



HAL
open science

Contrôle de la transcription depuis les LTR 5' et LTR 3' du rétrovirus HTLV-1 par l'oncoprotéine Tax

Christophe Martella

► **To cite this version:**

Christophe Martella. Contrôle de la transcription depuis les LTR 5' et LTR 3' du rétrovirus HTLV-1 par l'oncoprotéine Tax. Microbiologie et Parasitologie. Université Paris Cité, 2020. Français. NNT : 2020UNIP5213 . tel-04539714

HAL Id: tel-04539714

<https://theses.hal.science/tel-04539714>

Submitted on 9 Apr 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.

Université de Paris

École doctorale BioSPC – N°562

Institut Cochin – INSERM U1016 – CNRS UMR 8104

CONTRÔLE DE LA TRANSCRIPTION DEPUIS LES LTR 5' ET LTR 3' DU RETROVIRUS HTLV-1 PAR L'ONCOPROTÉINE TAX

Présentée par **Christophe MARTELLA**

Thèse de doctorat de Microbiologie

Dirigée par la **Docteure Claudine PIQUE**

Présentée et soutenue publiquement le Vendredi 11 Décembre 2020

Devant un jury composé de :

Pr. Sylvie VAN DER WERF, Université de Paris
Dr. Chloé JOURNO, ENS Lyon
Dr. Christine NEUVEUT, Université de Montpellier
Pr. Vincent MARECHAL, Sorbonne Université
Dr. Vincent MOCQUET, ENS Lyon
Dr. Claudine PIQUE, Université de Paris

Présidente de jury
Rapporteuse
Rapporteuse
Examineur
Examineur
Directrice de thèse



REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement l'ensemble des membres de mon jury pour leur investissement dans mon travail de thèse : la présidente Professeure Sylvie VAN DER WERF, les examinateurs Professeur Vincent MARECHAL et Docteur Vincent MOCQUET, les rapportrices Docteure Chloé JOURNO et Docteure Christine NEUVEUT pour leurs précieux commentaires, et ma directrice de thèse Docteure Claudine PIQUE. Je remercie la Ligue Nationale Contre le Cancer de m'avoir accordé une allocation doctorale pour réaliser ce projet.

La Docteure Claudine PIQUE, ou simplement Claudine, a rendu possible ce travail de thèse et aussi bien plus. J'ai rencontré une scientifique extraordinaire et créative, à la fois dans la réflexion scientifique, autant que dans les approches techniques, qui a fait ce que je suis devenu aujourd'hui. Claudine, tu as cru en moi dès notre première rencontre et j'ai su que nous étions faits pour partager une partie de notre chemin ensemble. Tu m'as transmis une énorme quantité de connaissances, dépassant largement le monde de HTLV-1, et par-dessus tout, la capacité de réfléchir par moi-même.

Aussi, j'ai rencontré une amie, très chère, qui est et restera pour toujours dans mon cœur et mon esprit, qui a été présente dans les moments de doutes, et de bonheur. Notre amitié n'en est qu'à ses débuts, et je sais, autant que toi, qu'elle durera jusqu'à l'infini. Ces quelques lignes ne me permettent pas de te remercier comme tu le mérites, mais ce lien indéfectible n'en est qu'à ses prémices.

MERCI.

L'équipe PIQUE m'a offert la chance de rencontrer Laëtitia, notre Technicienne Exceptionnelle, toujours à l'écoute et prête à redonner le sourire, prodiguant de nombreux conseils dépassant largement le cadre professionnel. Tant de moments passés ensemble à refaire nos vies, le monde, et même l'univers. Tant de moments complices et de soutien mutuel qui m'ont permis de devenir ce que je suis. Une seule chose peut résumer notre amitié : nous sommes prêts à traverser la Porte des Etoiles, nous savons qu'elle existe.

Impossible pour moi d'oublier Armelle, bien qu'elle ait quitté l'équipe il y a quelques temps, voguant vers de nouveaux horizons scientifiques et une réussite certaine qu'elle mérite. C'est grâce à Armelle que j'ai pu pleinement m'intégrer dans l'Institut Cochin, et y trouver ma place. Elle m'a donné toutes les ficelles qui étaient nécessaires à ma compréhension de la jungle Cochinoise, et m'a surtout permis de rencontrer les membres de l'association JeCCo, devenu aujourd'hui une vraie famille scientifique.

L'équipe PIQUE m'a apporté Manon, ma Manon. Nous avons passé 6 mois ensemble, pendant lesquels j'ai essayé de lui transmettre un maximum et tu as appris bien plus. 6 mois trop court, qu'on aimerait faire durer très longtemps, mais qui m'ont permis de rencontrer une véritable amie, qui, même si loin de moi, reste toute proche dans mon cœur.

Plus récemment, j'ai eu la chance de rencontrer Aurélien, jeune étudiant devenu jeune ingénieur avec un futur prometteur, et aussi un ami. Malheureusement, le SARS-Cov-2 est venu gâcher la fête. Malgré cela, Aurélien a su, en très peu de temps, se montrer à la hauteur de la mission qui lui a été confié. Aujourd'hui, je suis plus que confiant pour son avenir, et j'y trouve un merveilleux successeur qui, j'en suis sûr, deviendra un super ingénieur à l'Institut Cochin, et bien plus loin.

L'équipe PIQUE est indissociable de l'équipe MARGOTTIN, formant ainsi les **Piquottins**. Je remercie chaleureusement Florence pour tous nos échanges, conseils, et son soutien tout au long de ma thèse, ainsi que Cecilia avec qui nous sommes étroitement liés par la passion de la

Spironolactone. Un très grand merci à Virginie, Angélique, Marina, Roy, Pauline, Ghina, et Michaël. Tous ces moments passés à discuter, débattre de nos projets, permettant de les faire fructifier pour en tirer le meilleur. Tant de repas partagés à refaire le monde de la recherche et bien plus encore, apprendre à se connaître pour découvrir qui nous sommes une fois les manip terminées. Tant de moments inoubliables. Je vous souhaite la réussite que vous méritez amplement dans vos projets professionnels et personnels.

Michaël qui, en plus d'être mon meilleur collègue, est mon alter ego, ma moitié, ma vie. Nous sommes arrivés ensemble à l'Institut Cochin, nous l'avons apprivoisé à deux, et nous le quittons encore plus rapprochés. Cette expérience n'aurait pas été la même sans lui. Cette thèse n'a été permise que par la force et son soutien sans faille qu'il m'a apporté. Après 4 ans à partager entièrement notre vie professionnelle et personnelle, aujourd'hui, nos chemins professionnels se séparent, laissant la place libre à un épanouissement personnel total. Nos destins sont liés pour la vie, par la science et par l'amour, et c'est à toi que je dédie cette thèse. Nous la méritons. Aucun mot n'est assez puissant pour décrire l'expérience et le lien qui nous unit. La seule chose dont je suis certain est notre futur, liés et ensemble, nous rendant toujours plus fort et amoureux.

L'association / la famille JeCCo fait partie de mes plus belles expériences. Deux années passées à organiser des événements scientifiques, afin de promouvoir la science, d'aider les jeunes chercheurs de l'Institut, et à réaliser nos fameux Symposia. Tellement de personne sur qui j'ai pu compter. Je tiens à remercier mes collègues devenus amis : notre queen Marion, Anaïs, Isabel, Clara, Nam, Héloïse, Etienne, et Michaël, toujours là. Également un grand merci aux nouveaux responsables de l'association qui permettent à JeCCo d'exister, je vous souhaite le meilleur à tous.

Comment ne pas remercier l'ensemble des gens du bâtiment Méchain, qui ont été à mes côtés tout au long de mon expérience. Tellement de gens géniaux, avec qui échanger et s'entraider, que ce soit dans un coin de couloir, autour de la photocopieuse, ou lors de nos repas. Particulièrement nos supers gestionnaires, sans qui rien ne serait possible. Merci à Maryline, Amira, et Nabilla, toujours prêtes à nous aider pour rendre notre travail le plus agréable et efficace possible.

De nombreuses personnes à l'extérieur de l'Institut ont été présentes et m'ont soutenu.

Je ne peux que remercier des milliers de fois Nanssa, plus de dix ans maintenant que nous nous connaissons, même si j'ai l'impression que nous avons grandi ensemble. Nanssa est apparue le premier jour de mes études universitaires et est présente aujourd'hui pour les clôturer. Tellement de choses rendues possibles grâce à elle, tellement de souvenirs et de merveilleux moments passés ensemble. Intervient aussi Cyril, un merveilleux compagnon de route, présent encore pour très longtemps. Nous nous sommes forgés ensemble, et je suis fier de nous aujourd'hui. Vous n'êtes pas mes amis, vous êtes ma famille.

Je tiens à remercier ma famille de sang : mes parents, mes grands-parents, mes oncles, qui m'ont donné les clefs pour prendre un chemin qui était totalement inconnu à une famille d'italiens, peu familière avec les études supérieures et la virologie. Impossible de ne pas remercier ma Sœur, qui a toujours été là pour moi, qui a cru en moi, et qui m'a prodigué les enseignements pour réussir ma vie d'adulte, me permettant de m'épanouir pleinement. Elle m'a permis de rencontrer mon (*beau*)Frère qui m'a toujours soutenu, et m'a donné une autre vision de la vie,

qui m'est chère. J'ai, grâce à eux, deux merveilleux neveux et une nièce, que j'aime de tout mon cœur.

Ma famille de cœur, obtenu grâce à Michaël, a été bien plus présente que je ne pouvais l'espérer. Merci à eux pour leur soutien depuis notre rencontre. Merci à Gilles, sans qui ma soutenance de thèse n'aurait pas été aussi belle.

Michaël, mon compagnon de vie, je te dois mes accomplissements. A nous deux, tout est possible. Je t'aime.

A mon Pépé, à l'origine de mon tout.

Une page se tourne, une nouvelle s'écrit, n'empêchant pas d'y retrouver les mêmes mots afin de rédiger une nouvelle histoire, encore plus belle.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIÈRES	6
ABREVIATIONS	8
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	10
RESUME / ABSTRACT	11
I. INTRODUCTION.....	13
1. HTLV-1 – GENERALITES.....	13
1.1. DECOUVERTE	13
1.2. ORIGINE ET ÉPIDÉMIOLOGIE	13
1.3. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION PAR HTLV-1	15
1.3.1. <i>La transmission du virus</i>	15
1.3.1.1. La transmission verticale de la mère à l'enfant	15
1.3.1.2. La transmission par voie sexuelle	15
1.3.1.3. La transmission parentérale	16
1.3.2. <i>Pathologies associées à l'infection par HTLV-1</i>	16
1.3.2.1. La Leucémie T de l'Adulte.....	16
1.3.2.2. Paraparésie Spastique Tropicale	17
1.3.2.3. Autres pathologies	18
2. DEROULEMENT DU CYCLE VIRAL	19
2.1. ORGANISATION GENOMIQUE	19
2.1.1. <i>Gènes canoniques des rétrovirus</i>	19
2.1.2. <i>Produits de la région pX</i>	22
2.1.3. <i>Les transcrits antisens viraux</i>	22
2.2. CYCLE VIRAL	22
2.2.1. <i>Phase précoce de l'infection</i> :.....	22
2.2.2. <i>Phase tardive de l'infection</i>	24
2.3. ÉVOLUTION DE L'INFECTION <i>IN VIVO</i>	26
2.3.1. <i>Transmission cellule-cellule des particules virales HTLV-1</i>	26
2.3.2. <i>Propagation par expansion clonale</i>	26
3. L'ONCOGENESE ASSOCIEE AU HTLV-1 : LES ONCOPROTEINES TAX ET HBZ	27
3.1. L'ONCOPROTEINE TAX.....	28
3.2. L'ONCOPROTEINE HBZ.....	33
3.3. BILAN DES FONCTIONS RESPECTIVES DE TAX ET HBZ.....	38
4. DETOURNEMENT DE LA MACHINERIE DE TRANSCRIPTION CELLULAIRE PAR LE HTLV-1.....	39
4.1. TRANSCRIPTION CELLULAIRE DES GENES DE CLASSE II	39

4.1.1.	<i>En amont de l'initiation : levée de la répression transcriptionnelle</i>	39
4.1.2.	<i>Étape de Pré-initiation</i>	41
4.1.3.	<i>Étape de formation du PIC</i>	42
4.1.4.	<i>Elongation</i>	44
4.2.	MECANISME DE LA TRANSCRIPTION DU HTLV-1	46
4.2.1.	<i>Structure des LTRs</i>	46
4.2.2.	<i>Transcription basale du virus en absence de la protéine Tax</i>	47
4.2.3.	<i>Transcription induite par Tax</i>	49
4.2.3.1.	<i>En amont de l'initiation : Levée de la répression transcriptionnelle</i>	49
4.2.3.2.	<i>Formation du complexe de pré-initiation</i>	50
4.2.3.3.	<i>Initiation de la transcription : Détournement des GTF par Tax</i>	52
4.2.3.4.	<i>Elongation de la transcription</i>	54
4.2.4.	<i>Répression de la transcription virale</i>	55
4.2.5.	<i>Effet de Tax sur le LTR 3'</i>	57
5.	PROBLEMATIQUE DU TRAVAIL DE THESE	58
II.	MATERIELS ET METHODES	60
1.	MATERIELS	60
2.	METHODES	61
III.	RESULTATS	65
1.	PRESENTATION DE L'ARTICLE : « HUMAN T-CELL LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE 1 TRANSACTIVATOR TAX EXPLOITS THE XPB SUBUNIT OF TFIID DURING VIRAL TRANSCRIPTION » (MARTELLA ET AL, JVI, 2020)	65
2.	EFFETS DE LA PROTEINE TAX SUR L'EXPRESSION DES TRANSCRITS ANTISENS DU HTLV-1	85
2.1.	PREAMBULE	85
2.2.	L'INHIBITION DE LA TRANSCRIPTION SENS EST ASSOCIEE A UNE MODULATION DES NIVEAUX D'ARNM DE USHBZ ET DE SHBZ	86
2.3.	LA SUREXPRESSION DE TAX WT ET DU MUTANT TAX M47 INDUIT LE TRANSCRIT USHBZ	88
2.4.	L'AUGMENTATION DU NIVEAU D'ARN DE USHBZ EST ASSOCIEE A LA SUREXPRESSION DE TAX, ET NON A LA REACTIVATION DE LA TRANSCRIPTION SENS.	90
IV.	DISCUSSION	93
V.	BIBLIOGRAPHIE	104

ABBREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique
AP-1 : Activator Protein 1
ARN : Acide ribonucléique
ATF : Activating Transcription Factor
ATL : Adult T-cell Leukaemia
BER : Base Excision Repair
CBP : CREB binding protein
CCR4 : C-C Chemokine Type 4
CDK : Cyclin Dependant Kinase
ChIP : Immunoprécipitation de chromatine
CMV : Cytomégalo virus
CRE : cyclic AMP response element
CREB : cyclic-AMP response element binding protein
CTCF : CCCTC-binding Factor
CTD : C-terminal Domain
C-ter : Carboxy-terminal
Env : Enveloppe
EPL : Eplérénone
EZH2 : Enhancer of Zeste Homolog 2
GLUT-1 : Glucose Transporter 1
HAM : HTLV-1 Associated Myelopathy
HAT : Histone Acétyltransférase
HBZ : HTLV-1 b-Zip Factor
HDAC : Histone Deacétylase
HSPG : Heparan Sulfate Proteoglycans
hTERT : Human Telomerase Reverse Transcriptase
HTLV-1 : Human T cell Leukemia/Lymphoma Virus Type 1
HTLV-2 : Human T cell Leukemia/Lymphoma Virus Type 2
IFN- α : Interferon alpha
IgG : Immunoglobuline G
I κ B : Inhibitors of κ B
IKK : I κ B Kinase
IL-2 : interleukine 2
LT : Lymphocytes T
LTR : Long Terminal Repeat
MAPK : Mitogen-activated Protein Kinases
MMR : Mismatch Repair
NER : Nucleotide Excision Repair
NES : Nuclear Export Signal
NF- κ B : Nuclear Factor Kappa B
NHEJ : Non-Homologous End Joining
NLS : Nuclear Localisation Signal
NRP-1 : Neuropiline 1
N-ter : amino-terminal
ORF : Open Reading Frame
PBMC : Peripheral Blood Mononuclear Cells (Cellules mononuclées du sang périphérique)
P/CAF : p300/CBP Associated Factor
PCR : Polymerase Chain Reaction

PI3K : Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA : Protein Kinase A
PRC : Polycomb Repressive Complex
P-TEFb : Positive Transcription Elongation Factor b
PVL : Proviral Load (Charge provirale)
ROS : Reactive Oxygen Species
RT : Reverse Transcription
sHBZ : Spliced HTLV-1 b-Zip Factor
SP : Spironolactone
Sp1 : Specific Protein 1
SRE : Serum Response Element
SRF : Serum Response Factor
Suv39H1 : Suppressor of variegation 3-9 homolog 1
SWI/SNF : Switch/Sucrose Non Fermentable
TAF : TBP-Associated Factor
Tax : Transactivator of pX region
TBP : TATA box Binding Protein
TET2 : Ten-eleven-translocation 2
TFIID : Transcription Factor II D
TFIIH : Transcription Factor II H
TNF - α : Tumor Necrosis Factor alpha
TORC : Transducer of regulated CREB activity
TRE : Tax Responsive Element
TSP : Tropical Spastic Paraparesis
usHBZ : Unspliced HTLV-1 b-Zip Factor
vCRE : Viral cyclicAMP Responsive Element
XPB : Xeroderma Pigmentosum group B
XPD : Xeroderma Pigmentosum group D

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

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

Figure 2 : Schéma représentant le génome du HTLV-1 et les transcrits viraux

Figure 3 : Cycle viral simplifié du rétrovirus HTLV-1

Figure 4 : Schéma de la structure de la protéine virale Tax

Figure 5 : Schéma de la structure de la protéine virale HBZ

Figure 6 : Schéma simplifié de l'initiation de la transcription des promoteurs cellulaires de classe II

Figure 7 : Organisation du LTR du HTLV-1

Figure 8 : Schéma des éléments de transcription cellulaires impliqués dans la transcription basale du promoteur du HTLV-1

Figure 9 : Schéma résumant les principaux facteurs impliqués dans la transactivation du LTR par Tax

Figure 10 : Hypothèse de la régulation de la transcription virale par Tax

Figure 11 : Schéma des transcrits antisens du HTLV-1

Figure 12 : L'inhibition de la transcription sens par la SP influence les niveaux d'ARN de usHBZ et sHBZ

Figure 13 : Tax sauvage et le mutant M47 induisent l'expression de l'ARN usHBZ

Figure 14 : Schéma du provirus HTLV-1 modifié CMV-Env-LTR3'

Figure 15 : Tax active la transcription de l'ARN usHBZ dans la lignée Jurkat CMV-Env-LTR

Figure 16 : Modèle proposant Tax comme transactivateur du LTR 5' et du LTR 3'

Tableau 1 : Tableau résumant les précurseurs protéiques et protéines virales du HTLV-1

Tableau 2 : Modifications post-traductionnelles de la protéine virale Tax

Tableau 3 : Voies de signalisation cellulaires activées par la protéine virale Tax

Tableau 4 : Voies de maintenance de l'ADN perturbées par la protéine virale Tax

Tableau 5 : résumé des modèles cellulaires utilisés lors de l'étude

Tableau 6 : Résumé les anticorps utilisés lors de l'étude

Tableau 7 : Séquences des amorces et sonde utilisées pour la détection des transcrits Tax et sHBZ par qPCR

Tableau 8 : Séquences des amorces utilisées pour la détection des transcrits Gag et Env par qPCR

Tableau 9 : Séquences des amorces utilisées pour la détection des transcrits cellulaires

Annexe : « Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Transactivator Tax Exploits the XPB Subunit of TFIIH during Viral Transcription » Martella et al, Journal of Virology, 2020.

RESUME / ABSTRACT

Le Virus T Lymphotrope Humain de type 1 (HTLV-1), qui infecte principalement les lymphocytes T CD4+, est responsable du développement de la leucémie T de l'Adulte, lymphoprolifération maligne des lymphocytes T infectés, et de la Paraparésie Spastique Tropicale, pathologie inflammatoire du système nerveux central. Le génome du HTLV-1, seul rétrovirus oncogène chez l'Homme, code pour deux oncoprotéines : Tax (Transactivation of pX), et HBZ (HTLV-1 b-Zip). Tax, dont l'expression est sous contrôle du LTR 5', est un puissant inducteur de la prolifération cellulaire et est également responsable de l'inhibition de l'apoptose et de l'augmentation de l'instabilité génomique. L'oncoprotéine HBZ, codée en antisens du génome, est le produit de différents transcrits sous contrôle du promoteur LTR 3'. Un premier transcrit, initié à la jonction entre les régions R et U5 du LTR 3', permet la synthèse de deux ARNm alternativement épissés codant pour sHBZ et SP2. Un second transcrit, initié à 704 pb de la région U3 du LTR 3' permet la synthèse de l'ARNm non épissé usHBZ. Tax et HBZ sont toutes deux impliquées dans la lymphomagenèse induite par HTLV-1. Or, le stade leucémique est caractérisé par une perte d'expression des transcrits sens, alors que l'expression de HBZ est conservée. La modulation de la balance Tax/HBZ semble donc être un événement clé pour la transition immortalisation / transformation, mettant en évidence l'importance d'étudier les mécanismes impliqués dans la régulation des deux LTR.

Au niveau viral, Tax est le transactivateur du promoteur LTR 5' qui contrôle l'expression des transcrits viraux sens, dont celle de Tax, mais pas celle de HBZ, codée en antisens. Tax est connue pour recruter des co-facteurs spécifiques de la transcription par l'ARN polymérase II au niveau du promoteur viral comme CBP/p300, mais aussi des facteurs généraux de la transcription comme TFIIA et IID, permettant ainsi la synthèse et l'élongation de l'ARN viral. Néanmoins, le lien potentiel entre Tax et le complexe TFIIH qui assure la transition entre l'initiation et l'élongation n'a pas été étudiée en détails.

Dans un premier temps, l'étude se concentre donc sur le rôle de TFIIH, en particulier de sa sous-unité XPB, dont l'activité ATPase permet l'ouverture du promoteur. Les résultats montrent que Tax et XPB interagissent directement, forment un complexe dans un modèle de lymphocytes T infectés par HTLV-1 et que XPB est recrutée au niveau du promoteur viral de façon dépendante de Tax. De plus, la dégradation de XPB par un inhibiteur pharmacologique, la Spironolactone (SP), réduit fortement la transactivation du promoteur viral par Tax dans des lymphocytes T infectés par HTLV-1, effet compensé par la surexpression de XPB exogène. En outre, un mutant de XPB déficient pour l'activité ATPase n'est pas capable de compenser l'effet de la SP, démontrant l'importance de l'étape d'ouverture du promoteur dans la transactivation du LTR 5' par Tax. Ces résultats révèlent que XPB est un nouveau co-facteur cellulaire, détourné par la protéine virale Tax afin d'optimiser la transcription du HTLV-1.

Dans un second temps, l'étude s'intéresse à un potentiel rôle de Tax, en tant que transactivateur viral, dans la régulation de la transcription antisens du HTLV-1. Cet autre aspect a mis en lumière que l'inhibition de la transcription sens par la SP est associée à une diminution du niveau de l'ARN usHBZ. De plus, la surexpression de la protéine Tax active la production de l'ARN usHBZ dans un modèle de lymphocytes T infectés par HTLV-1. De façon intéressante, un mutant de Tax décrit comme déficient pour l'activation du LTR 5' est toujours capable d'induire l'expression de l'ARN usHBZ, suggérant un mécanisme de transactivation distinct entre les deux LTR. Ces résultats préliminaires mettent en perspective un rôle de Tax encore non décrit comme transactivateur du LTR 3' pour la synthèse de l'ARN usHBZ dans un contexte proviral.

Mots clés : HTLV-1, transcription virale, LTR, Tax, TFIIH, XPB, HBZ

Human T Lymphotropic Virus type 1 (HTLV-1), unique human oncoretrovirus, is responsible for the development of Adult T cell Leukemia (ATL), a malignant lymphoproliferation of CD4⁺ T cells, and Tropical Spastic Paraparesis, an inflammatory pathology of the central nervous system. The HTLV-1 genome, encodes two oncoproteins: Tax (Transactivation of pX), and HBZ (HTLV-1 b-Zip). Tax is a powerful inducer of cell proliferation and is involved in apoptosis inhibition and genomic instability. The HBZ oncoprotein is encoded in antisense of the genome and is the product of different transcripts whose expression is under the control of the 3' LTR promoter. A first transcript, initiated at the junction between the R and U5 regions of 3' LTR, allows the synthesis of two alternatively spliced mRNAs encoding sHBZ and SP2. A second transcript, initiated 704 bp upstream the 3' LTR, leads to the synthesis of the unspliced mRNA, usHBZ. Both Tax and HBZ are involved in HTLV-1-associated lymphomagenesis. However, the ATL stage is characterized by a loss of expression of sense transcripts, whereas the expression of HBZ, in antisense, is conserved. The modulation of the Tax/HBZ balance therefore seems to be a key event in the immortalization / transformation transition, highlighting the importance of studying the mechanisms involved in the regulation of the two LTRs.

At the viral level, Tax acts as the transactivator of the 5' LTR promoter, which controls the expression of viral sense transcripts, including that of Tax, but not that of HBZ, encoded in antisense of the viral genome. Tax is known to recruit specific co-factors of RNA polymerase II onto the viral promoter such as CBP/p300, but also general transcription factors such as TFIIA, and IID, thus allowing the synthesis and elongation of viral RNAs. However, the link between Tax and TFIIH, which ensures the transition between the initiation step and the elongation step, has not been studied in details.

First, the study addresses the possibility of a link between TFIIH and Tax, especially via its XPB subunit which ATPase activity is responsible for the promoter opening step. The results show that Tax and XPB interact directly, form a complex in a model of HTLV-1 infected T lymphocytes, and that XPB is recruited onto the viral promoter in a Tax-dependent manner. Furthermore, the degradation of XPB by a pharmacological inhibitor, Spironolactone (SP), strongly reduces the transactivation of the viral promoter by Tax in HTLV-1 infected T cells, an effect compensated by overexpression of exogenous XPB. In addition, an XPB mutant deficient for the ATPase activity is no more able to compensate the effect of SP, demonstrating the importance of the promoter opening step in this transcriptional mechanism. These results reveal that XPB is a new cellular co-factor hijacked by Tax to optimize HTLV-1 transcription. Second, the study focuses on a potential role of Tax, as a viral transactivator, in the regulation of HTLV-1 antisense transcription. This other aspect highlighted that inhibition of sense transcription by SP is associated with a decrease of usHBZ RNA level. In addition, overexpressing Tax protein activates usHBZ RNA transcription in a model of HTLV-1 infected T cells. Interestingly, a Tax mutant described as defective for the activation of 5' LTR is still able to induce the expression of usHBZ RNA, suggesting a distinct transactivation mechanism between the two LTRs. These preliminary results put into perspective a novel role of Tax as transactivator of 3' LTR to activate usHBZ mRNA expression in a proviral context.

Keywords: HTLV-1, viral transcription, LTR, Tax, TFIIH, XPB, HBZ

I. INTRODUCTION

1. HTLV-1 – Généralités

1.1. Découverte

L'existence de rétrovirus oncogènes a été démontrée dès le début du XXe siècle par la découverte du virus de Sarcome de Rous (RSV, Rous et al, 1911), ou encore du Virus de la Leucémie Murine (Gross et al, 1951). Or, la caractérisation de virus oncogènes chez l'Homme a débuté plus tardivement. Les avancées technologiques notables permettant la détection spécifique de l'activité de la transcriptase inverse propre au rétrovirus (Baltimore et al, 1970), ainsi que la caractérisation de l'IL-2 (Morgan et al, 1976) ont rendu possible la culture de lymphocytes humains *in vitro*. Ces nouvelles techniques ont permis à l'équipe de Robert Gallo de mettre en évidence l'existence d'un rétrovirus humain présent dans les cellules d'un patient atteint d'un lymphome cutané à cellules T en 1981, virus baptisé Human T-Lymphotropic Virus, HTLV (Revue dans Gallo et al, 2005).

Cette étude est à mettre en parallèle avec les travaux de l'équipe de Kiyashi Takatsuki au Japon, décrivant l'existence d'une forme spécifique de prolifération lymphocytaire T touchant les patients de la région de Kyush. Cette pathologie était retrouvée chez des adultes qui présentaient les mêmes symptômes, principalement des atteintes cutanées et la présence de cellules T avec des noyaux polylobés (Uchiyama et al, 1977). Cela conduisit à la description d'une nouvelle pathologie : la Leucémie T de l'Adulte (Adult T cell leukemia, ATL).

La similitude de ces deux études conduisit à la conclusion que le rétrovirus HTLV nouvellement décrit était l'agent responsable du développement de la Leucémie T de l'Adulte. Suite à ces découvertes, le rétrovirus HTLV-2 fut décrit (Kalyanaraman et al, 1982), remettant en cause la nomenclature du HTLV vers HTLV-1. Les études phylogéniques ont permis de démontrer que le HTLV-1 appartient à la famille des *Retroviridae*, à la sous-famille des *Orthoretrovirinae* et au genre *Deltaretrovirus* (Van der Kuyl et al, 2012)

1.2. Origine et Épidémiologie

Suite à la découverte du HTLV-1, des études menées sur des singes japonais montrèrent leur susceptibilité à être infectés par ce virus (Miyoshi et al, 1982 a). Puis, des études sérologiques plus importantes mirent en évidence que la majorité des singes japonais sont infectés par un

virus apparenté à HTLV-1 (Myoshi et al, 1982 b). Plus précisément, il fut montré que les singes de l'ancien monde et les *Hominoidea*, mais pas les singes du nouveau monde, sont infectés par ce même virus (Hayami et al, 1984), qui fût nommé Simien T Lymphotropic Virus, STLV-1 (Komuro et al, 1984 ; Watanabe et al, 1986). Cela permis de démontrer que le HTLV-1 est apparu chez l'homme suite à une transmission interespèce du STLV-1 il y a environ 27 000 ans en Afrique (Mossoun et al, 2017) et qu'il est toujours possible d'observer cette transmission lors de morsures par des singes infectés (Kazanji et al, 2015).

Actuellement, on considère qu'environ 10 millions de personnes sont infectées par le HTLV-1 (Gessain et Cassar, 2012), avec de fortes zones endémiques comme l'Afrique sub-saharienne, l'Asie du Sud-Est et l'Amérique du Sud et les Caraïbes (Figure 1). La forte endémie en Afrique et en Asie s'explique par la possibilité de transmissions interespèces avec les nombreux singes porteurs du STLV-1 présents dans ces régions. Concernant l'Amérique du Sud et les Caraïbes, l'hypothèse serait plutôt que la présence du HTLV-1 est due aux mouvements migratoires depuis l'Afrique.

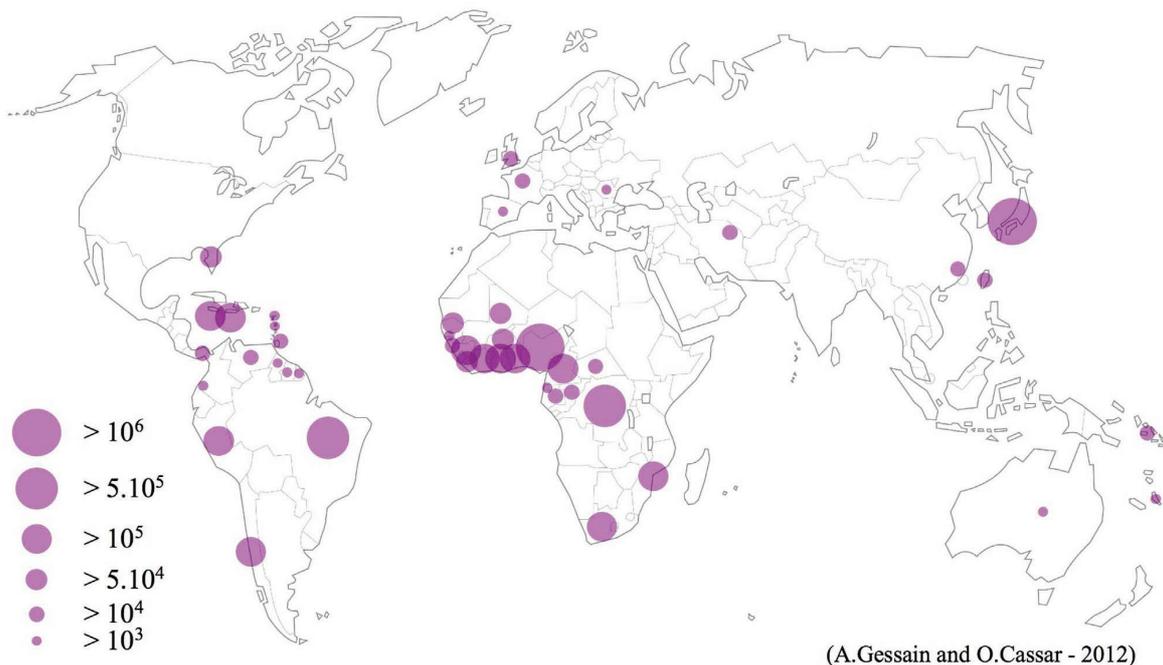


Figure 1 : Répartition mondiale des foyers d'infection majeurs par HTLV-1

Cette carte présente une estimation du nombre d'individus infectés par HTLV-1 basée sur l'étude de 1,5 milliards d'individus originaires de régions endémiques connues. Cette étude regroupe les données épidémiologiques concernant les femmes enceintes, les donneurs de sang et différentes populations d'adultes. (Gessain et Cassar, 2012).

En Europe, le principal foyer endémique est localisé en Roumanie avec une prévalence du HTLV-1 de 0,05%. En France, la prévalence est d'environ 0,03%, avec une zone endémique

importante localisée aux Antilles et en Guyane. HTLV-1 est aussi présent au Royaume-Uni, en Espagne et au Portugal. La majorité des personnes infectées par HTLV-1 dans l'ouest de l'Europe sont originaires ou descendants d'immigrants (80%) venant des zones endémiques fortes comme les Caraïbes et l'Afrique (Gessain et Cassar, 2012).

1.3. Physiopathologie de l'infection par HTLV-1

1.3.1. La transmission du virus

La transmission du HTLV-1 entre un individu sain et un individu infecté a lieu par l'échange de fluides corporels et nécessite la présence de cellules infectées, les produits acellulaires étant en effet très faiblement infectieux (Revue dans Pique et Jones, 2012). Plus précisément, cela implique les voies materno-fœtale, parentérale et sexuelle.

1.3.1.1. La transmission verticale de la mère à l'enfant

La transmission verticale du HTLV-1 implique majoritairement l'allaitement prolongé et entraîne une exposition continue du nouveau-né aux nombreux lymphocytes T infectés présents dans le lait maternel. L'infection transplacentale par HTLV-1 n'est, elle, pas décrite, ce qui s'explique par le faible nombre de cellules pouvant traverser la barrière placentaire (Revue dans Fujino et al, 2000). Des études épidémiologiques réalisées au Japon ont mis en évidence une séroconversion plus élevée chez des enfants allaités pendant plus d'un an par rapport à des enfants nourris au biberon (Ando et al, 1987). La quantité de virus retrouvée dans le lait maternel (appelée charge provirale) est un fort indicateur du risque de transmission du HTLV-1 par la voie materno-fœtale (Li et al, 2004). Suite à ces observations, l'« ATLL Prevention Program », programme japonais de lutte contre l'ATLL (*Adult T cell Leukemia/Lymphoma*), a pris la décision en 1987 de limiter l'allaitement par les mères séropositives pour le HTLV-1 dans la région de Nagasaki, ce qui a permis une forte diminution de la transmission materno-fœtale de 20,3% à 2,5% (Hino et al, 1997).

1.3.1.2. La transmission par voie sexuelle

La transmission par voie sexuelle a été montré comme étant efficace, particulièrement de

l'homme vers les femmes, en lien avec la concentration de lymphocytes T infectés dans le sperme par rapport aux sécrétions vaginales (Paiva et al, 2014).

1.3.1.3. La transmission parentérale

L'infection par HTLV-1 peut également avoir lieu suite à la transfusion de composants cellulaires sanguins infectés vers une personne saine (Manns et al, 1992). Suite à ces observations, certains pays développés comme le Japon et la France ont mis en place des tests sérologiques systématiques en 1986 et 1991 respectivement (Laperche et al, 2009).

Le risque de transmission de l'infection par voie parentérale a également été décrite dans le cas de consommateurs de drogues injectables, mettant en évidence une transmission *via* l'utilisation d'instruments contaminés (Futsch et al, 2017).

Des cas de développements rapides des pathologies associées à l'infection par HTLV-1 ont été décrits suite à des transplantations d'organes solides issus de donneurs infectés par HTLV-1 non diagnostiqués (Gout et al, 1990 ; Taylor et al, 2018).

1.3.2. Pathologies associées à l'infection par HTLV-1

1.3.2.1. La Leucémie T de l'Adulte

La leucémie T de l'Adulte (*Adult T cell Leukemia, ATL*) est une lymphoprolifération anormale et incontrôlée de lymphocytes T CD4⁺ infectés par HTLV-1. Après une période asymptomatique pouvant durer plusieurs dizaines d'années, cette pathologie se développe dans environ 5% des cas d'infection. Elle est associée à différents symptômes, généralement des lymphadénopathie, hépatomégalie, splénomégalie, hypercalcémie, et lésions cutanées et pulmonaires (Revue dans Hermine et al, 2018). L'ATL est classée selon 2 groupes majeurs : (i) les formes aiguës et lymphomateuses, qui constituent les formes les plus sévères et associées à un très mauvais pronostic (survie de quelques mois), (ii) puis les formes chroniques présentant un bien meilleur devenir mais pouvant évoluer vers une forme aiguë rapidement (Shimoyama et al, 1991).

Actuellement, aucun traitement ne permet la guérison totale des patients atteints d'ATL. La majorité des études cliniques ayant été réalisées au Japon, il est nécessaire d'extrapoler les résultats aux patients occidentaux. Or, l'efficacité des traitements semble être corrélée à la population concernée mettant en évidence la nécessité de continuer les études cliniques en Europe et aux USA (Revue dans Hermine et al, 2018).

Au Japon, les formes les plus agressives d'ATL sont traitées principalement grâce à l'utilisation de combinaisons de chimiothérapies conventionnelles, traitements associés à une faible augmentation de l'espérance de vie des patients. Les formes chroniques d'ATL sont, quant à elles, traitées par une greffe de moelle osseuse. Cette approche permet d'obtenir le meilleur taux de survie, cependant le nombre de patients pouvant bénéficier de cette greffe reste faible (Marçais et al, 2013 ; Katsuya et al, 2015).

L'utilisation de combinaisons de chimiothérapies conventionnelles est l'approche thérapeutique de référence pour traiter les formes aiguës d'ATL au Japon et aux USA, alors qu'en France, l'approche la plus plébiscitée est l'utilisation d'un inhibiteur de transcriptase inverse des rétrovirus (Zidovudine, ou AZT) couplée à de l'interféron alpha. Ce traitement montre des résultats positifs dans le cas de forme chroniques d'ATL mais est inefficace dans le cas des formes lymphomateuses (Marçais et al, 2013).

Une autre approche thérapeutique consiste à induire l'apoptose des cellules tumorales ou inhiber leur prolifération par l'utilisation d'une combinaison entre l'AZT, l'arsenic et l'interféron alpha, malheureusement associée à des effets secondaires hématologiques (Kchour et al, 2009).

Une nouvelle approche actuellement en développement est l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre des marqueurs moléculaires spécifique de l'ATL (Revue dans Hermine et al, 2018). La plus prometteuse est l'utilisation du Mogamulizumab, un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur aux chimiokines CCR4, surexprimé dans les lymphocytes T infectés par HTLV-1, qui permet d'obtenir une certaine efficacité (Ishida et al, 2015). Des essais cliniques sont en cours aux USA et au Japon, en complément ou non d'une chimiothérapie classique (Motohashi et al, 2013 ; Sekiguchi et al, 2014)

1.3.2.2. Paraparésie Spastique Tropicale

La Paraparésie Spastique Tropicale (TSP, *Tropical Spastic Paraparesis*) est une pathologie inflammatoire spécifique du système nerveux central associée à des lésions de la moelle épinière conduisant à une destruction des gaines de myéline. Les conséquences sont une forte

faiblesse, voire une paralysie des membres inférieurs ainsi qu'un dysfonctionnement de l'intestin et de la vessie.

Le lien entre l'infection par le HTLV-1 et le développement de la TSP a été décrit pour la première fois en Martinique en 1985 (Gessain et al, 1985). Il a été rapporté que cette pathologie se développe chez 0,2 à 3,8% des personnes infectées par le HTLV-1 (Osame et al, 1986). La présence de lymphocytes T infectés par HTLV-1 au niveau du système nerveux central entraîne la sécrétion de chimiokines pro-inflammatoires (Interféron γ et TNF α) par les cellules résidentes du système nerveux central. La conséquence est le recrutement de lymphocytes T CD8+ spécifique des antigènes du HTLV-1, entraînant une inflammation locale prolongée (Ozden et al, 2004). L'inflammation ainsi provoquée induit des dommages importants aux tissus environnants (effet by stander) (Nozuma et al, 2020).

Les traitements actuels ciblent les symptômes et limitent l'aggravation de la pathologie. La réponse immunitaire pro-inflammatoire est régulée par l'utilisation d'anti-inflammatoires majoritairement stéroïdiens comme la Prednisolone, particulièrement lors des stages précoces de la pathologie (Nozuma et al, 2020). De plus, l'utilisation d'antiviraux, comme le traitement par l'interféron alpha, sont à l'étude et montre des résultats positifs à court terme (Bangham et al, 2015).

Tout comme pour le traitement de l'ATL, les thérapies ciblant directement les cellules infectées par HTLV-1 sont prometteuses. L'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant le récepteur CCR4 au niveau de la surface des lymphocytes T infectés par HTLV-1 permettrait de réduire le nombre de cellules infectées, et donc la sévérité des pathologies associées (Yamauchi et al, 2015). Actuellement en cours d'essai clinique, le Mogamulizumab présente une très bonne efficacité à court terme sans effets secondaires majeures associés au traitement (Sato et al, 2018).

1.3.2.3. Autres pathologies

L'infection par le HTLV-1 est associée à de nombreuses pathologies inflammatoires touchant différents organes comme des uvéites, des arthrites, des dermatites, etc ... (Revue dans Martin et al, 2014). De plus, l'état immunologique des patients infectés par HTLV-1 est responsable d'infections opportunistes telles que l'infection par *Strongyloides stercoralis* (Gonçalves et al, 2010).

2. Déroulement du cycle viral

2.1. Organisation génomique

Sous forme intégrée dans le génome cellulaire (provirus), le génome du rétrovirus HTLV-1 se présente sous forme d'un ADN double brin d'environ 9000 paires de bases (pb) encadré par deux séquences terminales répétées (LTR pour *Long Terminal Repeat*) composés des éléments de régulation de la transcription (promoteur viral et site de polyadénylation). Le génome est composé des phases ouvertes de lecture (ORF pour *Open Reading Frame*) classiques des rétrovirus codant pour les gènes *gag*, *pro*, *pol* et *env* ainsi que d'une région spécifique des *Deltarétrovirus*, appelée région pX. Cette région code pour les protéines virales dites régulatrices (Tax et Rex), indispensables à la réplication du virus *in vitro* ainsi que les protéines virales auxiliaires (p12, p30, HBZ), modulant l'expression virale et agissant également sur la relation cellule/virus (Edwards et al, 2011 ; Fukumoto et al, 2013) (Figure 2).

2.1.1. Gènes canoniques des rétrovirus

La transcription virale initiée depuis le LTR5' donne naissance à des transcrits coiffés et polyadénylés. Le virus produit des transcrits non épissés et épissés. L'ARN viral non épissé couvrant l'intégralité du génome code pour les produits Gag/Pol et Gag/Pro/Pol : le précurseur Gag/p55 (clivé par la suite en protéines de matrice M_{Ap}19, capsid C_{Ap}24 et nucléocapsid NC_p15), la protéase, l'intégrase, et la transcriptase inverse. Cette grande flexibilité est due à l'existence de deux changements de cadre de lecture lors de la traduction par glissement du ribosome (Johnson et al, 2001). De la même façon, les glycoprotéines d'enveloppe sont produites sous forme d'un précurseur (gp61) ensuite clivé en deux sous-unités, la protéine de surface (SU/gp46) et la protéine transmembranaire (TM/gp21) et sont produites après le clivage du précurseur Env, (Figure 2 et Tableau 1).

