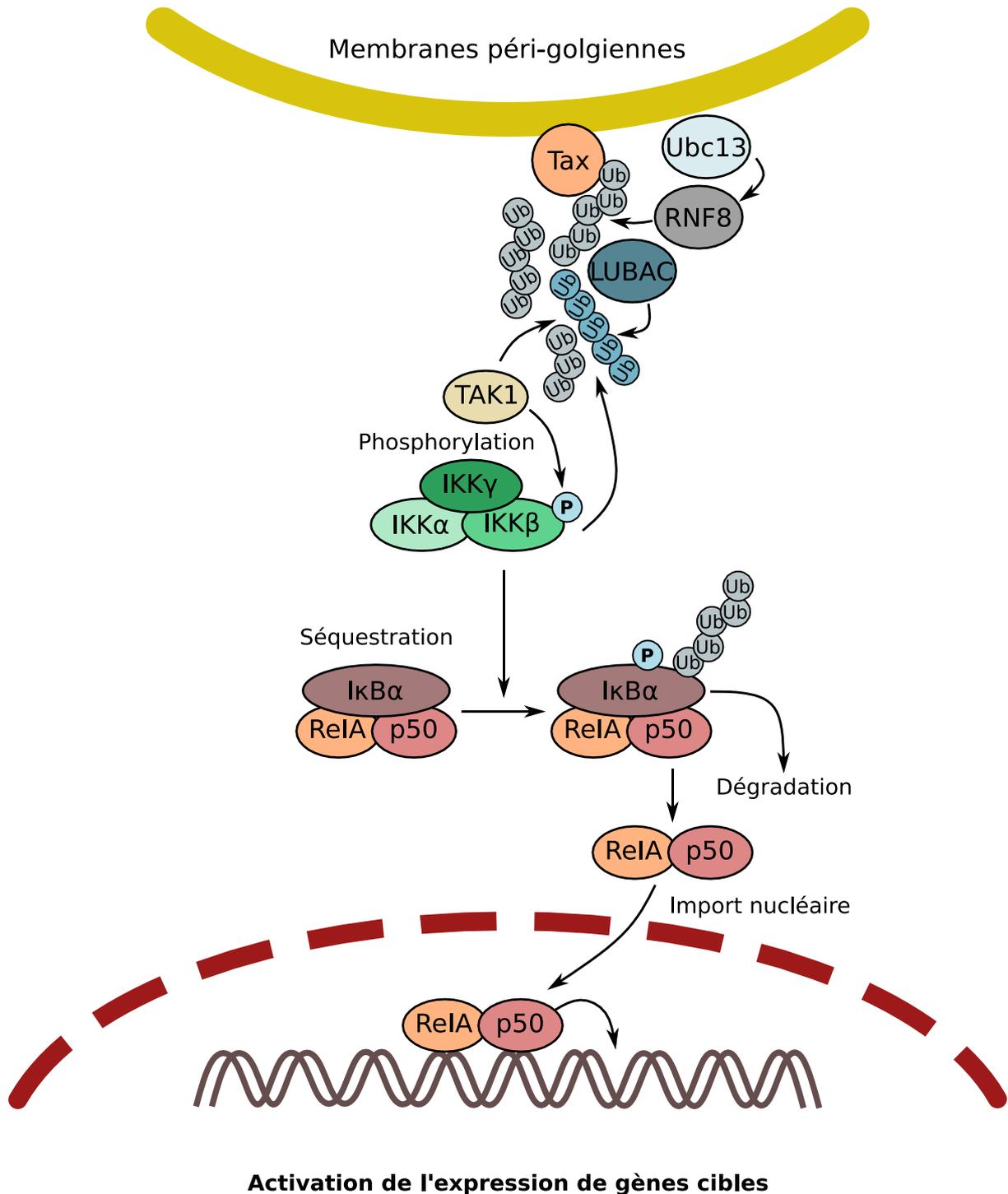


Figure 9 : Modulation de la voie NF-κB canonique par Tax.

Tax recrute la kinase TAK1 et le complexe IKK au niveau de membranes péri-golgiennes, favorisant ainsi l'activation de ce complexe, la phosphorylation de l'inhibiteur IκBα et l'import nucléaire des facteurs du complexe RelA / p65 – p50 et l'activation de l'expression de gènes cibles. Le recrutement de TAK1 et du complexe IKK est médié par l'ubiquitination de Tax et des chaînes libres d'ubiquitine dont la synthèse implique l'E2-ubiquitine ligase Ubc13 et les E3-ubiquitine ligases RNF8 et LUBAC.

Dans le cas de la voie non-canonique, il semble que Tax module l'activation de celle-ci essentiellement en se liant de façon directe à la protéine p100. Cette interaction favorise le

recrutement de la kinase IKK α , la phosphorylation de p100 et son clivage en p52 (Xiao *et al.*, 2001). Cela permet la libération du complexe ReIB – p52, son import nucléaire et l'activation de l'expression de gènes cibles (Figure 10).

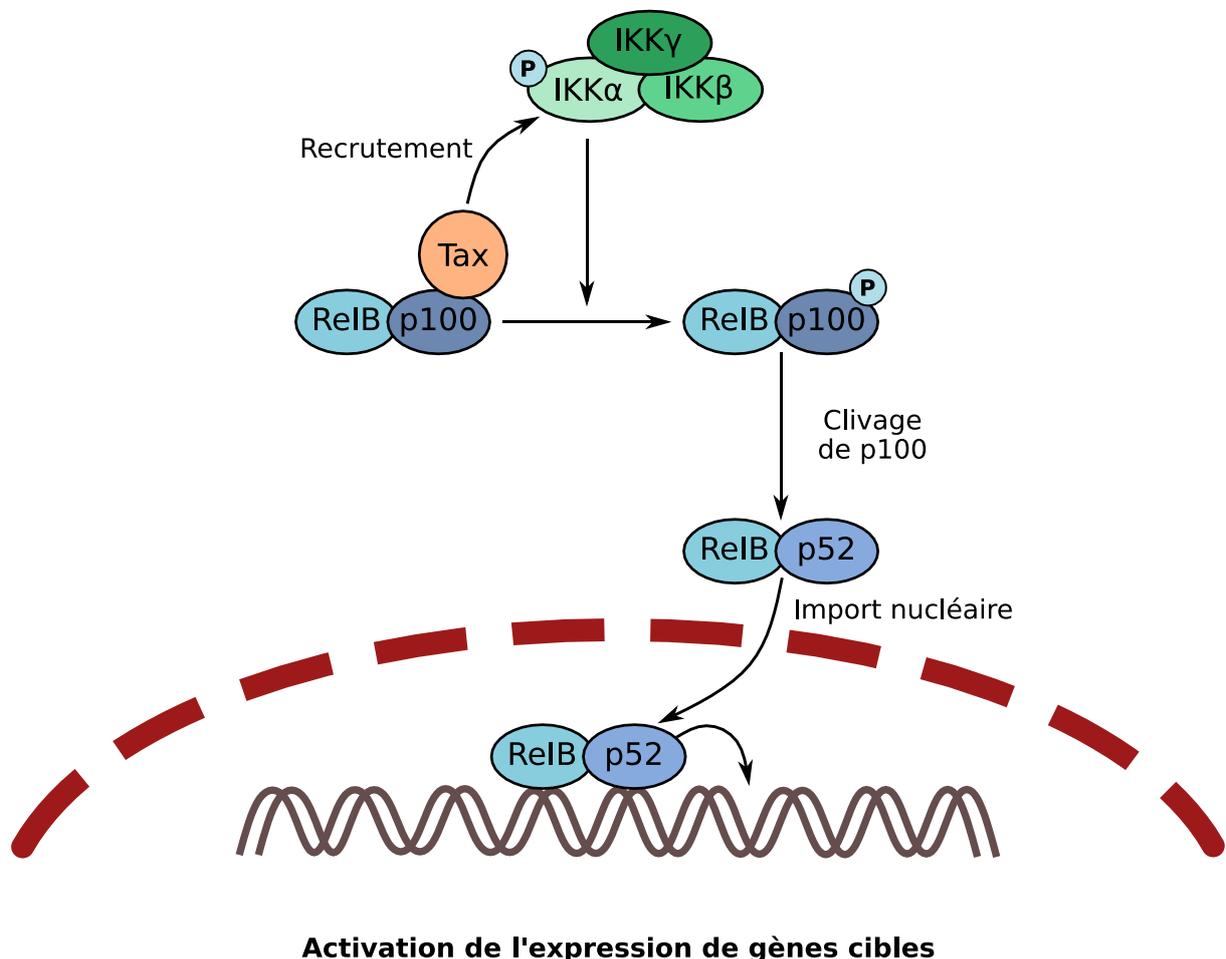


Figure 10 : Modulation de la voie NF- κ B non-canonique par Tax.

Tax se lie à l'inhibiteur p100 et favorise le recrutement de la kinase IKK α , ce qui entraîne la phosphorylation de p100 et son clivage en p52. Le complexe ReIB – p52 pourra alors être importé dans le noyau et activer l'expression de gènes cibles.

L'activation des voies NF- κ B et AKT favorise la survie et la prolifération cellulaire, et limite également l'apoptose, notamment par la transactivation du promoteur de bcl-xl (Tsukahara *et al.*, 1999). Néanmoins, il a aussi été montré que la suractivation de la voie NF- κ B pouvait induire la sénescence (Zhi *et al.*, 2011) et l'apoptose (Chlichlia *et al.*, 1995; Rivera-Walsh *et al.*, 2001). La protéine HBZ semble jouer un rôle important dans la mitigation de la sénescence liée à la suractivation de la voie NF- κ B (Philip *et al.*, 2014), reflétant une balance complexe entre ces protéines virales nécessaire à l'induction de la prolifération et de la survie cellulaire via la voie NF- κ B.

c) Tax dérégule le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases : la phase G1 (Growth phase 1), qui permet à la cellule de se préparer à la réplication de l'ADN, la phase S (Synthesis Phase) au cours de laquelle a lieu la réplication de l'ADN, la phase G2 (Growth Phase 2) pendant laquelle la cellule se prépare à la division cellulaire, et enfin la phase M (mitose) qui correspond à la division cellulaire. La progression du cycle cellulaire est finement régulée dans les cellules, via des complexes entre cyclines et CDK (kinases cycline-dépendantes), dont l'expression varie au cours du cycle cellulaire. Ces complexes sont régulés notamment par des inhibiteurs de CDK (CKI, pour CDK Inhibitors), notamment la famille Ink4 et la famille Cip/Kip. Lors du cycle cellulaire, deux étapes sont particulièrement contrôlées : l'entrée en phase S et l'entrée en phase M. A chacune de ces étapes, des checkpoints cellulaires permettent de s'assurer que les étapes précédentes ont été correctement réalisées et que la cellule est prête à s'engager dans l'étape suivante du cycle cellulaire. La transition G1-S est contrôlée par la protéine pRb (Retinoblastoma protein), qui séquestre le facteur de transcription E2F indispensable pour induire l'expression de gènes nécessaires à la transition G1-S et à la réplication de l'ADN pendant la phase S. Lors de la phase G1, pRb est phosphorylée par le complexe Cycline D / CDK (4/6) puis par le complexe Cycline (E/A) / CDK2, ce qui mène à son inactivation et à sa dégradation et à la libération d'E2F qui peut alors transloquer au noyau et induire l'expression de ses gènes cibles. La transition G2-M est quant à elle contrôlée par le complexe cycline B / CDK1 qui active par phosphorylation le facteur de transcription FoxM1, qui lui-même active l'expression des gènes nécessaires au passage en mitose (Lim and Kaldis, 2013).

Tax favorise la progression du cycle cellulaire et en particulier la transition G1-S (Schmitt *et al.*, 1998), en activant un certain nombre d'activateurs de transition de phase du cycle cellulaire d'une part, et d'autre part en inactivant des inhibiteurs (Figure 11).

Plus précisément, Tax augmente l'expression des Cyclines D1 et D2 de la phase G1 par une activation transcriptionnelle directe au niveau du promoteur, ainsi que de façon indirecte pour la cycline D2 via la signalisation Interleukine 2 (IL2) (Santiago *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2010).

De plus, Tax active également des CDK, notamment CDK4 et CDK6, ce qui conduit à l'inactivation par phosphorylation et/ou la dégradation de pRb et à la libération subséquente du facteur de transcription E2F qu'elle séquestre, ce qui *in fine* accélère la transition G1-S (Iwanaga *et al.*, 2001, 2008; Haller *et al.*, 2002; Kehn *et al.*, 2005). Tax pourrait également activer la transcription de E2F1 (Lemasson *et al.*, 1998). Tax favorise également l'activité des CDKs en limitant la transcription de leurs inhibiteurs CKI comme notamment INK4C, INK4D et KIP1 (Akagi, Ono and Shimotohno, 1996; Iwanaga

et al., 2001). Tax se lie également directement à INK4A et INK4B, conduisant à leur inactivation (Suzuki et al., 1999).

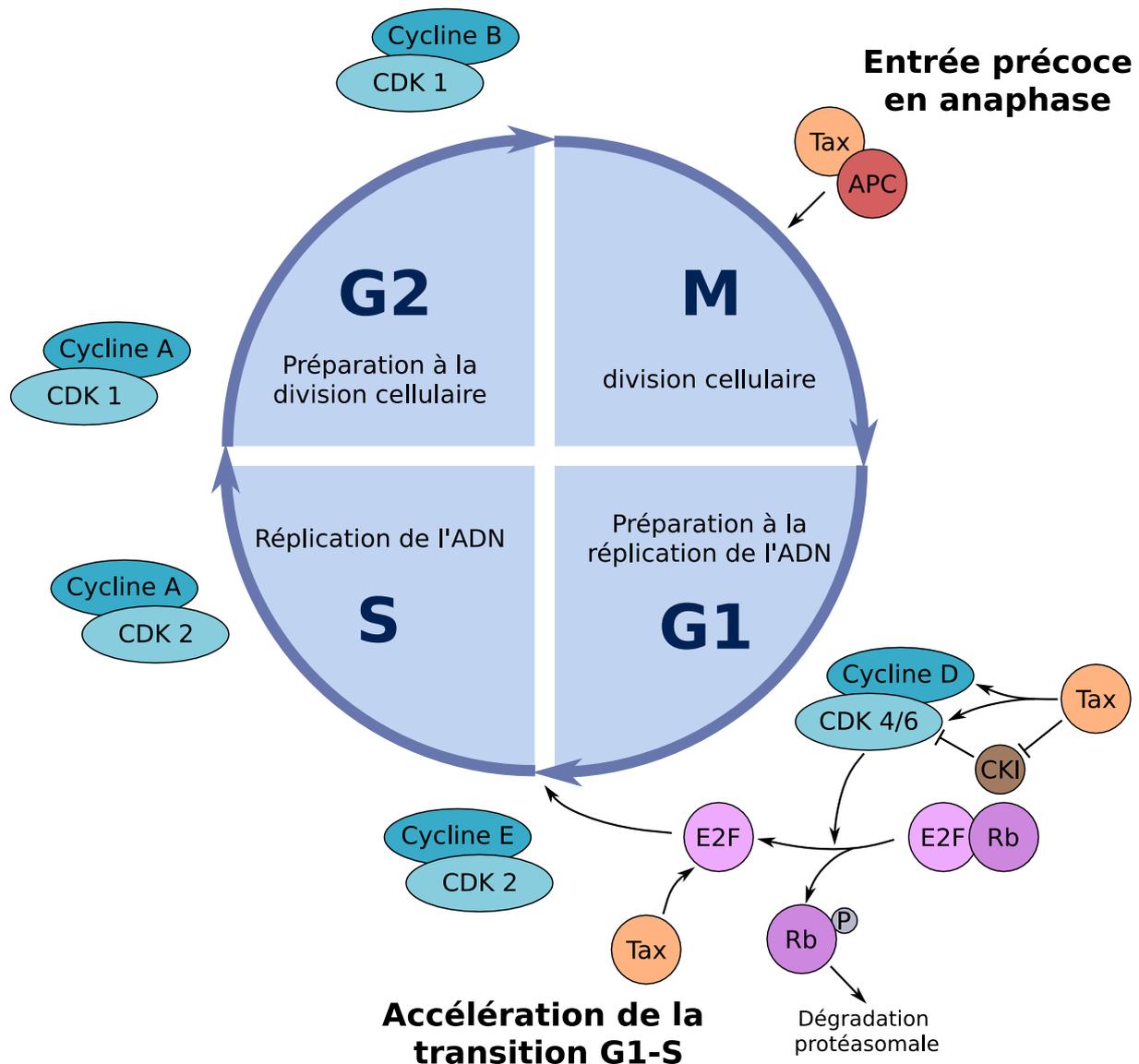


Figure 11 : Tax accélère la progression du cycle cellulaire.

La progression du cycle cellulaire est finement régulée à l'aide des complexes Cycline/CDK qui varient lors du cycle cellulaire. Tax favorise la progression du cycle cellulaire, en particulier à la transition G1-S en favorisant l'activité de la cycline D et des CDK 4 et 6, ce qui permet la phosphorylation et la dégradation de Rb et l'activité de E2F. Cela conduit à la transcription des gènes nécessaires au passage en phase S. En mitose, Tax favorise également l'entrée en anaphase en interagissant avec le complexe APC et en l'activant.

Enfin, Tax peut également accélérer le cycle cellulaire en interagissant directement avec des effecteurs du cycle cellulaire situés en aval des complexes Cycline / CDK, comme lors de l'anaphase : Tax active le complexe APC (Anaphase Promoting Complex) qui promeut le passage en anaphase. En l'absence de Tax, le complexe APC est inhibé tant que les chromatides sœurs ne sont pas attachées correctement aux microtubules du fuseau mitotique, ce qui empêche la progression de la mitose

jusqu'à un assemblage du fuseau mitotique correct. Tax se lie au complexe APC et l'active, ce qui peut donc entraîner une entrée précoce en anaphase et permet une tolérance aux altérations du fuseau mitotique (Liu *et al.*, 2005).

d) Tax favorise les dommages à l'ADN

L'accumulation de mutations, en lien souvent avec des dommages à l'ADN, est une caractéristique partagée par la plupart des cellules cancéreuses, et favorise généralement la dérégulation du fonctionnement cellulaire associée à l'oncogenèse. Cette instabilité génomique a également été observée pour HTLV-1, avec de nombreuses anomalies du caryotypes présentes dans la plupart des cas d'ATL (Ohshima *et al.*, 1998). Plus récemment, une analyse du génome de nombreux échantillons d'ATL (whole genome analysis) a permis de décrire plus précisément les mutations fréquemment associées à l'ATL, incluant notamment la signalisation du TCR et la voie NF- κ B, susceptibles de jouer un rôle moteur dans le développement de la maladie (Kataoka *et al.*, 2015).

Tax elle-même a été impliquée dans l'établissement et le maintien des dommages à l'ADN observés dans les cellules ATL (Marriott, Lemoine and Jeang, 2002) (Figure 12). Cela a d'abord été suggéré par l'observation que l'expression de Tax induit la formation de micronoyaux (Majone, Semmes and Jeang, 1993), qui sont associés à des dommages chromosomiques ou des défauts mitotiques (Parry and Parry, 1987; Thomson and Perry, 1988).

D'abord, Tax favorise directement l'apparition de dommages à l'ADN. Elle inhibe notamment l'expression de la télomérase (hTERT, pour human telomerase reverse transcriptase) (Gabet *et al.*, 2003), qui protège normalement les extrémités des chromosomes en catalysant la synthèse des télomères, ce qui empêche leur raccourcissement progressif lors des divisions cellulaires. Tax réduit également l'expression de la protéine KU80 qui est impliquée dans la stabilisation des dommages double brin (DSB, pour Double Strand Break) (Majone *et al.*, 2005). Par ailleurs, elle induit la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, pour Reactive Oxygen Species), qui favorisent les dégâts à l'ADN (Kinjo *et al.*, 2010).

De plus, Tax inhibe les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN, qui permettent normalement de prendre en charge ces dommages et de limiter leur impact. Tax inhibe notamment la réparation par excision de base (BER, pour Base Excision Repair) (Jeang *et al.*, 1990; Philpott and Buehring, 1999), la réparation par excision de nucléotide (NER, pour Nucléotide Excision Repair) (Kao and Marriott, 1999) et la réparation des mésappariements (MMR, pour Mismatch Repair) (Morimoto *et al.*, 2005).

Enfin, Tax inhibe un certain nombre de checkpoints conduisant à l'arrêt du cycle cellulaire en cas de dommages à l'ADN, en phase G1 (Haoudi and Semmes, 2003) ou à la transition G2/M par son

interaction avec CHK1 (Park *et al.*, 2004). Elle inhibe également la protéine p53, qui joue un rôle central dans l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation des dommages à l'ADN, et induit l'apoptose si ces dommages ne sont pas réparés, par des mécanismes qui semblent multiples (Ariumi *et al.*, 2000; Pise-Masison *et al.*, 2000; Miyazato *et al.*, 2005; Ohsugi *et al.*, 2013).

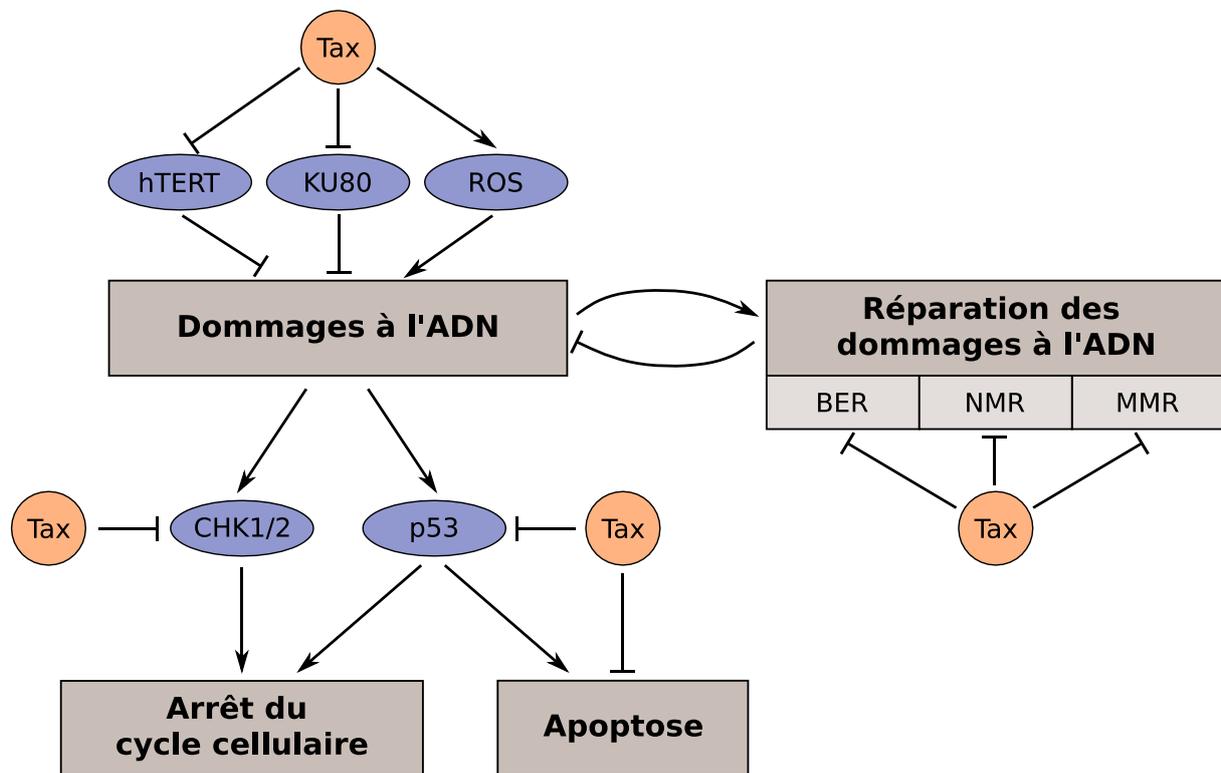


Figure 12 : Tax favorise l'apparition et le maintien de dommages à l'ADN.

Lors de dommages à l'ADN, des points de contrôle cellulaires sont activés, et conduisent à l'arrêt du cycle cellulaire. Cela permet la réparation de dommages à l'ADN, ou l'entrée de la cellule en apoptose en cas d'échec de ces réparations. Tax favorise l'apparition de dommages à l'ADN en inhibant hTERT et KU80 et en favorisant la production de ROS. En outre, elle bloque également des points de contrôle cellulaires, les mécanismes directs de réparation de ces dommages et enfin l'induction de l'apoptose en cas de dommages persistants.

Ainsi, en favorisant l'établissement de dommages à l'ADN, en limitant leur réparation et en inhibant l'arrêt du cycle cellulaire normalement induit par la présence de ces dommages, Tax favorise largement l'instabilité génomique des cellules infectées.

Tax induit également des perturbations du centrosome et du fuseau mitotique, ce qui favorise également l'instabilité génomique, comme nous le verrons plus en détail dans la partie suivante.

II – Des altérations centrosomales à la transformation cellulaire

A. Le centrosome

1. Organisation du centrosome

Le centrosome est un organite complexe formé par l'assemblage supramoléculaire hautement structuré de nombreuses protéines. Il joue des rôles essentiels dans la biologie des cellules animales, notamment pour l'organisation du cytosquelette. En effet, il est le centre organisateur des microtubules (MTOC, pour MicroTubule-Organising Center), et est impliqué dans l'organisation du cytosquelette d'actine (Farina *et al.*, 2016). En conséquence, il est directement impliqué dans la mise en place et le maintien de la polarité cellulaire et la motilité cellulaire. Il joue également un rôle central lors de la division cellulaire, en formant les pôles du fuseau mitotique qui ségrège les chromosomes entre les deux cellules filles. Il est également impliqué dans de nombreuses voies de signalisation cellulaire, pour lesquelles il semble servir de plateforme de signalisation. Il contribue notamment à la régulation du cycle cellulaire et à la réponse aux dommages à l'ADN (Arquint, Gabryjonczyk and Nigg, 2014).

La structure du centrosome est complexe et finement régulée. Il est formé d'une paire de centrioles disposés orthogonalement, qui sont chacun un cylindre d'environ 250 nm de large et 500 nm de long, formé de neuf triplets de microtubules associés selon une symétrie radiale, stabilisés par des modifications post-traductionnelles comme leur polyglutamylation ou leur acétylation (Bobinnec *et al.*, 1998; Janke, 2014). Les triplets de microtubules comportent un microtubule A complet situé proche du centre du centriole, un microtubule B incomplet accroché sur la paroi du microtubule A, et un microtubule C également incomplet accroché sur la paroi du microtubule B (Guichard *et al.*, 2010), connectés entre eux par des « linkers » A – C qui relient le microtubule A d'un triplet avec le microtubule C du triplet adjacent. Chaque centriole est polarisé, avec une extrémité proximale et une extrémité distale. A l'extrémité distale, les microtubules ne sont plus assemblés qu'en doublet. De nombreuses protéines sont associées aux microtubules et contribuent à l'architecture du centrosome. Elles sont également réparties de façon hétérogène le long de l'axe proximo-distal. De nombreux développements techniques ont permis de préciser leur organisation et leurs fonctions lors des dernières années, avec notamment l'utilisation d'approches de protéomique dynamique par biotinylation de proximité (Firat-Karalar *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2015), de biologie structurale (Kitagawa *et al.*, 2011), de microscopie super-résolutive (Lawo *et al.*, 2012; Mennella *et al.*, 2012) ou encore de cryotomographie électronique (Guichard *et al.*, 2013; Greenan *et al.*, 2018).

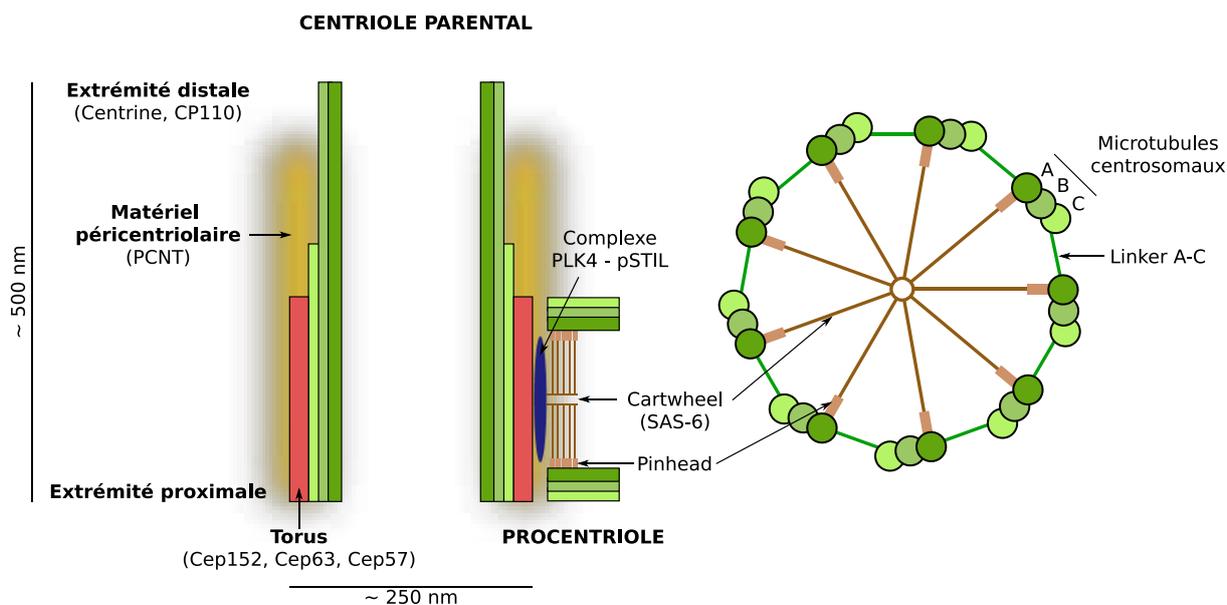


Figure 13 : Organisation du centrosome.

Le centrosome est composé d'un centriole parental mature et d'un procentriole immature, disposés orthogonalement. Chaque centriole est formé de 9 triplets de microtubules. Les centrioles sont entourés de matériel péricentriolaire (comprenant notamment la protéine PCNT) qui est impliqué dans la nucléation de microtubules. Au niveau de l'extrémité distale du centriole parental, on trouve des protéines telles que Centrine et CP110. Au niveau de l'extrémité proximale du centriole parental, un complexe Cep152 – Cep63 – Cep57 forme un torus qui recrute la machinerie de duplication, avec notamment le complexe PLK4 – pSTIL, qui recrute la protéine SAS-6 qui s'oligomérisse pour former le « cartwheel », base structurale du procentriole. Sur la partie de gauche du schéma, le centrosome est représenté en coupe longitudinale, et sur la partie droite un procentriole est représenté en coupe transversale, permettant de distinguer la symétrie radiale d'ordre 9 de disposition des triplets de microtubules.

Pour résumer les grandes caractéristiques de l'organisation du centrosome (Figure 13), on trouve au niveau de l'extrémité proximale du centriole parental un anneau appelé torus, constitué par un complexe des protéines Cep152, Cep63 et Cep57 (Sir *et al.*, 2011; Lukinavičius *et al.*, 2013). Elles sont impliquées dans l'initiation de la biogenèse du procentriole lors de la duplication des centrioles, sur laquelle nous reviendrons dans la partie suivante. Au niveau de l'extrémité distale du centriole parental, on trouve des protéines telles que Centrine et CP110. Les centrioles sont entourés de matériel péricentriolaire (PCM, pour PeriCentriolar Material) qui joue un rôle important dans la nucléation des microtubules. En effet, celle-ci a lieu au niveau de complexes de nucléation, de structure cylindrique, appelés γ -TuRC (γ -Tubulin Ring Complex) qui sont notamment riches en tubuline γ (Moritz *et al.*, 2000), et qui sont recrutés par divers composants du matériel péricentriolaire (Haren, Stearns and Lüders, 2009; Woodruff *et al.*, 2017). Ce matériel péricentriolaire est maintenu et organisé par des protéines telles que la Péricentrine (PCNT) et Cep192 (Zhu *et al.*, 2008; Lawo *et al.*, 2012; Mennella *et al.*, 2012). En périphérie du centrosome, on trouve également des granules cytoplasmiques associés au centrosome, appelés satellites centriolaires, qui correspondent à des

assemblages non membranaires dynamiques caractérisés notamment par la présence de la protéine PCM1 (Kubo *et al.*, 1999). Ces satellites centriolaires jouent un rôle important dans la régulation dynamique du centrosome (pour revue, voir Hori and Toda, 2017).

2. Cycle du centrosome

La structure et le nombre de centrosomes sont finement régulés dans la cellule. Dans les cellules en prolifération, le centrosome se duplique une fois par cycle cellulaire, de façon semi-conservative. Une représentation simplifiée de ce cycle de duplication est présentée en Figure 14.

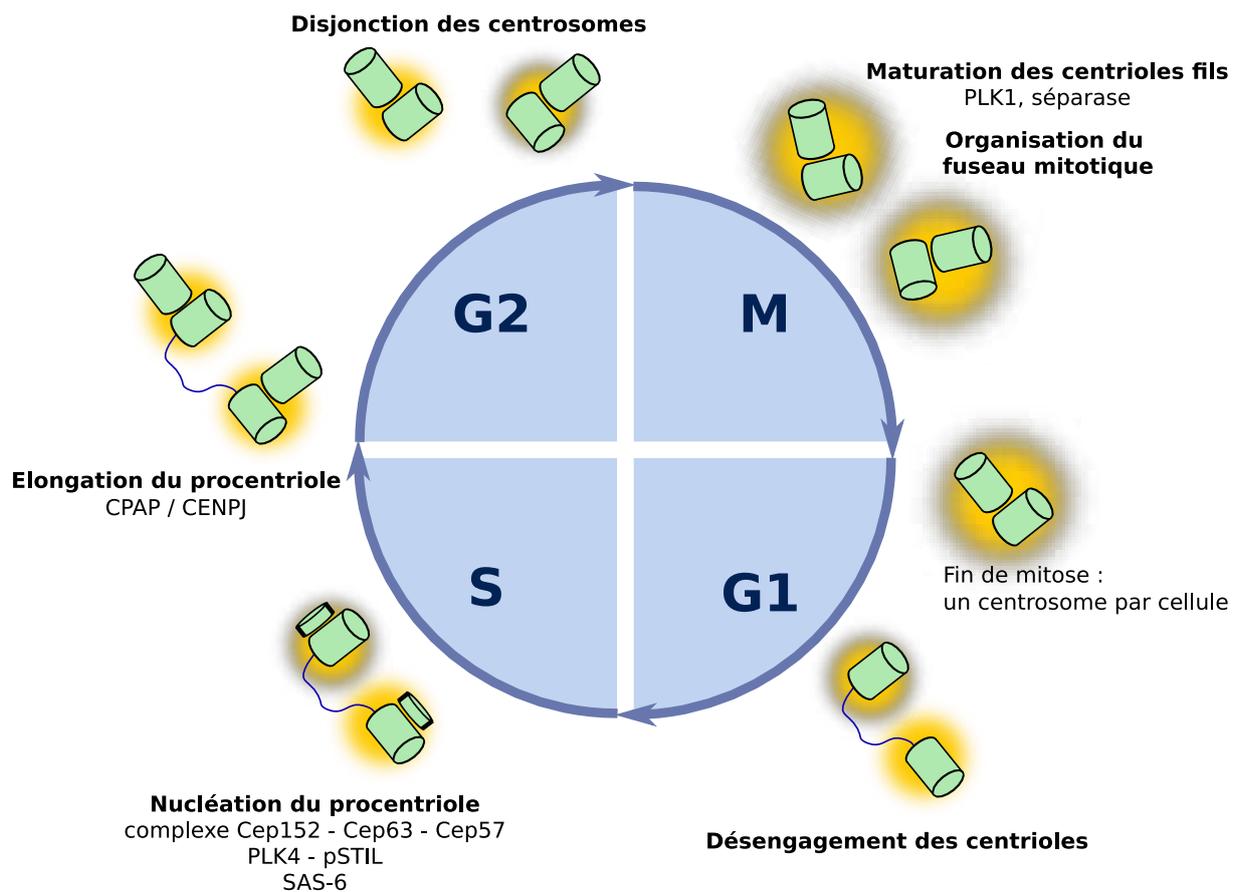


Figure 14 : Cycle du centrosome.

La duplication du centrosome est finement régulée avec la progression du cycle cellulaire. A l'issue de la mitose, chaque cellule fille possède un centrosome composé de deux centrioles. Lors de la phase G1, ces deux centrioles se désengagent, et la nucléation d'un procentriole a lieu au niveau de l'extrémité proximale de chacun d'entre eux. Elle implique le complexe Cep152 – Cep63 – Cep57 et les protéines PLK4 et pSTIL qui recrutent SAS-6, qui forme un « cartwheel » permettant l'assemblage du procentriole. Les procentrioles formés sont élargis, sous contrôle notamment de la protéine CPAP / CENPJ. En fin de phase G2, les deux centrosomes migrent aux pôles opposés de la cellule, où ils nucléent les deux pôles du fuseau mitotique. Lors de la mitose, la maturation des centrioles fils favorise le recrutement de matériel péricentriolaire et la nucléation des microtubules du fuseau, et est indispensable pour la future initiation d'une duplication.

En phase G1, la cellule contient un centrosome constitué de deux centrioles, qui correspondent à l'ancien centriole parental et au centriole fils formé lors du cycle précédent. Ces deux centrioles sont

liés par un « linker » constitué de C-NAP-1 et de rootletine (Bahe *et al.*, 2005). Un complexe formé des protéines Cep152, Cep63 et Cep57 s'assemble en anneau (aussi appelé « torus ») au niveau de l'extrémité proximale des centrioles (Figure 13), et sert de site d'assemblage pour l'émergence d'un procentriole par centriole parental (Cizmecioglu *et al.*, 2010; Hatch *et al.*, 2010; Sir *et al.*, 2011; Lukinavičius *et al.*, 2013).

Au moment de la transition G1-S, un nouveau procentriole commence à s'assembler orthogonalement au niveau du torus à l'extrémité proximale de chacun des deux centrioles parentaux. L'initiation de la biogenèse du procentriole implique le recrutement de deux protéines clé : la kinase PLK4 (Polo-Like Kinase 4) et STIL (SCL-interrupting locus protein) (Figure 13). La trans-autophosphorylation de PLK4 (Sillibourne *et al.*, 2010) et la phosphorylation de STIL stabilisent leur association, protègent localement PLK4 de sa dégradation constitutive (Holland *et al.*, 2010) et activent le complexe, permettant le recrutement de SAS-6 (Spindle ASsembly abnormal protein 6, ou HsSAS-6) (Ohta *et al.*, 2014; Kratz *et al.*, 2015; Moyer *et al.*, 2015). SAS-6 est une protéine essentielle à l'assemblage du « cartwheel », qui confère sa structure de base au centriole formé. Deux monomères de SAS-6 s'assemblent en dimère par leurs domaines coiled-coil, puis les dimères s'oligomérisent par leur domaine N-terminal à un angle de 40° environ, conférant au centriole sa symétrie d'ordre 9 en association avec des propriétés d'assemblage des microtubules eux-mêmes (Kitagawa *et al.*, 2011; Hilbert *et al.*, 2016). Les anneaux de SAS-6 s'empilent alors les uns sur les autres en une structure longue d'une centaine de nanomètres (Figure 13). Une analyse précise de la structure de ce « cartwheel » a été effectuée (Guichard *et al.*, 2012, 2017). Le « cartwheel » est connecté aux microtubules formant la paroi du centrosome via une structure appelée « pinhead » (Guichard *et al.*, 2013). Les microtubules s'allongent à partir de cette structure. Leur assemblage est contrôlé et leur longueur semble régulée par la dynamique intrinsèque des microtubules et leurs modifications post-traductionnelles, ainsi que par des protéines régulatrices telles que CPAP / CENPJ (Sharma *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2016).

A la fin de la phase G2, les deux centrosomes se disjoignent, et chacun migre à une extrémité de la cellule où il nucléé un pôle du fuseau mitotique (Figure 14). A la fin de la phase G2 et lors de la mitose, les centrioles fils subissent une étape cruciale de maturation, dépendante de l'activité de la kinase PLK1 (Polo-like kinase 1) et de la protéase séparase, qui semblent agir de façon parallèle et indépendante (Tsou and Stearns, 2006; Tsou *et al.*, 2009; Hatano and Sluder, 2012). La maturation confère aux centrioles fils la capacité d'organiser le matériel péricentriolaire (Wang *et al.*, 2011). Notamment, la phosphorylation de PCNT par PLK1 lors de la mitose favorise le recrutement du matériel péricentriolaire et la nucléation des microtubules du fuseau mitotique. La maturation du centriole fils implique également le recrutement de Cep192 par Cep295, qui participe au recrutement du matériel

péricentriolaire de façon conjointe avec PCNT (Zhu *et al.*, 2008; Tsuchiya *et al.*, 2016). La maturation du centriole fils lui permet par la suite de recruter la machinerie de duplication lors du cycle cellulaire suivant (Loncarek, Hergert and Khodjakov, 2010; Wang *et al.*, 2011). La maturation permet également aux deux centrioles de chaque centrosome de progressivement se désengager, c'est-à-dire de perdre leur orientation orthogonale (tout en restant reliés via le « linker » de C-NAP-1 et de rootletine), en fin de mitose et lors de la phase G1. Ainsi, la maturation et le désengagement des centrioles sont essentiels à la fois pour le bon fonctionnement du fuseau mitotique, et pour permettre la future duplication des centrioles. A l'issue de la mitose, chaque cellule fille récupère un centrosome, qui peut à nouveau se dupliquer lors du cycle cellulaire suivant.

La duplication du centrosome nécessitant la maturation mitotique du centriole fils et le désengagement des centrioles, le centrosome ne peut normalement se dupliquer qu'une seule fois au cours du cycle cellulaire. De plus, la progression du cycle du centrosome est étroitement liée avec la progression du cycle cellulaire, grâce à l'activité des cyclines et des CDKs qui régulent de façon coordonnée le cycle cellulaire et le cycle du centrosome (Hinchcliffe *et al.*, 1999; Lacey, Jackson and Stearns, 1999).

Il peut néanmoins arriver que cette régulation fine soit altérée, ce qui comme nous allons le voir peut avoir de graves conséquences pathologiques.

B. Un lien étroit entre perturbations du centrosome, instabilité génomique et oncogénèse

1. Instabilité génomique et oncogénèse

Les cellules cancéreuses sont des cellules anormales, qui prolifèrent de façon dérégulée et ont une réponse altérée aux signaux d'arrêt de la croissance et de mort cellulaire. Ces changements sont liés à l'instabilité génomique de ces cellules, avec la présence de nombreuses mutations et anomalies chromosomiques, perte ou gain de chromosomes entiers ou de fragments de chromosomes, qui conduisent à l'aneuploïdie.

L'aneuploïdie semble, au-delà d'être une caractéristique des cellules tumorales, être un moteur important de la transformation cellulaire et de l'oncogénèse. Notamment, des études en souris ont permis d'associer l'induction de l'aneuploïdie (obtenue notamment par la perturbation des checkpoints mitotiques impliquant Mad2 et APC) au développement de tumeurs (Dobles *et al.*, 2000; Rao *et al.*, 2005; Sotillo *et al.*, 2007; Weaver *et al.*, 2007; Diaz-Rodríguez *et al.*, 2008). Cependant, d'autres études suggèrent que l'aneuploïdie conduirait au contraire à un ralentissement de la prolifération cellulaire (Williams *et al.*, 2008), sans doute car elle peut induire l'activation des

checkpoints mitotiques lorsque ceux-ci sont fonctionnels, conduisant à un ralentissement de la mitose (Yang *et al.*, 2008). Cela souligne la complexité du processus d'oncogenèse, qui est multifactoriel.

2. Des anomalies centrosomales à l'instabilité génomique

Les anomalies du centrosome ont depuis de nombreuses années été proposées comme un moteur possible de l'instabilité génomique, pouvant conduire à des fuseaux mitotiques anormaux et à des anomalies de ségrégation des chromosomes. Theodore Boveri proposait déjà il y a une centaine d'années que des fuseaux mitotiques multipolaires pouvaient conduire à la formation de cellules filles aneuploïdes et favoriser la transformation cellulaire (Boveri, 2008). Néanmoins, les preuves expérimentales d'un lien de causalité possible entre les perturbations du centrosome et l'oncogenèse ont été apportées relativement récemment, chez la drosophile (Basto *et al.*, 2008) puis plus récemment chez la souris, avec la démonstration que l'induction de centrosomes surnuméraires en l'absence d'autres défauts génétiques était suffisante pour induire l'aneuploïdie et le développement de tumeurs (Levine *et al.*, 2017). Cependant, bien que la possibilité d'une induction de l'oncogenèse suite à des anomalies centrosomales ait désormais été démontrée, il reste généralement difficile de déterminer si les altérations centrosomales observées dans de nombreuses tumeurs sont la cause primaire de l'oncogenèse ou une conséquence secondaire, amplifiant et accélérant le processus d'oncogenèse.

En cas d'anomalies centrosomales menant à la présence de plus de deux centrosomes en début de mitose, la cellule peut former un fuseau mitotique multipolaire, qui conduira à une mauvaise répartition des chromosomes ou à des défauts de cytokinèse, et à la génération de cellules filles hautement aneuploïdes et souvent non viables (Shekhar *et al.*, 2002; Ganem, Godinho and Pellman, 2009). Plus récemment a émergé l'idée que les centrosomes surnuméraires pouvaient se regrouper et former un fuseau mitotique dit « pseudo-bipolaire » (Quintyne *et al.*, 2005; Basto *et al.*, 2008; Kwon *et al.*, 2008). Ce fuseau pseudo-bipolaire conduit à des anomalies mitotiques plus modérées, permettant la survie de la cellule, telles que des chromosomes retardés et à des erreurs de ségrégation des chromosomes suite à des aberrations d'attachement des microtubules sur les kinétochores (notamment l'attachement multiple d'un kinétochore à plusieurs pôles du fuseau mitotique, appelé attachement mérotélique) (Ganem, Godinho and Pellman, 2009; Silkworth *et al.*, 2009) (Figure 15).

ALTERATIONS CENTROSOMALES

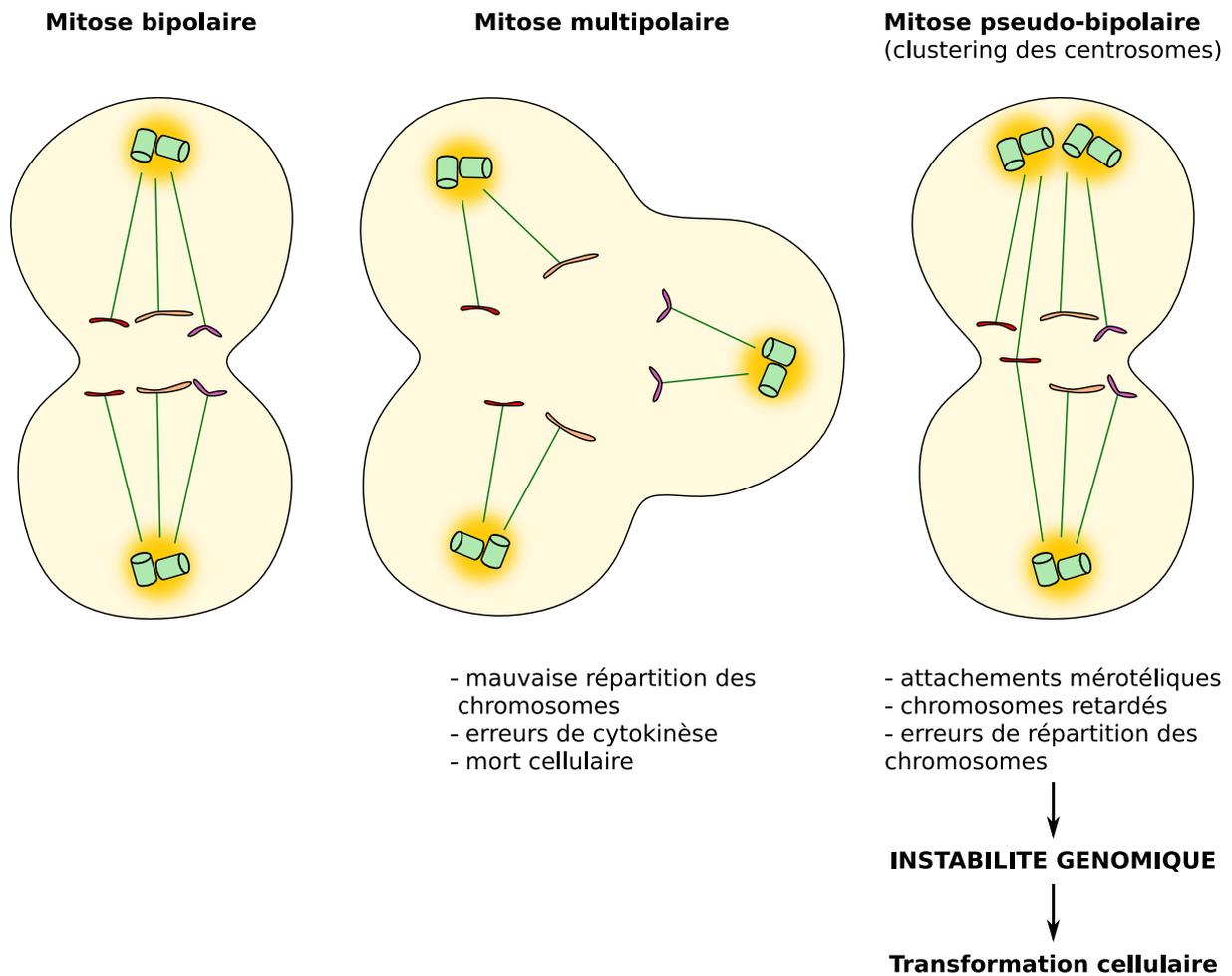


Figure 15 : Des altérations centrosomales induisent des mitoses anormales qui favorisent l'aneuploïdie et la transformation cellulaire.

Des altérations centrosomales dans les cellules en division peuvent conduire à des mitoses anormales, multipolaires ou pseudo-bipolaires, conduisant à des anomalies de répartition des chromosomes. Cela favorise l'aneuploïdie des cellules filles et l'instabilité génomique, qui est un moteur de la transformation cellulaire en cellule cancéreuse. Pour simplifier, seulement 3 chromosomes sont représentés sur ce schéma.

3. Mécanismes d'induction des altérations centrosomales

Les altérations centrosomales surviennent généralement en lien avec une dérégulation du cycle du centrosome. Elles peuvent être subdivisées en anomalies numériques et en anomalies de structure, ces deux types d'altérations pouvant coexister.

Une amplification centrosomale peut avoir lieu suite à une duplication excessive des centrioles en phase S. En particulier, l'altération de l'activité de PLK4 a été clairement associée avec une sur-duplication aberrante des centrioles (Cunha-Ferreira *et al.*, 2009; Marthiens, Piel and Basto, 2012). En effet, PLK4 joue un rôle crucial dans le recrutement de la machinerie de duplication des centrioles. La

sur-expression de PLK4 a été associée au développement de tumeurs (Basto *et al.*, 2008), mais également sa sous-expression, qui cause un ralentissement du cycle cellulaire et favorise des mitoses anormales (Ko *et al.*, 2005).

Les cellules peuvent également accumuler un nombre anormal de centrosomes suite à des défauts de cytokinèse en fin de mitose, par exemple en lien avec la surexpression de la kinase Aurora-A (Meraldi, Honda and Nigg, 2002). Cela conduit à la formation d'une unique cellule fille tétraploïde contenant deux centrosomes, au lieu de deux cellules filles diploïdes (Fujiwara *et al.*, 2005).

Plus récemment, des mécanismes de fragmentation du matériel péricentriolaire en mitose ont été décrits. Cette fragmentation a été associée à des délais mitotiques et à un désengagement précoce des centrioles (Karki, Keyhaninejad and Shuster, 2017). Elle peut également survenir suite à des défauts de l'autophagie. En effet, l'autophagie régule la composition des centrosomes par la dégradation des satellites centriolaires. Des défauts de ce processus ont pour conséquence une accumulation anormales de ces satellites qui induit la déstabilisation de la structure du centrosome, conduisant à une fragmentation du matériel péricentriolaire en mitose (Holdgaard *et al.*, 2019). Comme le matériel péricentriolaire est impliqué dans la nucléation des microtubules, sa fragmentation favorise la formation de fuseaux mitotiques multipolaires ou pseudobipolaires, ce qui conduit à des défauts de ségrégation des chromosomes (Holdgaard *et al.*, 2019).

Une amplification centrosomale a également été récemment décrite en lien avec une sur-élongation des centrioles, mettant en jeu à la fois la nucléation de pro-centrioles multiples le long du centriole anormalement long (Kohlmaier *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2013; Marteil *et al.*, 2018) et la fragmentation directe des centrioles sur-élongés eux-mêmes (Kohlmaier *et al.*, 2009; Marteil *et al.*, 2018). Les centrioles sur-élongés ont également des capacités de nucléation des microtubules accrues (Marteil *et al.*, 2018). Ces mécanismes sont associés à des défauts de ségrégation des chromosomes (Marteil *et al.*, 2018).

A noter que p53, un gène suppresseur de tumeur très important, semble jouer un rôle majeur dans la régulation de la réponse cellulaire aux amplifications centrosomales et à la polyploïdisation, induisant l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Cuomo *et al.*, 2008; Holland *et al.*, 2012; Ganem *et al.*, 2014). L'inactivation de p53 ou au moins une altération de cette voie, fréquente lors de l'oncogenèse, offre donc probablement un environnement permissif pour le maintien des altérations centrosomales et l'instabilité génomique associée.

C. Rôle central de Cep63 dans la régulation du centrosome et l'oncogenèse

1. Structure et localisation de la protéine Cep63

La protéine Cep63, constituée de 541 acides aminés, a été identifiée comme une protéine centrosomale il y a une vingtaine d'années (Andersen *et al.*, 2003). Elle localise quasiment exclusivement au centrosome lors du cycle cellulaire (Loffler *et al.*, 2011), bien qu'elle puisse en être délocalisée ponctuellement lors de la réponse aux dommages à l'ADN (Smith *et al.*, 2009). Plus précisément, comme nous l'avons déjà décrit page 45, Cep63 est localisée au niveau de la partie proximale des centrioles matures, où elle forme un anneau (ou torus) en complexe avec les protéines Cep152 et Cep57 (Figure 13), favorisant mutuellement le recrutement des autres membres du complexe. L'architecture de ce complexe et ses fonctions ont été de mieux en mieux élucidées par des études successives (Sir *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2013; Lukinavičius *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2019; Wei *et al.*, 2020; Zhao *et al.*, 2020). Cep63 est également associée aux satellites centriolaires. Elle interagit directement avec les protéines MNR (Moonraker, aussi connue sous le nom de KIAA0753), CCDC14 et Cep90, décrites comme des protéines des satellites centriolaires, qui contribuent à la régulation de la localisation et du niveau de Cep63 au centrosome (Firat-Karalar *et al.*, 2014; Kodani *et al.*, 2015).

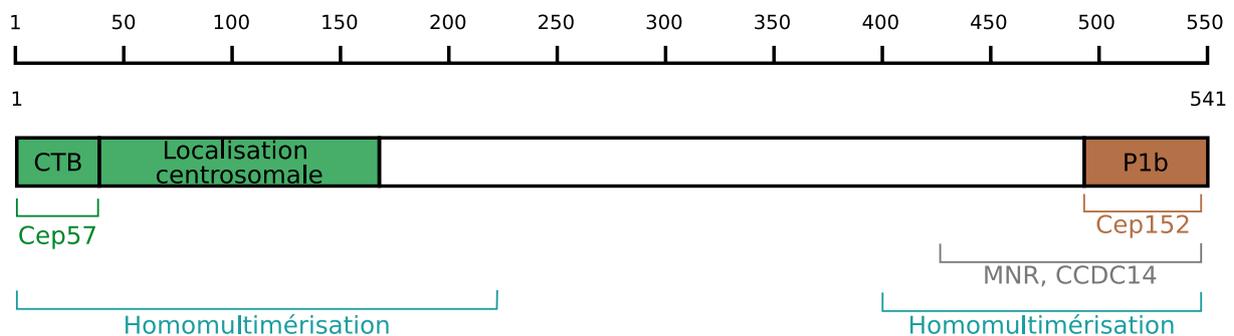


Figure 16 : Structure de la protéine Cep63.

La protéine Cep63 possède différents domaines, impliqués dans sa localisation centrosomale, son homomultimérisation et son interaction avec différents partenaires protéiques. CTB : Cep57/Translokin- Binding.

La structure de Cep63 n'a pas été déterminée expérimentalement par des techniques de biologie structurale, toutefois des prédictions bio-informatiques de sa structure ont permis l'identification de domaines coiled-coil potentiels (Kumar and Purohit, 2012; Einarsdottir *et al.*, 2015). Des domaines fonctionnels et d'interaction ont également pu être identifiés par différentes études (Figure 16). Notamment, la localisation centrosomale de Cep63 a été associée à sa partie N-terminale, entre les acides aminés 1 et 135 (Loffler *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2013). Des domaines ont également été associés à l'homomultimérisation de Cep63 : il s'agit principalement d'un domaine N-terminal (acides

aminés 1 – 220), et de façon secondaire d'un domaine C-terminal (acides aminés 400 – 541) (Kim *et al.*, 2019). La région N-terminale est également impliquée dans l'interaction de Cep63 avec Cep57 (acides aminés 1 – 40, arrangés en hélice alpha), et a été appelée CTB (Cep57/Translokin- Binding) (Wei *et al.*, 2020). De plus, le domaine d'interaction de Cep63 avec les protéines Cep152 et les protéines des satellites centriolaires MNR et CCDC14 a été localisé dans sa partie C-terminale, entre les acides aminés 425 et 541 (Brown *et al.*, 2013). Plus précisément, Cep63 interagit avec Cep152 par un domaine coiled-coil, situé entre les acides aminés 490 et 541, appelé domaine P1b (Kim *et al.*, 2019) (Figure 16).

Dans les cellules, Cep63 est présente sous la forme de 4 isoformes principaux, générés par épissage alternatif, dont le plus long peut avoir une taille de 703 acides aminés. Leur abondance relative varie en fonction des types cellulaires. La fonction de ces différents isoformes n'a à l'heure actuelle pas été caractérisée (Loffler *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2019).

2. Cep63 joue un rôle central de régulateur du cycle du centrosome et du cycle cellulaire

Plusieurs études ont associé la protéine Cep63 avec la régulation du cycle cellulaire (Figure 17). Notamment, Cep63 a été associée à la régulation de l'entrée en mitose. En effet, Cep63 interagit avec CDK1 et induit son recrutement au centrosome à la transition G2 / M (Loffler *et al.*, 2011). Cela permet l'initiation de la mitose en association avec la cycline B1 (De Souza, Ellem and Gabrielli, 2000) (Figure 11). De plus Cep63 est également impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire en mitose en cas de dommages à l'ADN. En effet, en cas de dommages à l'ADN, les kinases ATM / ATR phosphorylent Cep63, ce qui entraîne sa délocalisation du centrosome et l'arrêt du cycle cellulaire (Smith *et al.*, 2009). Les auteurs de cette étude postulent que l'arrêt du cycle cellulaire pourrait passer par l'activation du Spindle assembly checkpoint (SAC). Néanmoins les travaux plus récents de Löffler et collègues montrent que la déplétion de Cep63 empêche le recrutement centrosomal de CDK1 et l'initiation de la mitose (Loffler *et al.*, 2011). Il serait intéressant de savoir si la délocalisation du centrosome de Cep63 induite en réponse aux dommages à l'ADN pourrait également limiter le recrutement centrosomal de CDK1 et induire l'arrêt du cycle cellulaire par ce biais. De façon générale, ces travaux montrent un rôle essentiel de Cep63 dans la régulation de la progression du cycle cellulaire, en particulier de la mitose.

De façon parallèle, Cep63 a également été associée à de nombreux rôles dans la régulation du cycle du centrosome et de son fonctionnement (Figure 17). L'importance de ce rôle de Cep63 est soulignée par son association avec une pathologie, la microcéphalie primaire, qui correspond à un défaut du neurodéveloppement caractérisé par une réduction de la taille du cerveau pré-natal sans altération de sa structure. Cette pathologie a été associée à des défauts centrosomaux (Sir *et al.*, 2011; Marjanović *et al.*, 2015).

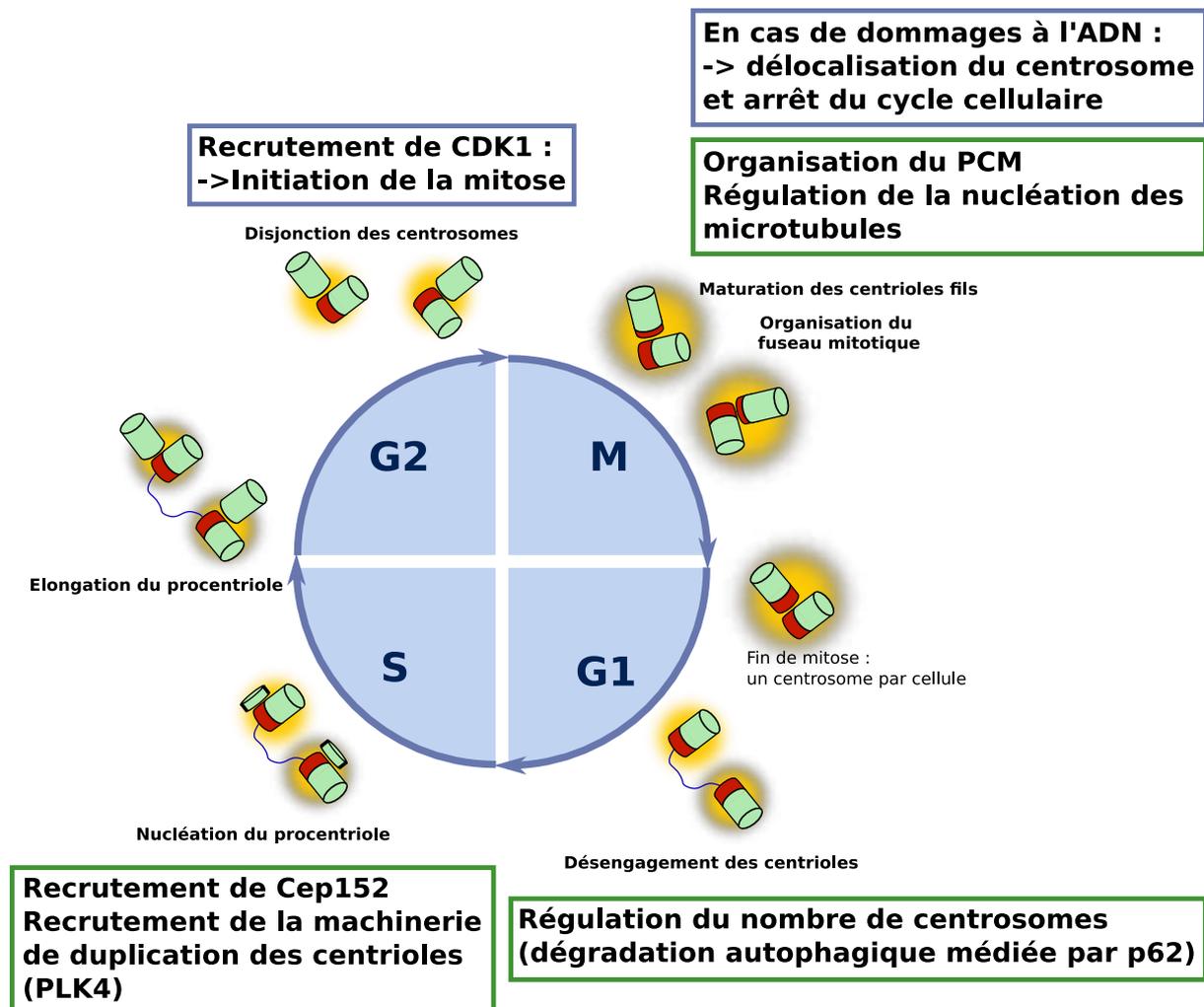


Figure 17 : Cep63 participe à la régulation du cycle cellulaire et du cycle du centrosome.

Les différentes fonctions de régulation du cycle cellulaire sont encadrées en bleu, les fonctions de régulation du cycle du centrosome et de son fonctionnement sont encadrées en vert. La localisation de Cep63 au centrosome est indiquée en rouge en région proximale des centrioles.

Un des rôles les mieux caractérisés de Cep63 est son implication dans la duplication des centrioles, en association avec les protéines Cep152 et Cep57 formant le torus proximal. Ce rôle a d'abord été mis en évidence par l'observation qu'une invalidation cellulaire de Cep63 conduisait à une réduction du nombre de centrioles (Sir *et al.*, 2011). Des études subséquentes ont confirmé l'implication de Cep63 dans la duplication des centrioles en association avec Cep152, montrant l'implication de ces protéines dans le recrutement de la machinerie de duplication des centrioles. En effet un défaut de recrutement de SAS-6 a été observé dans des cellules déplétées pour Cep63 ou Cep152 (Brown *et al.*, 2013). Ce mécanisme a par la suite été précisé par la mise en évidence d'un recrutement de PLK4 par le complexe Cep63 – Cep152, impliquant une interaction directe entre Cep152 et PLK4, qui peut ensuite recruter les autres éléments de la machinerie de duplication des centrioles (Kim *et al.*, 2019). Cep63 interagit également directement avec la kinase CDK2 et permet son recrutement au centrosome. Cette kinase

est impliquée dans la transition G1 – S et participe à l'initiation de la duplication des centrioles (Hinchcliffe *et al.*, 1999; Loffler *et al.*, 2011; Kodani *et al.*, 2015).

De plus, la dégradation autophagique de Cep63, impliquant son interaction avec le récepteur autophagique p62, semble être impliquée dans le contrôle du nombre de centrosomes (Watanabe *et al.*, 2016). Cependant, une étude plus récente associe le ciblage autophagique de composants du centrosomes essentiellement à une interaction des récepteurs autophagiques avec des protéines des satellites centriolaires, et ne montre pas de rôle particulier de Cep63 dans ce processus (Holdgaard *et al.*, 2019), ce qui montre une complexité dans la régulation autophagique du nombre, de la composition et de la stabilité des centrosomes.

Cep63 semble enfin pouvoir participer à l'organisation du matériel péricentriolaire. En effet, il a été montré que dans des spermatocytes de souris invalidées pour Cep63, lors de la méiose, le matériel péricentriolaire était moins compact, et présentait des extrusions anormales (Marjanović *et al.*, 2015). A l'inverse, une étude récente montre que lors de la mitose, les niveaux centrosomaux de Cep152 et de Cep63 sont réduits, en lien avec l'activité d'APC/C. Cette réduction favorise le recrutement de PCNT médié par Cep57 et la nucléation des microtubules. On a donc ici un rôle plutôt inhibiteur du recrutement du matériel péricentriolaire en mitose pour Cep63 (Tischer, Yang and Barford, 2022).

