



HAL
open science

Modulation de la machinerie de O-GlcNACylation par l'oncoprotéineTax du virus HTLV-1 et implication dans la transactivation du promoteur viral

Damien Groussaud

► **To cite this version:**

Damien Groussaud. Modulation de la machinerie de O-GlcNACylation par l'oncoprotéineTax du virus HTLV-1 et implication dans la transactivation du promoteur viral. Virologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB252 . tel-02141273

HAL Id: tel-02141273

<https://theses.hal.science/tel-02141273>

Submitted on 27 May 2019

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.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES
Spécialité Virologie

Ecole Doctorale Bio SPC

Présenté par Damien Groussaud

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

**Modulation de la machinerie de O-GlcNACylation
par l'oncoprotéine Tax du virus HTLV-1
et implication dans la transactivation
du promoteur viral**

Directrice de thèse : Dr Claudine Pique

Date de soutenance prévue le 19 Septembre 2016
Devant le jury composé de :

Pr. Pierre-Emmanuel CECCALDI
Dr Anne Sophie VERCOUTTER EDOUART
Dr Franck MORTREUX
Dr Jean Michel MESNARD
Dr Renaud MAHIEUX
Dr Claudine PIQUE

Président de jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse

Table des matières

TABLE DES MATIERES	3
ABREVIATIONS	5
INDEX DES FIGURES ET DES TABLEAUX	9
INTRODUCTION	10
I. UN PEU D'HISTOIRE : LA DECOUVERTE DU PREMIER RETROVIRUS ONCOGENE HUMAIN	11
II- PATHOLOGIES ASSOCIEES.	15
II-1- <i>La leucémie à cellules T de l'adulte (ATL)</i>	16
II-1-1) Tableau clinique.	16
II-1-2) Pathogénèse.	19
II-1-3) Thérapies.....	21
II-2- <i>La paraparésie spastique tropicale TSP/HAM</i>	22
II-2-1) Tableau clinique.	22
II-2-2) Pathogénèse.....	23
II-2-3) Traitements.....	26
II-3- <i>Autres pathologies associées à HTLV-1</i>	27
III. LE VIRUS HTLV-1 : ORIGINE D'UN RETROVIRUS PAS COMME LES AUTRES.	28
III-1- <i>Phylogénie des PTLV</i>	28
III-2- <i>Epidémiologie de l'infection par le HTLV-1</i>	31
III-2-1) Répartition géographique.....	31
III-2-2) Epidémiologie moléculaire.....	33
III-3- <i>Les modes de transmissions du HTLV-1</i>	36
IV. LE VIRUS HTLV-1 : ANATOMIE D'UN RETROVIRUS DE TYPE COMPLEXE.	39
IV-1. <i>Structure de la particule virale</i>	39
IV-2. <i>Génome et synthèse des protéines virales</i>	41
IV-2-1) Les protéines de structures et les enzymes virales.....	43
IV-2-2) Les protéines régulatrices et auxiliaires.....	44
IV-2-3) Les transcrits anti sens et la protéine HBZ.....	44
IV-3. <i>Cellules cibles et cycle viral</i>	47
IV-3-1 : Les phases précoces de l'infection : de l'entrée à l'intégration.....	48
IV-3-2- Les phases tardives de l'infection : de la synthèse des transcrits viraux au bourgeonnement viral.....	52
IV-4- <i>Mécanismes d'infections et échappement au système immunitaire</i>	54
IV-4-1- Transmission cellule-cellule.....	54
IV-4-2- La réplication du HTLV-1 par expansion clonale.....	58
V. HTLV-1 : UN VIRUS ONCOGENE.....	60
V-1- <i>Modulation des principales voies de signalisations cellulaires</i>	61
V-1-1) La voie MAP Kinase.....	61
V-1-2) La voie PI3K-Akt.....	63
V-1-3) La voie NF-kB.....	65
V-1-4) La voie AP-1.....	70
V-2- <i>Détournement du cycle cellulaire et de l'apoptose</i>	71
V-2-1) Cycle cellulaire.....	71
V-2-2) Stimulation de la production de cytokines.....	73
V-2-3) Blocage de l'entrée en apoptose.....	74
V-3- <i>Induction d'altération génétique</i>	77
V-4- <i>Détournement de la machinerie de transcription</i>	79
V-5- <i>Un autre acteur responsable de la transformation : la protéine HBZ</i>	83
VI- LA O-GLCNAcylation : UNE MODIFICATION POST TRADUCTIONNELLE CRUCIALE.....	87
VI-1- <i>Généralités</i> :.....	87
VI-2- <i>L'OGT (O-linked-N-acetylglucosaminyltransferase)</i>	88
VI-2-1- Découverte et structure.....	88
VI-2-2- Modifications post traductionnelles de l'OGT.....	90
VI-2-3- Inhibiteurs pharmacologiques de l'OGT.....	91
VI-3- <i>L'OGA (N-Acetyl-β-D glucosaminidase ou OGLcNAcase)</i>	91