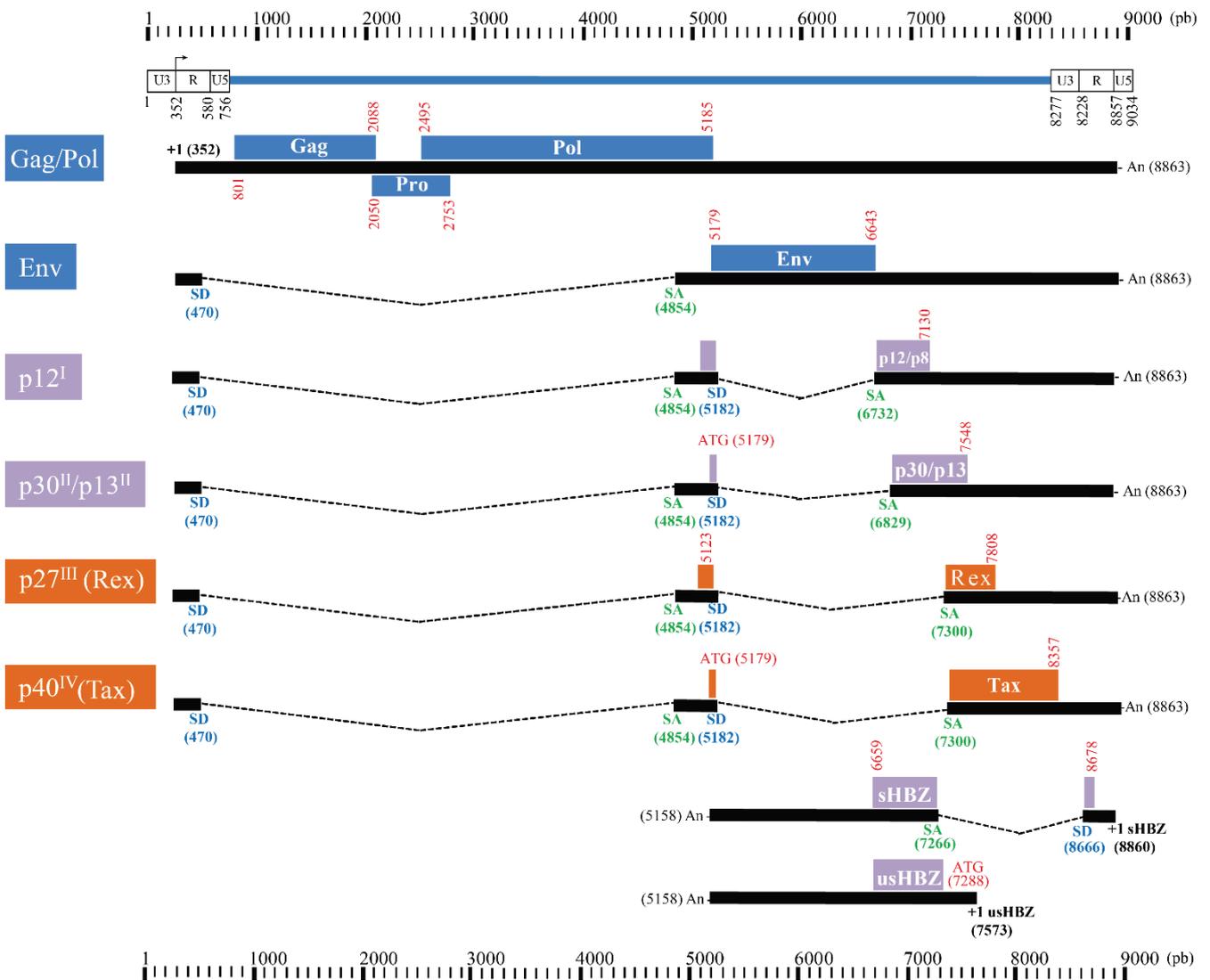


Figure 2 : Schéma représentant le génome du HTLV-1 et les transcrits viraux

Sous forme provirale, le génome viral est intégré dans celui de la cellule hôte et se présente comme une séquence d'ADN encadrée par des LTRs identiques composés des éléments de régulation de la transcription. Le génome viral comporte les phases ouvertes de lecture classiques des rétrovirus (GAG, PRO, POL, ENV) ainsi que par la région pX codant pour les protéines régulatrices et auxiliaires. Une phase ouverte de lecture (HBZ) est également codée sur le brin antisens.

Un ARN non épissé de longueur totale du génome peut être soit encapsidé dans les nouvelles particules virales, ou être utilisé pour la traduction protéines de capsid, de matrice et des enzymes rétrovirales. L'ARN codant pour les protéines d'enveloppe est mono-épissé, alors que les ARN codant pour les protéines régulatrices Tax, Rex et p30 et p12 sont doublement épissés. La transcription antisens depuis le LTR 3' donne naissance à deux transcrits : un premier initié dans la région U5 du LTR 3' à l'origine de la synthèse d'un ARN épissé (sHBZ), un second transcrit initié en amont du LTR 3' permettant la synthèse d'un ARN non épissé (usHBZ).

Tableau 1 : Tableau résumant les précurseurs protéiques et protéines virales du HTLV-1

	Précurseurs polyprotéiques	Protéines		Fonctions	Références
ARN génomique viral	Gag-p55	p19 p24 p15		Protéine de matrice Protéine de capside Protéine de nucléocapside	Malik et al, 1988 Trentin et al, 1998
	Gag-Pro	Protéase (28 kDa)		Maturation de la particule virale	Koralnik et al, 1994
	Gag-Pro-Pol	Pol (95kDa)	Transcriptase inverse	Étape de rétrotranscription du génome viral	Shuker et al, 2003
			Intégrase	Intégration du génome viral sous forme de provirus	
Env-gp61	gp46 (SU) / gp21 (TM)		Entrée virale	Pique et al, 2011	
ORF-I	-	p12/p8		Nécessaire à l'infectiosité du virus Modulation de l'homéostasie du Ca ²⁺ (coopération avec p13)	Sarkis et al, 2019
ORF-II	-	p13		Modulation de l'homéostasie du Ca ²⁺ (coopération avec p12) et du K ⁺ Activation de la chaîne respiratoire et augmentation de la production de ROS Modulation de l'apoptose médiée par Ras Persistance de l'infection Inhibition de la transactivation du LTR par Tax	Omsland et al, 2020
		p30		Essentielle pour l'infection <i>in vivo</i> Régulation de la latence virale par diminution de l'expression de Tax/Rex Modulation des voies de réparation de l'ADN	Moles et al, 2019
ORF-III	-	Rex		Interaction avec les motifs RXRE présents en amont du polyA permettant l'export des ARNm viraux Modulation de la machinerie du métabolisme des microARN	D'Agostino et al, 2019
ORF-IV	-	Tax		Modulation des voies de l'apoptose Modulation des voies de réparation de l'ADN Activation de nombreuses voies de prolifération lymphocytaire Dérégulation du cycle cellulaire Transactivateur de la transcription virale	Mohanty et al, 2020
ARN antisens	-	HBZ (2 ARNm : une forme épissée / une forme non épissée)		Activation de voies de prolifération lymphocytaire Activation de la télomérase hTERT Transactivation du LTR 3' <i>via</i> SP1	Ma et al, 2016

2.1.2. Produits de la région pX

Concernant la région pX, quatre ORF sont connues et sont à l'origine de la production de différentes protéines régulatrices et auxiliaires du virus.

Les protéines régulatrices regroupent les protéines Tax et Rex qui sont traduites à partir de transcrits doublement épissés codés par les ORF IV et III, respectivement (Fukumoto et al, 2013). Les protéines auxiliaires sont codées par l'ORF I et II. L'ORF I permet la production de la protéine p12, et p8 par clivage interne de la p12. L'ORF II permet la synthèse d'un ARN doublement épissé à l'origine de la synthèse des protéines p13 et p30, respectivement. (Figure 2 et Tableau 1).

2.1.3. Les transcrits antisens viraux

La transcription du brin antisens du génome du HTLV-1 a été caractérisée dans les lymphocytes T de patients infectés (Larocca et al, 1989). L'étude de la traduction de ces transcrits a permis la caractérisation de la protéine HBZ (HTLV-1 b-Zip Factor) (Gaudray et al, 2002). Plus précisément, cette transcription, dite antisens, permet la synthèse de deux transcrits distincts. Un premier transcrit initié dans la région U5 du LTR 3' est à l'origine d'un ARNm épissé appelé sHBZ (ou HBZ-SP1). Un autre transcrit, lui, initié en amont du LTR 3', permet la synthèse d'un ARNm non épissé appelé usHBZ (Barbeau et Mesnard, 2015). De ces deux transcrits antisens sont issues deux protéines différant de 7 acides aminés dans leur partie C-terminale. Cette différence confère une demi-vie supérieure à sHBZ par rapport usHBZ (Ma et al, 2016). (Figure 2 et Tableau 1).

2.2.Cycle Viral

2.2.1. Phase précoce de l'infection :

Cette phase va de l'entrée du virus dans la cellule cible à l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte.

La particule virale

La particule virale du HTLV-1 est caractéristique d'une particule de rétrovirus de type C, de 73 nm de taille en moyenne. Elle est enveloppée d'une membrane bi-lipidique acquise lors du bourgeonnement des particules néoproductes au niveau de la membrane cellulaire. Les glycoprotéines d'enveloppe virales, SU (gp46) et TM (gp21), y sont ancrées. L'enveloppe est également associée aux protéines de matrice (p19) *via* une interaction entre gp21 et p19 (Pique et Jones, 2011). Au centre se trouve la capsid, composée de protéines p24 et présentant une forme icosaédrique. Celle-ci contient le génome viral composé de deux copies d'ARN simple brin de polarité positive, associées aux protéines de la nucléocapside (p15) ainsi qu'à l'intégrase, la protéase virale et la transcriptase inverse, formant le complexe ribonucléoprotéique (Figure 3).

Tropisme et entrée de la particule virale

In vivo, le virus HTLV-1 possède préférentiellement un tropisme pour les lymphocytes T CD4⁺ (Richardson et al, 1990). De façon minoritaire, le virus peut aussi infecter des lymphocytes T CD8⁺, des lymphocytes B, des monocytes (Koyanagi et al, 1993), ainsi que des macrophages, des cellules dendritiques, myéloïdes et plasmacytoïdes (Grant et al, 2002).

L'entrée des rétrovirus dans les cellules cibles est gouvernée par l'interaction entre les glycoprotéines de l'enveloppe virale et un ou des récepteur(s) cellulaire(s). Dans le cas du HTLV-1 (revue dans Jones et al, 2011), l'interaction de la sous-unité SU avec les héparanes sulfate du protéoglycane permet l'adhérence du virus à la cellule cible, puis de faciliter le contact avec la neuropiline 1 (NRP-1), le récepteur cellulaire de liaison. Cela entraîne un changement conformationnel de SU permettant l'interaction du complexe HSPG-SU-NRP-1 avec une seconde protéine cellulaire, le transporteur de glucose GLUT-1, agissant comme récepteur de fusion. A l'inverse de HSPG et GLUT-1, exprimés de façon ubiquitaire dans les différents types cellulaires, le tropisme du HTLV-1 pour les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ s'explique par l'expression de NRP-1, exprimée après leur activation (revue dans Pique et Jones, 2012). Suite à ces événements de liaison puis fusion, la capsid virale est relâchée dans le cytoplasme de la cellule cible. S'y déroule alors l'étape de transcription inverse du génome ARN simple brin viral permettant de générer une molécule d'ADN double brin. L'ADN néoformé s'associe avec des protéines cellulaires et virales, comme l'intégrase virale, pour former le complexe de pré-intégration (Figure 3).

Intégration du génome viral sous forme de provirus.

Le complexe de préintégration du HTLV-1, n'ayant pas la capacité de franchir la membrane nucléaire, sera au contact de la chromatine lors d'évènements mitotiques associés à une désorganisation de la membrane nucléaire. Le génome viral est ensuite intégré dans le génome cellulaire grâce à la présence des LTR et de l'intégrase virale. Le site d'intégration du génome viral dans le génome cellulaire est relativement aléatoire (Derse et al, 2007). Cependant, le site d'intégration du provirus semble associé à des régions activement transcrites et au niveau des sites d'initiation de la transcription, donc de régions présentant des marques épigénétiques activatrices (Niederer et Bangham, 2014) (Figure 3).

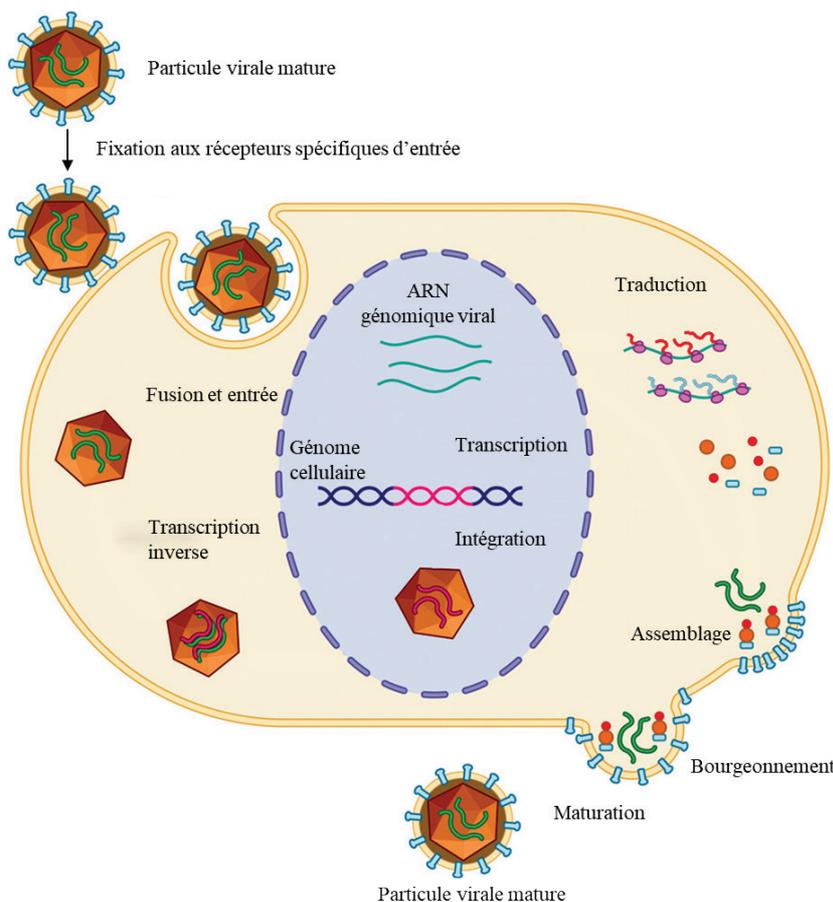


Figure 3 : Cycle viral simplifié du rétrovirus HTLV-1

Les particules virales matures se fixent à la surface de la membrane plasmique cellulaire par l'intermédiaire des récepteurs du virus (HSPG, NRP-1, GLUT-1) ce qui entraîne la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique cellulaire. La capsid contenant le génome viral est ainsi libérée dans le cytoplasme, suivi par la décapsidation et la transcription inverse du génome viral en ADN double brin qui est intégré dans le génome cellulaire grâce aux LTR et à l'activité de l'intégrase virale. L'expression du génome viral permet la synthèse des ARNm viraux, qui sont ensuite traduits en protéines structurales et non structurales. L'ARN génomique viral ainsi que les protéines virales sont acheminés à la membrane cellulaire afin de former de nouvelles particules virales par bourgeonnement à la membrane plasmique. Adapté de Lairmore et al, 2014

2.2.2. Phase tardive de l'infection

Cette phase va de la synthèse des transcrits viraux jusqu'au bourgeonnement des néoparticules virales.

Sous forme de provirus, le génome viral se comporte comme une entité cellulaire et est transcrit par l'ARN polymérase II (voir partie sur la transcription virale). Son expression résulte en la production des transcrits viraux précédemment décrits à l'origine de la synthèse d'un nouvel exemplaire d'ARN génomique viral ainsi que des ARN messagers viraux permettant la synthèse des protéines virales. Or, dans les cellules eucaryotes, l'export des ARNm vers le cytoplasme est associé à leur épissage. Dans le cas du HTLV-1, l'export des ARN viraux est régulé par la protéine virale Rex synthétisée à partir d'un ARN doublement épissé transcrit en premier. La protéine Rex, capable de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme, prend en charge l'export des ARNm viraux non épissés ou mono-épissés (Hidaka et al, 1988). Grâce à sa séquence d'import nucléaire NLS (*Nuclear Localisation Signal*), Rex possède une localisation nucléaire lui permettant d'interagir avec les ARNm viraux *via* leur séquence RxRE (*Rex Responsive Element*) localisée au niveau de leur extrémité 3'. Le complexe ainsi formé confère une meilleure stabilité aux ARNm viraux non et mono-épissés (Gröne et al, 1996). Rex, sous forme d'oligomères associés aux ARNm viraux, interagit avec l'exportine 1 (ou CRM1, *Chromosome Region Maintenance interacting protein 1*) grâce à son signal d'export nucléaire NES (*Nuclear Export Signal*), ce qui permet la translocation des ARNm viraux non et mono-épissés au niveau du cytoplasme (Hakata et al, 1998).

Les différents ARNm viraux transcrits sont ensuite traduits par la machinerie cellulaire permettant la synthèse des précurseurs polypeptidiques précédemment décrits. Le précurseur Env est produit au sein du réticulum endoplasmique, puis clivé au niveau de l'appareil de Golgi, libérant ainsi les sous-unités de la protéine d'enveloppe SU et TM. Elles sont alors exportées au niveau de la membrane plasmique où elles s'assemblent sous forme de trimères (Pique et al, 1992). Les précurseurs Gag, Gag/Pol et Gag/Pro/Pol, associés à l'ARN génomique viral, sont quant à eux, transportés au niveau de la face interne de la membrane plasmique au sein de laquelle sont ancrées les protéines d'enveloppe SU et TM. Le recrutement d'une machinerie cellulaire de bourgeonnement par le précurseur Gag permet ensuite la libération de particules virales immatures (Blot et al, 2004 ; Heidecker et al, 2004). Suite à la libération des virions hors de la cellule hôte, la maturation des particules virales se déclenche sous l'action de la protéase virale qui clive les différents précurseurs polyprotéiques Gag/Pro/Pol, entraînant la réorganisation des protéines virales et la formation des particules virales matures.

2.3.Évolution de l'infection *in vivo*

Les individus infectés par HTLV-1 présentent peu de particules virales libres dans le (Revue dans Pique et Jones, 2012). Cela est à corrélérer avec la faible infectiosité des particules libres *in vitro*, mettant en évidence que le HTLV-1 se propage par d'autres mécanismes : la transmission de cellule à cellule, ainsi que l'expansion clonale.

2.3.1. Transmission cellule-cellule des particules virales HTLV-1

La transmission cellule-cellule du virus HTLV-1 a lieu lorsqu'un lymphocyte T infecté par HTLV-1 entre en contact avec un autre lymphocyte T sain. Au niveau de la zone de contact, une synapse virologique se forme, associée à un réarrangement du cytosquelette des deux lymphocytes T et à une accumulation des protéines de capsid, d'enveloppe et d'ARN viral au niveau de la zone de contact (Igakura et al, 2003). Ce mécanisme permet de fortement concentrer les particules virales libérées par le lymphocyte T infecté dans l'espace intersynaptique, donc d'augmenter la probabilité de rencontre entre les particules virales et les récepteurs spécifiques à son entrée sur la membrane du lymphocyte T cible (Revue dans Pique et Jones, 2012).

L'existence de conduits cellulaires entre un lymphocytes T infecté par HTLV-1 et un second sain permet également l'échange de particules virales et l'infection du lymphocyte T sain (Prooyen et al, 2010).

En outre, la transmission du virus a été associée à la formation de biofilms viraux à la surface des cellules. Composés de différentes protéines dont la tétherine et de sucres complexes, ce biofilm retient les particules virales au niveau de la membrane plasmique et permet leur transfert vers la cellule saine dans le cas d'un contact cellule-cellule (Pais-Correia et al, 2010).

Ces mécanismes de transmission inter-cellulaires mettent en évidence la possibilité pour le HTLV-1 d'infecter de nouvelles cellules de façon très efficace en minimisant la détection des particules virales par le système immunitaire (Rizkallah et al, 2015).

2.3.2. Propagation par expansion clonale

Lors de la phase précoce de l'infection, le virus infecte les cellules voisines *via* les mécanismes d'infection précédemment décrits, dépendants de la formation et de la transmission de nouvelles

particules, ce qui est à l'origine de la formation du réservoir viral. Puis, durant la période dite de phase chronique, le virus va être répliqué sous forme de provirus : son génome est dupliqué en même temps que l'ADN cellulaire lors de la phase S, et transmis aux deux cellules filles, lors de la mitose. Ce mécanisme, dénommé expansion clonale, permet de générer des populations de lymphocytes T infectés portant le même site d'intégration, appelées clones (Wattel et al, 1995).

L'expansion clonale est rendue possible par la capacité de la protéine Tax à induire l'immortalisation du lymphocytes T infecté. Le système immunitaire met ensuite en place une réponse humorale composée des immunoglobulines IgM puis IgG et IgA, dirigée majoritairement contre les protéines virales Env, Gag, et Tax (Kira et al, 1992). Une réponse immunitaire cytotoxique est également déployée impliquant des lymphocytes T CD8+ reconnaissant majoritairement la protéine Tax, fortement immunogène (Goon et al, 2004). Ces mécanismes créent une balance entre la prolifération et la suppression des cellules infectées par HTLV-1. Cette réponse immunitaire ne permet pas l'éradication des lymphocytes T infectés par HTLV-1 mais, au contraire, exerce une pression de sélection sur les clones entraînant la survie des clones les moins immunogènes (faible expression de Tax) mais conservant une capacité pro-proliférative. Lors de cette phase, un clone pré-leucémique majoritaire peut émerger, pouvant être à l'origine du développement de l'ATL (Bangham et al, 2014). De plus, l'abondance des clones est associée à la pathologie développée : alors que les individus asymptomatiques ou atteints de TSP présentent généralement une répartition homogène de l'abondance des clones infectés, dans la majorité des cas d'ATL, un clone leucémique dominant est détecté, associé la présence d'autres clones minoritaires d'abondance variable, formant une répartition oligoclonale des lymphocytes T infectés (Watanabe et al, 2017).

3. L'oncogenèse associée au HTLV-1 : les oncoprotéines Tax et HBZ

Les protéines virales Tax et HBZ sont considérées comme les deux oncoprotéines du HTLV-1, responsable de l'apparition de la Leucémie T de l'Adulte.

3.1.L'oncoprotéine Tax

En plus de son rôle dans l'expression des gènes viraux (voir chapitre 4.2.3), Tax est impliquée dans la modulation de nombreuses voies de signalisation cellulaires et de l'expression de gènes cellulaires. Cette adaptabilité est permise grâce à la présence de différents domaines et modifications post-traductionnelles, impliqués dans l'interaction entre Tax et différents partenaires cellulaires.

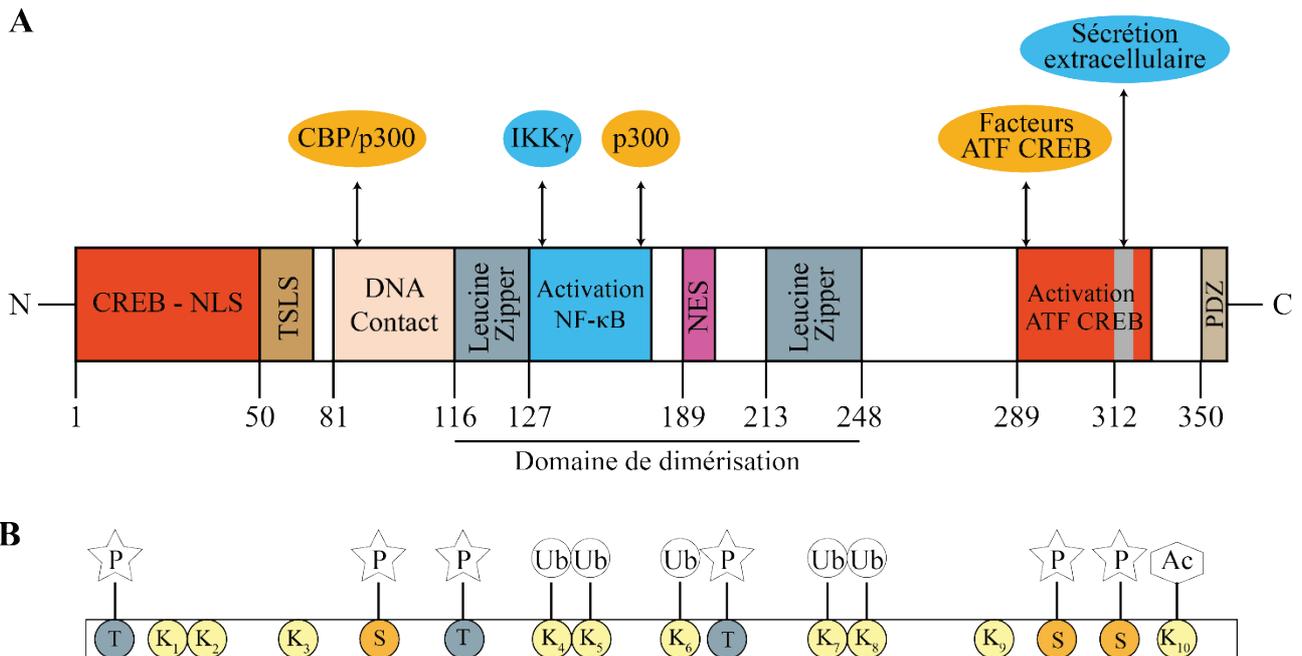


Figure 4 : Schéma de la structure de la protéine virale Tax

A : Schéma des domaines fonctionnels de la protéine Tax. La protéine Tax possède des signaux d'import et d'export nucléaire lui conférant une localisation nucléaire ou cytoplasmique. Un peptide responsable de sa sécrétion extracellulaire est présent à l'extrémité C-terminale de la protéine. Les domaines « leucine zipper » permettent la dimérisation de la protéine, nécessaire à son fonctionnement. Le domaine Tax Speckles structures Localisation Signal (TSLS) permet l'adressage de Tax au sein de corps nucléaires. Les différents domaines fonctionnels lui permettent d'interagir avec de nombreux partenaires cellulaires et lui offrent la possibilité d'interférer avec de nombreuses voies cellulaires.

B : Schéma présentant les modifications post-traductionnelles connues de la protéine Tax. Tax possède plusieurs résidus qui peuvent subir des phosphorylations, acétylations, ubiquitinylations et sumoylations. Ces modifications sont impliquées dans la régulation de la localisation subcellulaire de Tax, ainsi que dans sa capacité à interagir avec les partenaires cellulaires.

Adaptée de Shirinian et al. 2013

Localisation de la protéine Tax

Tax est une protéine de 40 kDa possédant 353 acides-aminés. Sa partie centrale présente deux domaines « leucine zipper » qui permettent son homodimérisation. De plus, Tax possède un signal de localisation nucléaire (NLS) dans sa partie amino-terminale (Revue dans Smith et Green, 1992) et un signal d'export nucléaire (NES) (Alefantis et al, 2003). Ces séquences

mettent en évidence un mécanisme de navette nucléo-cytoplasmique de la protéine Tax, permettant d'adapter la localisation de la protéine en fonction de la fonction souhaitée en réponse à différents stimuli ou modifications post-traductionnelles (Burton et al, 2000) (Figure 4).

Lorsque Tax possède une localisation nucléaire, elle forme des amas nommés corps nucléaires (Semmes et al, 1996), au sein desquels sont présents des éléments impliqués dans la machinerie de transcription, d'épissage, ainsi que différents ARNs et protéines p50 et RelA de la voie NF- κ B (Bex et al, 1997). La localisation de Tax au sein de ces complexes a été expliquée par la présence d'un signal de localisation permettant l'adressage de Tax au sein des corps nucléaires, appelés Tax Speckles structures Localisation Signal (TSLs).

Dans le cytoplasme, Tax est principalement associée au réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Marziali et al, 2017). Tax possède aussi la capacité d'être sécrétée dans le milieu extracellulaire (Alefantis et al, 2005).

Modifications post-traductionnelles

La protéine Tax est sujette à de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que des phosphorylations, acétylations, ubiquitinations, et Sumoylations, qui, seules ou en combinaison, sont impliquées dans la régulation de son activité et la modulation des voies cellulaires. Le détail de ces modifications et des résidus impliqués sont présentés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Modifications post-traductionnelles de la protéine virale Tax

Modifications Post-Traductionnelles	Sites accepteurs	Impliqué dans	Références
Phosphorylation	3 Sérines (positions 300, 301, et 336) 3 Thréonines (positions 48, 184 et 215)	Ser-300 et Ser-301 forment le site majeur de phosphorylation Au moins un résidu phosphorylé nécessaire à la localisation de Tax dans les corps nucléaires Interaction avec l'acétylase p300 Modulation de la voie NF κ B Stabilité de la protéine	Shirinian et al, 2013
Acétylation	Lysine 346	Activation de la voie NF κ B	Lodewick et al, 2009
Ubiquitination	Lysine 189, 197, 263, 280, 284	Localisation subcellulaire Modulation de la voie NF κ B	Nasr et al, 2006
SUMOylation	Lysine 280 et 284	Localisation subcellulaire	Pène et al, 2014

Immortalisation des lymphocytes T par Tax

La capacité oncogénique du HTLV-1 a tout d'abord été attribuée à la région pX. La transduction d'un vecteur codant pour la région pX du génome du HTLV-1 dans des lymphocytes T humains activés a permis leur immortalisation (Grassmann et al, 1989). Des études, utilisant un modèle *in vivo* de souris transgéniques exprimant uniquement Tax ont permis ensuite d'observer le développement de tumeur et de symptômes comparables à ceux observés chez des patients atteints de l'ATL, symptômes associés à une activation constitutive la voie NFκB (Hasegawa et al, 2006). Plus récemment, l'équipe du Dr Nicot est parvenue à immortaliser des PBMC humains par l'insertion d'un vecteur permettant uniquement l'expression de la protéine Tax, bien que ce soit un évènement rare (Bellon et al, 2010). Il semble donc que l'expression seule de Tax permette l'immortalisation des lymphocytes T primaires mais n'est pas suffisante pour induire leur transformation.

Les mécanismes complexes impliqués dans la capacité d'immortalisation de Tax restent à compléter. La principale voie de prolifération modulée par Tax est la voie NF-κB. L'importance de l'activation de cette voie dans le processus d'immortalisation a été démontré par l'utilisation d'un mutant de Tax, Tax M22 déficient pour l'activation de la voie NF-κB, qui n'est plus capable d'immortaliser les lymphocytes T dans un modèle d'infection *in vitro* (Revue dans Robek et Ratner, 1999).

Tax induit également l'activation constitutive des voies MAP (Mitogen Associated Protein) kinase, PI3kinase, AP-1 et Wnt, ainsi que la transcription dépendante des SRF (*Serum Responsive Element*) (données résumés dans le Tableau 3).

Indépendamment de l'activation de la voie NF-κB, Tax inhibe l'activité de la protéine p53, régissant l'entrée en apoptose (Mahieux et al, 2000 ; Mulloy et al, 1998).

Tableau 3 : Voies de signalisation cellulaires activées par la protéine virale Tax

Voies de signalisation	Cibles de Tax	Conséquences	Références
NF-κB	<p><u>Voie canonique :</u> Favorise la translocation nucléaire de RelA/p50 par l'activation de IKK et la dégradation protéasomale des protéines IκB via son interaction avec p62</p> <p><u>Voie non-canonique :</u> Favorise le clivage de p100 en 52, ainsi que la translocation nucléaire de p52/RelB</p>	Activation de la transcription de gènes impliqués dans l'inhibition de la mort cellulaire et favorisant la prolifération des lymphocytes T	Schwob et al, 2019 ; Revue dans Harhaj et Giam, 2018
MAPkinase	<p>Activation de TAK1 par Tax permet l'activation de la voie JNK</p> <p>Interaction Tax-RasGTP permet l'activation de la voie Raf/MEK/Erk</p>	Inhibition de l'apoptose et induction de la prolifération cellulaire	Saggioro et al, 2011 ; Suzuki et al, 2007
SRF (Serum Responsive Factor)	Augmentation de la liaison de SRF à l'ADN	Activation des gènes cellulaires c-fos, c-Jun, JunD, Fra1...	Winter et Marriott et al, 2007
PI3kinase	<p>Activation de PI3 kinase par son interaction avec sa sous-unité p85</p> <p>Inhibition de la phosphatase PTEN entraînant une activation constitutive de Akt</p>	Inhibition de l'apoptose, activation de hTERT	Peloponese et al, 2006
AP-1	Modulation de l'activité des facteurs AP-1 et de leur liaison à l'ADN	Augmentation de la transcription des gènes cibles de AP-1	Gazon et al, 2017
Wnt	Interaction entre Tax et DAPLE permettant d'activer la voie canonique Wnt	Forte prolifération cellulaire	Ma et al, 2013

Ces effets permettent une forte prolifération et un haut taux de survie des lymphocytes T infectés ainsi qu'une inhibition de l'entrée en apoptose (Taylor et Nicot, 2008). Or, l'hyperactivation de la voie NF-κB par Tax entraîne l'induction de la sénescence des cellules (Ho et al, 2012), mettant en évidence que l'expression de Tax seule ne permet pas la survie à moyen et long terme des lymphocytes T immortalisés infectés par HTLV-1 (Bellon et al, 2010).

Cycle cellulaire et instabilité génétique

Les lymphocytes infectés par HTLV-1 ont rapidement été démontré comme étant sujet à de profonds changements génétiques (Maruyama et al, 1992). L'augmentation de l'instabilité

génétique est principalement associée à l'expression de la protéine Tax. En effet, Tax module la progression du cycle cellulaire, ainsi que les voies de réparations de l'ADN, en faveur d'une prolifération accrue associée à une forte accumulation de modifications génétiques (Mohanty et al, 2000).

La modulation du cycle cellulaire par Tax s'illustre par sa capacité à cibler de nombreux acteurs impliqués dans son établissement. D'une part, Tax accélère la progression du cycle cellulaire en favorisant la formation de plusieurs complexes activateurs Cycline/CDK. Tax inhibe ainsi Chk1/Chk2 entraînant la formation du complexe Cycline B/CDK1, ce qui permet l'entrée en phase G1 du cycle. Puis, Tax stabilise le complexe Cycline D/CDK4 et favorise la formation du complexe Cycline E/CDK2 par la dégradation de la protéine Rb, libérant ainsi le facteur e2F ce qui permet une accélération de la progression en phase G1 du cycle. Ensuite, Tax augmente l'expression de l'inhibiteur p21 ciblant la formation des complexes Cycline D/CDK4 et Cycline E/CDK2, induisant la transition G1/S. Tax est également capable d'inhiber l'expression de la cycline A permettant de réaliser plusieurs réplifications successives durant la phase S, favorisant ainsi l'aneuploïdie des cellules infectées par HTLV-1. De plus, Tax inhibe les points de contrôle des transitions entre les différentes phases du cycle afin d'en accélérer son déroulement (Revue dans Marriott et Semmes, 2005).

L'instabilité génétique des lymphocytes T infectés s'explique également par la capacité de Tax à perturber les voies de maintenance de l'ADN. Tax inhibe les voies de réparation par excision de base, de nucléotide, ainsi que la réparation par recombinaison homologue et de reconnaissance des jonctions d'extrémité non homologue. Ces mécanismes sont présentés dans le Tableau 4. En plus d'inhiber la réparation de l'ADN, Tax augmente les dommages qui lui sont causés par l'augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Cela a pour conséquence une augmentation du stress oxydant (Takahashi et al, 2013).

Ces perturbations du cycle cellulaire et de la machinerie de réparation de l'ADN sur une longue période d'infection favorisent l'accumulation de mutations au sein du génome cellulaire des clones infectés. Ces modifications peuvent cibler différentes voies de prolifération des lymphocytes T, entraînant leur activation constitutive, ce qui permet à certains clones infectés de fortement proliférer.

Tableau 4 : Voies de maintenance de l'ADN perturbées par la protéine virale Tax

Voies de maintenance de l'ADN	Action de Tax	Conséquences	Références
Base Excision Repair (BER)	Inhibition de l'expression de l'ADN polymérase β	Défaut de la réparation des mésappariements	Jeang et al, 1990
Nucleotide Excision Repair (NER)	Augmentation de l'expression de PCNA permettant le fonctionnement de l'ADN polymérase δ malgré la présence de lésion de l'ADN	Augmentation de l'incorporation de nucléotides erronés	Kao et Marriott, 1999
Recombinaison homologue	Séquestration des facteurs de la voie au niveau de foci non associés à des cassures double brin de l'ADN	Diminution de la réparation des cassures double brin par recombinaison homologue	Baydoun et al, 2012
Non Homologous End Joining (NHEJ)	Répression de l'expression de Ku80	Diminution de la reconnaissance de cassure d'ADN double brin	Ducu et al, 2011

3.2.L'oncoprotéine HBZ

L'oncoprotéine HBZ (HTLV-1 bZIP) a été caractérisée par sa capacité à interagir avec le facteur de transcription CREB2, expliqué par le fait qu'elle contient également un domaine de type bZIP (Gaudray et al, 2002).

Le produit protéique issu du transcrit non épissé, appelé usHBZ, est supposé être peu stable et négligeable par rapport au produit protéique issu du transcrit épissé, sHBZ, et son existence sous forme de protéine divise encore la communauté. La majorité des études sur les propriétés et activités de HBZ concerne le produit de l'ARNm épissé sHBZ (Yoshida et al, 2008). Les fonctions ainsi développées dans cette partie correspondent donc à sHBZ.

Généralités

HBZ a la capacité d'être homologue aux facteurs bZIP grâce la présence d'un domaine leucine Zipper, composé de résidus hydrophobe formant une hélice α . Cette structure secondaire permet la dimérisation de HBZ avec les facteurs bZIP cellulaires. Le domaine bZIP de HBZ est riche en résidus Arginine lui conférant une forte activité basique, ce qui permet une meilleure

liaison à l'ADN. La présence, à son extrémité amino-terminale, d'un domaine d'activation de la transcription complète ses fonctions (Ma et al, 2016) (Figure 5).

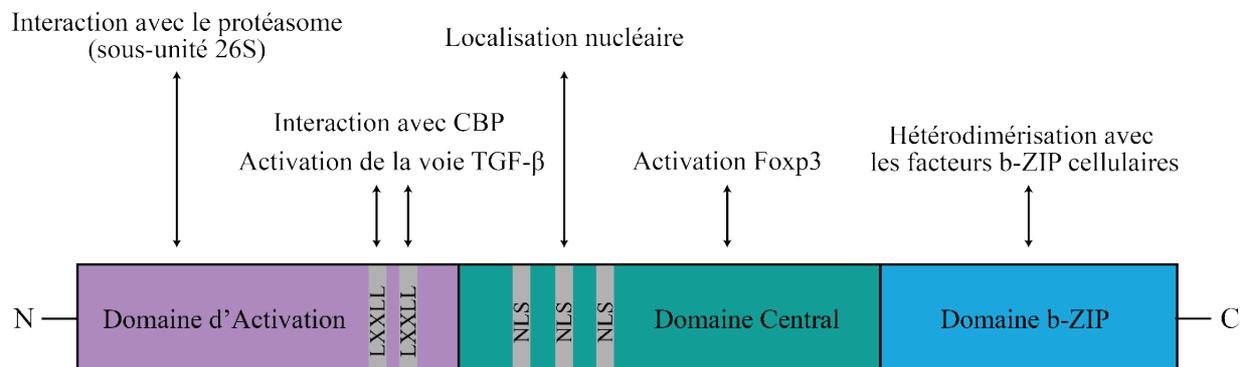


Figure 5 : Schéma de la structure de la protéine virale HBZ

Représentation schématique des domaines de la protéines HBZ. La protéine HBZ se compose de trois domaines fonctionnels distincts. A l'extrémité N-terminale se situe le domaine d'activation qui intervient dans l'interaction avec la sous-unité 26S du protéasome et avec le domaine KIX de CPB *via* deux motifs LXXLL. Ce domaine est également nécessaire pour l'activation de la voie TGF- β . Le domaine central est composé de trois signaux de localisation nucléaire (NLS) et participe à l'activation de Foxp3. A l'extrémité C-terminale est localisé le domaine b-Zip permettant l'hétérodimérisation de HBZ avec les facteurs b-Zip cellulaires régulant ainsi leurs activités.

Adaptée de Ma et al, 2016

HBZ possède trois signaux de localisation nucléaire (NLS) au niveau de son domaine central (Hivin et al, 2005). Les études d'imagerie, permises grâce au développement d'anticorps dirigés contre HBZ, ont mis en évidence son accumulation au niveau du noyau, potentiellement au sein de structures granulaires (Shiohama et al, 2016). De plus, la distribution cellulaire de HBZ semble varier en fonction de la pathologie développée : HBZ possède une localisation nucléaire dans les cellules de patients ayant développés une ATL, alors que sa localisation est cytoplasmique dans les cellules de patients ayant développés une TSP (Baratella et al, 2017). Cela met en évidence un rôle de la localisation de HBZ dans le développement des pathologies, potentiellement en régulant son activité au sein de la cellule.

Activation de la prolifération lymphocytaire

L'expression de HBZ est nécessaire à la survie des lymphocytes T infectés par HTLV-1. Cette implication a été démontrée *in vitro* par l'utilisation de shARN (short-hairpin RNA) ciblant l'ARNm de HBZ, traitement qui se traduit par une forte diminution de la viabilité et de la prolifération des lymphocytes T infectés (Arnold et al, 2008). De façon surprenante, l'activité pro-proliférative de HBZ semble être portée par l'ARNm sHBZ, plutôt que par la protéine. L'ARNm de sHBZ possède une structure appelée tige-boucle (stem-loop) qui serait à l'origine de sa capacité d'interagir avec le facteur E2F1, permettant la modulation de l'expression de ses

gènes cibles et la progression de la phase de transition G1/S lors de l'établissement du cycle cellulaire (Satou et al, 2006).

Augmentation de l'instabilité génomique

HBZ possède également la capacité de cibler des microARN (miR) cellulaires impliqués dans la prolifération et la survie des lymphocytes T CD4+. *Via* une action post-transcriptionnelle, HBZ augmente l'expression des miR17 et 21, impliqués dans la maintenance du génome, favorisant ainsi l'apparition d'anomalies génétiques (Vernin et al, 2014).

En outre, HBZ cible directement certaines voies de réparation de l'ADN. HBZ interagit, par l'intermédiaire de son domaine bZIP, avec Ku70 et Ku80, protéines impliquées dans la voie du NHEJ, entraînant une diminution de l'efficacité de réparation des cassures double brin (Rushing et al, 2018). HBZ, au même titre que Tax, participerait donc à l'augmentation de l'instabilité génomique des lymphocytes T infectés.

Modulation de l'apoptose

Initialement, HBZ a été montré comme capable d'augmenter l'expression de la télomérase, complexe ribonucléoprotéique qui prolonge les télomères, protégeant ainsi l'extrémité des chromosomes. Cette enzyme est normalement inactive dans la majorité des cellules humaines différenciées. Le raccourcissement des télomères est un facteur entraînant la mort cellulaire programmée, et l'activation de la télomérase est souvent associée au développement de cancer car favorisant l'immortalisation des cellules (Revue dans Hahn et Meyerson, 2001). HBZ active l'expression du facteur de transcription JunD, et induit la formation d'un dimère HBZ/JunD. Le gène codant pour la sous-unité catalytique de la télomérase fait partie des cibles de JunD, l'activation de l'expression de la télomérase ayant lieu par le recrutement du complexe HBZ/JunD/Sp1 au niveau des sites de fixation de Sp1 du promoteur du gène (Kuhlmann et al, 2007). Cela permet un échappement à la mort cellulaire programmée, et implique HBZ dans le processus d'immortalisation associée à l'infection par HTLV-1.

HBZ module également le processus d'apoptose. HBZ a été démontré comme étant capable d'interagir avec le facteur de transcription FoxO3a, résultant en une diminution de son recrutement au niveau de l'ADN. Cela se traduit par une diminution de la transcription des gènes Bim, FasL, et TRAIL, inhibant ainsi leur activité pro-apoptotique (Tanaka-Nakanishi et al, 2014).

HBZ est également impliqué dans l'inhibition de l'apoptose dépendante de p53 induite par le facteur ATF3. ATF3 possède un rôle de modulateur de l'apoptose en fonction de son niveau

d'activation : ATF3 est considéré comme un suppresseur de tumeur par sa capacité d'induire l'apoptose et, à la fois, comme un oncogène par sa capacité pro-proliférative. HBZ inhibe la capacité de ATF3 à induire l'entrée en apoptose, tout en conservant son activité pro-proliférative (Hagiya et al, 2011).

De plus, l'activité pro-apoptotique de p53 est régulée par son acétylation par CBP/p300, et HBZ, *via* son interaction avec CBP/p300, inhibe la capacité de p53 à induire l'entrée en apoptose, mimant l'action de Tax (Wright et al, 2016).

Cependant, la modulation de l'apoptose par HBZ peut également favoriser l'entrée des cellules dans le processus de mort programmée. Ces rôles opposés peuvent s'expliquer par des activités propres à la forme ARN ou protéique de HBZ. Même s'ils possèdent un rôle commun d'activateur de la prolifération lymphocytaire, le rôle inhibiteur de l'apoptose est conféré préférentiellement à l'ARN. L'induction de la prolifération des lymphocytes T par la protéine est associée à une réduction de l'apoptose, apoptose inhibée par l'activité de l'ARN de HBZ. Cela met en évidence un équilibre entre le rôle protecteur de l'ARN de HBZ vis-à-vis du rôle pro-prolifératif de la protéine (Mitobe et al, 2015).

Rôle immunomodulateur de HBZ

Un autre rôle majeur de la protéine HBZ est la modulation de la réponse immunitaire. L'expression de HBZ dans des lymphocytes T CD4⁺ est associée à un changement de phénotype vers des lymphocytes T de type régulateurs (T Reg). Cette modification est causée par la modulation de la voie du TGF- β par HBZ, entraînant l'induction de l'expression du facteur FoxP3 (Satou et al, 2011).

Il a également été mis en évidence que HBZ induit l'expression de la protéine TIGIT (*T cell immunoglobulin and ITI domain*) à la surface des lymphocytes T infectés par HTLV-1. TIGIT est une immunoglobuline co-inhibitrice et sa présence à la surface cellulaire est associée à l'expression de la cytokine IL-10, ayant une activité anti-inflammatoire (Yasuma et al, 2016). Ce rôle immunomodulateur est également illustré par la capacité de HBZ à diminuer l'expression des cytokines de type Th1 comme l'IL-2, l'IFN γ , ou le TNF- α , effet transcriptionnel dépendant de la signalisation NFAT et AP-1 contrôlées par HBZ (Sugata et al, 2012).

Interférence entre HBZ et Tax

Même si HBZ possède certains rôles homologues à ceux de Tax, HBZ antagonise nombres de ces actions.

Au niveau cellulaire, HBZ s'oppose à l'hyperactivation de la voie canonique NF- κ B exercée par Tax, ce qui permet de limiter l'entrée en sénescence des lymphocytes T infectés (Zhi et al, 2011). Pour ce faire, HBZ module l'activité de la protéine RelA/p65. HBZ a la capacité d'interagir avec p65, empêchant son recrutement sur l'ADN. De plus, par l'induction de son ubiquitinylation par la protéine PDLIM (*PDZ and LIM domain proteins*), HBZ induit la dégradation de p65 (Fochi et al, 2018). Ces actions ont pour conséquence une diminution de l'activation de l'expression des gènes cibles de la voie NF- κ B canonique.

La voie Wnt activée par Tax est également ciblée par HBZ. L'interaction entre HBZ et LEF1 (*lymphoid enhancer-binding factor 1*), coactivateur des gènes cibles de la voie Wnt, diminue son recrutement au niveau de ses gènes cibles, résultant en une diminution de leur expression (Ma et al, 2013).

D'autre part, HBZ active la voie du TGF- β , initialement réprimée par Tax, par l'augmentation de l'expression des facteurs SMAD2/3/4. Cette activation permet une diminution de l'activation des lymphocytes T CD4+, et participe à la persistance de l'infection (Zhao et al, 2011).