Ainsi, Cep63 semble être une protéine centrale dans la biologie du centrosome, impliquée à la fois dans sa structuration, ses fonctions mitotiques de nucléation du fuseau de microtubules et dans le maintien d'un nombre normal de centrosomes en médiant la duplication des centrioles et sa dégradation autophagique. Elle fait également un pont avec la régulation de la progression du cycle cellulaire et de l'entrée en mitose. En lien avec ces rôles essentiels, des perturbations de Cep63 sont associées à de graves conséquences pathologiques.

3. Des perturbations de Cep63 sont associées à l'amplification centrosomale et à l'oncogénèse

Des perturbations de l'expression de Cep63 ont largement été associées à l'oncogénèse, et à des tumeurs de différents tissus. Notamment, il a été observé que la surexpression et la sous-expression de Cep63 étaient toutes les deux associées à des tumeurs invasives de la vessie (Buim *et al.*, 2005). Cela s'explique certainement par le fait que la surexpression et la sous-expression de Cep63 conduisent toutes les deux à des anomalies centrosomales, comme nous le verrons plus loin dans cette partie. Ces observations ont été complétées par une étude ultérieure analysant les variations du nombre de copies de différents gènes dans des cas de cancer de la vessie. Cette étude associe une augmentation du nombre de copies de *Cep63* à la sévérité des tumeurs et à un mauvais pronostic vital (Cai *et al.*, 2021). Des perturbations de Cep63 ont également été associées à des cancers cérébraux, montrant

une surexpression de Cep63 dans des cas de neuroblastomes, associée à des formes graves (Löffler *et al.*, 2011), et un polymorphisme de Cep63 a été associé à un risque augmenté de développer des gliomes et des méningiomes (Mahjabeen *et al.*, 2021). Enfin, une augmentation de l'expression de Cep63 a été décrite dans des tissus de cancer papillaire de la thyroïde. De façon intéressante, les auteurs ont aussi montré que la déplétion de Cep63 dans des lignées cellulaires dérivées de ce type de cancer réduisaient les propriétés tumorales de ces cellules, notamment leur prolifération et leurs capacités d'invasion et de migration (Liu *et al.*, 2021). Ces multiples associations de perturbations de Cep63 avec des tumeurs suggèrent que les altérations de Cep63 peuvent probablement être un moteur de l'oncogenèse.

Appuyant cela, plusieurs études ont directement lié des variations de l'expression de Cep63 à des amplifications centrosomales. Étonnamment, à la fois la surexpression et la sous-expression de Cep63 ont été associées à l'établissement d'amplifications centrosomales, certainement en lien avec son rôle central dans la régulation du cycle du centrosome et du cycle cellulaire, soulignant l'importance d'une régulation fine de cette protéine. Löffler et collègues ont observé qu'une surexpression de Cep63 pouvait induire une amplification centrosomale en interphase avec une sur-duplication des centrioles. L'implication des CDK dans ce processus a été démontrée par un traitement avec un inhibiteur des CDK, la roscovitine, qui inhibe l'amplification centrosomale induite par la surexpression de Cep63. Cette amplification centrosomale a pour conséquence des mitoses pseudo-bipolaires avec un regroupement (« clustering ») des centrosomes (Löffler *et al.*, 2011). Dans la même étude, il a été montré qu'une diminution de l'expression de Cep63 pouvait elle aussi entraîner une amplification centrosomale. Cette amplification centrosomale semble liée à une polyploïdisation suite à l'inhibition de l'entrée en mitose en l'absence de Cep63 (nécessaire au recrutement de CDK1 au centrosome induisant la transition G2 / M, comme décrit dans la partie précédente), conduisant à une endoréplication. L'invalidation de Cep63 a également été associée à des mitoses multipolaires (Sir *et al.*, 2011). Dans cette étude, les auteurs font l'hypothèse que ces mitoses multipolaires pourraient être associées à un mauvais engagement des centrioles en lien avec un retard dans la duplication des centrioles en l'absence de Cep63, bien que le mécanisme sous-jacent soit peu clair.

Toutes ces observations mettent en évidence qu'une régulation fine de la localisation centrosomale de Cep63, de son niveau d'expression et de ses fonctions est indispensable au bon fonctionnement du cycle cellulaire et de la mitose, et qu'au contraire des anomalies de Cep63 peuvent être un moteur des altérations centrosomales et de l'oncogenèse.

D. Des altérations centrosomales sont observées lors de l'infection par HTLV-1

De façon intéressante, des altérations centrosomales ont été associées à l'infection par HTLV-1 (résumées sur la Figure 18). En raison du lien entre les anomalies du centrosome, l'instabilité génomique et l'oncogenèse, que nous avons décrit p 49, les altérations centrosomales ont rapidement été postulées comme pouvant hypothétiquement participer au processus d'oncogenèse viro-induit. Néanmoins, un lien clair de causalité reste encore à être établi.

Une étude cruciale permettant de relier infection par HTLV-1, développement de l'ATL et amplification centrosomale est le travail réalisé par Nitta et collègues en 2006. Cette étude observe des altérations centrosomales dans des cellules de patient-es ATL. Les altérations centrosomales décrites correspondent ici à des spots surnuméraires de γ -tubuline. De façon importante, l'expression de la protéine virale Tax dans une lignée de cellules T humaines permet de reproduire le phénotype observé dans les cellules de patient-es ATL et d'induire l'apparition de micronoyaux, suggérant un rôle central de Tax dans l'induction de ces altérations centrosomales, associées à une instabilité chromosomique (Nitta *et al.*, 2006). Les auteurs associent l'amplification centrosomale induite par Tax à une augmentation de l'activité de CDK2, qui joue un rôle dans l'initiation de la duplication des centrioles (Hinchcliffe *et al.*, 1999; Kodani *et al.*, 2015). Il s'agirait donc ici d'un effet de l'interaction de Tax avec les régulateurs du cycle cellulaire, et pas d'un effet direct sur le centrosome (Figure 18).

De façon similaire, des altérations centrosomales, caractérisées par des spots surnuméraires de γ -tubuline, ont été observées dans les lignées lymphocytaires chroniquement infectées par HTLV-1 MT-4 et C8166 (Ching *et al.*, 2006). L'expression de Tax dans des lignées de cellules T et dans des fibroblastes primaires reproduit là aussi le phénotype centrosomal observé. Les auteurs notent aussi dans ces cellules l'association des spots de γ -tubuline surnuméraires avec le marqueur centriolaire centrobine, ce qui suggère qu'il s'agit réellement de centrioles surnuméraires et pas seulement de matériel péri-centriolaire fragmenté. Il s'agirait donc d'une sur-duplication des centrioles. Ils identifient également un nouveau partenaire de Tax, la protéine TAX1BP2, un isoforme de la protéine Rootletin (qui constitue avec C-NAP-1 le « linker » entre les centrioles), issu d'un épissage alternatif. Une étude ultérieure a montré que TAX1BP2 localise également à proximité de la région du « linker », à l'extrémité proximale des centrioles (Li *et al.*, 2020). Ching et collègues ont montré que TAX1BP2 était un inhibiteur de la sur-duplication centriolaire, et suggèrent que la sur-duplication centriolaire induite par Tax serait médiée par une inhibition de TAX1BP2 (Figure 18). Depuis ces travaux, peu d'études se sont intéressées au rôle de TAX1BP2, qui reste encore mal évalué. Il semblerait toutefois que son activité soit inhibée par sa phosphorylation par CDK2 (Lai *et al.*, 2012), suggérant un lien possible entre

les observations de Ching et collègues (Ching *et al.*, 2006) et celles de Nitta et collègues qui proposaient une implication de CDK2 dans les altérations centrosomales qu'ils observaient (Nitta *et al.*, 2006). A noter également que TAX1BP2 a été décrite comme étant un substrat d'ATM, qui le phosphoryle en réponse aux dommages à l'ADN, ce qui stabilise la protéine et augmente son expression au centrosome (Lai, Hung and Ching, 2014). Enfin, TAX1BP2 a récemment été décrite comme pouvant inhiber les altérations centrosomales induites par un autre virus oncogène, le virus de l'hépatite B (HBV) en réduisant la nucléation anormale de microtubules induite par la protéine virale HBx (Li *et al.*, 2020). Ces différentes études, si elles ne clarifient pas totalement le mécanisme d'inhibition des altérations centrosomales par TAX1BP2, renforcent l'hypothèse que l'inhibition de TAX2BP2 par Tax puisse être responsable des altérations centrosomales observées par Ching et collègues (Ching *et al.*, 2006).

Une autre étude montre que dans des cellules MEF (Mouse Embryonic Fibroblasts) transfectées avec Tax, la localisation de Tax au centrosome en mitose, en colocalisation avec PCNT, induit des anomalies de PCNT spécifiquement en mitose, analysées comme étant une fragmentation mitotique du matériel péricentriolaire (Peloponese *et al.*, 2005). De façon surprenante, contrairement à d'autres travaux (Nejmeddine *et al.*, 2005), les auteurs n'observent pas de localisation centrosomale de Tax en interphase, ce qui est peut-être une spécificité de la lignée cellulaire utilisée. Par l'utilisation de mutants de Tax déficients pour la voie NF- κ B, les auteurs suggèrent que les altérations centrosomales observées nécessiteraient l'activation de cette voie. Cependant, ils ne démontrent pas plus directement l'implication de cette voie, et l'effet observé pourrait donc être lié à d'autres caractéristiques de ces mutants, qui comme nous le verrons par la suite peuvent présenter d'autres différences. Les auteurs montrent aussi une interaction entre Tax et la protéine RanBP1, et observent qu'une déplétion de RanBP1 inhibe la localisation centrosomale de Tax et l'induction d'altérations centrosomales associées. Bien que les mécanismes d'action de RanBP1 au centrosome en mitose ne soient toujours pas totalement élucidés, différentes études appuient un rôle possible de RanPB1 dans le maintien de la cohésion et le bon fonctionnement du fuseau mitotique, notamment par le recrutement d'autres facteurs (Tedeschi *et al.*, 2007). Notamment, un excès d'expression de RanBP1 peut conduire à un désengagement précoce des centrioles en mitose, induisant la formation d'un fuseau multipolaire (Di Fiore *et al.*, 2003). Les fonctions de RanBP1 sont régulées par sa phosphorylation en mitose par la kinase PLK1 (Hwang, Ji and Jang, 2011). Celle-ci ayant été impliquée dans les processus de désengagement et de maturation des centrioles en mitose, on peut émettre l'hypothèse que RanBP1 pourrait également participer à ce processus. Dans tous les cas, l'étude de Peloponese et collègues suggère que Tax pourrait interférer avec les mécanismes de désengagement des centrioles en mitose, et induirait une fragmentation du matériel péricentriolaire associé (Figure 18).

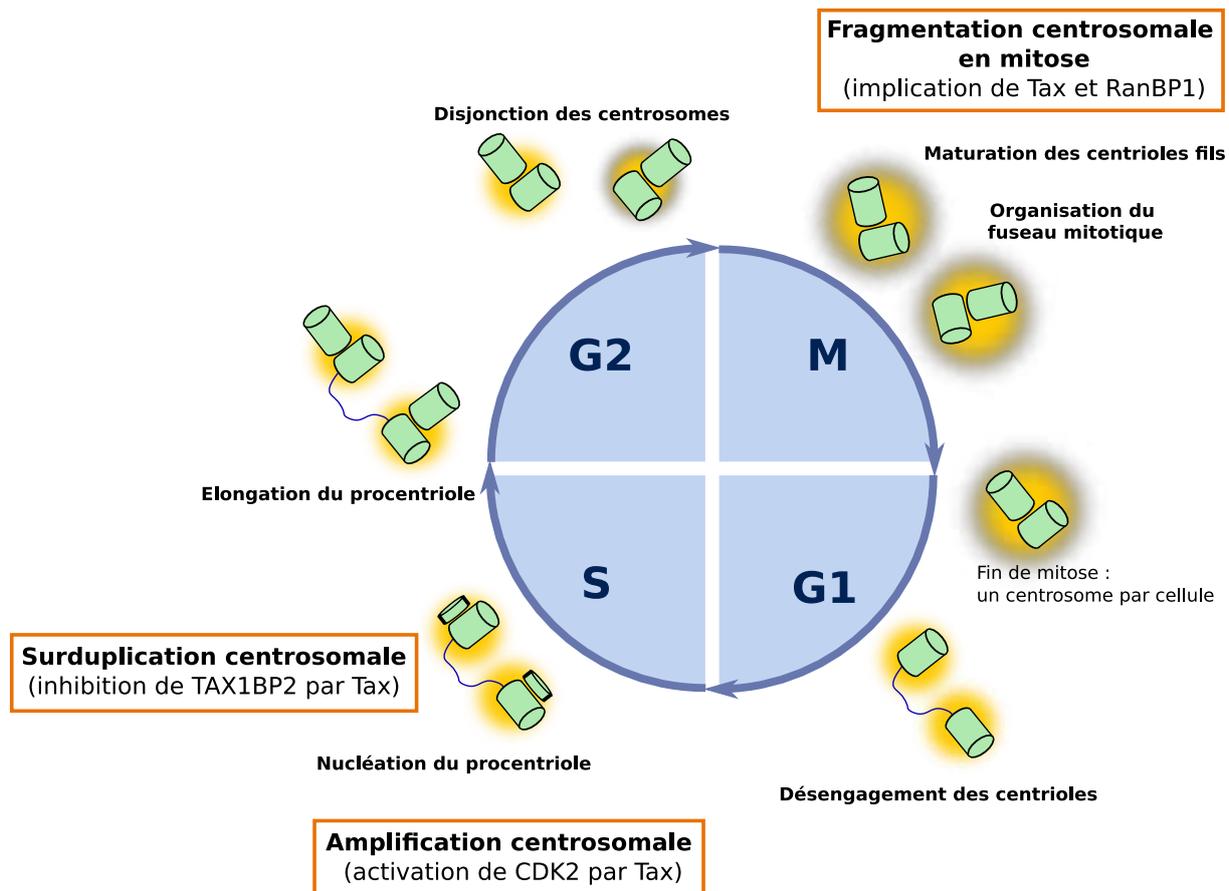


Figure 18 : Association d'altérations centrosomales à l'infection par HTLV-1.

L'infection par HTLV-1 ou l'expression de la protéine virale Tax ont été associées à des altérations du centrosome correspondant à la perturbation de différentes étapes du cycle du centrosome. Ces altérations impliquent différentes protéines associées à la régulation du cycle du centrosome, indiquées entre parenthèses.

Ces différentes études montrent clairement que l'infection par HTLV-1 entraîne des anomalies centrosomales, et suggèrent que la mise en place de ces anomalies implique la protéine Tax. La temporalité de l'expression de Tax, particulièrement importante lors des phases précoces de l'infection par HTLV-1, ainsi que la rapidité avec laquelle cette protéine semble induire des altérations centrosomales, suggère que ces altérations centrosomales pourraient être des événements précoces de l'infection et jouer un rôle moteur dans l'instabilité génomique et la progression de l'ATL. Cependant, ce processus est certainement multifactoriel, et nécessite certainement d'autres altérations des cellules infectées pour permettre leur survie ainsi que leur échappement au système immunitaire, ce qui expliquerait le développement non systématique et lent de l'ATL.

Quoi qu'il en soit, les mécanismes d'induction de ces altérations par la protéine Tax restent encore seulement partiellement élucidés à ce jour, avec des observations différentes qui restent à réconcilier. L'étude du centrosome a connu des développements techniques majeurs au cours des dernières années qui ont permis une compréhension bien plus poussée de sa structure et de son

fonctionnement. Il nous semble donc particulièrement intéressant de poursuivre ces premières études en nous basant sur les nouvelles connaissances et les nouveaux outils développés pour affiner la compréhension des altérations centrosomales induites par Tax en lien avec le processus d'oncogénèse.

III – Résultats préliminaires et problématique du travail de thèse

Dans cette partie, il s'agira de présenter les grandes lignes de quelques résultats préliminaires obtenus avant mon arrivée au laboratoire, afin de comprendre comment ce travail de thèse s'ancre dans leur continuité. L'ensemble des travaux fait l'objet d'un article (présenté en annexe 1) qui les décrit plus en détail.

A. Identification par Bio-ID de partenaires potentiels de Tax au centrosome

Afin de comprendre les mécanismes d'induction d'altérations centrosomales par Tax, les partenaires de Tax au centrosome ont été investigués par une approche de protéomique : la biotinylation de proximité (ou Bio-ID).

La biotinylation de proximité est une technique de protéomique apparue dans les dernières années, qui permet l'identification de partenaires de proximité d'une protéine d'intérêt suite à leur biotinylation *in situ* (Roux *et al.*, 2012). Elle est particulièrement intéressante pour l'étude du centrosome, qui est un compartiment cellulaire difficile d'accès par les techniques de protéomique classiques.

Une fusion entre Tax et une biotine-ligase BirA est générée et exprimée en cellules 293T. Lors de l'ajout de biotine au milieu de culture, BirA catalyse la biotinylation des protéines se trouvant à proximité (la biotinylation décroît avec la distance à l'enzyme), correspondant donc à des partenaires potentiels de Tax. A noter que dans cette technique, la biotinylation indique la proximité mais n'est pas une preuve d'interaction physique. Ces partenaires de proximité peuvent alors être purifiés à l'aide de billes de streptavidine après lyse cellulaire, et une analyse par spectrométrie de masse permet leur identification (Figure 19).

Elle a permis l'identification d'un ensemble de partenaires potentiels de Tax, incluant des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et du cycle du centrosome, et notamment de façon fascinante la protéine Cep63. Pour plus de détails quant à ces différents partenaires potentiels identifiés, voir l'article en annexe 1.

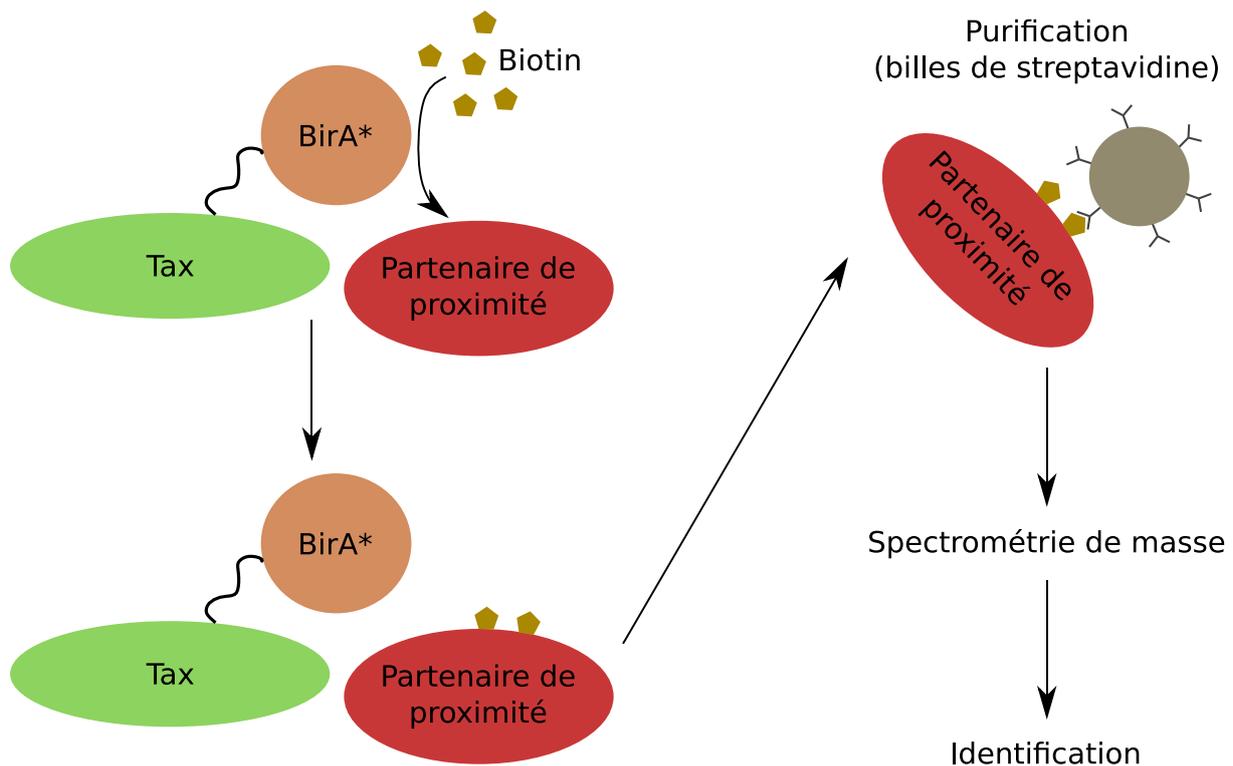


Figure 19 : Principe de la technique de BioID.

Une protéine fusion entre Tax et la biotine-ligase BirA est exprimée en cellules 293T. Suite à l'ajout de biotine dans le milieu de culture, BirA catalyse une biotinylation de proximité permettant le marquage des partenaires de proximité de Tax. Ces partenaires de proximité seront ensuite purifiés à l'aide de billes de streptavidine et identifiés par spectrométrie de masse.

B. Identification de Cep63 comme un partenaire de Tax au centrosome

Parmi les partenaires potentiels de Tax identifiés par Bio-ID, nous avons choisi d'investiguer plus précisément l'interaction avec la protéine centrosomale Cep63.

De façon importante, l'interaction entre Tax et Cep63 a d'abord été confirmée par co-immunoprécipitation dans des lignées de cellules adhérentes U2OS transfectées avec Tax et de façon endogène dans des lignées de cellules T chroniquement infectées par HTLV-1. Les domaines de Cep63 impliqués dans cette interaction ont été cartographiés, montrant que l'interaction passe par son extrémité N-Terminale, entre les acides aminés 1 et 135.

La capacité d'interagir avec Cep63 de différents mutants de Tax, les mutants M47, M22, K4-8R et KOR décrits précédemment (Smith and Greene, 1990; Chiari *et al.*, 2004), a également été analysée. En effet, ces différents mutants sont déficients pour différentes fonctions de Tax, en lien avec des défauts de modifications post-traductionnelles pour les mutants K4-8R et KOR. Il semblait donc intéressant de savoir si l'interaction entre Tax et Cep63 dépendait des fonctions de transactivation du LTR, d'activation de la voie NF- κ B, des différentes modifications post-traductionnelles de Tax ou d'autres caractéristiques de ces mutants. Le mutant M47 correspond à une substitution Leu-Leu \rightarrow Arg-Ser en

position 319-320, et est déficient pour les fonctions de transactivation du LTR viral impliquant CREB mais conserve sa capacité à activer la voie NF- κ B par le recrutement d'IKK au niveau de membranes péri-golgiennes en région centrosomale suite à son ubiquitination. Sa localisation est majoritairement nucléaire et centrosomale (Smith and Greene, 1990; Kfoury *et al.*, 2008). Le mutant M22 correspond à une substitution Gly-Leu \rightarrow Ala-Ser en position 137-138, et conserve sa capacité de transactiver le LTR viral, mais n'active pas la voie NF- κ B (Smith and Greene, 1990) : il ne peut pas être ubiquitiné (Chiari *et al.*, 2004) et ne peut pas recruter IKK au niveau des membranes péri-golgiennes. A noter également que ce mutant de Tax localise très peu au centrosome et présente plutôt une localisation cytoplasmique et nucléaire diffuse (Nasr *et al.*, 2006; Kfoury *et al.*, 2008). Les mutants K4-8R et KOR sont des mutants d'ubiquitination de Tax, mutés respectivement sur les lysines 4 à 8 ou sur toutes les lysines (1 à 10) remplacées par des arginines. Les lysines 4 à 8 sont des résidus cibles de l'ubiquitination de Tax impliqués dans l'activation de la voie NF- κ B (Nasr *et al.*, 2006), ces mutants sont donc déficients pour cette ubiquitination et l'activation de NF- κ B subséquente. En outre, Tax est également SUMOylée sur ses lysines 7 et 8 (Nasr *et al.*, 2006) et acétylée sur la lysine 10 (Lodewick *et al.*, 2009). Ces mutants permettent donc d'étudier l'impact de l'ubiquitination, de la SUMOylation et de l'acétylation de Tax sur son interaction avec Cep63.

De façon intéressante, les résultats obtenus ont montré que seul le mutant M47 de Tax conservait sa capacité à interagir avec Cep63, suggérant que l'ubiquitination de Tax pourrait être impliquée dans cette interaction. De plus, l'identification de mutants de Tax n'interagissant pas avec Cep63 est intéressante pour pouvoir étudier les conséquences de l'interaction entre Tax et Cep63.

C. Problématique du travail de thèse et stratégie expérimentale

Comme nous l'avons vu, Cep63 joue un rôle central dans la régulation du cycle du centrosome et du cycle cellulaire. Son identification comme un partenaire de Tax au centrosome questionne sur la possibilité que cette protéine puisse être impliquée dans l'induction d'anomalies de structure, de nombre ou de fonction du centrosome. Nous nous sommes donc demandés si l'interaction avec Tax conduisait à des altérations de localisation ou de fonction de Cep63.

D'un point de vue expérimental, nous avons souhaité focaliser notre étude sur des travaux réalisés en lignée de cellules T, en utilisant la lignée Jurkat (JK). En effet, bien que cela rende l'étude du centrosome plus complexe que dans des lignées de cellules adhérentes où sont conduites la plupart des études structurales et fonctionnelles le concernant, il nous semblait important de nous rapprocher au maximum des conditions d'infections, tout en conservant une certaine aisance expérimentale.

Nous avons d'abord étudié le phénotype de Cep63 dans des cellules JK transfectées avec Tax, en utilisant des techniques de microscopie confocale et super-résolutive. Afin de déterminer si le

phénotype de Cep63 est une conséquence directe de son interaction avec Tax, nous avons comparé le phénotype induit par le mutant de Tax M47 interagissant avec Cep63 et les mutants de Tax M22 et KOR ayant perdu cette capacité d'interaction.

Nous avons alors cherché à caractériser l'implication de ces altérations de Cep63 dans l'induction d'aberrations centrosomales par Tax. Pour cela, nous avons choisi d'étudier le phénotype d'autres marqueurs centrosomaux en microscopie confocale et super-résolutive : la centrine, marqueur centriolaire, et la péricentrine (PCNT), marqueur du matériel péricentriolaire. Ces protéines jouant des rôles importants dans les fonctions du centrosome, leur perturbation suggérerait, au-delà d'altérations structurales, de probables altérations fonctionnelles du centrosome.

Enfin, nous avons souhaité caractériser ces altérations induites par Tax spécifiquement en mitose, dans des cellules JK inductibles pour l'expression de Tax. En effet, lors de la mitose, le centrosome permet la répartition équitable des chromosomes entre les deux cellules filles. Des altérations de la structure ou de la fonction du centrosome peuvent donc perturber cette étape, et être un moteur de l'instabilité génomique. Il nous semblait donc très intéressant de comprendre quelles étaient les conséquences mitotiques des altérations centrosomales observées en interphase, afin de lier ces observations à l'instabilité génomique observée dans les cellules ATL. Pour cela, nous avons tenté de mettre au point la technique de cytométrie d'image pour l'étude du centrosome en cellules non adhérentes, permettant l'acquisition rapide d'images de microscopie à fluorescence de très nombreuses cellules, et ainsi d'accéder à la population rare de cellules mitotiques.

MATERIEL ET METHODES

Culture cellulaire :

La lignée de cellules Jurkat (JK) est une lignée immortalisée et transformée de lymphocytes T CD4+ humains dérivée de sang périphérique, qui provient d'un patient leucémique ALL (Acute Lymphoblastic Leukemia) non infecté par HTLV-1. Cette lignée ne présente pas de défauts marqués du centrosome.

Les lignées de cellules JK iTax expriment Tax de façon inductible, suite à l'ajout de doxycycline dans le milieu de culture. Elles ont été générées à partir de cellules JK par transduction du système d'expression inductible Tet-On 3G (Clontech-Takara) par la plateforme GIGA – Viral Vectors de l'université de Liège, et ont été fournies gracieusement par Jean-Claude Twizere (Vandermeulen *et al.*, 2021).

Ces cellules sont cultivées dans du milieu Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) + GlutaMAX™ (Gibco), supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) et des antibiotiques (pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 µg/mL, Gibco), et maintenues à 37 °C avec 5 % de CO₂.

Pour l'induction de l'expression de Tax, les cellules JK iTax sont centrifugées et resuspendues à une concentration cellulaire de 5.10⁵ cellules/mL dans du RPMI + GlutaMAX™ + 10 % SVF + antibiotiques (pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 µg/mL) supplémenté avec 1 µg/mL de doxycycline, et sont maintenues en culture pendant 48 h.

Plasmides :

Les plasmides codant pour les constructions de Tax portant une étiquette 6xHis, WT ou mutants (M47, M22, K4-8R et K0R), dans un vecteur pSG5M ont été préalablement décrits dans la littérature (Smith and Greene, 1990; Chiari *et al.*, 2004).

Le plasmide IκBα Ser32/36A (IκBα DN) correspond à un dominant négatif de la voie NF-κB, et a été généré par mutagenèse des Sérines 32 et 36 en Arginine, ce qui bloque leur phosphorylation nécessaire à l'activation de la voie NF-κB canonique.

Le plasmide IKK2-EE est un dominant actif de la voie NF-κB. Il a été généré par mutagenèse des Sérines 177 et 181 en Acide Glutamique par le Dr. Reinhard Voll (Université de Fribourg, Allemagne) (Voll *et al.*, 2000).

Transfection des cellules Jurkat par microporation :

Les cellules JK sont transfectées par microporation à l'aide du kit Neon™ Transfection System 100 µL (ThermoFisher Scientific). 2.10⁶ millions de cellules sont microporées avec 20 à 25 µg total de plasmide.

Afin d'ajuster les niveaux d'expression de Tax et de ses différents mutants s'exprimant plus ou moins difficilement dans ces cellules (comme décrit dans (Millen *et al.*, 2020)), les quantités de plasmides sont ajustées à 10 µg (Tax WT), 1 µg (Tax M47), 25 µg (Tax M22) et 20 µg (Tax KOR) de plasmide Tax1-His, complété avec du plasmide vide pSG5M. Dans les expériences l'indiquant, les cellules sont cotransfectées avec 5 µg d'un dominant négatif de la voie NF-κB (IκBα DN, IκBα Ser32/36A) ou 8 µg d'un dominant actif de la voie NF-κB (IKK2-EE).

Les cellules sont lavées avec du PBS et resuspendues dans 100 µL de milieu Opti-MEM™ (Gibco™), et mélangées avec les mix de plasmides. Les cellules sont aspirées dans le cône de microporation, et microporées dans du tampon E2 à un voltage de 1350 V, en 3 pulsations de 10 ms. Elles sont alors déposées dans 2 mL de milieu RPMI + GlutaMAX™ + 10% de SVF sans antibiotiques, et maintenues en culture pendant 48 h.

Clonage des JK iTax :

Les JK iTax ont été clonées afin d'obtenir une population monoclonale homogène en termes de ploïdie. Un premier clonage a été réalisé par dilution limite en plaque 96 puits : 24 h après la dilution, seuls les puits contenant une ou deux cellules sont conservés. Après amplification, la ploïdie et la capacité d'expression de Tax suite à une induction à la doxycycline sont analysées. Ce clonage a permis d'obtenir le clone D8 tétraploïde. Un deuxième clonage a été réalisé par tri cellulaire à l'aide d'un trieur FACS ARIA II (BD). Les cellules sont marquées au Hoechst (H3570, Invitrogen, 0,4 µg pour 5.10⁵ cellules) en RPMI + GlutaMAX™ + 10 % SVF + antibiotiques (pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 µg/mL) pendant 20 minutes à 37 °C, puis lavées en PBS + 2 mM EDTA + 1 % SVF avant le tri. Les cellules sont triées selon leur niveau de marquage Hoechst, permettant d'isoler des cellules diploïdes individuellement en plaque 96 puits. Après amplification, la ploïdie et la capacité d'expression de Tax suite à une induction à la doxycycline sont analysées. Ce clonage a permis d'obtenir le clone D7 diploïde.

Synchronisation cellulaire en mitose :

Les cellules sont centrifugées et remises en culture à une concentration cellulaire de 5.10⁵ cellules/mL dans du milieu RPMI + GlutaMAX™ + 10 % SVF + antibiotiques (pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 µg/mL), supplémenté avec les inhibiteurs suivants : 100 µM de Monastrol (sc-202710, Santa Cruz Biotechnology) ou 10 µM de RO-3306 (sc-358700, Santa Cruz Biotechnology) ou 200 ng/mL de Nocodazole (M1404, Sigma). Le Monastrol est un inhibiteur de la kinésine mitotique Eg5, et bloque de façon réversible la séparation des centrosomes ce qui conduit à un arrêt en mitose avec un fuseau monoastrol. Le RO-3306 est un inhibiteur des CDKs et en particulier de CDK1, qui bloque

de façon réversible la progression du cycle cellulaire en phase G2/M. Le Nocodazole induit la dépolymérisation des microtubules, et induit le blocage du cycle cellulaire en mitose.

Pour les traitements au Monastrol et au RO-3306, après incubation avec ces inhibiteurs pendant 20 h, les cellules sont centrifugées et lavées en PBS, puis resuspendues en RPMI + GlutaMAX™ + 10 % SVF + antibiotiques (pénicilline 100 U/mL, streptomycine 100 µg/mL) et remises en culture pour un relâchement du blocage du cycle cellulaire pendant respectivement 1 h (Monastrol), 1 h 30 (RO-3306, cellules JK) ou 2 h 30 (RO-3306, cellules JK iTax) avant la fixation et l'analyse.

Anticorps :

Pour les expériences de Western Blot, les anticorps commerciaux anti-His clone HIS.H8 produit en souris (ab18184, Abcam, 1/4 000), anti-β-Actine clone AC-74 produit en souris (A2228, Sigma, 1/6 000) et anti-mouse IgG couplé à HRP (NA9310V, GE Healthcare, 1/40 000) ont été utilisés.

Pour les expériences d'immunofluorescence, les anticorps commerciaux primaires anti-His produit en chèvre (ab9136, Abcam, 1/100 ; A190-113A, Bethyl Laboratories, 1/400), anti-Cep63 produit en lapin (06-1292, Millipore, 1/500), anti-p65 clone F-6 produit en souris (sc-8008, Santa Cruz Biotechnology, 1/50), anti-Centrine clone 20H5 produit en souris (04-1624, Millipore, 1/1 000), anti-Péricentrine clone 28144 produit en souris (ab28144, Abcam, 1/1 000) et produit en lapin (ab4448, Abcam, 1/2 000, Figure 28), anti-α-Tubuline clone B-5-1-2 produit en souris (T6074 / T5168, Sigma, 1/100), et secondaires anti-goat Alexa Fluor 488 (ab150129, Abcam, 1/200), anti-rabbit Alexa Fluor 568 (ab175693, Abcam, 1/250) et anti-mouse Alexa Fluor 647 (ab150107, Abcam, 1/100) ont été utilisés.

Pour les expériences de cytométrie de flux et d'image, les anticorps commerciaux primaires anti-phospho-Histone-H3 (Ser10) conjugué à la biotine (16-189, Sigma, 1/500), anti-Centrine clone 20H5 produit en souris (04-1624, Millipore, 1/1 000), anti-Péricentrine produit en lapin (ab4448, Abcam, 1/2 000) et secondaires anti-rabbit Alexa Fluor 568 (ab175693, Abcam, 1/1 000), anti-mouse Alexa Fluor 647 (ab150107, Abcam, 1/500) ainsi qu'une Streptavidine Alexa Fluor 647 (S21374, Invitrogen, 1/500, Figure 28) et une Streptavidine PE/Cyanine7 (405206, BioLegend, 1/2 000) ont été utilisés. L'anticorps monoclonal anti-Tax LT4 directement couplé à l'Alexa Fluor 488 (1/10), a été généreusement fourni par le Dr. Yuetsu Tanaka (Université de Kitasato, Kanagawa, Japon).

Western Blot :

Les cellules JK sont microporées et remises en culture pendant 48 h avec les plasmides d'intérêt. Les cellules sont récoltées et lavées en PBS, puis lysées pendant 20 minutes sur glace en tampon RIPA : 50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % NP40, 0,25 % NaDOC, Protease Inhibitor Cocktail (Complete,

Roche), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Après centrifugation, les concentrations protéiques du lysat sont dosées par Bradford (Biorad), et les échantillons sont analysés par SDS-PAGE. Les échantillons sont dénaturés pendant 5 minutes à 95 °C en présence de XT Sample Buffer (Biorad) et XT Reducing Agent (Biorad). Les protéines sont séparées sur un gel Bis-Tris avec 12 % d'acrylamide (Criterion, Biorad) et transférées sur une membrane de PVDF (Immobilon P, Millipore). Après saturation en TBS-Tween (Sigma-Aldrich) + lait 5 % pendant 1 h à température ambiante, les membranes sont incubées avec les anticorps primaires pendant 2 h puis secondaires pendant 45 minutes, dilués dans du TBS-Tween + lait 1 %, avant révélation avec le réactif Western Lightning Pro (Perkin Elmer). La révélation est imagée à l'aide du système ChemiDoc (Biorad).

Immunofluorescence et microscopie :

Les cellules JK sont microporées et remises en culture pendant 48 h avec les plasmides d'intérêt. Les cellules sont lavées dans du milieu RPMI + GlutaMAX™ sans SVF et déposées sur des lamelles de microscopie #1.5 (Menzel Gläser) pré-traitées avec de la poly-L-lysine (P4832, Sigma) pendant 15 minutes pour faciliter l'adhésion des cellules aux lamelles. Les cellules sont fixées avec du méthanol froid à -20 °C pendant 10 minutes. Après lavage au PBS, les cellules sont perméabilisées en PBS-Triton 0,5 % pendant 10 minutes, puis saturées en PBS + Tween 0,2 % + lait 5 % pendant 45 minutes à température ambiante. Les lamelles sont incubées dans des bains d'anticorps primaires puis secondaires dilués en PBS + Tween 0,2 % + lait 5 % pendant 45 minutes chacun, en chambre humide. Les lamelles sont montées en milieu de montage Prolong Diamond antifade mountant contenant du DAPI (P36966, Invitrogen).

L'acquisition des images de microscopie confocale (Figure 20 à Figure 24, Figure 26) a été réalisée avec un microscope inversé Axio Observer (Zeiss) équipé d'une tête confocale LSM800, de détecteurs sensibles de type GaAsP, d'un objectif Plan-Apochromatique 63x / 1,4 à immersion à huile (Zeiss) et du logiciel d'acquisition Zen 2.6 (Zeiss). La taille des pixels a été choisie de façon à respecter le critère d'échantillonnage. Les images présentées correspondent à une projection de maximum d'intensité d'une série d'acquisition en Z sur toute l'épaisseur de la cellule (à l'exception de la Figure 22, qui présente la projection du maximum d'intensité d'une série de 4 plans en Z en région nucléaire) avec 0,2 µm d'intervalle entre chaque plan, qui correspond au critère d'échantillonnage en z.

L'acquisition des images de microscopie à épifluorescence (Figure 28) et les comptages d'altérations centrosomales effectués pour les Figure 21 à Figure 24, Figure 26 et Figure 27 sont réalisés à l'aide d'un microscope droit Axio Imager. Z1 (Zeiss) équipé d'un objectif Plan-Apochromatique 63x / 1,4 à immersion à huile, d'une caméra Coolsnap HQ monochrome CDD (1392x1040 – 6,45 µm pixel, 12 bit, Roper Scientific) et du logiciel d'acquisition MetaMorph

(Molecular Devices LLC). Pour les comptages d'altérations centrosomales, 50 cellules transfectées sont analysées par condition pour chaque expérience. Pour chacune d'entre elle, le nombre de spots de chaque marqueur centrosomal ainsi qu'une éventuelle altération de son aspect (dispersion, perte de signal) sont analysés, permettant ainsi de caractériser et de corrélérer entre elle les altérations des différents marqueurs.

L'acquisition des images de microscopie super-résolutive (Figure 25) a été réalisée à l'aide d'un microscope Statif inversé Axio Observer (Zeiss) équipé du module de super résolution par illumination structurée Elyra 7 Lattice SIM (Zeiss) (Siebenmorgen *et al.*, 2018) piloté par le logiciel Zen 3.0R (Zeiss). Les images ont été obtenues avec un objectif alpha Plan-Apochromatique 63x / 1,46 à immersion à huile (Zeiss), pour lequel la taille des motifs de structuration de la lumière a été optimisée. Les acquisitions ont été effectuées avec une caméra PCO.edge4.2 sCMOS (Photonlines). Les tailles des motifs de structuration de la lumière ont été changées entre chaque canal de façon à suivre l'optimal recommandé par le logiciel. Les images ont été acquises à partir de 13 translations du pattern de structuration. Les images ont été reconstruites avec le même logiciel que le logiciel d'acquisition, en utilisant le module Lattice SIM2 qui associe la reconstruction de l'image à une déconvolution itérative (Löschberger *et al.*, 2021). La reconstruction a été faite en 20 itérations, avec un poids du facteur de régularisation de 0,025 et en filtrant 100% des informations d'ordre 0 (correspondant au bruit de fond). La taille du pixel de l'image reconstruite a été adaptée afin de suivre le critère d'échantillonnage en se basant sur une augmentation de résolution de l'image d'un facteur 1.5 permise par la technologie SIM2. Les images présentées correspondent à une projection de maximum d'intensité d'une série d'acquisition en Z sur toute l'épaisseur de la cellule avec 0,1 μm d'intervalle entre chaque plan, qui correspond au critère d'échantillonnage en z.

Les images présentées sont montées à l'aide du logiciel ImageJ (Schneider, Rasband and Eliceiri, 2012).

Cytométrie de flux et d'image :

Pour les expériences de cytométrie d'image, l'expression de Tax est préalablement induite dans les JK iTax par ajout de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de doxycycline au milieu de culture pendant 48 h (voir ci-dessus). Pour enrichir la population en cellules mitotiques, les cellules sont ensuite synchronisées par l'ajout de 10 μM de RO-3306 (sc-358700, Santa Cruz Biotechnology) pendant 20 h, puis relâchées pendant 2 h 30 avant la fixation (voir ci-dessus).

Avant la fixation, les cellules sont lavées en PBS et incubées à l'obscurité pendant 30 minutes avec un colorant Live – Dead eFluor 780 (65-0865-14, ThermoFisher Scientific, 1/1 000, 200 μL pour 10^6 cellules) qui permet de marquer les cellules mortes. Les cellules sont lavées en PBS et fixées avec du

méthanol froid à -20 °C pendant 10 minutes. Les cellules sont bloquées avec un kit de blocage Avidin/Biotin (ab64212, Abcam) : 10 minutes d'incubation dans une solution d'avidine (1 goutte pour 5.10^5 cellules), suivies de lavages, suivis de 10 minutes d'incubation dans une solution de biotine (1 goutte pour 5.10^5 cellules). Les cellules sont ensuite incubées à température ambiante dans des solutions d'anticorps primaires (45 minutes) puis secondaires (30 minutes) dilués dans du PBS + Tween 0,2 % + Bovine Serum Albumin (BSA, A9647, Sigma) 5 % + EDTA 2 mM, avant d'être resuspendues dans 30 μ L de PBS + EDTA + Hoechst 33342 (H3570, Invitrogen, 0,4 μ g pour 5.10^5 cellules) pour la cytométrie d'image (ou 200 μ L pour la cytométrie de flux).

Pour la cytométrie de flux, l'acquisition est réalisée à l'aide d'un cytomètre MACSQuant VYB, et l'analyse est réalisée à l'aide du logiciel FlowJo.

Pour la cytométrie d'image, l'acquisition est réalisée à l'aide d'un ImageStreamX (ISX) Mk II (Luminex) qui permet l'acquisition comme en cytométrie de flux classique de l'intensité de fluorescence globale des cellules, mais également d'images de fluorescence de chaque cellule permettant l'analyse de la localisation intracellulaire du signal. Pour chaque expérience et chaque condition, entre 100 000 et 400 000 cellules sont analysées. L'analyse est réalisée avec le logiciel IDEAS (Luminex). Lors de l'analyse, les cellules hors de focus sont d'abord éliminées. On conserve également seulement les singulets et les cellules vivantes et présentant un marquage Hoechst permettant de déterminer leur phase du cycle cellulaire, en association avec un marquage de la phospho-Histone-H3, spécifiquement phosphorylée sur la Serine 10 lors de la mitose. Les spots des marqueurs centrosomaux sont définis par les zones de pic d'intensité locale de signal, et sont ainsi dénombrés de façon automatisée. On conserve pour l'analyse uniquement les cellules dans lesquelles on détecte au moins un spot de chaque marqueur centrosomal, afin d'éviter de prendre en compte dans l'analyse des cellules où le centrosome ne serait pas au focus. Dans les conditions où l'expression de Tax est induite, on définit également différents niveaux d'expression de Tax : négatif (neg), faible (low) ou fort (high) en fonction de l'intensité du signal et du nombre de spots de Tax détectés.

Analyse statistique :

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Les tests statistiques utilisés sont précisés dans les légendes de chaque figure.

Les résultats des tests statistiques sont représentés de la façon suivante : ns = $p > 0,05$; * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

RESULTATS

I – L'interaction de Tax avec Cep63 corrèle avec sa dispersion au centrosome

Les résultats obtenus précédemment montrent que Tax interagit avec Cep63 au centrosome. Nous nous sommes donc demandés si cette interaction avait pour conséquence une altération de la localisation ou des fonctions de Cep63, et avons dans un premier temps cherché à caractériser le phénotype de Cep63 induit par l'expression de Tax. Afin de déterminer si ce phénotype est une conséquence directe de l'interaction entre Tax et Cep63 ou une conséquence indirecte de l'expression de Tax, nous avons également étudié le phénotype de Cep63 induit par certains mutants de Tax, dont les résultats précédents montrent qu'ils conservent ou pas la capacité d'interagir avec Cep63.

Nous avons pour cela choisi de travailler en lignée de cellules T, les cellules Jurkat (JK), afin de pouvoir ensuite étudier les effets de cette interaction de Tax avec Cep63 dans des conditions se rapprochant de conditions physiologiques d'infection, le virus HTLV-1 infectant principalement les lymphocytes T *in vivo*.

A. Validation de l'expression de Tax et de ses mutants en lignée T

Pour commencer, nous avons validé l'expression de Tax dans la lignée de cellules JK.

Nous avons d'abord vérifié l'expression de Tax WT et des différents mutants d'intérêt (M47, M22, K4-8R et KOR) par Western Blot. Pour transfecter ces cellules, nous avons utilisé la technique de microporation. Nous avons choisi d'ajuster la quantité de plasmide transfectée entre Tax WT et les différents mutants, afin de compenser la diminution d'expression des mutants déficients pour l'activité de la voie NF- κ B décrite précédemment (Millen *et al.*, 2020).

Nous avons analysé l'expression de Tax dans ces cellules par Western Blot, et avons pu confirmer que malgré la persistance de variations de niveau d'expression, nous parvenions bien à exprimer ces différentes constructions en cellules JK (Figure 20 A).

Nous avons ensuite vérifié la localisation subcellulaire de Tax et de ses mutants en cellules JK, afin de confirmer qu'elle correspondait bien à celle de la littérature et aux observations en cellules adhérentes.

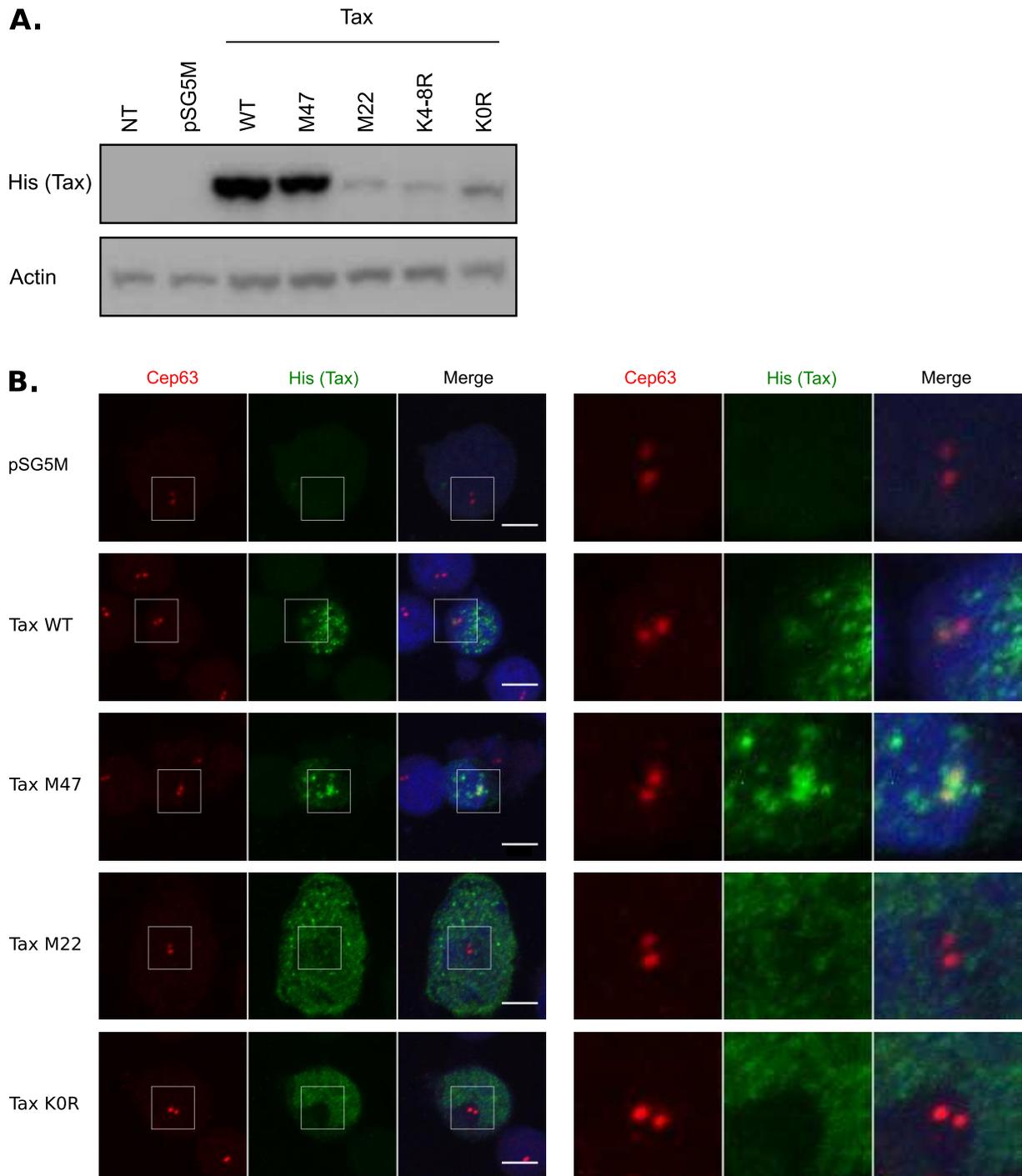


Figure 20 : Validation de l'expression et localisation subcellulaire de Tax et de ses mutants en lignée de cellules Jurkat.

2 millions de cellules Jurkat sont microporées avec respectivement 10 μ g (Tax WT), 1 μ g (Tax M47), 25 μ g (Tax M22) et 20 μ g (Tax K4-8R et K0R) de plasmide Tax1-His, complété avec du plasmide vide pSG5M, et laissées en culture pendant 48h. **(A)** Les culots cellulaires sont lysés en RIPA, et l'expression des protéines est analysée par Western Blot avec un anticorps anti-His et un anticorps anti-Actin comme témoin de charge. NT : non transfecté. **(B)** Les cellules sont fixées et marquées pour l'immunofluorescence avec des anticorps anti-Cep63 et anti-His et les noyaux sont colorés au DAPI. Les cellules sont imagées par microscopie confocale. Les panels sur la partie droite correspondent à un agrandissement de la région centrosomale de la cellule montrée sur le panel de gauche. Barre d'échelle : 5 μ m.

Conformément à la littérature (Kfoury *et al.*, 2008; Belgnaoui *et al.*, 2010), nous avons observé que dans les cellules JK, Tax localise au centrosome et en région péri-centrosomale, repérée par le marquage de la protéine centrosomale Cep63 qui forme un à deux spots selon la phase du cycle cellulaire, en raison de sa localisation à l'extrémité proximale des centrioles maternels. Tax localise également dans le noyau sous forme de « speckles » (Figure 20 B). Le mutant M47 partage cette localisation, avec fréquemment une localisation centrosomale encore plus marquée que la protéine WT (Figure 20 B). En revanche, les mutants M22 et KOR ne localisent pas ou que très peu au centrosome, et présentent une localisation nucléaire et cytoplasmique essentiellement diffuse (Figure 20 B).

Ainsi, il est possible d'exprimer Tax et les mutants étudiés dans des cellules Jurkat, et la localisation observée correspond à ce qui a été décrit dans la littérature. Nous avons ensuite voulu savoir si l'expression de Tax induisait des modifications de la localisation de Cep63.

B. Tax induit la dispersion de Cep63 du centrosome

Nous nous sommes demandés si l'expression de Tax pouvait perturber la localisation de Cep63. Nous nous sommes donc intéressés plus précisément à la distribution de la protéine Cep63 dans les cellules exprimant Tax, que nous avons observée par microscopie à fluorescence. Dans les cellules contrôle, comme nous l'avons vu sur la Figure 20, Cep63 est localisée au centrosome, où elle forme jusqu'à deux spots bien nets (Figure 21 A). En revanche, dans les cellules exprimant Tax, on observe fréquemment une distribution altérée de Cep63, avec une dispersion du signal du centrosome vers la région environnante, souvent au niveau de la région péri-centrosomale où localise Tax (Figure 21 A). Cette dispersion est également fréquemment associée à une perte de l'aspect nettement ponctiforme du signal de Cep63.

Afin de comprendre si cette dispersion de Cep63 est une conséquence directe de son interaction avec Tax, nous avons étudié la distribution de Cep63 dans les cellules exprimant les mutants de Tax M47, M22 et KOR. En effet, les résultats obtenus précédemment montrent que seul le mutant M47 conserve la capacité d'interagir avec Cep63, contrairement aux mutants M22 et KOR. Nous nous sommes donc demandé si les mutants de Tax M22 et KOR conservent malgré cela la capacité à induire la dispersion de Cep63. De façon intéressante, parmi les mutants de Tax que nous avons étudiés, seul le mutant M47 semble capable d'induire cette dispersion de Cep63 au centrosome (Figure 21 A).

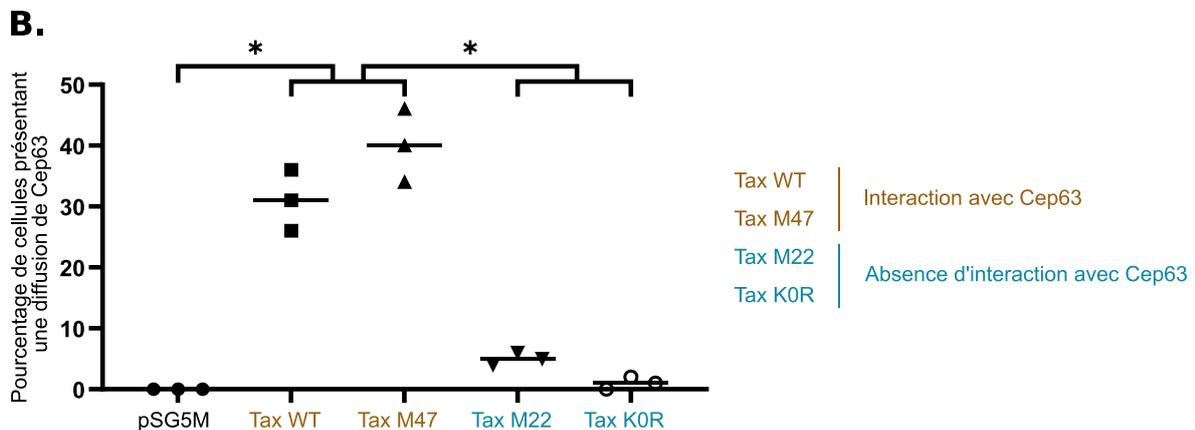
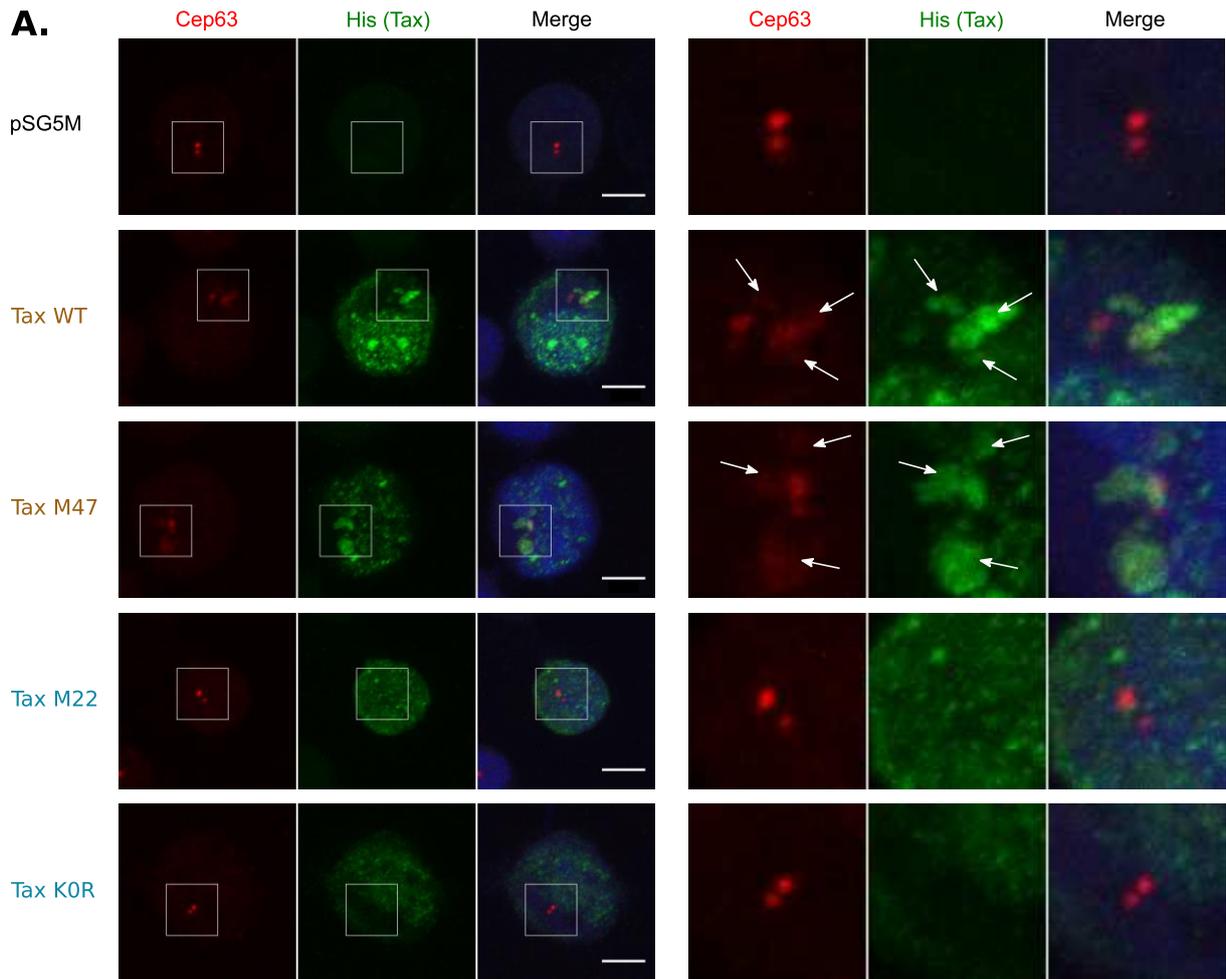


Figure 21 : Tax WT et le mutant M47 induisent une dispersion de Cep63 du centrosome.

(A,B) 2 millions de cellules Jurkat sont microporées avec respectivement 10µg (Tax WT), 1µg (Tax M47), 25µg (Tax M22) et 20µg (Tax K0R) de plasmide Tax1-His, complété avec du plasmide vide pSG5M, et laissées en culture pendant 48h avant d'être fixées et marquées pour l'immunofluorescence avec des anticorps anti-Cep63 et anti-His et les noyaux sont colorés au DAPI. (A) Les cellules sont imagées par microscopie confocale. Les panels sur la partie droite correspondent à un agrandissement de la région centrosomale de la cellule montrée sur le panel de gauche. Les flèches pointent vers les zones de dispersion de Cep63 colocalisées avec Tax. Barre d'échelle : 5µm. (B) Quantification du pourcentage de cellules présentant une dispersion de Cep63. Pour chaque expérience, 50 cellules transfectées sont

analysées. Les données sont représentées par la moyenne ainsi que les valeurs individuelles des trois expériences, et ont été analysées à l'aide d'une ANOVA monofactorielle à mesures répétées suivie de tests post-hoc permettant la comparaison de moyennes en appliquant la correction de Tukey.

Nous avons quantifié la proportion de cellules présentant une dispersion de Cep63 parmi les cellules transfectées avec Tax ou ses mutants, et confirmé que Tax WT pouvait bien induire cette dispersion dans environ 30 % des cellules transfectées, et le mutant M47 au moins autant, mais que cette dispersion de Cep63 était quasi inexistante en l'absence de Tax ou lorsque les mutants M22 et KOR étaient exprimés (Figure 21 B).

Ces résultats suggèrent que la dispersion de Cep63 du centrosome pourrait être une conséquence directe de son interaction avec Tax.

C. La dispersion de Cep63 du centrosome par Tax ne dépend pas de la voie NF- κ B

Néanmoins, outre leur capacité à interagir avec Cep63, certains des mutants de Tax étudiés sont déficients pour d'autres fonctions de Tax. En effet, le mutant M47 de Tax a pour particularité par rapport aux autres mutants M22 et KOR de conserver la capacité d'activer la voie NF- κ B, perdue chez les autres mutants (Kfoury *et al.*, 2008). Nous avons pu confirmer cette activation différentielle de la voie NF- κ B par les différents mutants dans notre système expérimental, en observant la localisation subcellulaire de la protéine p65 / RelA. En effet, en absence d'activation de la voie NF- κ B canonique, la protéine p65 est séquestrée dans le cytoplasme par un inhibiteur I κ B. En revanche, lorsque la voie est activée, la dégradation d'I κ B permet la libération de p65 et sa translocation nucléaire, où elle va pouvoir transactiver l'expression des gènes cibles de la voie NF- κ B. La localisation nucléaire de p65 est donc un marqueur d'activation de la voie NF- κ B canonique. Nous avons pu confirmer que Tax WT et M47 mais pas M22 et KOR induisent bien la translocation nucléaire de p65 (Figure 22 A), et donc activent la voie NF- κ B.

Afin d'éliminer la possibilité que la différence de dispersion de Cep63 induite par les mutants soit attribuable à la capacité du mutant M47 d'activer la voie NF- κ B, nous avons modulé l'activité de cette voie dans des cellules exprimant Tax ou ses mutants et analysé la distribution de Cep63.

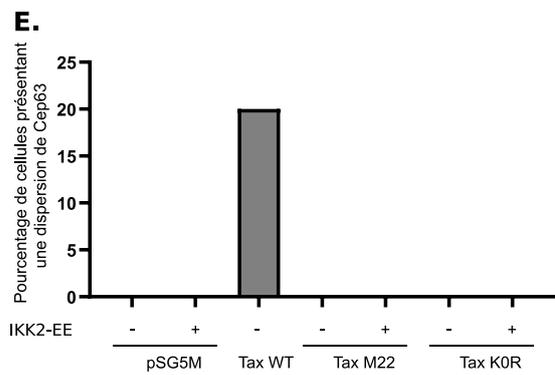
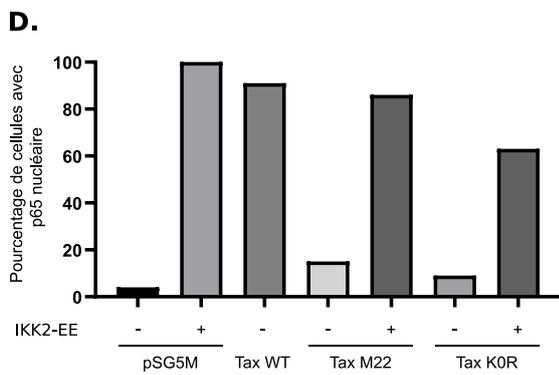
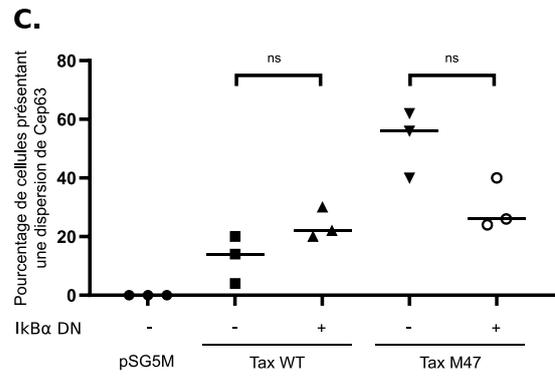
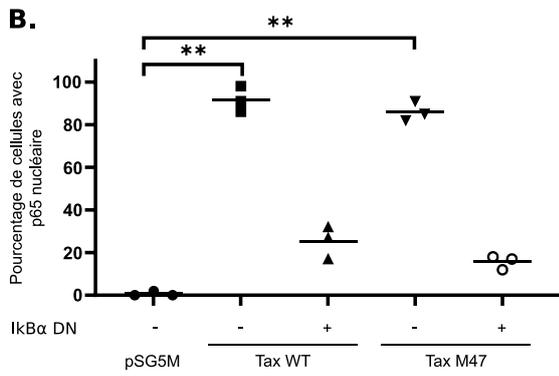
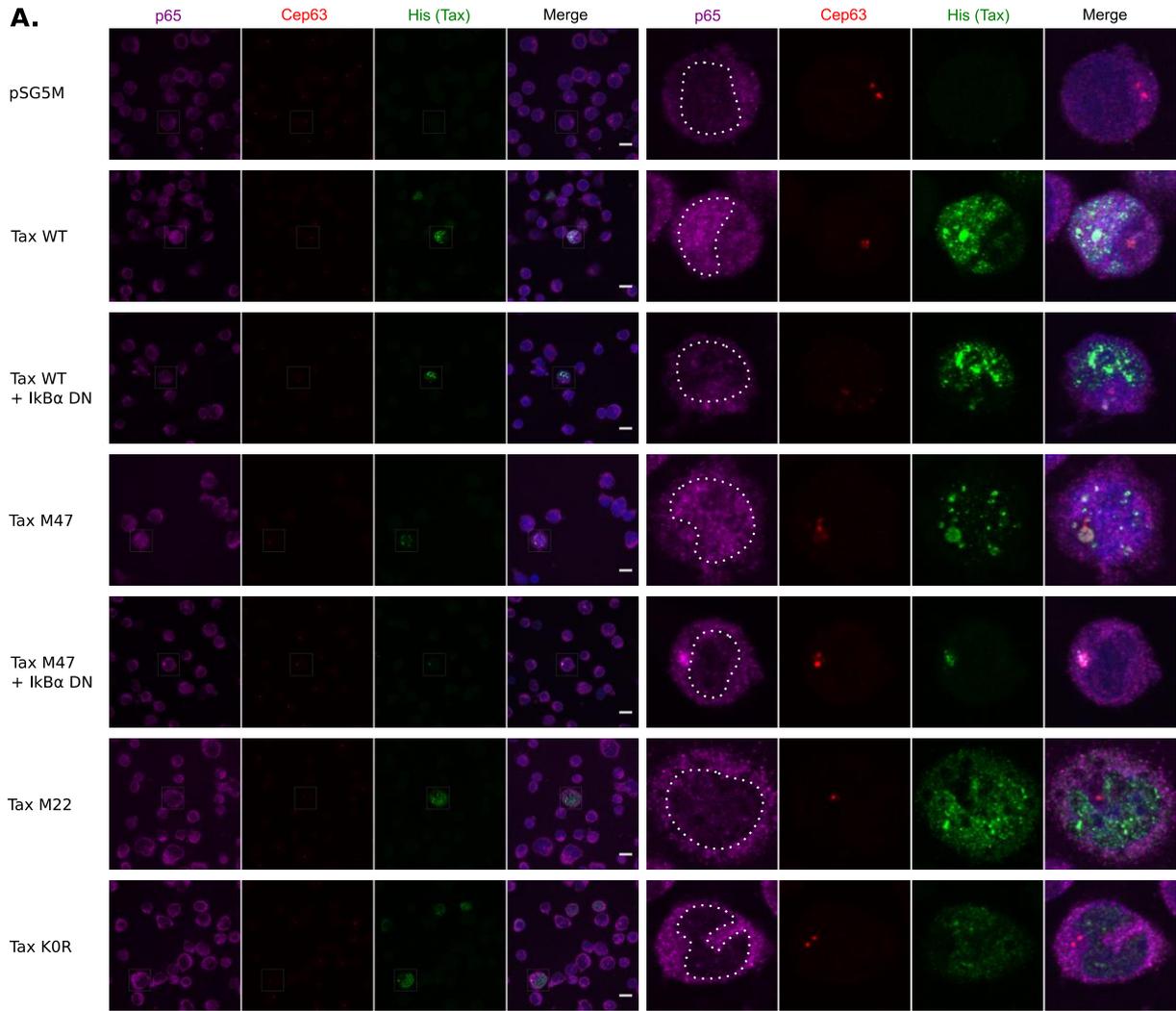


Figure 22 : La dispersion de Cep63 du centrosome induite par Tax ne dépend pas de l'activation de la voie NF-κB.