VI-3-1-Découverte et structure.....	91
VI-3-2-Modifications post-traductionnelles de l'OGA.....	92
VI-3-3-Inhibiteurs de l'OGA.....	93
<i>VI-4-La voie de biosynthèse des hexosamines.....</i>	<i>93</i>
<i>VI-5-Phosphorylation et O-GlcNAcylation : le yin et le yang.....</i>	<i>95</i>
<i>VI-6- O-GlcNAcylation et cancer.....</i>	<i>97</i>
<i>VI-7- O-GlcNAcylation et facteurs de transcription.....</i>	<i>99</i>
<i>VI-8- O-GlcNAcylation, transcription et régulations épigénétiques.....</i>	<i>101</i>
RESULTATS.....	106
VII. PRESENTATION DE L'ARTICLE (EN REVISION DANS PLOS PATHOGENS).....	107
VIII. ARTICLE.....	109
DISCUSSION.....	132
IX. DISCUSSION.....	133
BIBLIOGRAPHIE.....	144

Abréviations

AD : Activation Domain
ADN: Acide DesoxyRiboNucléique
AP-1 : Activator Potein 1
ARN : Acide RiboNucléique
ARNt : Acide RiboNucléique de transfert
ATF : Activating Transcription Factor
ATL : Adult T-cell Leukemia
ATLV / Adult T-cell Leukemia Virus
AZT : Zidovudine
BAFF : B-Cell Activating Factor
BER : Base Excision Repair
BLV : Bovine Leukemia Virus
BRCA-1 : Breast Cancer 1
c-Flip : cellular Flice-Like Inhibitory protein
C-Ter : C-Terminal
CA : Capside
CAMK IV : Calcium/Calmodulin-dependent Kinase IV
CARM1 : co -activator associated arginine methyltransferase 1
CBP : CREB Binding Protein
CCR4 : C-C Chemokine Type 4
CD I / CD II : Conserved Domain I et II
CDK : Cycline Dependant Kinase
CMH-1 : Complexe d'Histocompatibilité de type 1
CMV : CytoMegaloVirus
CPRV : Cottontail Rabbit Papillomavirus
CRE : cAMP response element
CREB : c-AMP Response Element Binding protein
CRM1 : Chromosome Region Maintenance interacting protein 1
CTD : C-Terminal Domain
DC-SIGN : DC-Specific ICAM-3Grabbing Non-integrin
DNA-PK : DNA Dependent Protein Kinase
EGF : Epidermal Growth factor
Env : enveloppe
ERK : Extracellular signal Regulated Kinase
fOGA : Full-lenght OGA
GAB : Growth factor Receptor-Bound protein 2
Gag : Group specific Antigens
GFAT : Glutamine Fructose-6-phosphate Amido Tranferase
GLUT-1 : Glucose Transporter 1
GRB2 : GRB2-Associated Binding Protein
HBP : Hexosamine Biosynthetic Pathway
HBZ : HTLV-1 b-ZIP Factor
HDAC : Histone Déacetylase