Un autre aspect est la capacité de HBZ à agir directement sur l'activité des facteurs de transcription c-Jun et JunB, activés par Tax. Grâce à son domaine bZIP, HBZ interagit avec les facteurs CREB et AP-1, entraînant leur séquestration dans des corps nucléaires, empêchant ainsi leur recrutement au niveau du promoteur des gènes codant pour c-Jun et JunB, donc leur expression. De plus, la protéine HBZ issue de la forme non épissée (usHBZ) pourrait faciliter la dégradation de c-Jun par son ancrage au niveau de la sous-unité 26S du protéasome (Terol et al, 2017). A l'inverse, il a récemment été montré que la protéine HBZ issue de l'ARNm épissé sHBZ stabilise le facteur c-Jun (Polakowski et al, 2020), interrogeant sur des possibles rôles opposés dans la modulation de la transcription entre les 2 formes d'HBZ.

Au niveau du virus, un des premiers rôles démontrés de HBZ est l'inhibition de la transactivation du LTR 5' viral par Tax, *via* une compétition avec les facteurs de transcription CREB. Ce point sera détaillé dans la suite de cette introduction.

Modifications post-traductionnelles de la protéine HBZ

HBZ ayant été caractérisée plus tardivement que les autres protéines virales, l'étude de ses modifications post-traductionnelles est encore superficielle. Peu d'entre elles ont pu être associées à la régulation de ses fonctions (Dissinger et al, 2014). Récemment, HBZ a été démontré comme capable d'interagir avec l'ubiquitine ligase UBR5 et son ubiquitylation semble directement lié à la régulation de sa propre stabilité (Panfil et al, 2018).

On voit donc que HBZ contrôle la prolifération lymphocytaire, la mort cellulaire, l'instabilité génomique, et module l'environnement immunitaire des lymphocytes infectées. Associées à son action sur la télomérase, ces fonctions lui confèrent la capacité d'immortaliser les lymphocytes infectés par HTLV-1 (Revue dans Bellon et Nicot, 2015).

3.3. Bilan des fonctions respectives de Tax et HBZ

Les oncoprotéines Tax et HBZ ont donc à la fois des rôles communs et opposés. Toutes deux activent la prolifération lymphocytaire, inhibe la mort cellulaire programmée, et augmente l'instabilité génomique. Or, l'expression de Tax seule n'est pas suffisante pour permettre l'immortalisation des lymphocytes infectés : la forte activation de la prolifération cellulaire associée à l'inhibition de l'apoptose entraîne la sénescence des cellules infectées. C'est dans ce contexte qu'intervient HBZ, qui permet de compenser cet effet de Tax et donc d'augmenter l'apparition de lymphocytes T infectés immortalisés.

La co-expression prolongée des oncoprotéines Tax et HBZ dans les lymphocytes T infectés par HTLV-1 est associée à une forte prolifération, une inhibition de l'apoptose et à l'apparition de nombreuses anomalies génétiques et épigénétiques. Les différents clones infectés accumulent de nombreuses modifications génétiques et épigénétiques pouvant entraîner l'activation constitutive des voies de prolifération lymphocytaires. En résulte l'apparition de clones infectés immortalisés majoritaires qui peuvent être à l'origine, après une longue période d'infection, de la génération du clone transformé, associé au développement de l'ATL (Watanabe et al, 2017). Cependant, de façon surprenante, dans la majorité des cas d'ATL, les clones transformés présentent une perte d'expression de la transcription sens, se traduisant par une perte de la protéine Tax, alors que la protéine HBZ est toujours détectable (Revue dans Matsuoka et Jeang, 2007 ; Kataoka et al, 2015). Cela met en évidence l'importance d'étudier précisément la

régulation de la transcription virale afin de comprendre les mécanismes impliqués dans la transition entre l'immortalisation et la transformation des lymphocytes T.

4. Détournement de la machinerie de transcription cellulaire par le HTLV-1

Pour permettre sa transcription, le HTLV-1 exploite la machinerie de transcription des gènes cellulaires de classe II impliquant l'ARN polymérase II et ses co-facteurs spécifiques. Avant de présenter les mécanismes régissant la transcription virale, il est nécessaire de présenter le déroulement de la transcription cellulaire (Partie résumée par la Figure 6).

4.1. Transcription cellulaire des gènes de classe II

4.1.1. En amont de l'initiation : levée de la répression transcriptionnelle

Dans son état réprimé, un promoteur est dans un état dit compacté. Cela est dû à la conformation de l'ADN sous forme de chromatine, c'est à dire associé à des protéines histones. Les histones sont des protéines basiques riches en acides aminés lysine et arginine dont les charges positives à pH physiologique vont interagir avec les charges négatives des phosphates de l'ADN assurant une association forte pour former les nucléosomes. Les histones ont une extrémité N-terminale dépassant du nucléosome et donc accessible à des enzymes de modification. C'est au niveau de cette extrémité que vont se faire les modifications post-traductionnelles comme des acétylations, phosphorylations, méthylations, ubiquitylations ou sumoylations. Ces changements perturbent l'interaction entre l'ADN et les histones et jouent sur le recrutement d'enzymes de remodelage de la chromatine, élément de régulation clé de l'expression des gènes (Revue dans Bannister et Kouzarides, 2011).

Il est nécessaire de moduler la localisation et la conformation de ces nucléosomes afin de rendre les séquences promotrices accessibles aux facteurs de transcription. Dans ce contexte, l'éviction des nucléosomes est régie principalement par la poly(ADP-ribose) polymérase 1 (PARP-1), impliquée dans la régulation de l'expression de nombreux gènes cellulaires nécessaires à la réparation de l'ADN, l'homéostasie et l'apoptose (Hou et al, 2019). Ce mécanisme implique

également le complexe NAP-1 (*Nucleosome Assembly Protein 1*) (Revue dans Sharma et Nyborg et al, 2008). Le remodelage des histones est lui assuré par le complexe SWI/SNF (*Switching defective/sucrose non fermenting*), composé principalement de 2 sous-complexes : BAF (*BRG-1 or BRM Associated Factor*) et PBAF (*Polybromo-associated BAF*). Ils portent tous deux une activité ATPase grâce aux sous-unités BRG1 (*Brahma-Related Gene 1*) et/ou BRM (*Brahma*), nécessaires à la relocalisation des histones. Ces activités peuvent avoir des effets positifs ou négatifs en fonction des gènes ciblés (Revue dans Roberts et Orkin, 2004).

La queue N-terminale des histones est sujette en particulier à des acétylations. Cette modification est régie par les protéines possédant une activité Histones Acétyl Transférase (HAT). L'acétylation des histones est généralement associée à un état actif du promoteur. Les complexes CBP (CREB Binding Protein) /p300 et P/CAF (p300/CBP Associated Factor) portent une activité HAT. Ils sont nécessaires à la transcription des gènes cellulaires, mettant en évidence l'importance de l'acétylation des histones dans une transcription processive depuis le promoteur (Nagy et al, 2007).

La méthylation des histones aux niveaux des résidus lysine est une marque épigénétiques très représentée. En fonction de l'histone et du résidu lysine ciblé, la modification sera considérée comme activatrice ou répressive. Par exemple, la tri-méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 induit la compaction de la chromatine sous forme d'hétérochromatine, limitant ainsi l'accès aux complexes cellulaires de transcription et réprimant donc l'expression génique (Becker et al, 2016). Afin de permettre une initiation processive de la transcription, la chromatine doit être dans un état dit ouvert associé à la présence de marques activatrices, telle que la tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 et à une faible abondance de marques répressives.

L'ADN est sujet à des méthylations des cytosines en 5-méthylcytosine, réalisées par des méthylases. Ces marques épigénétiques sont directement déposées sur l'ADN au niveau de structure appelées îlots CpG et sont considérées comme responsables de la plus forte répression de la transcription des gènes. Ce niveau de méthylation peut être réduit par des déméthylases, principalement de la famille TET, afin d'induire la lever de cette répression transcriptionnelle épigénétique (Revue dans Wu et Zhang, 2017).

4.1.2. Étape de Pré-initiation

La décompaction de la chromatine a pour conséquence principale une augmentation de l'accessibilité des séquences promotrices aux facteurs spécifiques de la transcription de la classe des facteurs à domaine bZIP, impliquant principalement des facteurs des familles ATF (*Associated Transcription Factor*) / CREB (*cAMP Response Element-Binding protein*). L'exemple du facteur spécifique de transcription CREB va être ici développé.

La protéine CREB est impliquée dans la transcription des gènes présentant des éléments de réponse cellulaire à l'AMP (*adenosine monophosphate*) cyclique de séquence consensus TGACGTCA, généralement localisée en amont du site d'initiation de la transcription. La présence du domaine bZIP au sein de la protéine permet sa dimérisation, rendant alors possible son recrutement au niveau de la séquence consensus. La reconnaissance seule de cette séquence ne permet pas son association avec l'ADN : il est nécessaire que le domaine KID (*kinase-inducible domain*) de CREB soit phosphorylé au niveau de la Serine 133 afin de permettre une interaction directe avec le domaine KIX (*KID interacting domain*) de CBP/p300. Cette phosphorylation, médiée par la protéine kinase A (PKA), est associée à une activation de la voie AMPc (Johannessen et al, 2004). Ce mécanisme permet la formation d'un complexe très stable ADN – CREB – CBP/p300, considéré comme la forme primaire du complexe de pré-initiation (PIC).

Les étapes suivantes font intervenir des co-facteurs de l'ARN polymérase de type II, nommés facteurs généraux de transcription (GTF) (Sainsbury et al, 2015). Ceux-ci sont recrutés par le complexe ADN – CREB – CBP/p300 initialement formé, et vont constituer la forme active du complexe de pré-initiation. Sont d'abord recrutés le complexe « Transcription Factor (TF) IID » et sa sous-unité « TATA Binding Protein » (TBP), par la fixation de TBP au niveau de la boîte TATA (*TATA box*) localisée 30 pb en amont du site d'initiation de la transcription (TSS) et qui possède la séquence consensus suivante : TATAWAWR (Basehoar et al, 2004). CREB possède un domaine CAD (*CREB activation domain*) qui interagit directement avec la sous-unité hTAFII135/TAF4 (*TAF, TBP associated factors*) de TFIID (Quinn et al, 2002). Cette fonction, nécessaire au bon déroulement de l'étape de pré-initiation de la transcription, est régulée par les protéines TORCs (*Target Of Rapamycin Complex 1*), via un contact avec CREB au niveau de son domaine bZIP. La présence des TORCs au sein du complexe CREB – TFIID permet une forte augmentation de l'affinité de TFIID pour l'ADN au niveau du promoteur (Conkright et

al, 2003). TFIID est un complexe transcriptionnel composé de la sous-unité TBP et de 14 TAFs. En cas d'absence de séquence consensus TATA box, TBP peut se fixer sur des éléments comparables d'un point de vue structural et permettre l'initiation des promoteurs sans boîte TATA (Revue dans Rhee et Pugh, 2012). La présence de la boîte TATA est détectée dans environ 20% des promoteurs des gènes du génome humain, montrant la capacité de la machinerie de transcription à œuvrer en son absence (Yang et al, 2007). La fixation de TBP sur l'ADN permet d'ancrer TFIID au niveau du promoteur et de former ainsi un complexe stable entre le promoteur, CREB, CBP/p300 et TFIID, correspondant au complexe de pré-initiation actif.

Les protéines TAFs associées à TFIID sont impliquées dans le remodelage du promoteur et la régulation de la pré-initiation de la transcription (Baumann et al, 2010). Plus précisément, TAF1 porte une activité HAT (acétylation de l'histone H3 sur les lysines 9 et 14) alors que TAF7 est un inhibiteur de l'étape d'élongation de la transcription *via* l'inhibition de l'activité kinase de CDK7 et de CDK9 (CDK : Cyclin Dependent Kinase) (*voir partie sur l'élongation*). Cette activité inhibitrice est présente seulement lorsque TAF1 et TAF7 sont en contact, associées à TFIID dans une conformation non liée à l'ADN. Or, lorsque TFIID se lie avec l'ADN *via* TBP, un changement conformationnel du complexe a lieu résultant en un réarrangement de ses sous-unités. Cela permet la phosphorylation de TAF7 par TAF1, entraînant la libération de TAF7 du complexe TFIID, bloquant en retour son activité inhibitrice sur l'élongation de la transcription. Cette temporisation de l'assemblage de la machinerie de transcription permet le bon déroulement des étapes suivant la pré-initiation de la transcription. Ces données mettent en évidence une boucle d'autorégulation entre l'étape de pré-initiation et l'étape d'élongation, afin de permettre un assemblage efficace des nombreux facteurs impliqués dans la transcription (Revue dans Gegonne et al, 2017).

4.1.3. Étape de formation du PIC

Afin d'atteindre un niveau de transcription maximal, les complexes protéiques formés sur l'ADN doivent être le plus stable possible. Cela implique des facteurs de transcription non nécessaires à la transcription basale mais cruciaux pour des niveaux de transcription élevés, permettant de former un complexe de pré-initiation complet, extrêmement stable.

C'est le cas du complexe TFIIA, hétérodimère composé de 2 sous-unités alpha/beta (GTF2A1) et gamma (GTF2A2). Il se fixe en amont de la boîte TATA sans perturber le complexe TFIID - ADN, et stabilise l'interaction TFIID - ADN permettant une transcription optimale à haut niveau (Imbalzano et al, 1994). L'affinité du complexe TFIIA – TFIID - ADN dépend de la séquence de la boîte TATA, plus précisément, de la structure du promoteur (définition d'un promoteur faible / fort) (Stargell et al, 2001). Le polypeptide TFIIIB se fixe en amont et en aval de la boîte TATA au niveau de la séquence « B recognition Element » (BRE) grâce à son domaine B linker (Juven-Gershon et al, 2008). Il permet un ancrage optimal de la matrice ADN dans le site catalytique de l'ARN Polymérase II (Kostrewa et al, 2008).

Ces étapes mènent à la formation du complexe de pré-initiation complet, formant ainsi la bulle de transcription.

La stabilisation de la bulle de transcription est ensuite permise par l'implication d'autres facteurs de transcription généraux, généralement non nécessaires à la transcription basale de la majorité des gènes cellulaires (Rani et al, 2004).

TFIIF est un hétérodimère composé de TFII α (également appelé RAP74) et TFII β (également appelé RAP30). Il empêche l'interaction non spécifique entre TFIIIB et l'ADN (Conaway et al, 1991) et stabilise l'établissement du PIC (Tan et al, 1995).

Le complexe TFIIH (Revue dans Compe et Egly, 2012 ; et Coin et Egly, 2015) est composé de 10 sous-unités réparties en 3 modules. Il possède à la fois un rôle dans la réparation de l'ADN (réparation par excision de nucléotide) et est aussi impliqué dans la transcription impliquant l'ARN polymérase II. Le premier module comprend 6 partenaires : XPD (*Xeroderma Pigmentosum complementation group D*, activité hélicase ATP-dépendante 5' -> 3'), p62, p52, p34, p8 et p44. Ce module est principalement impliqué dans la réparation de l'ADN via l'ouverture du double brin d'ADN (Coin et al, 2007). Cette activité est dépendante de l'hélicase XPD. Ce module permet également la bonne structuration du complexe TFIIH. Le second module est composé de l'hélicase/translocase XPB (*Xeroderma Pigmentosum complementation group B*, activité hélicase/translocase ATP-dépendante 3' -> 5'). XPB est impliquée dans l'initiation de la transcription, plus précisément dans l'ouverture du promoteur permettant le recrutement de l'ARN polymérase II, ceci grâce à son activité ATPase (Revue dans Guzman et Lis, 1999). XPB est maintenant considérée comme une hélicase non conventionnelle car recrutée en aval du PIC. Son activité hélicase se résume en fait à une activité de type translocase par la mise en place d'une torsion de l'ADN (*molecular wrench*), créée par le maintien de l'ADN figé en raison de la forte interaction TFIID - ADN. Cette torsion

entraîne un changement conformationnel de l'ADN rapprochant ainsi la queue C-terminale (C-terminal domain, CTD) de l'ARN polymérase II du module kinase de TFIIH.

Le module kinase de TFIIH est composé des protéines Cycline H, Ménage-à-trois 1 (MAT-1), et CDK7. L'activité kinase est portée par CDK7 qui cible le CTD de l'ARN polymérase II. CDK7 phosphoryle la sérine 5 du CTD, entraînant le déplacement de l'ARN polymérase II vers le nucléosome +1 (déplacement de 30-50 nt) et induisant un état de pause (Coin et al, 2015). Comme expliqué précédemment, TAF7 inhibe l'activité kinase de CDK7 permettant une temporisation de l'assemblage de la machine transcriptionnelle.

Le complexe TFIIIE est également un hétérodimère composé des sous-unités TFIIIE α et TFIIIE β . TFIIIE stabilise le recrutement de TFIIH par sa double fixation à l'ARN polymérase II et à TFIIH (Maxon et al, 1994). Ceci lui permet de stimuler l'activité ATPase (XPB) et kinase (CDK7) de TFIIH (Ohkuma et al, 1994) et donc de faciliter l'ouverture du promoteur et l'entrée en phase d'élongation.

L'initiation de la transcription *in vitro* requière la présence d'au moins un des facteurs de transcription suivant : TFIIIF, TFIIIE ou TFIIH. Cependant, elle ne peut avoir lieu si aucun d'entre eux n'est présent au niveau du promoteur (Pan et al, 1994).

4.1.4. Elongation

Pause de l'ARN polymérase II

Lorsque l'ARN polymérase II est positionnée au niveau du nucléosome +1, elle est associée aux facteurs DSIF (*DRB Sensitivity-Inducing Factor*), un hétérodimère des protéines hSpt4 et hSpt5, et à NELF (*Negative Elongation Factor*), l'ensemble permettant de mettre l'ARN polymérase II en état de pause (Yamaguchi et al, 1999 et Yamada et al, 2006). Cet état est maintenu tant que ces deux protéines ne sont pas ciblées par des phosphorylations spécifiques.

Sortie de l'état de pause

La sortie de l'état de pause de l'ARN polymérase II est permis grâce à l'implication du complexe « Positive Transcription Elongation Factor b » (P-TEFb), le facteur d'élongation spécifique de l'ARN polymérase II. De par ce rôle, P-TEFb est particulièrement important afin d'obtenir une transcription processive.

P-TEFb est composé de 3 cyclines : T1, T2 et H (Peng et al, 1998) et de la kinase CDK9 (Fu et al, 1999). CDK9 catalyse la phosphorylation de la Sérine 2 du CTD de l'ARN polymérase II.

De plus, il réalise la phosphorylation de NELF, entraînant sa libération du nucléosome +1 et son décrochement de l'ARN polymérase II, ainsi que la phosphorylation de la sous unité hSpt5 de DSIF au niveau de la thréonine 4 (Yamada et al, 2006). Contrairement à NELF, DSIF phosphorylé reste associé à l'ARN polymérase II, signe de l'activation de l'ARN polymérase II. De par ce rôle, CDK9 permet la sortie de l'état de pause, permettant ainsi l'élongation processive de l'ARN polymérase II (Coin et al, 2015). P-TEFb joue donc un rôle majeur dans l'élongation de l'ARN polymérase II et c'est pourquoi il est sujet à une régulation de son activité. Lorsque P-TEFb est inactif, il est complexé avec les sous unités répressives suivantes : HEXIM1, 7SK snRNA. A l'inverse, la forme active de P-TEFb est associée à Brd4, qui permet le recrutement de P-TEFb au niveau d'histones acétylés (Brès et al, 2008).

CDK9 est également inhibé par la sous-unité TAF7 de TFIID comme expliqué précédemment. Ces mécanismes de régulations négatives exercés sur l'initiation de la transcription permettent d'une part une augmentation de la stabilité des complexes impliqués et d'autre part de s'assurer de la présence ou absence de tous les complexes, permettant d'obtenir une transcription la plus efficace possible.

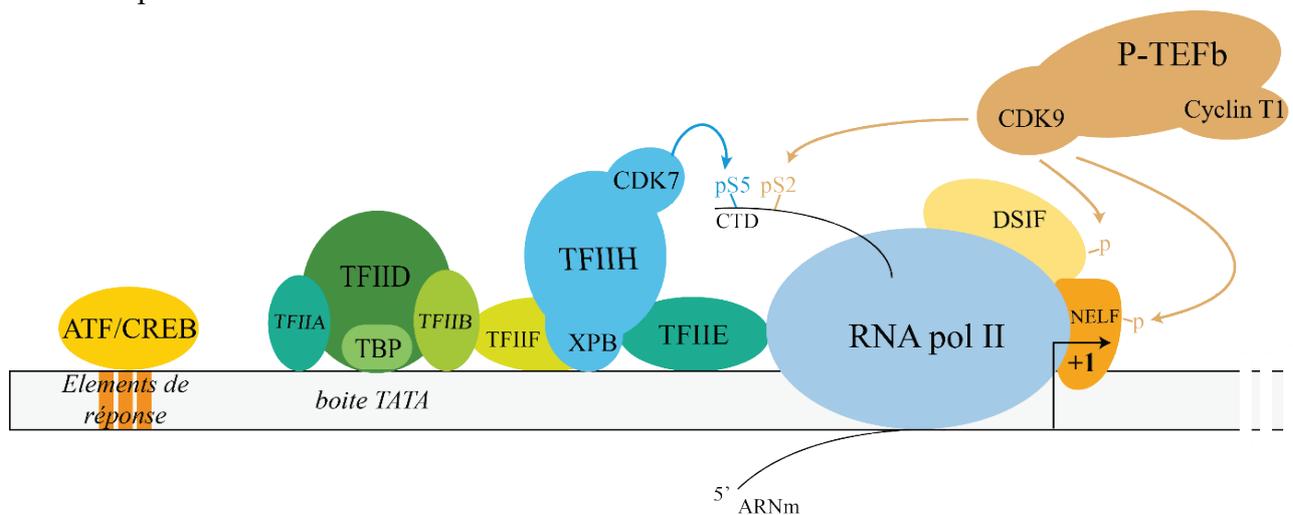


Figure 6 : Schéma simplifié de l'initiation de la transcription des promoteurs cellulaires de classe II

La transcription débute par le recrutement de facteurs de transcription spécifiques au niveau d'éléments de réponses localisés en amont de la boîte TATA (TATA box). Cette étape permet le recrutement au niveau de la boîte TATA du complexe de pré-initiation de la transcription (PIC), composé des facteurs généraux de transcription : TFIIA, TFIID, TFIIB. Le recrutement des autres facteurs généraux de transcription TFIIF, TFIIE et TFIIH permet ensuite la stabilisation de la bulle de transcription. La formation du PIC assure le recrutement de l'ARN polymérase II au niveau du promoteur, associée aux facteurs répressifs DSIF et NELF qui maintiennent l'ARN polymérase II dans un état de pause. Grâce à l'activité translocase de la sous-unité XPB de TFIIH, la sous-unité CDK7 de TFIIH est rapprochée du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II ce qui permet la phosphorylation de la Sérine 5 de l'ARN polymérase II par CDK7. Suite au recrutement du facteur P-TEFb, sa sous-unité CDK9 phosphoryle la Sérine 2 du domaine C-terminal de l'ARN polymérase II ainsi que les facteurs DSIF et NELF. Leur phosphorylation par CDK9 entraîne la libération de NELF, et permet l'activation de l'ARN polymérase II, associée à une transcription processive.

4.2. Mécanisme de la transcription du HTLV-1

Dans le contexte de la transcription du HTLV-1, le promoteur viral est localisé au sein du LTR. Il possède des éléments de réponses à différents facteurs de transcription et possède une séquence consensus TATA box, permettant d'assimiler le promoteur viral à un promoteur cellulaire de classe II, dont la transcription est régie par l'ARN polymérase II et ses co-facteurs spécifiques.

4.2.1. Structure des LTRs

Les LTRs sont deux séquences identiques conservées de 757 pb, divisées en 3 régions : U3 (353 pb), R (228 pb) et U5 (176 pb) flanquant le génome viral. Le LTR porte plusieurs éléments permettant la régulation de la transcription virale.

Le site d'initiation de la transcription (*Transcription Start Site, TSS*) viral est localisé à la jonction entre les régions U3 et R : la région U3 est considérée comme le promoteur viral et présente une séquence consensus boîte TATA en amont du TSS (Lever et al, 2010). Le signal de polyadénylation est localisé dans la région U5 et est inactif pour les transcrits initiés depuis le même LTR (Hanly et al, 1989 ; Cavanagh et al, 2006).

D'autres éléments de régulations de la transcription, dits éléments de régulations accessoires, sont localisés dans les régions R et U5.

La région U3 du LTR contient des éléments de réponse à différents facteurs de transcription qui varient selon le type d'activation, basale ou en présence du transactivateur viral Tax. Les éléments de réponse à Tax (*Tax Responsive Element, TxRE*) sont répartis en 2 groupes. Le TxRE de type 1 (TxRE1) est composé de trois éléments « enhancers » semi-conservés de 21 pb appelés viral Cyclic AMP Response Element (vCRE). On distingue le vCRE distal localisé à -242 du TSS, le vCRE central localisé à -193 du TSS et le vCRE proximal localisé à -94 du TSS (Figure 7). Chaque séquence vCRE est subdivisée en trois sous-domaines, A, B et C (Figure 7). Le domaine B (appelé vCRE core) présente une séquence proche du site consensus de réponse à CREB et est donc responsable du recrutement de multiples complexes de la famille de facteurs de transcription ATF/CREB. Les domaines A et C sont des séquences riches en G-C permettant le recrutement de Tax (région d'interaction avec Tax) (Kim et al, 2007).

Le TxRE de type 2 (TxRE2) est, lui, unique. Il est localisé à -140 bases du TSS entre le vCRE central et le vCRE proximal (Figure 7), et est composé d'un élément de réponse au sérum (*Serum Responsive Element, SRE*) (Winter et al, 2007). Le SRE contient un élément consensus de type boîte CArG, présent dans les promoteurs cellulaires associés à des sites de fixation du facteur de transcription Ets, ainsi que d'un site de liaison au facteur de transcription Sp1 (*Specific Protein 1*), appelé vSp1 (*viral Sp1*).

Ces différents éléments de régulation jouent un rôle dans la transcription basale et/ou la transcription induite par Tax.

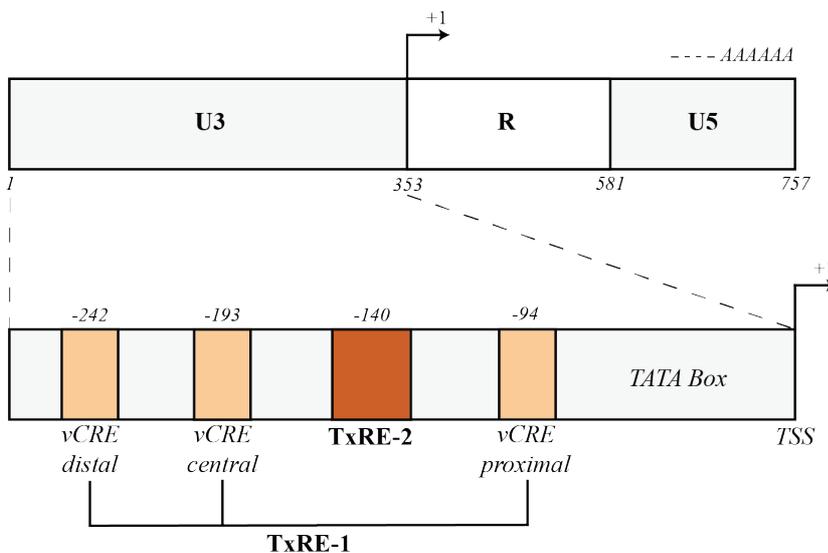


Figure 7 : Organisation du LTR du HTLV-1

Le LTR du HTLV-1 est divisé en trois parties : U3 (353 pb), R (228 pb) et U5 (176 pb). Le site d'initiation de la transcription (TSS) est localisé à la jonction entre U3 et R. Le domaine U3 possède les éléments de réponse à Tax (TxRE). Il en existe deux types : le TxRE-1, composé de trois éléments de réponse aux facteurs de transcription de la famille ATF/CREB (vCRE distal, vCRE central et vCRE proximal), et le TxRE-2.

vCRE distal : AAGGCTCTGACGTCTCCCCC
vCRE central TAGGCCCTGACGTGTCCCCT
vCRE proximal : CAGGCGTTGACGACAACCCCT
Domaines : A B C

4.2.2. Transcription basale du virus en absence de la protéine Tax

En absence de la protéine Tax, la transcription basale du virus est régie par différents facteurs de transcription cellulaires de la classe des bZIP (Partie résumée par la Figure 8).

Les facteurs de transcription cellulaire de AP-1 (*Activator Protein 1*) sont des hétérodimères composés des facteurs des familles Jun (c-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) (Revue dans Eferl et Wagner, 2003). AP-1 est impliqué dans la reconnaissance des séquences vCRE core ayant une séquence similaire à la séquence consensus cellulaire (TGAGTCA) (Jeang et al, 1991). Un autre facteur de classe bZIP, le facteur XBP-1, interagit avec les

séquences vCRE du TxRE1, permettant le recrutement de TBP au niveau de la boîte TATA virale et donc l'initiation de la transcription basale (Ku et al, 2008).

Le facteur Sp1 se lie préférentiellement au niveau du TxRE2 (vSp1), ainsi qu'au niveau du vCRE proximal qui présente également un site de réponse à Sp1 (Barnhart et al, 1997) par interaction avec la région riche en G-C (site mineur par rapport au TxRE2) (Wierstra et al, 2008). Le facteur Sp3 se lie également au niveau du site Sp1 localisé dans le vCRE proximal, mais en revanche, possède un rôle inhibiteur de la transcription basale induite par Sp1 (Yao et al, 2006).

La présence de sites SRE permet le recrutement du facteur « Serum Responsive Element » (SRF) qui intervient dans la transcription des gènes à expression précoce (*immediate early genes*) en réponse à la stimulation par des facteurs de croissance. La présence de domaines d'interaction et de dimérisation, appelés boîtes MADS, permet la formation d'homodimère qui s'associent avec l'ADN *via* les éléments consensus boîtes CArG des SRE (Niu et al, 2007). La protéine Elk-1 est un cofacteur important de SRF : elle permet la formation d'un complexe ternaire entre SRF, Elk-1 et l'ADN, au niveau du SRE, augmentant ainsi la transcription basale du HTLV-1 (Winter et al, 2007).

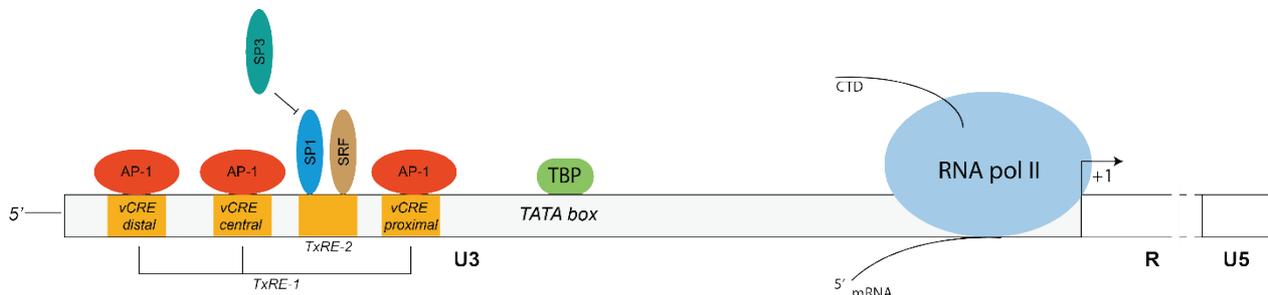


Figure 8 : Schéma des éléments de transcription cellulaires impliqués dans la transcription basale du promoteur du HTLV-1

Les éléments vCRE composant le TxRE-1 permettent le recrutement des facteurs de transcription AP-1. Le TxRE-2 possède un site de réponse au facteur SRF ainsi qu'au facteur Sp1. Le recrutement de Sp1 est inhibé sous l'action compétitive du facteur inhibiteur Sp3. Le recrutement d'au moins un de ces facteurs permet l'établissement de la transcription virale à un niveau très faible, mais suffisant pour une production minimale des transcrits viraux sens, à l'origine de la production de la protéine Tax, le transactivateur viral.

Le recrutement d'au moins un de ces facteurs entraîne le recrutement du complexe TBP au niveau de la boîte TATA. Cela permet d'enclencher l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II, mais à un niveau très faible. Cependant, ce mécanisme est suffisant pour permettre une production minimale des transcrits sens viraux doublement épissés en absence

de Tax, dont ceux codant Tax, permettant ensuite de mettre en place le mécanisme d'amplification par le transactivateur viral.

4.2.3. Transcription induite par Tax

La protéine Tax est impliquée à différents niveaux dans l'établissement de l'initiation de la transcription afin d'assurer un haut niveau de transcription, donc une forte production virale (Partie résumée par la Figure 9).

4.2.3.1. En amont de l'initiation : Levée de la répression transcriptionnelle

Le génome des rétrovirus, intégré dans le génome de la cellule hôte, est sujet à des répressions transcriptionnelles médiées par les mécanismes de défense cellulaire, cela afin d'empêcher l'expression des transcrits viraux. Ces mécanismes impliquent une répression par la méthylation de l'ADN et des histones (Ellis et al, 2005). Afin d'obtenir un niveau d'expression viral nécessaire à l'établissement du cycle viral, des mécanismes viraux sont mis en place afin de supprimer cette répression épigénétique.

Il a été montré que l'infection par HTLV-1 et l'expression de Tax entraîne une diminution du niveau général des histones dans les lymphocytes T lors de la division cellulaire. Ceci augmente le niveau de transcription général de la cellule, dont la transcription virale (Bogenberger et al, 2008). Il a également été observé que la concentration en nucléosomes et histones H1 répresseurs est diminuée au niveau du promoteur (Lemasson et al, 2002 ; Lemasson et al, 2006). L'éviction des nucléosomes répresseurs a été démontré comme étant médiée par des facteurs cellulaires : PARP-1 (Anderson et al, 2000), NAP-1 et p300 (Sharma et al, 2008). De plus, au niveau du promoteur viral, les histones H3 et H4 possèdent des marques d'acétylation activatrices (Lemasson et al, 2002 ; Lemasson et al, 2006). Or, le rôle direct de Tax et d'autres protéines dans ces mécanismes n'est, à ce jour, pas décrit.

De nombreuses régions contenant des îlots CpG, sites de la méthylation de l'ADN, sont présents sur le génome viral : 5'LTR-Gag (1-1,360 pb) ; pol (3,876-4,509 pb) ; env (5,648-6,166 pb) ; env-pX (6,446-7,561 pb) et pX-3'LTR (8,212-9,045 pb) (Taniguchi et al, 2005). La protéine Tax est cependant capable d'induire la transcription depuis un promoteur hyperméthylé (Ego

et al, 2005) impliquant l'interaction entre Tax et la protéine MBD2 (*methyl-CpG-binding domain protein 2*) via le domaine C-terminal de MBD2.

Le promoteur viral est recouvert par des enzymes déacétylant les histones (HDACs 1/2/3), réprimant la transcription. Il a été démontré que Tax interagit directement avec les HDAC 1/2/3 pour les extraire du promoteur (Ego et al, 2005 ; Lu et al, 2002 ; Villanueva et al, 2006). Tax a, en outre, la capacité d'interagir et de recruter de nombreux activateurs transcriptionnels pour permettre une transactivation efficace du LTR. De plus, Tax est capable d'interagir avec la protéine CARM1 (*Coactivator-associated Arginine Methyltransferase 1*), responsable de la méthylation des résidus Arginine 2 des histones H3 (H3R2me3). Ces marques activatrices sont nécessaires à une transactivation efficace (Jeong et al, 2006).

Ces données mettent en évidence une balance entre des mécanismes d'activation ou de répression de la transcription virale par Tax (Lemasson et al, 2004).

Comme expliqué précédemment (voir chapitre 4.1.1), le complexe SWI/SNF a un rôle important dans l'activation de promoteurs cellulaires. Ce complexe est également impliqué dans la transactivation par Tax. Tax est capable d'interagir avec les sous-unités BAF-53, BAF-57 et BAF-155 de ce complexe (Wu et al, 2004). A l'état basal, les sous-unités BRG1 et BRM sont associées au promoteur viral et l'expression de Tax conduit à l'exclusion de BRG1 et BRM hors du promoteur permettant le déplacement des nucléosomes hors du promoteur viral (Lemasson et al, 2006). Cela résulte en l'ouverture de la chromatine au niveau du promoteur viral, la rendant accessible aux cofacteurs de l'ARN polymérase II.

4.2.3.2. Formation du complexe de pré-initiation

La présence de l'histone acétyl transférase (HAT) CBP/p300 au niveau du LTR est corrélée avec l'acétylation activatrice des histones H3 et H4 (Lemasson et al, 2002). Le recrutement de p300 et de CBP par Tax se fait de façon directe et coordonnée (Kwok et al, 1996), *via* les domaines C/H1, KIX et CR2 de CBP (Lemasson et al, 2001). Au niveau du LTR, l'acétylation des résidus lysines des histones H3 et H4 par CBP/p300 ouvre la chromatine et rend accessible la séquence promotrice à la machinerie de transcription (Lu et al, 2002 ; Georges et al, 2002). La présence de l'histone H1 au niveau du LTR inhibe l'activité HAT de p300. Or, la présence de Tax a été montrée comme responsable de la levée de cette inhibition (Konesky et al, 2006).

Tax recrute également les protéines de la famille TORC au niveau des vCRE du LTR (Siu et al, 2006). Tax interagit directement avec les protéines TORC1/2/3 *via* leurs domaines « coiled-coil » pour activer le LTR de façon dépendante du recrutement de CBP/p300 (Siu et al, 2006). Or, la localisation nucléaire des protéines TORCs est nécessaire à leur activité transcriptionnelle : leur translocation nucléaire a lieu lors de l'activation de la voie AMPc ou de la voie de signalisation du calcium (Bittinger et al, 2004). Tax, mais également la protéine p12 du HTLV-1, activent la voie de réponse au calcium (Ding et al, 2002), compensant ainsi l'absence d'activation de la voie de l'AMPc. En outre, Tax interagit directement avec la protéine p300/CBP associated factor (P/CAF), formant ainsi un complexe p300/CBP – Tax – vCRE *in vitro*, qui est impliqué dans la transactivation du LTR (Harrod et al, 2000). De façon surprenante, un mutant de P/CAF déficient pour son activité HAT conserve sa capacité à transactiver le LTR, mettant en évidence un mécanisme indépendant de la fonction HAT et du recrutement de CBP/p300 (Jiang et al, 1999).

Le recrutement du complexe Tax – CBP/p300 – P/CAF se fait de façon synchrone avec le recrutement des facteurs ATF/CREB au niveau des vCRE, ce qui a pour conséquence la stabilisation du complexe de pré-initiation Tax – CBP/p300 - P/CAF – ATF/CREB (Giebler et al, 1997 ; Lenzmeier et al, 1998). Le recrutement des facteurs ATF/CREB au niveau des vCRE est rendu possible grâce à la capacité de Tax d'interagir avec différents facteurs de transcription de cette famille. Tax interagit directement avec CREB, CREM, CREB-2, ATF-1 (Revue dans Boxus et al, 2008), et forme un complexe endogène avec la protéine XBP-1, autre membre de la famille ATF (Ku et al, 2008). Ces membres de la famille ATF sont présents au niveau du promoteur viral (Lemasson et al, 2002). Cependant, l'évènement central de l'étape de pré-initiation médiée par Tax est le recrutement de CREB au niveau des vCRE (Zhao et al, 1992 ; Brauweiler et al, 1995). Tax seule possède une très faible affinité pour les TxRE du LTR (Giam et al, 1989), ce qui explique la nécessité de la formation du complexe CREB/ATF – Tax – TxRE. Sous forme dimérique, Tax facilite la dimérisation de CREB (Wagner et al, 1993), ce qui augmente l'affinité du complexe Tax - CREB pour les vCRE et stabilise son recrutement (Anderson et al, 1994). Cette stabilisation implique le contact entre le complexe Tax – CREB et les régions riches en G/C localisée de part et d'autre des vCRE (Lenzmeier et al, 1998).

A la différence du modèle cellulaire selon lequel CREB et CBP/p300 interagissent *via* leur domaine KID et KIX respectivement, Tax interagit avec le domaine bZIP de CREB. Puis, Tax et CREB interagissent tous deux avec le domaine KIX de CBP/p300 aux niveaux de deux sites différents, ce qui permet la formation d'un complexe extrêmement stable, indépendamment de

l'activation de la voie de l'AMPc (Geiger et al, 2008). Tax forme donc un pont entre CREB, CBP/p300 et le vCRE.

La présence de la forme phosphorylée Sérine 133 de CREB est nécessaire au recrutement du complexe CBP/p300 (Parker et al, 1996) ce qui permet de stabiliser le complexe CREB - Tax - CBP/p300 - vCRE. Tax augmente la phosphorylation de CREB et un niveau élevé de CREB phosphorylé est observé dans les lymphocytes T infectées par HTLV-1 (Kim et al, 2007). Cette observation est à mettre en parallèle avec l'activation des TORCs par la modulation de la voie de signalisation du calcium : Tax imite ainsi l'effet de l'activation de la voie de l'AMPc (Kim et al, 2007). De plus, Tax augmente le niveau de O-GlcNAcylation de CREB, modification post-traductionnelle impliquée dans la régulation de son activité, afin d'augmenter la transactivation du LTR (Groussaud et al, 2017).

Le complexe Tax - CREB/ATF est également impliqué dans l'activation de gènes cellulaires par Tax et est donc associé à sa capacité oncogénique. A l'inverse, ce complexe est également impliqué dans la répression des gènes cellulaires comme p53 (De La Fuente et al, 2006). Certains ATF possèdent une faible affinité de liaison aux promoteurs. Lorsque Tax interagit avec ces derniers, cela empêche leur recrutement au niveau du promoteur ce qui résulte en l'inhibition de la transcription. Ce mécanisme a également été observé pour la cycline D3 et l'ADN polymérase α (Kibler et al, 2001).

En conclusion, Tax a la capacité de recruter différents facteurs et cofacteurs de transcription cellulaires et additionnent leurs activités pour obtenir la meilleure efficacité de transcription. Cela permet d'utiliser la machinerie de régulation transcriptionnelle disponible en fonction de l'environnement cellulaire.

4.2.3.3. Initiation de la transcription : Détournement des GTF par Tax

La transcription depuis le LTR du HTLV-1 a pu être reconstituée *in vitro* par l'utilisation de protéines purifiées TFIID, TFIIA, TFIIIE, TFIIF, TFIIH et de l'ARN polymérase II (Piras et al, 1994 ; Duvall et al, 1995 ; Anderson et al, 2000). Ces données montrent l'implication de la machinerie de transcription de l'ARN polymérase II dans la transcription du HTLV-1 sans pour autant informer sur les rôles respectifs de ces différents complexes.

Suite à ces études, TFIID et TFIIA ont été montrés comme étant nécessaire à la transactivation par Tax du LTR (Duvall et al, 1995). Plus précisément, l'extinction de TFIIA inhibe la

transactivation du LTR par Tax et il a été montré que Tax recrute directement le complexe TFIIA *via* sa sous-unité de 35 kDa (Clemens et al, 1996).

TBP seul permet la transcription basale mais le complexe TFIID, incluant sa sous-unité TBP, est nécessaire à la transactivation par Tax (Duvall et al, 1995). De plus, Tax est capable d'interagir directement avec TFIID *via* TBP (Caron et al, 1993) et hTAFII28 (Caron et al, 1997), et leur surexpression augmente la transcription virale (Caron et al, 1997). La formation du complexe Tax – TFIID permet ainsi une augmentation de l'affinité de TBP pour la boîte TATA virale (Ching et al, 2004).

Contrairement à TFIID et TFIIA, TFIIB ne semble pas nécessaire à la transactivation du LTR par Tax. Sa surexpression a en effet peu d'impact sur le niveau de transcription virale (Caron et al, 1993).

Même si d'autres facteurs de transcription comme TFIIE, TFIIIF, et TFIIF, nécessaires dans les modèles cellulaires à l'ouverture du promoteur, semblent être impliqués dans la transactivation du LTR (Piras et al, 1994 ; Duvall et al, 1995 ; Anderson et al, 2000), leur rôle précis et leur lien avec Tax n'ont pas été étudiés de façon approfondie. De plus, les études concernant la transcription cellulaire ont montré la nécessité de la présence d'au moins un de ces trois complexes pour permettre une transcription efficace.

D'autres virus possédant un transactivateur viral recrutent le complexe TFIIF. Ainsi, la protéine EBNA2 du virus Epstein-Barr recrute le complexe TFIIF *via* sa sous-unité p62 pour augmenter la transcription virale (Tong et al, 1995). De plus, l'équipe dans laquelle j'ai réalisé ma thèse a mis en évidence que la sous unité XPB de TFIIF est impliquée dans la transactivation par Tat du LTR5' du VIH-1 (Lacombe et al, 2016),

Ces données semblent faire de TFIIF un candidat pertinent pour un rôle possible lors de l'étape d'ouverture du promoteur du HTLV-1. Dans cette optique, CDK7, sous-unité de TFIIF, a été détectée au niveau du LTR du HTLV-1 (Zhou et al, 2006). Or, Tax n'interagit pas avec CDK7 (Cho et al, 2007). Il serait donc possible que TFIIF soit recruté au niveau du LTR par Tax *via* une autre sous-unité.

4.2.3.4. Elongation de la transcription

Comme expliqué précédemment (Chapitre 4.1), l'étape d'élongation de l'ARN est régie par le complexe d'élongation P-TEFb qui permet à l'ARN Polymérase II de sortir de son état de pause transcriptionnelle.

Le complexe P-TEFb est détecté au sein du complexe de pré-initiation de la transcription du HTLV-1 *in vivo*, et sa sous unité CDK9 est recrutée au niveau du promoteur viral. L'inhibition de CDK9 (par l'utilisation de siRNA ou inhibition enzymatique de son activité kinase) inhibe la transactivation du LTR par Tax (Zhou et al, 2006), mettant en évidence un rôle majeur de P-TEFb dans la transcription virale. Tax entre en compétition avec Brd4 afin de libérer P-TEFb de son complexe répresseur (Cho et al, 2010). De plus, Tax interagit directement avec la sous-unité Cycline T1 de P-TEFb afin de le recruter au niveau du LTR (Cho et al, 2007). Le recrutement de P-TEFb par Tax au niveau du promoteur viral permet l'activation de l'ARN polymérase II, et donc une élongation processive de la transcription virale.