(A-E) 2 millions de cellules Jurkat sont microporées avec respectivement 10µg (Tax WT), 1µg (Tax M47) et 20µg (Tax M22, Tax KOR) de plasmide Tax1-His, et pour les conditions l'indiquant avec 5µg d'un dominant négatif de la voie NF-κB (IκBα DN, IκBα Ser32/36A) ou 8µg d'un dominant actif de la voie NF-κB (IKK2-EE), le tout complété avec du plasmide vide pSG5M. Les cellules sont laissées en culture pendant 48h avant d'être fixées et marquées pour l'immunofluorescence avec des anticorps anti-p65, anti-Cep63 et anti-His, et les noyaux sont colorés au DAPI. **(A)** Les cellules sont imagées par microscopie confocale. Les panels sur la partie droite correspondent à un agrandissement sur une cellule d'intérêt. Les pointillés blancs délimitent le noyau. Barre d'échelle : 10µm. **(B,D)** Quantification du pourcentage de cellules présentant une localisation nucléaire de p65. **(C,E)** Quantification du pourcentage de cellules présentant une dispersion de Cep63. Pour chaque expérience, 50 cellules transfectées par Tax et présentant la localisation de p65 attendue sont analysées. **(B,C)** Les données sont représentées par la moyenne ainsi que les valeurs individuelles des trois expériences, et ont été analysées à l'aide d'une ANOVA monofactorielle à mesures répétées suivie de tests post-hoc permettant la comparaison de moyennes en appliquant la correction de Tukey. **(D,E)** Les données d'une unique expérience sont représentées.

Pour cela, nous avons d'abord bloqué l'activation de la voie NF-κB dans des cellules JK transfectées avec Tax WT ou M47, en co-transfectant un dominant négatif de la voie NF-κB, IκBα DN (IκBα Ser32/36A) qui ne peut pas subir la phosphorylation nécessaire à sa dégradation et donc à la libération de p65. Si l'activation de la voie NF-κB est nécessaire pour induire la dispersion de Cep63 par Tax, alors la dispersion ne devrait pas être observée dans ces conditions. Nous avons confirmé que la co-transfection de IκBα DN permet bien de bloquer en grande partie la translocation nucléaire de p65, qui est réduite d'environ 90 % à environ 20 %, et donc l'activation de la voie NF-κB (Figure 22 A et B). Nous avons alors analysé la distribution de Cep63 dans les cellules transfectées par Tax mais où la voie NF-κB est bloquée. Nous avons observé que pour Tax WT, l'inhibition de la voie NF-κB ne semble pas induire de modification du taux de cellule présentant une dispersion de Cep63, à environ 20 % (Figure 22 C). Dans le cas du mutant M47, nous avons observé une légère diminution du taux de cellules présentant une dispersion de Cep63, qui passe de 55 % à 25 %, néanmoins celle-ci ne semble pas significative (Figure 22 C). Dans tous les cas, on observe que l'activation de la voie NF-κB n'est pas nécessaire à l'induction d'une dispersion de Cep63 par Tax, suggérant que l'absence de dispersion de Cep63 induite par les mutants M22 et KOR n'est pas due à leur défaut d'activation de la voie NF-κB.

Pour confirmer cela, nous avons également activé de façon ectopique la voie NF-κB dans des cellules transfectées avec un plasmide vide ou les mutants de Tax M22 et KOR en co-transfectant un dominant actif de la voie NF-κB, IKK2-EE, une forme constitutivement active de la kinase permettant la phosphorylation et la dégradation subséquente des IκB et la libération de p65. Si l'activation de la voie NF-κB permet la dispersion de Cep63, alors la dispersion devrait être observée dans ces conditions. Un seul réplicat de cette expérience a pour le moment été réalisé. Nous avons confirmé que la co-transfection d'IKK2-EE induit bien la translocation nucléaire de p65 dans environ 80 % et 60 %

des cellules transfectées par les mutants M22 et KOR de Tax, et donc permet bien d'activer la voie NF- κ B (Figure 22 D). En revanche, même dans les cellules où la voie NF- κ B est activée, les mutants de Tax M22 et KOR n'induisent pas de dispersion de Cep63 (Figure 22 E), ce qui indique que l'activation de la voie NF- κ B n'est pas suffisante pour induire la dispersion du centrosome de Cep63.

Ces résultats nous permettent d'exclure la possibilité que la différence de dispersion de Cep63 induite par les mutants de Tax étudiés soit dépendante de leur capacité à induire la voie NF- κ B. Il semble donc probable que la dispersion de Cep63 induite par Tax soit une conséquence directe de leur interaction. Néanmoins, nous ne pouvons pas non plus exclure la possibilité que les différences observées proviennent d'autres facteurs, en particulier de la localisation subcellulaire qui varient entre les mutants étudiés.

Nous avons donc pu montrer que suite à son interaction avec Cep63 au centrosome, Tax induit des perturbations de la localisation de celle-ci, avec une dispersion vers la région péri-centrosomale. Comme Cep63 joue un rôle important dans l'architecture du centrosome, la dispersion de Cep63 pourrait également induire une déstructuration du centrosome, ce que nous allons étudier dans la partie suivante.

II – La dispersion de Cep63 du centrosome induite par Tax est associée à d'autres altérations centrosomales

Afin de comprendre si la dispersion de Cep63 pouvait induire une déstructuration du centrosome, nous avons étudié la distribution d'autres protéines centrosomales. Nous avons choisi de nous focaliser sur la centrine, une protéine localisée normalement au niveau de l'extrémité distale des centrioles, et sur la péricentrine (PCNT), une protéine du matériel péricentriolaire. PCNT est également impliquée dans la nucléation des microtubules. La perturbation de ces marqueurs indiquerait donc des altérations structurelles plus globales du centrosome, associées à de probables altérations fonctionnelles, susceptible de perturber l'organisation du fuseau mitotique et la répartition des chromosomes en mitose.

A. La dispersion de Cep63 est associée à des altérations de Centrine

Nous nous sommes d'abord intéressés à la distribution de la protéine Centrine, qui dans des cellules normales forme 2 à 4 spots (selon la phase du cycle cellulaire) au niveau de l'extrémité distale des centrioles, à proximité de Cep63.

Dans des cellules transfectées avec Tax WT ou le mutant M47, nous avons observé des altérations de la localisation et du nombre des spots de Centrine, avec notamment une dispersion au niveau de la région péri-centrosomale où localise Tax, au niveau de zones où Cep63 est également dispersée, et une perte fréquente de l'aspect net et ponctiforme du signal (Figure 23 A).

Nous avons alors comparé la distribution de la Centrine dans les cellules transfectées par Tax qui ne présentent pas de dispersion de Cep63 et dans les cellules transfectées par Tax présentant une dispersion de Cep63. Bien que des altérations de la distribution de Centrine soient présentes dans toutes ces conditions, celles-ci étaient nettement plus fréquentes dans les cellules présentant une dispersion de Cep63, dans environ 80 % de ces cellules, par rapport aux cellules sans dispersion de Cep63, dans environ 30 % de ces cellules (Figure 23 B).

Les altérations de Centrine sont donc corrélées à la dispersion de Cep63.

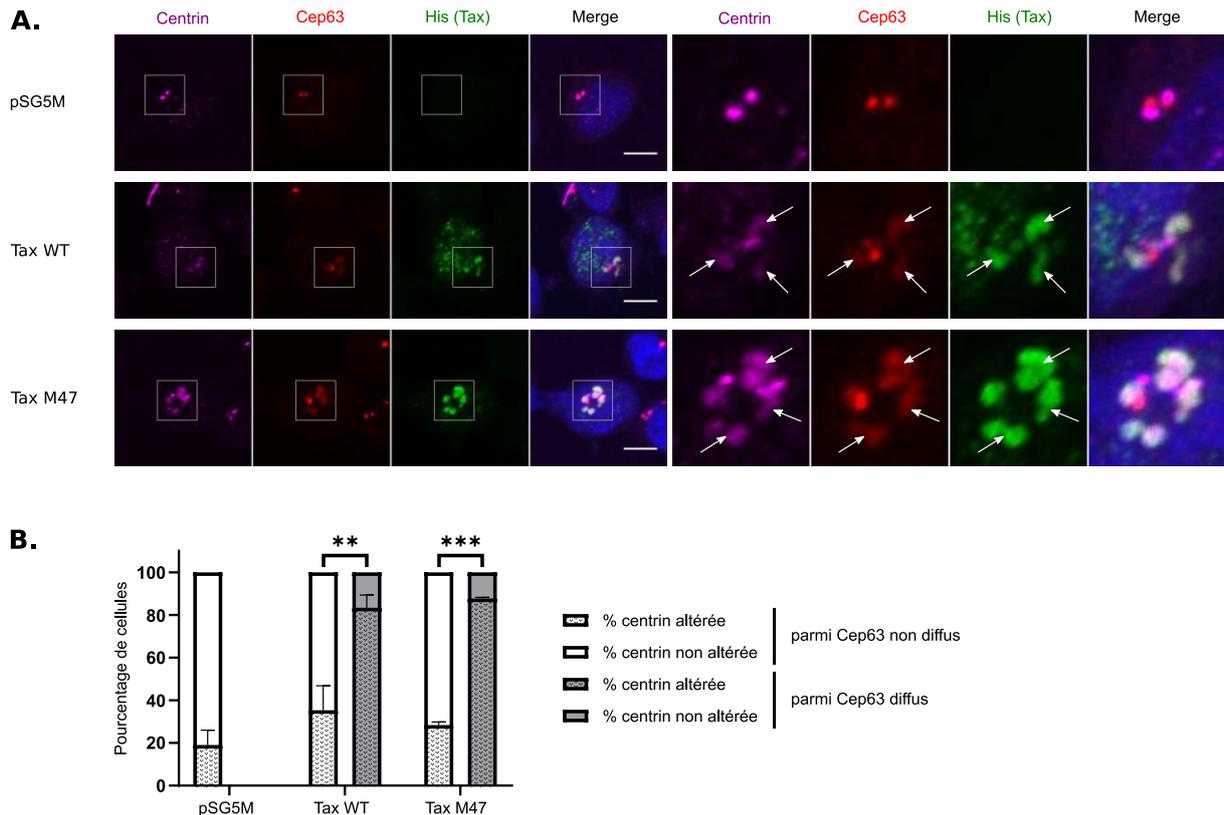


Figure 23 : La dispersion de Cep63 est associée à des altérations de Centrine.

(A,B) 2 millions de cellules Jurkat sont microporées avec respectivement 10 μ g (Tax WT) et 1 μ g (Tax M47) de plasmide Tax1-His, complété avec du plasmide vide pSG5M, et laissées en culture pendant 48h avant d’être fixées et marquées pour l’immunofluorescence avec des anticorps anti-Centrin, anti-Cep63 et anti-His, et les noyaux sont colorés au DAPI. **(A)** Les cellules sont imagées par microscopie confocale. Les panels sur la partie droite correspondent à un agrandissement de la région centrosomale de la cellule montrée sur le panel de gauche. Les flèches pointent vers les zones de dispersion de Centrine et Cep63 colocalisées avec Tax. Barre d’échelle : 5 μ m. **(B)** Quantification du pourcentage de cellules présentant des altérations de centrine parmi les cellules présentant ou pas une dispersion de Cep63. Pour chaque expérience, 50 cellules transfectées sont analysées. Les données sont représentées par la moyenne de trois expérience \pm erreur standard, et ont été analysées à l’aide d’un t-test multiple avec comparaisons de moyennes corrigée à l’aide de la méthode de Holm-Sidak.

B. La dispersion de Cep63 est associée à des altérations de PCNT

Nous nous sommes également intéressés à la distribution de la protéine Péricentrine (PCNT), qui est un marqueur du matériel péricentriolaire qui joue un rôle important dans la nucléation du cytosquelette de microtubules. Dans les cellules normales, PCNT forme 1 ou 2 spots situés autour des centrioles.

Dans les cellules transfectées avec Tax WT ou le mutant M47, nous avons également observé des altérations de la localisation et du nombre de spots de PCNT, avec comme pour Centrine une dispersion du signal de PCNT le long du signal de Cep63 diffus, fréquemment accompagnée d’une perte du signal centrosomal de PCNT (Figure 24 A).

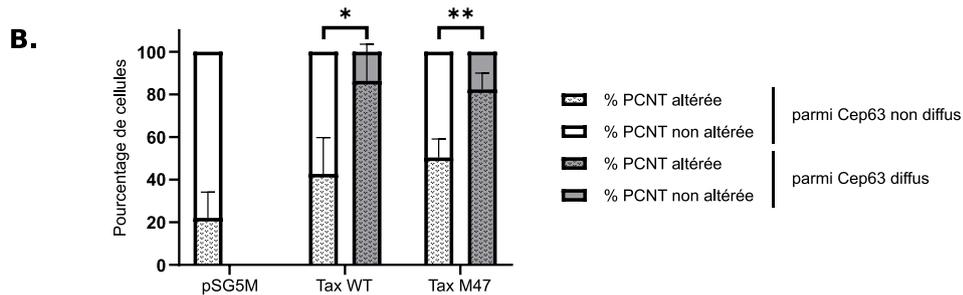
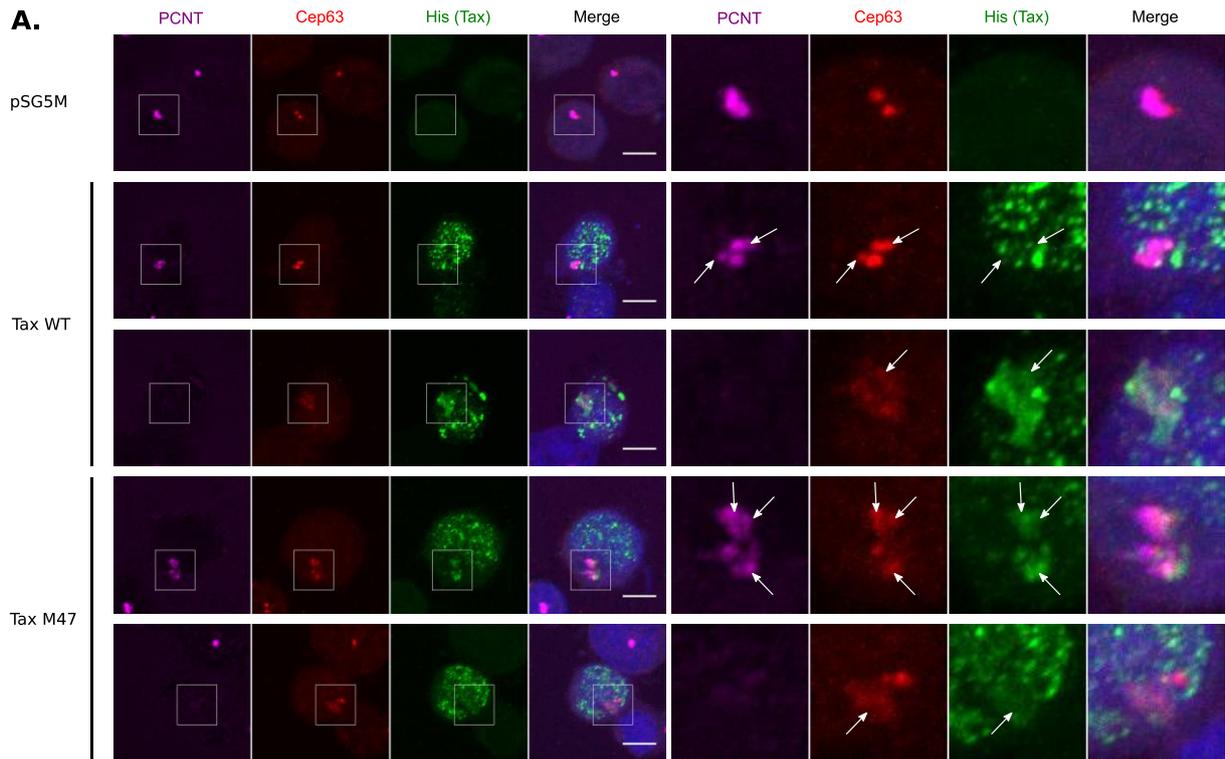


Figure 24 : La dispersion de Cep63 est associée à des altérations de PCNT.

(A,B) 2 millions de cellules Jurkat sont microporées avec respectivement 10 μ g (Tax WT) et 1 μ g (Tax M47) de plasmide Tax1-His, complété avec du plasmide vide pSG5M, et laissées en culture pendant 48h avant d'être fixées et marquées pour l'immunofluorescence avec des anticorps anti-PCNT, anti-Cep63 et anti-His, et les noyaux sont colorés au DAPI. (A) Les cellules sont imagées par microscopie confocale. Une image montrant la dispersion de PCNT et une image montrant une perte du signal centrosomal de PCNT sont montrées pour les conditions transfectées avec Tax WT et M47. Les panels sur la partie droite correspondent à un agrandissement de la région centrosomale de la cellule montrée sur le panel de gauche. Les flèches pointent vers les zones de dispersion de PCNT et Cep63 colocalisées avec Tax. Barre d'échelle : 5 μ m. (B) Quantification du pourcentage de cellules présentant des altérations de PCNT parmi les cellules présentant ou pas une dispersion de Cep63. Pour chaque expérience, 50 cellules transfectées sont analysées. Les données sont représentées par la moyenne de trois expériences \pm erreur standard, et ont été analysées à l'aide d'un t-test multiple avec comparaisons de moyennes corrigée à l'aide de la méthode de Holm-Sidak.

Nous avons comme pour la Centrine comparé la distribution de PCNT dans les cellules transfectées par Tax qui ne présentent pas de dispersion de Cep63 et dans les cellules transfectées par Tax présentant une dispersion de Cep63. A nouveau, nous avons observé des altérations de la distribution

de PCNT dans toutes ces conditions, mais celles-ci étaient nettement plus fréquentes dans les cellules présentant une dispersion de Cep63, dans environ 80 % de ces cellules, par rapport aux cellules sans dispersion de Cep63, dans 20 à 50 % de ces cellules (Figure 24 B).

Comme pour les altérations de Centrine, les altérations de PCNT sont donc corrélées à la dispersion de Cep63.

Les altérations observées de Centrine et de PCNT renforcent l'idée que Tax induit des perturbations de la structure globale du centrosome. En effet, on observe à la fois la dispersion d'une protéine associée à l'extrémité distale des centrioles, et d'une protéine associée au matériel péricentriolaire qui entoure les centrioles et contribue à la nucléation des microtubules. La corrélation de ces altérations avec la dispersion de Cep63 par Tax suggère que celle-ci pourrait être à l'origine des altérations de Centrine et de PCNT, et donc plus généralement d'une déstructuration du centrosome, bien que le lien de causalité ne soit pas prouvé ici.

C. Caractérisation des altérations centrosomales induites par Tax par microscopie super-résolutive

Afin de confirmer que les altérations centrosomales induites par Tax affectent bien la structure du centrosome, nous avons voulu observer plus finement la distribution de Cep63, de la Centrine et de PCNT en présence de Tax. Pour cela, nous avons utilisé la microscopie super-résolutive à illumination structurée, et plus précisément le nouveau module Lattice SIM2, qui permet des observations jusqu'à une résolution latérale de 60 à 100 nm et axiale de 200nm (Löschberger *et al.*, 2021).

Conformément à la structure centrosomale décrite dans la littérature (Sir *et al.*, 2011), dans les cellules n'exprimant pas Tax, Cep63 forme une structure en anneau, avec Centrine à proximité de l'extrémité distale des centrioles (Figure 25 A), et PCNT entourant les centrioles (Figure 25 B). En revanche, dans les cellules exprimant Tax WT ou M47, on observe que, de façon cohérente avec les observations de microscopie confocale, on perturbe cette structure, avec une localisation de Cep63 qui semble moins nette et moins structurée, et une dispersion dans la région péri-centrosomale au niveau du signal de Tax (Figure 25 A et B), accompagnée d'une dispersion également de Centrine (Figure 25 A) et PCNT (Figure 25 B).

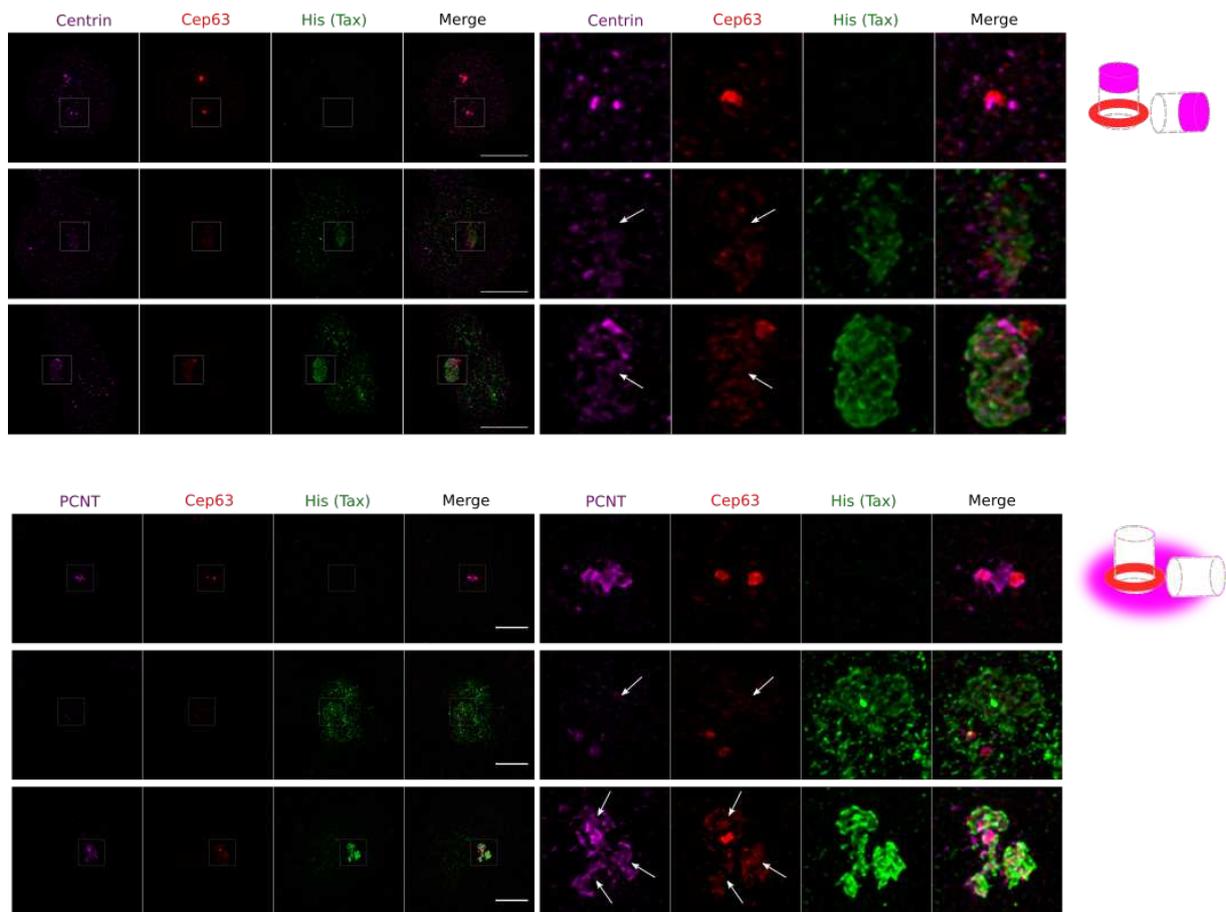


Figure 25 : Caractérisation des altérations centrosomales induites par Tax par microscopie super-résolutive SIM.

(A,B) 2 millions de cellules Jurkat sont microporées avec respectivement 10 μ g (Tax WT) et 1 μ g (Tax M47) de plasmide Tax1-His, complété avec du plasmide vide pSG5M, et laissées en culture pendant 48h avant d'être fixées et marquées pour l'immunofluorescence avec des anticorps anti-Centrine (A), anti-PCNT (B), anti-Cep63 et anti-His. Les lamelles sont imagées sur un microscope à super-résolutive SIM. Images représentatives avec un agrandissement sur la région du centrosome. Barre d'échelle : 5 μ m.

Ces observations en microscopie super-résolutive confirment que la dispersion de Cep63 induite par Tax correspond bien à une altération de la structure de Cep63. De même, les altérations de Centrine et Péricentrine semblent bien correspondre à des altérations structurales. Les protéines Cep63, Centrine et PCNT semblent dispersées dans la région péri-centrosomale où localise également Tax. Centrine et PCNT étant des marqueurs respectivement des extrémités distales des centrioles et du matériel péricentriolaire, cela suggère une déstructuration globale du centrosome. La corrélation de la dispersion de Cep63 avec les altérations de Centrine et de PCNT permet de proposer que la dispersion de Cep63 pourrait avoir un rôle causal dans la déstructuration du centrosome. Cette déstructuration pourrait être associée à des altérations fonctionnelles, notamment pour la nucléation des microtubules associée à PCNT. Par conséquent, le fonctionnement du fuseau mitotique en mitose pourrait être altéré, conduisant à des erreurs de ségrégation des chromosomes en mitose.

III – Tax induit des altérations surnuméraires de Cep63 indépendamment de son interaction avec Cep63, partiellement associées avec des altérations de Centrine et PCNT

A. Tax induit des spots surnuméraires de Cep63 indépendamment de son interaction avec Cep63

Lors de nos expériences, nous avons observé que les altérations de Cep63 induites par Tax ne se limitaient pas à la dispersion de Cep63 que nous avons présentée précédemment. En effet, nous avons également observé que Cep63 pouvait aussi être localisée en plus de deux spots nets, éventuellement associés à une dispersion de Cep63 autour de ces spots.

Nous avons observé ces spots surnuméraires de Cep63 dans les cellules transfectées avec Tax WT (Figure 26 A). Des spots surnuméraires de Cep63 ont également été observés dans les cellules transfectées avec les différents mutants de Tax (Figure 26 B). Tax et tous ses mutants que nous avons étudiés (M47, M22 et KOR) induisent des altérations surnuméraires de Cep63 dans 20 à 50 % des cellules, ce qui est plus important que dans le contrôle sans Tax dans lequel environ 10 % des cellules présentent ces altérations (Figure 26 B). A noter tout de même que cette différence n'est pas significative dans le cas du mutant M47 (Figure 26 B).

Contrairement à la dispersion de Cep63 qui était spécifiquement induite par Tax WT et le mutant M47, les altérations surnuméraires de Cep63 observées sont induites également par les mutants M22 et KOR. Ces mutants n'interagissent pas avec Cep63. L'induction d'altérations surnuméraires de Cep63 par Tax ne nécessite donc pas leur interaction, et résulte donc probablement d'un mécanisme indirect. Si ces observations dépassent le cadre de notre problématique, s'intéressant en premier lieu aux conséquences de l'interaction de Tax et Cep63, elles suggèrent toutefois l'existence d'un mécanisme supplémentaire d'altération du centrosome par Tax indépendant de cette interaction. Les conséquences de ces deux mécanismes dépendant et indépendant de l'interaction avec Cep63 sont complexes à dissocier. Pour mieux les comprendre, nous avons cherché à savoir si les spots surnuméraires de Cep63 étaient aussi associés à des altérations de Centrine et PCNT, ou si ces altérations étaient spécifiquement corrélées à la dispersion de Cep63.

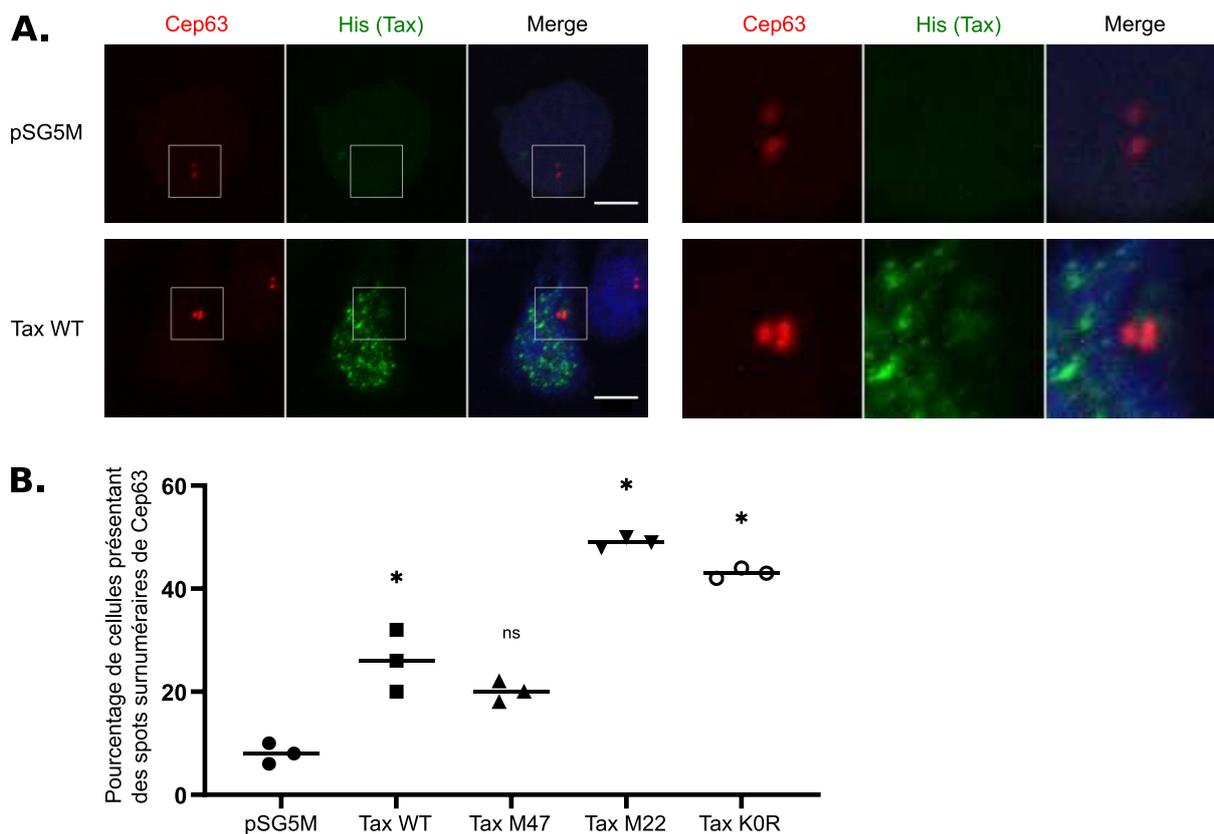


Figure 26 : Tax et ses mutants M47, M22 et K0R induisent des altérations surnuméraires de Cep63.

(A,B) 2 millions de cellules Jurkat sont microporées avec respectivement 10 μ g (Tax WT), 1 μ g (Tax M47), 25 μ g (Tax M22) et 20 μ g (Tax K0R) de plasmide Tax1-His, complété avec du plasmide vide pSG5M, et laissées en culture pendant 48h avant d'être fixées et marquées pour l'immunofluorescence avec des anticorps anti-Cep63 et anti-His, et les noyaux sont colorés au DAPI. **(A)** Les cellules sont imagées par microscopie confocale. Les panels sur la partie droite correspondent à un agrandissement de la région centrosomale de la cellule montrée sur le panel de gauche. Barre d'échelle : 5 μ m. **(B)** Quantification du pourcentage de cellules présentant des spots surnuméraires (> 2 spots) de Cep63. Pour chaque expérience, 50 cellules transfectées sont analysées. Les données sont représentées par la moyenne ainsi que les valeurs individuelles des trois expériences, et ont été analysées à l'aide d'une ANOVA monofactorielle à mesures répétées suivie de tests post-hoc permettant la comparaison de moyennes avec une correction appliquant la correction de Tukey.

B. Les altérations surnuméraires de Cep63 sont partiellement associées à des altérations de Centrine et PCNT

Afin de mieux caractériser les altérations centrosomales induites par Tax de façon indépendante de son interaction avec Cep63, nous avons donc comparé la distribution de Centrine et PCNT dans des cellules transfectées par Tax présentant des spots surnuméraires de Cep63 et dans des cellules transfectées par Tax ne présentant pas de spots surnuméraires de Cep63.

Nous avons observé des altérations de la localisation et du nombre des spots de Centrine (Figure 27 A) et de PCNT (Figure 27 B) dans toutes les conditions. Néanmoins, pour les deux protéines celles-ci étaient légèrement plus fréquentes dans les cellules transfectées par Tax présentant des spots

surnuméraires de Cep63, dans 50 à 80 % de ces cellules, par rapport aux cellules transfectées par Tax ne présentant pas de spots surnuméraires de Cep63, dans 30 à 50 % de ces cellules (Figure 27 A et B). La différence observée n'est significative que pour les altérations de Centrine induite par le mutant KOR de Tax (Figure 27 A). A noter également, les observations des altérations de PCNT n'ont pas été réalisées pour les mutants M22 et KOR.

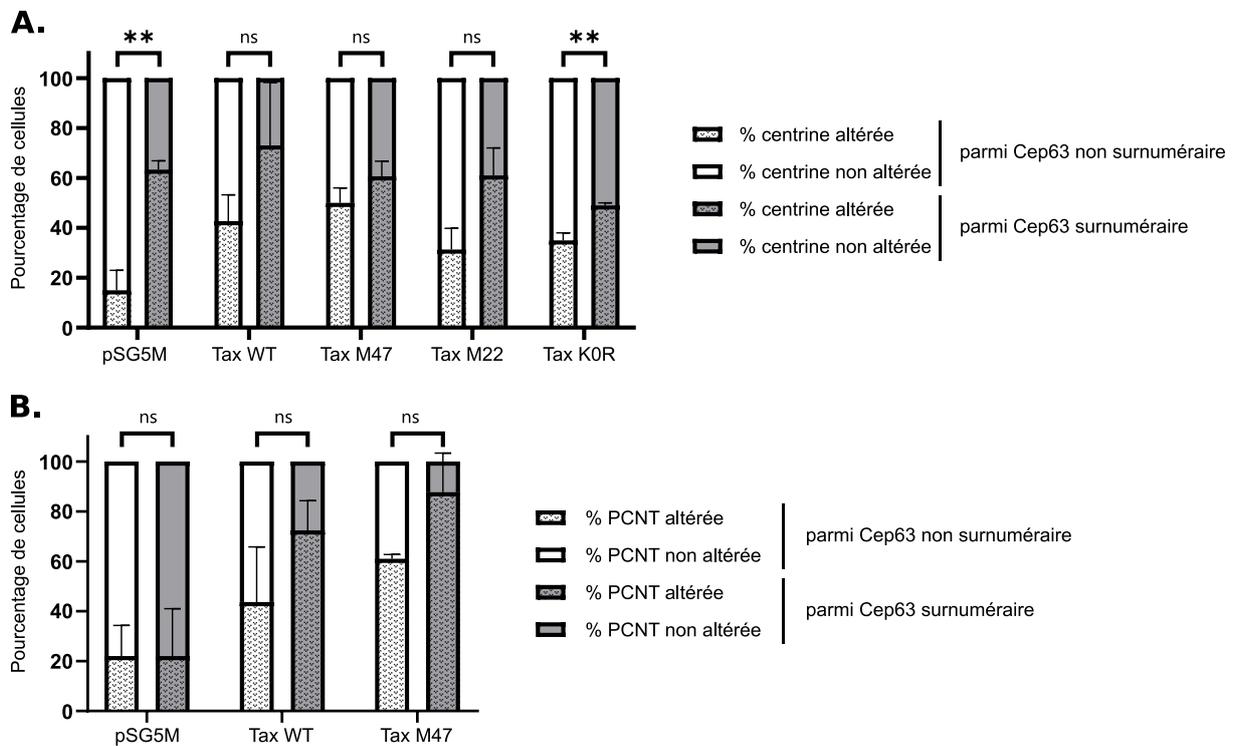


Figure 27 : Les altérations surnuméraires de Cep63 induites par Tax sont partiellement associées à des altérations de Centrine et PCNT.

(A,B) 2 millions de cellules Jurkat sont microporées avec respectivement 10µg (Tax WT), 1µg (Tax M47), 25µg (Tax M22) et 20µg (Tax KOR) de plasmide Tax1-His, complété avec du plasmide vide pSG5M, et laissées en culture pendant 48h avant d'être fixées et marquées pour l'immunofluorescence avec des anticorps anti-Centrin (A), anti-PCNT (B), anti-Cep63 et anti-His. Quantification du pourcentage de cellules présentant des altérations de Centrine (A) ou PCNT (B) parmi les cellules présentant ou pas des altérations surnuméraires de Cep63. Pour chaque expérience, 50 cellules transfectées sont analysées. Les données sont représentées par la moyenne de trois expériences ± erreur standard, et ont été analysées à l'aide d'un t-test multiple avec comparaisons de moyennes corrigée à l'aide de la méthode de Holm-Sidak.

Ces résultats montrent que par un mécanisme indépendant de son interaction avec Cep63, Tax participe à l'induction d'altérations non seulement de Cep63, mais également de Centrine et de PCNT. Ces altérations sont partiellement corrélées entre elles, mais de façon moins claire que les altérations associées à la dispersion de Cep63. Cela suggère que ces altérations ne correspondent probablement pas, ou pas systématiquement, à des centrosomes complets fonctionnels. Néanmoins, il est possible qu'elles puissent tout de même induire des perturbations du fuseau mitotique, notamment pour les spots surnuméraires de PCNT en participant à la nucléation de microtubules.

De façon générale, nos observations suggèrent que les mécanismes par lesquels Tax altère le centrosome sont multiples et complexes.

IV – Caractérisation des altérations centrosomales induites par Tax en mitose

Nous avons jusqu'ici montré que Tax induisait des altérations centrosomales, et proposé que ces altérations impliquaient en partie son interaction avec Cep63 et la dispersion de Cep63 du centrosome, conduisant à une déstructuration du centrosome dans son ensemble. Néanmoins, nos observations ont jusqu'ici été réalisées dans des cellules en interphase, et nous avons pu seulement postuler les conséquences de ces altérations sur la fonctionnalité du centrosome en mitose. La question des conséquences mitotiques des altérations centrosomales est particulièrement importante car la mitose est la phase du cycle cellulaire où a lieu la ségrégation des chromosomes entre les deux cellules filles, orchestrée par le centrosome. Les centrosomes organisent un fuseau mitotique symétrique en nucléant chacun de ses deux pôles. Des aberrations centrosomales peuvent conduire en mitose à la formation d'un fuseau multipolaire ou pseudo-bipolaire. Ce dernier favorise les anomalies de répartition des chromosomes entre les deux cellules filles et l'instabilité génomique.

Il nous semblait donc particulièrement intéressant d'observer si les altérations centrosomales que nous avons observées en interphase, en particulier la dispersion de Cep63 que nous avons identifiée, étaient corrélées avec des anomalies du fuseau mitotique. La fréquence des cellules mitotiques étant relativement faible parmi les cellules Jurkat, nous avons cherché à mettre au point un système expérimental permettant de les observer plus facilement. Pour cela, nous avons tenté de développer la technique de cytométrie d'image, qui permet l'imagerie à haut débit d'un grand nombre de cellule, associée à une synchronisation cellulaire en mitose.

Les résultats présentés dans cette partie sont préliminaires.

A. Mise au point de la synchronisation cellulaire en mitose

Nous cherchons donc à caractériser les anomalies centrosomales induites par Tax en mitose et leur association avec des anomalies du fuseau mitotique. Cependant, la fréquence des cellules en mitose est faible parmi les cellules Jurkat. Ces cellules représentent moins de 2 % des cellules totales (Figure 28 A). Comme nous cherchons à caractériser les conséquences de l'expression de Tax, nous souhaitons également imager uniquement les cellules exprimant Tax, qui représentent elles aussi une sous-population limitée. Notre sous-population d'intérêt, les cellules exprimant Tax et en mitose, est donc assez rare. Nous avons donc cherché à l'enrichir. Pour cela, nous avons d'abord mis au point la synchronisation cellulaire en mitose de ces cellules JK.

Nous avons comparé l'efficacité de différentes drogues. Le Monastrol est un inhibiteur de la kinésine mitotique Eg5, qui bloque de façon réversible la séparation des centrosomes à la transition G2/M ce qui conduit à un blocage du cycle cellulaire en début de mitose avec un fuseau monoastrol (Kapoor *et al.*, 2000; Leizerman *et al.*, 2004). Le RO-3306 est un inhibiteur des CDKs et en particulier de CDK1, qui bloque de façon réversible la progression du cycle cellulaire en phase G2/M (Vassilev *et al.*, 2006). Pour ces deux drogues, une synchronisation en mitose peut être atteinte par un blocage à la transition G2/M suivi d'un relâchement sans la drogue qui permet aux cellules d'entrer en mitose. Nous avons utilisé comme contrôle le Nocodazole qui induit la dépolymérisation des microtubules et induit un blocage du cycle cellulaire directement en mitose, mais que nous ne souhaitons pas utiliser pour la suite de nos expériences fonctionnelles pour éviter de perturber directement le centrosome.

Nous avons analysé la proportion de cellules JK dans chaque phase du cycle cellulaire par cytométrie de flux, à l'aide d'un double marquage Hoechst, qui permet de marquer la quantité d'ADN dans les cellules (2N en phase G1 et 4N en phase G2 et en mitose) et de la phospho-histone-H3 qui est phosphorylée spécifiquement en mitose, et permet donc de séparer les cellules en phase G2 des cellules en mitose.

Avec l'utilisation du Monastrol comme du RO-3306, nous avons pu optimiser le temps de relâchement nécessaire pour atteindre une assez bonne efficacité de synchronisation, avec jusqu'à respectivement 24 % et 20 % de cellules en mitose (Figure 28 A). Nous avons également confirmé cela par microscopie à fluorescence, et observé des cellules en mitose avec les deux drogues (Figure 28 B).

Nous avons également comparé les deux drogues vis-à-vis de leurs conséquences sur le centrosome. En effet, bien qu'aucune de ces deux drogues ne cible directement le centrosome lui-même, elles ont toutes les deux été décrites comme pouvant induire par elles-mêmes des altérations centrosomales en lien avec le délai en début de mitose (Steere *et al.*, 2011; Karki, Keyhaninejad and Shuster, 2017). Nous avons utilisé ici PCNT comme marqueur d'altérations centrosomales.

Nous avons observé que les traitements avec les deux drogues induisent des altérations centrosomales dans les cellules JK : certaines cellules présentent plus de deux spots de PCNT en mitose (Figure 28 B). Ces spots surnuméraires peuvent être rassemblés en deux groupes et conduire à une mitose pseudo-bipolaire, ou former des pôles distincts du fuseau mitotique (on parle alors de mitose multipolaire). Ces altérations de PCNT en mitose ont été observées dans des cellules transfectées ou non avec Tax (Figure 28 C).

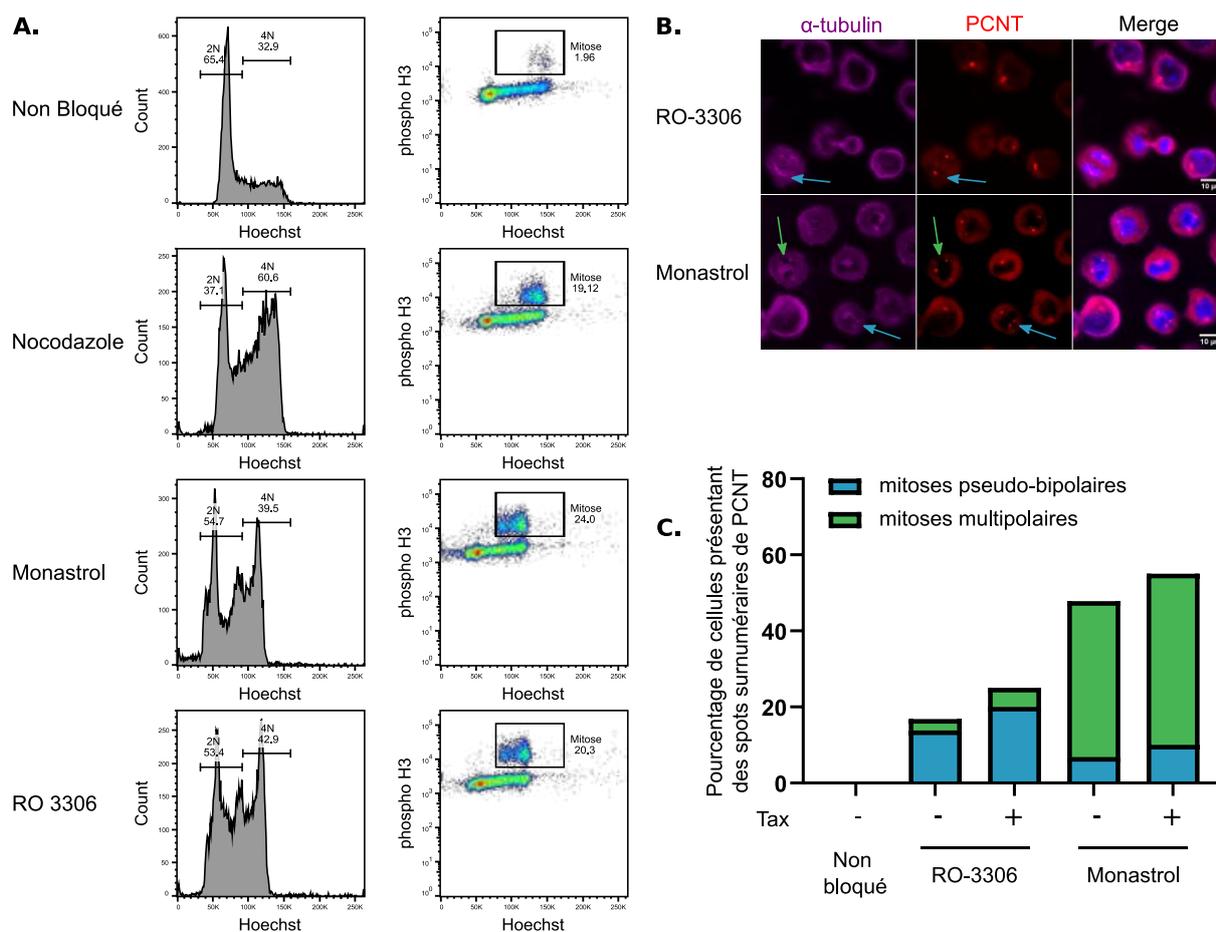


Figure 28 : Mise au point de la synchronisation cellulaire avec du RO-3306 ou du Monastrol.

(A-C) Des cellules Jurkat sont cultivées pendant 20h en présence de Nocodazole (200ng/mL), RO-3306 (10 μ M) ou de Monastrol (100 μ M). Pour les conditions synchronisées avec du RO-3306 ou du Monastrol, les cellules sont ensuite lavées et remises en culture pendant respectivement 1h30 ou 1h avant d'être fixées en méthanol pour la cytométrie de flux et marquées avec un marquage Hoechst et des anticorps anti-phospho-histone H3 (A) ; ou pour l'immunofluorescence et marquées avec des anticorps anti- α -Tubulin et anti-PCNT (B,C). (A) Analyse par cytométrie de flux du marquage phospho H3 / Hoechst sur 10 000 cellules permettant de discriminer les cellules selon leur quantité d'ADN (indiquée 2N et 4N sur les histogrammes Hoechst) et le niveau de phosphorylation de l'histone H3 permettant de repérer les cellules mitotiques, dont la proportion dans la population totale est indiquée sur les graphes. (B) Les cellules sont imagées par microscopie à épifluorescence. Les flèches bleues pointent vers des cellules en mitose pseudo-bipolaire, les flèches vertes pointent vers des cellules en mitose multipolaire. (C) Préalablement à la synchronisation, 2 millions Jurkat sont microporées et remises en culture pendant 30h avec 10 μ g de plasmide Tax1-His ou de plasmide vide pSG5M. Quantification du pourcentage de cellules mitotiques présentant des spots surnuméraires (>2 spots) de PCNT, rassemblés en groupe et formant une mitose pseudo-bipolaire, ou séparés et formant une mitose multipolaire. Pour chaque condition, au moins 20 cellules transfectées et en mitose sont analysées.

Nous avons de plus observé que le traitement avec le Monastrol induit de nombreuses altérations, avec plus de 50 % des cellules présentant des spots surnuméraires de PCNT en mitose, la plupart du temps formant un fuseau multipolaire. Avec un traitement au RO-3306, la proportion de cellules présentant des altérations de PCNT en mitose suite au traitement au RO-3306 était plus faible, avec

20 à 30 % d'altérations de PCNT en l'absence et en présence de Tax respectivement, et des fuseaux mitotiques formés essentiellement pseudo-bipolaires. A noter toutefois que ces observations sont basées sur seulement un réplicat de l'expérience, avec un minimum de 20 cellules comptées par condition (en raison de la difficulté à observer des cellules transfectées par Tax en mitose, malgré la synchronisation), ce qui n'est pas suffisant pour tirer des conclusions assurées.

Nous avons pour la suite choisi de poursuivre nos analyses avec une synchronisation cellulaire utilisant du RO-3306, qui semble induire un taux basal d'altérations centrosomales important mais qui semble permettre l'observation d'altérations supplémentaires qui seraient induites par Tax.

Malgré la synchronisation cellulaire, le taux de transfection relativement faible de Tax par microporation des cellules Jurkat (qu'on peut estimer à environ 5 à 10 % en moyenne) conduit à une proportion de cellules d'intérêt, les cellules exprimant Tax en mitose, qui reste faible, atteignant environ 1 à 2 %. Nous avons donc souhaité changer de système expérimental d'expression de Tax, tout en restant en lignée de cellules T.

B. Clonage de lignées de cellules Jurkat inductibles pour l'expression de Tax

Nous souhaité poursuivre notre étude dans des lignées de cellules T avec un système d'expression de Tax permettant une meilleure efficacité que la microporation, et permettant d'obtenir facilement un grand nombre de cellules exprimant Tax. L'expression durable de Tax dans les cellules induisant leur sénescence en lien avec la suractivation de la voie NF- κ B (Zhi *et al.*, 2011), l'utilisation de cellules exprimant Tax de façon stable n'est pas possible. Nous avons donc utilisé un système de cellules JK inductibles pour l'expression de Tax (JK iTax) lors de l'ajout de doxycycline au milieu de culture (Vandermeulen *et al.*, 2021).

Nous avons d'abord cherché à analyser la distribution de ces cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Cependant, ce faisant, nous avons constaté que ces cellules sont hétérogènes par leur ploïdie : un marquage Hoechst en cytométrie de flux montre la présence de cellules à une ploïdie 2N, 4N et 8N (Figure 29, panels de gauche). Nous avons donc décidé de les cloner. Nous avons réalisé un premier clonage par dilution limite, qui nous a permis d'obtenir un premier clone appelé D8. Contrairement à ce que nous souhaitions obtenir pour nous rapprocher de conditions d'infection, ce clone D8 présente des cellules à une ploïdie de 4N et 8N et est donc tétraploïde et pas diploïde (Figure 29 A). Afin d'obtenir un clone diploïde, nous avons alors réalisé un deuxième clonage par triage cellulaire qui nous a permis d'obtenir cette fois un clone appelé D7, pour lequel on observe bien des cellules à une ploïdie 2N et 4N (Figure 29 B). Lors des expériences de cytométrie d'image qui suivront,

le clone D8 tétraploïde a été utilisé dans les deux premières expériences et le clone D7 diploïde a été utilisé dans les deux dernières. Cette différence de ploïdie est susceptible d'expliquer en partie la variabilité de ces expériences, comme nous le discuterons dans cette partie-là.

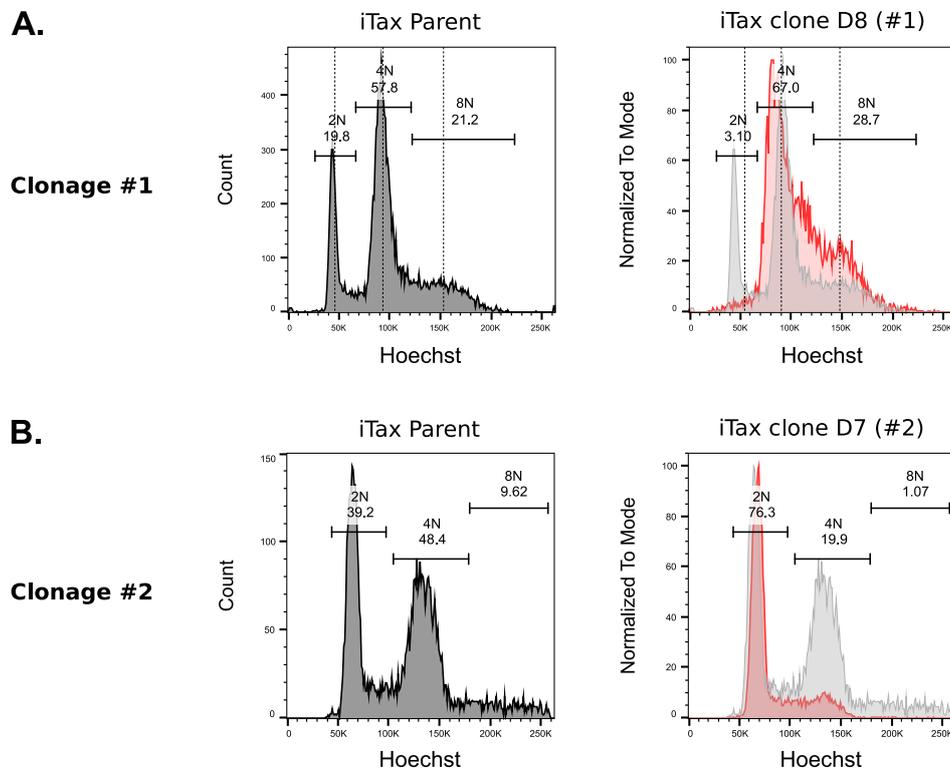


Figure 29 : Clonage de lignées iCT et iTax depuis les cellules parentales hétérogènes.

(A,B) La ploïdie des cellules est évaluée par cytométrie de flux avec un marquage Hoechst permettant de marquer de façon quantitative l'ADN des cellules. Le clone obtenu est représenté en rouge sur le panel de droite, et comparé avec les cellules parentales en gris. (A) Les cellules JK iTax sont clonées par dilution limite. Le clone D8 obtenu semble tétraploïde. (B) Les cellules JK iTax sont clonées par tri cellulaire. Le clone D7 obtenu semble diploïde.

L'expression de Tax dans ces cellules varie entre 15 à 20 % pour le clone D7 diploïde et jusqu'à 50 % pour le clone D8 tétraploïde (données non montrées). Elle est donc plus efficace que par la microporation de cellules JK. Elle reste cependant suffisamment faible pour que l'imagerie en microscopie demeure compliquée, et qu'il soit intéressant de développer l'utilisation de techniques d'imagerie à haut débit comme la cytométrie d'image.

C. Séparation des cellules selon leur phase du cycle cellulaire en cytométrie d'image

Notre objectif est d'analyser les altérations centrosomales parmi les cellules exprimant Tax et se trouvant en mitose. Ces cellules représentent une population assez rare malgré l'enrichissement permis par la synchronisation cellulaire et l'utilisation de JK iTax.

Nous avons donc souhaité mettre au point une analyse des altérations centrosomales induites par Tax par la technique de cytométrie d'image (ImageStreamX, ou ISX). En effet, cette technique innovante, qui mêle cytométrie de flux et microscopie à fluorescence, permet d'obtenir et de traiter de façon automatisée les images d'un grand nombre de cellules, et donc de visualiser des populations rares, avec des temps d'acquisition rapides. De façon similaire à la cytométrie de flux, les cellules en suspension passent une à une devant un laser et la fluorescence réémise est collectée. En outre, cette technique permet non seulement de collecter la donnée de fluorescence totale de la cellule pour différents canaux, mais aussi de collecter l'image de fluorescence de la cellule sur une caméra, et donc d'accéder à la localisation subcellulaire de marqueurs. Lors de l'analyse automatisée des images, on peut notamment analyser des nombres de spots, ce qui est très utile pour étudier des altérations centrosomales. Cette technique n'a à notre connaissance encore jamais été utilisée pour l'étude du centrosome, réalisée la plupart du temps en cellules adhérentes et par microscopie. Néanmoins elle nous semblait intéressante à mettre en place pour étudier le centrosome dans les cellules en suspension que sont les cellules JK.

Par cette technique, nous parvenons effectivement à obtenir un nombre important de cellules en mitose : à partir d'une population de base de 100 000 cellules acquises, suite aux différentes étapes de traitement permettant d'éliminer les événements indésirables (cellules hors focus, multiplets, cellules mortes, cellules jugées anormales car ne présentant aucun spot de PCNT ou de Centrine) de l'analyse, nous pouvons analyser environ 1 500 cellules en mitose (Figure 30 A), ce qui permet une analyse statistique convaincante.

Comme en cytométrie de flux, nous avons pu séparer les cellules selon leur phase du cycle cellulaire en utilisant un co-marquage Hoechst – phospho-histone-H3 (Figure 30 B). Sur les images correspondant aux cellules catégorisées en interphase par ce « gating », on observe un marquage phospho-histone-H3 faible, jusqu'à deux spots de PCNT et jusqu'à 4 spots de Centrine. Dans les cellules en mitose, on observe un marquage phospho-histone-H3 fort, et deux pôles du fuseau mitotique (dans des cellules non altérées) où colocalisent PCNT et Centrine, répartis de part et d'autre d'un marquage Hoechst condensé (Figure 30 C).

Cette technique permet donc bien d'analyser des sous-populations de cellules mitotiques, et de faire une analyse de marqueurs centrosomaux dans les différentes phases du cycle cellulaire. A noter cependant dès maintenant que la résolution ou la qualité du marquage Centrine ne permettent pas toujours de distinguer correctement les deux centrioles de chaque centrosome.

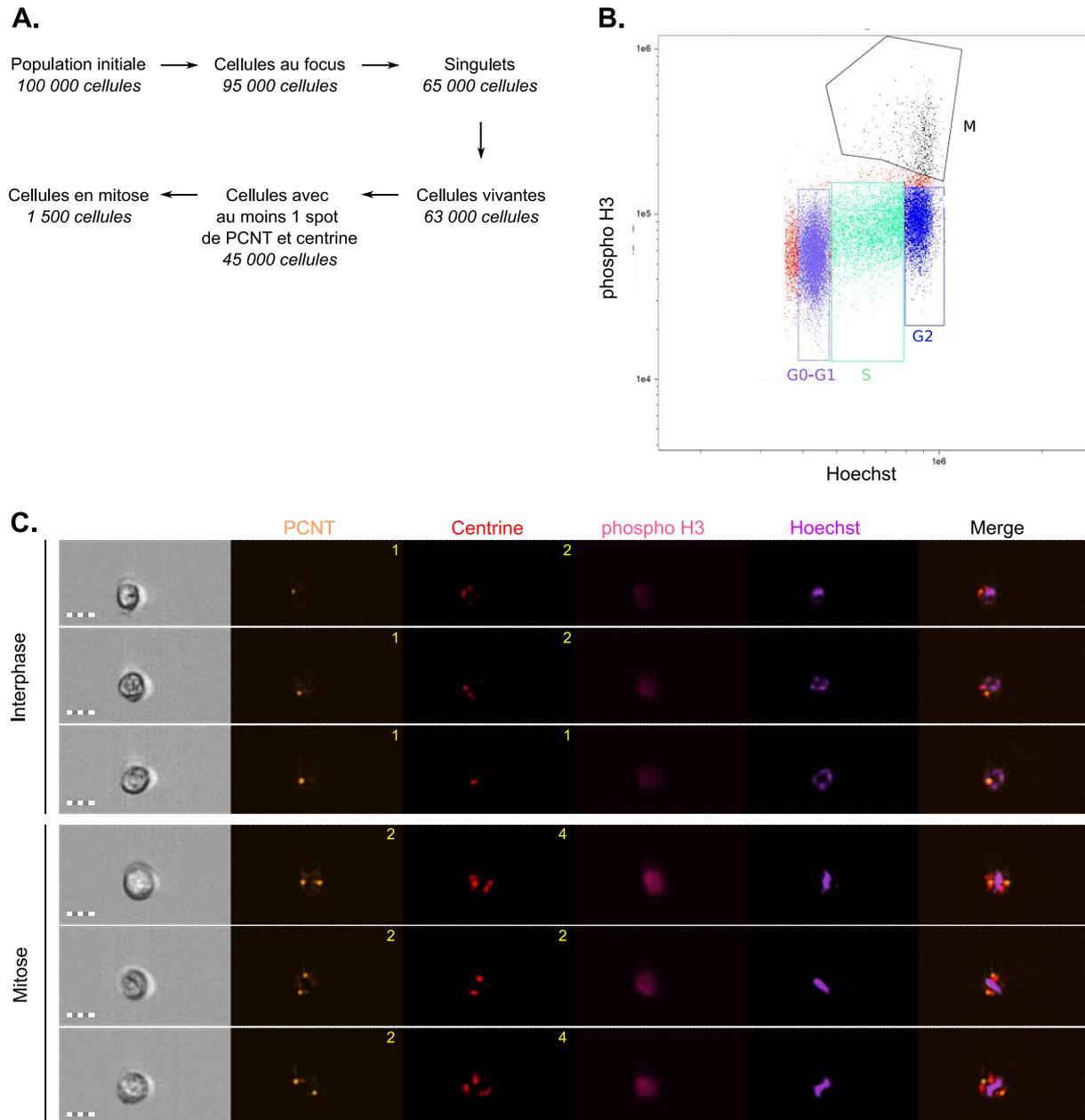


Figure 30 : La cytométrie d'image permet d'analyser une sous-population de cellules en mitose.

Les cellules JK iTax sont induites pour l'expression de Tax avec de la doxycycline pendant 48h. Elles sont ensuite synchronisées en mitose à l'aide d'un traitement avec 10 μ M de RO-3306 pendant 20h suivi d'un relâchement de 2h30 en l'absence de la drogue avant la fixation au méthanol et l'immunomarquage en suspension avec des anticorps anti-PCNT, anti-Centrine et anti-phospho-histone-H3 et un marquage Hoechst. **(A)** Stratégie de « gating » utilisée lors des expériences d'ISX pour éliminer les événements indésirables de l'analyse et arriver à l'analyse de la sous-population de cellules en mitose. Les nombres indiqués correspondent à un ordre de grandeur du nombre de cellules restantes à chaque étape. **(B)** Séparation des cellules selon leur phase du cycle cellulaire en ISX avec un marquage Hoechst – phospho-histone-H3. Les cellules en phase G0-G1 sont indiquées en violet, les cellules en interphase en vert, les cellules en phase G2 en bleu, et les cellules en mitose en noir. **(C)** Exemples représentatifs de cellules en interphase ou en mitose obtenues par ISX. Les nombres indiqués en haut à droite des images du marquage PCNT ou Centrine correspondent au nombre de spots dénombrés lors de l'analyse automatisée. Barre d'échelle : 5 μ m.

D. Induction d'altérations centrosomales au cours du cycle cellulaire par Tax

Nous avons ensuite cherché à analyser les anomalies centrosomales induites par Tax en interphase et en mitose par cytométrie d'image. Nous souhaitons notamment corrélérer la dispersion de Cep63 à des perturbations du fuseau mitotique. Malheureusement, nous avons eu des difficultés à obtenir un marquage de Cep63 suffisamment clair pour pouvoir analyser la distribution de Cep63. Ce marquage pourrait sans doute être optimisé, mais ne permettra sans doute pas d'observer la dispersion de Cep63 du centrosome. Nous avons donc centré notre étude sur les altérations de Centrine et de PCNT induites par l'expression de Tax, qui comme nous l'avons montré dans la partie II. sont associées de façon importante bien que non exclusive à la dispersion de Cep63 en interphase.