HDM : Histone Déméthylase
HMT : Histone Méthyl Transferase
HSPG : Heparan Sulfate Proteoglycans
HSV-2 : Herpes Simplex Virus de type 2
hTERT : Human Telomerase Reverse transcriptase
HTLV-1 : Human T cell Leukemia/Lymphoma Virus
IAP : Inhibitors of Apoptosis protein
ICAM1 : Intercellular Adhesion Molecule 1
I κ B : Inhibitors of κ B
IKK : I κ B Kinase
IL-2 : Interleukine 2
IN : Intégrase
INF- α : Interferon alpha
INF- β 1 : Interferon Beta 1
INF- γ : Interferon gamma
JNK : c-Jun N-Terminal Kinase
LFA-1 : Lymphocyte Function-associated Antigen 1
LKB1 : Liver Kinase B1
LTC : Lymphocyte T Cytotoxique
LTR : Long terminal Repeat
m-TOR : Mammalian target of Rapamycin
MA : Matrice
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases
MDC1 : Mediator of DNA Damage Checkpoint 1
MEKK-1 : Mitogen-activated MAP kinase kinase kinase 1
MGEA5 : Meningioma-Expressed Antigen 5
MMR : Mismatch Repair
mOGT : mitochondrial OGT
MST : Maladies Sexuellement Transmissibles
MTOC : Microtubule Organizing Center
MTS : Mitochondria Targetting Sequence
N-Ter : N-Terminal
NC : Nucléocapside
NCOAT : Nuclear and Cytoplasmic OGlcNAc Transferase and Acetyltransferase
ncOGT : Nuclear and Cytoplasmic OGT
NEMO : NF- κ B Essential Modulator
NER : Nucleotide Excision Repair
NF- κ B : Nuclear Factor Kappa B
NHEJ : Non Homologous Non Joining
NIK : NF- κ B Inducing Kinase
NLS : Nuclear Localisation Signal
NRP-1 : Neuropiline 1
OGA : N-Acetyl- β -D glucosaminidase ou OGlcNAcase
OGT : O-linked-N-acetylglucosaminyltransferase
ORF : Open Reading Frame

P-TEFb : Positive Transcription Elongation Factor b
PBS : Primer Binding Site
PCAF : CBP/p300 associated factor
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR : Polymerase Chain Reaction
PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase
PIP2 : Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphate
PIP3 : Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate
PKA : protein kinase A
Pol : polymerase
PTEN : Phosphatase and tensin Homolog
PTLV : Primate T-cell Lymphotropic Virus
RANKL : Receptor Activator of NF-kB Ligand
RBD : Receptor Binding Domain
RH : Recombinasion Homologue
RHD : Rel Homology Domain
RHD : Rel Homology Domain
ROS : Reactive Oxygen Species
RSV : Rous Sarcome Virus
RT : Reverse Transcriptase
RXRE : Rex Responsive Element
sHBZ : Spliced HTLV-1 b-ZIP Factir
sOGT : short OGT
SRF : Serum Response Factor
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
STLV-1 Simian T-cell Leukemia Virus
STZ : Streptozotocine
SU : Surface Unit
SWI/SNF : Switch/Sucrose Non Fermentable
TAB : TGF-beta Activated Kinase 1
TAD : TAD Transactivating Domain
TAFII28 : TBP-Associated Factor II 28
TAK-1 : Transforming growth factor beta-activated kinase 1
TAL1 : T-cell Acute Lymphoblastic leukemia 1
TAX : Transriptional Activator of pX Region
TBP : TATA Binding Protein
TLR : Toll-Like Receptors
TM : Transmembrane Unit
TNF : Tumor Necrosis Factor α
TPR : Tetratricopeptide repeat
TRAF : Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor
TRE : Tax Response element
TSP/HAM : Tropical Spastic Paraparesie / HTLV-1 Associated Myelopathy
TWEAK : TNF-Like Weak Inducer of Apoptosis
UDP-GlcNac : uridine 5-diphosho N-acétylglucosamine
usHBZ : Unscpliced HTLV-1 b-ZIP Factor

vCRE : viral cAMP Responsive Element
VIH : Virus de l'Immunodeficiency Humaine
VPA : Valproate