De façon surprenante, Tax possède également un rôle répresseur de l'élongation de la transcription. Sa présence dans le complexe P-TEFb entraîne l'autophosphorylation de CDK9 au niveau de sa thréonine 29, résultant en un blocage de son activité kinase et donc une inhibition temporaire de la phosphorylation du CTD de l'ARN polymérase II par CDK9 (Zhou et al, 2006), maintenant l'état de pause de l'ARN polymérase II. Cela met en évidence un rôle de Tax dans l'équilibre entre l'activation et l'inactivation de P-TEFb, c'est à dire dans la temporisation entre les étapes de pré-initiation et d'élongation de la transcription. Ce rôle rappelle fortement celui de la protéine TAF7 du complexe TFIID, régulant négativement l'élongation de l'ARN polymérase II dans le contexte cellulaire, processus nécessaire au bon déroulement de l'assemblage des complexes transcriptionnels, afin d'obtenir un haut niveau de transcription par l'ARN pol II (Gegonne et al, 2013). Ces points de contrôle « check-point » semblent nécessaires au bon déroulement de l'initiation de la transcription et Tax prend également en charge cette fonction afin d'optimiser la transcription virale.

transcriptionnelle. Or, Tax est capable d'interagir avec différentes HDACs, renforçant le modèle d'une balance entre activation de la transcription et répression par Tax (Lemasson et al, 2004).

De nombreux facteurs bZIP cellulaires sont impliqués dans la régulation de la transactivation par Tax du LTR, comme la famille CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBP). Le membre C/EBP β interagit avec Tax pour activer la transcription depuis le LTR (Hivin et al, 2004), alors que C/EBP α , C/EBP ξ forment un hétérodimère avec CREB-2 (Grant et al, 2006), et réduisent la transactivation du LTR 5'. De plus, le facteur ATFx est recruté au niveau des vCRE, ce qui entraîne la répression de la transactivation par Tax (Forgacs et al, 2005). C'est également le cas du facteur cAMP early repressor (ICER) (Newbound et al, 2000).

Répression de la transactivation du LTR5' par Tax par les autres protéines virales.

La protéine HBZ, via son domaine bZIP, forme des hétérodimères avec de nombreux facteurs de transcription cellulaires. Plus précisément, la protéine issue de la forme épissée de l'ARN de HBZ, sHBZ, interagit avec c-Jun entraînant une diminution de la transcription basale du LTR 5' (Basbous et al, 2003, Cavanagh et al, 2006). De plus, HBZ interagit avec CREB, bloquant son recrutement au niveau des TRE du LTR 5' lors de la transactivation par Tax (Lemasson et al, 2007). HBZ interfère également avec le recrutement de CBP/p300. *Via* le motif LXXLL en position N-terminale, HBZ entre en compétition avec Tax pour la liaison du domaine KIX de CBP/p300 (Clerc et al, 2008), ce qui inhibe son activité HAT nécessaire à l'activation du LTR (Wurm et al, 2012).

La protéine auxiliaire virale p30 possède un rôle régulateur de la transactivation par Tax. A faible concentration, p30 semble stimuler la transactivation par Tax du LTR, alors qu'en cas de fortes concentration, p30 entre en compétition avec Tax pour le recrutement de CBP/p300 (Zhang et al, 2001).

De façon surprenante, Tax, elle-même, possède un rôle répresseur de sa propre transcription. Au niveau épigénétique, la triméthylation de lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me3), marque épigénétique répressive, est assurée par différentes histones lysine méthyltransférases (KMT), dont la protéine Suv39h1. Tax interagit directement avec Suv39h1 et la recrute sur le LTR, diminuant le niveau d'activation du LTR (Kamoi et al, 2006). La triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) est également une marque répressive. Cette marque est déposée

par le complexe PRC2 (*Polycomb repressive complex 2*) dont l'activité catalytique est portée par la sous-unité Ezh2 (*Enhancer of Zeste Homolog 2*). Tax est capable d'interagir avec Ezh2, et un chevauchement entre les régions de liaison de Tax au sein du génome cellulaire et celle présentant un fort recrutement de Ezh2 a été observé (Fujikawa et al, 2016). Cela met en évidence un potentiel mécanisme de répression des LTRs viraux par Tax. En outre, l'expression de Bcl-3, membre de la famille IκB, est induite par Tax *via* l'activation de la voie NF-κB. Or, il a été montré que Bcl-3 inhibe la transactivation du LTR 5' par Tax par son incorporation dans le complexe Tax – CREB - TORC3 ; ce qui entraîne le recrutement de HDAC-1 et la désacétylation des histones menant à une inhibition de la transcription. (Hishiki et al, 2007). Ces derniers points mettent en évidence une boucle d'autorégulation négative, potentiellement impliquée dans la temporisation de la transcription virale, qui peut être mis en lien avec la capacité fortement immunogène de Tax.

4.2.5. Effet de Tax sur le LTR 3'

Il est nécessaire de rappeler que les deux LTR viraux présentent la même séquence et possèdent donc les mêmes éléments de régulation (Lemasson et al, 2004). Des études chez plusieurs rétrovirus ont initialement suggérées que le LTR 3' est bloqué lorsque le LTR 5' est actif (Cullen et al, 1984). Pourtant, l'expression du transcrit antisens HBZ, contrôlé par le LTR 3' du HTLV-1, a été caractérisé dans des cellules présentant une transcription sens active (Gaudray et al, 2002). Cela met en évidence la possibilité d'avoir une transcription active à la fois depuis le LTR 5' et le LTR 3'.

L'utilisation d'une construction permettant la transcription bidirectionnelle à partir de chacun des LTR (en contexte plasmidique et intégré) a mis en évidence l'absence d'interférence transcriptionnelle entre les LTR 5' et 3' dans le cas du HTLV-1 (Laverdure et al, 2014). En présence de Tax, la transcription antisens depuis le LTR 3' est maintenue, voire augmentée. De plus, Tax est détectée au niveau de la région U3 du LTR 3' (Lemasson et al, 2004), mettant en évidence que les vCRE du LTR 3' semblent être fonctionnels et comparables à ceux du LTR 5'. Ce point est confirmé par le recrutement de CREB au niveau des TxRE du LTR 3' lors de la surexpression de Tax, qui a pour conséquence une augmentation de la transcription antisens (Landry et al, 2009). Un autre modèle confirme cette observation : la transfection d'un plasmide codant pour la luciférase sous contrôle du promoteur de la forme usHBZ, associée à la surexpression de la protéine Tax, met en évidence une activation du promoteur de usHBZ par

la protéine Tax dépendante des TxRE du LTR 3', effet non observé avec le promoteur de sHBZ (Yoshida et al, 2008).

Le complexe NCoR contenant HDAC3 est préférentiellement recruté au niveau du LTR 3' par rapport au LTR 5' (Lemasson et al, 2004). Ceci met en évidence le recrutement de différents HDAC au niveau des LTR 5' et 3' bien qu'ils soient identiques, soulevant l'hypothèse d'une régulation différentielle des deux LTR impliquant d'autres mécanismes restant à définir.

La présence d'un site de fixation à la protéine CTCF (CCCTC binding factor) sur le génome viral permet la formation de boucle chromatinienne dans l'ADN génomique, rapprochant ainsi des régions génomiques distantes (Revue dans Ghirlando et Felsenfeld, 2016). Cela a pour conséquence la possibilité d'avoir des profils épigénétiques différents entre les extrémités 5' et 3' du génome (Satou et al, 2016). Ceci permet une régulation épigénétique différentielle des LTR 5' et LTR 3' (Satou et al, 2016), ce qui est cohérent avec l'observation que les histone activateurs H3 et H4 localisées au niveau du LTR 3' présentent des marques activatrices comme des acétylations et également di et tri méthylations de H3K4 (Yoshida et al, 2008) alors que le LTR5' est réprimé.

5. Problématique du travail de thèse

Tax est un puissant transactivateur des TxRE localisés dans la région U3 des LTR 5' et LTR 3'. Cette capacité est permise grâce à l'aptitude de Tax à recruter de nombreux de co-facteurs régissant les différentes étapes de l'initiation de la transcription virale. Cependant, l'implication de Tax dans l'étape d'ouverture du promoteur n'a pas été caractérisée, alors que cette étape est nécessaire à une transactivation optimale. Le complexe TFIID, étant connu pour être ciblé par d'autres virus lors de l'établissement de leur transcription, pourrait être ciblé par Tax. La première partie de cette étude concernera donc l'étude de l'implication de la sous-unité XPB de TFIID dans la transactivation du LTR 5' du HTLV-1 par Tax.

Après avoir étudié plus précisément le mécanisme contrôlant la transcription virale depuis le LTR 5', l'attention se porte sur le LTR 3', de séquence identique. Le complexe Tax/CREB, déclencheur de l'étape de pré-initiation de la transcription virale, est présent au niveau de la région U3 à la fois sur les LTR 5' et LTR 3'. Cela soulève l'hypothèse d'un rôle de Tax dans

la modulation de la transcription depuis le LTR 3' dépendante des TxREs, hypothèse appuyée par l'observation que la protéine Tax, dans un modèle transitoire, posséderait un rôle activateur du promoteur de usHBZ, mais pas du promoteur de sHBZ. La transcription de l'ARNm de sHBZ est sous contrôle des sites de réponse au facteur de transcription Sp1 localisé dans la région U5 du LTR 3' (Yoshida, 2008), alors que le site d'initiation de l'ARNm de usHBZ se situe en amont de la région U3 du LTR 3' (Yoshida, 2008). Ainsi, en antisens, le site d'initiation de usHBZ se localise en aval des TxREs de la région U3 du LTR 3', permettant de s'interroger sur le rôle de Tax et des éléments TxRE dans la transcription de usHBZ. La seconde partie du travail porte donc sur l'étude des effets de la protéine Tax sur les niveaux d'expression des transcrits antisens du HTLV-1 (Figure 10).

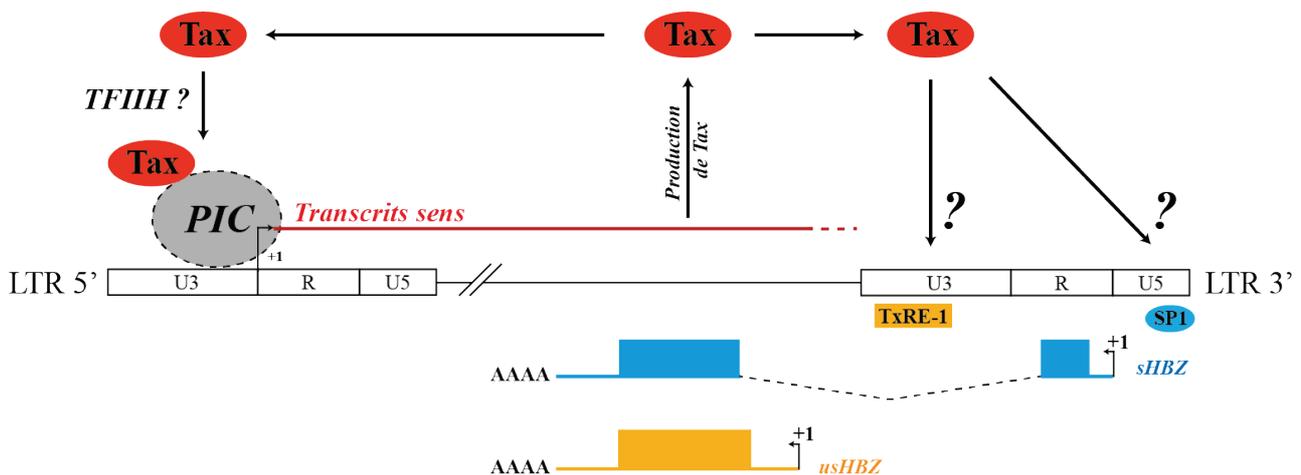


Figure 10 : Hypothèse de la régulation de la transcription virale par Tax

Le mécanisme de transactivation du LTR 5' par Tax est bien documenté : Tax recrute différents co-facteurs spécifiques de l'ARN polymérase II mais des informations complémentaires concernant l'implication de certains d'entre eux, comme le complexe TFIIDH, sont requises afin de comprendre précisément les détails du mécanisme impliqué. A l'inverse, le rôle du Tax dans l'établissement de la transcription antisens du HTLV-1 est très mal connu. Des études préliminaires supposent que Tax possède un effet sur la transcription antisens mais sa nature fait débat dans la communauté scientifique, d'où la nécessité de documenter le rôle de Tax dans la transcription depuis le LTR 3'.

II. MATERIELS ET METHODES

Seuls les matériels et méthodes utilisés lors de la partie 2 sont décrits ci-dessous. Les informations concernant la partie 1 sont détaillées dans l'article joint.

1. Matériels

Lignées cellulaires

Tableau 5 : résumé des modèles cellulaires utilisés lors de l'étude

Lignées	Origine	Type	Virion	LTR actif	Réf.
Jurkat	Patient Leucémique non HTLV-1	LT CD4+	-	-	ATCC TIB-152
TL-om1	Patient Leucémique HTLV-1	LT CD4+	Non	LTR 3'	Koiwa et al, 2002
MT1	Patient Leucémique HTLV-1	LT CD4+	Non	LTR 3'	Koiwa et al, 2002
C8166	Patient Leucémique HTLV-1	LT CD4+	Non	LTR 5' + LTR 3'	Bhat et al, 1993
MT4	Patient Leucémique HTLV-1	LT CD4+	Oui	LTR 5' + LTR 3'	Datta et al, 2001
CIB	Patient Leucémique HTLV-1	PBMC immortalisés	Oui	LTR 5' + LTR 3'	-

Les lignées humaines de LT CD4+ sont cultivées en milieu RMPI (Roswell Park Institut, Life Technologies) complété avec 10% de SVF, 200 mM de glutamine et de pénicilline/streptomycine (50 µg/mL). Les cellules de la lignée C8166 possèdent des génomes proviraux défectifs pour les phases ouvertes de lecture Gag et Pol, ainsi qu'un défaut d'export d'ARN viraux par Rex et ne produisent donc pas de particules virales (Tableau 1). Les cellules de la lignée TL-om1 possèdent un seul provirus intégré dans lequel le LTR 5' est réprimé (absence de transcription sens) et produise donc uniquement les protéines HBZ. Les cellules de la lignée MT1 possèdent des génomes proviraux sauvages dans lequel le LTR 5' est épigénétiquement réprimé se traduisant par un niveau de transcription sens très faible, non suffisant à la production des protéines virales. Les cellules de la lignée MT4 possèdent des génomes proviraux sauvages présentant une transcription sens et antisens actives associées à une production de particules virales. Les PBMC infectés par HTLV-1 immortalisés (CIB) ont été obtenus depuis un patient atteint de TSP et sont cultivés en présence d'IL-2 exogène. Toutes les lignées cellulaires sont cultivées à 37°C en atmosphère 5% CO₂.

Anticorps

Tableau 6 : Résumé les anticorps utilisés lors de l'étude

Types	Protéine cible	Origine	Espèces	Dilution pour Western-Blot
Monoclonaux	Tax	Santa Cruz sc-57872	Souris	1/1000
	GAPDH	Santa Cruz sc-32233 (6C5)	Souris	1/1000
Polyclonal	Protéines d'HTLV-1 dont Tax	Sérum de patients infectés par HTLV-1	Humain	1/3000

2. Méthodes

Transfection de lignées cellulaires

Les lignées de lymphocytes T sont transfectées avec le réactif commercial DMRIEC (ThermoFisher). Les plasmides sont ajoutés à 250 μ L de milieu sans sérum (OptiMEM, Life Technology) puis 250 μ L de OptiMEM + 5 μ L de DMRIEC sont additionnés à ce mélange après 15 min d'incubation à température ambiante. L'ensemble est incubé 45 min à température ambiante puis 200 μ L du mélange final est distribué dans les puits de culture (plaque 24 puits) et les cellules sont ensuite ajoutées (3×10^5 cellules dans 20 μ L de OptiMEM). Après une incubation de 5 h à 37 °C, 2 mL de RMPI complet sont finalement ajoutés.

Western-Blot

Après récolte par centrifugation (300g/min pendant 5 min), les cellules sont lysées dans du tampon RIPA (50 mM Tris HCl pH=8, 150 mM NaCl, NP40 1%, désoxycholate de sodium 0,5%, SDS 0,1%) additionné d'inhibiteurs de protéases, phosphatases et benzonase (Thermo Fisher Scientific) pendant 30 min sur roue à 4°C. Les protéines totales sont ensuite dosées par colorimétrie à l'aide du coffret BCA Protein Assay (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit, ThermoFisher Scientific). Pour la quantification, une gamme de BSA (Bovine Serum Albumin) de 0 à 2 mg/mL est réalisée dans le tampon RIPA. L'absorbance est mesurée à 560 nm après 30 minutes d'incubation à 37°C.

30 μ g de lysat protéique est mélangé avec une solution dénaturante et réductrice (Laemmli 5X) et le mélange est incubé 5 min à 95°C puis déposé dans un gel de polyacrylamide pré-coulé (gradient 4-15%, Mini-PROTEAN TGX Stain Free Gels, BIORAD). La migration a lieu dans un tampon Tris-Glycine pH=8,5, SDS 0,1% à voltage constant (250 V). Après la migration, les protéines séparées sont transférées sur une membrane de nitrocellulose 0.45 μ M (Millipore) et

le transfert est réalisé grâce à l'appareil Transblot Turbo Transfer System (BIORAD) et au coffret Trans-Blot Turbo RTA Mini Transfer Kit (BIORAD).

Lors des étapes de révélation, les sites de fixation non spécifiques de la membrane sont d'abord bloqués par incubation dans une solution de saturation (TBS, Tris Buffer Saline [Tris 0,5 mol/L + NaCl 1,5 mol/L] + Régilait écrémé 5%) pendant 1h à température ambiante. La membrane saturée est ensuite incubée avec les anticorps primaires dilués dans la solution de saturation additionnée de 0,1% de Tween 20 pendant une nuit à 4°C sous agitation douce. La membrane est lavée 3 fois 5 minutes dans du TBS Tween 0,1%, puis les anticorps secondaires couplés à la peroxydase sont incubés sur la membrane pendant 1 heure à 20°C sur agitation douce. La révélation se fait par addition du substrat de la peroxydase de la gamme Immobilon (Millipore). L'image des signaux révélés est obtenue par la caméra FUSION FX (Vilber Loumat) et la quantification de l'intensité des bandes est réalisée *via* le logiciel ImageJ.

Extraction des ARN cellulaires et viraux

Cette extraction se fait à partir de 5×10^5 à 10^6 cellules. Les cellules sont centrifugées 5 min à 300g/min et lavées 2 fois en PBS (Phosphate Buffer Saline, Thermofisher). Les ARNs totaux sont extraits à partir du culot sec grâce au coffret NucleoSin Extract II (Macherey-Nagel). Un traitement à la DNase est réalisé afin d'éliminer les traces d'ADN libérés pendant la lyse. La quantité des ARN extraits est évaluée par absorbance à 260 nm grâce à un spectrophotomètre (NanoDrop).

Détection spécifique des transcrits sens et antisens viraux

La détection spécifique des transcrits épissés Tax et sHBZ est réalisée par l'utilisation de sondes Taqman localisées à la jonction entre les exons associées à des amorces, dont les séquences sont présentées dans le tableau 7.

Tableau 7 : Séquences des amorces et sonde utilisées pour la détection des transcrits Tax et sHBZ par qPCR

Transcrits	Amorce sens	Amorce antisens	Sonde
Tax	ATCCCGTGAGACTCCTCAA	CCAAACACGTAGACTGGGTATCC	TCCAACACCATGGCCCACTTCCC
sHBZ	AGAACGCGACTCAACCGG	TGACACAGGCAAGCATCGA	TGGATGGCGGCCTCAGGGCT

Les transcrits sens non épissés sont détectés par l'utilisation d'amorces choisies dans une région non chevauchante avec la transcription antisens dont les séquences sont présentées dans le tableau 8

Tableau 8 : Séquences des amorces utilisées pour la détection des transcrits Gag et Env par qPCR

Transcrits	Amorce sens	Amorce antisens	Position sur le génome HTLV-1
Gag : ARN viral génomique	CAGAGGAAGATGCCCT CCTATT	GTCAACCTGGGCTTTAAT TACG	2037-2202
Env : Tous les transcrits sens	GCTAGTTCTGCCAGT GGAT	TTGGTGGTCTTTTTCTTT GG	5100-5179

Afin de détecter spécifiquement le transcrit usHBZ, on réalise une transcription inverse avec un oligonucléotide composé d'une séquence reconnaissant le second exon d'HBZ (en position 70 du second exon soit en position 7220 sur le génome HTLV-1) et d'une séquence neutre « Tag » (surlignée) :

5'-GGCAGTATCGTGAATTCGATGCTCCAAGGATAATAGCCCGTCCA-3'.

Cette transcription inverse (RT) est effectuée sur 1 µg d'ARN à l'aide de l'enzyme Maxima H-minus (Thermo Fisher Scientific) selon le protocole du fabricant. Après une étape de digestion par une DNase, spécifique de l'ADN double brin, et une pré-incubation avec les oligonucléotides et les dNTPs, la reverse transcription est réalisée à 65°C, pendant 30 minutes, et suivie d'une inactivation de l'enzyme pendant 5 minutes à 85°C. La PCR permettant la détection du transcrit usHBZ est ensuite réalisée avec un oligonucléotide sens spécifique de usHBZ : CAGTAGGGCGTGACGATGTA et un oligonucléotide antisens spécifique de la séquence Tag : GGCAGTATCGTGAATTCGATGC en présence de SYBR Green (Roche) incorporé dans l'ADN amplifié.

Les résultats sont normalisés sur deux transcrits provenant de gènes de ménage, EEF1G et HPRT, dont les amorces sont détaillées dans le tableau 9.

Tableau 9 : Séquences des amorces utilisées pour la détection des transcrits cellulaires

Transcrits	Amorce sens	Amorce antisens
EEF1G	AGATGGCCCAGTTTGATGCTAA	GCTTCTCTCCCGTGAACCCT
HPRT	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT

Les valeurs présentées, appelées NQ, sont obtenues selon le calcul suivant :

$$NQ = 2^{(Cp_{EEF1G} + Cp_{HPRT})/2 - Cp_{gène\ d'intérêt}}$$

Tests statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 7. La comparaison entre deux groupes a été effectuée à l'aide du test t jumelé et de l'analyse de groupes multiples avec le test unidirectionnel (one way ANOVA Test)

III. RESULTATS

1. Présentation de l'Article : « Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Transactivator Tax Exploits the XPB Subunit of TFIID during Viral Transcription » (Martella et al, JVI, 2020).

Comme détaillé précédemment, Tax est un puissant transactivateur du LTR du HTLV-1. Tax intervient à différents niveaux dans la mise en place de la machinerie de transcription du LTR5'. Lors de première phase de la transcription virale, Tax recrute les facteurs et co-facteurs spécifiques de l'ARN polymérase II au niveau des TxRE localisés dans la région U3 du LTR 5'. Tax est aussi connu pour recruter des facteurs généraux de la transcription cellulaire, permettant ainsi la formation du complexe de pré-initiation (PIC) de la transcription virale afin de réaliser la synthèse et l'élongation des ARNs viraux. Parmi ces facteurs généraux de transcription cellulaire, Tax recrute TFIIA, et IID, impliqués dans la formation du PIC, et le facteur P-TEFb, nécessaire à l'élongation processive de l'ARN polymérase II. Des données *in vitro* suggère que le complexe TFIID, impliqué dans l'ouverture de la chromatine et dans l'échappement de l'ARN polymérase II du promoteur, semble nécessaire à la transcription virale par Tax. Cependant, son importance dans l'établissement de la machinerie de transcription au niveau du LTR lors de sa transactivation par Tax, et le potentiel rôle de Tax dans son recrutement, n'ont pas été étudiés.

Ceci nous a conduit à étudier le lien potentiel entre Tax et TFIID. Je me suis en particulier intéressé à XPB dans la mesure où notre équipe a déjà montré que cette protéine est impliquée dans la transactivation du LTR5' d'un autre rétrovirus, le virus de l'immunodéficience humaine (Lacombe, 2016). Nous nous sommes appuyés sur les propriétés de la Spironolactone (SP), un antagoniste compétitif de l'aldostérone également capable d'induire la dégradation de la sous-unité XPB du complexe TFIID sans pour autant déstabiliser le complexe (Alekseev et al, 2014). Dans cette étude, nous avons montré que les protéines Tax et XPB interagissent directement *in vitro*, forment un complexe dans un modèle endogène de lymphocytes T infectés par HTLV-1, et que XPB est recruté au niveau du promoteur viral de façon dépendante de Tax. De plus, la dégradation de XPB par la SP est associée à une forte diminution de la transactivation du promoteur viral médiée par Tax dans des lymphocytes T infectés par HTLV-1, effet compensé

par la surexpression de XPB exogène. Cette approche nous a permis de montrer qu'un mutant de XPB, déficient pour l'activité ATPase nécessaire à l'ouverture du promoteur lors de l'initiation de la transcription, n'est pas capable de compenser l'effet du traitement SP, mettant en évidence l'importance de l'activité ATPase dans ce mécanisme transcriptionnel. Les résultats obtenus dans cette étude révèlent que XPB est un nouveau co-facteur cellulaire détourné par la protéine virale Tax pour augmenter la transcription du HTLV-1.

Annexe : « Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Transactivator Tax Exploits the XPB Subunit of TFIID during Viral Transcription » Martella et al, Journal of Virology, 2020.



Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Transactivator Tax Exploits the XPB Subunit of TFIIH during Viral Transcription

Christophe Martella,^a Armelle Inge Tollenaere,^{a*} Laetitia Waast,^a Benoit Lacombe,^a Damien Groussaud,^a Florence Margottin-Goguet,^a Bertha Cecilia Ramirez,^{a*} Claudine Pique^a

^aUniversité de Paris, Institut Cochin, INSERM, U1016, CNRS, UMR8104, Paris, France

ABSTRACT Human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) Tax oncoprotein is required for viral gene expression. Tax transactivates the viral promoter by recruiting specific transcription factors but also by interfering with general transcription factors involved in the preinitiation step, such as TFIIA and TFIID. However, data are lacking regarding Tax interplay with TFIIH, which intervenes during the last step of preinitiation. We previously reported that XPB, the TFIIH subunit responsible for promoter opening and promoter escape, is required for Tat-induced human-immunodeficiency virus promoter transactivation. Here, we investigated whether XPB may also play a role in HTLV-1 transcription. We report that Tax and XPB directly interact *in vitro* and that endogenous XPB produced by HTLV-1-infected T cells binds to Tax and is recruited on proviral LTRs. In contrast, XPB recruitment at the LTR is not detected in Tax-negative HTLV-1-infected T cells and is strongly reduced when Tax-induced HTLV-1 LTR transactivation is blocked. XPB overexpression does not affect basal HTLV-1 promoter activation but enhances Tax-mediated transactivation in T cells. Conversely, downregulating XPB strongly reduces Tax-mediated transactivation. Importantly, spironolactone (SP)-mediated inhibition of LTR activation can be rescued by overexpressing XPB but not XPD, another TFIIH subunit. Furthermore, an XPB mutant defective for the ATPase activity responsible for promoter opening does not show rescue of the effect of SP. Finally, XPB downregulation reduces viability of Tax-positive but not Tax-negative HTLV-1-transformed T cell lines. These findings reveal that XPB is a novel cellular cofactor hijacked by Tax to facilitate HTLV-1 transcription.

IMPORTANCE HTLV-1 is considered the most potent human oncovirus and is also responsible for severe inflammatory disorders. HTLV-1 transcription is undertaken by RNA polymerase II and is controlled by the viral oncoprotein Tax. Tax transactivates the viral promoter first via the recruitment of CREB and its cofactors to the long terminal repeat (LTR). However, how Tax controls subsequent steps of the transcription process remains unclear. In this study, we explore the link between Tax and the XPB subunit of TFIIH that governs, via its ATPase activity, the promoter-opening step of transcription. We demonstrate that XPB is a novel physical and functional partner of Tax, recruited on HTLV-1 LTR, and required for viral transcription. These findings extend the mechanism of Tax transactivation to the recruitment of TFIIH and reinforce the link between XPB and transactivator-induced viral transcription.

KEYWORDS retrovirus, oncoprotein, transcription, TFIIH, promoter opening

Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) is the etiologic agent of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL), a very aggressive malignant proliferation of CD4⁺ T lymphocytes (1, 2). In addition, HTLV-1 is associated with various inflammatory disorders, notably HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) (3).

The HTLV-1 genome encodes structural, enzymatic, regulatory, and auxiliary proteins. Among them, the regulatory protein Tax is a major player for disease develop-

Citation Martella C, Tollenaere AI, Waast L, Lacombe B, Groussaud D, Margottin-Goguet F, Ramirez BC, Pique C. 2020. Human T-cell lymphotropic virus type 1 transactivator Tax exploits the XPB subunit of TFIIH during viral transcription. *J Virol* 94:e02171-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.02171-19>.

Editor Viviana Simon, Icahn School of Medicine at Mount Sinai

Copyright © 2020 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Claudine Pique, claudine.pique@inserm.fr.

* Present address: Armelle Inge Tollenaere, Institute of Bioengineering, School of Life Sciences, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), Lausanne, Switzerland; Bertha Cecilia Ramirez, Institute for Integrative Biology of the Cell, CNRS, Université Paris-Saclay, CEA, Gif-Sur-Yvette, France.

Received 26 December 2019

Accepted 29 January 2020

Accepted manuscript posted online 5 February 2020

Published 31 March 2020

ment (4, 5). Indeed, Tax is an oncoprotein able to induce leukemia or lymphoma in transgenic mice (6) as well as immortalization of primary human CD4⁺ T cells *in vitro* (7). Tax is also the transactivator of the viral promoter located in the 5' LTR, thereby controlling its own production as well as that of all sense HTLV-1 transcripts (8).

Transcription is an ordered process that proceeds through multiple stages, including binding of specific transcription factors to the promoter, assembly of the preinitiation complex (PIC), promoter opening and escape, RNA polymerase II (Pol II) pausing, elongation, and termination (reviewed in references 9 and 10). Tax controls the first step by recruiting the specific transcription factor CREB as well as transcription cofactors such as CPB/p300 at viral CREB-response elements (vCRE) located in the U3 region of the 5' LTR (8, 11). This event was initially believed to be the only mechanism by which Tax achieved maximal transcription. However, further data pointed toward additional key roles of Tax on the subsequent steps of transcription (12). Indeed, Tax was also shown to recruit to the LTR the general transcription factors (GTF) TFIIA and TFIID (TBP and TAF28) (13–15), involved in PIC assembly, as well as the elongation factor pTEF-b (16, 17). TFIIF, which ensures transition between preinitiation and elongation, was also suggested to be required for LTR transactivation by Tax in an *in vitro* system (15). However, whether TFIIF subunits interact with Tax and/or are required for viral transcription in HTLV-1-infected T cells remains to be investigated.

TFIIF is a complex playing a dual role in DNA repair and transcription. It consists of five nonenzymatic proteins, the CDK-activating kinase (CAK) (cyclin H, CDK7, and Mat1), and the XPD and XPB enzymes (18). Within TFIIF, the ATPase and translocase xeroderma pigmentosum type B (XPB) plays a key role in transcription (19). XPB acts as a molecular wrench able to melt double-stranded DNA, allowing opening and insertion of the sequence around the transcription start into the active site of Pol II (19–22). The ATPase activity of XPB is critical for the DNA opening while the translocase activity is committed to promoter escape (23–25). The ATPase activity of XPB is carried out by the helicase domain 1 motif I and is regulated by other regions of the protein, notably the helicase domain 1 R-E-D motif (24, 26, 27).

XPB plays a complex role in transcription that has only been clarified recently. Indeed, Alekseev et al. demonstrated that XPB causes a regulatory block during preinitiation, imposed by its translocase/helicase activity, then subsequently relieved by its own ATPase activity (21, 28). Strikingly, this mechanism appears to be dispensable for basal transcription while, in contrast, transcription induced by transretinoic acid or cytokines was shown to be sensitive to XPB downregulation (29, 30). This elucidation of XPB function has been greatly facilitated by the use of a drug, spironolactone (SP), originally described as an aldosterone antagonist and later identified as a compound able to induce rapid degradation of XPB (30). Of note, the ability to induce XPB degradation is not related to aldosterone signaling, since the SP derivative eplerenone (EPL) antagonizes aldosterone signaling like SP but has no impact on XPB (30). Strikingly, SP is believed to induce the degradation of XPB within preformed TFIIF complexes, removing XPB while preserving TFIIF integrity (21, 30). A recent study showing that SP-induced XPB degradation depends on its prior phosphorylation by the other TFIIF subunit CDK7 provides the molecular explanation for this selectivity (31).

In a previous study, we demonstrated that XPB is required for Tat-mediated human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) promoter activation (32). This prompted us to investigate the possibility that XPB could also contribute to HTLV-1 transcription. In this study, we investigated the potential interaction between Tax and XPB as well as the impact of XPB on HTLV-1 promoter transactivation and viral transcription.

RESULTS

XPB binds to Tax. Since Tax was previously shown to interact directly with certain GTFs (13–15), we performed glutathione *S*-transferase (GST) pulldown assays to examine whether it may also interact directly with XPB. GST and GST-Tax proteins purified from bacterial extracts were incubated with recombinant XPB produced by *in vitro* transcription/translation (TnT). A GST protein fused to the HIV-1 capsid protein CAP24

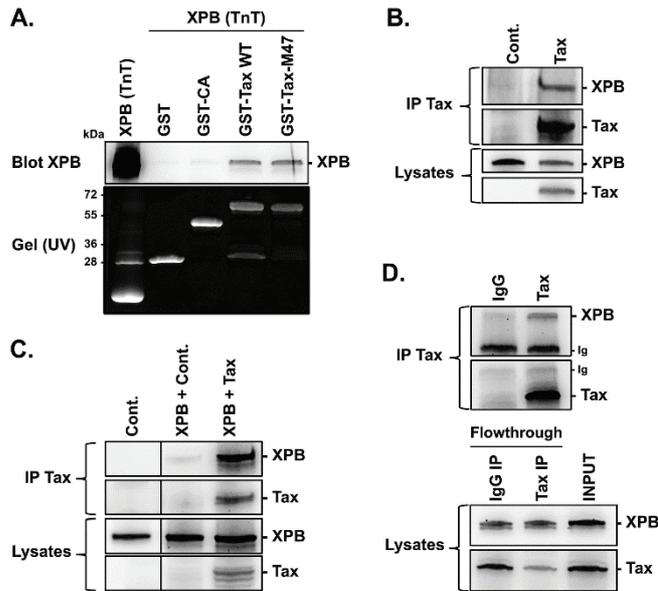


FIG 1 XPB binds to Tax. (A) GST-pulldown assay performed with GST, GST-CA, and GST-Tax (wt and M47 mutant) and *in vitro* transcribed/translated (TnT) XPB. Binding of XPB to the GST constructs was analyzed by immunoblot using an anti-XPB antibody. Protein inputs were determined by taking UV images of the SDS-PAGE gel before transfer. (B) Coimmunoprecipitation of Tax and endogenous XPB in 293T cells. Cells were transfected with a control or Tax plasmid and total proteins prepared 24 h posttransfection were analyzed by immunoblot before (lysates) or after anti-Tax immunoprecipitation (IP Tax). (C) Coimmunoprecipitation of Tax and overexpressed XPB in 293T cells. Cells were cotransfected with a control or XPB plasmid together or not with the Tax plasmid and proteins were analyzed as in (B). (D) Coimmunoprecipitation of endogenous Tax and XPB produced in HTLV-1-transformed C8166 T cells. Immunoprecipitated proteins (IP Tax, upper) or total proteins obtained before (input) or after (flowthrough) IP (lower) were analyzed by immunoblot. Ig, signal corresponding to immunoglobulins used for the IP. Each panel corresponds to one representative experiment out of two or three performed.

(GST-CA) was also used as a specificity control. XPB was pulled-down by GST-Tax but not by either GST or GST-CA (Fig. 1A), demonstrating a direct and specific interaction between Tax and XPB. Interestingly, XPB was also pulled-down by TaxM47, a mutant deficient in HTLV-1 transcriptional activation (33) (Fig. 1A). That XPB binds to Tax *in vitro* in the absence of the LTR and still interacts with TaxM47 suggests that the Tax/XPB interaction does not require assembly of the Tax-dependent transcription complex at the LTR.

Whether Tax and XPB also interact in cells was then investigated by coimmunoprecipitation experiments. Human 293T cells were transfected with a control or Tax expressor (endogenous XPB) or cotransfected with both Tax and XPB plasmids (overexpressed XPB). Immunoprecipitation of Tax allowed recovery of both endogenous (Fig. 1B) and overexpressed XPB (Fig. 1C). The same experiment was repeated in HTLV-1-infected C8166 T cells that endogenously produce Tax and XPB. Anti-Tax antibody precipitated XPB while only background signal was found with control IgG (Fig. 1D).

These data demonstrate that Tax and XPB directly interact, leading to the formation of intracellular Tax/XPB complexes in both overexpressed and endogenous conditions.

XPB is recruited at the proviral LTR. Whether XPB is recruited at the HTLV-1 LTR was examined by chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments conducted in either Tax-positive (C8166) or Tax-negative/low (TL-Om1, MT-1) HTLV-1-transformed T cell lines. TL-Om1 T cells do not express Tax (34), while MT-1 T cells were recently shown to produce Tax only in a fraction of cells and in a transient manner (35). ChIP experiments were also performed on CB-CD4/HTLV-1-immortalized T cells generated upon *in vitro* activation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from a HAM/TSP patient (36). Importantly, CB-CD4/HTLV-1 T cells remain dependent on exogenous IL-2 and present the same Tax or HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) intracellular distributions as fresh PBMC from HAM/TSP patients (37).

Following chromatin immunoprecipitation with a control (IgG) or anti-XPB antibody, recovered DNA fragments were subjected to PCR using primers amplifying the R region of both the 5' and 3' LTRs or the U5 region of the 5' LTR, each located downstream of the transcription start site. The $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (*NFKBIA*) promoter region, at which XPB was shown to be recruited (29), was amplified as a positive control. In addition, the nonrelated α -satellite region was amplified as a negative control.

In both C8166 and CB-CD4/HTLV-1 T cells, XPB recruitment was observed at the R and U5 LTR regions (Fig. 2A). In contrast, no LTR-specific signal (R or U5 region) was detected for either TL-Om1 or MT-1 T cells (Fig. 2B), strongly suggesting that XPB recruitment to the LTR depends on Tax. ChIP experiments were validated by the fact that for all T cell lines, positive XPB signals were found at the $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ promoter but not at the α -satellite region (Fig. 2A and B). Of note, Tax-negative HTLV-1-transformed T cells were shown to maintain permanent NF- κ B activation despite the absence of Tax (38), explaining the positive XPB signal found at the $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ promoter for both TL-Om1 and MT-1 T cells.

If XPB is recruited to the LTR in the course of HTLV-1 transcription, blocking LTR transactivation by Tax should lower the amount of XPB bound to the promoter. To address this hypothesis, we tried to deplete Tax via small interfering RNA (siRNA) in C8166 T cells, but obtained only a small decrease in global Tax levels (data not shown). Instead, we used chaetocin, an HSP90 inhibitor (39), since such inhibitors were previously shown to induce rapid Tax degradation (40). Treating C8166 T cells with chaetocin massively reduced Tax protein levels while having only a minor impact on XPB (Fig. 2C). Levels of total or phospho-CREB Ser133 were also not affected by chaetocin, while the amounts of CBP and p300 were reduced by 40% and 30%, respectively (Fig. 2C). Chaetocin treatment coincided with a statistically significant reduction of the level of XPB bound to the HTLV-1 LTR (Fig. 2D, left). In contrast, XPB was detected at the same level at the $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ promoter (Fig. 2D, right), showing that chaetocin did not prevent XPB recruitment at chromatin in a general manner.

Collectively, these findings show that XPB recruitment at the proviral LTR depends on the transcriptional action of Tax and/or its cofactors.

XPB is involved in Tax-mediated but not basal LTR activation in T cells. To directly assess the role of XPB in LTR activation, luciferase assays were performed in Jurkat T cells. We used an approach described by Elinoff et al., based on XPB overexpression in cells treated with spironolactone (SP) in order to allow rapid XPB degradation (29). Moreover, to discriminate between endogenous and overexpressed XPB, an XPB-GFP construct was used and its impact compared to that of XPD-GFP. Importantly, fusion to green fluorescent protein (GFP) was previously shown to preserve incorporation into TFIIH and activities of both XPB and XPD (31, 41). In addition, we found that XPB-GFP retained the ability to coprecipitate with Tax (Fig. 3B).

Jurkat T cells were transfected with the HTLV-1 U3R-Luc reporter construct and pRL-TK normalization plasmid together with a control (basal) or Tax (transactivation) plasmid and with the XPD-GFP or XPB-GFP expressor, and then treated with dimethyl sulfoxide (DMSO), EPL, or SP for 24 h. Cotransfection with either XPD-GFP or XPB-GFP reduced the level of transfected Tax, presumably due to plasmid competition (Fig. 3A, lower, lanes 13 to 18). However, because the amount of Tax was not limiting in the experiment, this did not lower the level of LTR activation. Neither SP treatment nor XPB-GFP or XPD-GFP overexpression affected basal U3R-Luc activation (Fig. 3A, upper, bars 1 to 9). In contrast, Tax-mediated U3R-Luc activation was increased in the presence of XPB-GFP (Fig. 3A, upper, bars 10 and 16), while XPD-GFP had no effect (bars 10 and 13). Compared to DMSO-treated cells, Tax-mediated LTR activation was reduced by 60% in SP-treated cells (Fig. 3A, upper, bars 10 and 12). The level of transfected Tax was similar in the presence of either DMSO or SP (Fig. 3A, lower, lanes 10 and 12), indicating that SP neither blocked Tax production from a cytomegalovirus (CMV) promoter nor altered Tax stability. Strikingly, while overexpressed XPB-GFP was still sensitive to SP in the absence of Tax (Fig. 3A, lower, lanes 7 and 9), it was no more downregulated upon

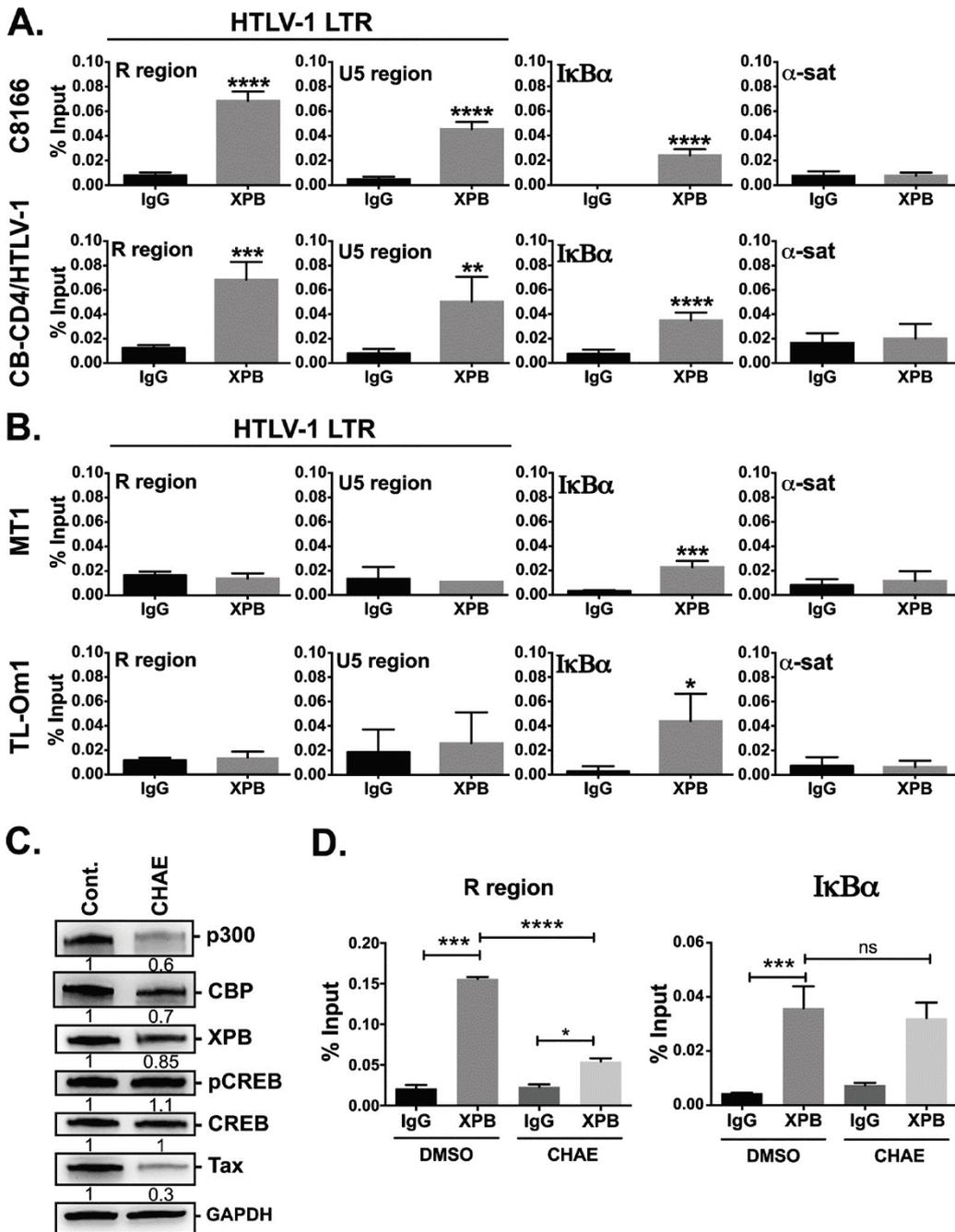


FIG 2 Endogenous XPB is recruited to the proviral LTR in a Tax-dependent manner. (A and B) ChIP experiments to detect XPB recruitment at various genomic loci. Sonicated chromatin prepared for Tax-positive C8166 and CB-CD4/HTLV-1 (A) or Tax-negative/low MT-1 and TL-Om1 HTLV-1-infected T cells (B) were amplified by PCR before (input) or after immunoprecipitation with control IgG or anti-XPB antibody. PCRs were performed using primers specific for the R or the 5' LTR U5 region of the HTLV-1 LTR or for the IκBα promoter (positive control) and the α-satellite regions (negative control). PCR amplification of the chromatin (input) gave positive signals for both R and the 5' LTR U5 regions in the four T cell lines (18 to 22 PCR cycles compared to 37 to 45 for water), confirming that they all carried integrated HTLV-1 genomes. Data correspond to means ± SEM of two independent experiments performed in triplicate. (C) Effect of chaetocin on XPB, Tax, and Tax cofactor expression levels. C8166 T cells were treated with 100 nM chaetocin for 24 h and the levels of endogenous p300, CBP, XPB, CREB, and Tax were analyzed by immunoblots (one representative experiment out of two). (D) Effect of chaetocin treatment on XPB recruitment to either the LTR or the IκBα promoter. ChIP analysis was performed as in (A). Data correspond to means ± SEM of one experiment performed in triplicate out of two. Statistical significance: ns, not significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$.