Nous évaluons ici les altérations centrosomales en dénombrant le nombre de spots de ces marqueurs, et définissons les cellules altérées comme celles présentant plus de 2 spots de PCNT et plus de 4 spots de Centrine. Cette mesure ne permet pas d'évaluer leur dispersion, que nous avons observée précédemment, car l'analyse d'image automatisée avec cette technique ne permet pas de la mesurer de façon fiable et aisée. Cependant, la dispersion de ces marqueurs pouvant être associée à leur distribution en plusieurs spots, le nombre de spots de ces marqueurs constitue un proxy global des altérations, plus simple à mesurer.

Dans la condition contrôle non induite pour l'expression de Tax (iTax – dox), nous avons observé une proportion déjà très importante de cellules présentant des altérations de PCNT (Figure 31). Le pourcentage de cellules présentant des altérations surnuméraires de PCNT s'élève en l'absence d'induction de Tax jusqu'à 30 % (Figure 31 B). Ce taux d'altérations important est sans doute en lien avec la synchronisation cellulaire à l'aide de RO-3306, qui comme nous l'avons vu avec la Figure 28 induit à elle seule des altérations centrosomales.

Afin d'étudier l'induction d'altérations de PCNT au cours du cycle cellulaire par Tax, nous avons ensuite comparé la proportion de cellules présentant des altérations surnuméraires de PCNT en interphase et en mitose parmi les JK iTax induites pour l'expression de Tax (+ dox) ou non induites (- dox). Pour les deux premières expériences (#1 et #2), réalisées sur un clone de JK iTax tétraploïde, on observe une augmentation de la proportion de cellules présentant des altérations surnuméraires de PCNT en mitose entre les cellules non induites pour l'expression de Tax et les cellules induites, passant de 30 à 40 % dans l'expérience #1 et de 15 à 30 % dans l'expérience #2 (Figure 31 B et C). Nous n'observons toutefois pas d'effet marqué en interphase, avec un taux d'altérations de PCNT à peu près constant à 2 et 8 % respectivement pour les expériences (Figure 31 B et C). A partir de ces deux expériences, l'augmentation de la proportion d'altérations induites par Tax spécifiquement en mitose

mais pas en interphase suggérait une éventuelle fragmentation de PCNT en mitose, peut-être associée à une fragilisation préalable en interphase, et renforcée par les forces importantes s'exerçant sur le fuseau mitotique. Cependant, la répétition de l'expérience avec un clone de JK iTax diploïde (#3 et #4) n'a pas permis de retrouver le même effet de l'expression de Tax sur le phénotype de PCNT. Si en interphase on observe toujours un taux à peu près constant d'altérations de PCNT, à 1 et 2 %, en mitose nous observons au contraire une tendance à la diminution des altérations de PCNT observées, d'environ 12 à 8 % dans les deux cas. Nous discuterons dans la section suivante des raisons qui pourraient expliquer ces différences.

Dans la population de cellules induites pour l'expression de Tax, le niveau effectif d'expression varie. Nous nous sommes donc demandés si l'induction d'altérations de PCNT pouvait dépendre du niveau d'expression de Tax. Pour cela, nous avons catégorisé le niveau d'expression de Tax en trois catégories : les cellules ne présentant pas d'expression (Tax neg), les cellules présentant une expression faible (Tax low) et les cellules présentant une expression forte (Tax high). Ces catégories sont arbitraires, mais permettent tout de même de catégoriser globalement les cellules. Nous avons donc étudié le phénotype de PCNT induit par Tax selon son niveau d'expression. Pour toutes les expériences, en interphase ou en mitose, nous avons observé que pour ces trois niveaux d'expression de Tax, le taux d'altérations de Tax ne semble pas suivre de tendance claire à l'augmentation ou à la diminution avec le niveau de Tax (Figure 31 D et E).

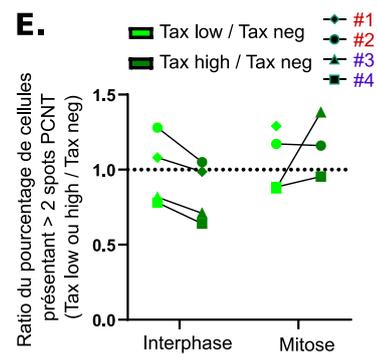
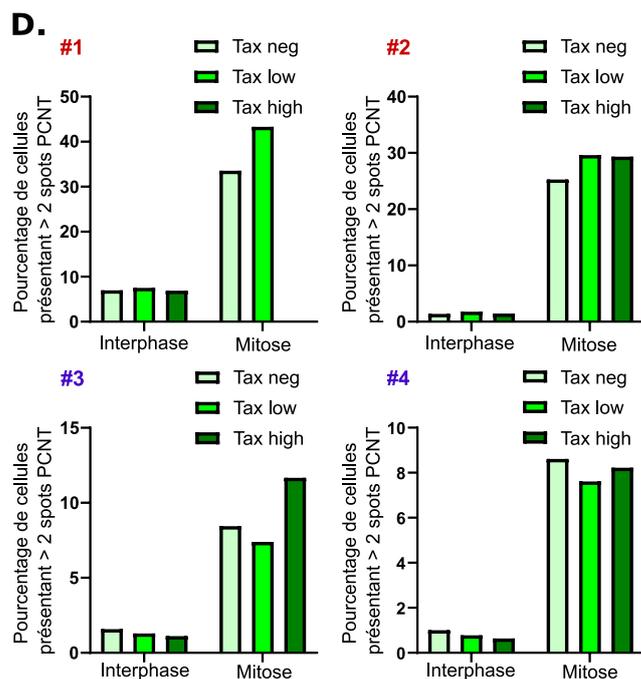
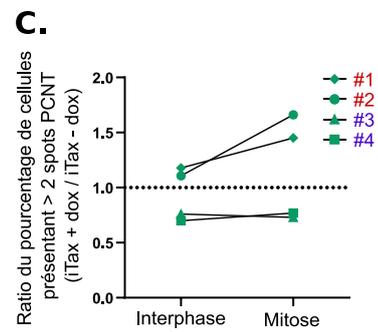
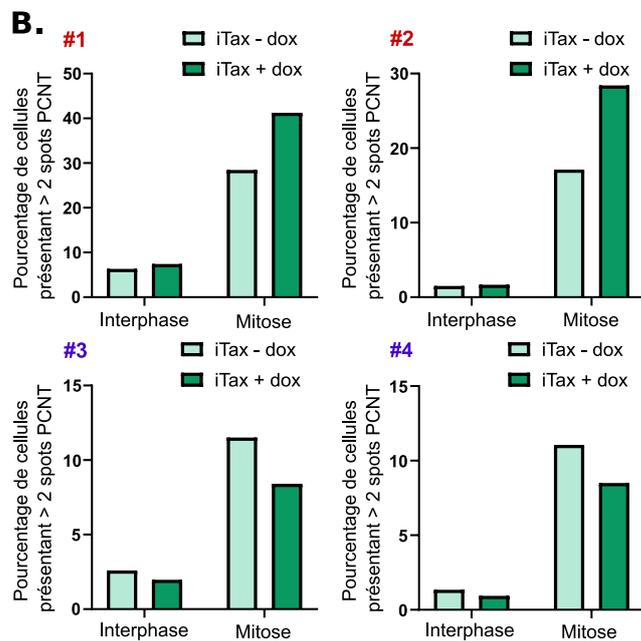
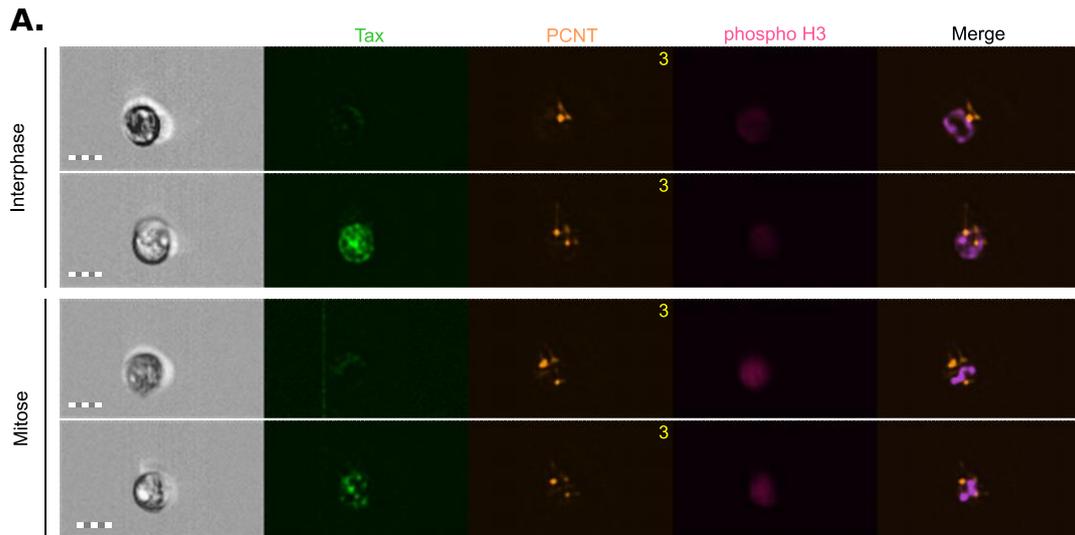


Figure 31 : Analyse des altérations de PCNT par cytométrie d'image.

Les cellules JK iTax sont induites pour l'expression de Tax avec de la doxycycline pendant 48h. Elles sont ensuite synchronisées en mitose à l'aide d'un traitement avec 10 μ M de RO-3306 pendant 20h suivi d'un relâchement de 2h30 en l'absence de la drogue avant la fixation au méthanol et l'immunomarquage en suspension avec des anticorps anti-Tax, anti-PCNT, et anti-phospho-histone-H3 et un marquage Hoechst. Les expériences #1 et #2 (en rouge) ont été réalisées sur le clone de JK iTax D8 tétraploïde, les expériences #3 et #4 (en bleu) ont été réalisées sur le clone de JK iTax D7 diploïde. **(A)** Images de cellules JK iTax induites avec de la doxycycline, présentant différents niveaux d'expression de Tax (correspondant à une image catégorisée Tax low et une image catégorisée Tax high par la suite), en interphase et en mitose. Les cellules choisies présentent des altérations de PCNT. Barre d'échelle : 5 μ m. **(B, C)** Pourcentage de cellules présentant >2 spots de PCNT en interphase et en mitose parmi les cellules induites à la doxycycline pour l'expression de Tax (+ dox) ou pas (- dox), dans la population totale (sans « gating » en fonction du niveau d'expression de Tax). **(B)** Les résultats sont représentés individuellement pour chacune des quatre expériences. **(C)** Les résultats sont normalisés par rapport au pourcentage de cellules présentant >2 spots de PCNT dans la population non induite à la doxycycline, et appariés par expérience. La ligne pointillée indique un ratio de 1, c'est-à-dire l'absence de variation du taux d'altérations de PCNT entre les cellules non induites et induites. **(D, E)** Pourcentage de cellules présentant >2 spots de PCNT en interphase et en mitose parmi les cellules induites pour l'expression de Tax (+ dox), selon le niveau d'expression de Tax, négatif (Tax neg), faible (Tax low) ou fort (Tax high). **(D)** Les résultats sont représentés individuellement pour chacune des quatre expériences. **(E)** Les résultats sont normalisés par rapport au pourcentage de cellules présentant >2 spots de PCNT dans la population de cellules Tax négatives et appariés par expérience. La ligne pointillée indique un ratio de 1, c'est-à-dire l'absence de variation du taux d'altérations de PCNT entre les cellules Tax neg et les cellules Tax low ou high.

De façon similaire, nous avons cherché à étudier l'impact de l'expression de Tax sur le phénotype de Centrine en interphase et en mitose. Ces observations ne sont pas représentées ici, car elles présentent une grande variabilité expérimentale qui rend difficile toute interprétation biologique. Cette variabilité s'explique probablement au moins en partie par la difficulté à distinguer les deux spots de Centrine correspondant aux deux centrioles de chaque centrosome, comme nous l'avons vu en Figure 30, ce qui induit probablement une forte variabilité dans la quantification automatisée. La qualité du marquage hétérogène contribue certainement également à ces difficultés.

En résumé, il est difficile de conclure de façon claire sur les altérations centrosomales induites par Tax en mitose à l'aide de ces observations en cytométrie d'image, du fait de la variabilité entre les expériences réalisées sur des clones de cellules de ploïdie différente, et de limites techniques. Il est possible que l'expression de Tax favorise la fragmentation de PCNT en mitose, mais ces observations devront être confirmées par d'autres approches expérimentales. Nous discuterons plus en détail de ces difficultés dans la partie suivante.

DISCUSSION

Ces travaux de thèse apportent de nouveaux éléments de compréhension de l'induction d'altérations centrosomales par la protéine Tax du rétrovirus HTLV-1. Notamment, ils montrent que Tax induit la dispersion du centrosome de la protéine Cep63, dont les rôles dans le maintien de la structure et du nombre de centrosomes, et en cas de dérégulations dans l'induction d'altérations centrosomales et l'oncogenèse, avait déjà été décrits par ailleurs.

Nous avons pu démontrer que l'interaction entre Tax et Cep63, qui avait été identifiée précédemment dans l'équipe par biotinylation de proximité, s'accompagne d'altérations de la distribution de Cep63 au centrosome en lignée de cellules lymphocytaires. En effet, nous avons mis en évidence la dispersion de Cep63 du centrosome. L'utilisation de différents mutants de Tax interagissant ou non avec Cep63, et conservant ou non leur capacité d'induire la voie NF- κ B, confirme que la dispersion centrosomale de Cep63 n'est pas un effet indirect de l'activation de la voie NF- κ B par Tax, ce qui suggère fortement que cette dispersion est une conséquence directe de l'interaction, bien que nous ne puissions pas exclure que d'autres des multiples fonctions de Tax entrent en jeu.

De façon importante, nous avons également montré que la dispersion de Cep63 du centrosome est associée à des altérations d'autres marqueurs centrosomaux : le marqueur du matériel péricentriolaire PCNT et le marqueur de centrioles Centrine. Cela renforce l'idée que ces altérations centrosomales pourraient avoir des conséquences fonctionnelles sur l'organisation du fuseau mitotique, et favoriser les erreurs de ségrégation des chromosomes et l'aneuploïdie.

Outre cette dispersion de Cep63 du centrosome, nous avons observé que Tax pouvait également induire des altérations surnuméraires de Cep63, par un mécanisme qui ne semble pas dépendre de l'interaction entre les deux protéines. Néanmoins, ces altérations surnuméraires sont plus faiblement associées à des altérations de Centrine et PCNT. Cela suggère un rôle secondaire de ces altérations surnuméraires de Cep63 dans les altérations centrosomales induites par Tax, bien que la nature de ces altérations ainsi que leur importance restent à caractériser plus précisément.

Nous n'avons malheureusement pas pu observer directement l'impact de ces altérations en mitose, du fait de la rareté de la sous-population de cellules en mitose exprimant Tax dans notre système expérimental. Nous avons cherché à parer à cette rareté en mettant en place un système expérimental d'imagerie à haut débit en flux, la cytométrie d'image, mais des difficultés techniques à mettre en place ce système rendent l'établissement de conclusion biologiques complexe.

Nous allons dans cette partie discuter davantage de l'intérêt et des difficultés de l'utilisation de la cytométrie d'image pour l'étude du centrosome. Nous reviendrons également sur les altérations centrosomales induites par Tax que nous avons décrites dans cette étude, et nous discuterons des

mécanismes qui pourraient les sous-tendre. Nous finirons par une remise en perspective de ces observations dans le processus d'oncogenèse induit par la protéine Tax lors de l'infection par HTLV-1.

I – Utilisation de la cytométrie d'image pour l'étude du centrosome

Comme nous venons de le voir, nous avons utilisé la technique de cytométrie d'image pour analyser les anomalies centrosomales induite par Tax dans des lignées de cellules Jurkat. A notre connaissance, cette technique n'avait jusqu'ici jamais été utilisée pour l'étude du centrosome, et il semble donc intéressant de dresser un bilan des avantages et des limitations de cette technique dans ce cadre, en comparaison de la microscopie à fluorescence qui est généralement utilisée pour l'étude du centrosome.

Un intérêt majeur de cette technique est qu'elle permet une analyse à haut débit d'un grand nombre de cellules, ce qui permet une analyse avec une grande puissance statistique. En comparaison, les techniques de microscopie à fluorescence, utilisées de façon classique pour l'étude du centrosome, permettent une analyse détaillée et fine (dépendant évidemment des systèmes optiques utilisés et de la qualité des échantillons), mais généralement plus difficile à mettre en œuvre à grande échelle à cause du temps d'acquisition des images, bien que l'apparition de systèmes confocaux HCS (High Content Screening) puisse permettre une automatisation de l'acquisition et une augmentation de sa vitesse.

A. L'acquisition à haut débit permet d'accéder à des sous-populations rares

Dans notre étude, un intérêt majeur de cette technique, par rapport à la microscopie à fluorescence classique, était qu'elle nous permettait d'accéder à une sous-population rare. En effet, dans notre système expérimental, environ 20 à 50% des cellules exprimaient Tax. Parmi ces cellules, malgré la synchronisation cellulaire, moins de 5% des cellules Tax+ étaient effectivement en mitose. Ces contraintes viennent notamment du fait que nous souhaitions réaliser notre analyse sur des cellules d'une lignée lymphocytaire, les cellules Jurkat, qui semblent ici se comporter de façon moins homogène que les lignées de cellules adhérentes. Le faible taux de cellules d'intérêt rend une observation en microscopie complexe, car une longue étape de localisation des cellules d'intérêt serait nécessaire avant de les imager. Au contraire, en cytométrie d'image, l'acquisition rapide d'images d'un grand nombre de cellules permet de restreindre l'analyse à cette sous-population *a posteriori* de l'acquisition, lors de l'étape d'analyse.

B. La cytométrie d'image est particulièrement adaptée pour étudier des cellules épaisses

De plus, une autre contrainte associée à l'utilisation de cellules Jurkat est leur épaisseur, puisqu'il s'agit de cellules rondes, d'un diamètre d'environ 5µm, dans lesquelles le centrosome peut avoir une localisation variable. En microscopie confocale, cela nécessite donc l'acquisition d'un grand nombre de plans, qui ajoute au temps d'acquisition. En cytométrie d'image, l'utilisation d'un module EDF (Extended Depth of Field) permet l'acquisition du signal de toute l'épaisseur de la cellule en préservant le focus et la résolution (Ortyn *et al.*, 2007). La cytométrie d'image est donc particulièrement intéressante pour l'étude de ces cellules épaisses. Néanmoins, lors de notre analyse, nous avons fréquemment détecté des populations de cellules qui ne présentaient pas de spots de Centrine ou de PCNT. Nous avons émis l'hypothèse qu'il pouvait s'agir de cellules pour lesquelles le centrosome se trouvait hors du focus, malgré le module EDF. Nous avons choisi d'éliminer de notre analyse ces cellules, cependant il est possible que le nombre de centrosomes soit globalement sous-évalué par cette méthode.

C. Enjeux liés à l'analyse automatisée des images

Que ce soit en microscopie à fluorescence ou en cytométrie d'image, une difficulté importante est la mise en place d'une analyse automatisée des images permettant une détection correcte des signaux qui, si elle peut être dispensable dans le cas de petits nombres d'échantillons et en visant l'analyse de 30 ou 50 cellules d'intérêt comme c'est classiquement le cas en microscopie à fluorescence, permet un gain de temps majeur en cas d'échantillons nombreux, et est indispensable pour l'analyse en cytométrie d'image. Pour la mise en place d'une analyse automatisée, une étape cruciale est l'établissement d'une délimitation entre le signal (sur lequel la suite des mesures pourra être réalisée) et le bruit de fond. L'objectif est de ne conserver que le signal d'intérêt, mais en préservant toutefois le maximum. Dans le cas de l'étude du centrosome, pour laquelle un enjeu important est souvent un dénombrement du nombre de spots de marqueurs afin de détecter une amplification centrosomale, le placement correct de ce seuil est essentiel, car un seuil trop élevé conduira à sous évaluer le nombre de spots (perte dans le comptage des spots d'intensité les plus faibles), mais un seuil trop faible ne permettra pas de distinguer des spots rapprochés (qui seraient alors comptés comme un seul spot), et peut introduire un sur-comptage en identifiant comme spot des variations locales d'intensité correspondant à du bruit de fond (une représentation visuelle simplifiée de cet enjeu est présenté sur la Figure 32).

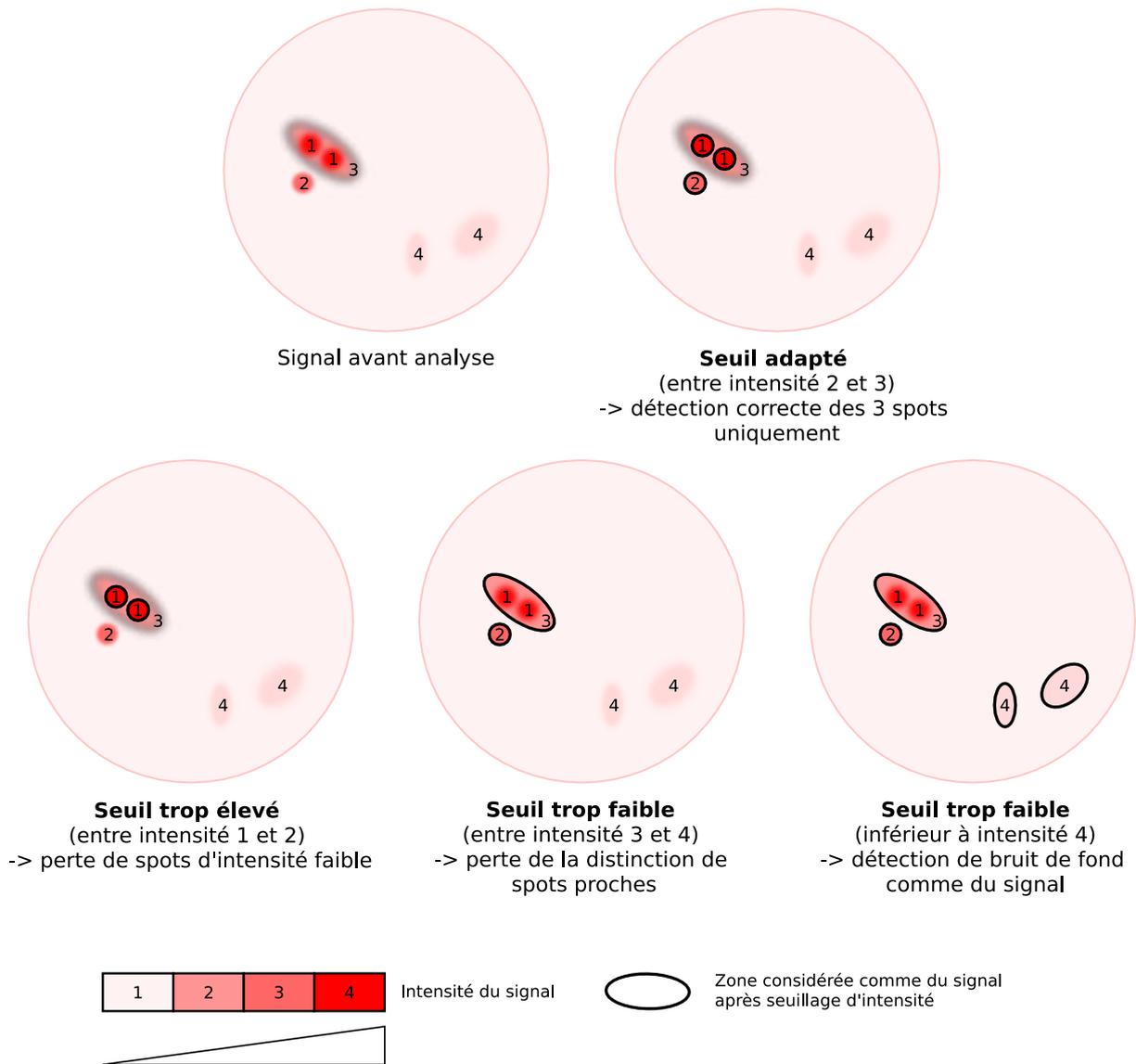


Figure 32 : Enjeu du placement d'un seuil d'intensité correcte pour le signal lors de l'analyse automatisée du nombre de centrosomes.

Lors de l'analyse automatisée du nombre de spots d'un marqueur (par exemple pour dénombrer les centrosomes) sur des images de microscopie à fluorescence ou de cytométrie d'image, le placement d'un seuil de positivité de signal, permettant de délimiter les zones distinctes à dénombrer, est nécessaire. Le niveau du seuil choisi est important pour un dénombrement précis : avec un seuil trop élevé, des spots d'intensité faible seront perdus, mais au contraire, avec un seuil trop faible, des signaux proches ne seront pas détectés comme distincts, et du bruit de fond pourra être détecté comme du signal. Représentation simplifiée d'une cellule contenant 3 spots d'un marqueur centrosomal : deux spots proches d'intensité forte (1) dans une zone d'intensité plus faible (3), et un spot d'intensité moyenne (2), dans une cellule avec des zones où le bruit de fond peut atteindre une intensité faible (4). Les zones détectées comme du signal dans les différentes conditions de seuillage sont entourées en noir.

Cette analyse automatisée du signal est d'autant plus simplifiée que la qualité du marquage est haute, permettant un ratio signal / bruit plus important, ce qui laisse plus de marge pour le placement du seuil dans l'intervalle entre les deux. Cette amélioration du marquage peut être atteinte par la

diminution du bruit de fond ou par l'augmentation du niveau du signal spécifique. La qualité du marquage dépend en bonne partie des anticorps ou marqueurs utilisés, mais aussi de la technique de marquage. En cytométrie d'image, le marquage se fait en suspension (par rapport à la microscopie où le marquage se fait sur cellules fixées sur des lamelles). Entre nos mains, dans des conditions similaires, le marquage en suspension donnait lieu à beaucoup plus de bruit de fond dans les cellules, compliquant donc l'analyse. Une hypothèse pour expliquer cette différence pourrait être le fait que les lavages sont sans doute moins efficaces lors d'un marquage en suspension par rapport à un marquage sur lamelles, où les cellules seraient mieux en contact avec la solution de lavage, permettant une meilleure élimination des anticorps fixés faiblement de façon non spécifique. De plus, en comparaison avec les études réalisées classiquement en cytométrie d'image, des contraintes expérimentales venaient également du fait que nous voulions appliquer cette technique à l'étude du centrosome spécifiquement. Pour cela, nous avons adapté la fixation des cellules en utilisant du méthanol au lieu de la fixation plus classique de cytométrie utilisant du paraformaldéhyde. En effet, l'utilisation de méthanol pour la fixation est recommandée pour l'observation du centrosome en microscopie, car elle permet de mieux distinguer le signal au niveau de cette structure dense. Entre nos mains, la fixation au méthanol, si elle était nécessaire pour l'observation nette du centrosome, induisait également largement plus de bruit de fond en cytométrie d'image. Ainsi, malgré l'optimisation de la concentration d'utilisation des anticorps, le rapport signal / bruit obtenu dans nos expériences ne permettait pas toujours une détection claire et sans erreurs du signal.

Le comptage correct des spots automatisé est d'autant plus simple que la résolution est importante, permettant une meilleure discrimination des spots proches. Si la cytométrie d'image permet l'acquisition d'image à des grossissements relativement importants (jusqu'à un objectif x60 pour l'appareil utilisé), elle ne permet pas d'accéder au même niveau de détails que la microscopie confocale.

Associé à la qualité du marquage globalement plus faible, le défaut de résolution rend difficile le comptage précis de spots de marqueurs centrosomaux rapprochés. Par exemple, pour le cas de Centrine, qui est un marqueur distal des centrioles, qui est donc censé être présent en 1 ou 2 paires de spots dans la cellule en fonction de la phase du cycle cellulaire, il était difficile de distinguer systématiquement les spots individuels d'une paire de centrioles. En mitose, si on distinguait parfois 2 paires de spots associées à 2 spots de PCNT, au contraire on ne distinguait parfois qu'un seul spot de Centrine par spot de PCNT (Figure 30). Cela rend l'analyse du nombre de spots surnuméraires assez peu robuste, puisqu'on semble être à la limite de la détection rassemblée ou séparée de chaque paire de centrioles. De même, les centrosomes surnuméraires sont fréquemment rassemblés en groupe lors

de la mitose, et dans ces conditions de marquage, la résolution ne permettait peut-être pas de bien distinguer les spots individuels dans les groupes de façon fiable.

De façon générale, il semble donc que l'utilisation de la cytométrie d'image pour l'étude du centrosome présente de nombreuses limites conduisant à une détection approximative des marqueurs centrosomaux. Il est possible que des optimisations techniques permettent une amélioration de cette détection, mais en conservant tout de même probablement une précision largement moindre qu'en microscopie confocale.

D. Une variabilité importante liée à notre étude

Les résultats présentés sont caractérisés par une grande variabilité entre les expériences.

D'une part, l'utilisation de RO-3306 pour synchroniser les cellules en mitose induisait un taux d'altérations centrosomales très important, en l'absence même de toute perturbation par Tax. Cela conduit probablement à plus de difficulté à observer des altérations subtiles de marqueurs centrosomaux, en tout cas avec la sensibilité de la technique de cytométrie d'image dont nous avons discuté dans la partie précédente.

D'autre part, une difficulté importante a été l'utilisation des cellules JK iTax, dont l'analyse a révélé qu'elles étaient hétérogènes. Suite à un premier clonage, le clone que nous avons réussi à isoler était tétraploïde, néanmoins nous avons décidé de l'utiliser pour des premières expériences, dont les résultats se sont révélés prometteurs puisqu'ils montraient la présence de spots surnuméraires de PCNT spécifiquement en interphase, ce qui suggérait une fragmentation du matériel péricentriolaire en mitose. Néanmoins, lorsque cette expérience a été répétée sur un nouveau clone diploïde, nous n'avons pas retrouvé le même résultat.

Au-delà d'une simple variabilité entre clones, cette différence est probablement explicable par d'autres facteurs. Tout d'abord, le taux d'expression de Tax était plus faible pour le clone diploïde que pour le clone tétraploïde. De plus, une étude récente a associé la polyploïdie à une augmentation de la fréquence des mitoses multi-polaires (Goupil *et al.*, 2020). En effet, les auteurs montrent que l'augmentation du contenu en ADN joue le rôle d'une barrière physique qui favorise la disposition multipolaire des pôles du fuseau. Dans notre étude, on peut donc émettre l'hypothèse que dans les expériences réalisées sur des clones tétraploïdes, nous parvenions mieux à visualiser une éventuelle fragmentation centrosomale en mitose puisqu'elle n'était pas associée à un regroupement des pôles mais à une mitose multipolaire, qui semble plus facilement visualisable par la technique de cytométrie d'image au vu de la difficulté à distinguer des spots proches dont nous avons discuté dans la partie précédente.

Il est également possible que les cellules polyploïdes soient plus permissives à l'établissement d'altérations centrosomales. En effet, ces cellules peuvent avoir des perturbations d'un certain nombre de mécanismes régulateurs du cycle cellulaire (qui empêchent normalement la progression du cycle cellulaire en cas d'anomalies du centrosome), ce qui pourrait être permis par leur instabilité génomique forte qui favorise l'apparition de mutations (Gemble *et al.*, 2022). En effet, la dérégulation des mécanismes de contrôle et d'arrêt du cycle cellulaire est probablement nécessaire pour que ces cellules survivent malgré les dommages à l'ADN qui les caractérisent (Nano *et al.*, 2019).

Il serait intéressant d'étudier l'apparition d'une éventuelle polyploïdisation dans le cadre de l'infection par HTLV-1 (qui pourrait être favorisée par des anomalies centrosomales et des défauts de cytokinèse). S'il est peu probable que les cellules infectées puissent survivre à une duplication totale du génome, des gains ponctuels de chromosomes sont possibles, comme cela a été observé dans des caryotypes de cellules d'ATL (Ohshima *et al.*, 1998). Ceux-ci pourraient donc potentiellement à leur tour jouer un rôle de moteur pour l'amplification centrosomale, en une boucle de rétroaction positive.

La variabilité observée semble donc notamment liée à des difficultés spécifiques à notre étude, et ne sont pas forcément généralisables à toutes les études du centrosome qui pourraient être faites par cytométrie d'image.

II – Caractérisation des altérations centrosomales induites par Tax

A. Comment Tax induit-elle la dispersion de Cep63 ?

Nous avons montré que l'expression de Tax en cellules Jurkat induisait la dispersion de Cep63 du centrosome. L'observation que les mutants de Tax ayant perdu leur capacité d'interaction avec Cep63 ne sont pas capables d'induire la dispersion de Cep63 suggère fortement que c'est l'interaction directe de Tax avec Cep63 qui permet la dispersion de Cep63. Néanmoins, il est possible que d'autres mécanismes entrent en jeu.

1. Implication de la voie NF- κ B

Nous avons notamment étudié l'implication de l'activation de la voie NF- κ B dans l'induction de la dispersion de Cep63. En effet, parmi les mutants que nous avons étudiés, les mutants M22 et KOR qui ont perdu leur capacité d'interaction avec Cep63 sont également déficients pour l'activation de la voie NF- κ B. Nous avons observé que l'activation ectopique de la voie NF- κ B canonique dans des cellules transfectées avec ces mutants M22 et KOR ne rétablit pas de dispersion de Cep63, suggérant qu'un autre défaut de ces mutants entrait en jeu. De plus, le blocage de la voie NF- κ B canonique dans des

cellules transfectées avec Tax WT ou le mutant M47 (capables d'activer la voie NF- κ B et d'interagir avec Cep63) n'abolissait pas leur capacité d'induire la dispersion de Cep63. Cela confirme que l'activation de la voie NF- κ B canonique n'est ni suffisante, ni nécessaire pour induire la dispersion de Cep63.

Cependant, avec nos résultats, il est difficile d'exclure une implication de la voie NF- κ B non canonique. En effet, il a été montré que le mutant M47 était capable d'induire le clivage de p100, contrairement au mutant M22 (Xiao *et al.*, 2001), indiquant que le mutant M22 est également déficient pour l'activation de la voie NF- κ B non canonique. Nous ne pouvons donc pas exclure que le défaut d'activation de la voie non-canonique du mutant M22 soit responsable de l'absence d'induction de la dispersion de Cep63. Afin de conclure sur l'implication de la voie NF- κ B non canonique dans la dispersion de Cep63, il serait intéressant de confirmer les variations d'activations de cette voie entre les mutants dans notre système expérimental. Il serait également intéressant d'utiliser de façon similaire aux expériences sur la voie canonique des dominants négatifs de la voie non canonique, qui permettraient de conclure sur la nécessité de l'activation de cette voie par Tax pour induire la dispersion de Cep63, et/ou des dominants actifs qui permettraient d'étudier si elle est suffisante pour induire cette dispersion.

2. Implication du niveau protéique de Tax au centrosome

On observe également que le mutant M47 a tendance à induire davantage la dispersion de Cep63 que Tax WT (Figure 21 B). Néanmoins, lorsqu'on bloque l'activation de la voie NF- κ B canonique, le taux d'altérations induites par le mutant M47 tend à diminuer et revient au même niveau que Tax WT (Figure 22 C). Si cela n'indique pas une nécessité de l'activation de la voie NF- κ B pour l'induction de la dispersion de Cep63 (celle-ci étant toujours largement induite), on peut se demander quelle est l'origine de ces variations, bien qu'elles ne soient pas statistiquement significatives. Une hypothèse intéressante serait d'associer ces variations au niveau d'expression centrosomal de Tax. En effet, le mutant M47 s'exprime très fortement et localise largement en région péri-centrosomale, de façon plus marquée que Tax WT. Cependant, lorsque l'induction de la voie NF- κ B est bloquée, les niveaux d'expression à la fois de Tax WT et de Tax M47 sont largement diminués, en cohérence avec la stabilisation de Tax induite par la voie NF- κ B (Millen *et al.*, 2020). De plus, la différence de niveau protéique au centrosome est abolie (visible légèrement sur la Figure 22 A, et observations répétées lors des comptages). Il semble donc possible que le niveau protéique de Tax au centrosome puisse impacter la capacité de Tax d'induire la dispersion de Cep63. Cette hypothèse est en cohérence avec une induction de la dispersion de Cep63 comme une conséquence directe de l'interaction : une plus grande disponibilité de Tax au centrosome favoriserait davantage d'interaction avec Cep63. Cela conduirait à une dispersion plus importante de Cep63 vers les zones où localise Tax, comme suggéré

par la colocalisation de Tax avec Cep63 au niveau des zones de dispersion. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant de mesurer le niveau d'expression centrosomal de Tax cellule par cellule, et de voir s'il corrèle avec une dispersion de Cep63 plus importante.

3. Hypothèse d'une fragilisation de l'ancrage de Cep63 au centrosome

On peut également se demander comment l'interaction directe entre Tax et Cep63 pourrait conduire à sa dispersion du centrosome. Le domaine de Cep63 qui permet sa localisation centrosomale correspond au domaine N-terminal, entre les acides aminés 1 et 135 (Loffler *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2013), comme montré sur la Figure 16. De façon intéressante, le domaine de Cep63 impliqué dans son interaction avec Tax correspond également à ce domaine N-terminal (voir article en annexe 1). On peut donc imaginer que l'interaction de Tax avec Cep63 perturberait son ancrage centrosomal par compétition. Cependant, la localisation centrosomale ne serait pas forcément totalement abolie, notamment en raison des propriétés de multimérisation de Cep63 impliquant également secondairement son domaine C-terminal, de même que son interaction avec Cep152 ((Brown *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2019), Figure 16). Par conséquent, l'interaction entre Tax et Cep63 pourrait conduire à une fragilisation de son ancrage au centrosome, avec toutefois conservation d'une localisation centrosomale et partiellement péri-centrosomale en raison de ces interactions.

4. Implication de l'autophagie

Un autre mécanisme qui pourrait être modulé par Tax est la dégradation autophagique de Cep63. En effet, Cep63 a été montré comme pouvant être un substrat de l'autophagie médiée par p62 (Watanabe *et al.*, 2016). De plus, une autre étude suggère que la dégradation autophagique de composants centrosomaux serait principalement médiée par les satellites centrosomaux (Holdgaard *et al.*, 2019), avec lesquels Cep63 est connue pour interagir (Firat-Karalar *et al.*, 2014; Kodani *et al.*, 2015). Or il a été montré que Tax pouvait moduler l'autophagie de façon complexe, en activant d'une part les étapes d'initiation de l'autophagie via la protéine Beclin-1 (Ren *et al.*, 2015) tout en inhibant l'étape tardive de maturation des autophagosomes conduisant à leur dégradation, ce qui favorise l'accumulation d'autophagosomes (Tang *et al.*, 2013) (pour une revue récente des relations complexes entre HTLV-1 et l'autophagie, voir Ducasa *et al.*, 2021). Tax interagit également avec p62 au niveau de membranes péri-golgiennes, contribuant ainsi à l'activation de la voie NF- κ B (Schwob *et al.*, 2019). Cette interaction pourrait favoriser la délocalisation de Cep63 vers des membranes péri-golgiennes ou autophagiques. On pourrait donc imaginer que Tax favorise l'accumulation péri-centrosomale de Cep63 et d'autres composants du centrosome au niveau de membranes autophagiques via les satellites centrosomaux, tout en empêchant l'étape finale menant à leur dégradation. Tax pourrait potentiellement favoriser le recrutement de Cep63 au niveau des membranes autophagiques. Il serait

intéressant de tester si la localisation dispersée de Cep63 correspond à une localisation de protéines des satellites centrosomaux telles que le marqueur PCM1, et de la protéine caractéristique des autophagosomes LC3.

De plus, des défauts de la dégradation autophagique des composants centrosomaux sont associés à une accumulation de Centrine et Péricentrine en région péri-centrosomale et à une fragmentation centrosomale en mitose (Holdgaard *et al.*, 2019), ce qui serait également être cohérent avec nos observations concernant ces marqueurs.

5. Dispersion de Cep63 ou recrutement péri-centrosomal augmenté ?

Enfin, il serait intéressant de confirmer que le phénotype observé correspond bien à une dispersion du signal de Cep63 depuis le centrosome vers la région péri-centrosomale, et pas au contraire à un recrutement accru de Cep63 en région péri-centrosomale induit par Tax. Par la manière dont nous avons réalisé les comptages, avec un microscope à épifluorescence et sans acquisition d'images systématique, nous n'avons pour l'instant pas pu réaliser de quantification du niveau de signal de Cep63 en région centrosomale et péri-centrosomale. Une telle quantification nous indiquerait en cas de niveau constant que le phénotype de Cep63 correspond bien à une dispersion du signal centrosomal initial, alors qu'en cas d'augmentation du signal cela suggérerait plutôt un recrutement centrosomal de Cep63.

Cependant, même si nous n'avons pas accès à cette quantification pour le moment, différentes observations tendent à suggérer que ce que nous observons correspond bien à une dispersion de Cep63 depuis le centrosome et pas à un recrutement augmenté. Notamment, nous n'avons pas observé de variations du niveau d'expression de Cep63 induite par Tax ou par les différents mutants en cellules Jurkat par Western Blot (données non montrées), bien qu'il soit possible que cette technique ne nous permette pas de détecter des variations subtiles dans la sous-population des cellules transfectées par Tax. De plus, l'observation du phénotype de Cep63 dans des lignées de lymphocytes chroniquement infectés par HTLV-1 montre une diminution de l'intensité du signal de Cep63 au centrosome (données non présentées), ce qui serait cohérent avec une perte progressive de la localisation centrosomale de Cep63. Cela pourrait être une conséquence soit d'une fragilisation de son ancrage centrosomal induite par l'interaction avec Tax, soit d'une dégradation autophagique augmentée.

De plus, une étude montre le sur-recrutement de Cep63 au centrosome suite à une invalidation de la protéine CCDC14 (une protéine des satellites centriolaires qui limite le recrutement centrosomal de Cep63) (Kodani *et al.*, 2015). Dans cette étude, les auteurs observent également l'apparition de multiples spots de Centrine, ce qui pourrait correspondre à nos observations. Néanmoins, cette étude

montre qu'il n'y a pas de recrutement du matériel péricentriolaire au niveau de la zone de dispersion de Cep63 et de la Centrine. Ces observations ne semblent donc pas totalement correspondre au phénotype induit par Tax, caractérisé par la dispersion à la fois de Centrine et de PCNT dans la zone de dispersion de Cep63.

Ainsi, même si le mécanisme d'induction des altérations de Cep63 par Tax n'est pas totalement élucidé, il semblerait que l'interaction entre Tax et Cep63 puisse favoriser sa dispersion du centrosome, par exemple en déstabilisant son ancrage centrosomal.

B. Comment la dispersion de Cep63 peut-elle contribuer à l'altération d'autres marqueurs centrosomaux, et quelles peuvent être leurs conséquences ?

Une question cruciale posée par nos observations est celle du lien entre la dispersion de Cep63 observée et l'induction d'altérations d'autres marqueurs centrosomaux, qui seraient un signe d'altération de la fonction du centrosome. En effet, nous avons observé une corrélation entre la dispersion de Cep63 et d'autres altérations des marqueurs Centrine et PCNT. Ces altérations correspondaient à une dispersion du centrosome selon la localisation de Cep63, des spots surnuméraires, ou une diminution importante (voire une perte) du signal centrosomal de ces marqueurs. Si nous n'avons dans notre étude pas montré de lien mécanistique entre la dispersion de Cep63 et l'induction de ces altérations, différentes études nous permettent de renforcer l'hypothèse d'un lien de causalité.

1. Implication possible de la protéine Cep57

En particulier, plusieurs études suggèrent que Cep63 joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité des centrosomes et du matériel péricentriolaire. Tout d'abord, dans des spermatocytes de souris invalidés pour Cep63, il a été observé une désorganisation du matériel péricentriolaires, avec une perte de sa compaction ainsi que la présence de davantage d'extrusions (Marjanović *et al.*, 2015). De plus, Cep63 pourrait participer à la stabilisation du matériel péricentriolaire par son association avec Cep57, avec qui elle forme un complexe à l'extrémité proximale des centrioles avec la protéine Cep152.

En effet, Cep57 a été impliquée dans l'organisation du matériel péricentriolaire et la nucléation des microtubules. Chez le Xénope, xCep57 interagit avec la γ -tubuline et favorise l'ancrage des microtubules au niveau des pôles du fuseau mitotique (Emanuele and Stukenberg, 2007). Chez les mammifères, Cep57 est également nécessaire au maintien de l'intégrité du matériel péricentriolaire en mitose, stabilise la nucléation des microtubules et est nécessaire au bon fonctionnement du fuseau

mitotique (Wu *et al.*, 2012). Elle participe également au recrutement du matériel péricentriolaire, notamment PCNT, au niveau des centrioles nouvellement formés (Aziz *et al.*, 2018) et à son organisation, et régule l'engagement des centrioles (Watanabe *et al.*, 2019; Ito *et al.*, 2021). Cep57 interagit également directement avec PCNT via un domaine N-terminal (acides aminés 68 – 103), ce qui participe probablement à son ancrage aux centrioles (Watanabe *et al.*, 2019). Bien que l'ancrage de PCNT au centrosome semble partagé entre Cep57 et d'autres protéines comme Cep152, Cep57 semble particulièrement importante pour l'ancrage et l'organisation de PCNT et du matériel péricentriolaire en mitose (Watanabe *et al.*, 2019). La déplétion conduit à une fragmentation du matériel péricentriolaire en mitose sous l'effet des forces appliquées par le fuseau mitotique et à une diminution de la nucléation des microtubules du fuseau mitotique (Wu *et al.*, 2012; Aziz *et al.*, 2018; Watanabe *et al.*, 2019). Elle conduit également à un désengagement précoce des centrioles (Aziz *et al.*, 2018; Watanabe *et al.*, 2019), sans doute en lien avec le fait que PCNT participe normalement au maintien de l'engagement des centrioles en mitose (Lee and Rhee, 2012; Matsuo *et al.*, 2012), et donc une déstabilisation du matériel péricentriolaire peut favoriser le désengagement précoce des centrioles. Enfin, en lien avec toutes ces observations, l'absence de Cep57 conduit à une augmentation des défauts de ségrégation des chromosomes, avec des chromosomes retardés et mal alignés (Aziz *et al.*, 2018; Watanabe *et al.*, 2019).

Un lien direct entre le complexe Cep152 / Cep63 et le rôle de recrutement de PCNT et de nucléation des microtubules médié par Cep57 a été apporté par une étude récente. Cette étude montre qu'en mitose, le complexe APC/C s'associe avec le complexe Cep152 / Cep63, ce recrutement étant médié par l'interaction d'APC/C avec Cep152. Suite à cette association, APC/C ubiquitine Cep152, ce qui induit la libération de Cep57 du complexe avec Cep63 et Cep152 et permet son interaction avec la Péricentrine, nécessaire à la nucléation des microtubules. Cette étude montre que pendant la mitose, la diminution du niveau centrosomal de Cep152 et de Cep63 favorise le recrutement de PCNT et la nucléation de microtubules. Des perturbations de ce mécanisme sont associées à des anomalies mitotiques et erreurs de ségrégation des chromosomes (Tischer, Yang and Barford, 2022). Cette étude montre que la diminution de l'interaction entre Cep57 et Cep63 peut altérer le recrutement de PCNT et la nucléation de microtubules en mitose.

Or, de façon intéressante, le domaine de Cep63 impliqué dans son interaction avec Tax est situé au niveau de sa partie N-terminale (voir article en annexe 1), ce qui correspond aussi à son domaine d'interaction avec Cep57 (Wei *et al.*, 2020). On peut donc émettre l'hypothèse que l'interaction entre Tax et Cep63 pourrait fragiliser l'interaction entre Cep63 et Cep57, ce qui pourrait conduire à un recrutement anormal de PCNT et à une nucléation anormale de microtubules en mitose. Cette hypothèse pourrait être confirmée par l'étude de l'interaction entre Cep63 et Cep57 en présence ou

en l'absence de Tax par co-immunoprécipitation. On peut émettre l'hypothèse que cette interaction pourrait être diminuée par compétition en présence de Tax.

2. Implication possible de la protéine CCDC57

La protéine CCDC57 est une protéine centrosomale récemment identifiée comme colocalisant avec Cep63 au niveau de l'extrémité proximale des centrioles, et qui interagit directement avec Cep63 et pourrait participer à son recrutement au centrosome. De façon intéressante, CCDC57 semble également réguler négativement la nucléation de microtubules et leur stabilité, ce qui impacte la progression mitotique (Gurkaslar *et al.*, 2020). Il serait donc intéressant de savoir si la dispersion de Cep63 impacte la localisation et les fonctions de CCDC57, ce qui pourrait en conséquence également perturber la nucléation des microtubules du fuseau mitotique. Pour cela, la distribution cellulaire de CCDC57 pourrait dans un premier temps être comparée entre les cellules transfectées par Tax présentant une dispersion de Cep63 et celles ne présentant pas de dispersion de Cep63. La capacité de nucléation des microtubules du fuseau mitotique pourrait également être investiguée par des tests de dépolymérisation – repolymérisation des microtubules.

C. Comparaison des altérations du centrosome induites par Tax avec des altérations similaires induites par d'autres virus

1. Comparaison avec les altérations du centrosome induites par le virus Zika

Le virus Zika est un flavivirus qui cause de graves troubles congénitaux du neurodéveloppement, notamment une microcéphalie. L'infection par le virus a été associée à des altérations du centrosome et à des défauts mitotiques (Souza *et al.*, 2016; Wolf *et al.*, 2017), impliquant la protéine virale NS5 (Kesari *et al.*, 2020), et induisant notamment la dégradation de la protéine PCM1 associée aux satellites centriolaires (Wen *et al.*, 2019).

De façon intéressante, un article sorti en pre-print en 2020 montre l'implication de la protéine Cep63 dans les altérations du centrosome induites par le virus (Kodani *et al.*, 2020). Cet article montre que la protéine virale NS3 localise au centrosome et interagit avec Cep63, ce qui induit son accumulation au centrosome, avec un phénotype extrêmement proche de ce que nous avons décrit comme une dispersion de Cep63, et induit la désorganisation du centrosome, avec l'apparition de foci surnuméraires de Centrine ne correspondant pas à des centrioles et colocalisant avec Cep63 en périphérie des centrioles.

La proximité entre les observations de ces auteurs et les nôtres est fascinante, et si elle n'apporte pas directement de nouveaux éléments de compréhension mécanistique, elle suggère qu'un

mécanisme commun pourrait être à l'œuvre, et étaye le fait que la désorganisation de Cep63 au centrosome peut effectivement conduire à d'autres altérations centrosomales.

Les auteurs montrent aussi que la désorganisation du centrosome qu'ils observent en présence de la protéine virale NS3 diminue le recrutement centrosomal de la kinase TBK1, qui est impliquée dans la réponse immunitaire innée à l'infection. Il serait très intéressant d'étudier si des mécanismes similaires permettent également de moduler la réponse immunitaire innée à l'infection par HTLV-1.

2. Comparaison avec les altérations du centrosome induites par le virus HBV

Le virus de l'hépatite B (HBV) est responsable du développement d'hépatocarcinomes. L'infection par ce virus a également été associée à des altérations centrosomales et des anomalies mitotiques (Forgues *et al.*, 2003; Yun *et al.*, 2004).

De façon intéressante, une étude récente a permis de mieux caractériser ces altérations centrosomales, et implique la protéine TAX1BP2 (Li *et al.*, 2020). Les auteurs montrent que la protéine virale HBx induit une déstructuration des centrioles, au niveau de la structure même des microtubules. Ils décrivent des altérations du matériel péricentriolaire, décrit comme étant plus lâche, des centrioles raccourcis et fragmentés, l'absence de « cartwheel » apparent, et des faisceaux de microtubules anormaux, ainsi qu'une amplification centrosomale (décrite en se basant sur les marqueurs PCNT et γ -tubuline). Les auteurs montrent que la protéine TAX1BP2 agit comme un inhibiteur de ces altérations du centrosome induites par HBx. TAX1BP2 est un homologue des protéines du « linker » centrosomal C-NAP-1 et Rootletin, et localise au niveau de la région du « linker » entre les centrioles, à l'extrémité proximale des centrioles. Les auteurs montrent que la surexpression de TAX1BP2 réduit la dynamique des microtubules induite par HBx et inhibe l'amplification centrosomale.

Dans cette étude, les auteurs n'étudient pas la protéine Cep63. Néanmoins, il est intéressant de constater qu'ils observent une déstructuration des centrioles et du matériel péricentriolaire. Bien que la résolution de nos observations ne nous ait pas permis de faire ce constat, il semble possible que la désorganisation que nous observons en microscopie à fluorescence corresponde au même genre d'altérations structurelles.

Il est très intéressant de noter que les auteurs identifient dans cette étude TAX1BP2. En effet, TAX1BP2 a également été identifiée comme un inhibiteur de la sur-duplication centrosomale ciblé par Tax (Ching *et al.*, 2006). On peut donc se demander si l'inhibition de TAX1BP2 induite par Tax pourrait également participer au fait de rendre les cellules permissives à la dispersion de Cep63 et aux altérations des autres marqueurs, pouvant correspondre à une déstructuration, que nous observons

dans notre étude. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions cotransfecter la protéine TAX1BP2 avec Tax, et déterminer si cette surexpression de TAX1BP2 limite la dispersion de Cep63.

D. Quelle est l'importance des altérations surnuméraires de Cep63, et comment sont-elles induites ?

Une autre question intéressante est celle du lien entre l'induction par Tax d'une dispersion et d'altérations surnuméraires de Cep63.

En effet, nous avons observé que Tax et tous ses mutants que nous avons étudiés induisent des altérations surnuméraires de Cep63. Leur formation ne semble donc nécessiter ni l'interaction avec Tax, ni l'activation de la voie NF- κ B.

Ces altérations semblent corrélées partiellement à des altérations d'autres marqueurs centrosomaux, ce qui suggère qu'il peut parfois s'agir d'une amplification centrosomale totale, mais pas systématiquement. Il est possible que ces spots surnuméraires correspondent parfois à des centrosomes surnuméraires complets, induits par exemple par l'activation de CDK2, comme suggéré précédemment (Nitta *et al.*, 2006). Dans d'autres cas, en l'absence d'association avec d'autres marqueurs centrosomaux, il pourrait s'agir d'agrégats de Cep63 délocalisés depuis le centrosome, par exemple en lien avec les dommages à l'ADN induits par Tax (voir page 43), qui pourraient alors activer les kinases ATM / ATR qui phosphorylent Cep63 et induisent sa délocalisation du centrosome (Smith *et al.*, 2009). Cependant, comme le phénotype de Cep63 induit par des dommages modérés dans des cellules humaines n'a à notre connaissance pas été décrit, il est difficile de savoir si la localisation de Cep63 en spots surnuméraires serait cohérente avec cette hypothèse.

Dans le cas de spots surnuméraires de Cep63 non associés à d'autres protéines centrosomales, ces altérations sont moins susceptibles de conduire à des anomalies du fuseau mitotique et de favoriser l'instabilité génomique, puisque des spots de Cep63 sans recrutement de matériel péricentriolaire sont peu susceptibles de nucléer des pôles du fuseau mitotique.

III – Vers une compréhension plus globale des mécanismes d'oncogenèse induits par la protéine Tax d'HTLV-1

Ces travaux permettent d'apporter de nouveaux éléments de compréhension aux mécanismes d'oncogenèse induits par la protéine Tax d'HTLV-1. Néanmoins, il est intéressant de se demander comment les altérations centrosomales que nous décrivons s'ancrent dans celui-ci, en lien avec les autres mécanismes décrits et les connaissances actuelles de l'évolution de l'oncogenèse associée à HTLV-1.

D'abord, une question récurrente lors de l'étude de l'oncogenèse en lien avec les altérations centrosomales est de savoir si ces altérations centrosomales ont un rôle causal dans l'aneuploïdie et l'oncogenèse, ou si elles en sont plutôt une conséquence qui peut dans un second temps accélérer l'oncogenèse. Il est extrêmement difficile de trancher cette question, de façon générale ou dans ce cas précis, mais différents arguments peuvent être considérés. D'abord, afin de pouvoir jouer un rôle de promoteur de l'aneuploïdie, les altérations centrosomales doivent d'abord être associées au passage de la mitose avec une survie de la cellule. En effet, de nombreux mécanismes de checkpoint du fuseau mitotique et d'éventuels dommages à l'ADN subséquents existent, et conduisent à un arrêt du cycle cellulaire, éventuellement suivi de l'apoptose si l'anomalie n'est pas corrigée. Dans le cas de l'infection par HTLV-1, la plupart de ces mécanismes de contrôle sont ciblés et inhibés par des protéines virales, en particulier la protéine Tax. Par conséquent, on peut imaginer que des cellules infectées par HTLV-1 pourraient survivre plus facilement aux conséquences des altérations centrosomales, favorisant ainsi la mise en place de l'aneuploïdie. De plus, nous avons montré, comme d'autres études dont nous avons discuté page 58, que la protéine Tax d'HTLV-1 était capable d'induire des altérations centrosomales de façon extrêmement rapide, en un ou deux cycles cellulaires seulement. Cette observation laisse penser qu'il serait possible que lors de l'infection, Tax joue ce rôle de façon très précoce, bien que les délais impliqués soient potentiellement plus longs *in vivo* que dans nos expériences *in vitro*. Cependant, le développement de l'ATL survient des années après l'infection chez les patient-es. Malheureusement, il n'existe à ce jour pas d'étude du centrosome dans des cellules de patient-es asymptomatiques. Ce genre d'étude permettrait de mieux comprendre la place des altérations centrosomales dans la chronologie du développement de l'oncogenèse.

La persistance virale est permise par la multitude de voies de signalisation et de mécanismes cellulaires perturbés par les protéines virales, qui permettent l'activation de la prolifération et de la survie cellulaire des cellules infectées tout en limitant l'expression virale. En interaction avec ces différents processus, les altérations centrosomales induites par la protéine Tax d'HTLV-1 jouent certainement un rôle important dans le passage d'une infection asymptomatique au développement de la leucémie associée, en favorisant l'aneuploïdie et la transformation cellulaire.

CONCLUSION

Lors de cette thèse, nous avons étudié le rôle de l'interaction entre la protéine Tax du rétrovirus HTLV-1 et la protéine centrosomale Cep63, nouvellement identifiée au sein de l'équipe, dans l'induction d'altérations centrosomales par Tax.

Ces travaux ont permis de mettre en évidence que Tax induisait l'altération de la localisation de Cep63, avec une fréquente dispersion de Cep63 du centrosome vers la région péri-centrosomale. Nos résultats suggèrent que la dispersion de Cep63 du centrosome dépend de son interaction directe avec Tax. De façon importante, cette dispersion de Cep63 est associée à des altérations du marqueur centriolaire Centrine et du marqueur du matériel péricentriolaire PCNT, ce qui suggère un rôle important de la protéine Cep63 dans l'induction d'altération de la structure et de la fonction du centrosome dans son ensemble.

Nous avons cherché à caractériser l'impact de ces altérations centrosomales en mitose en utilisant la technique de cytométrie d'image. Bien que cette technique ne nous ait pas permis d'arriver à des conclusions fortes, nos résultats suggèrent qu'il est possible que la protéine Tax induise une fragmentation du matériel péricentriolaire en mitose. Néanmoins, cette hypothèse devra être confirmée.

Ces résultats apportent de nouveaux éléments de compréhension des mécanismes d'induction d'altérations centrosomales par le rétrovirus HTLV-1. La compréhension de ces mécanismes est cruciale car ces altérations centrosomales contribuent probablement à la transformation des cellules infectées en cellules tumorales et donc au développement de l'ATL, une pathologie extrêmement grave et encore mal comprise.

Il sera également intéressant de comparer les mécanismes d'altérations centrosomales induites dans le cadre de l'infection par HTLV-1 avec ceux d'autres virus, notamment des virus oncogènes. Cela permettra potentiellement d'identifier des mécanismes ciblés de manière commune. Une étude est en cours, en collaboration avec d'autres équipes travaillant sur les virus HPV-16 et EBV. Ces virus codent chacun pour une protéine associée au centrosome, comme la protéine Tax pour HTLV-1. Cette étude comparera les interactomes de Tax et de ces protéines, BNRF1 pour EBV et E7 pour d'HPV-16 par biotinylation de proximité. Cela apportera une meilleure compréhension des mécanismes d'oncogenèse induits par les virus oncogènes.

Références bibliographiques

- Afonso, P.V. *et al.* (2008) 'Alteration of blood-brain barrier integrity by retroviral infection', *PLoS pathogens*, 4(11), p. e1000205. doi:10.1371/journal.ppat.1000205.
- Afonso, P.V., Cassar, O. and Gessain, A. (2019) 'Molecular epidemiology, genetic variability and evolution of HTLV-1 with special emphasis on African genotypes', *Retrovirology*, 16(1), p. 39. doi:10.1186/s12977-019-0504-z.
- Akagi, T., Ono, H. and Shimotohno, K. (1996) 'Expression of cell-cycle regulatory genes in HTLV-I infected T-cell lines: possible involvement of Tax1 in the altered expression of cyclin D2, p18Ink4 and p21Waf1/Cip1/Sdi1', *Oncogene*, 12(8), pp. 1645–1652.
- Andersen, J.S. *et al.* (2003) 'Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling', *Nature*, 426(6966), pp. 570–574. doi:10.1038/nature02166.
- Anderson, M.G. *et al.* (2000) 'Identification of poly(ADP-ribose) polymerase as a transcriptional coactivator of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein', *Journal of Virology*, 74(5), pp. 2169–2177. doi:10.1128/jvi.74.5.2169-2177.2000.
- Andresen, V. *et al.* (2011) 'Suppression of HTLV-1 replication by Tax-mediated rerouting of the p13 viral protein to nuclear speckles', *Blood*, 118(6), pp. 1549–1559. doi:10.1182/blood-2010-06-293340.
- Araujo, A. *et al.* (2021) 'Management of HAM/TSP: Systematic Review and Consensus-based Recommendations 2019', *Neurology. Clinical Practice*, 11(1), pp. 49–56. doi:10.1212/CPJ.0000000000000832.
- Ariumi, Y. *et al.* (2000) 'HTLV-1 tax oncoprotein represses the p53-mediated trans-activation function through coactivator CBP sequestration', *Oncogene*, 19(12), pp. 1491–1499. doi:10.1038/sj.onc.1203450.
- Arquint, C., Gabryjonczyk, A.-M. and Nigg, E.A. (2014) 'Centrosomes as signalling centres', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1650), p. 20130464. doi:10.1098/rstb.2013.0464.
- Aziz, K. *et al.* (2018) 'Mosaic-variegated aneuploidy syndrome mutation or haploinsufficiency in Cep57 impairs tumor suppression', *The Journal of Clinical Investigation*, 128(8), pp. 3517–3534. doi:10.1172/JCI120316.
- Bahe, S. *et al.* (2005) 'Rootletin forms centriole-associated filaments and functions in centrosome cohesion', *Journal of Cell Biology*, 171(1), pp. 27–33. doi:10.1083/jcb.200504107.
- Ballard, D.W. *et al.* (1988) 'HTLV-I tax induces cellular proteins that activate the kappa B element in the IL-2 receptor alpha gene', *Science (New York, N.Y.)*, 241(4873), pp. 1652–1655. doi:10.1126/science.241.4873.1652.
- Baltimore, D. (1970) 'RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses', *Nature*, 226(5252), pp. 1209–1211. doi:10.1038/2261209a0.
- Basto, R. *et al.* (2008) 'Centrosome Amplification Can Initiate Tumorigenesis in Flies', *Cell*, 133(6), pp. 1032–1042. doi:10.1016/j.cell.2008.05.039.

- Beimling, P. and Moelling, K. (1992) 'Direct interaction of CREB protein with 21 bp Tax-response elements of HTLV-ILTR', *Oncogene*, 7(2), pp. 257–262.
- Belgnaoui, S.M. *et al.* (2010) 'The Viral Oncoprotein Tax Sequesters DNA Damage Response Factors by Tethering MDC1 to Chromatin*', *Journal of Biological Chemistry*, 285(43), pp. 32897–32905. doi:10.1074/jbc.M110.146373.
- Bex, F. *et al.* (1999) 'Phosphorylation of the human T-cell leukemia virus type 1 transactivator tax on adjacent serine residues is critical for tax activation', *Journal of Virology*, 73(1), pp. 738–745. doi:10.1128/JVI.73.1.738-745.1999.
- 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 Research*, 2, p. 87. doi:10.12688/wellcomeopenres.12469.2.
- Birbach, A. *et al.* (2002) 'Signaling molecules of the NF-kappa B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus', *The Journal of Biological Chemistry*, 277(13), pp. 10842–10851. doi:10.1074/jbc.M112475200.
- Bobinnec, Y. *et al.* (1998) 'Centriole disassembly in vivo and its effect on centrosome structure and function in vertebrate cells', *The Journal of Cell Biology*, 143(6), pp. 1575–1589. doi:10.1083/jcb.143.6.1575.
- Bonnet, A. *et al.* (2012) 'Low nuclear body formation and tax SUMOylation do not prevent NF-kappaB promoter activation', *Retrovirology*, 9, p. 77. doi:10.1186/1742-4690-9-77.
- Boveri, T. (2008) 'Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris', *Journal of Cell Science*, 121 Suppl 1, pp. 1–84. doi:10.1242/jcs.025742.
- Brown, N.J. *et al.* (2013) 'Cep63 and cep152 cooperate to ensure centriole duplication', *PloS One*, 8(7), p. e69986. doi:10.1371/journal.pone.0069986.
- Buim, M.E. *et al.* (2005) 'The Transcripts of SFRP1, CEP63 and EIF4G2 Genes Are Frequently Downregulated in Transitional Cell Carcinomas of the Bladder', *Oncology*, 69(6), pp. 445–454. doi:10.1159/000090984.
- Cai, Z. *et al.* (2021) 'Copy Number Variations of CEP63, FOSL2 and PAQR6 Serve as Novel Signatures for the Prognosis of Bladder Cancer', *Frontiers in Oncology*, 11, p. 674933. doi:10.3389/fonc.2021.674933.
- Caron, C. *et al.* (1993) 'Functional and biochemical interaction of the HTLV-I Tax1 transactivator with TBP', *The EMBO journal*, 12(11), pp. 4269–4278.
- de Castro-Amarante, M.F. *et al.* (2015) 'Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Infection of the Three Monocyte Subsets Contributes to Viral Burden in Humans', *Journal of Virology*, 90(5), pp. 2195–2207. doi:10.1128/JVI.02735-15.
- Cavrois, M. *et al.* (1996) 'Proliferation of HTLV-1 infected circulating cells in vivo in all asymptomatic carriers and patients with TSP/HAM', *Oncogene*, 12(11), pp. 2419–2423.