Index des figures et des tableaux

FIGURE 1 : PREMIERES OBSERVATIONS DU BOURGEONNEMENT DU VIRUS HTLV-1 DANS DES CELLULES HUT-102 PAR L'EQUIPE DU DR ROBERT GALLO. D'APRES (COFFIN, 2015).....	13
FIGURE 2 : CARACTERISATION DE LA PARTICULE VIRALE DE TYPE C ISSUE DES CELLULES HUT-102.....	14
FIGURE 3 : CELLULES LEUCEMIQUES« EN FLEUR » CARACTERISTIQUES DE L'ATL.....	18
FIGURE 4 : MODELE ACTUEL DE DEVELOPPEMENT DE L'ATL.....	21
FIGURE 5 : MODELE PRESENTANT LES MECANISMES A L'ORIGINE DES LESIONS DE LA MOELLE INDUITE PAR LE VIRUS HTLV-1 DANS DE LE CAS DE LA TSP.....	25
FIGURE 6 : MODELE ACTUELLE DU DEVELOPPEMENT DE LA TSP.....	26
FIGURE 7 : MODELE ACTUELLE DU DEVELOPPEMENT DE LA TSP.....	29
FIGURE 8 : REPARTITION GEOGRAPHIQUE DES PRINCIPAUX FoyERS D'INFECTION PAR HTLV-1 DANS LE MONDE.....	33
FIGURE 9 : REPARTITION GEOGRAPHIQUE DES DIFFERENTS SOUS-TYPES MOLECULAIRES D'HTLV-1.....	36
FIGURE 10 : LES DIFFERENTS MODE DE TRANSMISSION DES VIRUS HTLV.....	38
FIGURE 11 : ANALYSE MORPHOLOGIQUE ET STRUCTURE DE LA PARTICULE VIRALE HTLV-1.....	40
FIGURE 12 : ORGANISATION GENOMIQUE DU VIRUS HTLV-1.....	42
FIGURE 13 : ORGANISATION DES CLIVAGES DES PRECURSEURS POLYPROTEIQUES A L'ORIGINE DES PROTEINES DE STRUCTURES ET DES ENZYMES VIRALES.....	43
FIGURE 14 : REPRESENTATION DES TRANSCRITS HBZ ET STRUCTURE DE LA PROTEINE.....	46
FIGURE 15 : CYCLE DE MULTIPLICATION DU VIRUS HTLV-1.....	47
FIGURE 16 : MODELE DE COOPERATION ENTRE HSPG, NRP-1 ET GLUT-1 ET LA SOUS UNITE SU DU VIRUS HTLV-1 PERMETTANT L'ENTREE DU VIRUS DANS LES CELLULES CIBLES.....	49
FIGURE 17 : MODELE CLASSIQUE DE TRANSCRIPTION INVERSE CHEZ LES RETROVIRUS.....	51
FIGURE 18 : REORGANISATION STRUCTURELLE DES PARTICULES VIRALES D'HTLV-1.....	54
FIGURE 19 : LES DIFFERENTS MODE DE TRANSMISSION CELLULE-CELLULE DU VIRUS HTLV-1.....	56
FIGURE 20 : MODELE D'EXPANSION CLONALE DES LYMPHOCYTES CD4+.....	60
FIGURE 21 : ACTIVATION ET MODULATION DE LA VOIE MAPK PAR TAX.....	63
FIGURE 22 : ACTIVATION ET MODULATION DE LA VOIE PI3K-AKT PAR TAX.....	65
FIGURE 23 : STRUCTURE PROTEIQUE DES INHIBITEURS IκB ET DES FACTEURS NFκB.....	68
FIGURE 24 : ACTIVATION ET MODULATION DE LA VOIE NF-κB PAR TAX.....	69
FIGURE 25 : MODULATION DU CYCLE CELLULAIRE PAR TAX.....	73
FIGURE 26 : DEREGULATION DES MECANISMES D'APOTOSE PAR TAX.....	76
FIGURE 27 : REPRESENTATION DES DIFFERENTES VOIES DE REPARATION DE L'ADN ET DE LEUR MODULATION PAR TAX.....	79
FIGURE 28 : MODEL ACTUEL D'ACTIVATION DU LTR 5' DU VIRUS HTLV-1 INDUITE PAR TAX.....	82
FIGURE 29 : LES MULTIPLES FONCTIONS DE HBZ.....	85
FIGURE 30 : STRUCTURE DES TROIS ISOFORMES DE L'OGT ET DE LEURS DIFFERENTS DOMAINES.....	90
FIGURE 31 : STRUCTURE DES DEUX ISOFORMES DE L'OGA ET LEURS DIFFERENTS DOMAINES.....	92
FIGURE 32 : LA VOIE DES HEXOSAMINES.....	95
FIGURE 33 : RELATION ENTRE O-GLCNACYLATION ET PHOSPHORYLATION, « LEYIN ET LE YANG ».....	97
FIGURE 34 : LES DIFFERENTS FACTEURS DE TRANSCRIPTIONS REGULE PAR O-GLCNACYLATION ET LEURS IMPLICATIONS DANS LE CANCER.....	101
FIGURE 35 : MODELE HYPOTHETIQUE DE TRANSCRIPTION DU LTR VIRAL.....	143
TABLEAU 1 : CARACTERISTIQUES DES DIFFERENTES FORMES CLINIQUES D'ATL.....	18
TABLEAU 2 : MALADIES ASSOCIEES A HTLV-1 ET LEUR DEGRE D'ASSOCIATION AVEC LE VIRUS. ADAPTE DE (GESSAIN, 2011).....	27