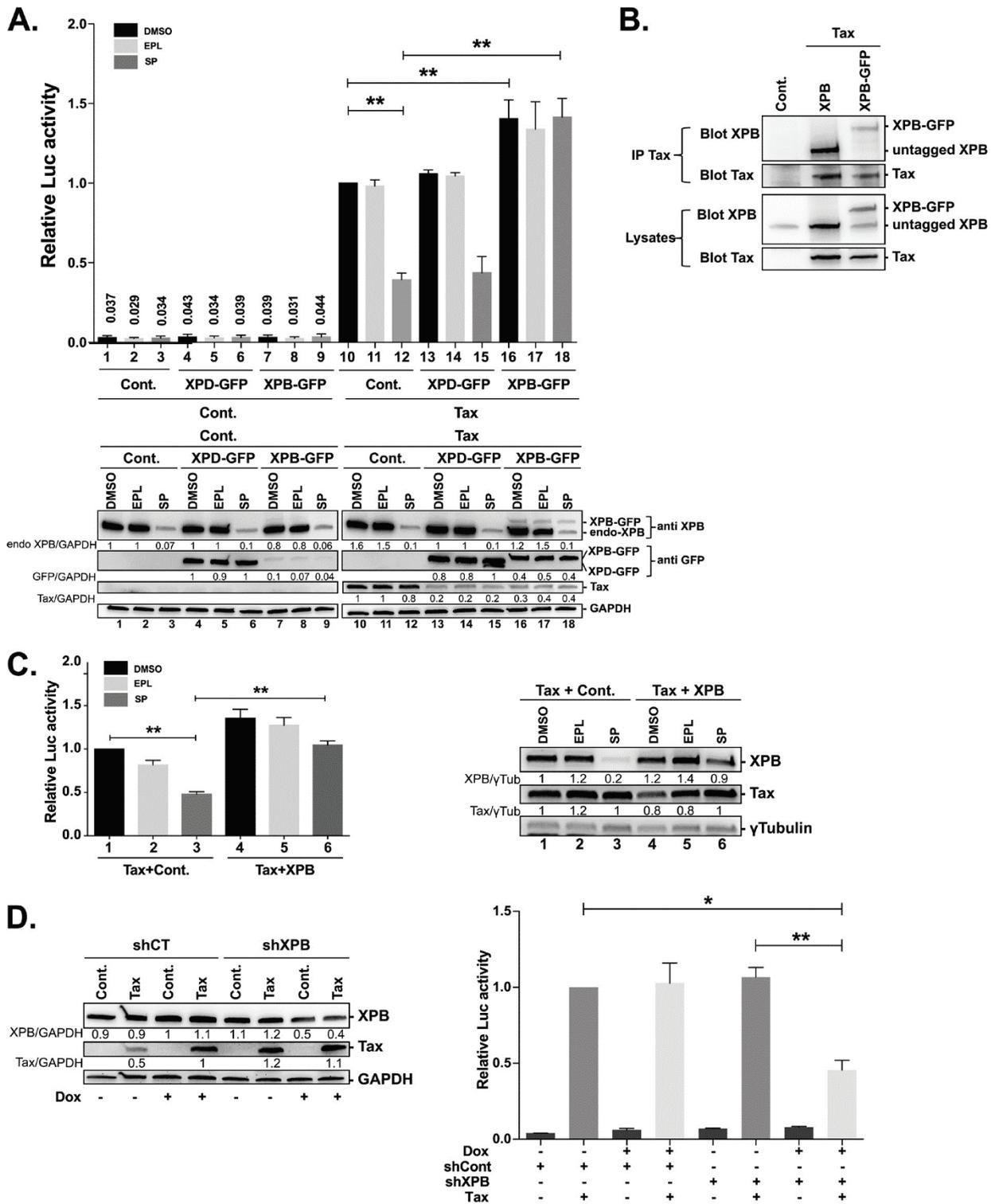


FIG 3 XPB is involved in Tax-mediated LTR activation. (A) Effect of XPB overexpression on HTLV-1 LTR activation in Jurkat T cells. Cells were transfected with the LTR U3R-Luc and pRL-TK reporter plasmids along with the control (basal) or Tax (transactivation) plasmids and with the XPB-GFP or XPD-GFP construct and then treated with DMSO or with EPL or SP at 10 μ M for 24 h. Upper panel: relative luciferase activity calculated by normalizing firefly/renilla ratios to that of DMSO-treated Tax-transfected cells (set to 1). Data are means \pm SEM of three independent experiments performed in duplicate. Lower panel: protein expression levels detected by immunoblots. Level of each band was normalized to the level of DMSO-treated control cells (lane 1). Data are from one representative experiment out of three. (B) XPB-GFP interaction with Tax. Human 293T cells were transfected with a control plasmid or with the Tax plasmid together with a plasmid encoding the untagged or GFP-fused version of XPB. Total (lysates) or anti-Tax immunoprecipitated (IP) proteins were blotted with the anti-XPB or anti-Tax antibody. (C) Effect of untagged XPB overexpression on HTLV-1 LTR activation in Jurkat T cells. Cells were transfected with the LTR U3R-Luc and pRL-TK reporter plasmids along with the Tax and XPB constructs and then treated with DMSO or with EPL or SP at 10 μ M for 24 h. Left panel: relative luciferase activity calculated

(Continued on next page)

SP treatment in Tax-expressing cells (Fig. 3A, lower, lanes 16 and 18). Importantly, this resistance to SP coincided with complete rescue of the inhibitory effect of SP, independently of the Tax level (Fig. 3A, upper, bars 12 and 18). In contrast, no rescue was found for XPD-GFP (bars 12 and 15) despite that XPD-GFP was expressed at a higher level than XPB-GFP (Fig. 3A, lower, lanes 13 and 16). Anti-XPB immunoblotting showed small amounts of XPB-GFP compared to endogenous XPB (Fig. 3A, lower, lanes 16 to 18). This is expected since transfected cells (around 20% of the total population) are diluted by nontransfected cells, leading to underestimation of the level of XPB-GFP. We also noticed that XPB-GFP was barely detected in control cells (Fig. 3A, lower, lanes 7 to 9) while its level strongly increased upon Tax expression. Since higher expression, although less pronounced, was also observed for XPD-GFP cloned in the same vector, this effect may be due to an effect of Tax on the plasmid's promoter. Importantly, overexpressing untagged XPB also compensated the negative effect of SP on Tax-mediated LTR activation (Fig. 3C), indicating that the rescue activity of XPB-GFP is indeed linked to XPB activity.

As a complementary approach to assess the role of XPB, XPB knockdown was performed in Jurkat T cells using a doxycycline-inducible control or an XPB short hairpin RNA (shRNA) vector. After induction (with dox) or not, cells were transfected with the reporter plasmids along or not with the Tax plasmid. XPB was downregulated by 60% in Jurkat-shXPB producing Tax, compared to Jurkat-shCont (Fig. 3D, left). Importantly, this coincided with a 55% reduction in Tax-mediated LTR activation despite that similar levels of transfected Tax were produced in the two conditions (Fig. 3D, right).

All together, these findings show that XPB is required for Tax-induced HTLV-1 LTR activation in both transfected and HTLV-1-infected T cells. In addition, the ability of overexpressed XPB to rescue SP inhibition confirms that SP acts on promoter transactivation in an XPB-dependent manner, which validates this drug as a relevant tool to analyze the impact of XPB downregulation on transcription.

The R-E-D domain of XPB is required for LTR transactivation and endogenous Tax production. To address the role of XPB on transcription from integrated viral genomes, luciferase assays were performed in C8166 T cells that produce Tax endogenously. Presumably because of toxicity of the shXPB, we were unable to efficiently knock down XPB in C8166 T cells. Therefore, we used the SP approach validated in Jurkat T cells. Treating C8166 T cells with SP for 24 h massively reduced the level of XPB but not of the other TFIIH subunits XPD, cdk7, and p62 (Fig. 4A). This coincided with lower Tax production (Fig. 4A), suggesting that XPB downregulation affected viral expression from the proviral LTR. In contrast, SP did not alter expression of total or phospho-CREB, specific protein 1 (Sp1), or CPB/p300, known to modulate Tax-induced or basal LTR activation (42) (Fig. 4A). SP, but not EPL, reduced U3R-Luc transactivation by more than 70% (Fig. 4B, upper, bars 1 and 3). Consistent with data obtained in Tax-positive Jurkat T cells, overexpressed XPB-GFP was not downregulated upon SP treatment (Fig. 4B, lower, lanes 7 and 9) and rescued SP-mediated inhibition of LTR transactivation (Fig. 4B, upper, bars 3 and 9), while no rescue was observed with XPD-GFP (bars 3 and 6).

We then took advantage of rescue by overexpressed XPB to characterize which XPB activity is required for transactivation of the proviral LTR by Tax. XPB contains various functional domains (25). In particular, the R-E-D motif (Fig. 4C, upper) was shown to be required for optimal ATPase activity and promoter opening (26). We then used untagged XPB either as a wild-type (wt) form or carrying one of three mutations: F99S or

FIG 3 Legend (Continued)

by normalizing firefly/renilla ratios to that of DMSO-treated Tax-transfected cells (set to 1). Data are means \pm SEM of three independent experiments performed in duplicate. Right panel: protein expression levels detected by immunoblots. Level of each band was normalized to the level of DMSO-treated Tax-transfected cells (lane 1). Data are from one representative experiment out of two. (D) Effect of XPB knockdown on LTR activation by Tax. RFP positive-sorted Jurkat T cells producing the control of XPB shRNA were induced (dox+) or not (dox-) and transfected with the U3R-Luc and pRL indicator plasmids with or without the Tax plasmid. Left panel: expression of Tax and XPB analyzed by immunoblots. Data correspond to one representative experiment out of three. Right panel: luciferase production. Data are means \pm SEM of three independent experiments performed in duplicate. Statistical significance: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

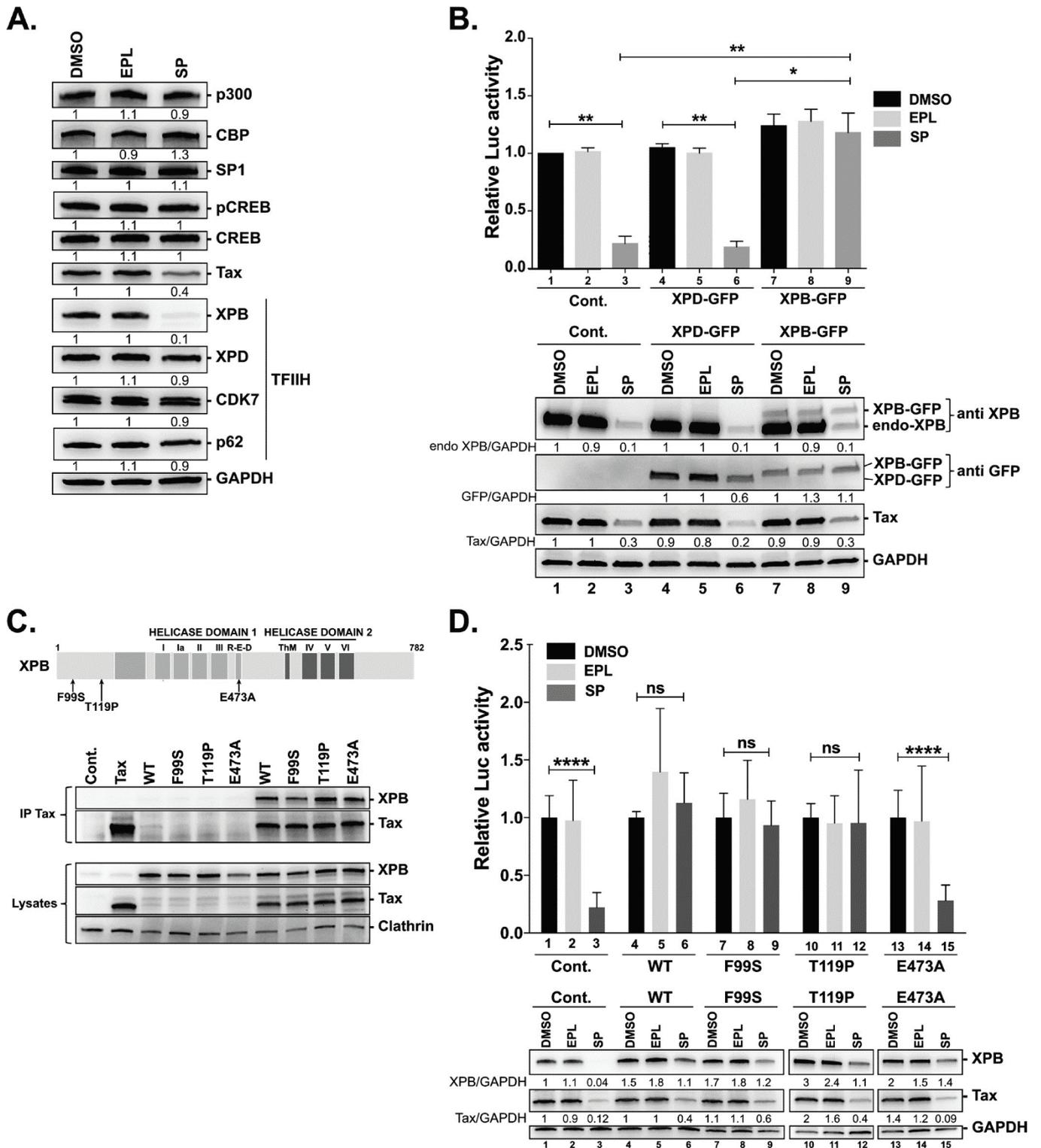


FIG 4 The R-E-D domain of XPB is required for proviral LTR transactivation and endogenous Tax production. (A) Expression levels of LTR-regulating factors or TFIIH components in C8166 T cells treated with SP. (B) Capacity of XPB-GFP or XPD-GFP to rescue SP-mediated inhibition of LTR transactivation or endogenous Tax production. HTLV-1-transformed C8166 T cells were transfected with the LTR U3R-Luc and pRL-TK reporter plasmids and either the XPB-GFP or XPD-GFP construct and were then treated with DMSO or with EPL or SP at 10 μ M for 48 h. Upper panel: relative luciferase activities calculated by normalizing firefly/renilla ratios to that of DMSO-treated control cells (bar 1). Data are means \pm SEM of three independent experiments performed in duplicate. Lower panel: Tax, XPB-GFP, or XPD-GFP expression levels detected by immunoblotting. Data are from one representative experiment out of three. (C) Interaction of Tax with the XPB mutants. Upper panel: schematic representation of the XPB protein and position of the XPB mutations. Lower panel: interaction of Tax with wild-type XPB or XPB mutants. Human 293T cells were cotransfected with one of the XPB constructs along with a control or Tax expressor. Total proteins prepared 24 h posttransfection were analyzed before (lysates) or after the anti-Tax immunoprecipitation (IP Tax). Data correspond to one representative experiment out of (Continued on next page)

T119P that do not perturb transcriptional activity but reduce (F99S) or maintain (T119P) DNA repair activity (27), or the R-E-D motif mutant XPB-E473A. Importantly, these three mutant proteins were previously shown to be properly incorporated within the TFIIH complex (26, 27). Moreover, coimmunoprecipitation experiments performed in cotransfected 293T cells demonstrated that each mutant form remains capable of interacting with Tax (Fig. 4C, lower).

Luciferase assays were then performed in HTLV-1-infected C8166 T cells transfected with the reporter plasmids and one of the XPB constructs in the presence of DMSO, EPL, or SP. A strong reduction in LTR transactivation was found in the SP-treated control cells (Fig. 4D, upper, bar 3). Overexpressing wt XPB, XPB-F99S, or XPB-T119P reversed the effect of SP on LTR activation by Tax (Fig. 4D, upper, bars 6, 9, and 12). In contrast, despite XPB-E473A being capable of increasing the level of total XPB similarly to wt XPB and the two other mutants (Fig. 4D, lower, lane 15), this mutant was unable to rescue LTR transactivation in SP-treated cells (Fig. 4D, upper, bar 15). Immunoblot analysis showed that overexpressing wt XPB, XPB-F99S, or XPB-T119P increased the level of endogenous Tax in SP-treated C8166 T cells (Fig. 4D, lower, lanes 6, 9, and 12). In contrast, no such increase was observed for XPB-E473A (Fig. 4D, lower, compare lane 15 to lane 1).

These results show that the R-E-D domain of XPB, needed for its optimal ATPase activity, is involved in Tax-induced LTR transactivation as well as endogenous Tax production in HTLV-1-infected T cells.

SP-mediated XPB downregulation inhibits viral transcription. We next directly investigated the impact of XPB downregulation on HTLV-1 mRNA production by reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR) experiments. C8166 and MT-4 HTLV-1-transformed T cells, as well as CB-CD4/HTLV-1-immortalized T cells, were treated with DMSO, SP, or EPL for 24 h. Of note, C8166 T cells exhibit a defect in viral RNA export and therefore do not produce Gag proteins but still generate Gag at the mRNA level (43). In C8166 T cells, SP treatment inhibited the production of Gag (Fig. 5A, upper). Tax mRNA production was also reduced in the presence of SP, confirming immunoblot data (see Fig. 4A). In MT-4 T cells, Tax and Gag production were also reduced at both the mRNA and protein levels in the presence of SP (Fig. 5A, middle). Of note is that lower production of Tax and Gag mRNA upon SP treatment was also found in CB-CD4/HTLV-1 T cells (Fig. 5A, lower). Consistent with a recent study (37), we found the level of Tax produced in CB-CD4/HTLV-1 T cells was quite low, preventing us from assessing the effect of SP on the Tax protein level in these cells.

To further study the link between XPB and HTLV-1 RNA production, the level of HTLV-1 Gag mRNA was quantified in the course of SP treatment. C8166 T cells were treated with DMSO, EPL, or SP up to 6 h. In agreement with previous data (30), a decrease in XPB levels can already be seen 30 min posttreatment, with a maximal reduction at 120 min (Fig. 5B). Reduction of Gag mRNA was already apparent at 30 min (Fig. 5C, left), coinciding with the beginning of XPB downregulation (Fig. 5B). Moreover, a solid positive correlation was found between the level of Gag mRNA and the amount of XPB protein over the course of SP treatment (Fig. 5C, right). Importantly, no significant variation in the level of HPRT or EEF1G housekeeping gene mRNAs was observed (Fig. 5D), confirming that SP does not act as a general inhibitor of Pol II-mediated transcription.

SP-mediated XPB downregulation inhibits growth of Tax-positive HTLV-1-infected T cells. We at last studied the effect of XPB downregulation on the growth of HTLV-1-infected T cells. Cells were treated every day with DMSO or with EPL or SP and

FIG 4 Legend (Continued)

two. (D) Capacity of wt or mutated XPB proteins to rescue SP-mediated inhibition of LTR transactivation or endogenous Tax production. HTLV-1-transformed C8166 T cells were transfected with the LTR U3R-Luc and pRL-TK reporter plasmids and one of the XPB constructs and were then treated with DMSO or with EPL or SP at 10 μ M for 48 h. Upper panel: relative luciferase activity calculated by normalizing firefly/renilla ratios to that of DMSO-treated control cells (bar 1). Data are means \pm SEM of five independent experiments performed in duplicate. Lower panel: Tax and XPB expression levels detected by immunoblotting. Data are from one representative experiment out of three. Statistical significance: ns, not significant; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ****, $P < 0.0001$.

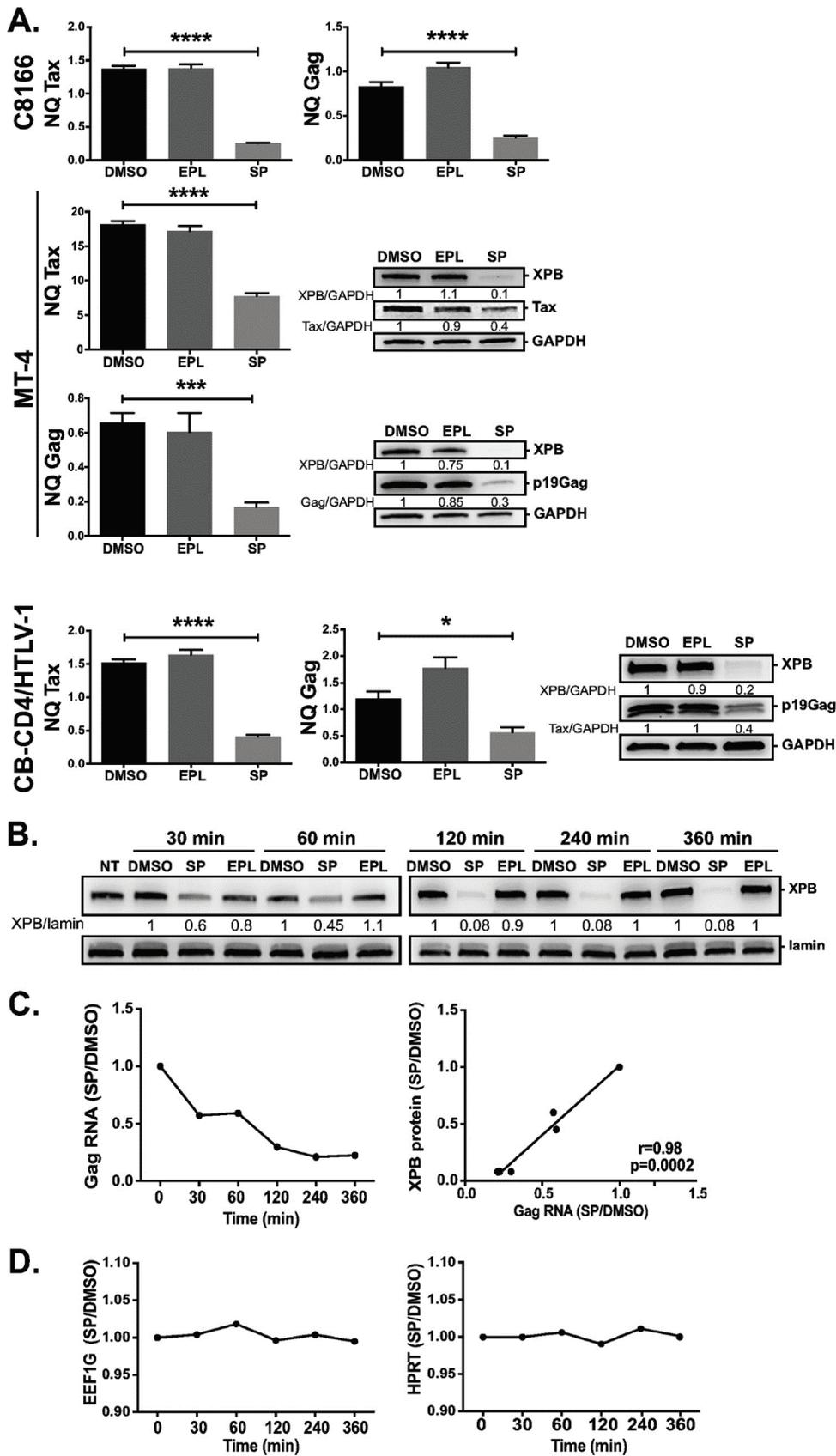


FIG 5 XPB downregulation inhibits viral transcription. (A) C8166 and MT-4 HTLV-1-transformed T cells or HTLV-1-immortalized CB-CD4/HTLV-1 T cells were treated with DMSO or with SP or EPL at 10 μ M for 24 h. The level
(Continued on next page)

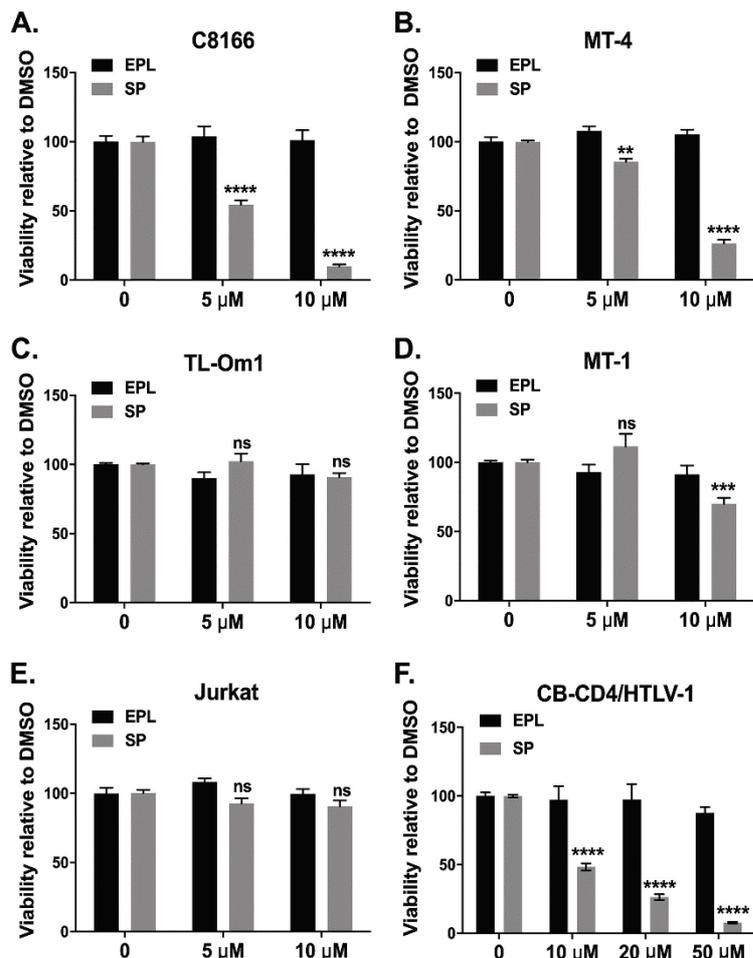


FIG 6 XPB downregulation reduces viability of Tax-positive HTLV-1-infected T cells. C8166 (A), MT-4 (B), TL-Om1 (C), MT-1 (D), Jurkat transformed T cells (E), and HTLV-1 immortalized CB-CD4/HTLV-1 cells (F) were treated every day with DMSO (0) or with EPL or SP at the indicated concentrations and cell viability was determined by the MTT method after 3 days of culture. The viability values for SP or EPL were normalized to that of DMSO-treated cells (set as 100%). For each cell line, viability results correspond to two independent experiments performed in triplicate. Ns, not significant; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$, ****, $P < 0.0001$.

the number of living cells were quantified by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method after 72 h of culture. Compared to DMSO and EPL, SP reduced the viability of C8166 (Fig. 6A) and MT-4 (Fig. 6B) T cells in a dose-dependent manner. The same treatments were applied on Tax-negative/low HTLV-1-infected T cells (MT-1, TL-Om1) and uninfected T cells (Jurkat). Neither SP nor EPL impacted viability of TL-Om1 (Fig. 6C) or Jurkat (Fig. 6E) T cells. Interestingly, SP at

FIG 5 Legend (Continued)

of Gag or Tax mRNA was quantified by RT-qPCR and normalized to the level of housekeeping genes (NQ). For MT-4 and CB-CD4/HTLV-1 T cells, the level of Gag protein (p19) was also analyzed by immunoblotting. Data correspond to one representative experiment out of two or three. (B) Time-course experiment to quantify the level of Gag mRNA over the course of SP treatment. C8166 T cells were either untreated (NT) or treated with DMSO or with SP or EPL at 10 μM. The level of XPB was analyzed at indicated times by immunoblotting in half of the cells. At each time point, the intensity of the XPB signal in EPL- or SP-treated cells was compared to that of DMSO-treated cells (set to 1). Data correspond to one representative experiment out of three. (C) The other half of the cells was used to quantify the level of Gag mRNA. Left panel shows the SP/DMSO ratios calculated from the level of RNA normalized to the level of housekeeping genes (NQ). Right panel shows the correlation between the level of XPB protein quantified from (B) and the SP/DMSO ratios shown in the left panel. (D) Effect of SP on the levels of housekeeping gene mRNAs. Data show the SP/DMSO ratios for *EEF1G* or *HPRT* calculated from relative quantities using the formula: $Q = 2^{-\Delta C_P}$. Data correspond to one representative experiment performed in triplicate out of three. Statistical significance: *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$.

10 μ M slightly decreased viability of MT-1 T cells (Fig. 6D), in agreement with the transient expression of Tax by this cell line (35). Importantly, SP treatment also reduced viability of CB-CD4/HTLV-1 T cells in a dose-dependent manner (Fig. 6F), demonstrating that its cytotoxic effect also occurred for HTLV-1-immortalized primary T cells.

These data show that the effect of XPB downregulation on HTLV-1 RNA production translates into inhibition of proliferation of Tax-positive HTLV-1-infected T cells, reinforcing the link between XPB and Tax expression.

DISCUSSION

As emphasized in recent reviews, HTLV-1 is considered the most potent cancer-associated virus and still remains a significant threat to human health (44, 45). Deciphering the mechanisms by which the HTLV-1 transactivator Tax regulates HTLV-1 gene expression is therefore a central issue for both fundamental and therapeutic aspects. In this study, we describe a novel physical and functional interaction between Tax and the XPB subunit of the general transcription factor TFIIH.

First, we showed that GST-Tax is able to pull down *in vitro*-synthesized XPB, proving a direct interaction. That Tax produced in bacteria interacts with XPB also strongly suggests that the posttranslational modifications of Tax are not required for XPB binding. Similar data were obtained for TBP, TFIIA, and the cdk9 subunit of pTEFb (13, 16, 46), suggesting that the same unmodified Tax form may associate with the preinitiation and elongation complexes. In addition, we documented that Tax coprecipitates with endogenous XPB in 293T cells as well as in HTLV-1-infected T cells. Next, we showed that endogenous XPB is bound to the HTLV-1 LTR in Tax-positive but not Tax-negative HTLV-1-transformed T cells, suggesting that XPB recruitment to the LTR depends on Tax. Importantly, XPB recruitment at the LTR was also observed in HTLV-1-immortalized T cells generated from PBMC from a HAM/TSP patient. The requirement of Tax-mediated LTR transcription for XPB recruitment at the LTR was further documented by data showing that inducing degradation of Tax and/or its transcriptional cofactors upon chaetocin treatment significantly reduced the amount of XPB bound to the LTR. Of note, we checked that chaetocin treatment used to induce Tax degradation has only little impact on XPB production. Furthermore, chaetocin did not prevent XPB recruitment at a cellular promoter, showing that XPB functionality was preserved. All together, these data provide direct evidence that XPB is a novel direct partner of Tax recruited at the LTR of integrated viral genomes during active transcription in both HTLV-1-transformed T cells and *in vivo*-infected T cells.

To explore the impact of XPB on HTLV-1 transcription, we took advantage of the ability of spironolactone (SP) to induce XPB degradation. Indeed, as previously shown by Alekseev et al. (30) and confirmed in this study, SP is a very effective tool to manipulate XPB as it induces almost complete XPB downregulation in less than 2 h. Moreover, the effect of SP can be compared to that of the SP derivative eplerenone (EPL), which blocks aldosterone binding to the mineralocorticoid receptor in the same way as does SP but does not induce XPB degradation (30, 32). We found that inducing XPB degradation using SP significantly reduced Tax-mediated LTR transactivation in Jurkat T cells with no impact on Tax stability. SP-mediated XPB downregulation also inhibits LTR transactivation by endogenous Tax in HTLV-1-transformed T cells, while the levels of Tax cofactors or other TFIIH subunits were not affected. Importantly, no significant change in Tax-mediated LTR transactivation was observed upon treatment with EPL, arguing against a role of aldosterone signaling modulation in LTR inhibition. To further substantiate the role of XPB, we examined the impact of shRNA-mediated depletion of XPB on Tax-induced LTR activation. Of note, as pointed out in reference 21, si/shRNAs are not considered an adequate tool to study the role of XPB in transcription. The reason is that XPB is a core subunit of TFIIH (47), such that blocking XPB production by si/shRNA alters TFIIH assembly. This is not observed with SP since this drug targets XPB proteins already incorporated within TFIIH (31), allowing the study of XPB-minus TFIIH complexes. We nevertheless studied the effect of an shRNA directed to XPB using an inducible vector and found that, compared to the control shRNA, XPB shRNA

significantly reduces Tax-mediated U3R-Luc activation in T cells, confirming the role of TFIIH/XPB in transactivation of the HTLV-1 LTR.

Further strong evidence for a key role of XPB in HTLV-1 LTR activation came from rescue experiments. Indeed, overexpressing an XPB-GFP protein is sufficient to reverse the negative effect of SP on Tax-induced LTR transactivation in either transfected Jurkat T cells or HTLV-1-infected C8166 T cells. Importantly, rescue was not observed with overexpressed XPD-GFP, underlying the specific role of XPB. Complete rescue was also found when untagged XPB was overexpressed, ruling out a role of the GFP fusion in the rescue property of XPB-GFP. Interestingly, we found that XPB-GFP and untagged XPB were, respectively, no more (Fig. 3A) or less (Fig. 3C) degraded upon SP treatment in the presence of Tax. Of note, both untagged XPB and XPB-GFP were still downregulated upon SP treatment in the absence of Tax, even though XPB-GFP appears less sensitive than the untagged form, as previously observed (30). In contrast, we observed that XPB is properly degraded by SP in HTLV-1-infected T cells that express Tax (Fig. 4 and 5). Therefore, Tax appears to protect overexpressed but not endogenous XPB from SP-induced degradation. Since transfection results in a high level of expression per cell and since Tax increased XPB-GFP production from the plasmid, this resistance to degradation could be due to an improper ratio between overexpressed XPB and the cellular proteins mediating SP-induced XPB degradation. Whatever the mechanism involved, SP resistance in the presence of Tax provides the molecular explanation for the ability of overexpressed XPB and XPB-GFP to rescue inhibition of Tax-induced LTR activation by SP.

The rescue property of overexpressed XPB also gave us the opportunity to identify the domain of XPB involved in Tax-mediated HTLV-1 transcription. We found that wild-type XPB and two XPB mutants defective for DNA repair but retaining transcriptional activity, fully compensated SP-mediated XPB downregulation in C8166 T cells. In contrast, no compensation was achieved with a mutant bearing a mutation in the R-E-D domain regulating XPB ATPase activity (26). This strongly suggests that the ATPase-dependent activity of XPB, necessary for the promoter opening activity, is indeed the one cooperating with Tax during HTLV-1 transcription.

Importantly, we also provide evidence that inducing XPB degradation had major consequences on viral RNA expression and the viability of HTLV-1-infected T cells. Indeed, we showed that SP reduces the production of HTLV-1 Gag and Tax mRNA and there is a solid correlation between the level of Gag mRNA and the level of XPB. Moreover, we found that compared to EPL, SP inhibits the proliferation of both HTLV-1-transformed and HTLV-1-immortalized T cells, proving that the effect of XPB downregulation is not restricted to HTLV-1-transformed T cell lines. In contrast, SP had no effect on either uninfected T cells or Tax-negative HTLV-1-infected T cells. This reinforces the functional link between XPB and Tax and confirms the key role of Tax in the survival of Tax-positive HTLV-1-infected T cells (48). These findings also reveal that via its ability to downregulate XPB, SP is a potent inhibitor of Tax-induced HTLV-1 gene expression as well as Tax-driven T cell proliferation.

Since XPB belongs to a complex of general transcription factors, one could assume that its downregulation would block transcription in a general manner. However, the role of XPB is more complex. Indeed, while XPB appears to be dispensable for basal transcription, it is required for transcription induced by certain stimuli. In good agreement with this, TFIIH was shown to be at least partially dispensable in the case of promoters with preformed transcription bubbles (49), while the promoter-opening step, controlled by XPB, is considered an important regulatory step for inducible promoters (50). We found here that SP-mediated degradation of XPB impacts Tax-mediated but not basal HTLV-1-LTR activity in Jurkat T cells. Noteworthy, we previously reported that SP inhibits Tat-dependent but not basal transcription of the HIV-1 LTR (32). Our data therefore provide new evidence for a role of XPB in inducible viral transcription by showing that XPB is also involved in HTLV-1 RNA production.

Our demonstration that Tax interacts with XPB raises the issue of whether XPB could

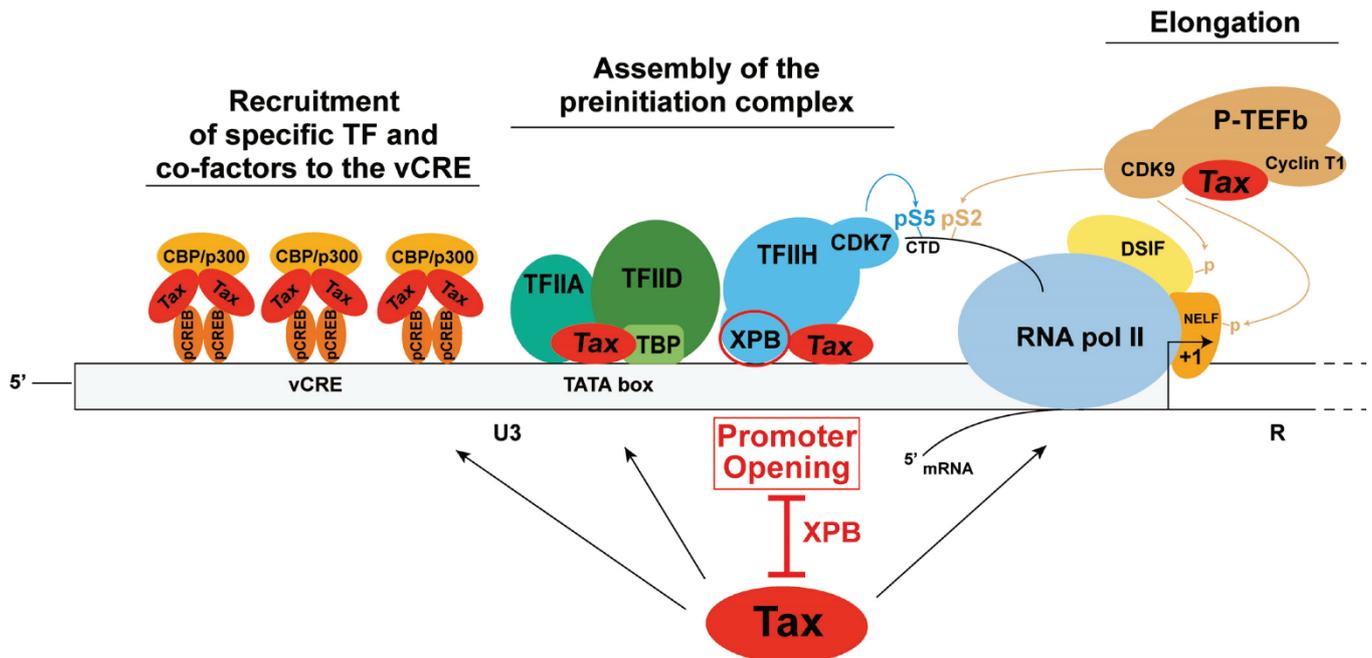


FIG 7 Model illustrating the capacity of Tax to target essential steps of the Pol II-mediated transcription process, including the promoter-opening step controlled by the XPB subunit of TFIIH.

also directly interact with Tat to accomplish its function on the HIV-1 LTR promoter. In this line, it would also be of interest to study the recruitment of XPB to the HIV-1 LTR sequence. Both HIV-1 Tat (51) and HTLV-1 Tax (16) interact with pTEF-b but, in contrast to Tat, Tax is able as well to recruit TFIIA and TFIID to the promoter. These findings, along with our present data, support a model in which Tax not only recruits specific transcription factors to the promoter but also controls subsequent steps of the transcription process by successively recruiting at least one subunit of each GTF complex acting together with RNA Pol II (Fig. 7). This provides another example of the powerful ability of Tax to manipulate cellular machineries.

In conclusion, this study demonstrates that XPB is a member of the Tax-dependent transcription complexes assembled at the HTLV-1 LTR in the course of viral transcription. Our data also suggest that the promoter-opening step of transcription plays a key role in HTLV-1 gene expression. These findings provide new insights on the molecular players governing HTLV-1 transcription and may open new avenues of research for the development of therapeutic interventions targeting HTLV-1 transcription.

MATERIALS AND METHODS

Cells and transfection. HEK-293T (American Type Culture Collection number CRL-3216) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum (Dutcher), 2 mM glutamine, 1 mM pyruvate, and antibiotics (Invitrogen) and were transfected using the phosphate calcium procedure. CD4⁺ Jurkat T-cells (kindly provided by S. Emiliani, Institut Cochin, France) were grown in RPMI 1640 medium supplemented as above. The HTLV-1-infected CD4⁺ T cell lines C8166 and MT-4 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, USA), TL-Om1, and MT-1 (kindly provided by Edward Harhaj, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, USA) were grown in supplemented RPMI 1640 containing also 25 mM glucose, 20 mM HEPES, and 5 ml of 100× nonessential amino acid solution (Invitrogen). T cell lines were transfected using the DMRIE-C reagent (Roche). HTLV-1-immortalized CB-CD4/HTLV-1 T cells generated from peripheral blood mononuclear cells of a TSP/HAM patient have been described (36). These cells were grown in supplemented RPMI medium in the presence of 50 U/ml of IL-2 (Roche).

Plasmids. The pSG5M empty vector and the pSG5M-Tax plasmids have been described (52). The pGEX-2T and pGEX-2T-Tax (wt and m47) plasmids were kindly provided by V. Mocquet (ENS, Lyon, France) and the pGEX-2T-p24 (GST-CA) was previously described (53). The U3R-Luc (Firefly) plasmid was kindly provided by A. Kress (Institute of Clinical and Molecular Virology, Erlangen, Germany). The normalization plasmid pRL-TK (Renilla) was obtained from Promega. The pTRIPZ-shRNA control and pTRIPZ-shRNA ERCC3/XPB (RHS4696-200709382) constructs harboring a doxycycline-inducible promoter

driving both RFP and shRNA expression were obtained from Horizon. The pEGFP-N2-XPB (XPD-GFP) and pEGFP-N1-XPB (XPB-GFP) constructs (54, 55) were kindly provided by W. Vermeulen (ERASMUS MC, Rotterdam, The Netherlands). To generate the pcDNA3-XPB plasmid, human XPB cDNA was cloned from total RNA extracted from Jurkat T cells by using the RNeasy minikit (Qiagen). One μg of total RNA was subjected to reverse transcription using the Maxima reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific). PCR amplification was performed on a fraction of RT products with the high fidelity Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) using the oligonucleotides XPB-BamHI Fw (5'-GCGCCTCGAGGATCCACCATGGGCAAAGAGACCGAGGC-3') and XPB NheI Rev (5'-GCGCACGCGTGCGGCCGCTAGCTCATTTCTAAAGCGCTTGAAG-3'). Products were then cloned into the pCR-Blunt II-TOPO vector (Invitrogen). The XPB insert was then digested with BamHI and NheI and cloned into the pcDNA3 vector (Invitrogen). XPB mutagenesis was performed on the pcDNA3-XPB plasmid by PCR amplification with the high fidelity proofreading Pfu Turbo DNA polymerase (Stratagene) using primers as follows: F99S (forward 5'-CAAATATGCCCAAGACTCCTTGTTGGTATTGC-3' and reverse 5'-GCAATA GCCA CCAAGGAGTCTTGGGCATATTTG-3'); T119P (forward 5'-CATGAGTACAACTA CCTGCCTACTCCTTG-3' and reverse 5'-CAAGGAGTAGGCAGGTAGTTGTAATCATG-3'); E473A (forward 5'-GCGACCCCTGTCCGCGCAATGACAAAATTGTG-3' and reverse 5'-CACAAATTTGT CATCTGCGCGGA CGAGGTCGC-3'). Sequencing of the wt and mutated plasmids showed that the XPB ORF was identical in each cDNA except for the presence of the introduced mutation.

Antibodies and reagents. The anti-XPB monoclonal antibody from Novusbio (NB10061060) was used for ChIP experiments. The other primary antibodies used in immunoblots were as follows: anti-p300 (Bethyl Laboratories, A300-358A); anti-CBP (Invitrogen, PA5-27369); anti-XPD (Cell Signaling, 11963); anti-p62 (Invitrogen, PA5-83832); anti-CDK7 (Bethyl Laboratories, A700-006-T); anti-XPB (Santa Cruz, s19); anti-CREB (Sigma-Aldrich, 17-600); anti-phospho-CREB-Ser133 (Millipore, CS 204400); anti-Sp1 (Abcam ab13370); anti-GAPDH (Santa Cruz, sc32233); anti- γ -tubulin (Abcam ab16504); anti-lamin A/C (Cell signaling, 20325); anti-clathrin (SCBT, sc-12734); and anti-IgG rabbit (Millipore PP64B). Horse radish peroxidase (HRP)-conjugated anti-human, anti-mouse, and anti-rabbit IgG (Promega) were used as secondary antibodies. Spirolactone (SP), eplerenone (EPL), and chaetocin (all from Sigma) were diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) as 10 mM stock solutions.

XPB knockdown. Stable shRNA transfectants were generated by transfecting Jurkat T cells (2×10^6 cells in 6-well plates) with 4 μg of inducible pTRIPZ-RFP-shRNA constructs. After 48 h, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of puromycin was added to the medium to select transfected cells. Puromycin-resistant cells were then treated with doxycycline (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 3 days and RFP-positive cells were sorted using a MoFlo Astrios sorter.

Luciferase assays. T cells ($3 \times 10^5/24$ well in duplicate) were cotransfected using the DMRIE-C reagent (Roche) with 100 ng of the U3R-Luc plasmid, 10 ng of pRL-TK, and 250 ng of the control, Tax, or XPB plasmid/well. After 48 h, cells were lysed in 100 μl of passive lysis buffer (Promega). Luciferase activities were quantified using the dual luciferase assay system (Promega) and firefly activity values were normalized to that of renilla activity.

GST pulldown. GST proteins were produced using BL21-DE3 *Escherichia coli* cells (Promega) transformed with the pGEX plasmids and induced with isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, 0.1 mM) at 20°C overnight. Bacteria pellets corresponding to 500 ml of culture were incubated with 10 ml of lysis buffer (Tris HCl 50 mM pH 7.5; KCl 150 mM; Triton 10%) and then sonicated (30 sec ON/30 sec OFF; amplitude 70%) during 5 min. Lysates were then incubated for 2 h at 4°C with 200 μl of dry glutathione sepharose 4B beads (GE Healthcare) in 20 ml reaction volume and beads were washed 3 times with cold binding buffer (Tris HCl 50 mM pH 7.4; EDTA 1 mM; NaCl 250 mM; NP-40 0.1%). XPB was synthesized *in vitro* from the pcDNA3-XPB plasmid using the T7-TnT coupled reticulocyte lysate system (Promega). TnT reaction mixtures (15 μl) were incubated with 10 μg of GST-fusion protein for 1 h at room temperature. Beads were then washed 5 times with cold binding buffer before elution with 50 μl of elution buffer (0.3 M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 20% glycerol, 0.04% bromophenol blue, and dithiothreitol [DTT] 100 mM) and proteins resolved by SDS-PAGE were analyzed by immunoblotting. UV images of the gels were taken before transfer to determine the inputs.