- Chiari, E. *et al.* (2004) 'Stable ubiquitination of human T-cell leukemia virus type 1 tax is required for proteasome binding', *Journal of Virology*, 78(21), pp. 11823–11832. doi:10.1128/JVI.78.21.11823-11832.2004.
- Ching, Y.-P. *et al.* (2004) 'Specific TATAA and bZIP requirements suggest that HTLV-I Tax has transcriptional activity subsequent to the assembly of an initiation complex', *Retrovirology*, 1, p. 18. doi:10.1186/1742-4690-1-18.
- Ching, Y.-P. *et al.* (2006) 'The retroviral oncoprotein Tax targets the coiled-coil centrosomal protein TAX1BP2 to induce centrosome overduplication', *Nature Cell Biology*, 8(7), pp. 717–724. doi:10.1038/ncb1432.
- Chlichlia, K. *et al.* (1995) 'Immediate effects of reversible HTLV-1 tax function: T-cell activation and apoptosis', *Oncogene*, 10(2), pp. 269–277.
- Cho, W.-K. *et al.* (2007) 'Modulation of the Brd4/P-TEFb interaction by the human T-lymphotropic virus type 1 tax protein', *Journal of Virology*, 81(20), pp. 11179–11186. doi:10.1128/JVI.00408-07.
- Cizmecioglu, O. *et al.* (2010) 'Cep152 acts as a scaffold for recruitment of Plk4 and CPAP to the centrosome', *Journal of Cell Biology*, 191(4), pp. 731–739. doi:10.1083/jcb.201007107.
- Clemens, K.E. *et al.* (1996) 'Interaction of the human T-cell lymphotropic virus type 1 tax transactivator with transcription factor IIA', *Molecular and Cellular Biology*, 16(9), pp. 4656–4664. doi:10.1128/MCB.16.9.4656.
- Clerc, I. *et al.* (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', *The Journal of Biological Chemistry*, 283(35), pp. 23903–23913. doi:10.1074/jbc.M803116200.
- Coskun, A.K. and Sutton, R.E. (2005) 'Expression of glucose transporter 1 confers susceptibility to human T-cell leukemia virus envelope-mediated fusion', *Journal of Virology*, 79(7), pp. 4150–4158. doi:10.1128/JVI.79.7.4150-4158.2005.
- Cunha-Ferreira, I. *et al.* (2009) 'The SCF/Slimb Ubiquitin Ligase Limits Centrosome Amplification through Degradation of SAK/PLK4', *Current Biology*, 19(1), pp. 43–49. doi:10.1016/j.cub.2008.11.037.
- Cuomo, M.E. *et al.* (2008) 'p53-Driven apoptosis limits centrosome amplification and genomic instability downstream of NPM1 phosphorylation', *Nature Cell Biology*, 10(6), pp. 723–730. doi:10.1038/ncb1735.
- De Souza, C.P., Ellem, K.A. and Gabrielli, B.G. (2000) 'Centrosomal and cytoplasmic Cdc2/cyclin B1 activation precedes nuclear mitotic events', *Experimental Cell Research*, 257(1), pp. 11–21. doi:10.1006/excr.2000.4872.
- Di Fiore, B. *et al.* (2003) 'Mammalian RanBP1 regulates centrosome cohesion during mitosis', *Journal of Cell Science*, 116(Pt 16), pp. 3399–3411. doi:10.1242/jcs.00624.
- Diaz-Rodríguez, E. *et al.* (2008) 'Hec1 overexpression hyperactivates the mitotic checkpoint and induces tumor formation in vivo', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(43), pp. 16719–16724. doi:10.1073/pnas.0803504105.

- Dobles, M. *et al.* (2000) 'Chromosome Missegregation and Apoptosis in Mice Lacking the Mitotic Checkpoint Protein Mad2', *Cell*, 101(6), pp. 635–645. doi:10.1016/S0092-8674(00)80875-2.
- Ducasa, N. *et al.* (2021) 'Autophagy in Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) Induced Leukemia', *Frontiers in Oncology*, 11, p. 641269. doi:10.3389/fonc.2021.641269.
- Edwards, D. *et al.* (2011) 'Orf-I and orf-II-encoded proteins in HTLV-1 infection and persistence', *Viruses*, 3(6), pp. 861–885. doi:10.3390/v3060861.
- Einarsdottir, E. *et al.* (2015) 'Mutation in CEP63 co-segregating with developmental dyslexia in a Swedish family', *Human Genetics*, 134(11–12), pp. 1239–1248. doi:10.1007/s00439-015-1602-1.
- Einsiedel, L. *et al.* (2021) 'Very high prevalence of infection with the human T cell leukaemia virus type 1c in remote Australian Aboriginal communities: Results of a large cross-sectional community survey', *PLoS neglected tropical diseases*, 15(12), p. e0009915. doi:10.1371/journal.pntd.0009915.
- Emanuele, M.J. and Stukenberg, P.T. (2007) 'Xenopus Cep57 Is a Novel Kinetochore Component Involved in Microtubule Attachment', *Cell*, 130(5), pp. 893–905. doi:10.1016/j.cell.2007.07.023.
- Farina, F. *et al.* (2016) 'The centrosome is an actin-organizing centre', *Nature Cell Biology*, 18(1), pp. 65–75. doi:10.1038/ncb3285.
- Firat-Karalar, E.N. *et al.* (2014) 'Proximity Interactions among Centrosome Components Identify Regulators of Centriole Duplication', *Current Biology*, 24(6), pp. 664–670. doi:10.1016/j.cub.2014.01.067.
- Fochi, S. *et al.* (2019) 'NF- κ B and MicroRNA Deregulation Mediated by HTLV-1 Tax and HBZ', *Pathogens*, 8(4), p. 290. doi:10.3390/pathogens8040290.
- Forgues, M. *et al.* (2003) 'Involvement of Crm1 in Hepatitis B Virus X Protein-Induced Aberrant Centriole Replication and Abnormal Mitotic Spindles', *Molecular and Cellular Biology*, 23(15), pp. 5282–5292. doi:10.1128/MCB.23.15.5282-5292.2003.
- Fraedrich, K., Müller, B. and Grassmann, R. (2005) 'The HTLV-1 Tax protein binding domain of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) includes the regulatory PSTAIRE helix', *Retrovirology*, 2, p. 54. doi:10.1186/1742-4690-2-54.
- Fujiwara, T. *et al.* (2005) 'Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells', *Nature*, 437(7061), pp. 1043–1047. doi:10.1038/nature04217.
- Gabet, A.-S. *et al.* (2003) 'Inactivation of hTERT transcription by Tax', *Oncogene*, 22(24), pp. 3734–3741. doi:10.1038/sj.onc.1206468.
- Gallo, R.C. *et al.* (1978) 'Isolation and tissue distribution of type-C virus and viral components from a gibbon ape (*Hylobates lar*) with lymphocytic leukemia', *Virology*, 84(2), pp. 359–373. doi:10.1016/0042-6822(78)90255-6.
- Ganem, N.J. *et al.* (2014) 'Cytokinesis failure triggers hippo tumor suppressor pathway activation', *Cell*, 158(4), pp. 833–848. doi:10.1016/j.cell.2014.06.029.

- Ganem, N.J., Godinho, S.A. and Pellman, D. (2009) 'A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability', *Nature*, 460(7252), pp. 278–282. doi:10.1038/nature08136.
- Gaudray, G. *et al.* (2002) 'The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription', *Journal of Virology*, 76(24), pp. 12813–12822. doi:10.1128/jvi.76.24.12813-12822.2002.
- Geleziunas, R. *et al.* (1998) 'Human T-cell leukemia virus type 1 Tax induction of NF-kappaB involves activation of the IkappaB kinase alpha (IKKalpha) and IKKbeta cellular kinases', *Molecular and Cellular Biology*, 18(9), pp. 5157–5165. doi:10.1128/MCB.18.9.5157.
- Gemble, S. *et al.* (2022) 'Genetic instability from a single S phase after whole-genome duplication', *Nature*, 604(7904), pp. 146–151. doi:10.1038/s41586-022-04578-4.
- Gessain, A. and Cassar, O. (2012) 'Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection', *Frontiers in Microbiology*, 3, p. 388. doi:10.3389/fmicb.2012.00388.
- Gessain, A. and Mahieux, R. (2012) 'Tropical spastic paraparesis and HTLV-1 associated myelopathy: Clinical, epidemiological, virological and therapeutic aspects', *Revue Neurologique*, 168(3), pp. 257–269. doi:10.1016/j.neurol.2011.12.006.
- Ghez, D. *et al.* (2006) 'Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry', *Journal of Virology*, 80(14), pp. 6844–6854. doi:10.1128/JVI.02719-05.
- Giam, C.Z. and Xu, Y.L. (1989) 'HTLV-I tax gene product activates transcription via pre-existing cellular factors and cAMP responsive element', *The Journal of Biological Chemistry*, 264(26), pp. 15236–15241.
- Gillet, N.A. *et al.* (2011) 'The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1-infected T-cell clones', *Blood*, 117(11), pp. 3113–3122. doi:10.1182/blood-2010-10-312926.
- Goupil, A. *et al.* (2020) 'Chromosomes function as a barrier to mitotic spindle bipolarity in polyploid cells', *The Journal of Cell Biology*, 219(4), p. e201908006. doi:10.1083/jcb.201908006.
- Gout, O. *et al.* (1990) 'Rapid development of myelopathy after HTLV-I infection acquired by transfusion during cardiac transplantation', *The New England Journal of Medicine*, 322(6), pp. 383–388. doi:10.1056/NEJM199002083220607.
- Greenan, G.A. *et al.* (2018) 'Insights into centriole geometry revealed by cryotomography of doublet and triplet centrioles', *eLife*. Edited by J.W. Raff and A. Akhmanova, 7, p. e36851. doi:10.7554/eLife.36851.
- Gröne, M., Koch, C. and Grassmann, R. (1996) 'The HTLV-1 Rex protein induces nuclear accumulation of unspliced viral RNA by avoiding intron excision and degradation', *Virology*, 218(2), pp. 316–325. doi:10.1006/viro.1996.0200.
- Gross, C. and Thoma-Kress, A.K. (2016) 'Molecular Mechanisms of HTLV-1 Cell-to-Cell Transmission', *Viruses*, 8(3), p. 74. doi:10.3390/v8030074.
- Groussaud, D. *et al.* (2017) 'Hijacking of the O-GlcNAcZYME complex by the HTLV-1 Tax oncoprotein facilitates viral transcription', *PLoS pathogens*, 13(7), p. e1006518. doi:10.1371/journal.ppat.1006518.

- Guichard, P. *et al.* (2010) 'Procentriole assembly revealed by cryo-electron tomography', *The EMBO journal*, 29(9), pp. 1565–1572. doi:10.1038/emboj.2010.45.
- Guichard, P. *et al.* (2012) 'Cartwheel Architecture of Trichonympha Basal Body', *Science*, 337(6094), pp. 553–553. doi:10.1126/science.1222789.
- Guichard, P. *et al.* (2013) 'Native Architecture of the Centriole Proximal Region Reveals Features Underlying Its 9-Fold Radial Symmetry', *Current Biology*, 23(17), pp. 1620–1628. doi:10.1016/j.cub.2013.06.061.
- Guichard, P. *et al.* (2017) 'Cell-free reconstitution reveals centriole cartwheel assembly mechanisms', *Nature Communications*, 8(1), p. 14813. doi:10.1038/ncomms14813.
- Gupta, G.D. *et al.* (2015) 'A Dynamic Protein Interaction Landscape of the Human Centrosome-Cilium Interface', *Cell*, 163(6), pp. 1484–1499. doi:10.1016/j.cell.2015.10.065.
- Gurkaslar, H.K. *et al.* (2020) 'CCDC57 Cooperates with Microtubules and Microcephaly Protein CEP63 and Regulates Centriole Duplication and Mitotic Progression', *Cell Reports*, 31(6), p. 107630. doi:10.1016/j.celrep.2020.107630.
- Haller, K. *et al.* (2002) 'Physical interaction of human T-cell leukemia virus type 1 Tax with cyclin-dependent kinase 4 stimulates the phosphorylation of retinoblastoma protein', *Molecular and Cellular Biology*, 22(10), pp. 3327–3338. doi:10.1128/MCB.22.10.3327-3338.2002.
- Hanon, E. *et al.* (2000) 'Fratricide among CD8(+) T lymphocytes naturally infected with human T cell lymphotropic virus type I', *Immunity*, 13(5), pp. 657–664. doi:10.1016/s1074-7613(00)00065-0.
- Haoudi, A. and Semmes, O.J. (2003) 'The HTLV-1 tax oncoprotein attenuates DNA damage induced G1 arrest and enhances apoptosis in p53 null cells', *Virology*, 305(2), pp. 229–239. doi:10.1006/viro.2002.1642.
- Harashima, N. *et al.* (2004) 'Graft-versus-Tax response in adult T-cell leukemia patients after hematopoietic stem cell transplantation', *Cancer Research*, 64(1), pp. 391–399. doi:10.1158/0008-5472.can-03-1452.
- Haren, L., Stearns, T. and Lüders, J. (2009) 'Plk1-dependent recruitment of gamma-tubulin complexes to mitotic centrosomes involves multiple PCM components', *PLoS One*, 4(6), p. e5976. doi:10.1371/journal.pone.0005976.
- Harrod, R. *et al.* (1998) 'An exposed KID-like domain in human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax is responsible for the recruitment of coactivators CBP/p300', *Molecular and Cellular Biology*, 18(9), pp. 5052–5061. doi:10.1128/MCB.18.9.5052.
- Hatano, T. and Sluder, G. (2012) 'The interrelationship between APC/C and Plk1 activities in centriole disengagement', *Biology Open*, 1(11), pp. 1153–1160. doi:10.1242/bio.20122626.
- Hatch, E.M. *et al.* (2010) 'Cep152 interacts with Plk4 and is required for centriole duplication', *Journal of Cell Biology*, 191(4), pp. 721–729. doi:10.1083/jcb.201006049.
- Hilbert, M. *et al.* (2016) 'SAS-6 engineering reveals interdependence between cartwheel and microtubules in determining centriole architecture', *Nature Cell Biology*, 18(4), pp. 393–403. doi:10.1038/ncb3329.

- Hinchcliffe, E.H. *et al.* (1999) 'Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts', *Science (New York, N.Y.)*, 283(5403), pp. 851–854. doi:10.1126/science.283.5403.851.
- Hino, S. *et al.* (1985) 'Mother-to-child transmission of human T-cell leukemia virus type-I', *Japanese Journal of Cancer Research: Gann*, 76(6), pp. 474–480.
- Hino, S. (1989) 'ATL Development after Adult Infection of HTLV-1?', *Japanese Journal of Cancer Research*, 80(10), pp. 1016–1016. doi:10.1111/j.1349-7006.1989.tb01643.x.
- Hino, S. (2011) 'Establishment of the milk-borne transmission as a key factor for the peculiar endemicity of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): the ATL Prevention Program Nagasaki', *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 87(4), pp. 152–166. doi:10.2183/pjab.87.152.
- Hinz, M. and Scheidereit, C. (2014) 'The I κ B kinase complex in NF- κ B regulation and beyond', *EMBO Reports*, 15(1), pp. 46–61. doi:10.1002/embr.201337983.
- Hishizawa, M. *et al.* (2004) 'Depletion and impaired interferon-alpha-producing capacity of blood plasmacytoid dendritic cells in human T-cell leukaemia virus type I-infected individuals', *British Journal of Haematology*, 125(5), pp. 568–575. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.04956.x.
- Ho, Y.-K. *et al.* (2015) 'HTLV-1 Tax Stimulates Ubiquitin E3 Ligase, Ring Finger Protein 8, to Assemble Lysine 63-Linked Polyubiquitin Chains for TAK1 and IKK Activation', *PLoS pathogens*, 11(8), p. e1005102. doi:10.1371/journal.ppat.1005102.
- Holdgaard, S.G. *et al.* (2019) 'Selective autophagy maintains centrosome integrity and accurate mitosis by turnover of centriolar satellites', *Nature Communications*, 10(1), p. 4176. doi:10.1038/s41467-019-12094-9.
- Holland, A.J. *et al.* (2010) 'Polo-like kinase 4 kinase activity limits centrosome overduplication by autoregulating its own stability', *Journal of Cell Biology*, 188(2), pp. 191–198. doi:10.1083/jcb.200911102.
- Holland, A.J. *et al.* (2012) 'The autoregulated instability of Polo-like kinase 4 limits centrosome duplication to once per cell cycle', *Genes & Development*, 26(24), pp. 2684–2689. doi:10.1101/gad.207027.112.
- Hori, A. and Toda, T. (2017) 'Regulation of centriolar satellite integrity and its physiology', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(2), pp. 213–229. doi:10.1007/s00018-016-2315-x.
- Huang, J. *et al.* (2009) 'HTLV-1 Tax is a critical lipid raft modulator that hijacks I κ B kinases to the microdomains for persistent activation of NF- κ B', *The Journal of Biological Chemistry*, 284(10), pp. 6208–6217. doi:10.1074/jbc.M806390200.
- Hwang, H.-I., Ji, J.-H. and Jang, Y.-J. (2011) 'Phosphorylation of Ran-binding protein-1 by Polo-like kinase-1 is required for interaction with Ran and early mitotic progression', *The Journal of Biological Chemistry*, 286(38), pp. 33012–33020. doi:10.1074/jbc.M111.255620.
- Igakura, T. *et al.* (2003) 'Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton', *Science (New York, N.Y.)*, 299(5613), pp. 1713–1716. doi:10.1126/science.1080115.

- Ikezoe, T. *et al.* (2007) 'Longitudinal inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling by LY294002 and rapamycin induces growth arrest of adult T-cell leukemia cells', *Leukemia Research*, 31(5), pp. 673–682. doi:10.1016/j.leukres.2006.08.001.
- Imaizumi, Y. *et al.* (2020) 'Prognosis of patients with adult T-cell leukemia/lymphoma in Japan: A nationwide hospital-based study', *Cancer Science*, 111(12), pp. 4567–4580. doi:10.1111/cas.14658.
- Inaba, S. *et al.* (1999) 'Efficacy of donor screening for HTLV-I and the natural history of transfusion-transmitted infection', *Transfusion*, 39(10), pp. 1104–1110. doi:10.1046/j.1537-2995.1999.39101104.x.
- Ito, K.K. *et al.* (2021) 'Cep57 and Cep57L1 maintain centriole engagement in interphase to ensure centriole duplication cycle', *The Journal of Cell Biology*, 220(3), p. e202005153. doi:10.1083/jcb.202005153.
- Iwanaga, M., Watanabe, T. and Yamaguchi, K. (2012) 'Adult T-Cell Leukemia: A Review of Epidemiological Evidence', *Frontiers in Microbiology*, 3. Available at: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00322> (Accessed: 7 April 2022).
- Iwanaga, R. *et al.* (2001) 'Molecular mechanism of cell cycle progression induced by the oncogene product Tax of human T-cell leukemia virus type I', *Oncogene*, 20(17), pp. 2055–2067. doi:10.1038/sj.onc.1204304.
- Iwanaga, R. *et al.* (2008) 'Activation of the cyclin D2 and cdk6 genes through NF-kappaB is critical for cell-cycle progression induced by HTLV-I Tax', *Oncogene*, 27(42), pp. 5635–5642. doi:10.1038/onc.2008.174.
- Janke, C. (2014) 'The tubulin code: Molecular components, readout mechanisms, and functions', *Journal of Cell Biology*, 206(4), pp. 461–472. doi:10.1083/jcb.201406055.
- Jarrett, W. *et al.* (1973) 'Horizontal Transmission of Leukemia Virus and Leukemia in the Cat', *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 51(3), pp. 833–841. doi:10.1093/jnci/51.3.833.
- Jarrett, W.F.H. *et al.* (1964) 'Leukæmia in the Cat: A Virus-like Particle associated with Leukæmia (Lymphosarcoma)', *Nature*, 202(4932), pp. 567–568. doi:10.1038/202567a0.
- Jiang, K.T. *et al.* (1990) 'HTLV-I trans-activator protein, tax, is a trans-repressor of the human beta-polymerase gene', *Science (New York, N.Y.)*, 247(4946), pp. 1082–1084. doi:10.1126/science.2309119.
- Jeong, S.-J. *et al.* (2005) 'Activated AKT regulates NF-kappaB activation, p53 inhibition and cell survival in HTLV-1-transformed cells', *Oncogene*, 24(44), pp. 6719–6728. doi:10.1038/sj.onc.1208825.
- Jögeda, E.-L. *et al.* (2016) 'Human T-lymphotropic virus types 1 and 2 are rare among intravenous drug users in Eastern Europe', *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 43, pp. 83–85. doi:10.1016/j.meegid.2016.05.022.
- Jones, K.S. *et al.* (2005) 'Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells', *Journal of Virology*, 79(20), pp. 12692–12702. doi:10.1128/JVI.79.20.12692-12702.2005.

- Jones, K.S. *et al.* (2006) 'Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 Use Different Receptor Complexes To Enter T Cells', *Journal of Virology*, 80(17), pp. 8291–8302. doi:10.1128/JVI.00389-06.
- Jones, K.S. *et al.* (2008) 'Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells', *Nature Medicine*, 14(4), pp. 429–436. doi:10.1038/nm1745.
- Journo, C. *et al.* (2009) 'NRP/Optineurin Cooperates with TAX1BP1 to potentiate the activation of NF-kappaB by human T-lymphotropic virus type 1 tax protein', *PLoS pathogens*, 5(7), p. e1000521. doi:10.1371/journal.ppat.1000521.
- Kajiyama, W. *et al.* (1986) 'Intrafamilial transmission of adult T cell leukemia virus', *The Journal of Infectious Diseases*, 154(5), pp. 851–857. doi:10.1093/infdis/154.5.851.
- Kao, S.Y. and Marriott, S.J. (1999) 'Disruption of nucleotide excision repair by the human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein', *Journal of Virology*, 73(5), pp. 4299–4304. doi:10.1128/JVI.73.5.4299-4304.1999.
- Kaplan, J.E. *et al.* (1990) 'The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I', *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 3(11), pp. 1096–1101.
- Kapoor, T. *et al.* (2000) 'Kapoor, T. M., Mayer, T. U., Coughlin, M. L. & Mitchison, T. J. Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J. Cell Biol.* 150, 975-988', *The Journal of cell biology*, 150, pp. 975–88. doi:10.1083/jcb.150.5.975.
- Karki, M., Keyhaninejad, N. and Shuster, C.B. (2017) 'Precocious centriole disengagement and centrosome fragmentation induced by mitotic delay', *Nature Communications*, 8, p. 15803. doi:10.1038/ncomms15803.
- Kataoka, K. *et al.* (2015) 'Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma', *Nature Genetics*, 47(11), pp. 1304–1315. doi:10.1038/ng.3415.
- Kawakami, T.G. *et al.* (1972) 'C-type virus associated with gibbon lymphosarcoma', *Nature: New Biology*, 235(58), pp. 170–171. doi:10.1038/newbio235170a0.
- Kchour, G. *et al.* (2013) 'The combination of arsenic, interferon-alpha, and zidovudine restores an "immunocompetent-like" cytokine expression profile in patients with adult T-cell leukemia lymphoma', *Retrovirology*, 10, p. 91. doi:10.1186/1742-4690-10-91.
- Kehn, K. *et al.* (2005) 'The HTLV-I Tax oncoprotein targets the retinoblastoma protein for proteasomal degradation', *Oncogene*, 24(4), pp. 525–540. doi:10.1038/sj.onc.1208105.
- Kesari, A.S. *et al.* (2020) 'Zika virus NS5 localizes at centrosomes during cell division', *Virology*, 541, pp. 52–62. doi:10.1016/j.virol.2019.11.018.
- Kfoury, Y. *et al.* (2008) 'Ubiquitylated Tax targets and binds the IKK signalosome at the centrosome', *Oncogene*, 27(12), pp. 1665–1676. doi:10.1038/sj.onc.1210804.
- Kfoury, Y. *et al.* (2011) 'Tax ubiquitylation and SUMOylation control the dynamic shuttling of Tax and NEMO between Ubc9 nuclear bodies and the centrosome', *Blood*, 117(1), pp. 190–199. doi:10.1182/blood-2010-05-285742.

- Kim, S.J. *et al.* (1990) 'Transactivation of the transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) gene by human T lymphotropic virus type 1 tax: a potential mechanism for the increased production of TGF-beta 1 in adult T cell leukemia', *The Journal of Experimental Medicine*, 172(1), pp. 121–129. doi:10.1084/jem.172.1.121.
- Kim, T.-S. *et al.* (2019) 'Molecular architecture of a cylindrical self-assembly at human centrosomes', *Nature Communications*, 10(1), p. 1151. doi:10.1038/s41467-019-08838-2.
- Kim, Y.-M. *et al.* (2010) 'The HTLV-1 tax protein cooperates with phosphorylated CREB, TORC2 and p300 to activate CRE-dependent cyclin D1 transcription', *Oncogene*, 29(14), pp. 2142–2152. doi:10.1038/onc.2009.498.
- Kinjo, T. *et al.* (2010) 'Induction of reactive oxygen species by human T-cell leukemia virus type 1 tax correlates with DNA damage and expression of cellular senescence marker', *Journal of Virology*, 84(10), pp. 5431–5437. doi:10.1128/JVI.02460-09.
- Kinoshita, K. *et al.* (1984) 'Demonstration of adult T-cell leukemia virus antigen in milk from three seropositive mothers', *Gan*, 75(2), pp. 103–105.
- Kitagawa, D. *et al.* (2011) 'Structural Basis of the 9-Fold Symmetry of Centrioles', *Cell*, 144(3), pp. 364–375. doi:10.1016/j.cell.2011.01.008.
- Klaver, B. and Berkhout, B. (1994) 'Comparison of 5' and 3' long terminal repeat promoter function in human immunodeficiency virus.', *Journal of Virology*, 68(6), pp. 3830–3840.
- Ko, M.A. *et al.* (2005) 'Plk4 haploinsufficiency causes mitotic infidelity and carcinogenesis', *Nature Genetics*, 37(8), pp. 883–888. doi:10.1038/ng1605.
- Kodani, A. *et al.* (2015) 'Centriolar satellites assemble centrosomal microcephaly proteins to recruit CDK2 and promote centriole duplication', *eLife*. Edited by W.J. Nelson, 4, p. e07519. doi:10.7554/eLife.07519.
- Kodani, A. *et al.* (2020) 'Zika virus alters centrosome organization to suppress the innate immune response', *bioRxiv*, p. 2020.09.15.298083. doi:10.1101/2020.09.15.298083.
- Kohlmaier, G. *et al.* (2009) 'Overly long centrioles and defective cell division upon excess of the SAS-4-related protein CPAP', *Current biology: CB*, 19(12), pp. 1012–1018. doi:10.1016/j.cub.2009.05.018.
- Koyanagi, Y. *et al.* (1993) 'In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells', *Virology*, 196(1), pp. 25–33. doi:10.1006/viro.1993.1451.
- Kratz, A.-S. *et al.* (2015) 'Plk4-dependent phosphorylation of STIL is required for centriole duplication', *Biology Open*, 4(3), pp. 370–377. doi:10.1242/bio.201411023.
- Kubo, A. *et al.* (1999) 'Centriolar satellites: molecular characterization, ATP-dependent movement toward centrioles and possible involvement in ciliogenesis', *The Journal of Cell Biology*, 147(5), pp. 969–980. doi:10.1083/jcb.147.5.969.
- Kumar, A. and Purohit, R. (2012) 'Computational investigation of pathogenic nsSNPs in CEP63 protein', *Gene*, 503(1), pp. 75–82. doi:10.1016/j.gene.2012.04.032.

- Kwon, M. *et al.* (2008) 'Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes', *Genes & Development*, 22(16), pp. 2189–2203. doi:10.1101/gad.1700908.
- Lacey, K.R., Jackson, P.K. and Stearns, T. (1999) 'Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(6), pp. 2817–2822. doi:10.1073/pnas.96.6.2817.
- Lai, W.-L. *et al.* (2012) 'The centrosomal protein Tax1 binding protein 2 is a novel tumor suppressor in hepatocellular carcinoma regulated by cyclin-dependent kinase 2', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 56(5), pp. 1770–1781. doi:10.1002/hep.25851.
- Lai, W.L., Hung, W.Y. and Ching, Y.P. (2014) 'The tumor suppressor, TAX1BP2, is a novel substrate of ATM kinase', *Oncogene*, 33(45), pp. 5303–5309. doi:10.1038/onc.2013.481.
- Lambert, S. *et al.* (2009) 'HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165', *Blood*, 113(21), pp. 5176–5185. doi:10.1182/blood-2008-04-150342.
- Lamsoul, I. *et al.* (2005) 'Exclusive ubiquitination and sumoylation on overlapping lysine residues mediate NF-kappaB activation by the human T-cell leukemia virus tax oncoprotein', *Molecular and Cellular Biology*, 25(23), pp. 10391–10406. doi:10.1128/MCB.25.23.10391-10406.2005.
- Lawo, S. *et al.* (2012) 'Subdiffraction imaging of centrosomes reveals higher-order organizational features of pericentriolar material', *Nature Cell Biology*, 14(11), pp. 1148–1158. doi:10.1038/ncb2591.
- Laydon, D.J. *et al.* (2020) 'The relative contributions of infectious and mitotic spread to HTLV-1 persistence', *PLoS computational biology*, 16(9), p. e1007470. doi:10.1371/journal.pcbi.1007470.
- Lee, K. and Rhee, K. (2012) 'Separase-dependent cleavage of pericentrin B is necessary and sufficient for centriole disengagement during mitosis', *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 11(13), pp. 2476–2485. doi:10.4161/cc.20878.
- Lehky, T.J. *et al.* (1995) 'Detection of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax RNA in the central nervous system of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by in situ hybridization', *Annals of Neurology*, 37(2), pp. 167–175. doi:10.1002/ana.410370206.
- Leizerman, I. *et al.* (2004) 'Differential effects of monastrol in two human cell lines', *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(16), pp. 2060–2070. doi:10.1007/s00018-004-4074-3.
- Lemasson, I. *et al.* (1998) 'Activation of E2F-mediated transcription by human T-cell leukemia virus type I Tax protein in a p16(INK4A)-negative T-cell line', *The Journal of Biological Chemistry*, 273(36), pp. 23598–23604. doi:10.1074/jbc.273.36.23598.
- Levine, M.S. *et al.* (2017) 'Centrosome Amplification Is Sufficient to Promote Spontaneous Tumorigenesis in Mammals', *Developmental Cell*, 40(3), pp. 313–322.e5. doi:10.1016/j.devcel.2016.12.022.
- Li, S.-K. *et al.* (2020) 'Centrosomal protein TAX1BP2 inhibits centrosome-microtubules aberrations induced by hepatitis B virus X oncoprotein', *Cancer Letters*, 492, pp. 147–161. doi:10.1016/j.canlet.2020.08.005.

- Lim, S. and Kaldis, P. (2013) 'Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation', *Development (Cambridge, England)*, 140(15), pp. 3079–3093. doi:10.1242/dev.091744.
- Lin, Y.-N. *et al.* (2013) 'CEP120 interacts with CPAP and positively regulates centriole elongation', *The Journal of Cell Biology*, 202(2), pp. 211–219. doi:10.1083/jcb.201212060.
- Liu, B. *et al.* (2005) 'HTLV-I Tax directly binds the Cdc20-associated anaphase-promoting complex and activates it ahead of schedule', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(1), pp. 63–68. doi:10.1073/pnas.0406424101.
- Liu, C. *et al.* (2021) 'Cep63 knockout inhibits the malignant phenotypes of papillary thyroid cancer cell line TPC-1', *Oncology Reports*, 46(3), p. 199. doi:10.3892/or.2021.8150.
- Liu, Y. *et al.* (2001) 'Phosphoinositide-3 kinase-PKB/Akt pathway activation is involved in fibroblast Rat-1 transformation by human T-cell leukemia virus type I tax', *Oncogene*, 20(20), pp. 2514–2526. doi:10.1038/sj.onc.1204364.
- Lodewick, J. *et al.* (2009) 'Acetylation of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein by p300 promotes activation of the NF-kappaB pathway', *Virology*, 386(1), pp. 68–78. doi:10.1016/j.virol.2008.12.043.
- Loffler, H. *et al.* (2011) 'Cep63 Recruits Cdk1 to the Centrosome: Implications for Regulation of Mitotic Entry, Centrosome Amplification, and Genome Maintenance', *Cancer Research*, 71(6), pp. 2129–2139. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2684.
- Loncarek, J., Hergert, P. and Khodjakov, A. (2010) 'Centriole reduplication during prolonged interphase requires procentriole maturation governed by Plk1', *Current biology: CB*, 20(14), pp. 1277–1282. doi:10.1016/j.cub.2010.05.050.
- Löschberger, A. *et al.* (2021) *Super-Resolution Imaging by Dual Iterative Structured Illumination Microscopy*. preprint. Biophysics. doi:10.1101/2021.05.12.443720.
- Lukinavičius, G. *et al.* (2013) 'Selective chemical crosslinking reveals a Cep57-Cep63-Cep152 centrosomal complex', *Current biology: CB*, 23(3), pp. 265–270. doi:10.1016/j.cub.2012.12.030.
- Mahgoub, M. *et al.* (2018) 'Sporadic on/off switching of HTLV-1 Tax expression is crucial to maintain the whole population of virus-induced leukemic cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(6), pp. E1269–E1278. doi:10.1073/pnas.1715724115.
- Mahjabeen, I. *et al.* (2021) 'Polymorphism in miRNA target sites of CEP-63 and CEP-152 ring complex influences expression of CEP genes and favors tumorigenesis in glioma', *Future Oncology (London, England)*, 17(25), pp. 3355–3372. doi:10.2217/fon-2020-1034.
- Majone, F. *et al.* (2005) 'Ku protein as a potential human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax target in clastogenic chromosomal instability of mammalian cells', *Retrovirology*, 2, p. 45. doi:10.1186/1742-4690-2-45.
- Majone, F., Semmes, O.J. and Jeang, K.T. (1993) 'Induction of micronuclei by HTLV-I Tax: a cellular assay for function', *Virology*, 193(1), pp. 456–459. doi:10.1006/viro.1993.1145.
- Malik, B. and Taylor, G.P. (2019) 'Can we reduce the incidence of adult T-cell leukaemia/lymphoma? Cost-effectiveness of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) antenatal screening in the

- United Kingdom', *British Journal of Haematology*, 184(6), pp. 1040–1043. doi:10.1111/bjh.15234.
- Manel, N. *et al.* (2003) 'The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV', *Cell*, 115(4), pp. 449–459. doi:10.1016/s0092-8674(03)00881-x.
- Manns, A. *et al.* (1992) 'A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion', *International Journal of Cancer*, 51(6), pp. 886–891. doi:10.1002/ijc.2910510609.
- Mansky, L.M. (2000) 'In vivo analysis of human T-cell leukemia virus type 1 reverse transcription accuracy', *Journal of Virology*, 74(20), pp. 9525–9531. doi:10.1128/jvi.74.20.9525-9531.2000.
- Marjanović, M. *et al.* (2015) 'CEP63 deficiency promotes p53-dependent microcephaly and reveals a role for the centrosome in meiotic recombination', *Nature Communications*, 6, p. 7676. doi:10.1038/ncomms8676.
- Marriott, S.J., Lemoine, F.J. and Jeang, K.-T. (2002) 'Damaged DNA and miscounted chromosomes: human T cell leukemia virus type I tax oncoprotein and genetic lesions in transformed cells', *Journal of Biomedical Science*, 9(4), pp. 292–298. doi:10.1007/BF02256583.
- Marteil, G. *et al.* (2018) 'Over-elongation of centrioles in cancer promotes centriole amplification and chromosome missegregation', *Nature Communications*, 9(1), p. 1258. doi:10.1038/s41467-018-03641-x.
- Martella, C. *et al.* (2020) 'Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Transactivator Tax Exploits the XPB Subunit of TFIIH during Viral Transcription', *Journal of Virology*, 94(8), pp. e02171-19. doi:10.1128/JVI.02171-19.
- Marthiens, V., Piel, M. and Basto, R. (2012) 'Never tear us apart – the importance of centrosome clustering', *Journal of Cell Science*, 125(14), pp. 3281–3292. doi:10.1242/jcs.094797.
- Martin, F., Taylor, G.P. and Jacobson, S. (2014) 'Inflammatory manifestations of HTLV-1 and their therapeutic options', *Expert Review of Clinical Immunology*, 10(11), pp. 1531–1546. doi:10.1586/1744666X.2014.966690.
- Martin, J.L. *et al.* (2016) 'Molecular Studies of HTLV-1 Replication: An Update', *Viruses*, 8(2), p. 31. doi:10.3390/v8020031.
- Matsuo, K. *et al.* (2012) 'Kendrin Is a Novel Substrate for Separase Involved in the Licensing of Centriole Duplication', *Current Biology*, 22(10), pp. 915–921. doi:10.1016/j.cub.2012.03.048.
- Matsuoka, M. (2005) 'Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL)', *Retrovirology*, 2, p. 27. doi:10.1186/1742-4690-2-27.
- Matsuoka, M. and Jeang, K.-T. (2007) 'Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation', *Nature Reviews Cancer*, 7(4), pp. 270–280. doi:10.1038/nrc2111.
- Melamed, A. *et al.* (2015) 'HTLV-1 drives vigorous clonal expansion of infected CD8+ T cells in natural infection', *Retrovirology*, 12, p. 91. doi:10.1186/s12977-015-0221-1.

- Mennella, V. *et al.* (2012) 'Subdiffraction-resolution fluorescence microscopy reveals a domain of the centrosome critical for pericentriolar material organization', *Nature Cell Biology*, 14(11), pp. 1159–1168. doi:10.1038/ncb2597.
- Meraldi, P., Honda, R. and Nigg, E.A. (2002) 'Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells', *The EMBO journal*, 21(4), pp. 483–492. doi:10.1093/emboj/21.4.483.
- Millen, S. *et al.* (2020) 'A novel positive feedback-loop between the HTLV-1 oncoprotein Tax and NF- κ B activity in T-cells', *Retrovirology*, 17(1), p. 30. doi:10.1186/s12977-020-00538-w.
- Mitobe, Y. *et al.* (2015) 'HTLV-1 bZIP Factor RNA and Protein Impart Distinct Functions on T-cell Proliferation and Survival', *Cancer Research*, 75(19), pp. 4143–4152. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0942.
- Miyazato, A. *et al.* (2005) 'Evidence for NF-kappaB- and CBP-independent repression of p53's transcriptional activity by human T-cell leukemia virus type 1 Tax in mouse embryo and primary human fibroblasts', *Journal of Virology*, 79(14), pp. 9346–9350. doi:10.1128/JVI.79.14.9346-9350.2005.
- Morimoto, H. *et al.* (2005) 'Reduced expression of human mismatch repair genes in adult T-cell leukemia', *American Journal of Hematology*, 78(2), pp. 100–107. doi:10.1002/ajh.20259.
- Moritz, M. *et al.* (2000) 'Structure of the gamma-tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation', *Nature Cell Biology*, 2(6), pp. 365–370. doi:10.1038/35014058.
- Moyer, T.C. *et al.* (2015) 'Binding of STIL to Plk4 activates kinase activity to promote centriole assembly', *Journal of Cell Biology*, 209(6), pp. 863–878. doi:10.1083/jcb.201502088.
- Murphy, E.L., Hanchard, B., *et al.* (1989) 'Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I', *International Journal of Cancer*, 43(2), pp. 250–253. doi:10.1002/ijc.2910430214.
- Murphy, E.L., Figueroa, J.P., *et al.* (1989) 'Sexual transmission of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)', *Annals of Internal Medicine*, 111(7), pp. 555–560. doi:10.7326/0003-4819-111-7-555.
- Nano, M. *et al.* (2019) 'Cell-Cycle Asynchrony Generates DNA Damage at Mitotic Entry in Polyploid Cells', *Current biology: CB*, 29(22), pp. 3937-3945.e7. doi:10.1016/j.cub.2019.09.041.
- Napetschnig, J. and Wu, H. (2013) 'Molecular Basis of NF- κ B Signaling', *Annual review of biophysics*, 42, pp. 443–468. doi:10.1146/annurev-biophys-083012-130338.
- Nasr, R. *et al.* (2006) 'Tax ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of NF-kappaB activation', *Blood*, 107(10), pp. 4021–4029. doi:10.1182/blood-2005-09-3572.
- Nejmeddine, M. *et al.* (2005) 'Human T-lymphotropic virus, type 1, tax protein triggers microtubule reorientation in the virological synapse', *The Journal of Biological Chemistry*, 280(33), pp. 29653–29660. doi:10.1074/jbc.M502639200.
- Nerome, Y. *et al.* (2014) 'Current human T-cell lymphotropic virus type 1 mother-to-child transmission prevention status in Kagoshima', *Pediatrics International: Official Journal of the Japan Pediatric Society*, 56(4), pp. 640–643. doi:10.1111/ped.12385.

- Nicot, C. *et al.* (2004) 'HTLV-1-encoded p30II is a post-transcriptional negative regulator of viral replication', *Nature Medicine*, 10(2), pp. 197–201. doi:10.1038/nm984.
- Nitta, T. *et al.* (2006) 'Centrosome amplification in adult T-cell leukemia and human T-cell leukemia virus type 1 Tax-induced human T cells', *Cancer Science*, 97(9), pp. 836–841. doi:10.1111/j.1349-7006.2006.00254.x.
- Ohshima, K. *et al.* (1998) 'Random integration of HTLV-1 provirus: increasing chromosomal instability', *Cancer Letters*, 132(1–2), pp. 203–212. doi:10.1016/s0304-3835(98)00188-8.
- Ohsugi, T. *et al.* (2013) 'p53 dysfunction precedes the activation of nuclear factor- κ B during disease progression in mice expressing Tax, a human T-cell leukemia virus type 1 oncoprotein', *Carcinogenesis*, 34(9), pp. 2129–2136. doi:10.1093/carcin/bgt144.
- Ohta, M. *et al.* (2014) 'Direct interaction of Plk4 with STIL ensures formation of a single procentriole per parental centriole', *Nature Communications*, 5(1), p. 5267. doi:10.1038/ncomms6267.
- Okochi, K., Sato, H. and Hinuma, Y. (1984) 'A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients', *Vox Sanguinis*, 46(5), pp. 245–253. doi:10.1111/j.1423-0410.1984.tb00083.x.
- Olindo, S. *et al.* (2018) 'Temporal trends in Human T-Lymphotropic virus 1 (HTLV-1) associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) incidence in Martinique over 25 years (1986-2010)', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(3), p. e0006304. doi:10.1371/journal.pntd.0006304.
- Ortyn, W.E. *et al.* (2007) 'Extended depth of field imaging for high speed cell analysis', *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 71(4), pp. 215–231. doi:10.1002/cyto.a.20370.
- Osame, M. *et al.* (1990) 'Nationwide survey of HTLV-I-associated myelopathy in Japan: association with blood transfusion', *Annals of Neurology*, 28(1), pp. 50–56. doi:10.1002/ana.410280110.
- Overbaugh, J. and Bangham, C.R.M. (2001) 'Selection Forces and Constraints on Retroviral Sequence Variation', *Science*, 292(5519), pp. 1106–1109. doi:10.1126/science.1059128.
- Pais-Correia, A.-M. *et al.* (2010) 'Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses', *Nature Medicine*, 16(1), pp. 83–89. doi:10.1038/nm.2065.
- Park, H.U. *et al.* (2004) 'Human T-cell leukemia virus type 1 Tax interacts with Chk1 and attenuates DNA-damage induced G2 arrest mediated by Chk1', *Oncogene*, 23(29), pp. 4966–4974. doi:10.1038/sj.onc.1207644.
- Parry, J.M. and Parry, E.M. (1987) 'Comparisons of tests for aneuploidy', *Mutation Research*, 181(2), pp. 267–287. doi:10.1016/0027-5107(87)90104-7.
- Peloponese, J.-M. *et al.* (2005) 'Abnormal centrosome amplification in cells through the targeting of Ran-binding protein-1 by the human T cell leukemia virus type-1 Tax oncoprotein', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(52), pp. 18974–18979. doi:10.1073/pnas.0506659103.

- Peloponese, J.-M. and Jeang, K.-T. (2006) 'Role for Akt/protein kinase B and activator protein-1 in cellular proliferation induced by the human T-cell leukemia virus type 1 tax oncoprotein', *The Journal of Biological Chemistry*, 281(13), pp. 8927–8938. doi:10.1074/jbc.M510598200.
- Philip, S. *et al.* (2014) 'Regulation of human T-lymphotropic virus type I latency and reactivation by HBZ and Rex', *PLoS pathogens*, 10(4), p. e1004040. doi:10.1371/journal.ppat.1004040.
- Philpott, S.M. and Buehring, G.C. (1999) 'Defective DNA repair in cells with human T-cell leukemia/bovine leukemia viruses: role of tax gene', *Journal of the National Cancer Institute*, 91(11), pp. 933–942. doi:10.1093/jnci/91.11.933.
- Pique, C. and Jones, K.S. (2012) 'Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1', *Frontiers in Microbiology*, 3. doi:10.3389/fmicb.2012.00378.
- Pise-Masison, C.A. *et al.* (2000) 'Inactivation of p53 by human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax requires activation of the NF-kappaB pathway and is dependent on p53 phosphorylation', *Molecular and Cellular Biology*, 20(10), pp. 3377–3386. doi:10.1128/MCB.20.10.3377-3386.2000.
- Poiesz, B.J. *et al.* (1980) 'Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(12), pp. 7415–7419. doi:10.1073/pnas.77.12.7415.
- Quintyne, N.J. *et al.* (2005) 'Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering', *Science (New York, N.Y.)*, 307(5706), pp. 127–129. doi:10.1126/science.1104905.
- Rao, C.V. *et al.* (2005) 'Colonic tumorigenesis in BubR1+/-ApcMin/+ compound mutant mice is linked to premature separation of sister chromatids and enhanced genomic instability', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(12), pp. 4365–4370. doi:10.1073/pnas.0407822102.
- Ren, T. *et al.* (2015) 'HTLV-1 Tax deregulates autophagy by recruiting autophagic molecules into lipid raft microdomains', *Oncogene*, 34(3), pp. 334–345. doi:10.1038/onc.2013.552.
- Richardson, J.H. *et al.* (1990) 'In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1', *Journal of Virology*, 64(11), pp. 5682–5687. doi:10.1128/JVI.64.11.5682-5687.1990.
- Rivera-Walsh, I. *et al.* (2001) 'NF-kappaB signaling pathway governs TRAIL gene expression and human T-cell leukemia virus-I Tax-induced T-cell death', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(44), pp. 40385–40388. doi:10.1074/jbc.C100501200.
- Romanelli, M.G. *et al.* (2013) 'Highlights on distinctive structural and functional properties of HTLV Tax proteins', *Frontiers in Microbiology*, 4, p. 271. doi:10.3389/fmicb.2013.00271.
- Rosadas, C. *et al.* (2020) 'Health state utility values in people living with HTLV-1 and in patients with HAM/TSP: The impact of a neglected disease on the quality of life', *PLoS neglected tropical diseases*, 14(10), p. e0008761. doi:10.1371/journal.pntd.0008761.
- Roucoux, D.F. *et al.* (2005) 'A prospective study of sexual transmission of human T lymphotropic virus (HTLV)-I and HTLV-II', *The Journal of Infectious Diseases*, 191(9), pp. 1490–1497. doi:10.1086/429410.

- Roux, K.J. *et al.* (2012) 'A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells', *Journal of Cell Biology*, 196(6), pp. 801–810. doi:10.1083/jcb.201112098.
- Rowan, A.G. *et al.* (2014) 'Cytotoxic T lymphocyte lysis of HTLV-1 infected cells is limited by weak HBZ protein expression, but non-specifically enhanced on induction of Tax expression', *Retrovirology*, 11, p. 116. doi:10.1186/s12977-014-0116-6.
- Santiago, F. *et al.* (1999) 'Transcriptional up-regulation of the cyclin D2 gene and acquisition of new cyclin-dependent kinase partners in human T-cell leukemia virus type 1-infected cells', *Journal of Virology*, 73(12), pp. 9917–9927. doi:10.1128/JVI.73.12.9917-9927.1999.
- Sarngadharan, M.G. *et al.* (1972) 'Reverse transcriptase activity of human acute leukaemic cells: purification of the enzyme, response to AMV 70S RNA, and characterization of the DNA product', *Nature: New Biology*, 240(98), pp. 67–72. doi:10.1038/newbio240067a0.
- Satou, Y. *et al.* (2006) 'HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3), pp. 720–725. doi:10.1073/pnas.0507631103.
- Schmitt, I. *et al.* (1998) 'Stimulation of cyclin-dependent kinase activity and G1- to S-phase transition in human lymphocytes by the human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 Tax protein', *Journal of Virology*, 72(1), pp. 633–640. doi:10.1128/JVI.72.1.633-640.1998.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S. and Eliceiri, K.W. (2012) 'NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis', *Nature Methods*, 9(7), pp. 671–675. doi:10.1038/nmeth.2089.
- Schwob, A. *et al.* (2019) 'SQSTM-1/p62 potentiates HTLV-1 Tax-mediated NF- κ B activation through its ubiquitin binding function', *Scientific Reports*, 9(1), p. 16014. doi:10.1038/s41598-019-52408-x.
- 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', *Journal of Virology*, 70(9), pp. 6347–6357. doi:10.1128/JVI.70.9.6347-6357.1996.
- Sharma, A. *et al.* (2016) 'Centriolar CPAP/SAS-4 Imparts Slow Processive Microtubule Growth', *Developmental Cell*, 37(4), pp. 362–376. doi:10.1016/j.devcel.2016.04.024.
- Shekhar, M.P.V. *et al.* (2002) 'Rad6 overexpression induces multinucleation, centrosome amplification, abnormal mitosis, aneuploidy, and transformation', *Cancer Research*, 62(7), pp. 2115–2124.
- Shembade, N. *et al.* (2007) 'The human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein requires the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 for NF- κ B activation', *Journal of Virology*, 81(24), pp. 13735–13742. doi:10.1128/JVI.01790-07.
- Shibata, Y. *et al.* (2017) 'HTLV-1 Tax Induces Formation of the Active Macromolecular IKK Complex by Generating Lys63- and Met1-Linked Hybrid Polyubiquitin Chains', *PLoS pathogens*, 13(1), p. e1006162. doi:10.1371/journal.ppat.1006162.
- Shimoyama, M. (1991) 'Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87)', *British Journal of Haematology*, 79(3), pp. 428–437. doi:10.1111/j.1365-2141.1991.tb08051.x.

- Siebenmorgen, D.J. *et al.* (2018) 'Introducing Lattice SIM for ZEISS Elyra 7', p. 8.
- Silkworth, W.T. *et al.* (2009) 'Multipolar Spindle Pole Coalescence Is a Major Source of Kinetochore Mis-Attachment and Chromosome Mis-Segregation in Cancer Cells', *PLOS ONE*, 4(8), p. e6564. doi:10.1371/journal.pone.0006564.
- Sillibourne, J.E. *et al.* (2010) 'Autophosphorylation of Polo-like Kinase 4 and Its Role in Centriole Duplication', *Molecular Biology of the Cell*, 21(4), pp. 547–561. doi:10.1091/mbc.e09-06-0505.
- Sir, J. *et al.* (2011) 'A primary microcephaly protein complex forms a ring around parental centrioles', *Nature genetics*. Nat Genet. doi:10.1038/ng.971.
- Siu, Y.-T. *et al.* (2006) 'TORC1 and TORC2 coactivators are required for tax activation of the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeats', *Journal of Virology*, 80(14), pp. 7052–7059. doi:10.1128/JVI.00103-06.
- Smith, E. *et al.* (2009) 'An ATM- and ATR-dependent checkpoint inactivates spindle assembly by targeting CEP63', *Nature Cell Biology*, 11(3), pp. 278–285. doi:10.1038/ncb1835.
- Smith, M.R. and Greene, W.C. (1990) 'Identification of HTLV-I tax trans-activator mutants exhibiting novel transcriptional phenotypes', *Genes & Development*, 4(11), pp. 1875–1885. doi:10.1101/gad.4.11.1875.
- Song, B. *et al.* (2005) 'Retrovirus Restriction by TRIM5 Variants from Old World and New World Primates', *Journal of Virology*, 79(7), pp. 3930–3937. doi:10.1128/JVI.79.7.3930-3937.2005.
- Sotillo, R. *et al.* (2007) 'Mad2 Overexpression Promotes Aneuploidy and Tumorigenesis in Mice', *Cancer Cell*, 11(1), pp. 9–23. doi:10.1016/j.ccr.2006.10.019.
- Souza, B.S.F. *et al.* (2016) 'Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells', *Scientific Reports*, 6, p. 39775. doi:10.1038/srep39775.
- Steere, N. *et al.* (2011) 'Centrosome Amplification in CHO and DT40 Cells by Inactivation of Cyclin-dependent Kinases', *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, 68(8), pp. 446–458. doi:10.1002/cm.20523.
- Sun, S.C. *et al.* (1994) 'Human T-cell leukemia virus type I Tax activation of NF-kappa B/Rel involves phosphorylation and degradation of I kappa B alpha and RelA (p65)-mediated induction of the c-rel gene', *Molecular and Cellular Biology*, 14(11), pp. 7377–7384. doi:10.1128/mcb.14.11.7377-7384.1994.
- Suzuki, T. *et al.* (1999) 'Down-regulation of the INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors by tax protein of HTLV-1 through two distinct mechanisms', *Virology*, 259(2), pp. 384–391. doi:10.1006/viro.1999.9760.
- Suzuki, T., Uchida-Toita, M. and Yoshida, M. (1999) 'Tax protein of HTLV-1 inhibits CBP/p300-mediated transcription by interfering with recruitment of CBP/p300 onto DNA element of E-box or p53 binding site', *Oncogene*, 18(28), pp. 4137–4143. doi:10.1038/sj.onc.1202766.
- Suzuki, T. and Yoshida, M. (1997) 'HTLV-1 Tax protein interacts with cyclin-dependent kinase inhibitor p16Ink4a and counteracts its inhibitory activity to CDK4', *Leukemia*, 11 Suppl 3, pp. 14–16.

- Takahashi, K. *et al.* (1991) 'Inhibitory effect of maternal antibody on mother-to-child transmission of human T-lymphotropic virus type I. The Mother-to-Child Transmission Study Group', *International Journal of Cancer*, 49(5), pp. 673–677. doi:10.1002/ijc.2910490508.
- Takeda, S. *et al.* (2004) 'Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells', *International Journal of Cancer*, 109(4), pp. 559–567. doi:10.1002/ijc.20007.
- Tam, W.F. and Sen, R. (2001) 'IkappaB family members function by different mechanisms', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(11), pp. 7701–7704. doi:10.1074/jbc.C000916200.
- Tang, S.-W. *et al.* (2013) 'The cellular autophagy pathway modulates human T-cell leukemia virus type 1 replication', *Journal of Virology*, 87(3), pp. 1699–1707. doi:10.1128/JVI.02147-12.
- Tedeschi, A. *et al.* (2007) 'RANBP1 localizes a subset of mitotic regulatory factors on spindle microtubules and regulates chromosome segregation in human cells', *Journal of Cell Science*, 120(Pt 21), pp. 3748–3761. doi:10.1242/jcs.009308.
- Temin, H.M. and Mizutani, S. (1970) 'RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus', *Nature*, 226(5252), pp. 1211–1213. doi:10.1038/2261211a0.
- Thomson, E.J. and Perry, P.E. (1988) 'The identification of micronucleated chromosomes: a possible assay for aneuploidy', *Mutagenesis*, 3(5), pp. 415–418. doi:10.1093/mutage/3.5.415.
- Tischer, T., Yang, J. and Barford, D. (2022) 'The APC/C targets the Cep152-Cep63 complex at the centrosome to regulate mitotic spindle assembly', *Journal of Cell Science*, 135(2), p. jcs259273. doi:10.1242/jcs.259273.
- Toro, C. *et al.* (2003) 'Rapid development of subacute myelopathy in three organ transplant recipients after transmission of human T-cell lymphotropic virus type I from a single donor', *Transplantation*, 75(1), pp. 102–104. doi:10.1097/00007890-200301150-00019.
- Tsou, M.-F.B. *et al.* (2009) 'Polo Kinase and Separase Regulate the Mitotic Licensing of Centriole Duplication in Human Cells', *Developmental Cell*, 17(3), pp. 344–354. doi:10.1016/j.devcel.2009.07.015.
- Tsou, M.-F.B. and Stearns, T. (2006) 'Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle', *Nature*, 442(7105), pp. 947–951. doi:10.1038/nature04985.
- Tsuchiya, Y. *et al.* (2016) 'Cep295 is a conserved scaffold protein required for generation of a bona fide mother centriole', *Nature Communications*, 7(1), p. 12567. doi:10.1038/ncomms12567.
- Tsukahara, T. *et al.* (1999) 'Induction of Bcl-x(L) expression by human T-cell leukemia virus type 1 Tax through NF-kappaB in apoptosis-resistant T-cell transfectants with Tax', *Journal of Virology*, 73(10), pp. 7981–7987. doi:10.1128/JVI.73.10.7981-7987.1999.
- Uchiyama, T. *et al.* (1977) 'Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases.', *Blood*, 128(24), p. 2745. doi:10.1182/blood-2016-10-746677.
- Vallabhapurapu, S. *et al.* (2008) 'Nonredundant and complementary functions of TRAF2 and TRAF3 in a ubiquitination cascade that activates NIK-dependent alternative NF-kappaB signaling', *Nature Immunology*, 9(12), pp. 1364–1370. doi:10.1038/ni.1678.

- Van Dooren, S. *et al.* (2004) 'The low evolutionary rate of human T-cell lymphotropic virus type-1 confirmed by analysis of vertical transmission chains', *Molecular Biology and Evolution*, 21(3), pp. 603–611. doi:10.1093/molbev/msh053.
- Van Prooyen, N. *et al.* (2010) 'Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(48), pp. 20738–20743. doi:10.1073/pnas.1009635107.
- Vandermeulen, C. *et al.* (2021) 'The HTLV-1 viral oncoproteins Tax and HBZ reprogram the cellular mRNA splicing landscape', *PLoS pathogens*, 17(9), p. e1009919. doi:10.1371/journal.ppat.1009919.
- Vassilev, L. *et al.* (2006) 'Selective small-molecule inhibitor reveals critical mitotic functions of human CDK1', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, pp. 10660–5. doi:10.1073/pnas.0600447103.
- Voll, R.E. *et al.* (2000) 'NF-kappa B activation by the pre-T cell receptor serves as a selective survival signal in T lymphocyte development', *Immunity*, 13(5), pp. 677–689. doi:10.1016/s1074-7613(00)00067-4.
- Wang, W.-J. *et al.* (2011) 'The conversion of centrioles to centrosomes: essential coupling of duplication with segregation', *Journal of Cell Biology*, 193(4), pp. 727–739. doi:10.1083/jcb.201101109.
- Watanabe, K. *et al.* (2019) 'The Cep57-pericentrin module organizes PCM expansion and centriole engagement', *Nature Communications*, 10(1), p. 931. doi:10.1038/s41467-019-08862-2.
- Watanabe, Y. *et al.* (2016) 'Autophagy controls centrosome number by degrading Cep63', *Nature Communications*, 7, p. 13508. doi:10.1038/ncomms13508.
- Wattel, E. *et al.* (1995) 'Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy', *Journal of Virology*, 69(5), pp. 2863–2868. doi:10.1128/JVI.69.5.2863-2868.1995.
- Weaver, B.A.A. *et al.* (2007) 'Aneuploidy Acts Both Oncogenically and as a Tumor Suppressor', *Cancer Cell*, 11(1), pp. 25–36. doi:10.1016/j.ccr.2006.12.003.
- Wei, Z. *et al.* (2020) 'Requirement of the Cep57-Cep63 Interaction for Proper Cep152 Recruitment and Centriole Duplication', *Molecular and Cellular Biology*, 40(10), pp. e00535-19. doi:10.1128/MCB.00535-19.
- Wen, F. *et al.* (2019) 'Zika virus increases mind bomb 1 levels, causing degradation of pericentriolar material 1 (PCM1) and dispersion of PCM1-containing granules from the centrosome', *The Journal of Biological Chemistry*, 294(49), pp. 18742–18755. doi:10.1074/jbc.RA119.010973.
- Williams, B.R. *et al.* (2008) 'Aneuploidy Affects Proliferation and Spontaneous Immortalization in Mammalian Cells', *Science*, 322(5902), pp. 703–709. doi:10.1126/science.1160058.
- Wolf, B. *et al.* (2017) 'Zika virus causes supernumerary foci with centriolar proteins and impaired spindle positioning', *Open Biology*, 7(1), p. 160231. doi:10.1098/rsob.160231.
- Woodruff, J.B. *et al.* (2017) 'The Centrosome Is a Selective Condensate that Nucleates Microtubules by Concentrating Tubulin', *Cell*, 169(6), pp. 1066–1077.e10. doi:10.1016/j.cell.2017.05.028.

- World Health Organization (2021) *Human T-lymphotropic virus type 1: technical report*. World Health Organization. Available at: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240020221> (Accessed: 17 May 2022).
- Wu, Q. *et al.* (2012) 'Cep57, a NEDD1-binding pericentriolar material component, is essential for spindle pole integrity', *Cell Research*, 22(9), pp. 1390–1401. doi:10.1038/cr.2012.61.
- Xiao, G. *et al.* (2001) 'Retroviral oncoprotein Tax induces processing of NF-kappaB2/p100 in T cells: evidence for the involvement of IKKalpha', *The EMBO journal*, 20(23), pp. 6805–6815. doi:10.1093/emboj/20.23.6805.
- Yamaoka, S. *et al.* (1996) 'Constitutive activation of NF-kappa B is essential for transformation of rat fibroblasts by the human T-cell leukemia virus type I Tax protein', *The EMBO journal*, 15(4), pp. 873–887.
- Yamauchi, J., Yamano, Y. and Yuzawa, K. (2019) 'Risk of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infection in Kidney Transplantation', *The New England Journal of Medicine*, 380(3), pp. 296–298. doi:10.1056/NEJMc1809779.
- Yang, Z. *et al.* (2008) 'Extra centrosomes and/or chromosomes prolong mitosis in human cells', *Nature Cell Biology*, 10(6), pp. 748–751. doi:10.1038/ncb1738.
- Yoshida, M. *et al.* (2008) 'Transcriptional control of spliced and unspliced human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ) gene', *Journal of Virology*, 82(19), pp. 9359–9368. doi:10.1128/JVI.00242-08.
- Yoshida, M., Miyoshi, I. and Hinuma, Y. (1982) 'Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(6), pp. 2031–2035. doi:10.1073/pnas.79.6.2031.
- Yun, C. *et al.* (2004) 'Mitotic aberration coupled with centrosome amplification is induced by hepatitis B virus X oncoprotein via the Ras-mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein pathway', *Molecular cancer research: MCR*, 2(3), pp. 159–169.
- Zane, L. *et al.* (2012) 'Wip1 and p53 contribute to HTLV-1 Tax-induced tumorigenesis', *Retrovirology*, 9, p. 114. doi:10.1186/1742-4690-9-114.
- Zhao, H. *et al.* (2020) 'Cep57 and Cep57l1 function redundantly to recruit the Cep63-Cep152 complex for centriole biogenesis', *Journal of Cell Science*, 133(13), p. jcs241836. doi:10.1242/jcs.241836.
- Zhao, T., Satou, Y. and Matsuoka, M. (2014) 'Development of T cell lymphoma in HTLV-1 bZIP factor and Tax double transgenic mice', *Archives of Virology*, 159(7), pp. 1849–1856. doi:10.1007/s00705-014-2099-y.
- Zheng, X. *et al.* (2016) 'Molecular basis for CPAP-tubulin interaction in controlling centriolar and ciliary length', *Nature Communications*, 7(1), p. 11874. doi:10.1038/ncomms11874.
- Zhi, H. *et al.* (2011) 'NF-κB hyper-activation by HTLV-1 tax induces cellular senescence, but can be alleviated by the viral anti-sense protein HBZ', *PLoS pathogens*, 7(4), p. e1002025. doi:10.1371/journal.ppat.1002025.

Zhu, F. *et al.* (2008) 'The Mammalian SPD-2 Ortholog Cep192 Regulates Centrosome Biogenesis', *Current Biology*, 18(2), pp. 136–141. doi:10.1016/j.cub.2007.12.055.

ANNEXES

Liste des annexes :

Annexe 1 :

Gauthier J., Teruel E., Arone C., Beltramini J., Martin E., Mahieux R., Journo C., « **Bioid proximity mapping identifies Cep63 as a centrosomal target of the retroviral HTLV-1 Tax oncoprotein** », article en preparation

Annexe 2 :

Schwob A., Teruel E., Dubuisson L., Lormières F., Verlhac P., Abudu Y P., Gauthier J., Naoumenko M., Cloarec-Ung F-M., Faure M., Johansen T., Dutartre H., Mahieux R., Journo C., « **SQSTM-1/p62 potentiates HTLV-1 Tax-mediated NF-κB activation through its ubiquitin binding function** », Scientific Reports 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52408-x>

Cet article a été publié par l'équipe avant le début de ma thèse. Les deux étudiant-es en thèse précédent-es, Aurélien Schwob et Elodie Teruel, ont réalisé la plus grande partie de ce travail, sous la supervision de Chloé Journo. J'ai également participé de façon mineure à ce travail, suite à un stage réalisé dans l'équipe en 2015.

Il présente un nouveau mécanisme de modulation de la voie NF-κB par la protéine Tax, médié par le récepteur autophagique p62. p62 est identifiée comme un partenaire potentiel de Tax par biotinylation de proximité, et l'interaction directe entre ces deux protéines est confirmée. p62 s'associe au signalosome Tax / IKK formé au niveau des membranes péri-golgiennes, et participe à l'activation d'IKK par un mécanisme impliquant sa liaison à des chaînes d'ubiquitine, probablement en jouant un rôle de facteur d'échafaudage moléculaire de ces chaînes d'ubiquitine.

1 **BioID proximity mapping identifies Cep63 as a centrosomal target of the**
2 **retroviral HTLV-1 Tax oncoprotein**

3

4 Gauthier J^{1,2}, Teruel E^{1,2}, Arone C¹, Beltramini J¹, Martin E¹, Mahieux R¹, Journo C^{1*}

5

6 ¹ CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, (“Retroviral Oncogenesis” team),

7 Univ Lyon, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, ENS de

8 Lyon, Lyon France.

9 ² These authors contributed equally.