Immunoprecipitation and immunoblotting. Human 293T cells (1.5×10^6 cells in a 10-cm dish) were transfected with 6 μg of the control, Tax, or XPB plasmid and lysed 48 h posttransfection. Transfected 293T cells or C8166 T cells (5×10^6) were lysed in 500 μl of radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, and 150 mM NaCl) supplemented with protease inhibitor and benzonase nuclease (Sigma). The lysates (500 μg) were incubated overnight with 3 μg of primary antibodies at 4°C and 10 μg of the lysates were used for Western blot analysis. Immunocomplexes were then captured on protein A/G-agarose beads (Thermo-scientific 20421) 1 h at 4°C. Beads were then washed 5 times in wash buffer (120 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8, 0.2 mM NaF, 0.2 mM EGTA, 0.2% deoxycholate, 0.5% NP-40) before elution in 50 μl of Laemmli buffer (0.3 M Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 20% glycerol, 0.04% bromophenol blue, DTT 100 mM). Immunoprecipitated proteins or total cell lysates were separated on 4 to 15% SDS-PAGE precast gels (Bio-Rad), transferred to nitrocellulose membranes (0.45 μm), and blotted with specific antibodies. Images were acquired using a Fusion Fx camera (Vilber Lourmat). Band quantification was performed with the Image J software after subtraction of the background.

RNA extraction and RT-qPCR. Total RNAs were prepared with the Nucleospin RNAi kit (Macherey-Nagel, France) and 1 μg was reverse transcribed using the Maxima first strand cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific, France). Real-time PCR were performed on 1/10 of the reverse transcription reaction. HTLV-1 genomic RNA (gRNA) and housekeeping control RNAs were amplified using the Sybr green reagent (Roche) with the following primers: unspliced Gag mRNA (region 2,036 to 2,224, forward

5'-CAGAGGAAGATGCCCTCTATT-3' and reverse 5'-GTCAACCTGGGCTTTAATTACG-3'); EEF1G (forward 5'-AGATGGCCAGTTTGATGCTAA-3' and reverse 5'-GCTTCTCTCCCGTGAACCCT-3'); HPRT (forward 5'-T GACTGTCGCAAAACAATGCA-3' and reverse 5'-GGTCTTTTCACCAGCAAGCT). Tax mRNA was quantified using the TaqMan method using the primers forward 5'-ATCCCGTGGAGACTCCTCAA-3' and reverse 5'-GGATACCCAGTCTACGTGTTGG-3' and a probe encompassing the spliced junction 5'-TCCAACACCA TGGCCCACTTCCC-3'. PCR conditions were as followed: preincubation 95° 5 min; amplification (45 cycles); denaturation 95° 10 sec; annealing 60° 20 sec; extension 72° 10 sec; acquisition, melting curve, cooling. The normalized quantity (NQ) of each mRNA was determined by normalizing their level to that of the housekeeping genes EEF1G and HPRT according to the following formula: $NQ = 2^{-((cp - ((cp_{EEF1G} + cp_{HPRT})/2))}$.

ChIP experiments. Before the experiment, 10^7 cells were cross-linked using 1.1% formaldehyde (Electron Microscopy Sciences) for 8 min at room temperature. Chromatin was then sheared using a Bioruptor Pico sonicator (Diagenode) to obtain fragments of around 300 bp. Immunoprecipitations were performed using the ChIP-IT high sensitivity kit (Active motif) on 10 μ g of chromatin using 4 μ g of specific or control antibodies and 10% of chromatin was kept for inputs. qPCR was conducted with the following primers: α -sat (forward 5'-CTGCACTACTGAAGAGGAC-3' and reverse 5'-GATGGTTCAACACTC TTACA-3'); I κ B α (SimpleChIP human I κ B α promoter primers number 5552, Cell Signaling Technology); LTR R region (forward 5'-CGCATCTCTCCTCAGCGC-3' and reverse 5'-CGGTCTCGACTGAG-3'); or LTR U5-Gag region (forward 5'-GACAGCCATCCTATAGCACTC-3' and reverse 5'-CTAGCGCTACGGG AAAAGATT-3').

Cell viability assays. Cell viability was quantified by measuring the rate of mitochondrial reduction of yellow tetrazolium salt MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma) to insoluble purple crystals. Cells were cultured for 72 h with DMSO, EPL, or SP and MTT solution (25 μ l of a solution at 5 mg/ml) was added to each well for 2 h. The supernatant was then removed and 50 μ l of DMSO added to dissolve formazan crystal. Optical densities (OD) were measured at 590 nm with a Tecan infinite Pro 2000 spectrophotometer.

Statistical analysis. Statistical analyses were conducted with the GraphPad Prism 6 software. Two-group comparison was done using the paired *t* test and multiple-group analysis with the one-way ANOVA Tukey's multiple-comparison test. Correlation analysis was done using the Pearson test. Statistical significance was defined for *P* values < 0.05.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the AIDS Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH, for HTLV-1-infected T cell lines and A. Kress, W. Vermeulen, and V. Mocquet for the plasmids. We also thank the staff of the genomic (GENOM'IC) and cytometry (CYBIO) facilities of the Cochin Institute for their expertise.

This work was supported by grants from the Ligue contre le Cancer (Comité Ile de France; <https://www.ligue-cancer.net/cd75>) and from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM; grant number DEQ20140329528 awarded to F.M.-G.; <https://www.frm.org/>). C.M. and A.I.T. were recipients of Ph.D. grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (<https://www.ligue-cancer.net>) or from the Université Paris Descartes (<https://www.parisdescartes.fr/>) and the Fondation ARC (<https://www.fondationarc.org/>), respectively. The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

REFERENCES

- Hermine O, Ramos JC, Tobinai K. 2018. A review of new findings in adult T-cell leukemia-lymphoma: a focus on current and emerging treatment strategies. *Adv Ther* 35:135–152. <https://doi.org/10.1007/s12325-018-0658-4>.
- Panfil AR, Martinez MP, Ratner L, Green PL. 2016. Human T-cell leukemia virus-associated malignancy. *Curr Opin Virol* 20:40–46. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.08.009>.
- Bangham CR, Araujo A, Yamano Y, Taylor GP. 2015. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Nat Rev Dis Primers* 1:15012. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.12>.
- Currer R, Van Duyn R, Jaworski E, Guendel I, Sampey G, Das R, Narayanan A, Kashanchi F. 2012. HTLV tax: a fascinating multifunctional co-regulator of viral and cellular pathways. *Front Microbiol* 3:406. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00406>.
- Kfoury Y, Nasr R, Journo C, Mahieux R, Pique C, Bazarbachi A. 2012. The multifaceted oncoprotein Tax: subcellular localization, posttranslational modifications, and NF-kappaB activation. *Adv Cancer Res* 113:85–120. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394280-7.00003-8>.
- Hasegawa H, Sawa H, Lewis MJ, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, Ichinohe T, Tsunetsugu-Yokota Y, Katano H, Takahashi H, Matsuda J, Sata T, Kurata T, Nagashima K, Hall WW. 2006. Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat Med* 12:466–472. <https://doi.org/10.1038/nm1389>.
- Bellon M, Baydoun HH, Yao Y, Nicot C. 2010. HTLV-I Tax-dependent and -independent events associated with immortalization of human primary T lymphocytes. *Blood* 115:2441–2448. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-241117>.
- Nyborg JK, Egan D, Sharma N. 2010. The HTLV-1 Tax protein: revealing mechanisms of transcriptional activation through histone acetylation and nucleosome disassembly. *Biochim Biophys Acta* 1799:266–274. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2009.09.002>.
- Chen FX, Smith ER, Shilatfard A. 2018. Born to run: control of transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:464–478. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0010-5>.
- Nogales E, Louder RK, He Y. 2017. Structural insights into the eukaryotic transcription initiation machinery. *Annu Rev Biophys* 46:59–83. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070816-033751>.
- Lemasson I, Polakowski NJ, Laybourn PJ, Nyborg JK. 2002. Transcription factor binding and histone modifications on the integrated proviral promoter in human T-cell leukemia virus-I-infected T-cells. *J Biol Chem* 277:49459–49465. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209566200>.
- de la Fuente C, Kashanchi F. 2004. The expanding role of Tax in

- transcription. *Retrovirology* 1:19. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-1-19>.
13. Clemens KE, Piras G, Radonovich MF, Choi KS, Duvall JF, DeJong J, Roeder R, Brady JN. 1996. Interaction of the human T-cell lymphotropic virus type 1 tax transactivator with transcription factor IIA. *Mol Cell Biol* 16:4656–4664. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.9.4656>.
 14. Caron C, Mengus G, Dubrowskaya V, Roisin A, Davidson I, Jalinot P. 1997. Human TAF(II)28 interacts with the human T cell leukemia virus type 1 Tax transactivator and promotes its transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3662–3667. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.8.3662>.
 15. Anderson MG, Scoggin KE, Simbulan-Rosenthal CM, Steadman JA. 2000. Identification of poly(ADP-ribose) polymerase as a transcriptional coactivator of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *J Virol* 74:2169–2177. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.5.2169-2177.2000>.
 16. Zhou M, Lu H, Park H, Wilson-Chiru J, Linton R, Brady JN. 2006. Tax interacts with P-TEFb in a novel manner to stimulate human T-lymphotropic virus type 1 transcription. *J Virol* 80:4781–4791. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.10.4781-4791.2006>.
 17. Cho WK, Zhou M, Jang MK, Huang K, Jeong SJ, Ozato K, Brady JN. 2007. Modulation of the Brd4/P-TEFb interaction by the human T-lymphotropic virus type 1 tax protein. *J Virol* 81:11179–11186. <https://doi.org/10.1128/JVI.00408-07>.
 18. Rimel JK, Taatjes DJ. 2018. The essential and multifunctional TFIIH complex. *Protein Sci* 27:1018–1037. <https://doi.org/10.1002/pro.3424>.
 19. Compe E, Egly JM. 2016. Nucleotide excision repair and transcriptional regulation: TFIIH and beyond. *Annu Rev Biochem* 85:265–290. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014857>.
 20. Fishburn J, Tomko E, Galburt E, Hahn S. 2015. Double-stranded DNA translocase activity of transcription factor TFIIH and the mechanism of RNA polymerase II open complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:3961–3966. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417709112>.
 21. Alekseev S, Nagy Z, Sandoz J, Weiss A, Egly JM, Le May N, Coin F. 2017. Transcription without XPB establishes a unified helicase-independent mechanism of promoter opening in eukaryotic gene expression. *Mol Cell* 65:504–514.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.012>.
 22. Kim TK, Ebricht RH, Reinberg D. 2000. Mechanism of ATP-dependent promoter melting by transcription factor IIH. *Science* 288:1418–1422. <https://doi.org/10.1126/science.288.5470.1418>.
 23. Tirode F, Busso D, Coin F, Egly JM. 1999. Reconstitution of the transcription factor TFIIH: assignment of functions for the three enzymatic subunits, XPB, XPD, and cdk7. *Mol Cell* 3:87–95. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80177-x](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80177-x).
 24. Lin YC, Choi WS, Gralla JD. 2005. TFIIH XPB mutants suggest a unified bacterial-like mechanism for promoter opening but not escape. *Nat Struct Mol Biol* 12:603–607. <https://doi.org/10.1038/nsmb949>.
 25. Oksenysh V, Coin F. 2010. The long unwinding road: XPB and XPD helicases in damaged DNA opening. *Cell Cycle* 9:90–96. <https://doi.org/10.4161/cc.9.1.10267>.
 26. Oksenysh V, Bernardes de Jesus B, Zhovmer A, Egly JM, Coin F. 2009. Molecular insights into the recruitment of TFIIH to sites of DNA damage. *EMBO J* 28:2971–2980. <https://doi.org/10.1038/emboj.2009.230>.
 27. Coin F, Oksenysh V, Egly JM. 2007. Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. *Mol Cell* 26:245–256. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.009>.
 28. Sandoz J, Coin F. 2017. Unified promoter opening steps in eukaryotic gene expression. *Oncotarget* 8:84614–84615. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21387>.
 29. Elinoff JM, Chen LY, Dougherty EJ, Awad KS, Wang S, Biancotto A, Siddiqui AH, Weir NA, Cai R, Sun J, Preston IR, Solomon MA, Danner RL. 2018. Spironolactone-induced degradation of the TFIIH core complex XPB subunit suppresses NF-kappaB and AP-1 signalling. *Cardiovasc Res* 114:65–76. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx198>.
 30. Alekseev S, Ayadi M, Brino L, Egly JM, Larsen AK, Coin F. 2014. A small molecule screen identifies an inhibitor of DNA repair inducing the degradation of TFIIH and the chemosensitization of tumor cells to platinum. *Chem Biol* 21:398–407. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.12.014>.
 31. Ueda M, Matsuura K, Kawai H, Wakasugi M, Matsunaga T. 2019. Spironolactone-induced XPB degradation depends on CDK7 kinase and SCF(FBXL) (18) E3 ligase. *Genes Cells* 24:284–296. <https://doi.org/10.1111/gtc.12674>.
 32. Lacombe B, Morel M, Margottin-Goguet F, Ramirez BC. 2016. Specific inhibition of HIV infection by the action of spironolactone in T cells. *J Virol* 90:10972–10980. <https://doi.org/10.1128/JVI.01722-16>.
 33. Smith MR, Greene WC. 1990. Identification of HTLV-I tax trans-activator mutants exhibiting novel transcriptional phenotypes. *Genes Dev* 4:1875–1885. <https://doi.org/10.1101/gad.4.11.1875>.
 34. Hironaka N, Mochida K, Mori N, Maeda M, Yamamoto N, Yamaoka S. 2004. Tax-independent constitutive IkkappaB kinase activation in adult T-cell leukemia cells. *Neoplasia* 6:266–278. <https://doi.org/10.1593/neo.3388>.
 35. Mahgoub M, Yasunaga JI, Iwami S, Nakaoka S, Koizumi Y, Shimura K, Matsuoka M. 2018. Sporadic on/off switching of HTLV-1 Tax expression is crucial to maintain the whole population of virus-induced leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E1269–E1278. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715724115>.
 36. Ozden S, Cochet M, Mikol J, Teixeira A, Gessain A, Pique C. 2004. Direct evidence for a chronic CD8+-T-cell-mediated immune reaction to tax within the muscle of a human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1-infected patient with sporadic inclusion body myositis. *J Virol* 78:10320–10327. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10320-10327.2004>.
 37. Forlani G, Baratella M, Tedeschi A, Pique C, Jacobson S, Accolla RS. 2019. HTLV-1 HBZ protein resides exclusively in the cytoplasm of infected cells in asymptomatic carriers and HAM/TSP patients. *Front Microbiol* 10:819. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00819>.
 38. Mori N, Fujii M, Ikeda S, Yamada Y, Tomonaga M, Ballard DW, Yamamoto N. 1999. Constitutive activation of NF-kappaB in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 93:2360–2368.
 39. Song X, Zhao Z, Qi X, Tang S, Wang Q, Zhu T, Gu Q, Liu M, Li J. 2015. Identification of epipolythiodioxopiperazines HDN-1 and chaetocin as novel inhibitor of heat shock protein 90. *Oncotarget* 6:5263–5274. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3029>.
 40. Gao L, Harhaj EW. 2013. HSP90 protects the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) tax oncoprotein from proteasomal degradation to support NF-kappaB activation and HTLV-1 replication. *J Virol* 87:13640–13654. <https://doi.org/10.1128/JVI.02006-13>.
 41. Hoogstraten D, Nigg AL, Heath H, Mullenders LH, van Driel R, Hoeijmakers JH, Vermeulen W, Houtsmuller AB. 2002. Rapid switching of TFIIH between RNA polymerase I and II transcription and DNA repair in vivo. *Mol Cell* 10:1163–1174. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00709-8](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00709-8).
 42. Yao J, Grant C, Harhaj E, Nonnemacher M, Alefantis T, Martin J, Jain P, Wigdahl B. 2006. Regulation of human T-cell leukemia virus type 1 gene expression by Sp1 and Sp3 interaction with TRE-1 repeat III. *DNA Cell Biol* 25:262–276. <https://doi.org/10.1089/dna.2006.25.262>.
 43. Bhat NK, Adachi Y, Samuel KP, Derse D. 1993. HTLV-1 gene expression by defective proviruses in an infected T-cell line. *Virology* 196:15–24. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1450>.
 44. Tagaya Y, Gallo RC. 2017. The exceptional oncogenicity of HTLV-1. *Front Microbiol* 8:1425. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01425>.
 45. Martin F, Tagaya Y, Gallo R. 2018. Time to eradicate HTLV-1: an open letter to WHO. *Lancet* 391:1893–1894. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)30974-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30974-7).
 46. Caron C, Rousset R, Beraud C, Moncollin V, Egly JM, Jalinot P. 1993. Functional and biochemical interaction of the HTLV-I Tax1 transactivator with TBP. *EMBO J* 12:4269–4278. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06111.x>.
 47. Hilario E, Li Y, Nobumori Y, Liu X, Fan L. 2013. Structure of the C-terminal half of human XPB helicase and the impact of the disease-causing mutation XP11BE. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 69:237–246. <https://doi.org/10.1107/S0907444912045040>.
 48. Dassouki Z, Sahin U, El Hajj H, Jollivet F, Kfoury Y, Lallemand-Breitenbach V, Hermine O, de Thé H, Bazarbachi A. 2015. ATL response to arsenic/interferon therapy is triggered by SUMO/PML/RNF4-dependent Tax degradation. *Blood* 125:474–482. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-04-572750>.
 49. Hahn S. 2004. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat Struct Mol Biol* 11:394–403. <https://doi.org/10.1038/nsmb763>.
 50. Kouzine F, Wojtowicz D, Yamane A, Resch W, Kieffer-Kwon KR, Bandle R, Nelson S, Nakahashi H, Awasthi P, Feigenbaum L, Menoni H, Hoeijmakers J, Vermeulen W, Ge H, Przytycka TM, Levens D, Casellas R. 2013. Global regulation of promoter melting in naive lymphocytes. *Cell* 153:988–999. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.033>.
 51. Rice AP. 2017. The HIV-1 Tat protein: mechanism of action and target for HIV-1 cure strategies. *Curr Pharm Des* 23:4098–4102. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170704130635>.
 52. Nasr R, Chiari E, El-Sabban M, Mahieux R, Kfoury Y, Abdulhay M, Yazbeck V, Hermine O, de Thé H, Pique C, Bazarbachi A. 2006. Tax ubiquitylation

- and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of NF-kappaB activation. *Blood* 107:4021–4029. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3572>.
53. Perugi F, Muriaux D, Ramirez BC, Chabani S, Decroly E, Darlix JL, Blot V, Pique C. 2009. Human Discs Large is a new negative regulator of human immunodeficiency virus-1 infectivity. *Mol Biol Cell* 20:498–508. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-02-0189>.
54. Mone MJ, Bernas T, Dinant C, Goedvree FA, Manders EM, Volker M, Houtsmuller AB, Hoeijmakers JH, Vermeulen W, van Driel R. 2004. In vivo dynamics of chromatin-associated complex formation in mammalian nucleotide excision repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15933–15937. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403664101>.
55. Giglia-Mari G, Miquel C, Theil AF, Mari PO, Hoogstraten D, Ng JM, Dinant C, Hoeijmakers JH, Vermeulen W. 2006. Dynamic interaction of TTDA with TFIIH is stabilized by nucleotide excision repair in living cells. *PLoS Biol* 4:e156. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040156>.

2. Effets de la protéine Tax sur l'expression des transcrits antisens du HTLV-1

2.1. Préambule

La transcription antisens du HTLV-1 est à l'origine de différentes formes de la protéine HBZ : sHBZ (ou HBZ-SP1), SP2 et usHBZ (Cavanagh et al, 2006 ; Murata et al, 2006 ; Satou et al, 2006). Un premier transcrit, initié à la jonction entre les régions R et U5 du LTR 3', permet la synthèse de deux ARNm alternativement épissés codant pour sHBZ et SP2 (Cavanagh et al, 2006 ; Murata et al, 2006) grâce à la présence de sites donneurs d'épissage, respectivement localisés à 367 et 227 du site d'initiation du transcrit (numérotation antisens), à l'origine de sHBZ et SP2. Le site accepteur d'épissage est lui commun et est localisé à 1594 du site d'initiation du transcrit. Un second transcrit, initié à 704 pb de la région U3 du LTR 3' permet la synthèse de l'ARNm non épissé usHBZ (Yoshida et al, 2008). Ces différents transcrits possèdent tous un site de polyadénylation commun (Figure 11).

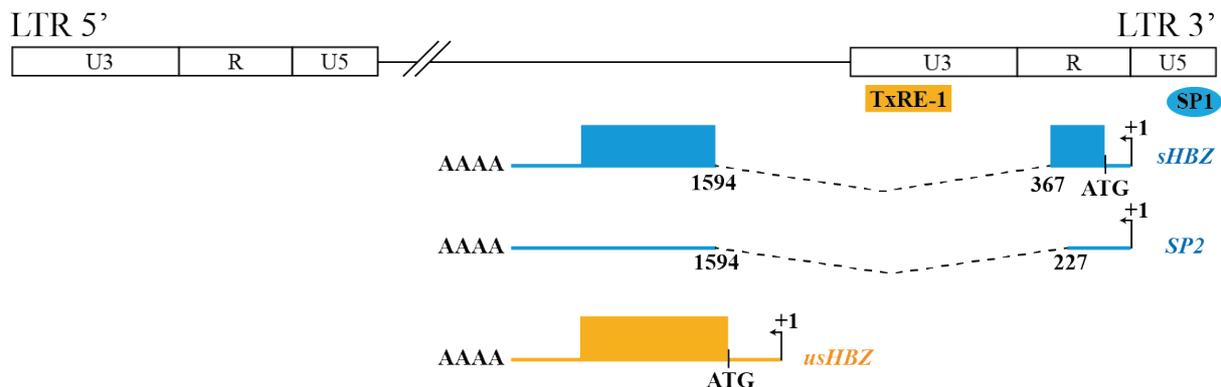


Figure 11 : Schéma des transcrits antisens du HTLV-1

La transcription antisens du HTLV-1 permet la synthèse de plusieurs ARN à l'origine de différents variants de la protéine HBZ. Un premier transcrit, initié à la jonction entre les régions R et U5 du LTR 3' est à l'origine de deux ARNm alternativement épissés codant pour sHBZ et SP2. Sa transcription semble être sous contrôle du facteur cellulaire SP1. Un second transcrit, initié à 704 pb de la région U3 du LTR 3', permet la synthèse d'un ARNm non épissé codant pour usHBZ.

La numérotation est antisens, avec pour début l'extrémité 3' du LTR 3'.

Les ARNm sHBZ et usHBZ sont tous deux détectés dans des lignées de lymphocytes infectés par HTLV-1, à l'inverse de la forme SP2 qui semble indétectable. De plus, aucun codon initiateur AUG n'est détecté pour l'ARN SP2, remettant en cause l'existence d'une protéine associée (Cavanagh et al, 2006). Pour ces raisons, l'isoforme SP2 n'est que très peu étudiée et l'étude de la transcription antisens du HTLV-1 se résume à l'étude des ARNm sHBZ et usHBZ.

L'existence de sites d'initiation de la transcription radicalement différents entre ces 2 transcrits suppose une régulation de la transcription spécifique à chacun de ces deux ARN.

La transcription de sHBZ semble être contrôlée par la région U5 du LTR 3', contenant des sites de liaison au facteur de transcription cellulaire Sp1, qui régule positivement le niveau d'expression de sHBZ dans un modèle *in vitro* (Yoshida et al, 2008) (Figure 11). La transcription de usHBZ pourrait, elle, être contrôlée par la région U3 du LTR 3' possédant les éléments de réponse à Tax (Yoshida et al, 2008) (Figure 11). Cette hypothèse est appuyée par la présence de Tax, CREB et CBP/p300 au niveau de la région U3 du LTR 3' (Lemasson et al, 2004). Tax semble donc avoir un rôle crucial dans la régulation de la transcription de usHBZ. Cependant, un tel mécanisme mis en évidence par une approche impliquant la transfection de plasmides indicateurs n'a pas été étudié dans le contexte des génomes viraux intégrés (provirus). C'est pourquoi il est nécessaire d'étudier plus précisément les potentiels effets de la protéine Tax sur la modulation de la transcription des ARNm de sHBZ et usHBZ à partir de provirus intégrés dans des lymphocytes T infectés par le HTLV-1.

2.2. L'inhibition de la transcription sens est associée à une modulation des niveaux d'ARNm de usHBZ et de sHBZ

Afin d'étudier si la protéine Tax possède un effet régulateur de la transcription antisens du HTLV-1, j'ai utilisé la stratégie mis en place précédemment : l'utilisation de la Spironolactone (SP) en tant qu'inhibiteur de la transcription sens du HTLV-1.

Pour ce faire, j'ai utilisé plusieurs modèles cellulaires de lymphocytes T infectés par HTLV-1 : les lignées C8166 et MT4 qui présentent une transcription sens et une transcription antisens active ; la lignée MT1 qui, tout en conservant une transcription antisens active, possède une transcription sens quasiment inexistante, avec uniquement une production de Tax au niveau ARNm, et les CB-CD4/HTLV-1, PBMC infectés et immortalisés par HTLV-1, obtenus d'un patient ayant développé une TSP.

Ces différentes cellules ont été traitées avec 10 μ M de SP ou d'Eplérénone (EPL), homologue de la SP incapable d'induire la dégradation de XPB, pendant 24h. A la fin du traitement, les

cellules ont été récupérées pour la réalisation des expériences de RT-qPCR, présentant les niveaux d'ARN d'intérêt.

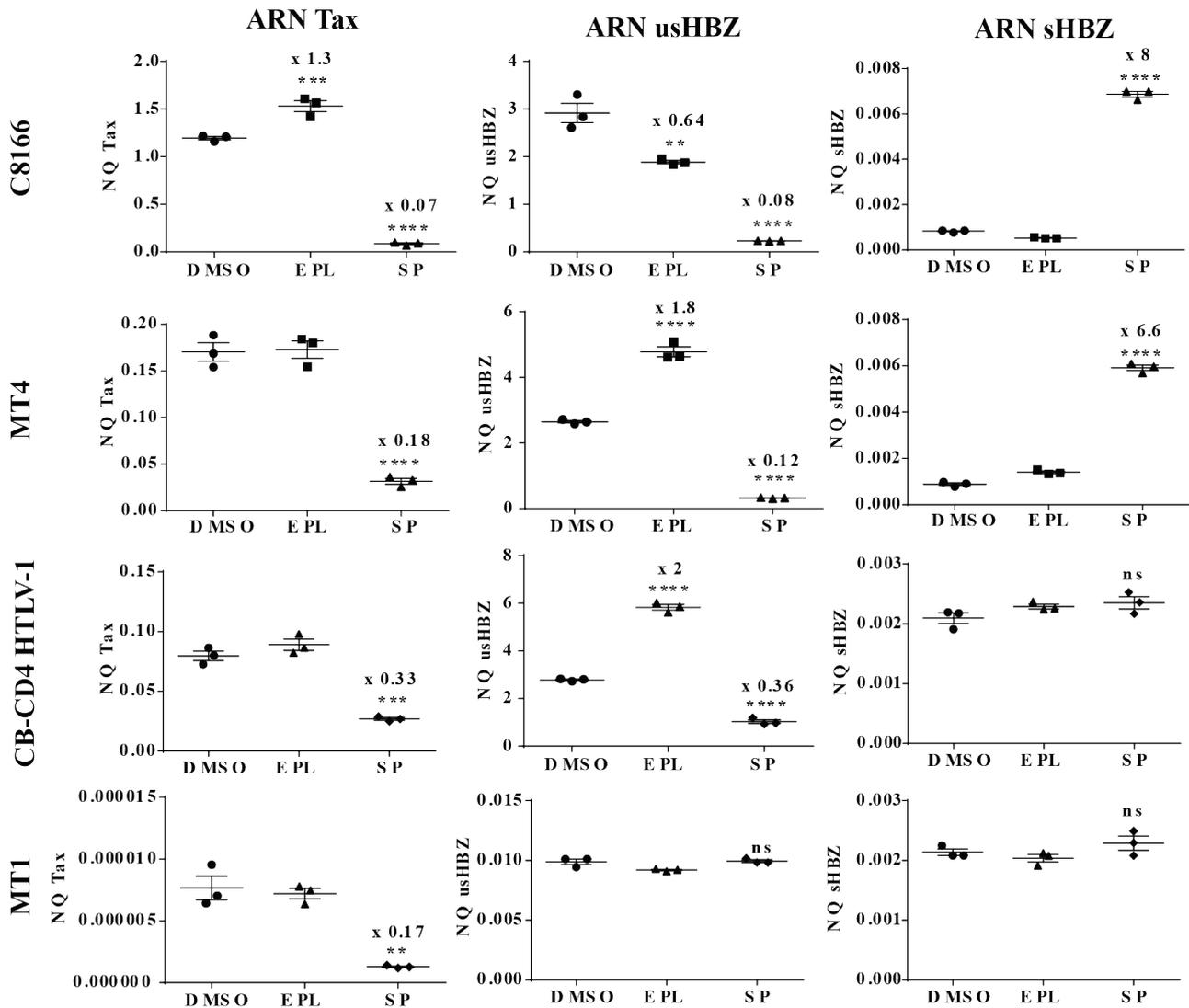


Figure 12 : L'inhibition de la transcription sens par la SP influence les niveaux d'ARN de usHBZ et sHBZ

Des lignées de lymphocytes T infectés par HTLV-1 (C8166, MT4, MT1) et des PBMC immortalisés par HTLV-1 (CB-CD4 HTLV-1) ont été traités avec 20 μ M de SP ou de EPL pendant 24h. Les cellules ont ensuite été lysées pour extraction des ARN totaux et réalisation des RT-qPCR. Les résultats présentent les niveaux des transcrits viraux Gag, Tax, usHBZ et sHBZ normalisés en fonction des gènes cellulaires *EEF1G* et *HPRT* selon la démarche présentée dans la partie Matériels et Méthodes. NS : non significatif ; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0,0001$; Test statistique comparaison multiple one way ANOVA

Tout d'abord, intéressons-nous aux lignées C8166 et MT4, qui possèdent une transcription sens et antisens actives. Comme démontré dans l'étude précédente, le traitement par la SP, mais pas l'EPL, entraîne une diminution des niveaux des ARN de Gag et Tax (Figure 12). De façon surprenante, cette inhibition est associée à une diminution du niveau d'ARN de usHBZ, alors que le niveau d'ARN de sHBZ lui augmente (Figure 12). Ces résultats sont confirmés avec les

cellules immortalisées CB-CD4/HTLV-1, avec cependant un effet plus faible concernant l'augmentation du niveau d'ARN sHBZ (Figure 12).

Concernant la lignée MT1, ne possédant pas une transcription sens assez élevée pour permettre la synthèse de la protéine Tax, aucune variation significative lors de traitement à la SP des niveaux d'ARN de usHBZ et de sHBZ n'est observée.

Ces résultats montrent que l'inhibition de la transcription sens est associée à une diminution du niveau d'ARN de usHBZ et à une augmentation du niveau d'ARN de sHBZ dans les lignées transformées. Cela permet d'émettre l'hypothèse que la protéine Tax aurait un rôle régulateur de la transcription antisens, spécifique à chaque transcrit antisens.

Dans les LT immortalisés, un effet sur usHBZ de même ampleur que dans les lignées transformées est observé alors que l'effet sur sHBZ est beaucoup moins net.

2.3. La surexpression de Tax WT et du mutant Tax M47 induit le transcrit usHBZ

Afin de tester directement le rôle de Tax sur l'expression des transcrits antisens usHBZ et sHBZ, j'ai choisi l'approche de la surexpression de Tax par transfection dans des lymphocytes T infectés par HTLV-1 de la lignée MT1, possédant une transcription sens très peu active.

Ces cellules ont été transfectées avec un plasmide contrôle, ou avec des plasmides codants pour la protéine Tax. De plus, une construction codant pour le mutant Tax M47, qui n'est plus capable de recruter le complexe transcriptionnel P/CAF empêchant ainsi la transactivation du LTR 5', a été utilisée (Smith and Greene, 1990 ; Jiang et al, 1999). Les cellules ont été récupérées 72h après la transfection pour la réalisation des expériences de RT-qPCR et de Western-Blot.

Grâce au Western Blot réalisé, il est clairement observé que les protéines Tax WT et Tax M47 sont tous deux exprimées correctement (Figure 13, A). Puis, l'étude présente les niveaux des ARN sens (Gag et Tax) et des ARN antisens sHBZ et usHBZ en condition de surexpression de Tax ou non (Figure 13, B).

Tout d'abord, la surexpression de Tax WT, mais pas de Tax M47, est associée à une forte augmentation du niveau des ARN sens (Gag et Tax), traduisant une réactivation de la

transcription sens. Cela est permis grâce à la fonction de transactivateur du LTR 5' portée par Tax, non observée avec l'utilisation du mutant Tax M47 qui est déficient pour le recrutement de P/CAF au niveau des TxRE, nécessaire à une transactivation efficace du LTR 5'.

Concernant les transcrits antisens sHBZ et usHBZ, la surexpression de Tax WT est associée à une augmentation du niveau d'ARN de usHBZ, sans pour autant faire varier le niveau d'ARN de sHBZ. De façon inattendue, le même effet est observé lors de la surexpression de Tax M47 (Figure 13, B).

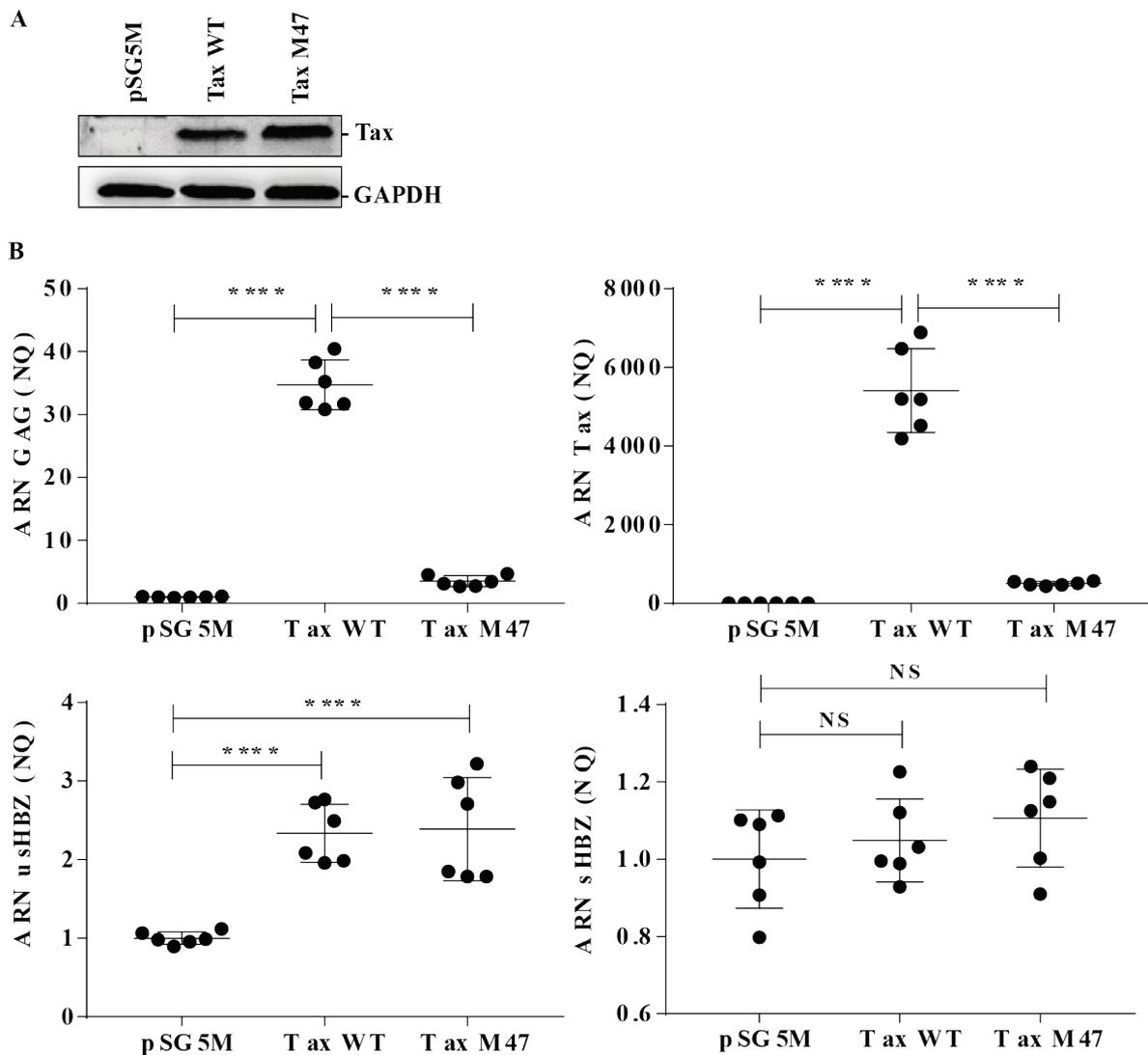


Figure 13 : Tax sauvage et le mutant M47 induisent l'expression de l'ARN usHBZ

Des lymphocytes T infectés par HTLV-1 de la lignée MT1 ont été transfectés avec des plasmides contrôle (pSG5M), codant pour Tax sauvage (Tax WT) ou un mutant de Tax ne pouvant pas transactiver le LTR 5' (Tax M47), puis les cellules sont récupérées 72h post-transfection et séparées pour la réalisation du Western-Blot contrôlant l'expression des protéines exogènes (A) et pour l'extraction des ARN totaux et la réalisation de la RT-qPCR (B). Les résultats présentent les niveaux des transcrits viraux GAG, Tax, usHBZ et sHBZ normalisés en fonction des gènes cellulaires EEF1G et HPRT selon la démarche présentée dans la partie Matériels et Méthodes. Moyenne de 2 expériences réalisées en triplicats. NS : non significatif ; **** $p < 0,0001$; Test statistique comparaison multiple one way ANOVA

Ces résultats mettent en évidence un rôle de Tax dans l'augmentation de la production de l'ARN usHBZ, effet également observé avec un mutant de Tax ne pouvant pas transactiver le LTR 5'. Cela permet de poser l'hypothèse que Tax serait un activateur de la transcription de usHBZ, potentiellement *via* les TxRE du LTR 3', impliquant cependant un mécanisme transcriptionnel différent de celui impliqué dans la transactivation du LTR 5'. Or, il faut noter que la surexpression de Tax dans la lignée MT1 est associée à une réactivation de la transcription sens, même si le niveau obtenu ne permet pas la production des protéines virales. Afin de vérifier si l'augmentation du niveau d'ARN de usHBZ est spécifiquement due à la surexpression de Tax, mais pas à la réactivation de la transcription sens du provirus, j'ai souhaité réaliser la même expérience dans un autre modèle cellulaire possédant un provirus modifié.

2.4. L'augmentation du niveau d'ARN de usHBZ est associée à la surexpression de Tax, et non à la réactivation de la transcription sens.

Afin de confirmer l'hypothèse précédemment émise, j'ai souhaité surexprimer Tax WT et Tax M47 dans une lignée de Jurkat possédant un provirus modifié (Figure 14).

Cette lignée Jurkat CMV-Env-LTR a présenté au fur et à mesure de sa culture une répression presque totale du promoteur CMV, phénomène fréquemment observé pour les transgènes sous contrôle de ce promoteur (Revue dans Reeves, 2010). Elle présente donc l'avantage de pouvoir étudier la transcription antisens sans faire varier le niveau de transcription sens. La même expérience, réalisée précédemment dans la lignée MT1, est réitérée dans cet autre modèle cellulaire.

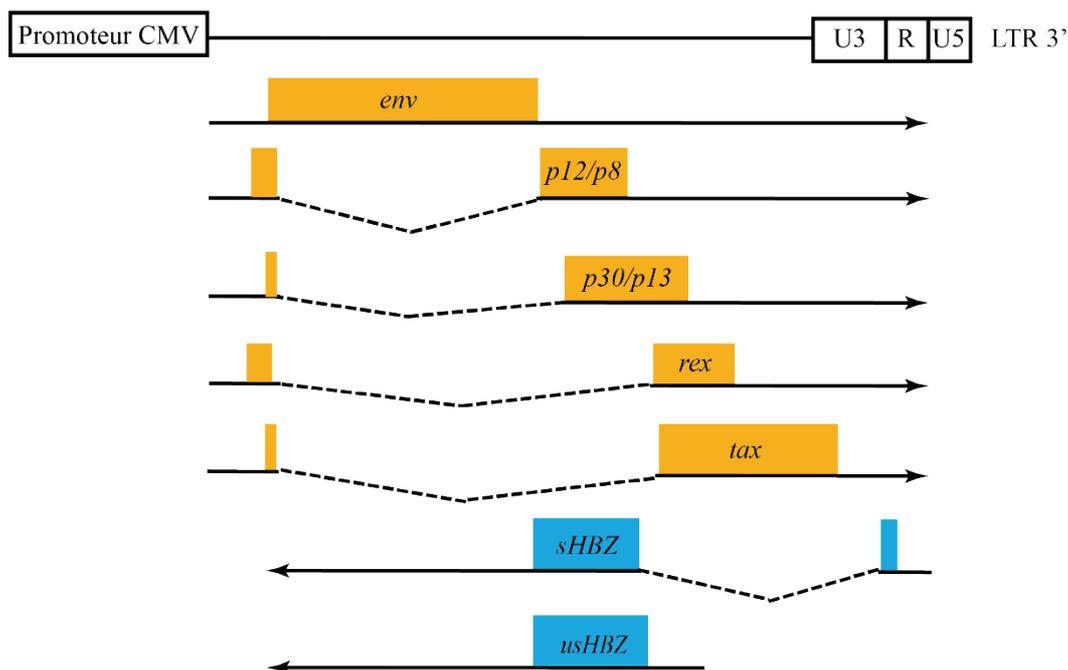


Figure 14 : Schéma du provirus HTLV-1 modifié CMV-Env-LTR3'

Le mini génome, appelé CMV-Env-LTR, permet l'expression des transcrits Env, Tax, Rex, ainsi que des transcrits permettant la synthèse de p12/p8 et p30/p13 sous contrôle d'un promoteur CMV. Les transcrits sHBZ et usHBZ sont eux aussi exprimés et sous contrôle du LTR 3', comme dans le provirus sauvage. Le niveau de transcription sens étant faible, le niveau d'expression des transcrits n'est pas suffisant à la synthèse des protéines virales.

Le Western-Blot présenté permet d'observer que les niveaux de Tax WT et Tax M47 surexprimés sont satisfaisants (Figure 15, A). Puis, l'étude du niveau des ARN par RT-qPCR montre tout d'abord que la surexpression de Tax WT et Tax M47 entraîne une faible augmentation du niveau de transcription sens dépendante du promoteur CMV, expliqué par l'effet de Tax sur ce promoteur (Suzuki et al, 2018), mais n'est pas associé à la production des protéines virales endogènes (Figure 15, B). Concernant les niveaux d'ARN de usHBZ et sHBZ, la surexpression de Tax WT, mais aussi de Tax M47, entraîne une augmentation du niveau d'ARN de usHBZ, sans faire varier le niveau d'ARN de sHBZ, reproduisant donc les résultats obtenus dans la lignée MT1 (Figure 15, B).

L'ensemble de ces résultats mettent en évidence que la protéine Tax possède un effet activateur de l'expression de l'ARN de usHBZ, effet conservé avec le mutant Tax M47, malgré son incapacité à recruter l'histone acétyltransférase P/CAF au niveau des TxRE, nécessaire à la transactivation du LTR 5'. Cette observation permet d'émettre l'hypothèse que Tax pourrait influencer l'expression de usHBZ *via* les TxREs du LTR 3', en recrutant une machinerie de transcription différente de celle impliquée dans la transactivation du LTR 5'.

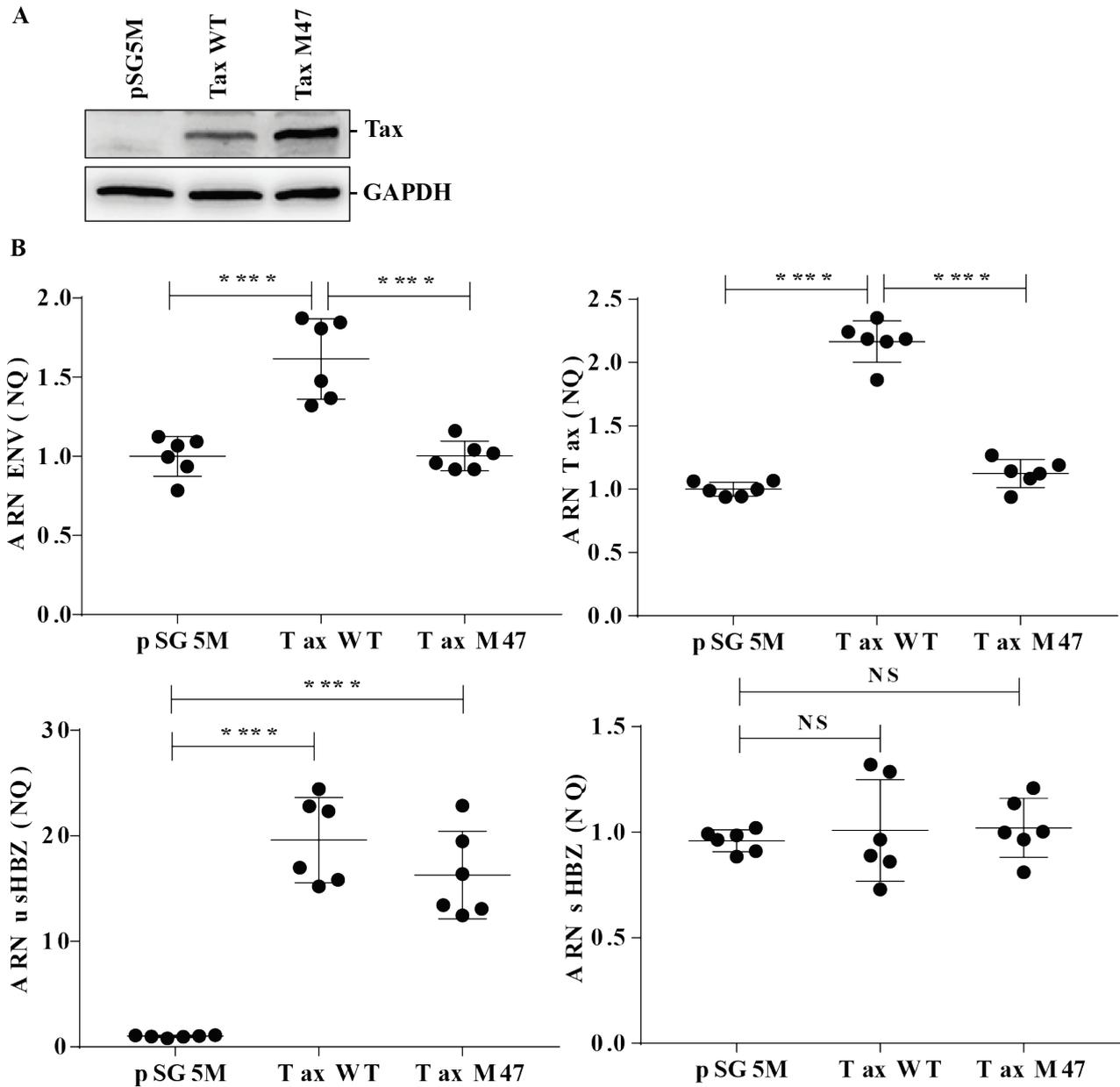


Figure 15 : Tax active la transcription de l'ARN usHBZ dans la lignée Jurkat CMV-Env-LTR

Des lymphocytes T de la lignée Jurkat, possédant le mini-génome CMV-Env-LTR 3', ont été transfectés avec des plasmides contrôle (pSG5M), codant pour Tax sauvage (Tax WT) ou codant pour un mutant de Tax ne pouvant pas transactiver le LTR 5' (Tax M47). Les cellules sont récupérées 72h post-transfection et séparées en 2 fractions : une lysée pour la réalisation du Western-Blot contrôlant l'expression des protéines exogènes (A) ; une lysée pour l'extraction des ARN totaux et la réalisation de la RT-qPCR (B). Les résultats présentent les niveaux des transcrits viraux GAG, Tax, usHBZ et sHBZ normalisés en fonction des gènes cellulaires EEF1G et HPRT selon la démarche présentée dans la partie Matériels et Méthodes. Moyenne de 2 expériences réalisées en triplicats. NS : non significatif ; **** $p < 0,0001$; Test statistique comparaison multiple one way ANOVA

IV. DISCUSSION

Le développement des pathologies associées à l'infection par HTLV-1 est lié à l'expression de ses deux oncoprotéines Tax et HBZ, respectivement sous contrôle du LTR 5' et du LTR 3', mettant en évidence l'importance de la compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation de leur expression. Les mécanismes régulant l'expression des transcrits sens sont bien décrits, principalement la transactivation du LTR 5' par Tax, même si certains mécanismes restent encore mal compris. Cependant, les mécanismes régissant la transcription antisens du HTLV-1, à l'origine de la production des transcrits HBZ, font débat car encore faiblement documentés.

PARTIE 1 : XPB, un nouveau co-facteur de la transcription virale médiée par Tax du HTLV-1

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux mécanismes impliqués dans la transactivation du LTR 5' par Tax. Dans cette première étude, nous avons montré que la protéine Tax et la sous-unité XPB du complexe de transcription TFIIH interagissent directement *in vitro*, forment un complexe dans un modèle endogène, et que XPB est recruté au niveau du promoteur viral de façon dépendante de Tax. De plus, nous avons mis en évidence un rôle important de XPB dans la transactivation par Tax : la dégradation de XPB est associée à une forte diminution de la transactivation du promoteur viral médiée par Tax dans des lymphocytes T infectés par HTLV-1, effet compensé par la surexpression de XPB exogène. Cette approche nous a permis de montrer qu'un mutant de XPB, déficient pour l'activité ATPase nécessaire à l'ouverture du promoteur lors de l'initiation de la transcription, n'est pas capable de compenser le défaut de XPB endogène, mettant en évidence l'importance de l'activité ATPase dans ce mécanisme transcriptionnel viral. Les résultats obtenus dans cette étude révèlent que XPB est un nouveau co-facteur cellulaire détourné par la protéine virale Tax pour augmenter la transcription du HTLV-1.

XPB interagit avec la protéine virale Tax et est recruté au niveau du promoteur du HTLV-1

L'hypothèse d'une interaction entre Tax et XPB nous a posé la question d'une interaction directe entre ces deux protéines. C'est pourquoi nous avons démontré, par la technique du GST-

pull down, que Tax et XPB interagissent de façon directe. En effet, Tax est connue pour interagir directement avec plusieurs facteurs cellulaires de la transcription par l'ARN polymérase II comme TBP (Caron et al, 1993), TFIIA (Clemens et al, 1996), et CDK9 (Zhou et al, 2006), découvertes obtenues par la même approche technique. Tax, ayant été produite dans un système bactérien, ne possède pas de modifications post-traductionnelles, mettant en évidence que ces modifications de Tax ne semblent pas nécessaires à son interaction avec les complexes impliqués dans l'initiation de la transcription.

Pour aller plus loin, nous avons démontré, par la technique d'immunoprécipitation que Tax et XPB forment un complexe, aussi bien dans un modèle de surexpression, que dans des lymphocytes T infectés par HTLV-1, transformés mais aussi seulement immortalisés. Cela pose l'hypothèse que XPB serait recruté au niveau du LTR 5' du HTLV-1 de façon dépendante de Tax. Nous avons donc montré que le recrutement de XPB au niveau du LTR 5' dans des lymphocytes T infectés par HTLV-1 est aboli lorsque la protéine Tax est dégradée par la Chaetocine. Cet inhibiteur de la protéine chaperonne Heat Shock Protein 90 (Song et al, 2015) n'a qu'un faible impact sur le niveau de protéine XPB et son recrutement au niveau du promoteur du gène cellulaire $I\kappa B\alpha$ est maintenu (Elinoff et al, 2017), éloignant un possible biais du traitement Chaetocine sur l'abolition du recrutement de XPB au niveau du LTR 5' du HTLV-1. Ces résultats mettent en évidence que XPB est une cible de Tax, potentiellement impliquée dans l'établissement de l'initiation de la transcription virale.

XPB est impliqué dans la transactivation du LTR 5' par Tax

L'hypothèse que XPB possède un rôle majeur dans l'initiation de la transcription du HTLV-1 est renforcée par des travaux précédents ayant montré que le complexe TFIID semble être nécessaire à la transcription du HTLV-1 *in vitro* (Anderson et al, 2000). De plus, TFIID est connu pour être impliqué dans la transcription de certains virus : XPB a été montré comme nécessaire à la transactivation du LTR 5' du Virus de l'Immunodéficience Humaine de type 1 (VIH-1) par la protéine virale Tat (Lacombe et al, 2016), mais aussi impliqué dans la transactivation des gènes lytiques du Virus Epstein Barr (EBV) par la protéine virale SM (Verma et al, 2020).

Afin d'étudier le rôle de XPB dans la transcription du HTLV-1, nous avons mis à profit l'utilisation de la Spironolactone (SP), une drogue précédemment décrite comme étant capable d'induire la dégradation spécifique de la sous-unité XPB de TFIID au sein du complexe sans perturber son intégrité (Alekseev et al, 2014). Il a récemment été montré que la SP stimule la

phosphorylation de la Sérine 90 de XPB par CDK7, ce qui permet la reconnaissance de XPB par le complexe SCF^{FBXL18} E3 ligase (*SKP1:CUL1:RBX1:FBXL18*), entraînant sa polyubiquitination et sa dégradation par le protéasome (Ueda et al, 2018). La SP est un inhibiteur pharmacologique de la voie des minéralocorticoïdes, par compétition avec l'aldostérone pour ces récepteurs spécifiques. Afin de s'affranchir d'un potentiel effet secondaire dû à cette activité, nous avons utilisé en tant que contrôle un homologue de la SP, l'Eplérénone (EPL), qui possède la même activité pharmacologique, mais n'a pas la capacité d'induire la dégradation de XPB (Alekseev et al, 2014).

Tout d'abord, dans un modèle de lymphocytes T non infectés (Jurkat), nous avons montré que le traitement par la SP n'a pas effet sur la stabilité de la protéine virale Tax, ainsi que sur la transcription basale virale. Cependant, ceci est associé à une forte diminution de la transactivation du LTR 5' par Tax. Les mêmes observations ont été faites dans un modèle de lymphocytes T infectés par HTLV-1 exprimant Tax de façon endogène. Cette technique de transfection d'une plasmide indicateur U3R-Luc nous a permis de développer l'approche de compensation de la dégradation de XPB par l'expression exogène de la protéine XPB. L'effet inhibiteur de la dégradation de la protéine XPB endogène sur l'activation du promoteur viral est compensé par la surexpression de la protéine XPB, mais pas par celle de la protéine XPD, autre hélicase membre du complexe TFIIH. Cette approche par compensation nous a permis d'utiliser plusieurs mutants de la protéine XPB, mettant en évidence que la protéine XPB portant une mutation dans son domaine R-E-D, donc déficiente pour l'activité ATPase, n'est plus capable de compenser l'effet de la dégradation de la protéine endogène sur la transcription du HTLV-1. Le domaine R-E-D de la protéine XPB, portant l'activité requise pendant l'étape d'ouverture du promoteur lors de la pré-initiation de la transcription, est donc nécessaire à la transactivation du LTR 5' par Tax, confirmant l'implication de XPB dans la transactivation du LTR 5' du HTLV-1 par Tax.

La dégradation de XPB par la SP bloque la transcription virale

Pour compléter les données obtenues par la transfection des plasmides indicateurs, nous nous sommes intéressés au rôle de XPB dans la transcription virale sens depuis un provirus intégré. Nous avons donc utilisé différents modèles cellulaires de lymphocytes T infectés par HTLV-1, traités à la SP ou à l'EPL. Les résultats ont montré que la dégradation de XPB par la SP réduit fortement l'expression du transcrit codant pour la protéine Tax, mais aussi des autres transcrits sens, présentant une forte corrélation entre le niveau d'ARN viral Gag et la quantité de protéine

XPB. De plus, la dégradation de XPB induite par la SP diminue fortement la viabilité des lymphocytes T transformés ou immortalisés par HTLV-1. A l'inverse, les lymphocytes T non infectés par HTLV-1, ou infectés mais n'exprimant pas Tax, ne sont pas sensibles au traitement à la SP, confirmant le lien étroit entre Tax et XPB, ainsi que l'importance de la protéine Tax dans la survie des lymphocytes T infectés par HTLV-1. Ces résultats identifient la SP comme un puissant inhibiteur de la transcription virale et de la prolifération induite par Tax

XPB, un co-facteur de la pathogénèse virale ?

En tant que co-facteur de transcription par l'ARN polymérase II, la déplétion de XPB est supposée entraîner des conséquences sur le niveau global de transcription cellulaire. Or, lors de nos expériences, nous avons remarqué que la dégradation de XPB n'a pas d'effet sur la transcription basale du HTLV-1, mais seulement sur la transcription induite par Tax. L'absence d'effet de la dégradation de XPB sur la transcription basale peut être surprenante, mais le rôle de XPB dans l'établissement de la transcription est complexe. En effet, XPB ne semble pas être nécessaire à la transcription basale, mais, dans le cas d'induction de la transcription d'un gène en réponse à un stimuli, la présence de XPB, pendant l'étape d'ouverture du promoteur lors de l'initiation de la transcription, est requise ; cela afin d'obtenir un haut niveau transcriptionnel (Hahn et al, 2004 ; Kouzine et al, 2013 ; Alekseev et al, 2017). Notre étude, associée aux autres découvertes sur le rôle de XPB dans la transcription du VIH-1 et de EBV, présentent XPB comme étant la cible de plusieurs virus afin d'optimiser leur propre transcription virale (Lacombe et al, 2016 ; Verma et al, 2020).

Cependant, la protéine Tax possède un rôle d'activateur transcriptionnel de certains promoteurs cellulaires codants pour différents facteurs impliqués dans la transcription, la prolifération, et la survie des lymphocytes T infectés (Yoshida et al, 1995 ; Boxus et al, 2008). Ce point soulève l'hypothèse d'une possible implication de XPB dans la transcription de gènes cellulaires modulés par Tax. Afin de tester cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser un séquençage aléatoire du transcriptome entier (*RNAseq*) de lymphocytes T infectés par HTLV-1 traitées à la SP. Cela permettrait d'observer de façon spécifique les conséquences de la dégradation de XPB sur le niveau d'expression de gènes cellulaires connus pour être modulés par Tax comme le gène codant pour la chaîne α du récepteur à l'IL2 (Inoue et al, 1986), l'IL6 (Yamashita et al, 1994) ou le CMH de classe 1 (Sawada et al, 1990). Les résultats apportés permettraient de définir précisément le rôle de Tax et XPB dans la transcription de gènes inductibles par Tax ayant un rôle dans le développement des pathologies associées à l'infection par HTLV-1.

XPB est un membre du complexe de transcription TFIIH, ayant des fonctions à la fois dans l'initiation de la transcription par l'ARN polymérase II, mais aussi dans la réparation de l'ADN par excision de nucléotide (NER) (Revue dans Rimel et Taatjes, 2018). L'étude ici réalisée s'est focalisée sur la sous-unité XPB et non sur le complexe TFIIH entier, et seulement dans le cadre de ces fonctions transcriptionnelles.

Même si le rôle de XPB dans la transcription du HTLV-1 est à présent décrit, le rôle du complexe TFIIH dans l'établissement de la transcription virale nécessite d'être étudié. Il serait ainsi intéressant d'observer si les autres membres de TFIIH sont eux aussi recrutés de façon comparable à XPB, par la mise au point d'immunoprécipitation de chromatine ciblant les principales autres sous-unités XPD, CDK7 ou p62. De plus, le recrutement de XPB semble être dépendant de la présence de la protéine virale Tax. Cette observation, associée aux résultats montrant que Tax et XPB interagissent directement, permettent d'émettre l'hypothèse d'un recrutement synchrone du complexe Tax-XPB au niveau du promoteur du HTLV-1. Afin de tester cette hypothèse, il serait judicieux de mettre au point des immunoprécipitations de chromatine successives des protéines Tax et XPB.

La protéine virale Tax possède la capacité de moduler différentes voies de réparation de l'ADN, dont la voie par excision de nucléotide, favorisant l'accumulation d'erreurs génétiques (Kao et Marriott, 1999). Cette voie de réparation implique le complexe TFIIH, qui permet l'ouverture du double brin d'ADN au niveau du site de réparation grâce à l'activité hélicase portée par les sous-unités XPD et XPB (Kokic et al, 2019). En faisant le parallèle entre le rôle de XPB comme co-facteur de Tax pour la transactivation du promoteur du HTLV-1, et son rôle dans la réparation de l'ADN, nous pouvons nous demander si le détournement de XPB par Tax, lors de l'établissement de la transcription virale, entraîne également un défaut de réparation de l'ADN par TFIIH. Pour tester cette hypothèse, il serait nécessaire d'utiliser des lymphocytes T, exprimant Tax et/ou XPB, irradiés par un rayonnement UV induisant des cassures de l'ADN, prises en charge par la machinerie du NER. L'efficacité de réparation des cassures induites peut être mesurée soit par la technique Unscheduled DNA Synthesis (UDS), déjà utilisé lors de l'étude du lien entre Tax et la voie NER (Kao et Marriott, 1999), ou la technique Single Cell Gel Electrophoresis assay (SCGE), aussi appelée Comet assay (Azqueta et al, 2014).

PARTIE 2 : Tax module la transcription antisens du HTLV-1

La compréhension des mécanismes impliqués dans la transcription depuis le LTR 5' du HTLV-1 est relativement avancée en regard de celle des mécanismes impliqués dans la transcription depuis le LTR 3'. Comme l'oncoprotéine Tax, produit de la transcription sens, l'oncoprotéine HBZ, codée en antisens du génome et dont l'expression est sous contrôle du LTR 3', possède un rôle majeur dans le développement des pathologies associées à l'infection par HTLV-1. Bien que les LTR 5' et 3' soient identiques (Lemasson et al, 2004), la régulation de l'expression des protéines Tax et HBZ n'est pas homogène. En effet, dans le cas des cellules ATL, l'expression de HBZ est conservée alors que celle de Tax est majoritairement perdue, mettant en évidence une régulation différentielle de l'expression de ces deux protéines, et donc des LTR 5' et 3'. A la vue du rôle de Tax en tant que transactivateur du LTR, nous nous sommes naturellement demandé si la protéine Tax possède un effet sur la transcription des ARN codant pour HBZ. Dans cette nouvelle étude, nous avons obtenu des résultats préliminaires suggérant que Tax possède un rôle activateur de la transcription de l'ARN de usHBZ, et impliquant une machinerie de transcription différente que celle impliquée dans la transcription depuis le LTR 5'.

Tax serait un activateur transcriptionnel de usHBZ dans un contexte proviral

Le premier point abordé est l'effet de l'inhibition de la transcriptions sens sur les niveaux des transcrits sHBZ et usHBZ. Nous avons précédemment démontré que la SP est un inhibiteur de la transactivation du LTR 5' du HTLV-1 par Tax. Nos résultats mettent, en outre, en évidence que, dans des lymphocytes T infectés par HTLV-1, l'inhibition de la transcription sens par la SP est également associée à une diminution du niveau d'ARN usHBZ et, de façon surprenante, à une augmentation du niveau d'ARN sHBZ. Il faut noter que l'hypothèse d'un effet direct de la SP sur les niveaux d'ARN de usHBZ et de sHBZ est contrée par l'absence d'effet du traitement SP dans la lignée MT1, dont la transcription sens est fortement réprimée. Ce résultat confirme que les effets observés lors du traitement SP sont spécifiquement dus à l'inhibition de la transcription sens et non à un effet secondaire de la SP, effet également observés lors de l'utilisation de PBMC immortalisés et infectés *in vivo* par HTLV-1.

Cette observation nous a permis de faire l'hypothèse qu'un élément, dont l'expression est sous contrôle du promoteur LTR 5', possède une activité régulatrice de l'expression des ARN usHBZ et sHBZ. Suite à la première étude réalisée sur la protéine Tax comme transactivateur

du promoteur du HTLV-1, notre attention s'est naturellement focalisée sur un possible effet de Tax sur l'expression des transcrits antisens du HTLV-1.

Cette hypothèse nous a amené à étudier les conséquences de la surexpression de Tax dans des lymphocytes T infectés par HTLV-1 sur les niveaux des ARN de usHBZ et sHBZ. Le premier modèle utilisé est la lignée MT1 de lymphocytes T infectés par HTLV-1 ayant la particularité de présenter une transcription sens virale quasi indétectable, alors que la transcription antisens est conservée. Puis, afin de s'affranchir de tout effet causé par la réactivation de la transcription sens lors de la surexpression de Tax dans les MT1, nous avons utilisés un second modèle, la lignée de lymphocytes T Jurkat possédant un mini génome CMV-Env-LTR3' (Figure 11) dans lequel le LTR 5', ainsi que la région GAG, PRO/POL, ont été remplacé par un promoteur CMV et dont le niveau de transcription est trop faible pour permettre la synthèse des protéines virales. Ce faible niveau de transcription depuis le promoteur CMV est associé à une forte répression du promoteur CMV contrôlant l'expression de transgène, phénomène fréquemment décrit (Revue dans Reeves, 2010). Dans ces deux modèles cellulaires, la surexpression de Tax est associée à une augmentation du niveau d'ARN de usHBZ, alors qu'aucun effet n'est observé sur le niveau d'ARN de sHBZ. Ce résultat place Tax comme un potentiel activateur de la transcription de l'ARN usHBZ, sans pour autant influencer le niveau d'ARN sHBZ. Mis en parallèle avec les résultats obtenus suite au traitement SP des différentes lignées de lymphocytes T infectés par HTLV-1, l'effet positif du traitement SP sur le niveau d'ARN sHBZ semble être indépendant de Tax car aucune conséquence de sa surexpression n'est observée sur le niveau d'ARN sHBZ. Pour ce qui est du transcrit usHBZ, on peut supposer que sa diminution suite au traitement SP est liée à la diminution de la production de Tax endogène, ne pouvant ainsi plus stimuler la transcription de usHBZ en antisens. Le fait que le site d'initiation de l'ARN de usHBZ soit en amont (orientation antisens) des séquences de réponse à Tax au niveau du LTR 3' (Figure 11) supporte l'hypothèse que Tax pourrait être un activateur de la transcription de usHBZ. Ces données représentent la première démonstration de l'importance de Tax sur l'expression du transcrit usHBZ dans le contexte de génomes viraux intégrés dans des lymphocytes T infectés par HTLV-1. Cela rejoint les découvertes réalisées en 2008 par Yoshida et al. montrant que, dans un modèle de transfection transitoire de plasmides indicateurs luciférase sous contrôle de différentes régions du LTR 3', Tax activerait le promoteur de usHBZ sans faire varier le niveau d'activation du promoteur de sHBZ (Yoshida et al, 2008). Les travaux réalisés par Lemasson et al. ont mis en évidence que la protéine Tax est recruté au niveau de la région U3 du LTR 3', région incluant des séquences de réponse à Tax (Lemasson et al, 2002). Mis en commun avec nos résultats, ces informations permettent de supposer que Tax induit

l'expression de l'ARN usHBZ via son recrutement au niveau des TxRE localisés dans la région U3 du LTR 3', définissant ainsi Tax comme étant également transactivateur du LTR 3'.

Les modèles cellulaires précédemment présentés, permettant la surexpression de Tax, nous offrent la possibilité d'exprimer le mutant M47 de Tax, qui ne peut pas transactiver le LTR 5'. Ce défaut est expliqué par la perte d'interaction entre Tax M47 et P/CAF, HAT dont le recrutement par Tax au niveau du LTR 5' est nécessaire à la mise en place de la machinerie de l'initiation de la transcription virale (Smith and Greene, 1990 ; Jiang et al, 1999). De façon surprenante, la surexpression de Tax M47 entraîne une augmentation du niveau d'ARN usHBZ comparable à celle observée suite à la surexpression de Tax WT. Cette observation permet de supposer que Tax activerait la transcription de usHBZ par une machinerie différente de celle impliquée dans la transcription depuis le LTR 5'. Or, l'étude réalisée par Yoshida et al. montre que la surexpression de Tax M47 ne permet pas l'activation du promoteur de usHBZ. Il faut noter que dans notre étude, nous utilisons un modèle de provirus intégré, à l'inverse de celle réalisée par Yoshida et al, basée des promoteurs transfectés. L'effet activateur de Tax M47 sur la transcription de usHBZ semble donc nécessiter une intégration de la séquence virale, que ce soit sous forme d'un génome complet (lignée MT1) ou partiel (lignée Jurkat CMV-Env-LTR). Cette information permet d'émettre l'hypothèse d'un effet en cis de la transcription sens sur la transcription antisens. L'existence d'une transcriptions sens au sein du provirus, même à un faible niveau, permettrait de maintenir l'ADN dans une conformation accessible aux facteurs de transcription, et cela le long du provirus, jusqu'au site de polyadénylation localisé dans la région R du LTR 3'. Cela dispenserait du recrutement des facteurs remodelant l'accessibilité de l'ADN au niveau du LTR 3' comme la HAT P/CAF, ce qui expliquerait l'activité du mutant Tax M47 sur l'activation de la transcription antisens de usHBZ.

Cependant, il faut garder en mémoire que Tax possède la capacité de contrôler de nombreuses voies de prolifération et d'activation des lymphocytes T, impliquées dans la modulation de l'expression de nombreux facteurs cellulaires. L'une des principales voies modulées par Tax étant la voie NF κ B, il ne faut pas négliger l'hypothèse que les effets activateurs de Tax sur le niveau d'ARN usHBZ pourraient être associés à la modulation de la voie NF κ B. En effet, le mutant Tax M47 conserve, au même titre que Tax WT, ses capacités d'induction de cette voie de prolifération. Afin d'éclaircir plus précisément le mécanisme responsable de l'augmentation du niveau d'ARN usHBZ par Tax, il est nécessaire d'étudier les effets de la modulation de la voie NF κ B sur la transcription antisens du HTLV-1. Afin de tester cette hypothèse, l'utilisation d'inhibiteur de la voie couplée à la surexpression de Tax dans les lignées MT1 et Jurkat CMV-

Env-LTR3' permettrait d'observer si l'augmentation du niveau d'ARN de usHBZ est corrélée à la surexpression de Tax indépendamment de l'activation de la voie NFκB.

Afin de permettre la meilleure expression possible du génome viral, la protéine virale Tax cible de nombreux facteurs de transcription et les détourne au niveau de son promoteur afin d'obtenir le niveau de transcription le plus élevé possible. En outre, la protéine Tax est aussi connue pour influencer la stabilité des ARN. Tax a été démontré comme étant capable d'interagir avec le facteur UPF1 (*Up-Frameshift Suppressor 1 Homolog*), impliqué dans l'activation du mécanisme de *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD). L'interaction entre Tax et UPF1 entraîne une diminution de l'affinité de UPF1 pour les ARN et permet donc d'inhiber leur dégradation par NMD (Fiorini et al, 2018), assurant ainsi une meilleure production des protéines virales. Dans le contexte de notre étude, cette information est importante car, la technique de RT-qPCR, informant seulement sur la quantité finale d'ARN, ne permet pas de discriminer un effet transcriptionnel d'un effet post-transcriptionnel. Il serait donc important d'étudier cet aspect par la réalisation de la technique du *Nuclear Run On* qui permet d'observer la néotranscription des ARN totaux *in vitro*, sans qu'ils soient ensuite soumis aux différents processus de maturation (Roberts et al, 2015). L'approche de surexpression de Tax dans les deux modèles MT1 et Jurkat CMV-Env-LTR3' pourra être conservé afin de réaliser la technique du *Nuclear Run On* et ainsi observer si, en absence d'évènement post-transcriptionnels, Tax conserve son habilité à augmenter le niveau d'ARN usHBZ, confirmant l'implication d'un mécanisme transcriptionnel et non post-transcriptionnel. De plus, l'utilisation de cette technique avec des lymphocytes T infectés par HTLV-1 traités à la SP pourrait nous informer sur le mécanisme impliqué dans l'augmentation du niveau d'ARN sHBZ lors de l'inhibition de la transcription sens, qui reste actuellement sans explication.

La SP, un antiviral efficace contre l'infection par HTLV-1 ?

La SP est une drogue couramment utilisée dans le traitement de l'hypertension artérielle et elle est associée à très peu d'effets indésirables, en faisant un bon candidat thérapeutique (Lainscak et al, 2015). Cependant, la concentration utilisée afin d'induire la dégradation de la protéine XPB *in vitro* est largement supérieure à la concentration pharmacologique utilisée dans le cas du traitement de l'hypertension artérielle. De plus, l'absence ou la perte d'activité de la protéine XPB *in vivo* est associée à la pathologie Xeroderma Pigmentosum, qui consiste en un défaut de

réparation de l'ADN cassés à la suite de dégâts causés par une exposition aux UV (Sijbers et al, 1996). Or, un haut niveau de dégradation de XPB est nécessaire afin d'inhiber l'expression du HTLV-1, ce qui signifie que l'utilisation physiologique de la SP pour cette fonction aurait des effets secondaires majeurs rejoignant la pathologie Xeroderma Pigmentosum. Cependant, la voie de réparation impliquant la protéine XPB permet aussi la réparation des dommages à l'ADN causés par les approches thérapeutiques par chimiothérapies et radiothérapies dans le traitement de cancer. L'utilisation de la SP en amont de ces traitements permettrait d'inhiber la réparation des dommages à l'ADN y étant associés et ainsi augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses à ces derniers (Gabbard et al, 2020). Dans le cas des traitements des formes aiguës d'ATL, il serait intéressant d'étudier si le pré-traitement à la SP, en amont des chimiothérapies conventionnelles, serait associé à une meilleure éradication des cellules leucémiques, augmentant ainsi l'efficacité des traitements existants.

Indépendamment des effets cytotoxiques associés à la dégradation de XPB, nous avons néanmoins pu observer que l'inhibition de la transcription sens par la SP est associée à une induction de la production de l'ARN sHBZ. Il est nécessaire de rappeler que dans le cas des cellules ATL, la transcription sens, dont la protéine Tax, est inexistante alors que l'expression de HBZ est maintenue. Ce profil d'expression des oncoprotéines Tax et HBZ, spécifique aux cellules ATL, n'est pas sans rappeler celui obtenu dans le cas des lymphocytes T infectés par HTLV-1 à la suite du traitement à la SP, comparable aux cellules ATL. Il semble donc plutôt dangereux d'utiliser la SP pour bloquer l'infection par HTLV-1 puisque ceci pourrait favoriser l'apparition de clones infectés par HTLV-1 ayant un profil d'expression des oncoprotéines Tax et HBZ semblables aux clones leucémiques retrouvés dans les cas d'ATL.

Les deux études présentées dans ma thèse documentent le rôle de Tax en tant que transactivateur du LTR du HTLV-1. Dans un premier temps, nous avons caractérisé XPB comme étant un cofacteur de la transactivation du LTR 5' par Tax, nécessaire à l'établissement de l'initiation de la transcription virale. Puis, dans un second temps, nous avons mis en lumière un nouveau rôle de Tax comme étant un inducteur de la synthèse de l'ARN de usHBZ, mettant en perspective un rôle encore non décrit de Tax comme transactivateur du LTR 3' dans un contexte proviral.

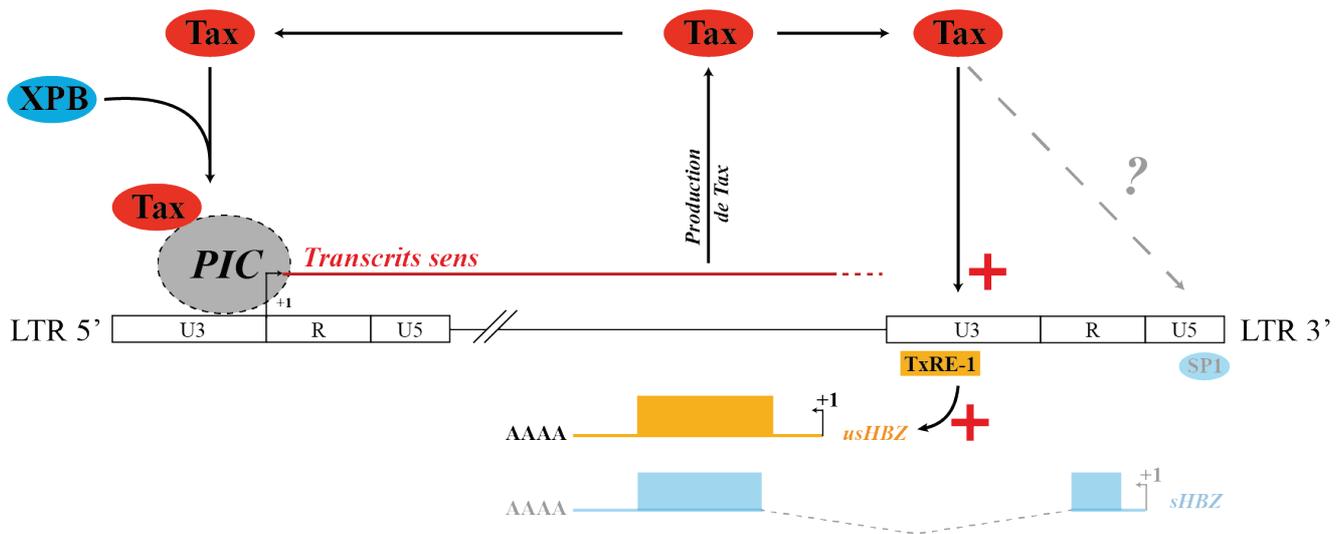


Figure 16 : Modèle proposant Tax comme transactivateur du LTR 5' et du LTR 3'

Dans un premier temps, nous avons montré que XPB est un nouveau co-facteur de la transcription du HTLV-1 détourné par Tax afin d'optimiser la transcription virale.

Dans un second temps, nous avons mis en évidence un rôle activateur de la protéine Tax sur la transcription de l'ARN usHBZ, permettant de supposer un nouveau rôle de Tax en tant que transactivateur du LTR 3', via une machinerie différente que celle impliquée dans la transactivation du LTR 5'

V. BIBLIOGRAPHIE

- Alefantis T, Barmak K, Harhaj EW, Grant C, Wigdahl B. Characterization of a Nuclear Export Signal within the Human T Cell Leukemia Virus Type I Transactivator Protein Tax. *J Biol Chem.* 13 juin 2003;278(24):21814-22.
- Alekseev S, Ayadi M, Brino L, Egly J-M, Larsen AK, Coin F. A Small Molecule Screen Identifies an Inhibitor of DNA Repair Inducing the Degradation of TFIIH and the Chemosensitization of Tumor Cells to Platinum. *Chemistry & Biology.* mars 2014;21(3):398-407.
- Alekseev S, Nagy Z, Sandoz J, Weiss A, Egly J-M, Le May N, et al. Transcription without XPB Establishes a Unified Helicase-Independent Mechanism of Promoter Opening in Eukaryotic Gene Expression. *Molecular Cell.* févr 2017;65(3):504-514.e4.
- Anderson MG, Dynan WS. Quantitative studies of the effect of HTLV-I Tax protein on CREB protein--DNA binding. *Nucleic Acids Res.* 11 août 1994;22(15):3194-201.
- Anderson MG, Scoggin KE, Simbulan-Rosenthal CM, Steadman JA. Identification of poly(ADP-ribose) polymerase as a transcriptional coactivator of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *J Virol.* mars 2000;74(5):2169-77.
- Ando Y, Nakano S, Saito K, Shimamoto I, Ichijo M, Toyama T, et al. Transmission of adult T-cell leukemia retrovirus (HTLV-I) from mother to child: comparison of bottle- with breast-fed babies. *Jpn J Cancer Res.* avr 1987;78(4):322-4.
- Arnold J, Zimmerman B, Li M, Lairmore MD, Green PL. Human T-cell leukemia virus type-1 antisense-encoded gene, Hbz, promotes T-lymphocyte proliferation. *Blood.* 2008;112(9):3788-3797.
- Azqueta A, Slyskova J, Langie SAS, O'Neill Gaivão I, Collins A. Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. *Front Genet [Internet].* 25 août 2014 [cité 23 sept 2020];5. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4142706/>
- Baltimore D. Viral RNA-dependent DNA Polymerase: RNA-dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses. *Nature.* juin 1970;226(5252):1209-11.
- Bangham CRM, Araujo A, Yamano Y, Taylor GP. HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Nat Rev Dis Primers.* déc 2015;1(1):15012.
- Bangham CRM, Cook LB, Melamed A. HTLV-1 clonality in adult T-cell leukaemia and non-malignant HTLV-1 infection. *Seminars in Cancer Biology.* juin 2014;26:89-98.
- Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* mars 2011;21(3):381-95.
- Baratella M, Forlani G, Raval GU, Tedeschi A, Gout O, Gessain A, et al. Cytoplasmic Localization of HTLV-1 HBZ Protein: A Biomarker of HTLV-1-Associated

- Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). Kashanchi F, éditeur. PLOS Neglected Tropical Diseases. 17 janv 2017;11(1):e0005285.
- Barbeau B, Mesnard J-M. Does chronic infection in retroviruses have a sense? Trends in Microbiology. juin 2015;23(6):367-75.
- Barnhart MK, Connor LM, Marriott SJ. Function of the human T-cell leukemia virus type 1 21-base-pair repeats in basal transcription. Journal of virology. 1997;71(1):337-44.
- Basbous J, Arpin C, Gaudray G, Piechaczyk M, Devaux C, Mesnard J-M. The HBZ factor of human T-cell leukemia virus type I dimerizes with transcription factors JunB and c-Jun and modulates their transcriptional activity. J Biol Chem. 31 oct 2003;278(44):43620-7.
- Basehoar AD, Zanton SJ, Pugh BF. Identification and distinct regulation of yeast TATA box-containing genes. Cell. 5 mars 2004;116(5):699-709.
- Baumann M, Pontiller J, Ernst W. Structure and Basal Transcription Complex of RNA Polymerase II Core Promoters in the Mammalian Genome: An Overview. Mol Biotechnol. juill 2010;45(3):241-7.
- Baydoun HH, Bai XT, Shelton S, Nicot C. HTLV-I Tax Increases Genetic Instability by Inducing DNA Double Strand Breaks during DNA Replication and Switching Repair to NHEJ. Harhaj E, éditeur. PLoS ONE. 20 août 2012;7(8):e42226.
- Becker JS, Nicetto D, Zaret KS. H3K9me3-Dependent Heterochromatin: Barrier to Cell Fate Changes. Trends Genet. janv 2016;32(1):29-41.
- Bellon M, Baydoun HH, Yao Y, Nicot C. HTLV-I Tax-dependent and -independent events associated with immortalization of human primary T lymphocytes. Blood. 25 mars 2010;115(12):2441-8.
- Bellon M, Nicot C. Multiple Pathways Control the Reactivation of Telomerase in HTLV-I-Associated Leukemia. Int J Cancer Oncol. 2 juin 2015;2(2).
- Bex F, McDowall A, Burny A, Gaynor R. The human T-cell leukemia virus type 1 transactivator protein Tax colocalizes in unique nuclear structures with NF-kappaB proteins. J Virol. mai 1997;71(5):3484-97.
- Bhat NK, Adachi Y, Samuel KP, Derse D. HTLV-1 gene expression by defective proviruses in an infected T-cell line. Virology. sept 1993;196(1):15-24.
- Bittinger MA, McWhinnie E, Meltzer J, Iourgenko V, Latario B, Liu X, et al. Activation of cAMP response element-mediated gene expression by regulated nuclear transport of TORC proteins. Curr Biol. 14 déc 2004;14(23):2156-61.
- Blot V, Perugi F, Gay B, Prévost M-C, Briant L, Tangy F, et al. Nedd4.1-mediated ubiquitination and subsequent recruitment of Tsg101 ensure HTLV-1 Gag trafficking towards the multivesicular body pathway prior to virus budding. J Cell Sci. 1 mai 2004;117(Pt 11):2357-67.

- Bogenberger JM, Laybourn PJ. Human T Lymphotropic Virus Type 1 protein Tax reduces histone levels. *Retrovirology*. 31 janv 2008;5:9.
- Boxus M, Twizere J-C, Legros S, Dewulf J-F, Kettmann R, Willems L. The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology*. 2008;5(1):76.
- Brauweiler A, Garl P, Franklin AA, Giebler HA, Nyborg JK. A molecular mechanism for human T-cell leukemia virus latency and Tax transactivation. *J Biol Chem*. 26 mai 1995;270(21):12814-22.
- Brès V, Yoh SM, Jones KA. The multi-tasking P-TEFb complex. *Current Opinion in Cell Biology*. juin 2008;20(3):334-40.
- Burton M, Upadhyaya CD, Maier B, Hope TJ, Semmes OJ. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax shuttles between functionally discrete subcellular targets. *J Virol*. mars 2000;74(5):2351-64.
- Caron C, Rousset R, Béraud C, Moncollin V, Egly JM, Jalinot P. Functional and biochemical interaction of the HTLV-I Tax1 transactivator with TBP. *EMBO J*. nov 1993;12(11):4269-78.
- Caron C, Mengus G, Dubrowskaya V, Roisin A, Davidson I, Jalinot P. Human TAF(II)28 interacts with the human T cell leukemia virus type I Tax transactivator and promotes its transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 15 avr 1997;94(8):3662-7.
- Cavanagh M-H, Landry S, Audet B, Arpin-André C, Hivin P, Paré M-È, et al. HTLV-I antisense transcripts initiating in the 3'LTR are alternatively spliced and polyadenylated. *Retrovirology*. 2 mars 2006;3:15.
- Ching Y-P, Chun ACS, Chin K-T, Zhang Z-Q, Jeang K-T, Jin D-Y. Specific TATAA and bZIP requirements suggest that HTLV-I Tax has transcriptional activity subsequent to the assembly of an initiation complex. *Retrovirology*. 30 juill 2004;1:18.
- Cho W-K, Jang MK, Huang K, Pise-Masison CA, Brady JN. Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Tax Protein Complexes with P-TEFb and Competes for Brd4 and 7SK snRNP/HEXIM1 Binding. *Journal of Virology*. 15 déc 2010;84(24):12801-9.
- Cho W-K, Zhou M, Jang MK, Huang K, Jeong S-J, Ozato K, et al. Modulation of the Brd4/P-TEFb Interaction by the Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Tax Protein. *Journal of Virology*. 15 oct 2007;81(20):11179-86.
- Clemens KE, Piras G, Radonovich MF, Choi KS, Duvall JF, DeJong J, et al. Interaction of the human T-cell lymphotropic virus type 1 tax transactivator with transcription factor IIA. *Molecular and Cellular Biology*. 1996;16(9):4656-4664.
- Clerc I, Polakowski N, André-Arpin C, Cook P, Barbeau B, Mesnard J-M, et al. An interaction between the human T cell leukemia virus type 1 basic leucine zipper factor (HBZ) and the KIX domain of p300/CBP contributes to the down-regulation of tax-dependent viral transcription by HBZ. *J Biol Chem*. 29 août 2008;283(35):23903-13.

- Coin F, Egly J-M. Revisiting the Function of CDK7 in Transcription by Virtue of a Recently Described TFIIH Kinase Inhibitor. *Molecular Cell*. août 2015;59(4):513-4.
- Coin F, Oksenyich V, Egly J-M. Distinct roles for the XPB/p52 and XPD/p44 subcomplexes of TFIIH in damaged DNA opening during nucleotide excision repair. *Mol Cell*. 27 avr 2007;26(2):245-56.
- Compe E, Egly J-M. TFIIH: when transcription met DNA repair. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 10 mai 2012;13(6):343-54.
- Conaway JW, Hanley JP, Garrett KP, Conaway RC. Transcription initiated by RNA polymerase II and transcription factors from liver. Structure and action of transcription factors epsilon and tau. *J Biol Chem*. 25 avr 1991;266(12):7804-11.
- Conkright MD, Canettieri G, Sreaton R, Guzman E, Miraglia L, Hogenesch JB, et al. TORCs: transducers of regulated CREB activity. *Mol Cell*. août 2003;12(2):413-23.
- Cullen BR, Lomedico PT, Ju G. Transcriptional interference in avian retroviruses—implications for the promoter insertion model of leukaemogenesis. *Nature*. janv 1984;307(5948):241-5.
- D'Agostino DM, Cavallari I, Romanelli MG, Ciminale V. Post-transcriptional Regulation of HTLV Gene Expression: Rex to the Rescue. *Front Microbiol*. 2019;10:1958.
- Datta S, Kothari NH, Fan H. Induction of Tax I Expression in MT-4 Cells by 5-Azacytidine Leads to Protein Binding in the HTLV-I LTR in Vivo. *Virology*. mai 2001;283(2):207-14.
- de la Fuente C, Gupta MV, Klase Z, Strouss K, Cahan P, McCaffery T, et al. Involvement of HTLV-I Tax and CREB in aneuploidy: a bioinformatics approach. *Retrovirology*. 5 juill 2006;3:43.
- Derse D, Crise B, Li Y, Princler G, Lum N, Stewart C, et al. Human T-cell leukemia virus type 1 integration target sites in the human genome: comparison with those of other retroviruses. *J Virol*. juin 2007;81(12):6731-41.
- Ding W, Albrecht B, Kelley RE, Muthusamy N, Kim S-J, Altschuld RA, et al. Human T-cell lymphotropic virus type 1 p12(I) expression increases cytoplasmic calcium to enhance the activation of nuclear factor of activated T cells. *J Virol*. oct 2002;76(20):10374-82.
- Dissinger N, Shkriabai N, Hess S, Al-Saleem J, Kvaratskhelia M, Green PL. Identification and characterization of HTLV-1 HBZ post-translational modifications. *PLoS ONE*. 2014;9(11):e112762.
- Ducu RI, Dayaram T, Marriott SJ. The HTLV-1 Tax oncoprotein represses Ku80 gene expression. *Virology*. 20 juill 2011;416(1-2):1-8.
- Duvall JF, Kashanchi F, Cvekl A, Radonovich MF, Piras G, Brady JN. Transactivation of the human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax1-responsive 21-base-pair repeats requires Holo-TFIID and TFIIA. *J Virol*. août 1995;69(8):5077-86.

- Edwards D, Fenizia C, Gold H, de Castro-Amarante MF, Buchmann C, Pise-Masison CA, et al. Orf-I and orf-II-encoded proteins in HTLV-1 infection and persistence. *Viruses*. 2011;3(6):861-85.
- Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. nov 2003;3(11):859-68.
- Ego T, Ariumi Y, Shimotohno K. The interaction of HTLV-1 Tax with HDAC1 negatively regulates the viral gene expression. *Oncogene*. 17 oct 2002;21(47):7241-6.
- Ego T, Tanaka Y, Shimotohno K. Interaction of HTLV-1 Tax and methyl-CpG-binding domain 2 positively regulates the gene expression from the hypermethylated LTR. *Oncogene*. 10 mars 2005;24(11):1914-23.
- Elinoff JM, Chen L-Y, Dougherty EJ, Awad KS, Wang S, Biancotto A, et al. Spironolactone-induced degradation of the TFIIH core complex XPB subunit suppresses NF- κ B and AP-1 signalling. *Cardiovascular Research*. 1 janv 2018;114(1):65-76.
- Ellis J. Silencing and variegation of gammaretrovirus and lentivirus vectors. *Hum Gene Ther*. nov 2005;16(11):1241-6.
- Fiorini F, Robin J-P, Kanaan J, Borowiak M, Croquette V, Le Hir H, et al. HTLV-1 Tax plugs and freezes UPF1 helicase leading to nonsense-mediated mRNA decay inhibition. *Nat Commun*. 30 2018;9(1):431.
- Fochi S, Mutascio S, Bertazzoni U, Zipeto D, Romanelli MG. HTLV Deregulation of the NF- κ B Pathway: An Update on Tax and Antisense Proteins Role. *Front Microbiol*. 2018;9:285.
- Forgacs E, Gupta SK, Kerry JA, Semmes OJ. The bZIP transcription factor ATFx binds human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax and represses HTLV-1 long terminal repeat-mediated transcription. *J Virol*. juin 2005;79(11):6932-9.
- Fu T-J, Peng J, Lee G, Price DH, Flores O. Cyclin K Functions as a CDK9 Regulatory Subunit and Participates in RNA Polymerase II Transcription. *J Biol Chem*. 3 déc 1999;274(49):34527-30.
- Fujikawa D, Nakagawa S, Hori M, Kurokawa N, Soejima A, Nakano K, et al. Polycomb-dependent epigenetic landscape in adult T-cell leukemia. *Blood*. 7 avr 2016;127(14):1790-802.
- Fujino T, Nagata Y. HTLV-I transmission from mother to child. *J Reprod Immunol*. juill 2000;47(2):197-206.
- Fukumoto R. Human T-lymphotropic virus type 1 non-structural proteins: Requirements for latent infection. *Cancer Sci*. août 2013;104(8):983-8.
- Futsch N, Mahieux R, Dutartre H. HTLV-1, the Other Pathogenic Yet Neglected Human Retrovirus: From Transmission to Therapeutic Treatment. *Viruses*. 21 déc 2017;10(1):1.