10

11 *Correspondence: chloe.journo@ens-lyon.fr

12

13 **Abstract**

14 Adult T-cell Leukemia (ATL) is an aggressive hematological malignancy, which onset is

15 driven by HTLV-1-induced genomic instability. In HTLV-1 infected cells, a fraction of the

16 viral oncoprotein Tax localizes at the centrosome, and expression of Tax is sufficient to

17 trigger centrosome aberrations that could fuel genomic instability. However, the precise

18 mechanisms underlying Tax-induced centrosome aberrations remain elusive, mainly because

19 probing interactions at the centrosome using proteomic approaches has been challenging. We

20 took advantage of a proximity-dependent biotinylation assay (BioID) using a BirA-modified

21 Tax that we recently set up, to access Tax proximity partners, including in solubilization-

22 resistant cellular compartments such as the centrosome. Analysis of the BioID data allowed

23 the identification of several proximity partners of Tax directly involved in centrosomal

24 regulation, or indirectly modulating the cell cycle. Among these proximity partners, we

25 focused our analysis on the centrosomal protein Cep63, a key regulator of centrosome
26 architecture and duplication. Co-immunoprecipitation assays confirmed the interaction
27 between Tax with Cep63, including in infected T-cell lines, and allowed the mapping of the
28 domains involved. Using confocal and structured illumination super-resolution (SIM)
29 imaging in T-cells, we further showed that by interacting with Cep63, Tax induces its
30 dispersion from the centrosome. Importantly, Tax-induced dispersion of Cep63 was
31 correlated to centriolar and pericentriolar aberrations, indicating that it could participate in
32 centrosome dysfunction in infected cells. Altogether, these findings provide new insights into
33 the molecular bases of oncovirus-induced centrosomal alterations.

34

35 **Introduction**

36 In 2018, it was estimated about 12% of human cancers were caused by oncoviruses
37 worldwide [1]. These infections are preponderant in developing countries, where 20% of
38 deaths are imputed to viral infections. Among RNA oncoviruses, the Human T-cell Leukemia
39 Virus type 1 (HTLV-1) was the first oncogenic human retrovirus to be discovered. HTLV-1
40 belongs to the *Retroviridae* family and to the *Deltaretrovirus* genus, which also includes
41 HTLV-2, -3 and -4 and the Bovine Leukemia Virus. HTLV-1 is highly endemic in South
42 Western Japan, sub-Saharan Africa, Australia and Melanesia, South America and the
43 Caribbean Islands [2]. HTLV-1 is the etiological agent of two severe diseases known as
44 Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-1-Associated Myelopathy (TSP/HAM) and Adult T cell
45 Leukemia/Lymphoma (ATL). In Japan, about 1000 new ATL cases are detected per year.
46 ATL is characterized by the transformation of CD4⁺ CD25⁺ T cells and ATL cells are
47 usually referred to as “flower cells” because of their multi-lobulated nuclei typical of
48 chromosomal instability. HTLV-1 harbors a single-stranded positive RNA genome of 8.5 kb
49 encoding several structural proteins but also several regulatory and auxiliary proteins

50 involved in viral replication, persistence and cell transformation. The viral transactivator Tax
51 is considered the major viral oncoprotein. This 40-kDa oncoprotein is known to deregulate
52 cellular gene expression, to disturb the cell cycle by targeting cellular checkpoints, and to lead
53 to the accumulation of damaged cellular DNA, enhancing genomic instability [3].

54 Aneuploidy and chromosome instability, both hallmarks of cancer, are linked to centrosome
55 dysfunction [4]. The centrosome is the primary microtubule organizing center and is therefore
56 a key regulator of chromosomes segregation during mitosis. It is composed of two centrioles,
57 cylindrical structures composed of doublet and triplet microtubules. The centriole number is
58 tightly controlled in dividing cells in order to allow the symmetric formation of the mitotic
59 spindle and the accurate segregation of the genome during mitosis. During every cell cycle,
60 the centrosome is duplicated exactly once and centrosome duplication is synchronized with
61 DNA replication [5]. Abnormal centrosome number is a common phenotype in cancer and
62 may be caused by centrosome overduplication, *de novo* centriole formation accumulation,
63 premature centriole disengagement, or cytokinesis failure [6–8]. Interestingly, oncogenic
64 viruses such as HTLV-1, human papilloma virus (HPV) and Epstein-Barr virus (EBV) share
65 the property to induce centrosome abnormalities [9].

66 HTLV-1 Tax was itself previously described to be distributed at the vicinity of the
67 centrosome and to be responsible for centrosome fragmentation during mitosis [10]. Although
68 Tax is known to dysregulate several centrosomal proteins such as RanBP1 and TAX1BP2
69 [10,11], the complete interaction network of Tax at the centrosome remains elusive, mainly
70 because probing interactions at the centrosome using proteomic approaches has been
71 challenging.

72 In the present study, we aimed at mapping the proximity interaction network of Tax at the
73 centrosome by taking advantage of a proximity-dependent biotinylation assay (BioID) that we
74 recently set up using a BirA*-Tax fusion protein [12]. Among the novel proximity partners

75 identified through this BioID screen, we focused our analysis on the centrosomal protein
76 Cep63, a key actor of centrosome architecture and duplication. Our observations in T-cell
77 lines, including in infected T-cells, suggest that by interacting with Cep63, Tax might disrupt
78 its localization at the centrosome, which in turn could affect the structure of the centrosome,
79 thus contributing to the alteration of centrosomal functions reported in HTLV-1-infected cells.

80

81 **Material and methods**

82 **Cell culture**

83 HEK293T cells were obtained from ATCC and grown in Dulbecco's modified Eagle's
84 medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Invitrogen), antibiotics
85 (penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 µg/mL, Invitrogen) and L-glutamine. U2OS Centrin-
86 1-GFP epithelial cells (adherent cells from human bone osteosarcoma stably expressing
87 Centrin-1-GFP, kind gift from Dr Bornens, Paris) were grown in DMEM supplemented with
88 FCS (10%), antibiotics (penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 µg/mL) and L-glutamine.
89 Uninfected Jurkat as well as chronically HTLV-1-infected HuT102 and C8166 T-cell lines
90 were grown in RPMI supplemented with 10% FCS, antibiotics (penicillin 100 U/mL,
91 streptomycin 100 µg/mL) and L-glutamine. All cell lines were maintained at 37°C in 5%
92 CO₂. When appropriate, cells were treated with 5µg/mL nocodazole for 1h at 37°C (or
93 DMSO) before fixation.

94

95 **Plasmids**

96 Tax sequence cloned into a pSG5M vector, with a 6xHis tag, was previously described [13].
97 Tax-His sequence cloned into a Myc-BioID2-MCS vector encoding BirA* (Addgene #74223,
98 from Dr K. Roux [14]) was described in our previous work [12]. Tax mutants M47, M22 [15],
99 K1-10R [16] (deficient for ubiquitinylation; lysine to arginine mutations) with a 6xHis tag

100 were also previously described. Full-length Cep63, corresponding to Cep63 isoform c, and
101 truncated sequences 1-135, 136-378, 379-495, and combination thereof, were obtained from
102 Dr V. Costanzo and cloned into a pcDNA3/pT7-link-GVSV vector.

103

104 **Transfection**

105 HEK293T cells were transfected using Polyfect (Qiagen). U2OS cells were transfected using
106 Lipofectamine 2000 (Life Technologies). Jurkat cells were transfected using the Neon
107 electroporation system (Thermo Fisher).

108

109 **Antibodies**

110 Rabbit polyclonal anti-histidine (G-18, sc-804), goat monoclonal anti γ -tubulin (C-20, sc-
111 7396), mouse monoclonal anti-p65/RelA (F-6, sc-8008) were from Santa Cruz
112 Biotechnology. Mouse monoclonal (HIS.H8, ab18184), goat polyclonal anti-6X His tag
113 (ab9136), mouse monoclonal anti-pericentrin (28144 clone, ab28144), rabbit polyclonal anti-
114 pericentrin (ab4448) were from Abcam. A goat polyclonal anti-6X His tag from Bethyl
115 Laboratories was also used (A190-113A). Mouse monoclonal anti-GM130 was from BD
116 (610823). Mouse monoclonal anti-VSV glycoprotein (P5D4, V5507), rabbit polyclonal anti-
117 VSV (V4888), and mouse monoclonal anti- α -tubulin (B-5-1-2, T6074 / T5168) were from
118 Sigma. Rabbit polyclonal Anti-Cep63 (#06-1292) and mouse monoclonal anti-Centrin (20H5,
119 #04-1624) were from Millipore. Mouse monoclonal anti-Tax was from NIH (Tab172).

120 For western blot analysis, we used as secondary antibodies, anti-rabbit (donkey, NA9340) and
121 anti-mouse (sheep, NA9310) IgG Horseradish peroxidase linked F(ab')₂ fragments from GE
122 Healthcare. For immunofluorescence, Dylight 488 anti-mouse (Vector laboratories, DL-
123 2488), Texas Red anti-rabbit (Vector laboratories, TI-1000), Texas Red anti-goat (Jackson
124 ImmunoResearch laboratories, 705-075-147), Dylight 649 anti-rabbit (AbD serotec,

125 STAR36D649), Alexafluor 647 anti-mouse (ab150107, Abcam), Alexafluor 568 anti-rabbit
126 (ab175693, Abcam), and Alexafluor 488 anti-goat (ab150129, Abcam) antibodies were used,
127 as well as GFP booster (gba488-100, Chromotek).

128

129 **Immunofluorescence**

130 For immunofluorescence analysis, cells were plated on glass coverslips (coated with poly-L-
131 Lysine in the case of suspension T-cells). Cells were fixed in -20°C methanol for 10 minutes.
132 After several washes, cells were permeabilized in PBS-Triton X-100 0.1% for 5 minutes and
133 blocked in PBS-Tween 0.2%-Milk 5% for a minimum of 30 minutes. Coverslips were
134 incubated with primary antibodies diluted in PBS-Tween 0.2%-Milk 5% for 45 minutes at
135 room temperature. Coverslips were washed in PBS-Tween 0.2% and incubated in secondary
136 antibodies for 45 minutes at room temperature. Coverslips were mounted in Fluoromount-G
137 (SouthernBiotech) or in Prolong Diamond antifade mountant with DAPI (Invitrogen).

138 For epifluorescence imaging, acquisition was performed using a Plan Apochromat 63x/1.4 oil
139 DIC (440762; wd 0.18 mm) objective in an AxioImager.Z1 microscope (Zeiss). Images were
140 acquired using a Coolsnap HQ monochrome CCD (Zeiss; 1392x1040 – 6.45µm pixel; 12bit)
141 camera and reconstructed using Metamorph software. For confocal microscopy, acquisition
142 was performed using an inverted Axio Observer microscope (Zeiss) equipped with a LSM800
143 confocal module, high-sensitivity GaAsP detectors, a Plan Apochromat 63x/1.4 oil DIC
144 objective (Zeiss) and the Zen 2.6 software (Zeiss). Pixel size was adjusted to fit the sampling
145 criteria. Z-stacks were acquired with an 0.2µm interval corresponding to the sampling
146 optimum in z, and projected using the maximum intensity algorithm, using the ImageJ
147 software. Image analysis was performed in ImageJ.

148

149 **BioID procedure and mass spectrometry analyses**

150 The BioID protocol was reported elsewhere [12]. Briefly, HEK293T cells were transfected
151 with BirA*-encoding vectors for 24 h and treated with biotin (50 μ M, Sigma) for 18 h. BioID
152 streptavidin pulldown was performed on whole cell lysates using Dynabead MyOne
153 Streptavidin C1 (ThermoFisher Scientific). After the washing steps, beads were washed and
154 bound proteins were reduced with 200 mM DTT and alkylated with 200 mM Iodoacetamide.
155 After digestion and desalting, samples were analyzed qualitatively or in a Label Free
156 quantitation strategy using an Ultimate 3000 nano-RSLC (Thermo Scientific, San Jose
157 California) coupled on line with a Q Exactive HF mass spectrometer via a nano-electrospray
158 ionization source (Thermo Scientific, San Jose California). Samples were analysed in
159 triplicate with TOP20 HCD method. Data files were then analyzed with Proteome Discover
160 2.1 or with with Proteome Discover 2.2 using the SEQUEST HT algorithm against the
161 Swissprot Human database (2018-09 release, 20332 sequences), complemented with the
162 Uniprot HTLV sequences (2018-09 release, 3298 sequences) and the BirA and streptavidin
163 sequences. For qualitative analysis, proteins specifically identified in the BirA*-Tax-
164 transfected cells and not in the BirA*-transfected control cells were considered. For
165 quantitative analysis, protein quantification was done by the Label Free Quantification (LFQ)
166 approach, and LFQ abundance values were obtained for each sample, normalized to the total
167 peptide amount. The abundance ratio [BirA*-Tax/BirA*] was calculated as well as the
168 adjusted p-value. Retrieved interactors were ranked based on their abundance ratio and
169 associated p-value of 4 independent experiments. GO term enrichment was performed using
170 the AmiGO 2 platform, powered by Panther. Lists of interactors from specific GO terms were
171 retrieved from Panther, and plotted in Cytoscape.

172

173 **His-select Ni-NTA precipitation, immunoprecipitation, and western blotting**

174 For His-select Ni-NTA precipitation and immunoprecipitation, 293T cells or U2OS cells were
175 transfected in 10-cm petri dishes. Twenty-four hours after transfection, cells were lysed (Tris-
176 HCl pH 8 50mM, NaCl 200mM, EDTA 0.1mM, NP-40 0.5%, Na₃VO₄ 2mM, NaF 100mM)
177 in the presence of protease inhibitors (Complete, Roche Applied Science) and incubated for
178 20 minutes on ice. After clearing cell debris by centrifugation, protein concentration in cell
179 lysates was determined by Bradford (Biorad). His-select Ni-NTA precipitation was conducted
180 using HIS-Select HF Nickel Affinity Gel (Sigma) on 400μg of cells lysates overnight at 4°C.
181 Then, complexes were washed (Tris-HCl pH 8 50mM, NaCl 500mM, EDTA 0.1mM, NP-40
182 0.5%, Na₃VO₄ 2mM, NaF 100mM and Imidazole 10mM) and eluted.

183 For immunoprecipitation, 400μg of proteins were incubated with pAG beads (Bio-
184 Adembeads, Ademtech) for preclearing for one hour at 4°C. Then, immunoprecipitation was
185 conducted using 2μg of α-Cep63 antibody or control IgG (sc-2027, Santa Cruz
186 Biotechnology) overnight at 4°C. After addition of pAG beads for one hour at 4°C,
187 immunoprecipitates were washed (Tris-HCl pH 8 50mM, NaCl 500mM, EDTA 0.1mM, NP-
188 40 0.5%, Na₃VO₄ 2mM, NaF 100mM) and eluted.

189 For immunoblotting, samples were loaded on 10% Bis-Tris gels (NP0301, Invitrogen, or
190 3450112, Biorad), subjected to electrophoresis and transferred onto a polyvinylidene fluoride
191 (PVDF) membrane (Immobilon-P, Millipore). Membranes were blocked in 5% TBST-Milk
192 for at least 30min and incubated with the appropriate primary antibodies for 2 hours or
193 overnight. Membranes were then washed and incubated with either anti-rabbit or anti-mouse
194 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 1 hour and developed using ECL
195 Prime reagent kit (GE Healthcare) under a Chemidoc system (Biorad).

196

197 **Super-resolution Structured Illumination Microscopy (SR-SIM)**

198 SIM imaging was performed using an inverted Axio Observer microscope (Zeiss) equipped
199 with the Elyra 7 Lattice SIM super-resolution module (Zeiss) run by the Zen 3.0R software
200 (Zeiss). Images were obtained using an alpha Plan-Apochromat 63x/1.46 Oil objective
201 (Zeiss), for which the size of the structured illumination pattern was optimized and changed
202 for each wavelength. Images were acquired using a PCO.edge4.2 sCMOS (Photonlines)
203 Images were acquired using 13 grid translations and reconstructed using ZEN software using
204 the Lattice SIM2 module [17]. The pixel size was set to match the sampling criteria, based on
205 a 1.5-fold increase in resolution allowed by SIM2 technology. Z-stacks were acquired with an
206 0.1 μ m interval corresponding to the sampling optimum in z, and projected using the
207 maximum intensity algorithm, using the ImageJ software.

208

209 **Statistical analyses and graphical representation**

210 Statistical analyses and graphical representation were performed using the GraphPad Prism 9
211 software. Statistical tests used are indicated in each figure legend. Differences between means
212 were considered significant when the p-value was less than 0.05. ***p < 0.001; **p < 0.01;
213 *p < 0.05; ns, p > 0.05.

214

215 **Results**

216 **Proximity interaction network of the viral oncoprotein Tax at the centrosome**

217 We recently described the set-up of a proximity-dependent biotinylation assay using a BirA*-
218 Tax fusion protein, that allowed the identification of the selective autophagy receptor
219 SQSTM-1/p62 as a novel partner of Tax involved in NF- κ B signaling in Golgi-associated
220 signalosomes [12]. Importantly, when setting up the assay in 293T cells, we observed that the
221 BirA*-Tax fusion protein displayed a subcellular localization similar to the wild-type protein,
222 with an enrichment in nuclear speckles as well as a in a perinuclear domain that could

223 correspond to the Golgi / centrosome. To confirm that the BioID approach using BirA*-Tax
224 could be adequate to map Tax proximity interaction network at the centrosome, we stained
225 the cells for γ -tubulin, a marker of the pericentriolar material, and observed that Tax as well
226 as BirA*-Tax were consistently colocalizing with γ -tubulin (Figure 1A). We repeated the
227 experiment in U2OS cells stably expressing GFP-tagged Centrin-1 as a marker of
228 centrosomes, which are widely used to study the centrosome by microscopy, and in which we
229 also stained the Golgi apparatus using anti-GM130 antibodies. In these cells, Tax as well as
230 BirA*-Tax were most frequently distributed in nuclear speckles as well as a in a perinuclear
231 domain overlapping the Golgi apparatus and the centrosome (Supp. Figure 1A). As described
232 in the literature, Tax subcellular localization showed a degree of heterogeneity from cell to
233 cell, with some cells displaying Tax signal only in the Golgi apparatus / centrosome domain,
234 or in less-well defined perinuclear, nuclear and cytoplasmic structures, but this heterogeneity
235 was similar between Tax and BirA*-Tax (Supp. Figure 1B). To check whether BirA*-Tax is a
236 *bone fide* centrosome-docked protein, or is continuously trafficked to the centrosome by the
237 microtubule network, we repeated the experiment in cells that were treated with nocodazole to
238 disorganize the microtubule network. Nocodazole treatment indeed led to the
239 depolymerisation of microtubules, as verified by an anti- α -tubulin staining, but did not
240 abolish Tax or BirA*-Tax colocalization with Centrin-1 (Supp. Figure 1C), indicating that
241 Tax as well as BirA*-Tax are indeed *bone fide* centrosome-docked proteins.
242 We then assessed whether BirA*-Tax retained its ability to induce centrosome aberrations as
243 described for Tax. Importantly, when expressing Tax or BirA*-Tax in Centrin-1-GFP-U2OS
244 cells for 72 hrs, the percentage of cells with abnormal centrosomes (identified as cells with
245 supernumerary spots of Centrin-1) increased up to approx. 40%, with comparable levels
246 between Tax and BirA*-Tax-expressing cells (Figure 1B). Taken together, these control

247 experiments confirmed that BirA*-Tax was physically associated with the centrosome and
248 able to induce centrosome aberrations, justifying the use of BioID to map Tax proximity
249 interaction network and identify novel partners involved in centrosome dysfunction.

250 In the BioID assay, cells were lysed using a protocol that allowed extraction of centrosomal
251 proteins [18]. After purification of biotinylated proteins from BirA*-Tax-expressing cells, and
252 from BirA*-only expressing cells as a control, followed by mass spectrometry identification,
253 we ranked the Tax proximity interactors based on their abundance ratio and associated p-
254 value of 4 independent experiments (see Material and Methods for details). Gene Ontology
255 (GO) analysis indicated that components of ribonucleoprotein complexes were among the
256 most significantly enriched cell components (Figure 1C), consistent with the known functions
257 of Tax as a transcriptional regulator. Interestingly, components of the centrosome and of
258 related GO terms (Microtubule organizing centre, Microtubule cytoskeleton, Mitotic spindle)
259 were also significantly enriched (Figure 1C, in red). This was associated with an enrichment
260 in biological processes related to the cell cycle, and in particular of mitosis-related processes,
261 with GO terms such as “Mitotic cell cycle”, “Spindle organization”, and “Cell cycle phase
262 transition” (Figure 1D, in red). These analyses thus indicate that the BioID approach indeed
263 identifies the centrosome as a target of Tax, validating our strategy.

264 From the list of top-ranked proximity partners of Tax, we then filtered out the partners
265 associated with the “Centrosome” GO term (Supp. Table 1) and retrieved approx. 60 cellular
266 proteins. Detailed analysis of the Biological Processes GO terms associated with these
267 proteins allowed the selection of 21 proteins with functions particularly relevant to our study,
268 *i.e.* proteins involved (i) in the centrosome assembly and cycle; and (ii) in the regulation of
269 cell cycle checkpoints and most particularly of G2/M transition. Of note, approx. half of these
270 proteins were associated both these sets of functions.

271

272 **Tax interacts with the centrosomal protein Cep63**

273 Among the centrosomal proteins identified in the BioID screen, we were particularly
274 interested in the Cep63 protein. Indeed, previous experiments in yeast and mammalian two-
275 hybrid assays showed a potential interaction between Cep63 and Tax [19] (R. Mahieux,
276 unpublished data). In order to confirm the interaction between Cep63 and Tax, we first
277 performed a His-select Ni-NTA precipitation after transfection of 293T cells with plasmids
278 encoding His-tagged Tax and/or VSV-tagged Cep63 (Figure 2A). When both Cep63-VSV
279 and Tax-His were transfected, Tax-His precipitation led to VSV-Cep63 co-precipitation (lane
280 3), confirming that ectopic Tax and Cep63 interact in cells.

281 Because U2OS cells are a widely used cell line to study the centrosome by microscopy, we
282 then aimed at confirming the interaction between Tax and endogenous Cep63 in this cell type
283 (Figure 2B). U2OS cells were transfected with the Tax-His-encoding plasmid and Tax1-His
284 was precipitated by His-select Ni-NTA precipitation. Using an anti-Cep63 antibody, we could
285 detect four bands for Cep63 by western blot in the inputs, which correspond to the four
286 known isoforms of Cep63 produced by alternative splicing (81 kDa, 63 kDa, 58 kDa and 56
287 kDa, lanes 1-2). After Ni-NTA, endogenous Cep63 co-precipitated with Tax1-His (lane 2) but
288 was undetectable in the absence of Tax1-His (lane 1), confirming that endogenous Cep63
289 interacts with Tax transiently expressed in U2OS cells.

290 We next tested whether endogenous Cep63 and Tax interacted in HTLV-1-infected T-cell
291 lines such as HuT102 and C8166 (Figure 2C). Non-infected Jurkat T-cells were used as a
292 negative control. Endogenous isoforms of Cep63 were detected in the inputs for all three cell
293 lines (lanes 7-9). Following immunoprecipitation with an anti-Cep63 antibody (lanes 2, 4 and
294 6), Tax was co-precipitated only in C8166, but not in Jurkat or HuT102 cells (compare lane 6
295 to lanes 2 and 4). These observations indicate that the interaction between endogenous Cep63
296 and Tax was detectable at least in one HTLV-1-infected cell line.

297 Altogether, these experiments validate the BioID data and demonstrate that Cep63 is a novel
298 centrosomal partner of Tax in multiple cell lines.

299

300 **Tax interacts with the N-terminal domain of Cep63**

301 We next sought to screen a series of frequently used Tax mutants for their ability to interact
302 with Cep63 (Figure 2D). We included the Tax-M22 and Tax-M47 mutants that harbour
303 missense mutations selectively disrupting their ability to activate the NF- κ B and CREB
304 pathways, respectively. As Tax ubiquitinylation is required for its localization at the
305 centrosome [16], we also included the K1-10R mutant, in which mutations of lysines into
306 arginines were introduced to abolish Tax ubiquitinylation. U2OS cells were transfected with
307 plasmids encoding His-tagged Tax mutants, and Tax was precipitated by His-select Ni-NTA
308 precipitation. All Tax mutants were detected using an anti-His antibody in the inputs (Figure
309 2D, lanes 1-4). Interestingly, endogenous Cep63 co-precipitated only with wild-type Tax and
310 the M47 mutant, indicating that the M22 and K1-10R mutants were unable to interact with
311 Cep63 and could therefore constitute useful tools to dissect the consequences of Tax/Cep63
312 interaction (see below).

313 We then mapped the domain of Cep63 interacting with Tax. A collection of Cep63 truncation
314 mutants was obtained from Dr. Costanzo's lab [20] and cloned into a VSV-tag encoding
315 plasmid (Figure 2E, left panel). As a control, when full-length (FL) Cep63 and Tax were
316 transfected into U2OS cells, Tax-His precipitation by His-Select Ni-NTA precipitation led to
317 Cep63-FL co-precipitation (Figure 2E, right panel, lane 3). Tax-His precipitation only led to
318 the co-precipitation of Cep63₁₋₁₃₅ and Cep63₁₋₃₇₈ (lanes 4 and 7), but not of Cep63₁₃₅₋₃₇₈,
319 Cep63₃₇₈₋₄₉₅ or Cep63₁₃₅₋₄₉₅ (lanes 5, 6 and 8), indicating that the N-terminus of Cep63 is
320 necessary and sufficient for the interaction with Tax.

321

322 **A fraction of Tax colocalizes with Cep63 at the centrosome in T-cells**

323 Cep63 was previously shown to locate at the proximal end of the mother centriole [21]. Since
324 our biochemical analyses showed that Tax and Cep63 interact, we next investigated whether
325 Tax and Cep63 colocalize at the centrosome. To better respect the cell tropism of the virus,
326 we performed the following experiments in T-cells. In this experimental system, we also
327 included the Tax mutants that we had tested in our biochemical assay (see Figure 2D). Jurkat
328 T-cells were microporated with WT or mutant His-tagged Tax-expressing plasmids, and
329 imaged by confocal microscopy after anti-His and anti-Cep63 staining (Figure 3). As
330 expected from the literature, Cep63 appeared as two clear puncta, corresponding to the two
331 parent centrioles (Figure 3, a-e). In microporated cells, Tax WT was distributed in nuclear
332 speckles and in a perinuclear domain, reminiscent of the Golgi apparatus / centrosome, in
333 which Tax colocalized with Cep63 (Figure 3, b'). As expected from published data, the M47
334 mutant, which we have found to interact with Cep63, also colocalized with Cep63, with even
335 greater Tax signals at the centrosome than the WT Tax protein (Figure 3, c'). In contrast, the
336 M22 and K1-10R mutants, which we have found not to interact with Cep63 in biochemical
337 assays, did not colocalize with Cep63 (Figure 3, d'-e'). Altogether, these results strengthen
338 the notion that WT and M47 Tax, but not M22 or K1-10R, interact with Cep63 at the
339 centrosome, including in T-cells, the natural target cells of HTLV-1.

340

341 **Tax induces Cep63 dispersion from the centrosome**

342 Interestingly, while assessing the possible colocalization of Tax and Cep63 at the centrosome,
343 we frequently observed that in Tax-expressing cells, Cep63 distribution was modified, with a
344 striking dispersion of the clean and punctate signal observed in control cells, to a larger
345 diffuse area in the pericentrosomal region (Figure 4A), in approx. 30% of Tax-positive cells
346 (Figure 4B). Importantly, the diffuse signal of Cep63 also colocalized with Tax in this

347 pericentrosomal area, suggesting that by interacting with Cep63, Tax might relocalize Cep63
348 from the centrosome to the pericentrosomal area.

349 To test whether this dispersion of Cep63 signal was a direct result of the interaction with Tax,
350 we took advantage of the Tax mutants that interacted or not with Cep63. Interestingly, we
351 found that only the WT and M47 Tax proteins induced the dispersion of Cep63 (Figure 4 b-c),
352 and not the M22 or K1-10R mutants (Figure 4 d-e). Thus, the ability of Tax to interact with
353 Cep63 is correlated with its ability to disperse Cep63 from the centrosome to the
354 pericentrosomal area.

355 Of note, Tax and its M47 mutant are able to activate the NF- κ B pathway, a property that is
356 lost in the M22 and K1-10R mutants, as illustrated by their ability or not to induce the nuclear
357 translocation of p65/RelA (Figure 5 b,d,f, g). Thus, we sought to determine whether our
358 observations of the dispersion of Cep63 could in fact reflect the ability of Tax to activate the
359 NF- κ B pathway, which could indirectly lead to Cep63 dispersion. To this end, we blocked the
360 ability of Tax to activate the NF- κ B pathway by co-expressing a non-phosphorylable
361 dominant-negative form of the I κ B α inhibitor (I κ B α DN). Co-expression of I κ B α DN and of
362 WT or M47 Tax indeed drastically limited Tax-induced nuclear translocation of p65/RelA
363 (Figure 5 c, e). Nonetheless, although a non-significant trend was observed for M47,
364 abrogating Tax-induced NF- κ B activation was insufficient to abrogate Tax-induced
365 dispersion of Cep63 (Figure 5 c', e'). This demonstrated that activation of NF- κ B is
366 dispensable for Tax-induced dispersion of Cep63. Consistently, activating NF- κ B signaling in
367 M22- or K1-10R-expressing cells by co-expression of a constitutively active form of IKK β
368 (IKK2-EE) did not rescue the inability of these mutants to induce the dispersion of Cep63
369 (data not shown), indicating that activation of NF- κ B is not sufficient for Tax-induced
370 dispersion of Cep63. Taken together, these observations support the notion that the ability of

371 Tax to induce Cep63 dispersion is independent of its ability to activate the NF- κ B pathway.
372 We therefore propose that by localizing at the centrosome and interacting with Cep63, Tax
373 directly induces its displacement from the centrosome to a pericentrosomal area where both
374 proteins colocalize.

375

376 **Tax-induced dispersion of Cep63 from the centrosome is associated with multiple**
377 **centrosomal aberrations**

378 Because Cep63 is known as a key architect of the centrosome, we asked whether its
379 dispersion could result in the loss of integrity of the centrosome structure. We selected two
380 centrosomal markers, the distribution of which we used as a read-out for centrosome integrity:
381 Centrin, a centriolar protein which normally associates with the distal end of the centrioles,
382 and Pericentrin (PCNT), a pericentriolar protein which contributes to the pericentriolar
383 material (PCM). Jurkat T-cells were microporated with constructs encoding WT Tax or M47,
384 and stained for Tax, Cep63 and Centrin (or PCNT, respectively). We then compared the
385 distribution of Centrin (resp. PCNT) in Tax-expressing cells with no dispersion of Cep63, and
386 in Tax-expressing cells with a dispersion of Cep63 from the centrosome (Figure 6A-B).
387 Aberrations in Centrin distribution were observed in all conditions, although to varying
388 extents, and consisted in a loss of the punctate signal and an increase in the diffuse
389 pericentrosomal signal, with an overlap with Cep63 and Tax signals, that was accompanied
390 by super-numerary Centrin spots in a fraction of cells (Figure 6A b-c). Strikingly, aberrations
391 in Centrin distribution were massively over-represented in the sub-population of Tax-
392 expressing cells that showed a dispersion of Cep63 (approx. 80% of such cells showing
393 Centrin aberrations, compared to 20-30% in control cells or Tax-expressing cells with no
394 dispersion of Cep63, Figure 6C). Aberrations in PCNT distribution were also observed, and
395 consisted in a dispersion of the signal from the centrosome to the pericentrosomal region

396 (Figure 6B b, d), that was accompanied by a frequent loss of PCNT signal at the centrosome
397 (Figure 6B c, e). Similar to Centrin, PCNT aberrations were also over-represented in the sub-
398 population of Tax-expressing cells that showed a dispersion of Cep63 (approx. 80% of cells
399 compared to 20-50% in control cells or Tax-expressing cells with no dispersion of Cep63,
400 Figure 6D).

401 Centrosomal aberrations in Tax-expressing Jurkat cells were then analysed by super-
402 resolution 3D-SIM (Figure 6E-F). These analyses confirmed that the doughnut structure of
403 Cep63 around the proximal end of the centriole, observed in Tax-negative cells (Figure 6E-F
404 a'), was altered in WT and M47 Tax-expressing cells, with a dispersion of Cep63 signal
405 (Figure 6E-F b'-c'), together with Centrin (Figure 6E b-c) and PCNT (Figure 6F b-c), to a
406 pericentrosomal area in which Tax is also present.

407 Finally, we confirmed our observations in an infected T-cell line (C8166), in which we had
408 been able to detect Tax interaction with Cep63 (see Figure 2C): indeed, Cep63 was dispersed
409 from the centrosome in a mean of 22% of cells, which was significantly different from Jurkat
410 cells (mean: 4%, Figure 6G, red signal). In the cells in which Cep63 was dispersed, other
411 centrosomal aberrations were frequently observed, as illustrated here with γ -tubulin (Figure
412 6G, green signal). Taken together, these observations indicate that Tax-induced dispersion of
413 Cep63 from the centrosome in T-cells is associated with multiple centrosomal aberrations,
414 including in infected T-cells, and support the notion that by interacting with Cep63, Tax
415 might disrupt the structure of the centrosome, which could contribute to the perturbation of
416 centrosomal functions reported in HTLV-1-infected cells.

417

418 **Discussion**

419 In this study, we took advantage of BioID, a proximity-dependent labelling strategy, to access
420 HTLV-1 Tax proximity interaction network at the centrosome, a cell compartment that has

421 remained refractory to protein-protein interaction mapping by standard approaches for many
422 years. Among the few dozen of centrosomal proximity interactors that we identified, we
423 further analyzed the consequences of Tax / Cep63 interaction. Combining biochemical
424 approaches with state-of-the-art imaging techniques, including the newly developed Lattice-
425 SIM2 module, we uncovered that Tax induced a dispersion of Cep63 from the centrosome,
426 and we hypothesize that this process could be at the basis of a series of structural aberrations
427 affecting the centrosome and the pericentrosomal region, that could further lead to
428 centrosomal dysfunctions and mitotic errors.

429 Importantly, most of our results have been obtained or confirmed in T-cells, including in
430 infected T-cell lines (Figure 2C, Figures 3-6), strengthening the notion that this Tax/Cep63
431 interplay could indeed occur in the course of infection. Of note, in our co-
432 immunoprecipitation assays performed, we could only detect Tax interaction with
433 endogenous Cep63 in one of the two HTLV-1-infected cell lines tested (Figure 2C). Cep63
434 displays four known isoforms produced by alternative splicing. It is possible that all infected
435 cell lines do not express the same relative amount of each isoform, which could impact the
436 interaction with Tax. Alternatively, because Cep63 is present in low abundance in cells, it is
437 possible that the sensitivity of our co-immunoprecipitation assay is too low to efficiently
438 detect Tax/Cep63 interaction in all cell lines, which would further justify the relevance of
439 more sensitive assays such as BioID.

440 Interestingly, Tax mutants M22 and K1-10 were unable to interact with Cep63 (Figure 2D).
441 The inability of these well-characterized mutants to be ubiquitinated suggests that the
442 ubiquitination of Tax may be required for its interaction with Cep63. Various studies have
443 reported that Tax1 ubiquitinylation is critical for its localization in Golgi / centrosome-
444 associated cytoplasmic domains, and hence for its functions such as NF- κ B pathway
445 activation, which requires assembly of a ubiquitin-dependent signalosome on Golgi /

446 centrosome-associated platforms [16,22]. It is thus appropriate to hypothesize that Tax/Cep63
447 interplay at the centrosome requires Tax ubiquitinylation. Alternatively, data from Figure 2D
448 are also compatible with a model in which Tax/Cep63 interplay would be an indirect
449 consequence of Tax-mediated NF- κ B activation. However, interfering with NF- κ B signaling
450 did not significantly affect Tax/Cep63 interplay (Figure 3), invalidating this hypothesis.
451 Our mapping experiments revealed that the N-terminal region of Cep63, spanning amino
452 acids 1-135, is necessary and sufficient to interact with Tax (Figure 2E). This is interesting
453 because the N-terminal region of Cep63 has also previously been reported to mediate Cep63
454 association with the centrosome [20,23]. Thus, we can hypothesize that by interacting with
455 the N-terminus of Cep63, Tax outcompetes its binding to the centrosome, resulting in the
456 displacement of Cep63 from the centrosome to the pericentrosomal region where Tax is
457 present. Identifying the nature and composition of this pericentrosomal region where Tax and
458 Cep63 accumulate is ongoing. Of note, Cep63 displacement from the centrosome remains
459 partial, possibly because of Cep63 capacity to multimerize through its C-terminal domain and
460 its interaction with Cep152 [20,24] that might not be impacted by Tax.
461 It is also possible that Cep63 dispersion results from mechanisms distinct from displacement
462 by Tax, that could in fact depend on the modulation of Cep63 degradation by Tax. Indeed,
463 Cep63 was discovered as a substrate of selective autophagy, which therefore controls the
464 abundance and distribution of Cep63 in a SQSTM-1/p62-dependent manner [25]. Because
465 Tax also interacts with SQSTM-1/p62 [12], we can hypothesize that Tax interferes with the
466 autophagic degradation of Cep63, resulting in its accumulation. The centriolar satellites were
467 further shown to be involved in the autophagic degradation of centrosome components [26].
468 Because Cep63 is known to interact with satellites [27,28], Tax could have cascading effects
469 on the abundance of other centrosome components by interfering with the satellite functions,
470 through Cep63.

471 Consistent with this notion, our confocal and Lattice SIM2 microscopy analyses indicated that
472 Cep63 dispersion from the centrosome was most frequently associated to other structural
473 aberrations of the centrosome, as illustrated here with centriolar (Centrin) and pericentriolar
474 markers (PCNT, γ -tubulin, Figure 6). This supports the hypothesis that Cep63 dispersion is at
475 the basis of a series of Tax-induced centrosomal aberrations which could indirectly result
476 from the loss of Cep63 functions in regulating the abundance of other centrosome
477 components. Interestingly, defects in turn-over of centrosome components have been shown
478 by others to correlate with the pericentrosomal accumulation of Centrin and PCNT and to
479 centrosome fragmentation in mitosis [26], which could also be happening in Tax-expressing
480 cells.

481 Tax-induced centrosomal aberrations could also result from the loss of Cep63 functions in
482 structuring the centrosome. For instance, in *Cep63*^{-/-} mouse spermatocytes, the pericentriolar
483 material (PCM) was shown to be disorganized [29]. Cep63 contributes to the integrity of the
484 PCM by interacting with Cep57, a centrosomal protein bridging the centrioles to the PCM and
485 required to avoid PCM fragmentation upon mitosis [30–33]. A decreased interaction of Cep63
486 and Cep57 was recently reported to alter the recruitment of the PCM and the function of the
487 mitotic spindle [34]. Importantly, the N-terminal domain of Cep63, which is targeted by Tax
488 (Figure 2E), is also required for Cep63 to interact with Cep57 [35], highlighting the
489 possibility that Tax in fact interferes with the stability of the Cep63 / Cep57 complex.

490 Competition assays are under way in the lab to test this hypothesis.

491 Of note, while analyzing the distribution of centrosomal markers in cells expressing mutant
492 Tax proteins that had lost their ability to interact with Cep63, and that were thus unable to
493 induce Cep63 dispersion (Figure 4), we observed that these Tax mutants retained the ability to
494 induce distinctive supranumerical anomalies of the centrosome. This underscores that fact that
495 Tax most probably affects the centrosome by multiple, independent activities, in line with its

496 demonstrated pleiotropy. Disentangling the respective contributions of these activities in
497 generating genomic instability remains a challenge that we are currently taking up by
498 combining the use of multiple Tax mutants. Correlating the activities of these mutants on
499 centrosome structure with their consequences on the formation of the mitotic spindle and on
500 the faithful segregation of chromosomes could help us understand which activities have the
501 largest contribution to genomic instability. Development of live imaging approaches to track
502 the kinetics of centrosome alterations by Tax together with the cell fate in mitosis will be
503 instrumental in this respect.

504 A previous paper demonstrated that Cep63 recruited CDK1 to the centrosome and thus
505 regulated mitotic entry via activation of CyclinB1-CDK1 complex [23]. Interestingly, we
506 found that CDK1 was also a proximity partner of Tax in our BioID screen. Although our
507 preliminary experiments did not reveal any changes in CDK1 centrosomal recruitment in Tax-
508 expressing U2OS cells, including in cells with dispersed centrosomal markers such as
509 Centrin-1-GFP (data not shown), investigating the potential consequences of Tax/Cep63
510 interaction on CDK1 functions will be of interest in future work. Because Cep63 has also
511 been involved in the response to DNA damage [36,37], we are also currently investigating the
512 potential consequences of Tax/Cep63 interaction on double strand breaks repair, a process
513 that is known to be altered by Tax. Our preliminary experiments showed that the Tax/Cep63
514 interaction is maintained upon induction of DNA damage (data not shown), indicating that
515 Tax may modulate Cep63 functions to subvert the DNA damage response. Testing this
516 hypothesis will be the object of future work.

517 In conclusion, given the multiple functions ascribed to Cep63 in the general process of cell
518 cycle regulation and centrosome and genomic integrity maintenance, identifying Cep63 as
519 interactor of Tax opens exciting avenues to integrate Cep63 in the network of cellular
520 functions targeted by the oncoprotein Tax.

521

522 **Data availability**

523 The datasets generated during the current study are available from the corresponding author
524 on reasonable request.

525

526 **Acknowledgements**

527 We would like to thank Dr. M. Bornens and Dr. V. Costenzo for their kind gifts of plasmids
528 and cells. We thank the Retroviral Oncogenesis team, as well as Dr. P.V. Afonso, Dr. M.
529 Delattre, Dr H. Gruffat and Dr. M. Tommasino for helpful discussion. We acknowledge the
530 financial support from ITMO Cancer AVIESAN (Alliance Nationale pour les Sciences de la
531 Vie et de la Santé, National Alliance for Life Sciences and Health) within the framework of
532 the cancer plan, for the Orbitrap mass spectrometer funding. This work has benefited from the
533 facilities and expertise of the Protein Science Facility (Adeline Page and Frédéric Delolme) of
534 the SFR Biosciences Lyon (UMS3444/CNRS, US8/Inserm, ENS de Lyon, UCBL). We also
535 thank the PLATIM microscopy facility of the SFR Biosciences Lyon (Elodie Chatre and
536 Jacques Brocard) for their help with image acquisition and analysis. This work was supported
537 by the “Fondation pour la Recherche Médicale, équipe labellisée” program to RM (grant
538 number DEQ. 20180339200), by an Inserm U1111 intramural grant to CJ, by the “Ligue
539 Nationale contre le Cancer, comité du Rhône, Projet Pluri-Equipes” program to CJ.

540

541 **Figure legends**

542 **Figure 1. BioID identifies Cep63 as a centrosomal target of Tax.** A. 293T cells were
543 transfected with the indicated constructs, fixed after 24 hrs and immunostained with α -His
544 antibodies for the detection of Tax (red), and α - γ -tubulin for the detection of centrosomes
545 (green). DNA was counterstained with DAPI (blue). Scale bar = 10 μ m. B. U2OS cells stably

546 expressing Centrin1-GFP were transfected with the indicated constructs, fixed after 72 hrs
547 and immunostained with α -His antibodies for the detection of Tax (red). Centrosomes were
548 detected by direct fluorescence of Centrin1-GFP (green). DNA was counterstained with DAPI
549 (blue). Scale bar = 10 μ m. Cells with abnormal number of centrosomes (> 2) were numbered
550 among the whole population (for Empty vector transfection) or among the Tax-positive
551 population (for Tax-His and Myc-BirA*-Tax-His transfections). A least a hundred of cells
552 were counted for each condition. **C-D.** Mass spectrometry analysis of Myc-BirA*-Tax-His
553 interactors. GO-enrichment analysis of the top-ranked interactors of Tax based on the cellular
554 components (**C**) or biological processes (**D**) to which they are associated. The fold enrichment
555 compared to a random gene set and its associated p-value are plotted. The size of the symbols
556 is proportional to the number of interactors identified in each GO-term. The GO-terms
557 relative to the centrosome and to the cell cycle regulation are highlighted in red. **E.** Proximity
558 interactors associated to the “Centrosome” cellular component and to centrosome and cell
559 cycle regulation biological processes were filtered out from the list of Tax interactors.
560 Proteins in diamonds are functionally associated to centrosome assembly and cycle. Proteins
561 in pink borders are functionally associated to cell cycle checkpoints and to the G2/M
562 transition.

563

564 **Figure 2. Tax interacts with the N-terminal domain of Cep63.** **A.** 293T cells were
565 transfected with the indicated plasmids for 24 hrs. Tax-His was precipitated with His-select
566 Ni-NTA beads, followed by immunoblotting with α -His (Tax) et α -VSV (Cep63) antibodies.
567 **B.** U2OS cells were transfected with the indicated plasmids for 24 hrs. Tax-His was
568 precipitated with His-select Ni-NTA beads, followed by immunoblotting with α -His (Tax) et
569 α -VSV (Cep63) antibodies. **C.** Non-infected Jurkat and HTLV-1-infected HuT102 and C8166
570 T-cells were subjected to immunoprecipitation with α -Cep63 or control IgG, followed by

571 immunoblotting with α -Tax and α -Cep63 antibodies. The black arrow indicates co-
572 immunoprecipitated Tax in C8166 cells. **D.** U2OS cells were transfected with the indicated
573 plasmids for 24 hrs. Tax-His was precipitated with His-select Ni-NTA beads, followed by
574 immunoblotting with α -His (Tax) et α -Cep63 antibodies. **E.** Left panel: schematic
575 representation of the truncation mutants used in the right panel. U2OS cells were transfected
576 with the indicated plasmids for 24 hrs. Tax-His was precipitated with His-select Ni-NTA
577 beads, followed by immunoblotting with α -His (Tax) et α -VSV (Cep63) antibodies. FL =
578 Full-Length; ns = non-specific.

579

580 **Figure 3. Tax colocalizes with Cep63 at the centrosome of T-cells.** Jurkat T-cells were
581 microporated with the indicated plasmids, fixed after 24 hrs and immunostained with α -Cep63
582 (red) and with α -His antibodies for the detection of Tax (green). DNA was counterstained
583 with DAPI (blue). Scale bar = 5 μ m. **(a-d')** Magnified image of the centrosome area. The
584 dotted white lines delineate the centrosome area to highlight colocalization (or not) with Tax.
585 Colocalization of Tax with Cep63 is summarized on the right, and correlated with the
586 interaction data from Figure 2.

587

588 **Figure 4. Tax induces the dispersion of Cep63 from the centrosome to the**
589 **pericentrosomal area in T-cells.** Jurkat T-cells were microporated with the indicated
590 plasmids, fixed after 24 hrs and immunostained with α -Cep63 (red) and with α -His antibodies
591 for the detection of Tax (green). DNA was counterstained with DAPI (blue). **A.**
592 Representative images. Scale bar = 5 μ m. **(a-e')** Magnified image of the centrosome area. The
593 dotted white lines delineate the centrosome and pericentrosomal area to highlight dispersion
594 (or not) in the presence of Tax. Dispersion of Cep63 is summarized on the right, and
595 correlated with the interaction data from Figure 2. **B.** Fifty cells per replicate were numbered

596 according to the dispersion of Cep63. The mean and the standard error of the mean of the
597 percentage of cells with dispersed Cep63 is plotted (n=3 independent experiments). Means are
598 compared using a one-way ANOVA with repeated measures followed by a post-hoc test.

599

600 **Figure 5. Tax-induced dispersion of Cep63 is independent of NF- κ B signaling.** Jurkat T-
601 cells were microporated with the indicated plasmids, fixed after 24 hrs and immunostained
602 with α -p65/RelA to visualize NF- κ B activation (magenta), α -Cep63 (red), and α -His
603 antibodies for the detection of Tax (green). DNA was counterstained with DAPI (blue). **A.**
604 Representative cells. **(a-g)** The dotted white lines delineate the nucleus to highlight
605 translocation (or not) of p65/RelA. **(a'-g')** The dotted white lines delineate the centrosome
606 and pericentrosomal area to highlight dispersion (or not) in the presence of Tax. Dispersion of
607 Cep63 is summarized on the right, and correlated with activation of NF- κ B and with the
608 interaction data from Figure 2. **B.** Fifty cells per replicate were numbered according to the
609 dispersion of Cep63. The mean and the standard error of the mean of the percentage of cells
610 with dispersed Cep63 is plotted (n=3 independent experiments). Means are compared using a
611 one-way ANOVA with repeated measures followed by a post-hoc test.

612

613 **Figure 6. Tax-induced dispersion of Cep63 is associated with centrosomal aberrations.**
614 Jurkat T-cells were microporated with the indicated plasmids, fixed after 24 hrs and
615 immunostained with α -Centrin (**A-C-E**) or α -PCNT (**B-D-F**) (magenta), α -Cep63 (red), and
616 α -His antibodies for the detection of Tax (green). DNA was counterstained with DAPI (blue).
617 **A-B.** Cells were imaged by confocal microscopy and representative cells (cropped around the
618 centrosomal area) are depicted. **(a-e')** The dotted white lines delineate the centrosome and
619 pericentrosomal area to highlight dispersion (or not) in the presence of Tax. **C-D.** Fifty cells

620 per replicate were numbered according to the dispersion of Cep63 and Centrin (C) or PCNT
621 (D). The mean and the standard error of the mean of the percentage of cells with dispersed
622 Centrin (resp. PCNT) among cells with or without Cep63 is plotted (n=3 independent
623 experiments). Means are compared using a one-way ANOVA with repeated measures
624 followed by a post-hoc test. E-F. Cells were imaged by 3D-SIM² super-resolution microscopy
625 and representative cells (cropped around the centrosomal area) are depicted. (a-c') The dotted
626 white lines delineate the centrosome and pericentrosomal area to highlight dispersion (or not)
627 in the presence of Tax. G. Uninfected Jurkat and C8166 infected T-cells were immunostained
628 with α -Tax antibodies (cyan), α -Cep63 antibodies (red) and α - γ -tubulin for the detection of
629 centrosomes (green). DNA was counterstained with DAPI (blue). Scale bar = 10 μ m.

630

631 **Supp. Figure 1. Tax-His and Myc-BirA*-Tax-His are *bona fide* centrosome-docked**

632 **proteins. A-B.** U2OS cells stably expressing Centrin1-GFP were transfected with the
633 indicated constructs, fixed after 24 hrs and immunostained with α -GM130 antibodies for the
634 detection of the Golgi apparatus (cyan), and α -His antibodies for the detection of Tax (red).
635 Centrosomes were detected by direct fluorescence of Centrin1-GFP (green). DNA was
636 counterstained with DAPI (blue). A. Representative cells are shown. Scale bar = 10 μ m. B. At
637 least a hundred of cells were numbered according to the subcellular localization of Tax. C.
638 U2OS cells stably expressing Centrin1-GFP were transfected with the indicated constructs for
639 24 hrs, treated with DMSO or Nocodazole 5 μ g/ml for 1h at 37°C and then fixed and
640 immunostained with α - α -tubulin antibodies for the detection of microtubules (cyan) and α -His
641 antibody for the detection of Tax (red). Centrosomes were detected by direct fluorescence of
642 Centrin1-GFP (green). DNA was counterstained with DAPI (blue). Scale bar = 10 μ m.

643

644 **Supp. Table 1.** List of Tax proximity interactors associated to the “Centrosome” cellular
645 component and to centrosome and cell cycle regulation biological processes, filtered out from
646 the list of top-ranked Tax interactors identified by mass spectrometry analysis.

647

648 **References**

- 649 1. de Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM: **Global burden of cancer**
650 **attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis.** *The Lancet Global*
651 *Health* 2020, **8**:e180–e190. [doi: 10.1016/S2214-109X(19)30488-7]
- 652 2. Gessain A, Cassar O: **Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1**
653 **infection.** *Frontiers in Microbiology* 2012, **3**:388. [doi: 10.3389/fmicb.2012.00388]
- 654 3. Kfoury Y, Nasr R, Journo C, Mahieux R, Pique C, Bazarbachi A: **The multifaceted**
655 **oncoprotein Tax: subcellular localization, posttranslational modifications, and NF-**
656 **kappaB activation.** *Adv Cancer Res* 2012, **113**:85–120. [doi: B978-0-12-394280-7.00003-8
657 [pii] 10.1016/B978-0-12-394280-7.00003-8]
- 658 4. Godinho S. A., Pellman D.: **Causes and consequences of centrosome abnormalities**
659 **in cancer.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2014,
660 **369**:20130467. [doi: 10.1098/rstb.2013.0467]
- 661 5. Nigg EA, Holland AJ: **Once and only once: mechanisms of centriole duplication**
662 **and their deregulation in disease.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2018, **19**:297–
663 312. [doi: 10.1038/nrm.2017.127]
- 664 6. Habedanck R, Stierhof Y-D, Wilkinson CJ, Nigg EA: **The Polo kinase Plk4**
665 **functions in centriole duplication.** *Nature Cell Biology* 2005, **7**:1140–1146. [doi:
666 10.1038/ncb1320]
- 667 7. Karki M, Keyhaninejad N, Shuster CB: **Precocious centriole disengagement and**
668 **centrosome fragmentation induced by mitotic delay.** *Nature Communications* 2017,

- 669 8:15803. [doi: 10.1038/ncomms15803]
- 670 8. Meraldi P, Honda R, A.Nigg E: **Aurora-A overexpression reveals tetraploidization**
671 **as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells.** *The EMBO Journal* 2002,
672 **21**:483–492. [doi: 10.1093/emboj/21.4.483] [PMID: 11847097]
- 673 9. Teruel E, Gruffat H, Tommasino M, Journo C: **Viral oncogenesis and genomic**
674 **instability: the centr(osom)al connection.** *Virologie* 2019, **23**:16–31. [doi:
675 10.1684/vir.2019.0793]
- 676 10. Peloponese J-M, Haller K, Miyazato A, Jeang K-T: **Abnormal centrosome**
677 **amplification in cells through the targeting of Ran-binding protein-1 by the human T**
678 **cell leukemia virus type-1 Tax oncoprotein.** *Proceedings of the National Academy of*
679 *Sciences of the United States of America* 2005, **102**:18974–18979.
- 680 11. Ching Y-P, Chan S-F, Jeang K-T, Jin D-Y: **The retroviral oncoprotein Tax targets**
681 **the coiled-coil centrosomal protein TAX1BP2 to induce centrosome overduplication.**
682 *Nature Cell Biology* 2006, **8**:717–724. [doi: 10.1038/ncb1432]
- 683 12. Schwob A, Teruel E, Dubuisson L, Lormières F, Verlhac P, Abudu YP, Gauthier J,
684 Naoumenko M, Cloarec-Ung F-M, Faure M, et al.: **SQSTM-1/p62 potentiates HTLV-1**
685 **Tax-mediated NF- κ B activation through its ubiquitin binding function.** *Sci Rep* 2019,
686 **9**:16014. [doi: 10.1038/s41598-019-52408-x]
- 687 13. Meertens L, Chevalier S, Weil R, Gessain A, Mahieux R: **A 10-amino acid domain**
688 **within human T-cell leukemia virus type 1 and type 2 tax protein sequences is**
689 **responsible for their divergent subcellular distribution.** *The Journal of biological*
690 *chemistry* 2004, **279**:43307–20. [doi: 10.1074/jbc.M400497200]
- 691 14. Kim DI, Jensen SC, Noble KA, Birendra KC, Roux KH, Motamedchaboki K, Roux
692 KJ: **An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling.** *Molecular biology of*
693 *the cell* 2016, **27**:1188–1196.

- 694 15. Smith MR, Greene WC: **Identification of HTLV-I tax trans-activator mutants**
695 **exhibiting novel transcriptional phenotypes.** *Genes Dev.* 1990, **4**:1875–1885. [doi:
696 10.1101/gad.4.11.1875]
- 697 16. Kfoury Y, Nasr R, Favre-Bonvin a, El-Sabban M, Renault N, Giron M-L, Setterblad
698 N, Hajj HE, Chiari E, Mikati a G, et al.: **Ubiquitylated Tax targets and binds the IKK**
699 **signalosome at the centrosome.** *Oncogene* 2008, **27**:1665–1676. [doi:
700 10.1038/sj.onc.1210804]
- 701 17. Löschberger A, Novikau Y, Netz R, Spindler M-C, Benavente R, Klein T, Sauer M,
702 Kleppe DI: *Super-Resolution Imaging by Dual Iterative Structured Illumination Microscopy*
703 [Internet]. bioRxiv; 2021.
- 704 18. Firat-Karalar EN, Stearns T: **Probing mammalian centrosome structure using**
705 **BioID proximity-dependent biotinylation [Internet].** In *Methods in Cell Biology.* .
706 Elsevier; 2015:153–170.
- 707 19. Simonis N, Rual J-F, Lemmens I, Boxus M, Hirozane-Kishikawa T, Gatot J-S, Dricot
708 A, Hao T, Vertommen D, Legros S, et al.: **Host-pathogen interactome mapping for HTLV-**
709 **1 and -2 retroviruses.** *Retrovirology* 2012, **9**:1–20. [doi: 10.1186/1742-4690-9-26]
- 710 20. Brown NJ, Marjanović M, Lüders J, Stracker TH, Costanzo V: **Cep63 and Cep152**
711 **Cooperate to Ensure Centriole Duplication.** *PLoS ONE* 2013, **8**:e69986. [doi:
712 10.1371/journal.pone.0069986]
- 713 21. Sir J-H, Barr AR, Nicholas AK, Carvalho OP, Khurshid M, Sossick A, Reichelt S,
714 D’Santos C, Woods CG, Gergely F: **A primary microcephaly protein complex forms a**
715 **ring around parental centrioles.** *Nature Genetics* 2011, **43**:1147–1153. [doi:
716 10.1038/ng.971]
- 717 22. Nasr R, Chiari E, El-Sabban M, Mahieux R, Kfoury Y, Abdulhay M, Yazbeck V,
718 Hermine O, de The H, Pique C, et al.: **Tax ubiquitylation and sumoylation control critical**

719 **cytoplasmic and nuclear steps of NF-kappaB activation.** *Blood* 2006, **107**:4021–9. [doi:
720 2005-09-3572 [pii] 10.1182/blood-2005-09-3572]

721 23. Löffler H, Fechter A, Matuszewska M, Saffrich R, Mistrik M, Marhold J, Hornung C,
722 Westermann F, Bartek J, Kramer A: **Cep63 Recruits Cdk1 to the Centrosome:**
723 **Implications for Regulation of Mitotic Entry, Centrosome Amplification, and Genome**
724 **Maintenance.** *Cancer Research* 2011, **71**:2129–2139. [doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-
725 2684]

726 24. Kim T-S, Zhang L, Il Ahn J, Meng L, Chen Y, Lee E, Bang JK, Lim JM, Ghirlando R,
727 Fan L, et al.: **Molecular architecture of a cylindrical self-assembly at human**
728 **centrosomes.** *Nat Commun* 2019, **10**:1151. [doi: 10.1038/s41467-019-08838-2] [PMID:
729 30858376] [PMCID: PMC6411776]

730 25. Watanabe Y, Honda S, Konishi A, Arakawa S, Murohashi M, Yamaguchi H, Torii S,
731 Tanabe M, Tanaka S, Warabi E, et al.: **Autophagy controls centrosome number by**
732 **degrading Cep63.** *Nat Commun* 2016, **7**:13508. [doi: 10.1038/ncomms13508]

733 26. Holdgaard SG, Cianfanelli V, Pupo E, Lambrughli M, Lubas M, Nielsen JC, Eibes S,
734 Maiani E, Harder LM, Wesch N, et al.: **Selective autophagy maintains centrosome**
735 **integrity and accurate mitosis by turnover of centriolar satellites.** *Nat Commun* 2019,
736 **10**:4176. [doi: 10.1038/s41467-019-12094-9]

737 27. Firat-Karalar EN, Rauniyar N, Yates JR, Stearns T: **Proximity Interactions among**
738 **Centrosome Components Identify Regulators of Centriole Duplication.** *Current Biology*
739 2014, **24**:664–670. [doi: 10.1016/j.cub.2014.01.067]

740 28. Kodani A, Yu TW, Johnson JR, Jayaraman D, Johnson TL, Al-Gazali L, Sztriha L,
741 Partlow JN, Kim H, Krup AL, et al.: **Centriolar satellites assemble centrosomal**
742 **microcephaly proteins to recruit CDK2 and promote centriole duplication.** *Elife* 2015, **4**.
743 [doi: 10.7554/eLife.07519] [PMID: 26297806] [PMCID: PMC4574112]

- 744 29. Marjanović M, Sánchez-Huertas C, Terré B, Gómez R, Scheel JF, Pacheco S, Knobel
745 PA, Martínez-Marchal A, Aivio S, Palenzuela L, et al.: **CEP63 deficiency promotes p53-**
746 **dependent microcephaly and reveals a role for the centrosome in meiotic recombination.**
747 *Nat Commun* 2015, **6**:7676. [doi: 10.1038/ncomms8676]
- 748 30. Wu Q, He R, Zhou H, Yu AC, Zhang B, Teng J, Chen J: **Cep57, a NEDD1-binding**
749 **pericentriolar material component, is essential for spindle pole integrity.** *Cell Res* 2012,
750 **22**:1390–1401. [doi: 10.1038/cr.2012.61]
- 751 31. Aziz K, Sieben CJ, Jeganathan KB, Hamada M, Davies BA, Velasco ROF, Rahman
752 N, Katzmann DJ, Deursen JM van: **Mosaic-variegated aneuploidy syndrome mutation or**
753 **haploinsufficiency in Cep57 impairs tumor suppression.** *J Clin Invest* 2018, **128**:3517–
754 3534. [doi: 10.1172/JCI120316] [PMID: 0]
- 755 32. Watanabe K, Takao D, Ito KK, Takahashi M, Kitagawa D: **The Cep57-pericentrin**
756 **module organizes PCM expansion and centriole engagement.** *Nat Commun* 2019, **10**:931.
757 [doi: 10.1038/s41467-019-08862-2] [PMID: 30804344] [PMCID: PMC6389942]
- 758 33. Ito KK, Watanabe K, Ishida H, Matsushashi K, Chinen T, Hata S, Kitagawa D: **Cep57**
759 **and Cep57L1 maintain centriole engagement in interphase to ensure centriole**
760 **duplication cycle.** *J Cell Biol* 2021, **220**:e202005153. [doi: 10.1083/jcb.202005153] [PMID:
761 33492359] [PMCID: PMC7836272]
- 762 34. Tischer T, Yang J, Barford D: **The APC/C targets the Cep152-Cep63 complex at**
763 **the centrosome to regulate mitotic spindle assembly.** *J Cell Sci* 2022, **135**:jcs259273. [doi:
764 10.1242/jcs.259273] [PMID: 34878135] [PMCID: PMC8917351]
- 765 35. Wei Z, Kim T-S, Ahn JI, Meng L, Chen Y, Ryu EK, Ku B, Zhou M, Kim SJ, Bang
766 JK, et al.: **Requirement of the Cep57-Cep63 Interaction for Proper Cep152 Recruitment**
767 **and Centriole Duplication [Internet].** *Molecular and Cellular Biology* 2020, **40**. [doi:
768 10.1128/MCB.00535-19] [PMID: 32152252]

- 769 36. Smith E, Dejsuphong D, Balestrini A, Hampel M, Lenz C, Takeda S, Vindigni A,
770 Costanzo V: **An ATM- and ATR-dependent checkpoint inactivates spindle assembly by**
771 **targeting CEP63.** *Nat. Cell Biol.* 2009, **11**:278–285. [doi: 10.1038/ncb1835] [PMID:
772 19182792]
- 773 37. Brown N, Costanzo V: **An ATM and ATR dependent pathway targeting**
774 **centrosome dependent spindle assembly.** *Cell Cycle* 2009, **8**:1997–2001.
775

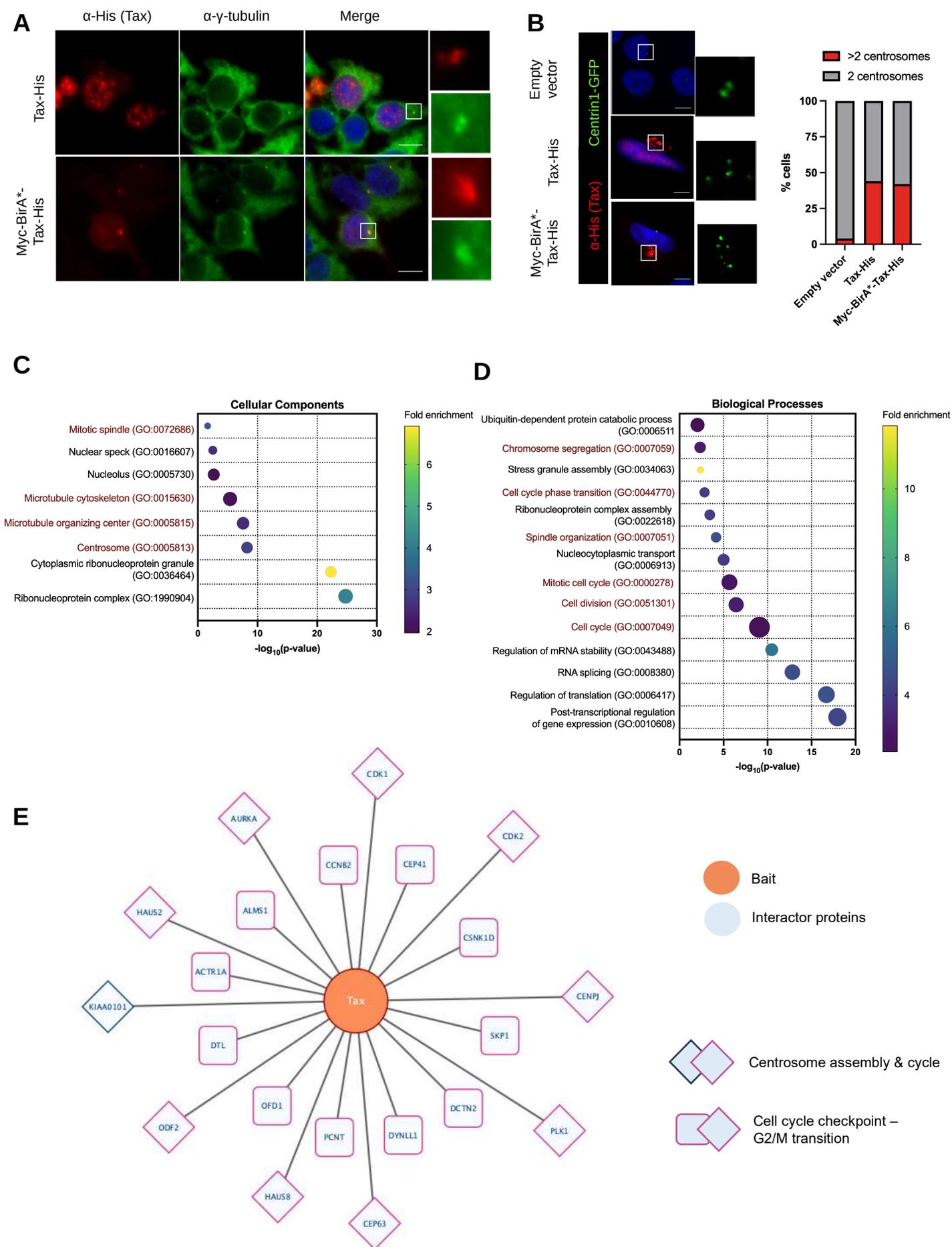
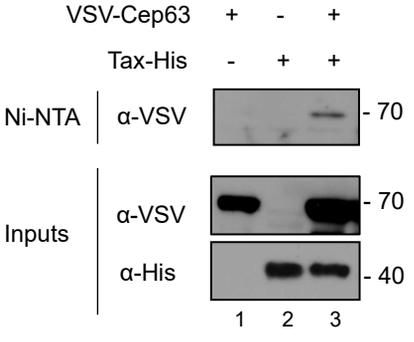
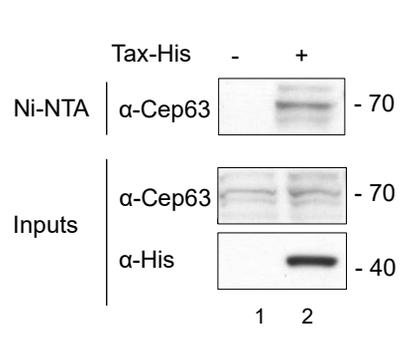
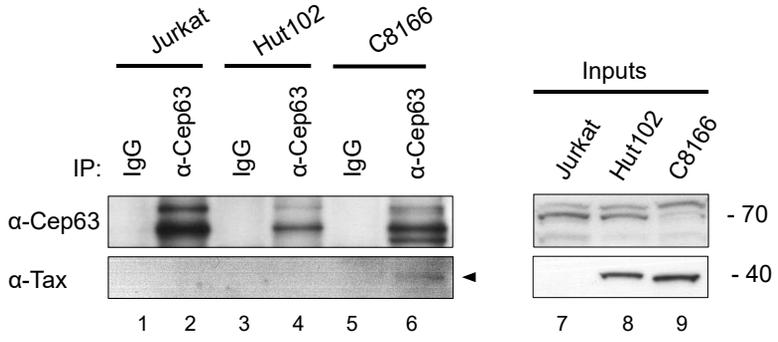
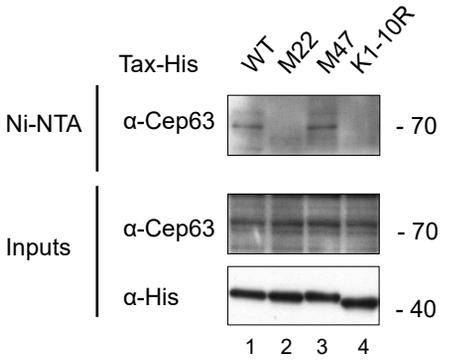
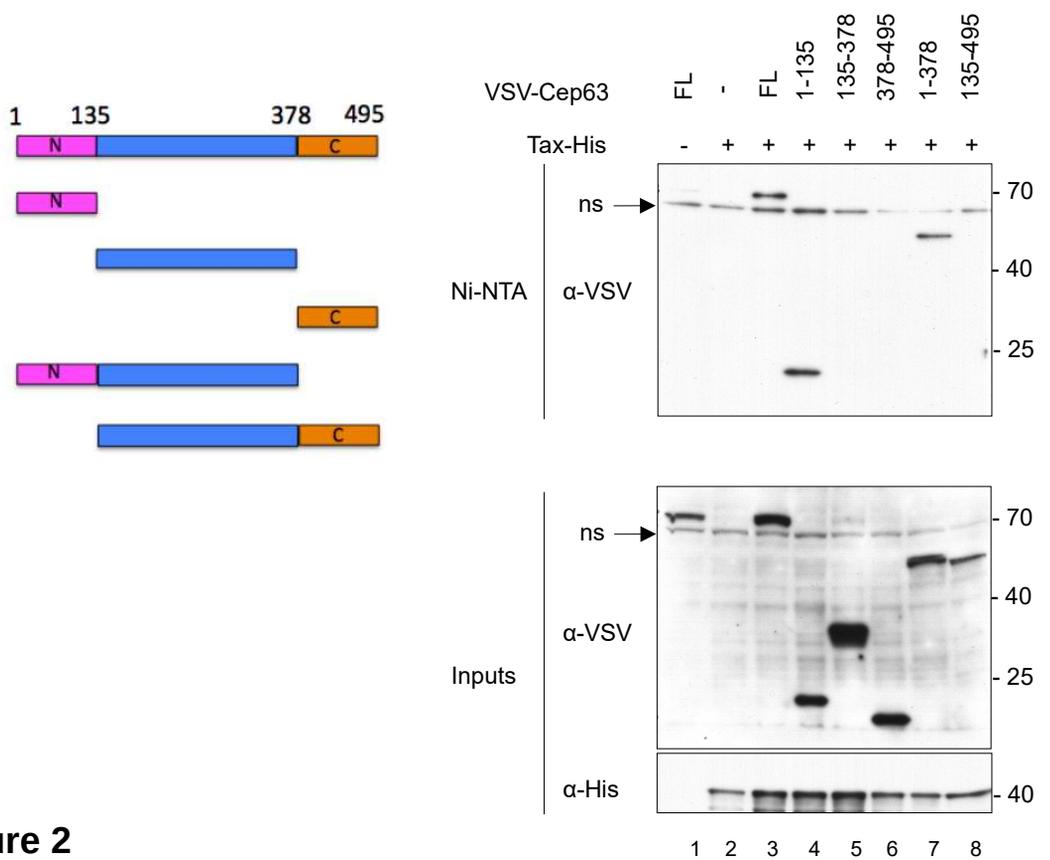


Figure 1

A**B****C****D****E****Figure 2**

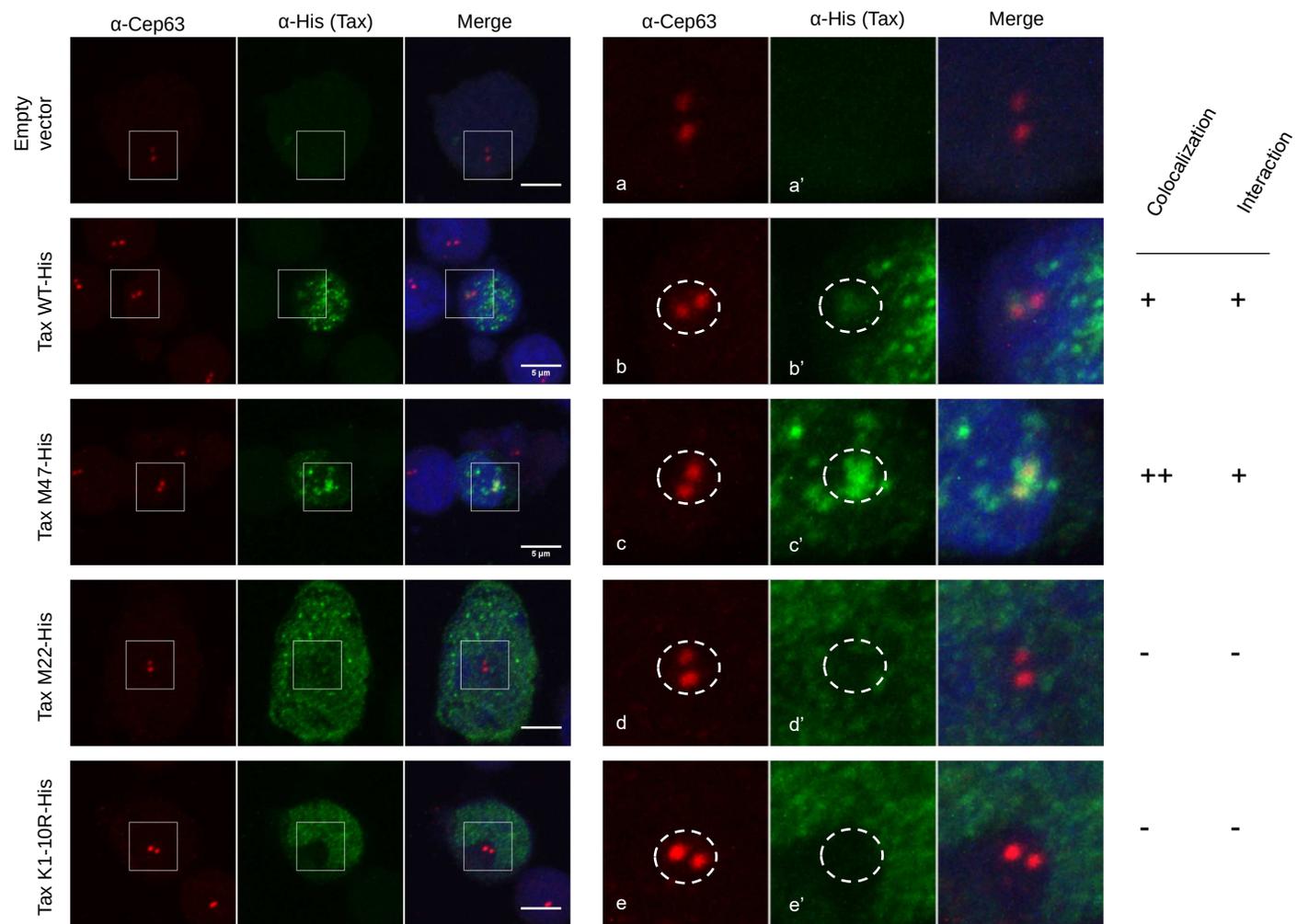


Figure 3

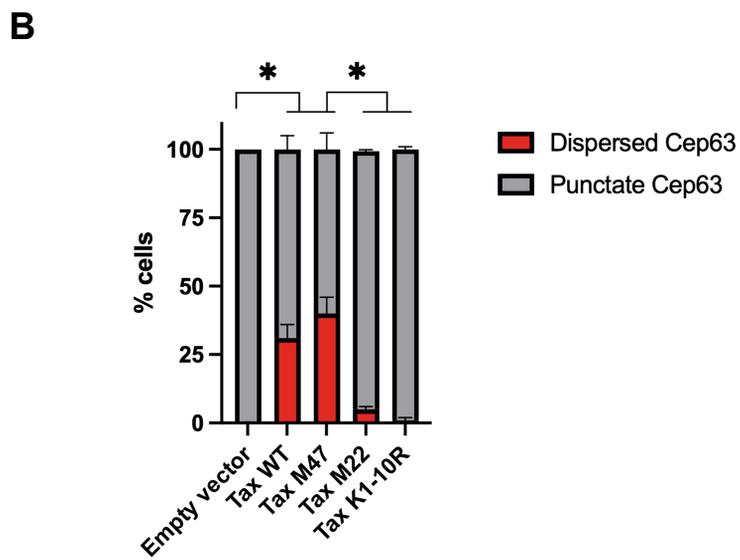
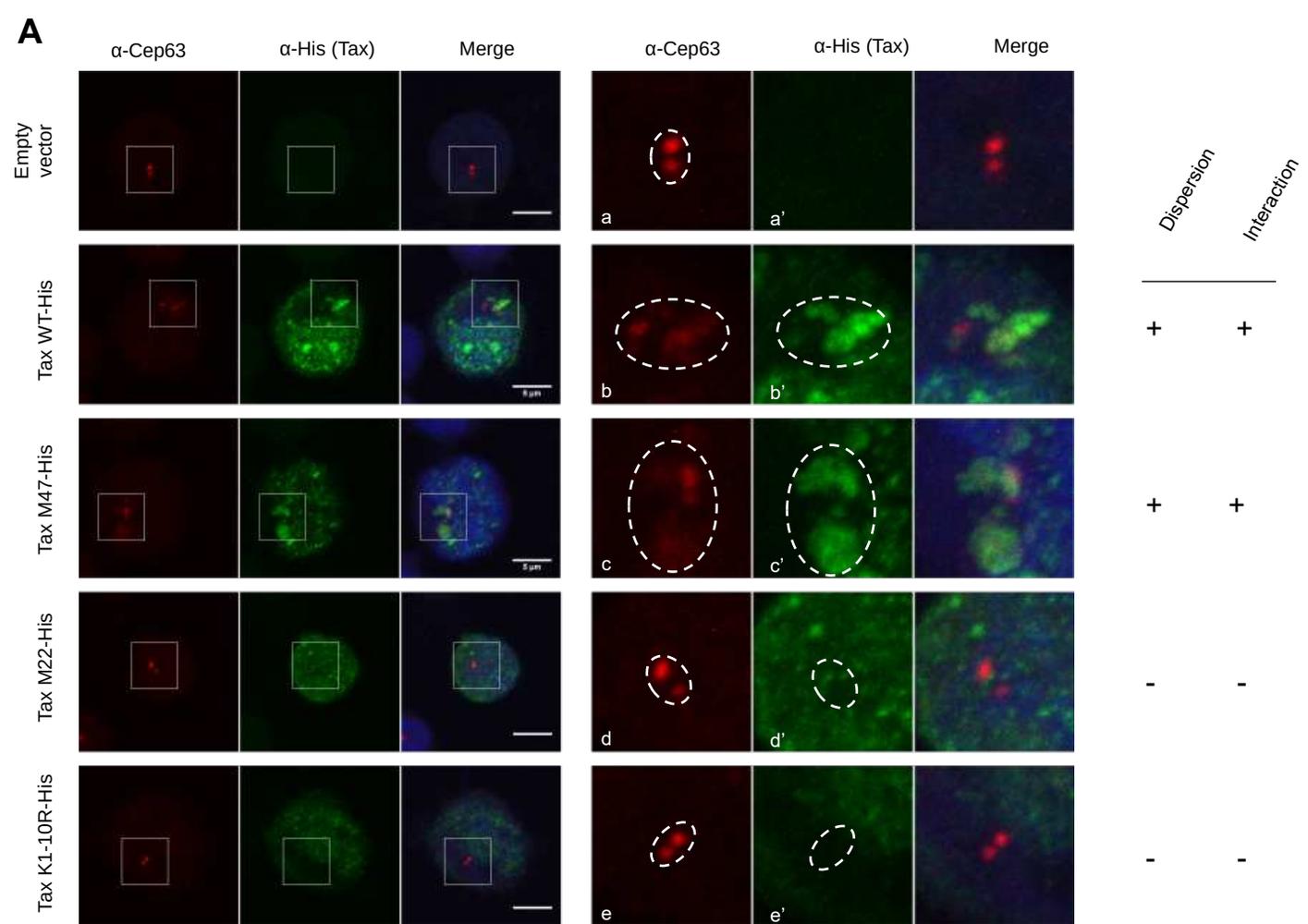
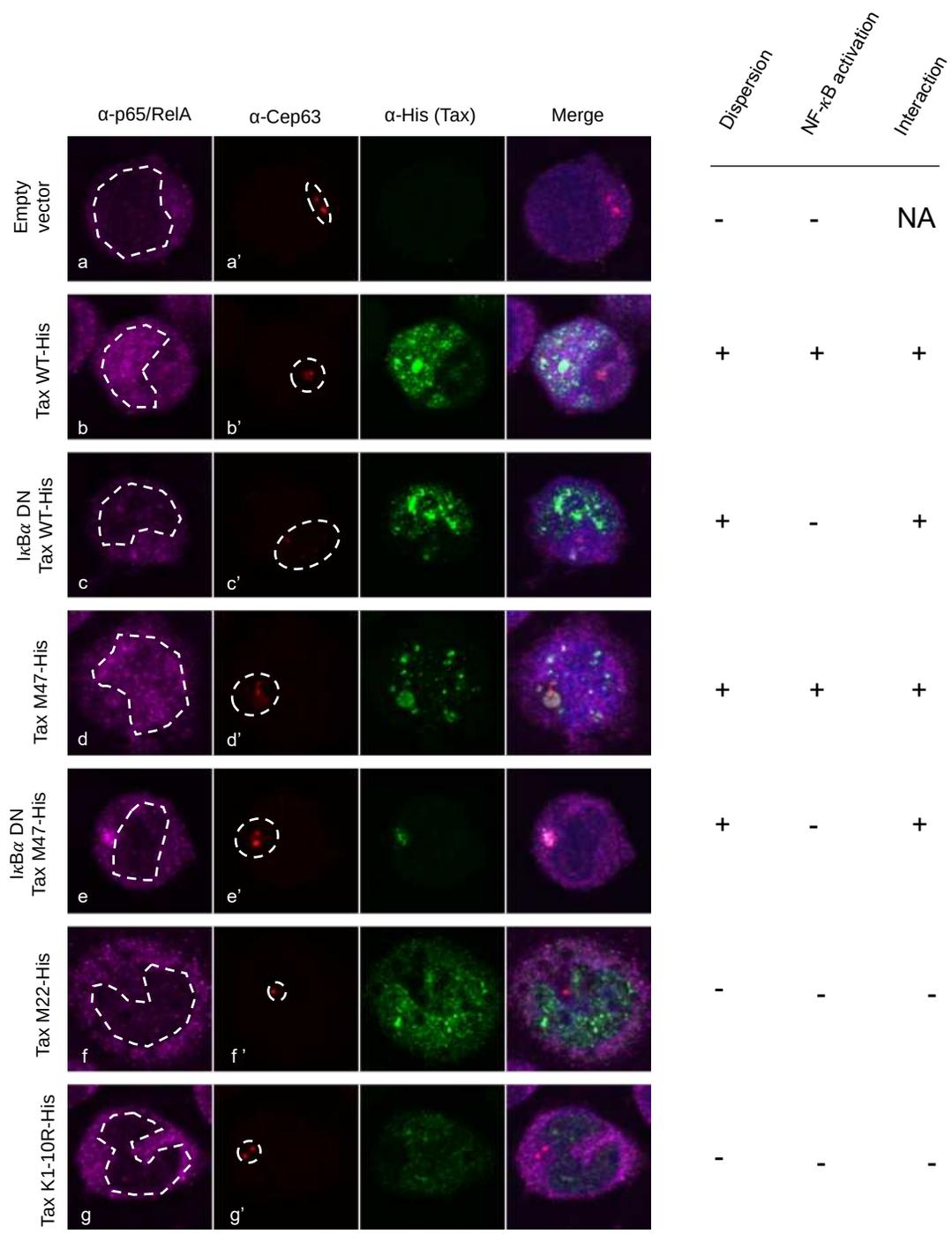
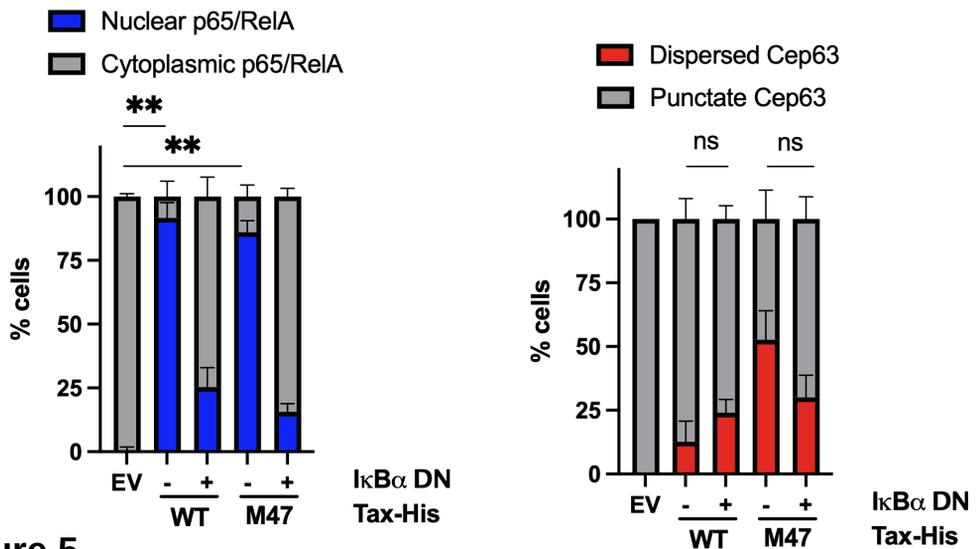


Figure 4

A**B****Figure 5**

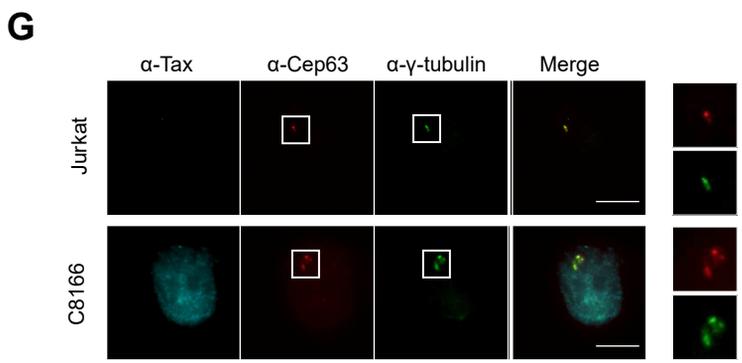
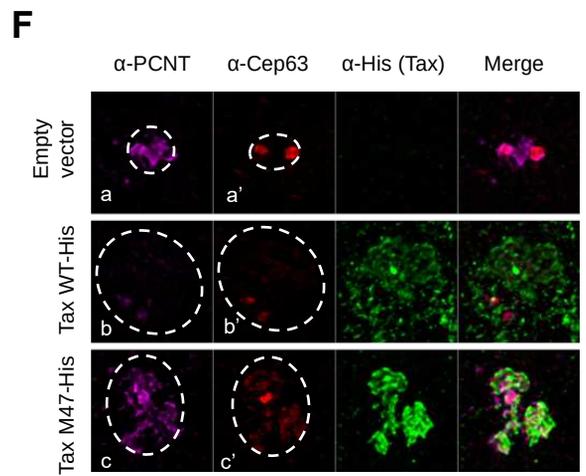
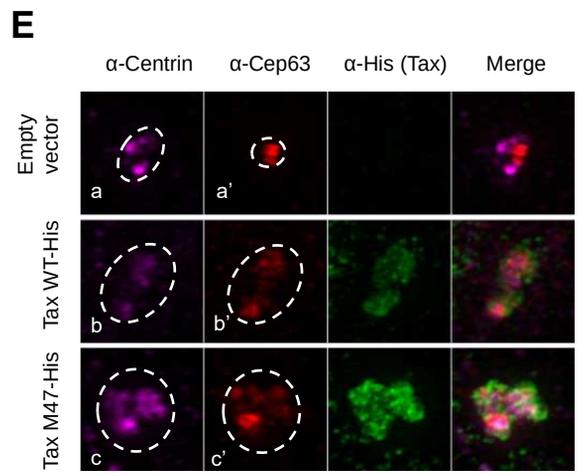
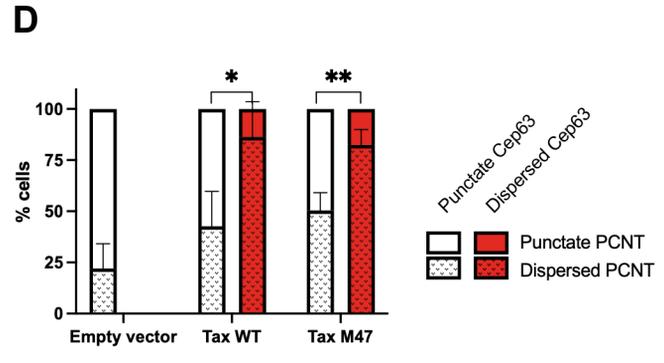
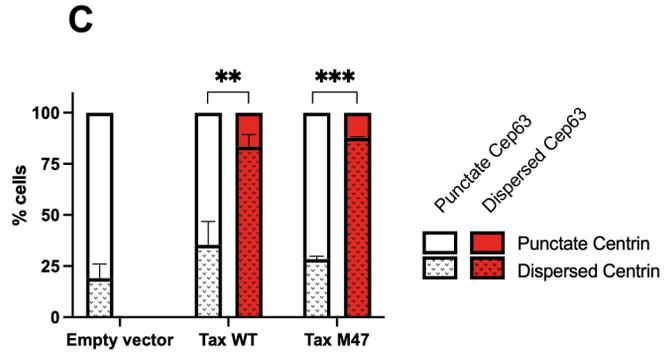
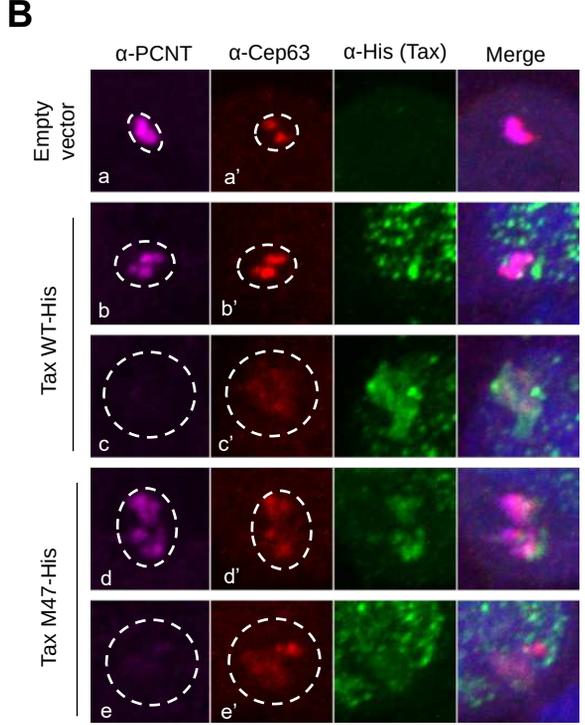
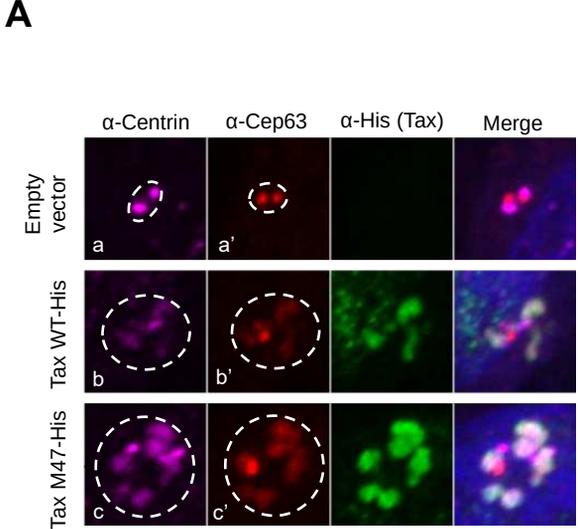
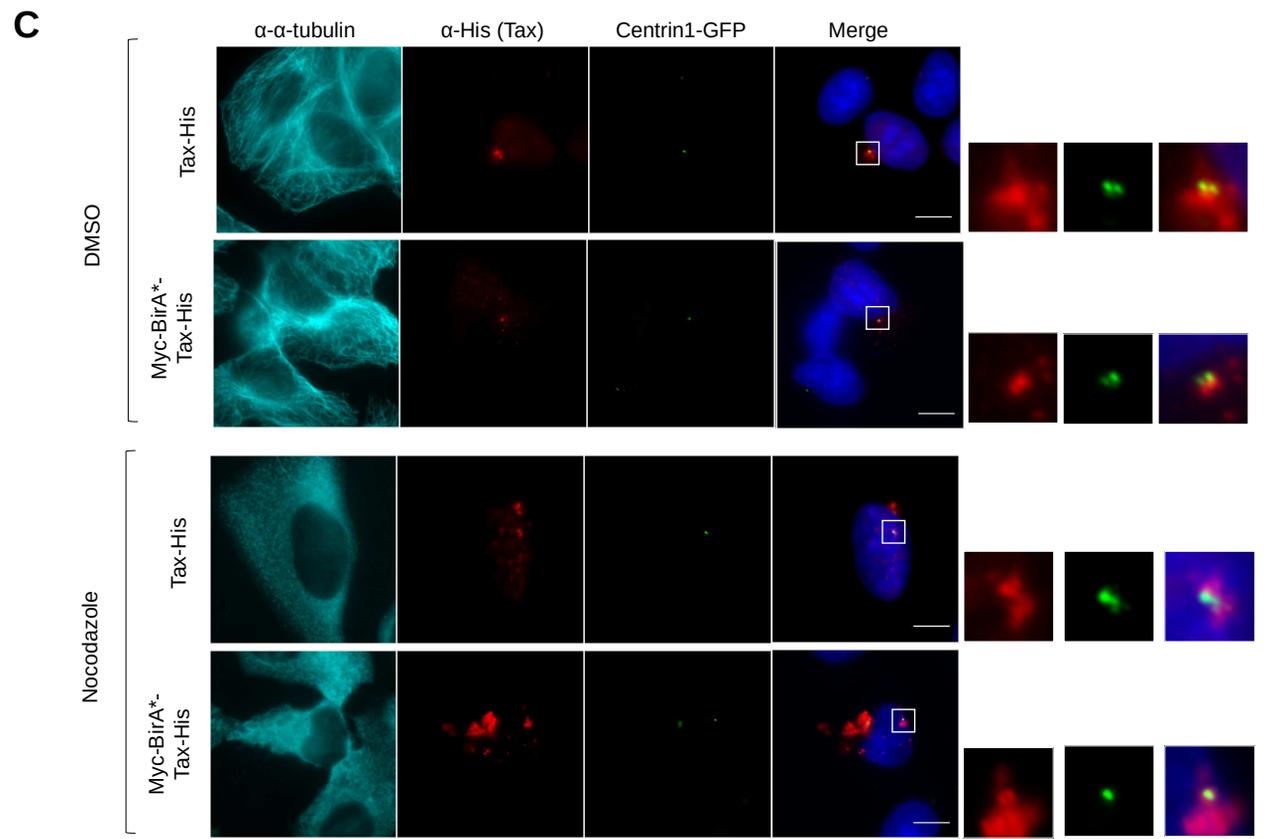
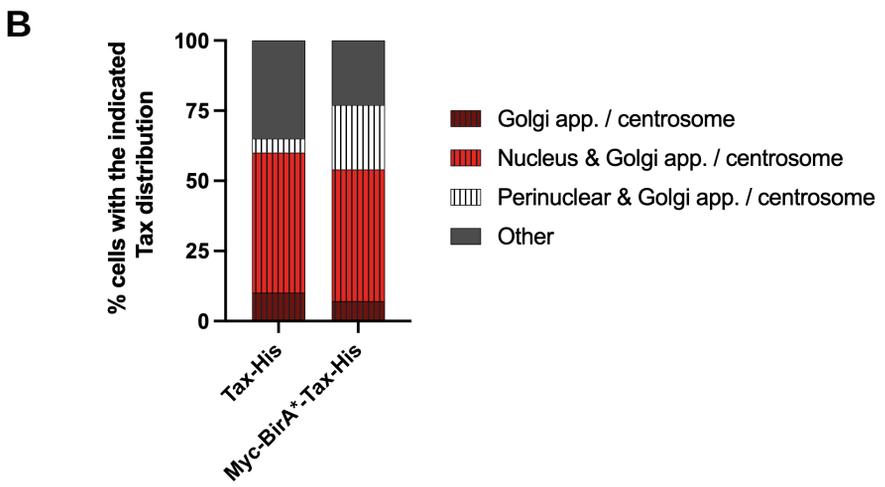
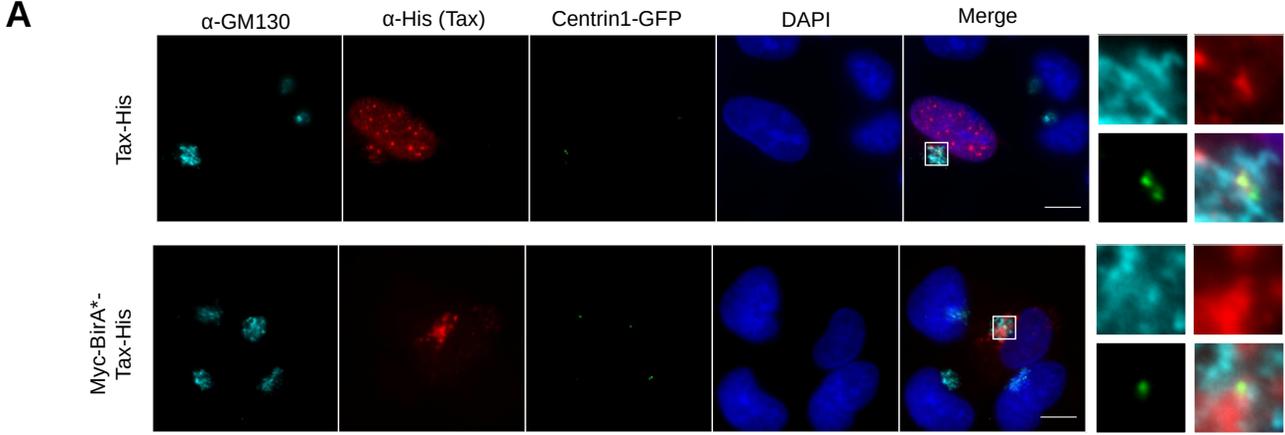


Figure 6



Supp. Figure 1

UniProt ID	Entry Name	Name
HUMAN HGNC=1771 UniProtKB=P24941	CDK2_HUMAN	Cyclin-dependent kinase 2
HUMAN HGNC=13666 UniProtKB=Q9NRG9	AAAS_HUMAN	Aladin
HUMAN HGNC=11393 UniProtKB=O14965	AURKA_HUMAN	Aurora kinase A
HUMAN HGNC=25309 UniProtKB=Q6P2H3	CEP85_HUMAN	Centrosomal protein of 85 kDa
HUMAN HGNC=30288 UniProtKB=Q9NZJ0	DTL_HUMAN	Denticleless protein homolog
HUMAN HGNC=1990 UniProtKB=Q8WVK9	CKAP2_HUMAN	Cytoskeleton-associated protein 2
HUMAN HGNC=7095 UniProtKB=O15344	TRI18_HUMAN	E3 ubiquitin-protein ligase Midline-1
HUMAN HGNC=11655 UniProtKB=P17987	TCPA_HUMAN	T-complex protein 1 subunit alpha
HUMAN HGNC=23169 UniProtKB=Q9Y224	RTRAF_HUMAN	RNA transcription, translation and transport factor protein
HUMAN HGNC=2584 UniProtKB=Q9NQ7	CYLD_HUMAN	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase CYLD
HUMAN HGNC=16068 UniProtKB=O95613	PCNT_HUMAN	Pericentrin
HUMAN HGNC=1580 UniProtKB=O95067	CCNB2_HUMAN	G2/mitotic-specific cyclin-B2
HUMAN HGNC=11233 UniProtKB=Q9UBP0	SPAST_HUMAN	Spastin
HUMAN HGNC=12310 UniProtKB=Q15650	TRIP4_HUMAN	Activating signal cointegrator 1
HUMAN HGNC=25886 UniProtKB=Q6NZ67	MZT2B_HUMAN	Mitotic-spindle organizing protein 2B
HUMAN HGNC=28109 UniProtKB=Q96BD8	SKA1_HUMAN	Spindle and kinetochore-associated protein 1
HUMAN HGNC=10667 UniProtKB=Q96C92	ENTR1_HUMAN	Endosome-associated-trafficking regulator 1
HUMAN HGNC=428 UniProtKB=Q8TCU4	ALMS1_HUMAN	Alstrom syndrome protein 1
HUMAN HGNC=26146 UniProtKB=Q9NQ8C	IFT46_HUMAN	Intraflagellar transport protein 46 homolog
HUMAN HGNC=30532 UniProtKB=Q9BT25	HAUS8_HUMAN	HAUS augmin-like complex subunit 8
HUMAN HGNC=10899 UniProtKB=P63208	SKP1_HUMAN	S-phase kinase-associated protein 1
HUMAN HGNC=28961 UniProtKB=Q15004	PAF15_HUMAN	PCNA-associated factor
HUMAN HGNC=29062 UniProtKB=Q86Y57	C2CD5_HUMAN	C2 domain-containing protein 5
HUMAN HGNC=12370 UniProtKB=Q9BYV8	CEP41_HUMAN	Centrosomal protein of 41 kDa
HUMAN HGNC=15468 UniProtKB=Q9NP97	DLRB1_HUMAN	Dynein light chain roadblock-type 1
HUMAN HGNC=9077 UniProtKB=P53350	PLK1_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase PLK1
HUMAN HGNC=2567 UniProtKB=O75665	OFD1_HUMAN	Oral-facial-digital syndrome 1 protein
HUMAN HGNC=21215 UniProtKB=Q9H6K1	ILRUN_HUMAN	Protein ILRUN
HUMAN HGNC=30299 UniProtKB=Q5T3J3	LRIF1_HUMAN	Ligand-dependent nuclear receptor-interacting factor 1
HUMAN HGNC=2452 UniProtKB=P48730	KC1D_HUMAN	Casein kinase I isoform delta
HUMAN HGNC=24238 UniProtKB=Q5VT06	CE350_HUMAN	Centrosome-associated protein 350
HUMAN HGNC=25083 UniProtKB=Q8N0Z3	SPICE_HUMAN	Spindle and centriole-associated protein 1
HUMAN HGNC=24595 UniProtKB=Q8TCX1	DC2L1_HUMAN	Cytoplasmic dynein 2 light intermediate chain 1
HUMAN HGNC=15476 UniProtKB=P63167	DYL1_HUMAN	Dynein light chain 1, cytoplasmic
HUMAN HGNC=1722 UniProtKB=P06493	CDK1_HUMAN	Cyclin-dependent kinase 1
HUMAN HGNC=975 UniProtKB=O75934	SPF27_HUMAN	Pre-mRNA-splicing factor SPF27
HUMAN HGNC=17272 UniProtKB=Q9HC77	CENPJ_HUMAN	Centromere protein J
HUMAN HGNC=1161 UniProtKB=Q53E24	CEP55_HUMAN	Centrosomal protein of 55 kDa
HUMAN HGNC=24110 UniProtKB=O14530	TXND9_HUMAN	Thioredoxin domain-containing protein 9
HUMAN HGNC=5360 UniProtKB=P41134	ID1_HUMAN	DNA-binding protein inhibitor ID-1
HUMAN HGNC=28363 UniProtKB=Q9H7T9	AUNIP_HUMAN	Aurora kinase A and ninein-interacting protein
HUMAN HGNC=29381 UniProtKB=Q9BRK4	LZTS2_HUMAN	Leucine zipper putative tumor suppressor 2
HUMAN HGNC=26244 UniProtKB=Q8IW35	CEP97_HUMAN	Centrosomal protein of 97 kDa
HUMAN HGNC=6945 UniProtKB=P25205	MCM3_HUMAN	DNA replication licensing factor MCM3
HUMAN HGNC=26193 UniProtKB=Q1MSJ5	CSPP1_HUMAN	Centrosome and spindle pole-associated protein 1
HUMAN HGNC=25815 UniProtKB=Q96MT8	CEP63_HUMAN	Centrosomal protein of 63 kDa
HUMAN HGNC=31675 UniProtKB=Q9Y5A9	YTHD2_HUMAN	YTH domain-containing family protein 2
HUMAN HGNC=16909 UniProtKB=O14777	NDC80_HUMAN	Kinetochore protein NDC80 homolog
HUMAN HGNC=25530 UniProtKB=Q9NVX0	HAUS2_HUMAN	HAUS augmin-like complex subunit 2
HUMAN HGNC=167 UniProtKB=P61163	ACTZ_HUMAN	Alpha-centractin
HUMAN HGNC=27709 UniProtKB=A2RUB6	CCD66_HUMAN	Coiled-coil domain-containing protein 66
HUMAN HGNC=2712 UniProtKB=Q13561	DCTN2_HUMAN	Dynactin subunit 2
HUMAN HGNC=11133 UniProtKB=O95721	SNP29_HUMAN	Synaptosomal-associated protein 29
HUMAN HGNC=26933 UniProtKB=Q5T280	CI114_HUMAN	Putative methyltransferase C9orf114
HUMAN HGNC=4617 UniProtKB=P49841	GSK3B_HUMAN	Glycogen synthase kinase-3 beta
HUMAN HGNC=26558 UniProtKB=Q96M11	HYLS1_HUMAN	Hydrolethalus syndrome protein 1
HUMAN HGNC=26877 UniProtKB=Q8IYA6	CKP2L_HUMAN	Cytoskeleton-associated protein 2-like
HUMAN HGNC=8114 UniProtKB=Q5BJF6	ODFP2_HUMAN	Outer dense fiber protein 2

OPEN

SQSTM-1/p62 potentiates HTLV-1 Tax-mediated NF- κ B activation through its ubiquitin binding function

Aurélien Schwob^{1,2,7}, Elodie Teruel^{1,2,7}, Louise Dubuisson^{1,2}, Florence Lormières^{1,2}, Pauline Verlhac^{3,4}, Yakubu Princely Abudu⁵, Janelle Gauthier^{1,2}, Marie Naoumenko^{1,2}, Fanny-Mei Cloarec-Ung^{1,2,6}, Mathias Faure³, Terje Johansen⁵, Hélène Dutartre^{1,2}, Renaud Mahieux^{1,2} & Chloé Journo^{1,2*}

The NF- κ B pathway is constitutively activated in adult T cell leukemia, an aggressive malignancy caused by Human T Leukemia Virus type 1 (HTLV-1). The viral oncoprotein Tax triggers this constitutive activation by interacting with the ubiquitin-rich IKK complex. We previously demonstrated that Optineurin and TAX1BP1, two members of the ubiquitin-binding, Sequestosome-1 (SQSTM-1/p62)-like selective autophagy receptor family, are involved in Tax-mediated NF- κ B signaling. Here, using a proximity-dependent biotinylation approach (BioID), we identify p62 as a new candidate partner of Tax and confirm the interaction in infected T cells. We then demonstrate that p62 knock-out in MEF cells as well as p62 knock-down in HEK293T cells significantly reduces Tax-mediated NF- κ B activity. We further show that although p62 knock-down does not alter NF- κ B activation in Jurkat T cells nor in infected T cells, p62 does potentiate Tax-mediated NF- κ B activity upon over-expression in Jurkat T cells. We next show that p62 associates with the Tax/IKK signalosome in cells, and identify the 170–206 domain of p62 as sufficient for the direct, ubiquitin-independent interaction with Tax. However, we observe that this domain is dispensable for modulating Tax activity in cells, and functional analysis of p62 mutants indicates that p62 could potentiate Tax activity in cells by facilitating the association of ubiquitin chains with the Tax/IKK signalosome. Altogether, our results identify p62 as a new ubiquitin-dependent modulator of Tax activity on NF- κ B, further highlighting the importance of ubiquitin in the signaling activity of the viral Tax oncoprotein.

Human T cell Leukemia Virus type 1 (HTLV-1) is a member of the *Retroviridae* family and of the *Deltaretrovirus* genus^{1,2}. It infects at least 5 to 10 million people worldwide, notably in several endemic regions such as Japan, Sub-Saharan Africa, the Caribbean, Brazil and a part of Eastern Europe^{3,4}. HTLV-1 is the etiologic agent of Adult T cell Leukemia (ATL) and of a set of inflammatory diseases including Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-Associated Myelopathy (HAM/TSP)⁵. At the cellular level, HTLV-1 induces the constitutive activation of the NF- κ B signaling pathway in infected T cells. This drives both cell transformation and inflammation^{6,7}. The viral transactivator Tax promotes constitutive activation of both the canonical and non-canonical NF- κ B pathways⁸.

¹International Center for Research in Infectiology, Retroviral Oncogenesis Laboratory, INSERM U1111 – Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308,  cole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon, Lyon, France. ²Equipe labellis e "Fondation pour la Recherche Médicale", Paris, France. ³International Center for Research in Infectiology, Autophagy, Infection, Immunity Laboratory, INSERM U1111 – Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308,  cole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon, Lyon, France. ⁴Department of Biomedical Sciences of Cells and Systems, Section Molecular Cell Biology, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands. ⁵Molecular Cancer Research Group, Institute of Medical Biology, University of Troms  - The Arctic University of Norway, Troms , Norway. ⁶ cole Normale Supérieure Paris-Saclay, Université Paris-Saclay, Cachan, France. ⁷These authors contributed equally: Aurélien Schwob and Elodie Teruel. *email: chloe.journo@ens-lyon.fr

In non-infected T cells, the canonical NF- κ B pathway is activated downstream of several receptors, such as Toll-Like Receptors (TLR), Tumor Necrosis Factor Receptors (TNFR) and the T Cell Receptor (TCR). Regardless of the nature of the receptor, its engagement results in the recruitment of the I κ B kinase (IKK) complex by K63-linked and linear M1-linked polyubiquitin chains borne by signaling intermediates, such as TRAF6, RIP1 or MALT1, or by unanchored polyubiquitin chains⁹. The IKK complex activation then promotes the I κ B α inhibitor phosphorylation, followed by its ubiquitination and proteasomal degradation, allowing NF- κ B nuclear translocation and target gene transactivation.

HTLV-1 Tax has been shown to recruit the IKK γ regulatory subunit of the IKK complex^{10–12} via direct interaction strengthened by Tax-conjugated K63-polyubiquitin chains^{13–19}, leading to I κ B α degradation and NF- κ B activation²⁰. In addition, recent studies also suggested that Tax could enhance synthesis of unanchored polyubiquitin chains by RNF8²¹, and of hybrid K63- and M1-linked polyubiquitin chains by LUBAC²². Tax could thus trigger IKK activation through indirect, ubiquitin-dependent interactions, by organizing an active macromolecular IKK signalosome. On the other hand, it was also suggested that Tax acts as an E3-ubiquitin ligase that directly catalyzes synthesis of unanchored polyubiquitin chains, although these results are still debated²³.

The Tax/IKK signalosome has been described as a cytoplasmic complex associated with the centrosome and the Golgi^{14,16,19} that assembles mainly on lipid rafts²⁴ by a mechanism that relies on the membrane-associated CADM1 protein²⁵. In a previous work, we identified both Optineurin (OPTN) and Tax1-Binding Protein 1 (TAX1BP1) as crucial cellular partners involved in Tax-dependent NF- κ B activation²⁶. More specifically, OPTN was shown to interact with Tax in Golgi-associated structures and to enhance its K63-polyubiquitination in a TAX1BP1-dependent manner. OPTN and TAX1BP1 association with the Tax/IKK signalosome on lipid raft-enriched membranes in infected cell lysates was further confirmed by other investigators²⁵. Independently, Shembade *et al.* demonstrated that Tax interaction with TAX1BP1 impaired the assembly of the inhibitory TAX1BP1/A20 complex, further contributing to constitutive NF- κ B activation²⁷.

Both OPTN and TAX1BP1 have recently been identified as members of the Sequestosome-1 (SQSTM-1/p62)-like selective autophagy receptor (SLR) family^{28–31}, which function as selective macroautophagy receptors³². Interestingly, in addition to its function as a selective autophagic receptor, p62 has also been shown to potentiate NF- κ B signaling downstream of TNF α and IL-1 stimulation by interacting with PKC ζ , RIP1, TRAF6 and IKK γ , and enhancing TRAF6 E3 ubiquitin ligase activity towards TRAF6 itself and towards IKK γ ^{33–37}. p62 was further shown to interact with MEKK3 and to allow MEKK3 association with TRAF6, thereby allowing MEKK3-induced activation of NF- κ B³⁸. p62 also potentiates TRAF6-dependent NF- κ B signaling downstream of CD40 activation in macrophages³⁹. Upon TCR stimulation in T cells, p62 was identified as an essential scaffold that mediates clustering of the MALT1-BCL10-TRAF6 signalosome upstream of IKK activation⁴⁰. Taken together, these findings suggest a crucial scaffolding hub function for p62 in NF- κ B signaling. Herein, we identify p62 as a new partner of Tax and demonstrate that in addition to OPTN and TAX1BP1, p62 also potentiates Tax-mediated NF- κ B signaling. We further show that p62 associates with the Tax/IKK signalosome in infected cells. Data obtained using p62 mutants suggest that p62 could potentiate Tax activity by binding to ubiquitin chains. Altogether, our results identify p62 as a new modulator of Tax activity on NF- κ B and support a ubiquitin-dependent scaffolding role for p62 in this process.

Results

Proximity-dependent biotinylation by BirA*-Tax fusion protein identifies p62 as a new partner of Tax.

In order to identify new cellular partners of Tax involved in NF- κ B signaling, we took advantage of BioID, a recently developed proximity-dependent labelling approach⁴¹. In this procedure, the protein of interest (here Tax) is fused to a biotin ligase domain modified from an *E. coli* enzyme (BirA*). Expression of this fusion protein in the presence of biotin allows proximity-dependent labelling of partners in a 10nm-radius. Biotinylated partners are then purified and analyzed by mass spectrometry. We first verified that the BirA*-Tax fusion protein was able to induce biotinylation (Fig. 1a). Of note, BirA*-Tax displayed the expected subcellular localization previously described for Tax, with nuclear speckles as well as a perinuclear accumulation of Tax reminiscent of the Tax/IKK signalosome associated with the Golgi apparatus¹⁴ (Fig. 1b, see arrows). BirA*-Tax-mediated biotinylation depended on proximity, as shown by the colocalization of BirA*-Tax and Streptavidin-stained biotinylated protein (Fig. 1b). Using a NF- κ B-dependent luciferase reporter assay, we then verified that the BirA*-Tax fusion protein conserved its ability to activate the NF- κ B pathway (Fig. 1c). The BirA*-Tax fusion protein conserved its ability to undergo polyubiquitination, a feature required for NF- κ B signaling^{13–19}, as shown by its purification by Ni-NTA pulldown under denaturing conditions followed by ubiquitin-specific western blotting (Fig. 1d). These control experiments indicate that the BirA*-fused Tax construct is appropriate for identifying cellular partners involved in NF- κ B signaling.

We then purified the biotinylated proteins from BirA*-Tax-expressing cells and subjected them to mass spectrometry identification. As a control, biotinylated proteins from BirA*-only expressing cells were also analyzed. One of the top-ranked BirA*-Tax-specific protein identified in the three independent replicas was identified as Sequestosome-1 (SQSTM-1/p62, Fig. 1e), indicating that p62 could be a proximity partner of Tax.

We then verified whether Tax and p62 could interact in infected T cells. Co-immunoprecipitation assays were performed in HTLV-1 chronically-infected C8166, HuT102 and C91PL cells (Fig. 1f). Endogenous Tax and p62 co-immunoprecipitated in all these cell lines, confirming that p62 is indeed a partner of Tax.

p62 potentiates Tax-dependent NF- κ B activation. Because p62 has been shown to potentiate NF- κ B signaling downstream of TNF α and IL-1 stimulation, we first assessed whether p62 also modulates Tax-induced NF- κ B signaling. We first compared Tax-induced NF- κ B activation in WT and p62^{-/-} MEF cells using a NF- κ B-dependent luciferase reporter assay. Interestingly, Tax-dependent NF- κ B activation was significantly lower in p62^{-/-} MEF cells compared to wild type cells, reaching only 50% of maximal activation (Fig. 2a), thus

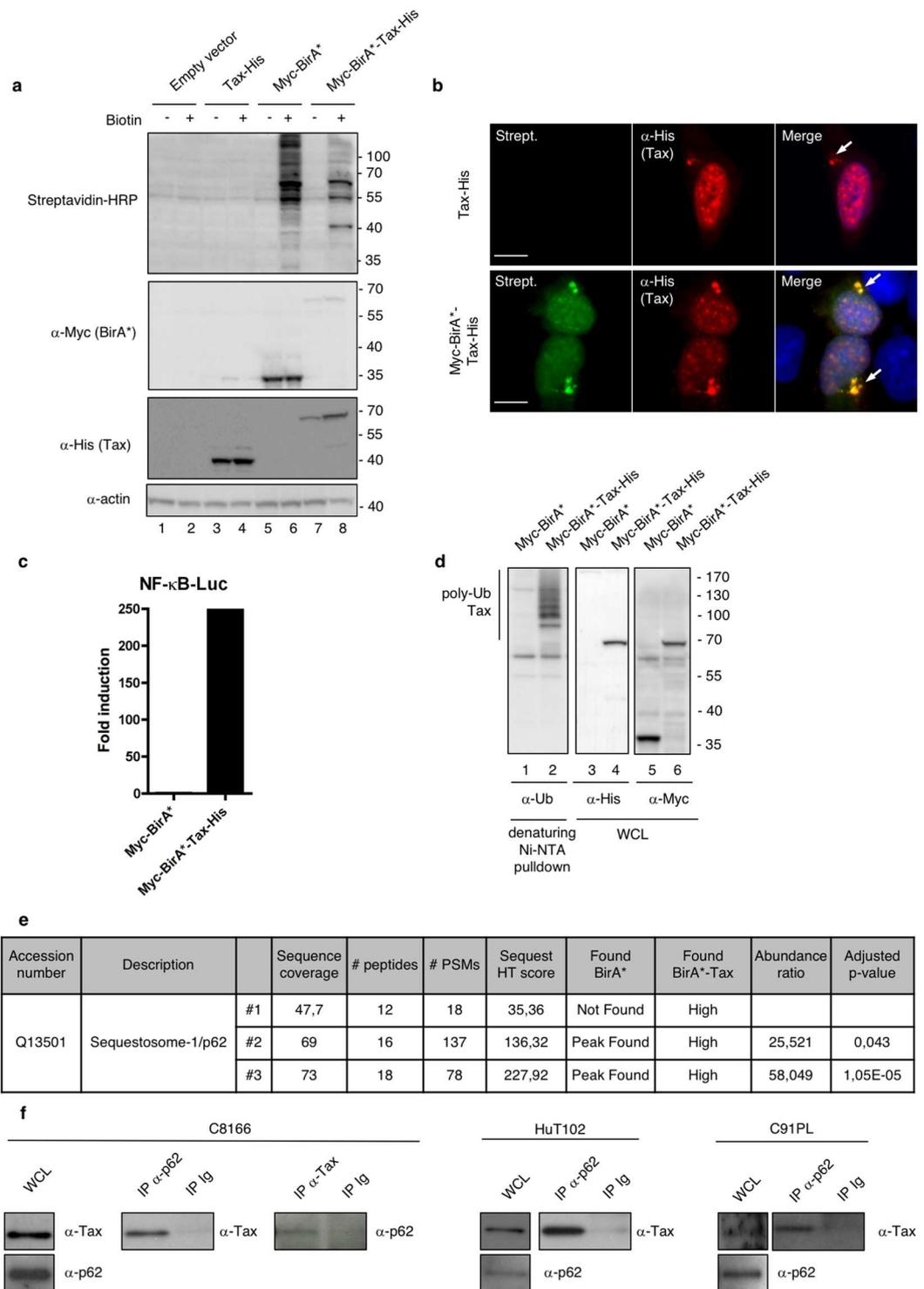


Figure 1. Functional validation of the BirA*-Tax fusion protein and identification of p62 as a new candidate partner of Tax. **(a)** Lysates from HEK293T cells transfected with the indicated plasmids for 24 h and then treated overnight with biotin or left untreated were analyzed by western blot. **(b)** U2OS cells transiently expressing Tax-His or Myc-BirA*-Tax-His and treated overnight with biotin were analyzed by epifluorescence microscopy after staining with Streptavidin (Strept., green) and His-specific antibodies (red). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Representative images are shown. Scale bar = 10 μ m. The arrows indicate perinuclear accumulation of Tax/IKK signal. **(c)** HEK293T cells were transfected with Myc-BirA* or Myc-BirA*-Tax-His, together with an NF- κ B-luc construct. Luciferase activity was measured and normalized over the “Myc-BirA*” condition. The graph shows the result from a representative experiment. **(d)** Lysates from HEK293T cells transiently expressing Myc-BirA* or Myc-BirA*-Tax-His were submitted to a His-specific Ni-NTA pulldown in denaturing conditions before western blot analyses. WCL, whole cell lysate. **(e)** SQSTM-1/p62 is a BirA*-Tax-specific biotinylated protein identified by mass spectrometry. **(f)** Lysates

from HTLV-1 chronically infected cells (C8166, HuT102 or C91PL cells) were immunoprecipitated with a p62-specific or Tax-specific antibody, or with control Ig (IP Ig). Samples were then analyzed by western blot. WCL, whole cell lysates. Full-length blots are presented in Supplementary Fig. S4.

indicating that p62 is necessary for an optimal activation of NF- κ B by Tax. To verify that p62 is specifically involved in Tax-mediated NF- κ B activation, and not in other functions of Tax such as the HTLV-1 LTR transactivation, we repeated the experiment using an LTR-dependent reporter. p62 knock-out did not significantly affect Tax-dependent HTLV-1 LTR activation (Supplementary Fig. S1), thus demonstrating an NF- κ B-specific interplay between p62 and Tax. To confirm the involvement of p62 in Tax-mediated NF- κ B activation in a luciferase reporter-independent assay, an ELISA assay was performed to quantify the transcriptionally active form of p65 (i.e. able to bind an NF- κ B-responsive promoter) in nuclear extracts from Tax-transfected WT and p62^{-/-} MEF cells (Fig. 2b and Supplementary Fig. S1 for the controls of cell fractionation). While an increasing level of Tax expression led to an increasing amount of transcriptionally active p65 in WT MEF cells, the increase in transcriptionally active p65 upon Tax expression was undetectable in p62^{-/-} MEF cells (Fig. 2b, compare grey bars). As an additional control, we further checked that p62 knock-out did not affect Tax expression levels (Fig. 2c, compare lanes 2–4 with lanes 6–8).

Then, in order to confirm the importance of p62 in Tax-mediated NF- κ B activation, we measured *Il6* expression as an NF- κ B target gene in WT or p62^{-/-} MEF cells (Fig. 2d). In contrast to WT MEF cells in which Tax expression led to an average 7.5-fold increase in *Il6* mRNA abundance, *Il6* was barely up-regulated upon Tax expression in p62^{-/-} MEF cells (Fig. 2d, left and middle panels), confirming that p62 is required for full NF- κ B activation by Tax in MEF cells.

Because these results were obtained in murine cells, we then confirmed that p62 was required for an efficient NF- κ B activation by Tax in human cells by comparing Tax activity in mock- and p62-silenced HEK293T cells (Fig. 2e). In agreement with data from p62^{-/-} MEF cells, Tax-dependent NF- κ B activation was significantly lower in p62-silenced cells compared to mock-silenced cells (Fig. 2e). As a control, we checked that Tax expression levels were also stable upon p62 silencing in HEK293T cells (Fig. 2f, compare lanes 3 and 6). Results from reporter assays were confirmed with two additional siRNA targeting p62 (Supplementary Fig. S1), and expression of ectopic p62 in p62-knocked down cells restored full Tax-induced NF- κ B activation (Supplementary Fig. S1), further confirming that p62 is responsible for the modulation of Tax function. Of note, the magnitude of p62 effect on Tax-dependent NF- κ B activation was similar to the well-documented effect of OPTN, as shown by silencing either p62 or OPTN in HEK293T cells before assaying NF- κ B activity (Supplementary Fig. S1). Similar to results obtained in MEF cells, no significant difference was observed for HTLV-1 LTR activation upon p62 silencing (Supplementary Fig. S1), indicating that p62 is specifically involved in Tax-mediated NF- κ B activation in HEK293T cells.

Finally, Tax activity was analyzed in human T cells. Surprisingly, in HTLV-1-infected cells, p62 silencing did not alter IKK complex activation, as shown by WB analysis of IKK α / β phosphorylation, I κ B α phosphorylation and I κ B α degradation in C91PL and C8166 cells (Supplementary Fig. S2). Similarly, p62 silencing in Jurkat T cells did not inhibit Tax-induced NF- κ B activation, as shown by WB analysis of IKK α / β phosphorylation and I κ B α degradation as well as by a luciferase assay using an NF- κ B reporter construct (Supplementary Fig. S2). Importantly, and consistent with a role of p62 in Tax-induced NF- κ B activation, expression of ectopic p62 in Jurkat T cells resulted in a 4-fold potentiation of Tax-induced NF- κ B activity compared to cells expressing endogenous levels of p62 (Fig. 2g). Of note, the potentiation of Tax-induced NF- κ B activation by p62 was confirmed at the level of endogenous IKK α / β phosphorylation in Jurkat T cells, which was specifically detected in Tax-transduced cells and not in mock-transduced cells (Fig. 2h, compare lanes 1–3–5 with lanes 2–4–6), and which increased upon p62 over-expression in the presence of Tax (Fig. 2h, compare lanes 2, 4 and 6). Control western blot as well as flow cytometry analyses confirmed the expression of Tax following transduction as well as the expression of ectopic p62 (Fig. 2h and Supplementary Fig. S2).

Altogether, these results demonstrate that p62 modulates Tax-dependent NF- κ B activation in all tested cell types, including human T cells. This effect is specific for NF- κ B activation, as p62 is not required for HTLV-1 LTR activation. Mechanistically, this first set of experiments indicates that p62 impacts Tax activity upstream of IKK α / β phosphorylation.

p62 interacts with the Tax/IKK signalosome in peri-Golgi structures. To explain the potentiation of Tax-dependent IKK activation by p62, and because p62 is known to mediate scaffolding of signaling complexes, we hypothesized that p62 could be associated with the Tax/IKK signalosome, which is known to assemble on golgian membranes. We then analyzed the localization of the Tax/p62 complexes in cells by investigating whether they also stained positive for the GM130 Golgi marker and for IKK γ , used here as a marker of the IKK complex. Confocal microscopy analyses were first performed in Jurkat T cells transiently expressing Tax. Consistent with previous reports, Tax was detected in perinuclear structures in addition to the nucleus (Fig. 3a, second row). Foci of Tax colocalization with endogenous p62 were observed in the cytoplasmic perinuclear region, but not in the nucleus. Perinuclear Tax/p62 speckles were distributed in the vicinity of the Golgi compartment with partial co-localization with GM130 (Fig. 3a, second row, see intensity plot on the right). Similar observations were made in the chronically infected C91PL cell line (Fig. 3a, third row and intensity plot on the right). We next investigated colocalization with IKK γ . As a control, Tax-negative Jurkat T cells exhibited a diffuse distribution of IKK γ and no co-localization between IKK γ and p62 (Fig. 3b, first row). Consistent with previous reports, IKK γ was massively relocalized both in Jurkat cells transiently expressing Tax and in infected C91PL cells, and perfectly colocalized with Tax in perinuclear structures (Fig. 3b, second and third rows). Interestingly, while p62-negative regions of

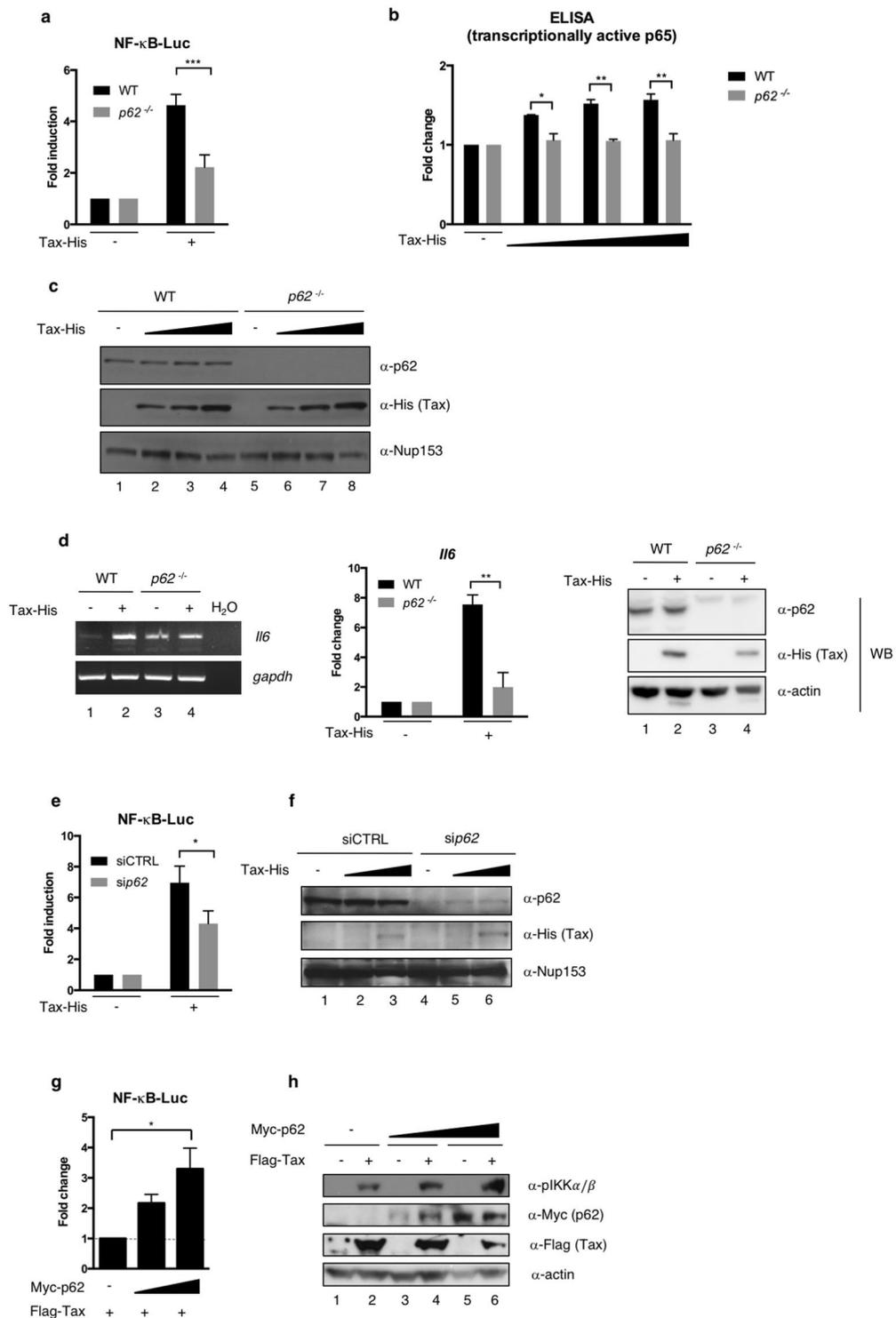


Figure 2. p62 potentiates Tax-dependent NF-κB activation upstream of IKK activation. (a) Wild type (WT) and *p62*^{-/-} MEF cells were transfected with Tax-His, together with an NF-κB-luc construct. Luciferase activity was measured and normalized over the corresponding Tax-negative condition. The graph shows results from at least 3 independent experiments. (b) WT and *p62*^{-/-} MEF cells were transfected with Tax-His. After fractionation of cell nuclei, transcriptionally active p65 was quantified by ELISA. (c) Lysates from WT and *p62*^{-/-} MEF cells transfected with Tax-His were analyzed by western blot. (d) WT and *p62*^{-/-} MEF cells were transfected with Tax-His. After RNA extraction and conversion to cDNAs, *Il6* and *gapdh* cDNAs were amplified by PCR (left panel). The normalized *Il6* signal intensities were calculated and are shown relative to the corresponding Tax-negative conditions on the graph (results from 2 independent experiments). Cell lysates were also analyzed by western blot (right panel). (e) HEK293T cells were transfected with control (siCTRL) or *p62*-specific (*sip62*) siRNA and Tax-His, together with an NF-κB-luc construct. Luciferase activity was measured and normalized over the corresponding Tax-negative condition. The graph shows results from at

least 3 independent experiments. (f) Lysates from HEK293T cells transfected with siCTRL or *sip62* and Tax-His were analyzed by western blot. (g) Jurkat cells were transfected with increasing amounts of Myc-p62 and an NF- κ B-luc construct, followed by transduction with an empty or Flag-Tax-encoding lentivector. Luciferase activity was measured and normalized to the corresponding Tax-negative condition. Values obtained with endogenous p62 were set to 1 and other values are shown as fold change over the “endogenous p62” condition. The graph shows results from 3 independent experiments. (h) Lysates from Jurkat cells were analyzed by western blot. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ (one-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc* test). Full-length blots and gels are presented in Supplementary Fig. S4.