- Gabbard, Ryan D., et al. « Spironolactone and XPB: An Old Drug with a New Molecular Target ». *Biomolecules*, vol. 10, no 5, mai 2020, p. 756. DOI.org (Crossref), doi:10.3390/biom10050756.
- Gallo RC. History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. *Oncogene*. sept 2005;24(39):5926-30.
- Gaudray G, Gachon F, Basbous J, Biard-Piechaczyk M, Devaux C, Mesnard J-M. The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. *J Virol*. déc 2002;76(24):12813-22.
- Gazon H, Barbeau B, Mesnard J-M, Peloponese J-M. Hijacking of the AP-1 Signaling Pathway during Development of ATL. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 15 janv 2018 [cité 5 févr 2018];8. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.02686/full>
- Gegonne A, Devaiah BN, Singer DS. TAF7: Traffic controller in transcription initiation. *Transcription*. janv 2013;4(1):29-33.
- Geiger TR, Sharma N, Kim Y-M, Nyborg JK. The human T-cell leukemia virus type 1 tax protein confers CBP/p300 recruitment and transcriptional activation properties to phosphorylated CREB. *Mol Cell Biol*. févr 2008;28(4):1383-92.
- Georges SA, Kraus WL, Luger K, Nyborg JK, Laybourn PJ. p300-mediated tax transactivation from recombinant chromatin: histone tail deletion mimics coactivator function. *Mol Cell Biol*. janv 2002;22(1):127-37.
- Gessain A, Barin F, Vernant JC, Gout O, Maurs L, Calender A, et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet*. 24 août 1985;2(8452):407-10.
- Gessain A, Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2012 [cité 11 avr 2017];3. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2012.00388/abstract>
- Ghirlando R, Felsenfeld G. CTCF: making the right connections. *Genes Dev*. 15 avr 2016;30(8):881-91.
- Giam CZ, Xu YL. HTLV-I tax gene product activates transcription via pre-existing cellular factors and cAMP responsive element. *J Biol Chem*. 15 sept 1989;264(26):15236-41.
- Giebler HA, Loring JE, van Orden K, Colgin MA, Garrus JE, Escudero KW, et al. Anchoring of CREB binding protein to the human T-cell leukemia virus type 1 promoter: a molecular mechanism of Tax transactivation. *Mol Cell Biol*. sept 1997;17(9):5156-64.
- Gonçalves DU, Proietti FA, Ribas JGR, Araújo MG, Pinheiro SR, Guedes AC, et al. Epidemiology, Treatment, and Prevention of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Associated Diseases. *CMR*. juill 2010;23(3):577-89.

- Goon PKC, Biancardi A, Fast N, Igakura T, Hanon E, Mosley AJ, et al. Human T cell lymphotropic virus (HTLV) type-1-specific CD8+ T cells: frequency and immunodominance hierarchy. *J Infect Dis.* 15 juin 2004;189(12):2294-8.
- Gout O, Baulac M, Gessain A, Semah F, Saal F, Périès J, et al. Rapid Development of Myelopathy after HTLV-I Infection Acquired by Transfusion during Cardiac Transplantation. *New England Journal of Medicine.* 8 févr 1990;322(6):383-8.
- Grant C, Nonnemacher M, Jain P, Pandya D, Irish B, Williams SC, et al. CCAAT/enhancer-binding proteins modulate human T cell leukemia virus type 1 long terminal repeat activation. *Virology.* 10 mai 2006;348(2):354-69.
- Grassmann R, Dengler C, Müller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, McGuire K, Dokhelar M-C, et al. Transformation to continuous growth of primary human T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type I X-region genes transduced by a Herpesvirus saimiri vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1989;86(9):3351–3355.
- Gröne M, Koch C, Grassmann R. The HTLV-1 Rex protein induces nuclear accumulation of unspliced viral RNA by avoiding intron excision and degradation. *Virology.* 15 avr 1996;218(2):316-25.
- Gross L. « Spontaneous » leukemia developing in C3H mice following inoculation in infancy, with AK-leukemic extracts, or AK-embryos. *Proc Soc Exp Biol Med.* janv 1951;76(1):27-32.
- Groussaud D, Khair M, Tollenaere AI, Waast L, Kuo M-S, Mangeney M, et al. Hijacking of the O-GlcNAcZYME complex by the HTLV-1 Tax oncoprotein facilitates viral transcription. *PLoS Pathog* [Internet]. 24 juill 2017 [cité 20 oct 2017];13(7). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5542696/>
- Guzmán E, Lis JT. Transcription Factor TFIIF Is Required for Promoter Melting In Vivo. *Mol Cell Biol.* août 1999;19(8):5652-8.
- Hagiya K, Yasunaga J-I, Satou Y, Ohshima K, Matsuoka M. ATF3, an HTLV-1 bZip factor binding protein, promotes proliferation of adult T-cell leukemia cells. *Retrovirology.* 17 mars 2011;8:19.
- Hahn S. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nature Structural & Molecular Biology.* mai 2004;11(5):394-403.
- Hahn WC, Meyerson M. Telomerase activation, cellular immortalization and cancer. *Ann Med.* mars 2001;33(2):123-9.
- Hakata Y, Umemoto T, Matsushita S, Shida H. Involvement of human CRM1 (exportin 1) in the export and multimerization of the Rex protein of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol.* août 1998;72(8):6602-7.
- Hanly SM, Rimsky LT, Malim MH, Kim JH, Hauber J, Duc Dodon M, et al. Comparative analysis of the HTLV-I Rex and HIV-1 Rev trans-regulatory proteins and their RNA response elements. *Genes Dev.* oct 1989;3(10):1534-44.

- Harhaj EW, Giam C-Z. NF- κ B signaling mechanisms in HTLV-1-induced adult T-cell leukemia/lymphoma. *FEBS J.* 2018;285(18):3324-36.
- Harrod R, Kuo YL, Tang Y, Yao Y, Vassilev A, Nakatani Y, et al. p300 and p300/cAMP-responsive element-binding protein associated factor interact with human T-cell lymphotropic virus type-1 Tax in a multi-histone acetyltransferase/activator-enhancer complex. *J Biol Chem.* 21 avr 2000;275(16):11852-7.
- Hasegawa H, Sawa H, Lewis MJ, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, et al. Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat Med.* avr 2006;12(4):466-72.
- Hayami M, Komuro A, Nozawa K, Shotake T, Ishikawa K, Yamamoto K, et al. Prevalence of antibody to adult T-cell leukemia virus-associated antigens (ATLA) in Japanese monkeys and other non-human primates. *Int J Cancer.* 15 févr 1984;33(2):179-83.
- Heidecker G, Lloyd PA, Fox K, Nagashima K, Derse D. Late Assembly Motifs of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 and Their Relative Roles in Particle Release. *J Virol.* juin 2004;78(12):6636-48.
- Hermine O, Ramos JC, Tobinai K. A Review of New Findings in Adult T-cell Leukemia–Lymphoma: A Focus on Current and Emerging Treatment Strategies. *Adv Ther.* févr 2018;35(2):135-52.
- Hidaka M, Inoue J, Yoshida M, Seiki M. Post-transcriptional regulator (rex) of HTLV-1 initiates expression of viral structural proteins but suppresses expression of regulatory proteins. *EMBO J.* févr 1988;7(2):519-23.
- Hino S, Katamine S, Miyata H, Tsuji Y, Yamabe T, Miyamoto T. Primary prevention of HTLV-1 in Japan. *Leukemia.* avr 1997;11 Suppl 3:57-9.
- Hishiki T, Ohshima T, Ego T, Shimotohno K. BCL3 Acts as a Negative Regulator of Transcription from the Human T-cell Leukemia Virus Type 1 Long Terminal Repeat through Interactions with TORC3. *Journal of Biological Chemistry.* 28 sept 2007;282(39):28335-43.
- Hivin P, Gaudray G, Devaux C, Mesnard J-M. Interaction between C/EBPbeta and Tax down-regulates human T-cell leukemia virus type I transcription. *Virology.* 20 janv 2004;318(2):556-65.
- Ho Y-K, Zhi H, DeBiaso D, Philip S, Shih H-M, Giam C-Z. HTLV-1 tax-induced rapid senescence is driven by the transcriptional activity of NF- κ B and depends on chronically activated IKK α and p65/RelA. *J Virol.* sept 2012;86(17):9474-83.
- Hou W-H, Chen S-H, Yu X. Poly-ADP ribosylation in DNA damage response and cancer therapy. *Mutat Res.* juin 2019;780:82-91.
- Igakura T. Spread of HTLV-I Between Lymphocytes by Virus-Induced Polarization of the Cytoskeleton. *Science.* 14 mars 2003;299(5613):1713-6.

- Imbalzano AN, Zaret KS, Kingston RE. Transcription factor (TF) IIB and TFIIA can independently increase the affinity of the TATA-binding protein for DNA. *J Biol Chem.* 18 mars 1994;269(11):8280-6.
- Inoue J, Seiki M, Taniguchi T, Tsuru S, Yoshida M. Induction of interleukin 2 receptor gene expression by p40x encoded by human T-cell leukemia virus type 1. *EMBO J.* nov 1986;5(11):2883-8.
- Ishida T, Jo T, Takemoto S, Suzushima H, Uozumi K, Yamamoto K, et al. Dose-intensified chemotherapy alone or in combination with mogamulizumab in newly diagnosed aggressive adult T-cell leukaemia-lymphoma: a randomized phase II study. *Br J Haematol.* juin 2015;169(5):672-82.
- Jeang KT, Chiu R, Santos E, Kim SJ. Induction of the HTLV-I LTR by Jun occurs through the Tax-responsive 21-bp elements. *Virology.* mars 1991;181(1):218-27.
- Jeang KT, Widen SG, Semmes OJ, Wilson SH. HTLV-I trans-activator protein, tax, is a trans-repressor of the human beta-polymerase gene. *Science.* 2 mars 1990;247(4946):1082-4.
- Jeong S-J, Lu H, Cho W-K, Park HU, Pise-Masison C, Brady JN. Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 enhances transcriptional activity of the human T-cell lymphotropic virus type 1 long terminal repeat through direct interaction with Tax. *J Virol.* oct 2006;80(20):10036-44.
- Jiang H, Lu H, Schiltz RL, Pise-Masison CA, Ogryzko VV, Nakatani Y, et al. PCAF interacts with tax and stimulates tax transactivation in a histone acetyltransferase-independent manner. *Mol Cell Biol.* déc 1999;19(12):8136-45.
- Johannessen M, Delghandi MP, Moens U. What turns CREB on? *Cell Signal.* nov 2004;16(11):1211-27.
- Johnson JM, Harrod R, Franchini G. Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukaemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1). *Int J Exp Pathol.* juin 2001;82(3):135-47.
- Jones KS, Lambert S, Bouttier M, Bénit L, Ruscetti FW, Hermine O, et al. Molecular Aspects of HTLV-1 Entry: Functional Domains of the HTLV-1 Surface Subunit (SU) and Their Relationships to the Entry Receptors. *Viruses.* 15 juin 2011;3(12):794-810.
- Juven-Gershon T, Hsu J-Y, Theisen JW, Kadonaga JT. The RNA polymerase II core promoter — the gateway to transcription. *Current Opinion in Cell Biology.* juin 2008;20(3):253-9.
- Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science.* 5 nov 1982;218(4572):571-3.
- Kamoi K, Yamamoto K, Misawa A, Miyake A, Ishida T, Tanaka Y, et al. SUV39H1 interacts with HTLV-1 Tax and abrogates Tax transactivation of HTLV-1 LTR. *Retrovirology.* 13 janv 2006;3:5.

- Kao S-Y, Marriott SJ. Disruption of Nucleotide Excision Repair by the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Protein. *J Virol.* mai 1999;73(5):4299-304.
- Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A, Shiraishi Y, Shimamura T, Yasunaga J, et al. Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nat Genet.* nov 2015;47(11):1304-15.
- Katsuya H, Ishitsuka K, Utsunomiya A, Hanada S, Eto T, Moriuchi Y, et al. Treatment and survival among 1594 patients with ATL. *Blood.* 10 déc 2015;126(24):2570-7.
- Kazanji M, Mouinga-Ondémé A, Lekana-Douki-Etenna S, Caron M, Makuwa M, Mahieux R, et al. Origin of HTLV-1 in hunters of nonhuman primates in Central Africa. *J Infect Dis.* 1 févr 2015;211(3):361-5.
- Kchour G, Tarhini M, Kooshyar M-M, El Hajj H, Wattel E, Mahmoudi M, et al. Phase 2 study of the efficacy and safety of the combination of arsenic trioxide, interferon alpha, and zidovudine in newly diagnosed chronic adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL). *Blood.* 25 juin 2009;113(26):6528-32.
- Kibler KV, Jeang KT. CREB/ATF-dependent repression of cyclin a by human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *J Virol.* mars 2001;75(5):2161-73.
- Kim Y-M, Ramírez JA, Mick JE, Giebler HA, Yan J-P, Nyborg JK. Molecular characterization of the Tax-containing HTLV-1 enhancer complex reveals a prominent role for CREB phosphorylation in Tax transactivation. *J Biol Chem.* 29 juin 2007;282(26):18750-7.
- Kim Y-M, Ramírez JA, Mick JE, Giebler HA, Yan J-P, Nyborg JK. Molecular characterization of the Tax-containing HTLV-1 enhancer complex reveals a prominent role for CREB phosphorylation in Tax transactivation. *J Biol Chem.* 29 juin 2007;282(26):18750-7.
- Kira J, Nakamura M, Sawada T, Koyanagi Y, Ohori N, Itoyama Y, et al. Antibody titers to HTLV-I-p40tax protein and gag-env hybrid protein in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: correlation with increased HTLV-I proviral DNA load. *J Neurol Sci.* janv 1992;107(1):98-104.
- Koiwa T, Hamano-Usami A, Ishida T, Okayama A, Yamaguchi K, Kamihira S, et al. 5'-Long Terminal Repeat-Selective CpG Methylation of Latent Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Provirus In Vitro and In Vivo. *Journal of Virology.* 15 sept 2002;76(18):9389-97.
- Kokic G, Chernev A, Tegunov D, Dienemann C, Urlaub H, Cramer P. Structural basis of TFIIH activation for nucleotide excision repair. *Nat Commun.* 28 2019;10(1):2885.
- Komuro A, Watanabe T, Miyoshi I, Hayami M, Tsujimoto H, Seiki M, et al. Detection and characterization of simian retroviruses homologous to human T-cell leukemia virus type I. *Virology.* 30 oct 1984;138(2):373-8.
- Konesky KL, Nyborg JK, Laybourn PJ. Tax abolishes histone H1 repression of p300 acetyltransferase activity at the human T-cell leukemia virus type 1 promoter. *J Virol.* nov 2006;80(21):10542-53.

- Koralnik IJ, Gessain A. Virus HTLV-1: structure et fonction des protéines de la région pX. :10.
- Kostrewa D, Zeller ME, Armache K-J, Seizl M, Leike K, Thomm M, et al. RNA polymerase II-TFIIB structure and mechanism of transcription initiation. *Nature*. 19 nov 2009;462(7271):323-30.
- Kouzine F, Wojtowicz D, Yamane A, Resch W, Kieffer-Kwon K-R, Bandle R, et al. Global Regulation of Promoter Melting in Naive Lymphocytes. *Cell*. mai 2013;153(5):988-99.
- Koyanagi Y, Itoyama Y, Nakamura N, Takamatsu K, Kira J, Iwamasa T, et al. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology*. sept 1993;196(1):25-33.
- Ku SCY, Lee J, Lau J, Gurumurthy M, Ng R, Lwa SH, et al. XBP-1, a Novel Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) Tax Binding Protein, Activates HTLV-1 Basal and Tax-Activated Transcription. *JVI*. 1 mai 2008;82(9):4343-53.
- Kuhlmann A-S, Villaudy J, Gazzolo L, Castellazzi M, Mesnard J-M, Duc Dodon M. HTLV-1 HBZ cooperates with JunD to enhance transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Retrovirology*. 13 déc 2007;4:92.
- Kwok RP, Laurance ME, Lundblad JR, Goldman PS, Shih H, Connor LM, et al. Control of cAMP-regulated enhancers by the viral transactivator Tax through CREB and the co-activator CBP. *Nature*. 18 avr 1996;380(6575):642-6.
- Lacombe B, Morel M, Margottin-Goguet F, Ramirez BC. Specific Inhibition of HIV Infection by the Action of Spironolactone in T Cells. *Kirchhoff F, éditeur. Journal of Virology*. 1 déc 2016;90(23):10972-80.
- Lairmore MD. Animal Models of Bovine Leukemia Virus and Human T-Lymphotropic Virus Type-1: Insights in Transmission and Pathogenesis. *Annual Review of Animal Biosciences*. févr 2014;2(1):189-208.
- Landry S, Halin M, Vargas A, Lemasson I, Mesnard J-M, Barbeau B. Upregulation of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Antisense Transcription by the Viral Tax Protein. *Journal of Virology*. 15 févr 2009;83(4):2048-54.
- Laperche S, Worms B, Pillonel J. Blood safety strategies for human T-cell lymphotropic virus in Europe. *Vox Sanguinis*. 2009;96(2):104-10.
- Larocca D, Chao LA, Seto MH, Brunck TK. Human T-cell leukemia virus minus strand transcription in infected T-cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 15 sept 1989;163(2):1006-13.
- Laverdure S, Polakowski N, Hoang K, Lemasson I. Permissive Sense and Antisense Transcription from the 5' and 3' Long Terminal Repeats of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1. *Ross SR, éditeur. Journal of Virology*. 1 avr 2016;90(7):3600-10.
- Lemasson I, Nyborg JK. Human T-cell leukemia virus type I tax repression of p73beta is mediated through competition for the C/H1 domain of CBP. *J Biol Chem*. 11 mai 2001;276(19):15720-7.

- Lemasson I, Polakowski NJ, Laybourn PJ, Nyborg JK. Tax-dependent Displacement of Nucleosomes during Transcriptional Activation of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1. *Journal of Biological Chemistry*. 12 mai 2006;281(19):13075-82.
- Lemasson I, Lewis MR, Polakowski N, Hivin P, Cavanagh M-H, Thébault S, et al. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) bZIP protein interacts with the cellular transcription factor CREB to inhibit HTLV-1 transcription. *J Virol*. févr 2007;81(4):1543-53.
- Lemasson I, Polakowski NJ, Laybourn PJ, Nyborg JK. Transcription factor binding and histone modifications on the integrated proviral promoter in human T-cell leukemia virus-I-infected T-cells. *J Biol Chem*. 20 déc 2002;277(51):49459-65.
- Lemasson I, Polakowski NJ, Laybourn PJ, Nyborg JK. Transcription regulatory complexes bind the human T-cell leukemia virus 5' and 3' long terminal repeats to control gene expression. *Mol Cell Biol*. juill 2004;24(14):6117-26.
- Lenzmeier BA, Giebler HA, Nyborg JK. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax requires direct access to DNA for recruitment of CREB binding protein to the viral promoter. *Mol Cell Biol*. févr 1998;18(2):721-31.
- Lever AML, Jeang K-T, Berkhout B, éditeurs. Recent advances in human retroviruses: principles of replication and pathogenesis: advances in retroviral research. Singapore ; Hackensack, NJ: World Scientific; 2010. 493 p.
- Li H, Loehrer PJ, Hisada M, Henley J, Whitby D, Engels EA. Absence of human T-cell lymphotropic virus type I and human foamy virus in thymoma. *Br J Cancer*. 1 juin 2004;90(11):2181-5.
- Lodewick J, Lamsoul I, Polania A, Lebrun S, Burny A, Ratner L, et al. Acetylation of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein by p300 promotes activation of the NF-kappaB pathway. *Virology*. 30 mars 2009;386(1):68-78.
- Lu H, Pise-Masison CA, Fletcher TM, Schiltz RL, Nagaich AK, Radonovich M, et al. Acetylation of nucleosomal histones by p300 facilitates transcription from tax-responsive human T-cell leukemia virus type 1 chromatin template. *Mol Cell Biol*. juill 2002;22(13):4450-62.
- Ma G, Yasunaga J, Fan J, Yanagawa S, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP factor dysregulates the Wnt pathways to support proliferation and migration of adult T-cell leukemia cells. *Oncogene*. 5 sept 2013;32(36):4222-30.
- Ma G, Yasunaga J, Matsuoka M. Multifaceted functions and roles of HBZ in HTLV-1 pathogenesis. *Retrovirology* [Internet]. déc 2016 [cité 25 mai 2017];13(1). Disponible sur: <http://www.retrovirology.com/content/13/1/16>
- Mahieux R, Pise-Masison CA, Nicot C, Green P, Hall WW, Brady JN. Inactivation of p53 by HTLV type 1 and HTLV type 2 Tax trans-activators. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1 nov 2000;16(16):1677-81.

- Malik KTA, Even J, Karpas A. Molecular Cloning and Complete Nucleotide Sequence of an Adult T Cell Leukaemia Virus/Human T Cell Leukaemia Virus Type I (ATLV/HTLV-I) Isolate of Caribbean Origin: Relationship to Other Members of the ATLV/HTLV-I Subgroup. *Journal of General Virology*. 1 juill 1988;69(7):1695-710.
- Manns A, Wilks RJ, Murphy EL, Haynes G, Figueroa JP, Barnett M, et al. A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion. *Int J Cancer*. 30 juill 1992;51(6):886-91.
- Marçais A, Suarez F, Sibon D, Frenzel L, Hermine O, Bazarbachi A. Therapeutic options for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Curr Oncol Rep*. oct 2013;15(5):457-64.
- Marriott SJ, Semmes OJ. Impact of HTLV-I Tax on cell cycle progression and the cellular DNA damage repair response. *Oncogene*. 5 sept 2005;24(39):5986-95.
- Martin F, Taylor GP, Jacobson S. Inflammatory manifestations of HTLV-1 and their therapeutic options. *Expert Rev Clin Immunol*. nov 2014;10(11):1531-46.
- Maruyama K, Fukushima T, Mochizuki S, Kawamura K, Miyauchi M. Human T-cell leukemia virus type I as agent inducing genetic changes in infected human lymphocytes. *Leukemia*. 1992;6 Suppl 3:60S-63S.
- Marziali F, Bugnon Valdano M, Brunet Avalos C, Moriena L, Cavatorta AL, Gardiol D. Interference of HTLV-1 Tax Protein with Cell Polarity Regulators: Defining the Subcellular Localization of the Tax-DLG1 Interaction. *Viruses*. 23 2017;9(12).
- Matsuoka M, Jeang K-T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer*. avr 2007;7(4):270-80.
- Maxon ME, Goodrich JA, Tjian R. Transcription factor IIE binds preferentially to RNA polymerase IIa and recruits TFIIH: a model for promoter clearance. *Genes Dev*. 3 janv 1994;8(5):515-24.
- Mitobe Y, Yasunaga J, Furuta R, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP Factor RNA and Protein Impart Distinct Functions on T-cell Proliferation and Survival. *Cancer Res*. 1 oct 2015;75(19):4143-52.
- Miyoshi I, Taguchi H, Fujishita M, Yoshimoto S, Kubonishi I, Ohtsuki Y, et al. Transformation of monkey lymphocytes with adult T-cell leukaemia virus. *Lancet*. 1 mai 1982;1(8279):1016.
- Miyoshi I, Yoshimoto S, Fujishita M, Taguchi H, Kubonishi I, Niiya K, et al. Natural adult T-cell leukemia virus infection in Japanese monkeys. *Lancet*. 18 sept 1982;2(8299):658.
- Mohanty S, Harhaj EW. Mechanisms of Oncogenesis by HTLV-1 Tax. *Pathogens*. 7 juill 2020;9(7).
- Moles R, Sarkis S, Galli V, Omsland M, Purcell DFJ, Yurick D, et al. p30 protein: a critical regulator of HTLV-1 viral latency and host immunity. *Retrovirology*. 18 2019;16(1):42.

- Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science*. 10 sept 1976;193(4257):1007-8.
- Mossoun A, Calvignac-Spencer S, Anoh AE, Pauly MS, Driscoll DA, Michel AO, et al. Bushmeat Hunting and Zoonotic Transmission of Simian T-Lymphotropic Virus 1 in Tropical West and Central Africa. *J Virol* [Internet]. 28 avr 2017 [cité 8 avr 2020];91(10). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5411610/>
- Motohashi K, Suzuki T, Kishimoto K, Numata A, Nakajima Y, Tachibana T, et al. Successful treatment of a patient with adult T cell leukemia/lymphoma using anti-CC chemokine receptor 4 monoclonal antibody mogamulizumab followed by allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol*. août 2013;98(2):258-60.
- Mulloy JC, Kislyakova T, Cereseto A, Casareto L, LoMonico A, Fullen J, et al. Human T-cell lymphotropic/leukemia virus type 1 Tax abrogates p53-induced cell cycle arrest and apoptosis through its CREB/ATF functional domain. *J Virol*. nov 1998;72(11):8852-60.
- Murata K, Hayashibara T, Sugahara K, Uemura A, Yamaguchi T, Harasawa H, et al. A Novel Alternative Splicing Isoform of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 bZIP Factor (HBZ-SI) Targets Distinct Subnuclear Localization. *Journal of Virology*. 1 mars 2006;80(5):2495-505.
- Nagy Z, Tora L. Distinct GCN5/PCAF-containing complexes function as co-activators and are involved in transcription factor and global histone acetylation. *Oncogene*. 13 août 2007;26(37):5341-57.
- Nasr R, Chiari E, El-Sabban M, Mahieux R, Kfoury Y, Abdulhay M, et al. Tax ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of NF-kappaB activation. *Blood*. 15 mai 2006;107(10):4021-9.
- Niederer H, Bangham C. Integration Site and Clonal Expansion in Human Chronic Retroviral Infection and Gene Therapy. *Viruses*. 31 oct 2014;6(11):4140-64.
- Niu Z, Li A, Zhang SX, Schwartz RJ. Serum Response Factor Micro-Managing Cardiogenesis. *Curr Opin Cell Biol*. déc 2007;19(6):618-27.
- Nozuma S, Kubota R, Jacobson S. Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and cellular immune response in HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol* [Internet]. 23 juill 2020 [cité 11 août 2020]; Disponible sur: <http://link.springer.com/10.1007/s13365-020-00881-w>
- Ohkuma Y, Roeder RG. Regulation of TFIIH ATPase and kinase activities by TFIIIE during active initiation complex formation. *Nature*. 10 mars 1994;368(6467):160-3.
- Omsland M, Silic-Benussi M, Moles R, Sarkis S, Purcell DFJ, Yurick D, et al. Functional properties and sequence variation of HTLV-1 p13. *Retrovirology* [Internet]. 12 mai 2020 [cité 21 mai 2020];17. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7218495/>

- Osame M, Usuku K, Izumo S, Ijichi N, Amitani H, Igata A, et al. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet*. 3 mai 1986;1(8488):1031-2.
- Ozden S, Cochet M, Mikol J, Teixeira A, Gessain A, Pique C. Direct Evidence for a Chronic CD8+-T-Cell-Mediated Immune Reaction to Tax within the Muscle of a Human T-Cell Leukemia/Lymphoma Virus Type 1-Infected Patient with Sporadic Inclusion Body Myositis. *J Virol*. oct 2004;78(19):10320-7.
- Pais-Correia A-M, Sachse M, Guadagnini S, Robbiati V, Lasserre R, Gessain A, et al. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat Med*. janv 2010;16(1):83-9.
- Paiva A, Casseb J. Sexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. *Rev Soc Bras Med Trop*. juin 2014;47(3):265-74.
- Pan G, Greenblatt J. Initiation of transcription by RNA polymerase II is limited by melting of the promoter DNA in the region immediately upstream of the initiation site. *Journal of Biology Chemistry*. 1994;30101-4.
- Panfil AR, Al-Saleem J, Howard CM, Shkriabai N, Kvaratskhelia M, Green PL. Stability of the HTLV-1 Antisense-Derived Protein, HBZ, Is Regulated by the E3 Ubiquitin-Protein Ligase, UBR5. *Front Microbiol*. 2018;9:80.
- Parker D, Ferreri K, Nakajima T, LaMorte VJ, Evans R, Koerber SC, et al. Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. *Mol Cell Biol*. févr 1996;16(2):694-703.
- Peloponese J-M, Yeung ML, Jeang K-T. Modulation of Nuclear Factor- κ B by Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Protein: Implications for Oncogenesis and Inflammation. *IR*. 2006;34(1):1-12.
- Pene S, Waast L, Bonnet A, Benit L, Pique C. A Non-SUMOylated Tax Protein Is Still Functional for NF- κ B Pathway Activation. *Journal of Virology*. 15 sept 2014;88(18):10655-61.
- Peng J, Zhu Y, Milton JT, Price DH. Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev*. 1 mars 1998;12(5):755-62.
- Pique C, Pham D, Tursz T, Dokh lar MC. Human T-cell leukemia virus type I envelope protein maturation process: requirements for syncytium formation. *J Virol*. févr 1992;66(2):906-13.
- Pique C, Jones KS. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. *Front Microbiol*. 2012;3:378.
- Piras G, Kashanchi F, Radonovich MF, Duvall JF, Brady JN. Transcription of the human T-cell lymphotropic virus type I promoter by an alpha-amanitin-resistant polymerase. *J Virol*. oct 1994;68(10):6170-9.

- Polakowski N, Pearce M, Kuguyo O, Boateng G, Hoang K, Lemasson I. The splice 1 variant of HTLV-1 bZIP factor stabilizes c-Jun. *Virology* [Internet]. 9 août 2020 [cité 13 août 2020]; Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682220301409>
- Prooyen NV, Gold H, Andresen V, Schwartz O, Jones K, Ruscetti F, et al. Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. *PNAS*. 30 nov 2010;107(48):20738-43.
- Quinn PG. Mechanisms of basal and kinase-inducible transcription activation by CREB. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2002;72:269-305.
- Rani PG, Ranish JA, Hahn S. RNA polymerase II (Pol II)-TFIIF and Pol II-mediator complexes: the major stable Pol II complexes and their activity in transcription initiation and reinitiation. *Mol Cell Biol*. févr 2004;24(4):1709-20.
- Reeves MB. Chromatin-mediated regulation of cytomegalovirus gene expression. *Virus Research*. mai 2011;157(2):134-43.
- Rhee HS, Pugh BF. Genome-wide structure and organization of eukaryotic pre-initiation complexes. *Nature*. 18 janv 2012;483(7389):295-301.
- Richardson JH, Edwards AJ, Cruickshank JK, Rudge P, Dalglish AG. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol*. nov 1990;64(11):5682-7.
- Rimel JK, Taatjes DJ. The essential and multifunctional TFIIH complex: Essential and Multi-Functional TFIIH. *Protein Science*. juin 2018;27(6):1018-37.
- Rizkallah G, Mahieux R, Dutartre H. Transmission intercellulaire de HTLV-1: Des mécanismes loin d'être complètement élucidés. *Med Sci (Paris)*. juin 2015;31(6-7):629-37.
- Robek MD, Ratner L. Immortalization of CD4+ and CD8+ T Lymphocytes by Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Mutants Expressed in a Functional Molecular Clone. *Journal of Virology*. 1 juin 1999;73(6):4856-65.
- Roberts CWM, Orkin SH. The SWI/SNF complex--chromatin and cancer. *Nat Rev Cancer*. févr 2004;4(2):133-42.
- Roberts TC, Hart JR, Kaikkonen MU, Weinberg MS, Vogt PK, Morris KV. Quantification of nascent transcription by bromouridine immunocapture nuclear run-on RT-qPCR. *Nat Protoc*. août 2015;10(8):1198-211.
- Rushing AW, Hoang K, Polakowski N, Lemasson I. The Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Basic Leucine Zipper Factor Attenuates Repair of Double-Stranded DNA Breaks via Nonhomologous End Joining. *J Virol*. 01 2018;92(15).
- Saggioro D, Forino M, Chieco-Bianchi L. Transcriptional block of HTLV-I LTR by sequence-specific methylation. *Virology*. mai 1991;182(1):68-75.

- Saggiaro D. Anti-apoptotic effect of Tax: an NF- κ B path or a CREB way? *Viruses*. 2011;3(7):1001-14.
- Sainsbury S, Bernecky C, Cramer P. Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 18 févr 2015;16(3):129-43.
- Sarkis S, Galli V, Moles R, Yurick D, Khoury G, Purcell DFJ, et al. Role of HTLV-1 orf-I encoded proteins in viral transmission and persistence. *Retrovirology*. déc 2019;16(1):43.
- Sato T, Coler-Reilly ALG, Yagishita N, Araya N, Inoue E, Furuta R, et al. Mogamulizumab (Anti-CCR4) in HTLV-1-Associated Myelopathy. *N Engl J Med*. 8 févr 2018;378(6):529-38.
- Satou Y, Yasunaga J, Yoshida M, Matsuoka M. HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 17 janv 2006;103(3):720-5.
- Satou Y, Yasunaga J-I, Zhao T, Yoshida M, Miyazato P, Takai K, et al. HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation in vivo. *PLoS Pathog*. 10 févr 2011;7(2):e1001274.
- Sawada M, Suzumura A, Yoshida M, Marunouchi T. Human T-cell leukemia virus type I trans activator induces class I major histocompatibility complex antigen expression in glial cells. *J Virol*. août 1990;64(8):4002-6.
- Schwob A, Teruel E, Dubuisson L, Lormières F, Verlhac P, Abudu YP, et al. SQSTM-1/p62 potentiates HTLV-1 Tax-mediated NF- κ B activation through its ubiquitin binding function. *Sci Rep [Internet]*. 5 nov 2019 [cité 7 oct 2020];9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6831704/>
- Sekiguchi Y, Shimada A, Ichikawa K, Wakabayashi M, Sugimoto K, Kinoshita A, et al. A case of post-mogamulizumab relapse of acute-type adult T-cell leukemia/lymphoma successfully treated with mogamulizumab and etoposide. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(9):6278-90.
- Semmes OJ, Jeang KT. Localization of human T-cell leukemia virus type 1 tax to subnuclear compartments that overlap with interchromatin speckles. *J Virol*. sept 1996;70(9):6347-57.
- Sharma N, Nyborg JK. The coactivators CBP/p300 and the histone chaperone NAP1 promote transcription-independent nucleosome eviction at the HTLV-1 promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*. 10 juin 2008;105(23):7959-63.
- Shimoyama M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br J Haematol*. nov 1991;79(3):428-37.
- Shiohama Y, Naito T, Matsuzaki T, Tanaka R, Tomoyose T, Takashima H, et al. Absolute quantification of HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) protein and its plasma antibody in HTLV-1 infected individuals with different clinical status. *Retrovirology*

[Internet]. déc 2016 [cité 17 mars 2017];13(1). Disponible sur: <http://retrovirology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12977-016-0263-z>

- Shirinian M, Kfoury Y, Dassouki Z, El-Hajj H, Bazarbachi A. Tax-1 and Tax-2 similarities and differences: focus on post-translational modifications and NF- κ B activation. *Front Microbiol.* 2013;4:231.
- Shuker SB, Mariani VL, Herger BE, Dennison KJ. Understanding HTLV-I Protease. *Chemistry & Biology.* 1 mai 2003;10(5):373-80.
- Sijbers AM, de Laat WL, Ariza RR, Biggerstaff M, Wei YF, Moggs JG, et al. Xeroderma pigmentosum group F caused by a defect in a structure-specific DNA repair endonuclease. *Cell.* 6 sept 1996;86(5):811-22.
- Siu Y-T, Chin K-T, Siu K-L, Yee Wai Choy E, Jeang K-T, Jin D-Y. TORC1 and TORC2 coactivators are required for tax activation of the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeats. *J Virol.* juill 2006;80(14):7052-9.
- Smith MR, Greene WC. Identification of HTLV-I tax trans-activator mutants exhibiting novel transcriptional phenotypes. *Genes Dev.* 11 janv 1990;4(11):1875-85.
- Smith MR, Greene WC. Characterization of a novel nuclear localization signal in the HTLV-I tax transactivator protein. *Virology.* mars 1992;187(1):316-20.
- Song X, Zhao Z, Qi X, Tang S, Wang Q, Zhu T, et al. Identification of epipolythiodioxopiperazines HDN-1 and chaetocin as novel inhibitor of heat shock protein 90. *Oncotarget.* 2015;6(7):5263.
- Stargell LA, Ogg RC, Adkins JN, Robinson MM, Lumb KJ. Transcriptional activity of the TFIIA four-helix bundle in vivo. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* 2001;43(2):227-32.
- Sugata K, Satou Y, Yasunaga J, Hara H, Ohshima K, Utsunomiya A, et al. HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines. *Blood.* 12 janv 2012;119(2):434-44.
- Suzuki S, Singhirunnusorn P, Mori A, Yamaoka S, Kitajima I, Saiki I, et al. Constitutive activation of TAK1 by HTLV-1 tax-dependent overexpression of TAB2 induces activation of JNK-ATF2 but not IKK-NF- κ B. *J Biol Chem.* 31 août 2007;282(35):25177-81.
- Takahashi M, Higuchi M, Makokha GN, Matsuki H, Yoshita M, Tanaka Y, et al. HTLV-1 Tax oncoprotein stimulates ROS production and apoptosis in T cells by interacting with USP10. *Blood.* 1 août 2013;122(5):715-25.
- Tan S, Conaway RC, Conaway JW. Dissection of transcription factor TFIIIF functional domains required for initiation and elongation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 20 juin 1995;92(13):6042-6.

- Tanaka-Nakanishi A, Yasunaga J -i., Takai K, Matsuoka M. HTLV-1 bZIP Factor Suppresses Apoptosis by Attenuating the Function of FoxO3a and Altering Its Localization. *Cancer Research*. 1 janv 2014;74(1):188-200.
- Taniguchi Y, Nosaka K, Yasunaga J, Maeda M, Mueller N, Okayama A, et al. Silencing of human T-cell leukemia virus type I gene transcription by epigenetic mechanisms. *Retrovirology*. 22 oct 2005;2(1):64.
- Taylor JM, Nicot C. HTLV-1 and apoptosis: role in cellular transformation and recent advances in therapeutic approaches. *Apoptosis*. juin 2008;13(6):733-47.
- Terol M, Gazon H, Lemasson I, Duc Dodon M, Barbeau B, Césaire R, et al. HBZ-mediated shift of JunD from growth suppressor to tumor promoter in leukemic cells by inhibition of ribosomal protein S25 expression. *Leukemia* [Internet]. 6 mars 2017 [cité 8 mars 2017]; Disponible sur: <http://www.nature.com/doi/10.1038/leu.2017.74>
- Tong X, Drapkin R, Reinberg D, Kieff E. The 62- and 80-kDa subunits of transcription factor IIIH mediate the interaction with Epstein-Barr virus nuclear protein 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 11 avr 1995;92(8):3259-63.
- Trentin B, Rebeyrotte N, Mamoun RZ. Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Reverse Transcriptase (RT) Originates from the pro and pol Open Reading Frames and Requires the Presence of RT-RNase H (RH) and RT-RH-Integrase Proteins for Its Activity. *Journal of Virology*. 1 août 1998;72(8):6504-10.
- Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood*. sept 1977;50(3):481-92.
- Ueda M, Matsuura K, Kawai H, Wakasugi M, Matsunaga T. Spironolactone-induced XPB degradation depends on CDK7 kinase and SCF FBXL 18 E3 ligase. *Genes to Cells* [Internet]. 14 févr 2019 [cité 19 mars 2019]; Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1111/gtc.12674>
- van der Kuyl AC. HIV infection and HERV expression: a review. *Retrovirology*. déc 2012;9(1):6.
- Verma D, Church TM, Swaminathan S. Epstein-Barr virus co-opts TFIIH component XPB to specifically activate essential viral lytic promoters. *PNAS*. 9 juin 2020;117(23):13044-55.
- Vernin C, Thenoz M, Pinatel C, Gessain A, Gout O, Delfau-Larue M-H, et al. HTLV-1 bZIP factor HBZ promotes cell proliferation and genetic instability by activating OncomiRs. *Cancer Res*. 1 nov 2014;74(21):6082-93.
- Villanueva R, Iglesias AH, Camelo S, Sanin LC, Gray SG, Dangond F. Histone deacetylase 3 represses HTLV-1 tax transcription. *Oncol Rep*. sept 2006;16(3):581-5.
- Wagner S, Green MR. HTLV-I Tax protein stimulation of DNA binding of bZIP proteins by enhancing dimerization. *Science*. 15 oct 1993;262(5132):395-9.

- Watanabe T. Adult T-cell leukemia: molecular basis for clonal expansion and transformation of HTLV-1-infected T cells. *Blood*. 2017;129(9):1071–1081.
- Watanabe T, Seiki M, Hirayama Y, Yoshida M. Human T-cell leukemia virus type I is a member of the African subtype of simian viruses (STLV). *Virology*. 30 janv 1986;148(2):385-8.
- Wattel E, Vartanian JP, Pannetier C, Wain-Hobson S. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *J Virol*. mai 1995;69(5):2863-8.
- Wierstra I. Sp1: Emerging roles—Beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. juill 2008;372(1):1-13.
- Winter HY, Dayaram T, Marriott SJ. Activation of the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat by the ternary complex factor Elk-1. *J Virol*. déc 2007;81(23):13075-81.
- Winter HY, Marriott SJ. Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Enhances Serum Response Factor DNA Binding and Alters Site Selection. *J Virol*. juin 2007;81(11):6089-98.
- Wright DG, Marchal C, Hoang K, Ankney JA, Nguyen ST, Rushing AW, et al. Human T-cell leukemia virus type-1-encoded protein HBZ represses p53 function by inhibiting the acetyltransferase activity of p300/CBP and HBO1. *Oncotarget*. 12 janv 2016;7(2):1687-706.
- Wu K, Bottazzi ME, de la Fuente C, Deng L, Gitlin SD, Maddukuri A, et al. Protein profile of tax-associated complexes. *J Biol Chem*. 2 janv 2004;279(1):495-508.
- Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet*. 2017;18(9):517-34.
- Wurm T, Wright DG, Polakowski N, Mesnard J-M, Lemasson I. The HTLV-1-encoded protein HBZ directly inhibits the acetyl transferase activity of p300/CBP. *Nucleic Acids Res*. juill 2012;40(13):5910-25.
- Yamada T, Yamaguchi Y, Inukai N, Okamoto S, Mura T, Handa H. P-TEFb-Mediated Phosphorylation of hSpt5 C-Terminal Repeats Is Critical for Processive Transcription Elongation. *Molecular Cell*. janv 2006;21(2):227-37.
- Yamaguchi Y, Takagi T, Wada T, Yano K, Furuya A, Sugimoto S, et al. NELF, a Multisubunit Complex Containing RD, Cooperates with DSIF to Repress RNA Polymerase II Elongation. *Cell*. avr 1999;97(1):41-51.
- Yamashita I, Katamine S, Moriuchi R, Nakamura Y, Miyamoto T, Eguchi K, et al. Transactivation of the human interleukin-6 gene by human T-lymphotropic virus type 1 Tax protein. *Blood*. 1 sept 1994;84(5):1573-8.
- Yamauchi J, Coler-Reilly A, Sato T, Araya N, Yagishita N, Ando H, et al. Mogamulizumab, an anti-CCR4 antibody, targets human T-lymphotropic virus type 1-infected CD8+ and CD4+ T cells to treat associated myelopathy. *J Infect Dis*. 15 janv 2015;211(2):238-48.

- Yang C, Bolotin E, Jiang T, Sladek FM, Martinez E. Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene*. mars 2007;389(1):52-65.
- Yao J, Grant C, Harhaj E, Nonnemacher M, Alefantis T, Martin J, et al. Regulation of human T-cell leukemia virus type 1 gene expression by Sp1 and Sp3 interaction with TRE-1 repeat III. *DNA Cell Biol*. mai 2006;25(5):262-76.
- Yasuma K, Yasunaga J, Takemoto K, Sugata K, Mitobe Y, Takenouchi N, et al. HTLV-1 bZIP Factor Impairs Anti-viral Immunity by Inducing Co-inhibitory Molecule, T Cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT). *PLoS Pathog*. janv 2016;12(1):e1005372.
- Yoshida M, Satou Y, Yasunaga J, Fujisawa J, Matsuoka M. Transcriptional Control of Spliced and Unspliced Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 bZIP Factor (HBZ) Gene. *J Virol*. oct 2008;82(19):9359-68.
- Yoshida M. HTLV-1 oncoprotein Tax deregulates transcription of cellular genes through multiple mechanisms. *J Cancer Res Clin Oncol*. sept 1995;121(9-10):521-8.
- Zhang W, Nisbet JW, Albrecht B, Ding W, Kashanchi F, Bartoe JT, et al. Human T-lymphotropic virus type 1 p30(II) regulates gene transcription by binding CREB binding protein/p300. *J Virol*. oct 2001;75(20):9885-95.
- Zhao LJ, Giam CZ. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) transcriptional activator, Tax, enhances CREB binding to HTLV-I 21-base-pair repeats by protein-protein interaction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1 août 1992;89(15):7070-4.
- Zhao T, Satou Y, Sugata K, Miyazato P, Green PL, Imamura T, et al. HTLV-1 bZIP factor enhances TGF- β signaling through p300 coactivator. *Blood*. 18 août 2011;118(7):1865-76.
- Zhi H, Yang L, Kuo Y-L, Ho Y-K, Shih H-M, Giam C-Z. NF- κ B hyper-activation by HTLV-1 tax induces cellular senescence, but can be alleviated by the viral anti-sense protein HBZ. *PLoS Pathog*. avr 2011;7(4):e1002025.
- Zhou M, Lu H, Park H, Wilson-Chiru J, Linton R, Brady JN. Tax Interacts with P-TEFb in a Novel Manner To Stimulate Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Transcription. *Journal of Virology*. 15 mai 2006;80(10):4781-91.