Tax/IKK γ speckles were consistently observed (Fig. 3b, second row, see intensity plot, b), foci of Tax/p62 colocalization were consistently distributed at the periphery of the perinuclear Tax/IKK signalosome, showing an overlap with the IKK γ staining (Fig. 3b, second row, see intensity plot, a; and third row). Taken together, microscopy analyses thus suggest that a fraction of Tax/IKK complexes assembles with p62 in peri-golgian speckles.

To confirm that p62 assembles with Tax/IKK complexes, a biochemical approach was undertaken. HeLa cells were transiently transfected with FLAG-tagged IKK γ and His-tagged Tax constructs and the Tax/IKK signalosome was purified by FLAG-specific immunoprecipitation followed by His-selective Ni-NTA purification (Fig. 3c). FLAG-tagged IKK γ and His-tagged Tax-expressing cells analyzed by this two-step protocol showed that endogenous p62 co-purified with Tax and IKK γ (Fig. 3c, lane 3), demonstrating that p62 is indeed associated with the Tax/IKK signalosome.

p62 does not allow Tax autophagic degradation at the steady-state. Because p62 is known to function as a selective autophagy receptor that allows the recruitment of cargoes to autophagosomal membranes and their degradation following fusion with lysosomes^{32,42}, we investigated whether p62 could dually modulate Tax activity by concomitantly recruiting Tax to autophagic degradation. This was tested in HeLa cells stably expressing GFP-LC3, a widely accepted marker of autophagic structures⁴³. These cells were transiently transfected with a Tax-encoding plasmid and observed by confocal microscopy (Fig. 4a). Comparison of Tax, p62 and LC3 subcellular distributions showed that foci of Tax/p62 co-localization were GFP-positive (Fig. 4a, see merge panel and intensity plot), indicating that p62 can possibly recruit Tax into LC3-containing structures. Similar observations were made with OPTN (Fig. 4a, see merge panel and intensity plot). To determine whether this possible recruitment of Tax into LC3-containing structures by Tax-interacting selective autophagic receptors might correlate with Tax degradation by lysosomal activity, cells were treated with inhibitors of lysosomal enzymes (E64D and pepstatin) and Tax expression levels were monitored by western blot (Fig. 4b). While lysosomal inhibition stabilized p62 (Fig. 4b, compare lanes 1 and 2 and see quantification), as expected since p62 is a known substrate of autolysosomal degradation, it did not affect Tax expression levels, indicating that at the steady-state, Tax is not degraded in autolysosomes. In addition, starvation-induced autophagy activation (Fig. 4c, “HBSS”) only partially decreased Tax levels compared to p62 levels (Fig. 4c, compare lanes 1 and 2 and see quantification), indicating that starvation-induced autophagy does not efficiently degrade Tax. Taken together, these results suggest that at the steady-state, p62 does not recruit Tax into the autophagic degradation pathway. They thus further support the notion that p62 can potentiate Tax-dependent NF- κ B activation.

p62 directly interacts with Tax via the 170-206 region of p62. We next aimed at gaining insight into the mechanism of p62 potentiation of Tax activity on the NF- κ B pathway. To this end, mapping of the interaction domain between p62 and Tax was first undertaken. *In vitro* GST pull-down assays were performed using GST-p62 and *in vitro* translated ³⁵S-labeled Tax. This resulted in Tax detection after GST-p62 pull-down (Fig. 5a, lane 3), indicating that Tax and p62 interact directly. Repeating the experiment with GST-tagged deletion mutants of p62 (Fig. 5b), we further showed that the GST-p62 Δ 170-256 mutant alone was unable to pull down *in vitro* translated Tax, indicating that the 170-256 region of p62 is required for interaction with Tax (Fig. 5c). Using MBP-tagged deletion constructs of p62, we demonstrated that the p62 region 170-221, corresponding to the Multiple protein Interaction Region (MIR), was required for Tax binding (Fig. 5d). In addition, a fragment containing amino acids 170-206 of p62 fused to MBP was sufficient for binding Tax (Fig. 5d). Taken together, these results indicate that Tax interacts directly with p62 via the MIR domain of p62 and more specifically via the 170-206 region.

p62 binding to ubiquitin is required for p62 potentiation of Tax-mediated NF- κ B activation. Following the identification of the domain of p62 required for the interaction with Tax, we hypothesized that a p62 mutant deleted from this domain and thus unable to directly interact with Tax would be unable to potentiate Tax activity on NF- κ B. Surprisingly however, when repeating the functional luciferase assay in Jurkat T cells with ectopic p62 Δ 170-221, we observed that this p62 mutant did not lose its ability to potentiate Tax-mediated NF- κ B activity when compared to full-length (FL) p62 (Fig. 6a), indicating that direct interaction with Tax is dispensable for p62 function on Tax. Because Tax-induced activation of the IKK complex is known to rely on the assembly of a signalosome containing multiple anchored and unanchored ubiquitin chains, and because p62 is known to bind ubiquitin chains via its ubiquitin-associated UBA domain^{44,45}, we investigated whether the potentiation of Tax-mediated NF- κ B activation by p62 required binding of ubiquitin by p62. We thus included the p62 Δ UBA construct in the luciferase assay. This p62 mutant lost its ability to potentiate Tax-mediated NF- κ B activity when compared to the full-length p62 (Fig. 6a), indicating that p62 binding to ubiquitin chains is critical for its ability to enhance Tax-dependent NF- κ B signaling. As a control, we further checked that expression levels of both mutants were similar to full-length p62 (Supplementary Fig. S3).

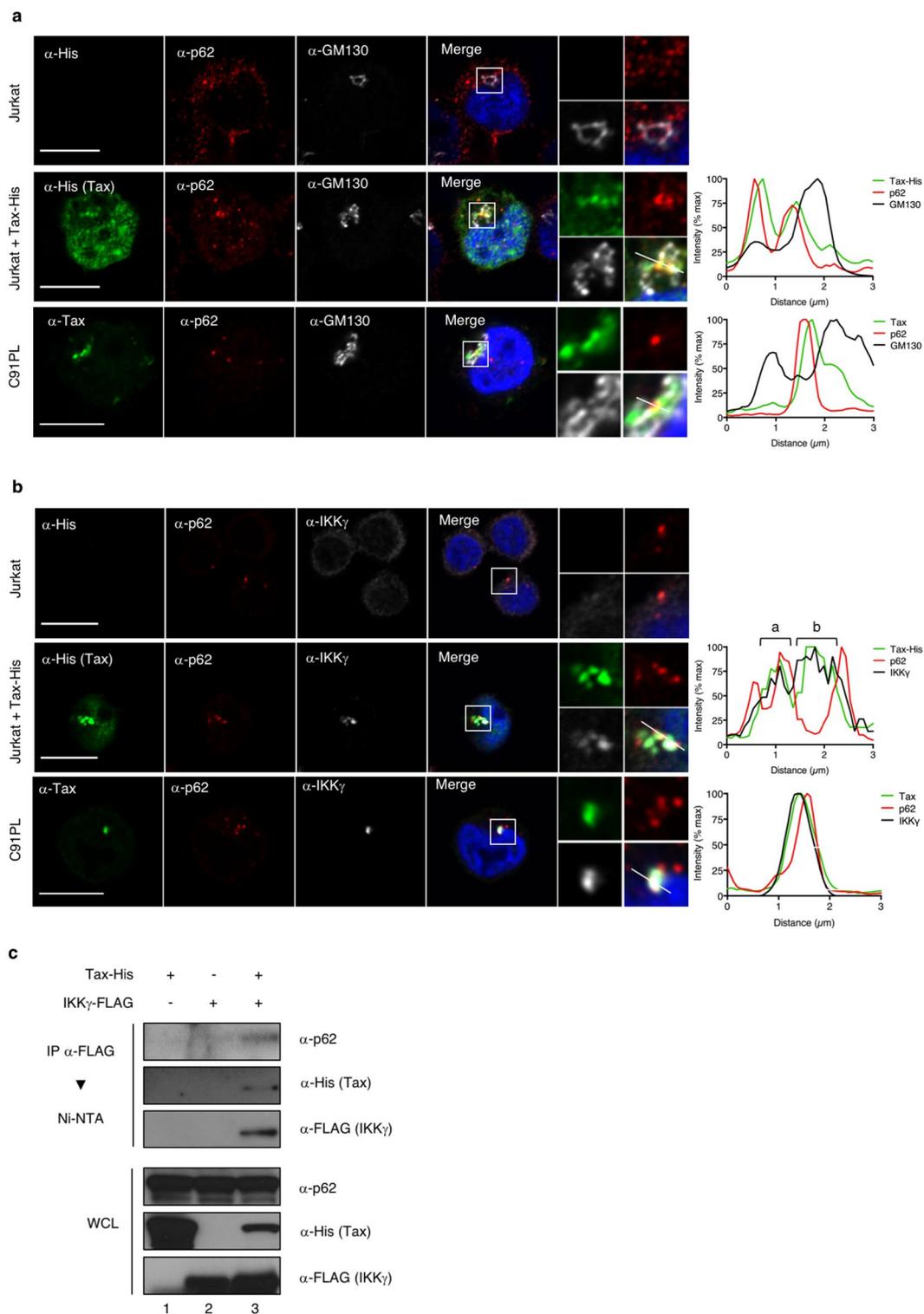


Figure 3. p62 associates with Tax/IKK signalosomes in peri-golgian structures. **(a,b)** Jurkat cells transiently expressing Tax-His and HTLV-1 chronically infected C91PL cells were analyzed by confocal microscopy after staining with His- or Tax- (green), p62- (red), and GM130- **(a)**, white) and IKK γ -specific **(b)**, white) antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Representative images are shown. Tax, p62, GM130 and IKK γ signals were quantified along the segments represented on the merge panels and plotted on the histogram. Scale bar = 10 μ m. **(c)** Lysates from HeLa cells transiently expressing Tax-His and/or IKK γ -FLAG were submitted to a FLAG-immunoprecipitation followed by a His-specific Ni-NTA purification and western blot analyses. Full-length blots are presented in Supplementary Fig. S4.

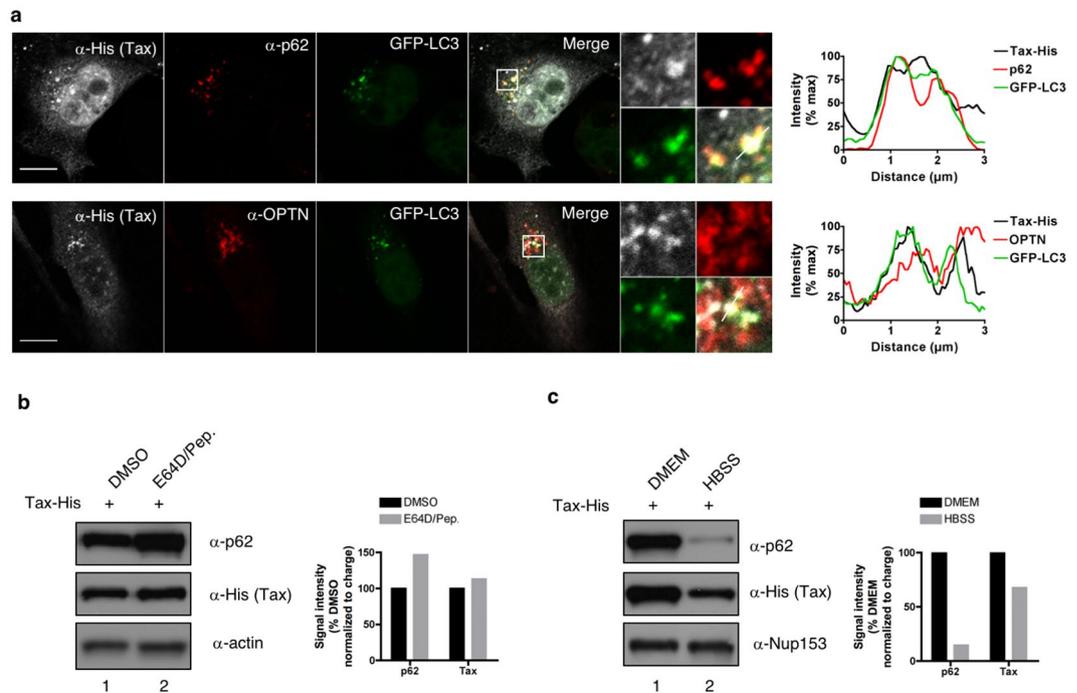


Figure 4. p62 does not allow Tax autophagic degradation at the steady-state. **(a)** HeLa cells stably expressing GFP-LC3 were transfected with Tax-His and analyzed by confocal microscopy after staining with His- (white) and p62- or OPTN-specific (red) antibodies. Representative images are shown. Tax, p62 or OPTN and GFP-LC3 signals were quantified along the segment represented on the merge panel and plotted on the histogram. Scale bar = 10 μ m. **(b,c)** HeLa cells transiently expressing Tax-His were treated with lysosomal inhibitors (**b**, E64D/Pep.) or starved (**c**, HBSS) before lysis, western blot analyses and quantification. Full-length blots are presented in Supplementary Fig. S4. Blots and graphs show results representative of at least 3 experiments.

Because assembly of protein complexes *in vitro* may not reflect the processes occurring in cells, we then asked whether the Δ 170-221 p62 mutant was able to associate with Tax in cells. Co-immunoprecipitation assays were performed using either the full-length or the Δ 170-221 p62 construct. Because p62 is known to polymerize, and in order to avoid rescue of mutant p62 function by polymerization with wild type p62, the experiment was conducted in $p62^{-/-}$ MEF cells (Fig. 6b). Interestingly, only a weak association between p62 Δ 170-221 and Tax was detected (Fig. 6b, compare lanes 4 and 5), indicating that the 170-221 domain of p62 is indeed necessary for an efficient association with Tax in cells, and thus, that p62 potentiating activity might not correlate with its degree of association with Tax. We then asked whether the UBA domain of p62 could be necessary for its interaction with Tax complexes in cells. Indeed, although it is dispensable for interaction with Tax *in vitro* (see Fig. 5c), it could facilitate recruitment of p62 to ubiquitin-rich Tax complexes in specific cell compartments. Co-immunoprecipitation assays were performed using either the full-length or the Δ UBA p62 construct (Fig. 6c). However, and consistent with Fig. 5c, p62 Δ UBA interacted with Tax as efficiently as full-length p62 (Fig. 6c, compare lanes 1 and 4), indicating that p62 binding to ubiquitin is not required for p62 to assemble with Tax complexes.

Tax harbors 10 lysine residues and ubiquitination on lysine 4 to 8 is required for interaction with IKK γ , OPTN and activation of the NF- κ B pathway^{13,14,16-18,26}. To further confirm that p62 interaction with Tax complexes does not rely on p62 binding to Tax-anchored ubiquitin chains, ubiquitination-defective Tax mutants (Tax-K4-8R, mutated on lysine 4 to 8, and Tax-K1-10R, mutated on all 10 lysine residues) were used. Ubiquitination-defective Tax mutants co-immunoprecipitated with endogenous p62 as efficiently as wild type Tax (Supplementary Fig. S3), indicating that Tax ubiquitination is not required for its interaction with p62, which is consistent with the *in vitro* pulldown experiments. In a control experiment, the antisense protein of HTLV-1 (HBZ) did not immunoprecipitate with p62 (Supplementary Fig. S3), indicating that the Tax/p62 interaction is specific in this assay.

We previously showed that OPTN potentiates Tax activity by stabilizing Tax polyubiquitination through the ubiquitin-binding domain of OPTN²⁶. To investigate whether p62 could act in a similar manner, we then compared Tax polyubiquitination in mock- and p62-silenced cells (Fig. 6d). Tax polyubiquitination was unaffected by p62 silencing (Fig. 6d, compare lanes 1 and 2), indicating that in contrast to OPTN²⁶, p62 does not modulate Tax polyubiquitination.

Because the p62 Δ UBA protein associates with Tax complexes but is unable to potentiate Tax activity, we further hypothesized that p62 could potentiate Tax activity by allowing the efficient association of the Tax with IKK γ in a ubiquitin-binding-dependent process. Wild type and $p62^{-/-}$ MEF cells were transiently transfected with FLAG-tagged IKK γ and His-tagged Tax constructs and cell lysates were submitted to anti-FLAG immunoprecipitation (Fig. 6e). Tax and IKK γ interacted equally efficiently in wild type and $p62^{-/-}$ cells (Fig. 6e, compare lanes

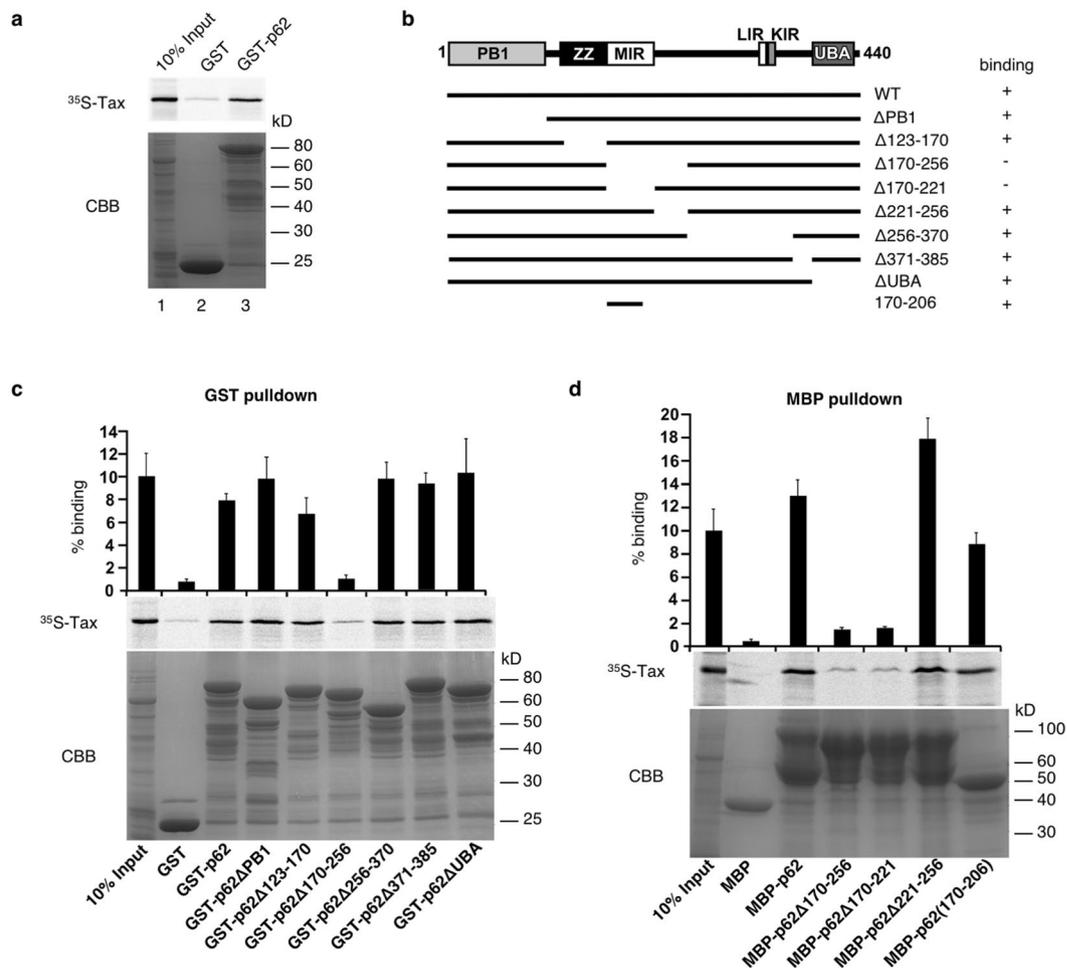


Figure 5. p62 directly interacts with Tax through its 170-206 domain. **(a)** GST and GST-tagged p62 were expressed in bacteria and used for GST pull-down of *in vitro* translated ³⁵S-labeled Tax. Inputs as well as eluates were run on SDS-PAGE gels and autoradiography was performed. **(b)** Domain organization of p62 constructs with different deletion used for GST and MBP pull-down assays. The results of the pull-down assays shown in **(c,d)** indicate Tax binding ability and are indicated on the right. PB1, Phox and Bem1 domain; ZZ, zinc finger domain; MIR, multiple protein interaction region; LIR, LC3-interacting region; KIR, KEAP1 interacting region; UBA, ubiquitin-associated domain. **(c,d)** GST pull-down **(c)** and MBP pull-down assays **(d)** were performed with different p62 constructs. The percentage of input radioactively labeled-Tax bound to p62 was quantified from three independent experiments. CBB, Coomassie brilliant blue-stained SDS-PAGE gel.

1 and 4), indicating that p62 is not required for the association of Tax and IKK γ but is critical for the subsequent activation of the IKK complex.

Taken together, these data support a model in which p62 is recruited to the Tax/IKK complexes in peri-golgian structures, downstream of the association of Tax with IKK γ , and participates in the efficient activation of IKK complexes by a mechanism requiring the binding of ubiquitin chains by p62.

Discussion

Since the initial identification of IKK γ as a key target of Tax^{10–12}, several additional partners required for efficient NF- κ B signaling have been characterized by our laboratory and others. These include OPTN and TAX1BP1²⁶. Here, using the BioID proteomic approach, we identified Sequestosome-1 (SQSTM-1/p62) as a novel candidate partner of Tax. The recent description of OPTN and TAX1BP1 as members of the SQSTM-1/p62-like selective autophagy receptor (SLR) family and the well-described involvement of p62 in NF- κ B regulation prompted us to hypothesize a hijacking of p62 functions for full signaling efficiency by Tax. Our results indicate that in addition to OPTN and TAX1BP1, p62 is indeed also able to potentiate Tax-induced NF- κ B signaling. Of note, while ectopic p62 expression in T cells led to a significant potentiation of Tax activity (see Fig. 2g,h), the consequences of p62 knock-out or knock-down differed among the cell lines tested: the decrease in p62 expression did not hamper Tax activity in T cells (see Supplementary Fig. S2), but led to a significantly lower NF- κ B activity in MEF or HEK293T cells (see Fig. 2a–f). These observations indicate that while p62 mechanistically modulates Tax functions in all tested cell lines, the requirement of p62 for full Tax-induced NF- κ B signaling may be limited to certain cell types and may not apply to T cells. This would be consistent with the emergent view that NF- κ B modulation

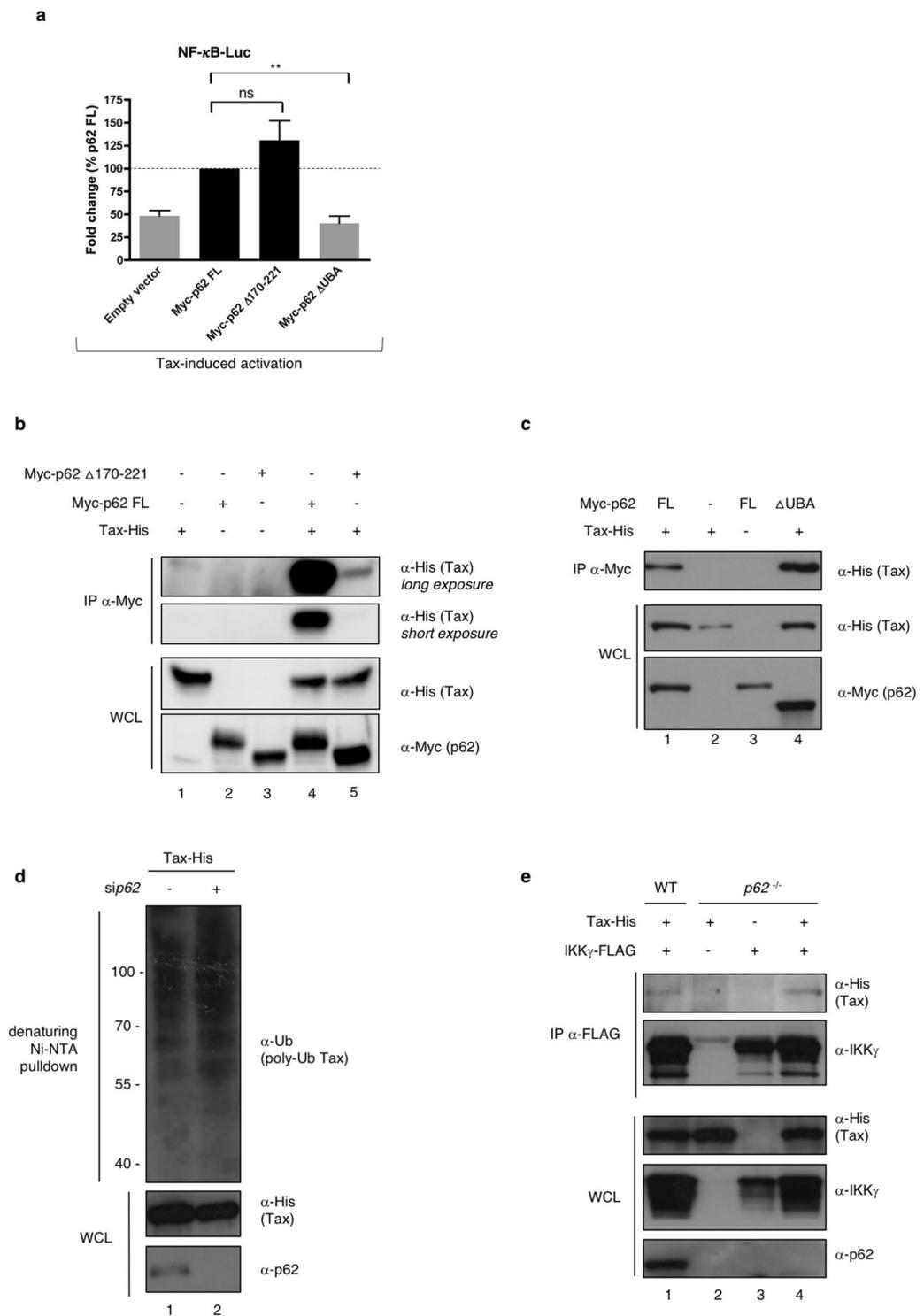


Figure 6. p62 binding to ubiquitin is required for p62 potentiation of Tax-mediated NF- κ B activation. **(a)** Jurkat cells were transfected with full-length Myc-p62 (My-p62 FL) or p62 mutants in which the Tax-interacting region (Myc-p62 Δ 170-221) or the ubiquitin-binding domain (Myc-p62 Δ UBA) were deleted, and an NF- κ B-luc construct, followed by transduction with an empty or Flag-Tax-encoding lentivector. Luciferase activity was measured and normalized to the corresponding Tax-negative condition. Values obtained with full-length ectopic p62 were set to 1 and other values are shown as fold change over the “p62 FL” condition. The graph shows results from 3 independent experiments. **(b)** Lysates from *p62*^{-/-} MEF cells transiently expressing Tax-His and either Myc-tagged full-length p62 (p62FL) or p62 Δ 170-221 were immunoprecipitated with a Myc-specific antibody followed by western blot analyses. **(c)** Lysates from *p62*^{-/-} MEF cells transiently expressing Tax-His and either Myc-tagged full-length p62 (p62FL) or p62 Δ UBA were immunoprecipitated with a Myc-specific antibody followed by western blot analyses. **(d)** HeLa cells were transfected with control (-) or *p62*-specific (+) siRNA and Tax-His. Cell lysates were submitted to a His-specific Ni-NTA pulldown in denaturing

conditions before western blot analyses. (e) Lysates from WT and *p62*^{-/-} MEF cells transiently expressing Tax-His- and FLAG-IKK γ were immunoprecipitated with a FLAG-specific antibody followed by western blot analyses. ***p* < 0.01; ns, *p* > 0.05 (one-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc* test). Full-length blots are presented in Supplementary Fig. S4.

and dynamics may vary in a cell type-specific manner, and in particular may differ between fibroblasts or epithelial cells and immune cells⁴⁶. In T cells, possible additional mechanisms of potentiation (for instance by several members of the SLR family) may hinder the detection of a reduction of Tax activity upon silencing of *p62* alone, in contrast to non-T cells.

Interestingly, Tax interaction with *p62* is independent of Tax ubiquitination, and this is a distinctive feature when compared to Tax interaction with OPTN and TAX1BP1. We show that *p62* associates with the Tax/IKK signalosome and that binding of *p62* to ubiquitin chains is required for *p62* to potentiate Tax activity. However, in contrast to OPTN, *p62* does not modulate Tax polyubiquitination. *p62* is also not required for the efficient assembly of IKK γ with Tax. We therefore propose a model in which *p62* participates in the efficient activation of the IKK complex by Tax by a mechanism requiring the scaffolding of ubiquitin chains, in agreement with the known functions of *p62* in NF- κ B signaling.

Indeed, *p62* is a multi-functional scaffold protein regulating NF- κ B activation downstream of TNFR, IL1R, CD40 and TCR³⁶. Its scaffold properties mainly arise from its ability to bind ubiquitin chains through its C-terminal UBA domain⁴⁷. *p62* shows high affinity for linear M1-linked polyubiquitin chains, and a weaker but significant affinity for K63-linked chains, while the affinity for K48 chains is low⁴⁸. The link between ubiquitin binding by *p62* and NF- κ B signaling was first identified following the analysis of *p62* mutations present in Paget's disease of bone (PDB). This disorder results from defects in osteoclast differentiation and/or activity, which are controlled by the NF- κ B pathway. *p62* mutations in PDB patients are commonly affecting the UBA domain, indicating that ubiquitin binding by *p62* could modulate NF- κ B signaling⁴⁹. The UBA domain of *p62* was further shown to modulate TRAF6 polyubiquitination by influencing TRAF6 E3 ligase activity³⁴.

The domain of *p62* that engages Tax by direct interaction (amino acids 170 to 221) encompasses the MIR (for Multiple Protein Interaction Region) through which several proteins are known to bind *p62*, including the LIM domain protein Ajuba⁵⁰, p38 MAPK⁵¹, a familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mutant of superoxide dismutase (SOD1)⁵² and the autophagy adapter ALFY⁵³. Hence, this region functions as an important protein-protein interaction domain. This direct interaction, which does not require Tax ubiquitination, contrasts with Tax/IKK γ and Tax/OPTN interactions for which Tax ubiquitination is essential²⁶. Interestingly, *p62* has been described to interact with other viral proteins independently of their ubiquitination, such as with the capsid protein of Sindbis virus⁵⁴ and with the Tat transactivator of human immunodeficiency virus type 1⁵⁵, leading to the autophagic clearance of these viral proteins. However, and in contrast to our work, these interactions were analyzed in cells and not *in vitro*, so that indirect interactions cannot be excluded in those settings. Hence, Tax is the first direct, ubiquitin-independent viral partner of *p62* to be reported.

To our surprise however, a *p62* mutant in which the Tax-interaction region is deleted, and which thus can no longer directly interact with Tax (see Figs 5 and 6b), is still able to efficiently potentiate Tax activity (see Fig. 6a). Our data thus support a two-step mechanism (Fig. 7): (i) association of Tax with IKK γ in a *p62*-independent process (see Fig. 6e) that initiates the assembly of ubiquitin-rich IKK complexes and (ii) recruitment of *p62* by both direct interaction with Tax and indirect binding to ubiquitin chains, the latter being necessary to enhance Tax signaling. Because Tax induces the synthesis of anchored and unanchored polyubiquitin chains, our data indicate that *p62* could interact with polyubiquitin chains produced upon Tax expression and retain them in close proximity to the IKK signalosome for full activation. *p62*-mediated scaffolding of Tax-induced ubiquitin chains combined with *p62* ability to oligomerize would possibly facilitate the organization of active macromolecular IKK complexes favorable to IKK *trans*-autophosphorylation, and/or the recruitment of the activating kinases of IKK such as MEKK3, which interacts with *p62* through *p62* PB1 domain³⁸, although the requirement of MEKK3 for Tax-induced NF- κ B activation is still under debate²².

In addition, although TRAF6 was initially described as dispensable for Tax-induced NF- κ B activation⁵⁶, Tax has also been demonstrated to interact with TRAF6 and to promote TRAF6 self-ubiquitination in an IKK γ -dependent manner, a process that was proposed to play a role in Tax-induced NF- κ B activation^{57,58}. Whether Tax exploits *p62* ability to increase TRAF6 self-ubiquitination³⁴ for efficient NF- κ B signaling remains to be investigated. In IL-1-induced NF- κ B signaling, *p62* has recently been shown to compete with the de-ubiquitinase YOD1 for the binding to TRAF6⁵⁹. Thus, association of *p62* with the Tax/IKK signalosome could similarly help it to escape negative regulatory mechanisms such as editing of polyubiquitin chains by the A20/Itch complex²⁷ or de-ubiquitination by CYLD or USP20^{58,60,61}, although this needs to be tested.

Our results indicate that while *p65* activity induced by Tax is totally abrogated in *p62*-deficient cells, a residual activity of the synthetic NF- κ B reporter construct (which responds to several members of the NF- κ B family in addition to *p65*) is detected in these cells. This suggests that *p62* may be specifically involved in the activation of the canonical (*i.e.* *p65*-dependent) NF- κ B pathway by Tax, and may not be required for activation of the non-canonical (*i.e.* *p65*-independent) pathway.

Recent work by Paul *et al.* showed that *p62* scaffolds the MALT1-BCL10-TRAF6-IKK signalosome in so-called cytosolic POLKADOTS (punctate and oligomeric killing or activating domains transducing signals) downstream of TCR activation in T cells⁴⁰. These POLKADOTS are associated with autophagic structures involved in the degradation of BCL10 and termination of signaling⁶². In our study, assessment of Tax/*p62* localization in GFP-LC3-expressing cells showed that these complexes may be localized at LC3-positive structures. However, Tax expression levels were unaffected by lysosomal inhibition, indicating that at the steady-state, Tax is not degraded

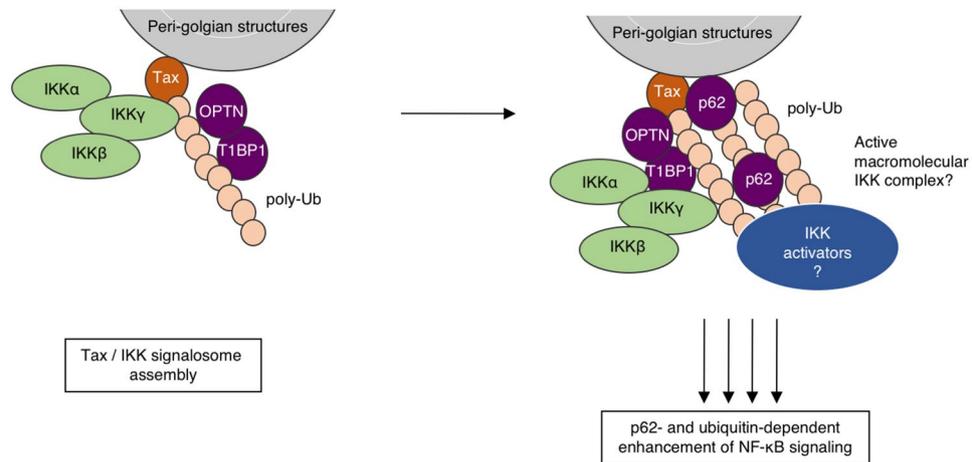


Figure 7. Involvement of ubiquitin binding by p62 in Tax-induced NF- κ B activation: working model. p62 associates with Tax in peri-golgian structures, downstream of the formation of Tax/IKK complexes, and participates in the efficient activation of the IKK complex by a mechanism requiring binding to ubiquitin chains. See text for further details. TAX1BP1: TAX1BP1. Artwork is a derivative of Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>), used under CC BY 3.0 FR (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), and includes modifications in shapes, colors and disposition of the original material.

by an autophagic pathway. This is in agreement with the fact that Tax has been shown to inhibit autophagic degradation in infected cells through inhibition of the fusion between autophagosomes and lysosomes⁶³. Thus, despite its functions as a selective autophagy receptor, p62 could indeed be a positive modulator of Tax-induced NF- κ B activation.

Taken together, our results identify p62 as a new modulator of Tax activity on NF- κ B and support a ubiquitin-dependent scaffolding role for p62 in this process, further highlighting the importance of ubiquitin in the signaling activity of the viral Tax oncoprotein. Together with the previously published observations that Tax exploits OPTN and TAX1BP1 functions for NF- κ B signaling, these results indicate that Tax might hijack the functions of the Sequestosome-1/p62-like selective autophagy receptor family for its signaling activity.

Methods

Cell culture. HeLa and HEK293T cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). U2OS cells were a kind gift from Dr. Michel Bornens. Wild-type and p62 knockout (*p62*^{-/-}) MEF cells were kindly provided by Dr. Toru Yanagawa. These cells were grown in high glucose, GlutaMAX Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biosera) and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin, Gibco). Non-infected Jurkat T cells (ATCC) and HTLV-1 chronically infected C8166, HuT102 and C91PL T cells (kind gifts from Dr. Antoine Gessain) were grown in GlutaMAX Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biosera) and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin, Gibco). All cells were maintained at 37°C in 5% CO₂. In order to induce autophagy, cells were cultivated in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) for 6 hours.

Constructs and siRNA. pSG5M vectors encoding His-tagged Tax, Tax-K4-8R, Tax-K1-10R have been previously described¹³. The Tax-His coding sequence was amplified by PCR and tagged with BirA* by cloning between *Eco*RI and *Hind*III sites into the Myc-BioID2-MCS vector (Addgene #74223, from Dr Kyle Roux⁴¹). The HBZ-SP1 coding sequence was amplified from the pcDNA3.1-Myc-His vector (a kind gift from Dr. Jean-Michel Mesnard)⁶⁴ and cloned into the pSG5M backbone with a C-terminal His-tag. Flag-Tax-encoding lentivectors have been described previously⁶⁵. Myc-p62 constructs cloned into the pCMV-Myc-Gat backbone were kindly provided by Dr. Anne-Sophie Nicot and Dr. Laurent Schaeffer. Myc-p62FL and Myc-p62 Δ UBA constructs cloned into pcDNA3-Myc backbone were kindly provided by Dr. Jorge Moscat³⁴. The Myc-p62 Δ 170-221 was generated from Myc-p62FL by site-directed mutagenesis (QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent Technologies, #200521) using the following primers: forward primer CCAAGCTCGCATTCGCCAGCCCACGTCCTCC; reverse primer GGAGGACGTGGGCTGGGGAATGCGAGCTTGG. The p62 expression vectors used for GST pulldown, or their ENTR constructs (pDEST15-p62, pDEST15-p62 Δ PB1, pDEST15-p62 Δ 123-170, pDEST15-p62 Δ 170-256, pDEST15-p62 Δ 256-370, pDEST15-p62 Δ 371-385 and pDEST15-p62 Δ UBA), or used for MBP pulldown (pTH1-p62, pTH1-p62 Δ 170-256, pTH1-p62 Δ 170-221, pTH1-p62 Δ 221-256 and pTH1-p62(170-206)) have been described before⁵³. The NF- κ B-luciferase and HTLV-1-LTR-luciferase reporter gene plasmids have been previously described⁶⁶. The FLAG-tagged IKK γ expression vector was used previously⁶⁶.

Non-targeting siRNA and p62-specific siRNA were purchased from Dharmacon (ON-TARGET plus Human SQSTM1) and from Ambion (Silencer Select Human SQSTM1, siRNA ID #s16961 and #s16962, referred to here as sip62 #2 and sip62 #3). OPTN-specific siRNA were from Sigma-Aldrich.

Antibodies and reagents. The following antibodies were used: anti-His (ab9136 or ab18184, Abcam or sc-804, Santa Cruz), anti-Tax1 (Tab172, NIH), anti-p62 (GP62-C, Progen), anti-OPTN (100000, Cayman), anti-GM130 (610823, BD), anti-IKK γ (611306, BD), anti-phosphorylated IKK α/β (2078, Cell Signaling Technology), anti-I κ B α (4814, Cell Signaling Technology), anti-phosphorylated I κ B α (9246, Cell Signaling Technology), anti-FLAG (M2, Sigma-Aldrich), anti-Myc (4A6, Millipore), anti-Ub (P4D1, sc-8017, Santa Cruz), anti-actin (AC-74, Sigma-Aldrich), anti-Nup153 (147050002, Covance). HRP-Streptavidin was from Sigma (RAB-HRP3). For control immunoprecipitation, normal guinea pig IgG (sc-2711, Santa-Cruz) were used. For inhibition of lysosomal degradation, E64D and pepstatin (Sigma) were both used at 10 μ g/mL.

Transient transfections and transduction. HEK293T and HeLa cells were transfected using either Polyfect or Effectene (Qiagen), or with DreamFect Gold (OZ Biosciences). MEF and U2OS cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Life Technologies). For siRNA transfections, the Lipofectamine RNAiMax reagent (Life Technologies) was used, while Lipofectamine 2000 (Life Technologies) was used for siRNA and DNA co-transfection. Jurkat cells, C91PL cells and C8166 cells were transfected using the Neon electroporation system (Thermo Fisher). When indicated, Jurkat cells were transduced using Flag-Tax-expressing lentiviruses, as described previously⁶⁵.

BioID procedure and mass spectrometry analyses. HEK293T cells were transfected with BirA*-encoding vectors for 24 h and treated with biotin (50 μ M, Sigma) for 18 h. BioID streptavidin pull-down was performed on whole cell lysates as described previously⁶⁷ using Dynabead MyOne Streptavidin C1 (ThermoFisher Scientific). After the washing steps, beads were washed twice in 50 mM NH₄HCO₃. Bound proteins were reduced with 200 mM DTT and alkylated with 200 mM Iodoacetamide. Digestion was performed with trypsin enzyme (Promega) at a ratio 1/100 overnight at 37 °C. After desalting on C18 cartridges (Harvard Apparatus), samples were analyzed qualitatively or in a Label Free quantitation strategy using an Ultimate 3000 nano-RSLC (Thermo Scientific, San Jose California) coupled on line with a Q Exactive HF mass spectrometer via a nano-electrospray ionization source (Thermo Scientific, San Jose California). Samples were injected and loaded on a C18 Acclaim PepMap100 trap-column 75 μ m ID x 2 cm, 3 μ m, 100 Å, (Thermo Scientific) for 3.0 minutes at 5 μ L/min with 2% ACN, 0.05% TFA in H₂O and then separated on a C18 Acclaim Pepmap100 nano-column, 50 cm x 75 μ m i.d, 2 μ m, 100 Å (Thermo Scientific) with a 60-minute linear gradient from 3.2% to 40% buffer B (A: 0.1% FA in H₂O, B: 100% ACN, 0.1% FA) and then from 40 to 90% of B in 2 min, hold for 10 min and returned to the initial conditions in 1 min for 14 min. The total duration was set to 90 minutes at a flow rate of 300 nL/min. The oven temperature was kept constant at 40 °C.

Samples were analysed in triplicate with TOP20 HCD method: MS data were acquired in a data-dependent strategy selecting the fragmentation events based on the 20 most abundant precursor ions in the survey scan (350–1600 Th). The resolution of the survey scan was 60,000 at m/z 200 Th and for MS/MS scan the resolution was set to 15,000 at m/z 200 Th. The Ion Target Value for the survey scans in the Orbitrap and the MS/MS scan were set to 3E6 and 1E5 respectively and the maximum injection time was set to 60 ms for MS and MS/MS scan. Parameters for acquiring HCD MS/MS spectra were as follows: collision energy = 27 and an isolation width of 2 m/z. The precursors with unknown charge state, charge state of 1 and 8 or greater than 8 were excluded. Peptides selected for MS/MS acquisition were then placed on an exclusion list for 30 s using the dynamic exclusion mode to limit duplicate spectra.

Data files were then analyzed with Proteome Discover 2.1 or with Proteome Discover 2.2 using the SEQUEST HT algorithm against the Swissprot Human database (2018-09 release, 20332 sequences), complemented with the Uniprot HTLV sequences (2018-09 release, 3298 sequences) and the BirA and streptavidin sequences. Precursor mass tolerance was set at 10 ppm and fragment mass tolerance was set at 0.02 Da, and up to 2 missed cleavages were allowed. Oxidation (M), acetylation (Protein N-terminus) were set as variable modification, and Carbamidomethylation (C) as fixed modification. Peptides and proteins were filtered with a false discovery rate (FDR) at 1% using percolator. For qualitative analysis, proteins specifically identified in the BirA*-Tax-transfected cells and not in the BirA*-transfected control cells were considered. For quantitative analysis, protein quantification was done by the Label Free Quantification (LFQ) approach, and LFQ abundance values were obtained for each sample, normalized to the total peptide amount. The abundance ratio [BirA*-Tax/BirA*] was calculated as well as the adjusted p-value. The numbers presented in Fig. 1e include the SEQUEST HT score. The highest this score is, the better the protein is identified.

Immunofluorescence microscopy. Cells were fixed in 10% formalin solution (HT5011, Sigma-Aldrich) or ice-cold methanol (for Fig. 1b), washed and permeabilized in PBS containing 0.5% Triton X-100. After saturation in PBS containing 0.2% Tween (PBS-T) and 5% milk, cells were incubated with primary antibodies for 1 h at room temperature. After three washes in PBS-T, cells were incubated with Dylight 488 anti-mouse IgG (DI-2488, Vector), Dylight 488 anti-rabbit IgG (ab98488, Abcam), Dylight 549 anti-mouse IgG (DI-2549, Vector), AlexaFluor 647 anti-mouse (715-605-150, Jackson), Alexa Fluor 555 anti-guinea pig IgG (ab150186, Abcam) or AlexaFluor 647 Streptavidin (S21374, ThermoFisher Scientific) for 1 h at room temperature. After three washes in PBS-T, coverslips were then mounted on glass slides in Fluoromount-G medium containing DAPI (0100-20, Southern Biotech).

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

Samples were examined under a Leica spectral SP5 confocal microscope equipped with a 63x 1.4–0.6 oil-immersion objective using the LAS-AF software, or under a Zeiss LSM800 confocal microscope equipped with a 63x 1.4 oil immersion objective using the ZEN software. For Fig. 1b, samples were observed under an AxioImager.Z1 microscope (Zeiss) equipped with a 63x/1.4 Plan Apochromat oil-immersion objective using the Metamorph software. Images were processed with ImageJ⁶⁸.

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

NF- κ B (p65) transcription factor ELISA assay. After transfection, cells were fractionated using the following buffers: buffer A for cytoplasm extraction (0.2% Igepal-630, 10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 100 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, supplemented with protease inhibitors [Complete, Roche]) and buffer B for nuclear extraction (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 400 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Igepal-630, 0.2% SDS, 1 mM DTT, 100 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, supplemented with protease inhibitors). Protein quantification was performed using the detergent-compatible Bradford assay kit (Pierce, #23246). Active p65 was quantified from 2 μ g of WT and p62^{-/-} MEF cell nuclear extracts using the Cayman Chemical assay kit (#10007889), following the supplier's instructions.

Western blot analyses, immunoprecipitation, Ni-NTA purification and GST and MBP pulldown assays. For western blots, cells were lysed for 20 min on ice in the following buffer: 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.25% sodium deoxycholate, complemented with protease inhibitors (Complete, Roche) and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). After centrifugation and protein concentration determination (Bradford, Biorad), proteins were analyzed by SDS-PAGE. Alternatively, for Fig. 2h, cells were lysed in Laemmli buffer before SDS-PAGE analysis.

For immunoprecipitation, cells were lysed for 20 min on ice in the following buffer: 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP40, complemented with protease inhibitors (Complete, Roche) as well as the phosphatase inhibitors NaF (100 mM) and Na₃VO₄ (2 mM), and then scraped from Petri dishes. Cell lysates were passed through 26G^{1/2} needles, centrifuged, and protein concentration was quantified using the Bradford method (Biorad). Equal quantities of proteins were immunoprecipitated overnight at 4 °C with anti-p62, anti-Myc antibodies or normal guinea pig IgG and *Staphylococcus aureus* Protein G sepharose beads (GE Healthcare). After three washes in lysis buffer, proteins were eluted and analyzed by SDS-PAGE.

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

For ubiquitination assay, denaturing Ni-NTA pulldown was performed as described previously¹⁵.

For GST and MBP pulldown assays, GST and GST-tagged proteins were expressed in *E. coli* soluBL21 (Amsbio) and immobilized on glutathione-coupled Sepharose beads (Glutathione-Sepharose 4 Fast Flow; GE Healthcare). MBP and MBP-tagged proteins were expressed in *E. coli* BL21(DE3) (Amsbio) and immobilized on amylose resin (New England Biolabs). Pulldown assays with *in vitro* translated [³⁵S]-labeled proteins (here HTLV-1 Tax) were performed as described previously⁴².

For SDS-PAGE analysis, proteins were separated on 10% or 12% Bis-Tris gels or on 10% or 12% TGX stain-free gels (Criterion, Biorad) and transferred onto PVDF membranes (Immobilon P, Millipore). After incubation in TBS-Tween (Sigma-Aldrich) containing 5% milk, membranes were incubated in primary antibodies. Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (NA9310, GE Healthcare or #32430, Thermo Fisher), anti-rabbit IgG (NA9340, GE Healthcare or #32460, Thermo Fisher), and anti-guinea pig Ig (P0141, Dako) were used as secondary antibodies, before revelation with ECL Prime (Amersham), ECL Select (Amersham) or SuperSignal West Femto (Thermo Fisher) substrates. Signals were quantified using the ImageJ software⁶⁸.

RT-PCR assay. Total RNAs were obtained by Trizol extraction. After treatment with DNase (DNA-free™ DNA Removal Kit, Invitrogen), 500 ng of total RNA were converted to cDNA using the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific), following the supplier's instructions with OligodT primers. A volume of 2 μ l of cDNA was then used in a PCR reaction (25 μ l reaction volume) containing 1X PCR buffer (Invitrogen), 0.4 μ M of forward and reverse primers, 0.2 mM dNTP mix, 1.5 mM MgCl₂, and 0.5 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). The *gapdh* primers from the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit were used to amplify *gapdh* cDNAs (496 bp). The following primer pair was used to amplify *Il6* cDNAs (460 bp): forward 5'-GACTTCACAGAGGATACCCTC and reverse 5'-GTCCTTAGCCACTCCTCTG. PCR products were visualized after agarose gel electrophoresis. Signals were quantified using the Image Lab software (Biorad).

Flow cytometry. To estimate the transduction efficiency with the GFP-encoding lentivector, cells were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde and analyzed on a MACSQuant cytometer (Miltenyi). Analyses were performed under the FlowJo software.

Statistical analyses. Data are presented as mean \pm SEM. One-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc* test was used to compare means (GraphPad Prism). Differences between means were considered significant when the *p*-value was less than 0.05. ****p* < 0.001; ***p* < 0.01; **p* < 0.05; ns, *p* > 0.05.

Data availability

The datasets generated during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 18 May 2019; Accepted: 15 October 2019;

Published online: 05 November 2019

References

- Poiesz, B. J. *et al.* Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *PNAS* **77**, 7415–9 (1980).
- Yoshida, M., Miyoshi, I. & Hinuma, Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *PNAS* **79**, 2031–2035 (1982).
- Gessain, A. & Cassar, O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Front. Microbiol.* **3**, 388 (2012).
- Willems, L. *et al.* Reducing the global burden of HTLV-1 infection: An agenda for research and action. *Antiviral Res.* **137**, 41–48 (2017).
- Satou, Y. & Matsuoka, M. Virological and immunological mechanisms in the pathogenesis of human T-cell leukemia virus type 1. *Rev. Med. Virol.* **23**, 269–280 (2013).
- Dewan, M. Z. *et al.* Rapid Tumor Formation of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Infected Cell Lines in Novel NOD-SCID/gammaCnull Mice: Suppression by an Inhibitor against NF- κ B. *J. Virol.* **77**, 5286–5294 (2003).
- Mori, N. *et al.* Constitutive Activation of NF- κ B in Primary Adult T-Cell Leukemia Cells. *Blood* **93**, 2360–2368 (1999).
- Kfoury, Y. *et al.* The multifaceted oncoprotein Tax: subcellular localization, posttranslational modifications, and NF- κ B activation. *Adv Cancer Res* **113**, 85–120 (2012).
- Chen, J. & Chen, Z. J. Regulation of NF- κ B by ubiquitination. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 4–12 (2013).
- Yamaoka, S. *et al.* Complementation Cloning of NEMO, a Component of the I κ B Kinase Complex Essential for NF- κ B Activation. *Cell* **93**, 1231–1240 (1998).
- Chu, Z. L., Shin, Ya, Yang, J. M., DiDonato, Ja & Ballard, D. W. IKKgamma mediates the interaction of cellular I κ B kinases with the tax transforming protein of human T cell leukemia virus type 1. *J. Biol. Chem.* **274**, 15297–15300 (1999).
- Harhaj, E. W. & Sun, S. C. IKKgamma serves as a docking subunit of the I κ B kinase (IKK) and mediates interaction of IKK with the human T-cell leukemia virus tax protein. *J. Biol. Chem.* **274**, 22911–22914 (1999).
- Chiari, E., Lamsoul, I., Lodewick, J., Bex, F. & Pique, C. Stable Ubiquitination of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Is Required for Proteasome Binding. *J. Virol.* **78**, 11823–11832 (2004).
- Harhaj, N. S., Sun, S. & Harhaj, E. W. Activation of NF- κ B by the Human T Cell Leukemia Virus Type I Tax Oncoprotein Is Associated with Ubiquitin-dependent Relocalization of I κ B Kinase. *J. Biol. Chem.* **282**, 4185–4192 (2007).
- Journo, C. *et al.* Human T cell leukemia virus type 2 tax-mediated NF- κ B activation involves a mechanism independent of Tax conjugation to ubiquitin and SUMO. *J. Virol.* **87**, 1123–36 (2013).
- Kfoury, Y. *et al.* Ubiquitylated Tax targets and binds the IKK signalosome at the centrosome. *Oncogene* **27**, 1665–1676 (2008).
- Lamsoul, I. *et al.* Exclusive Ubiquitination and Sumoylation on Overlapping Lysine Residues Mediate NF- κ B Activation by the Human T-Cell Leukemia Virus Tax Oncoprotein. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 10391–10406 (2005).
- Nasr, R. *et al.* Tax ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of NF- κ B activation. *Blood* **107**, 4021–9 (2006).
- Shembade, N., Harhaj, N. S., Yamamoto, M., Akira, S. & Harhaj, E. W. The human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein requires the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 for NF- κ B activation. *J. Virol.* **81**, 13735–42 (2007).
- Lavorgna, A. & Harhaj, E. W. Regulation of HTLV-1 tax stability, cellular trafficking and NF- κ B activation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Viruses* **6**, 3925–3943 (2014).
- Ho, Y. K. *et al.* HTLV-1 Tax Stimulates Ubiquitin E3 Ligase, Ring Finger Protein 8, to Assemble Lysine 63-Linked Polyubiquitin Chains for TAK1 and IKK Activation. *PLoS Pathog.* **11**, e1005102 (2015).
- Shibata, Y. *et al.* HTLV-1 Tax Induces Formation of the Active Macromolecular IKK Complex by Generating Lys63- and Met1-Linked Hybrid Polyubiquitin Chains. *PLOS Pathog.* **13**, e1006162 (2017).
- Wang, C. *et al.* HTLV-1 Tax Functions as a Ubiquitin E3 Ligase for Direct IKK Activation via Synthesis of Mixed-Linkage Polyubiquitin Chains. *PLoS Pathog.* **12**, 1–25 (2016).
- Huang, J., Ren, T., Guan, H., Jiang, Y. & Cheng, H. HTLV-1 tax is a critical lipid raft modulator that hijacks I κ B kinases to the microdomains for persistent activation of NF- κ B. *J. Biol. Chem.* **284**, 6208–6217 (2009).
- Pujari, R. *et al.* Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) Tax Requires CADM1/TSLC1 for Inactivation of the NF- κ B Inhibitor A20 and Constitutive NF- κ B Signaling. *PLoS Pathog.* **11**, 1–27 (2015).
- Journo, C. *et al.* NRP/Optineurin Cooperates with TAX1BP1 to potentiate the activation of NF- κ B by human T-lymphotropic virus type 1 tax protein. *PLoS Pathog.* **5**, e1000521 (2009).
- Shembade, N., Pujari, R., Harhaj, N. S., Abbott, D. W. & Harhaj, E. W. The kinase IKK α inhibits activation of the transcription factor NF- κ B by phosphorylating the regulatory molecule TAX1BP1. *Nat. Immunol.* **12**, 834–843 (2011).
- Tumbarello, Da *et al.* Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome. *Nat. Cell Biol.* **14**, 1024–1035 (2012).
- Wild, P. *et al.* Phosphorylation of the Autophagy Receptor Optineurin Restricts Salmonella. *Science* **333**, 228–233 (2011).
- Petkova, D. S. *et al.* Distinct Contributions of Autophagy Receptors in Measles Virus Replication. *Viruses* **9**, 123 (2017).
- Deretic, V. Autophagy as an innate immunity paradigm: Expanding the scope and repertoire of pattern recognition receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **24**, 21–31 (2012).
- Svenning, S. & Johansen, T. Selective autophagy. *Essays Biochem.* **55**, 79–92 (2013).
- Sanz, L., Diaz-Meco, M. T., Nakano, H. & Moscat, J. The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF- κ B activation by the IL-1-TRAF6 pathway. *EMBO J.* **19**, 1576–86 (2000).
- Wooten, M. W. *et al.* The p62 scaffold regulates nerve growth factor-induced NF- κ B activation by influencing TRAF6 polyubiquitination. *J. Biol. Chem.* **280**, 35625–35629 (2005).
- Zotti, T. *et al.* TRAF6-mediated ubiquitination of NEMO requires p62/sequestosome-1. *Mol. Immunol.* **58**, 27–31 (2014).
- Moscat, J., Diaz-Meco, M. T. & Wooten, M. W. Signal integration and diversification through the p62 scaffold protein. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 95–100 (2007).
- Faure, M. & Lafont, F. Pathogen-induced autophagy signaling in innate immunity. *J. Innate Immun.* **5**, 456–470 (2013).
- Nakamura, K., Kimple, A. J., Siderovski, D. P. & Johnson, G. L. PB1 domain interaction of p62/sequestosome 1 and MEK3 regulates NF- κ B activation. *J. Biol. Chem.* **285**, 2077–2089 (2010).

39. Seibold, K. & Ehrenschrwender, M. p62 regulates CD40-mediated NF- κ B activation in macrophages through interaction with TRAF6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **464**, 330–335 (2015).
40. Paul, S. *et al.* T Cell Receptor Signals to NF- κ B Are Transmitted by a Cytosolic p62-Bcl10-Malt1-IKK Signalosome. *Sci. Signal.* **7**, ra45 (2014).
41. Kim, D. I. *et al.* An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. *Mol. Biol. Cell* **27**, 1188–1196 (2016).
42. Pankiv, S. *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* **282**, 24131–24145 (2007).
43. Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **12**, 1–222 (2015).
44. Bjørkøy, G. *et al.* p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* **171**, 603–614 (2005).
45. Khaminets, A., Behl, C. & Dikic, I. Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends Cell Biol.* **26**, 6–16 (2016).
46. Dorrington, M. G. & Fraser, I. D. C. NF- κ B Signaling in Macrophages: Dynamics, Crosstalk, and Signal Integration. *Front. Immunol.* **10**, 705 (2019).
47. Vadlamudi, R. K., Joung, I., Strominger, J. L. & Shin, J. p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **271**, 20235–20237 (1996).
48. Wurzer, B. *et al.* Oligomerization of p62 allows for selection of ubiquitinated cargo and isolation membrane during selective autophagy. *eLife* **4**, e08941 (2015).
49. Laurin, N., Brown, J. P., Morissette, J. & Raymond, V. Recurrent Mutation of the Gene Encoding sequestosome 1 (SQSTM1/p62) in Paget Disease of Bone. *Am. J. Hum. Genet.* **70**, 1582–1588 (2002).
50. Feng, Y. & Longmore, G. D. The LIM Protein Ajuba Influences Interleukin-1-Induced NF- κ B Activation by Affecting the Assembly and Activity of the Protein Kinase C/p62/TRAF6 Signaling Complex. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 4010–4022 (2005).
51. Kawai, K., Saito, A., Sudo, T. & Osada, H. Specific regulation of cytokine-dependent p38 MAP kinase activation by p62/SQSTM1. *J. Biochem. (Tokyo)* **143**, 765–772 (2008).
52. Gal, J. *et al.* Sequestosome 1/p62 links familial ALS mutant SOD1 to LC3 via an ubiquitin-independent mechanism. *J. Neurochem.* **111**, 1062–1073 (2009).
53. Clausen, T. H. *et al.* p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and their degradation by autophagy. *Autophagy* **6**, 330–344 (2010).
54. Orvedahl, A. *et al.* Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. *Cell Host Microbe* **7**, 115–27 (2010).
55. Sagnier, S. *et al.* Autophagy restricts HIV-1 infection by selectively degrading Tat in CD4+ T lymphocytes. *J. Virol.* **89**, 615–25 (2015).
56. Gelezianas, R. *et al.* Human T-cell leukemia virus type 1 Tax induction of NF- κ B involves activation of the IkappaB kinase alpha (IKKalpha) and IKKbeta cellular kinases. *Mol Cell Biol* **18**, 5157–5165 (1998).
57. Choi, Y. B. & Harhaj, E. W. HTLV-1 Tax Stabilizes MCL-1 via TRAF6-Dependent K63-Linked Polyubiquitination to Promote Cell Survival and Transformation. *PLoS Pathog.* **10**, e1004458 (2014).
58. Yasunaga, J., Lin, F. C., Lu, X. & Jeang, K. T. Ubiquitin-specific peptidase 20 targets TRAF6 and human T cell leukemia virus type 1 tax to negatively regulate NF- κ B signaling. *J. Virol.* **85**, 6212–6219 (2011).
59. Schimmack, G. *et al.* YOD1/TRAF6 association balances p62-dependent IL-1 signaling to NF- κ B. *eLife* **6** (2017).
60. Kovalenko, A. & Chable-Bessia, C. The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF κ B signalling by deubiquitination. *Nature* **424**, 801–805 (2003).
61. Trompouki, E. *et al.* CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF- κ B activation by TNFR family members. *Nature* **107**, 793–796 (2003).
62. Paul, S., Kashyap, A. K., Jia, W., He, Y. W. & Schaefer, B. C. Selective Autophagy of the Adaptor Protein Bcl10 Modulates T Cell Receptor Activation of NF- κ B. *Immunity* **36**, 947–958 (2012).
63. Tang, S. W., Chen, C. Y., Klase, Z., Zane, L. & Jeang, K. T. The Cellular Autophagy Pathway Modulates Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Replication. *J. Virol.* **87**, 1699–1707 (2013).
64. Thebault, S., Basbous, J., Hivin, P., Devaux, C. & Mesnard, J. M. HBZ interacts with JunD and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett* **562**, 165–70 (2004).
65. Chevalier, S. A. *et al.* The transcription profile of Tax-3 is more similar to Tax-1 than Tax-2: insights into HTLV-3 potential leukemogenic properties. *PLoS One* **7**, e41003 (2012).
66. Meertens, L., Chevalier, S., Weil, R., Gessain, A. & Mahieux, R. A 10-amino acid domain within human T-cell leukemia virus type 1 and type 2 tax protein sequences is responsible for their divergent subcellular distribution. *J. Biol. Chem.* **279**, 43307–20 (2004).
67. Firat-Kalar, E. N. & Stearns, T. Probing mammalian centrosome structure using BioID proximity-dependent biotinylation. *In Methods in Cell Biology* **129**, 153–170 (Elsevier, 2015).
68. Abramoff, M. D., Magalhães, P. J. & Ram, S. J. Image processing with imageJ. *Biophotonics Int.* **11**, 36–41 (2004).

Acknowledgements

We would like to thank Dr. M. Bornens, Dr. J.-M. Mesnard, Dr. A.-S. Nicot, Pr. L. Schaeffer, Dr. J. Moscat, Dr. T. Yanagawa, Dr. A. Gessain, Dr. V. Mocquet and Dr B. Horvat for their kindly gifts of plasmids, cells, reagents and technical advice. We thank the Retroviral Oncogenesis team, as well as Dr. P.V. Afonso, Dr. B. Py, Dr H. Gruffat and Dr. M. Tommasino for helpful discussion. We acknowledge the financial support from ITMO Cancer AVIESAN (Alliance Nationale pour les Sciences de la Vie et de la Santé, National Alliance for Life Sciences and Health) within the framework of the cancer plan, for the Orbitrap mass spectrometer funding. This work has benefited from the facilities and expertise of the Protein Science Facility (Adeline Page and Frédéric Delolme) of the SFR Biosciences Lyon (UMS3444/CNRS, US8/Inserm, ENS de Lyon, UCBL). We also thank the PLATIM microscopy facility of the SFR Biosciences Lyon (UMS3444/CNRS, US8/Inserm, ENS de Lyon, UCBL) for its help with image acquisition and analysis. We thank Layla Roesler for English proofreading. This work was supported by the “Ligue Nationale contre le Cancer, équipe labellisée” program to RM (grant number EL-2013 Mahieux), by the “Association de Recherche contre le Cancer” foundation to CJ (grant number PJA 20141202070), by the “Fondation pour la Recherche Médicale, équipe labellisée” program to RM (grant number DEQ. 20180339200), by an INSERM U1111 intramural grant to CJ, by the “Ligue Nationale contre le Cancer, comité du Rhône, Projet Pluri-Equipes” program to CJ and by the Research Council of Norway (grant number 249884) to T.J. AS, RM and CJ are funded by the ENS de Lyon.

Author contributions

A.S., C.J., R.M., M.F. and T.J. designed the experiments. A.S., E.T., L.D., F.L., P.V., Y.P.A., J.G., M.N. and F.M.C.U. performed the experiments. A.S., E.T., P.V., Y.P.A., M.F., T.J., H.D., R.M. and C.J. analyzed the data, and A.S. and C.J. wrote the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52408-x>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.J.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019