Introduction

I. Un peu d'histoire : la découverte du premier rétrovirus oncogène humain.

La fin des années 1970 et le début des années 1980 furent des années charnières pour la recherche de rétrovirus oncogène humain (Coffin, 2015). Jusqu'ici, les différentes découvertes de la communauté scientifique avaient été établies sur des modèles animaux mais aucune preuve directe de la présence de rétrovirus oncogène chez l'Homme n'avait été clairement démontrée. En 1911, Peyton Rous est le premier à faire le lien entre virus et cancer en découvrant le virus du sarcome de Rous (RSV), un virus à ARN positif induisant un sarcome chez le poulet (Rous, 1911). En 1935, Joseph Beard et Peyton Rous, une nouvelle fois, mirent en évidence le premier virus à ADN oncogène, cette fois-ci chez le lapin, le *cottontail rabbit papillomavirus* (CPRV) (Rous and Beard, 1935). Puis en 1951, ce fut au tour de Ludwik Gross de découvrir le premier virus de la leucémie murine (Gross, 1951).

Avec la découverte de ces virus oncogènes de plus en plus nombreux chez l'animal, la recherche pour découvrir de tels virus chez l'Homme ne fit que s'intensifier. C'est ainsi qu'en 1965, Tony Epstein et Yvonne Barr mirent en évidence, par microscopie, le premier virus oncogène chez l'Homme dans des lignées issues d'un lymphome de Burkitt (Epstein et al., 1965). Puis en 1975, le virus de l'Hépatite B, premier virus associé à un carcinome hépatocellulaire, fut découvert par l'équipe de Payet (Blumberg et al., 1975). En 1970, la découverte de la reverse transcriptase (RT), une enzyme permettant à partir d'une copie d'ARN de synthétiser de l'ADN, par Howard Temin et David Baltimore (Baltimore, 1970; Temin and Mizutani, 1970), dans des tumeurs issues d'un sarcome de Rous bouleversa la communauté scientifique. L'idée que des virus ARN puissent intégrer leur génome sous forme de provirus ADN chez l'animal et engendrer ainsi une tumeur déclencha le début de la course à la découverte de tels virus chez l'Homme. Malheureusement, la tâche ne se révéla pas aussi simple. En 1971, un foamy virus fut isolé à partir d'un carcinome nasopharyngé chez un patient du Kenya (Achong et al., 1971) mais quelques années plus tard, l'origine simienne du virus fut mise en avant (Herchenröder et al., 1994). Suivirent de nombreuses publications démontrant, à chaque fois, la découverte du premier rétrovirus humain mais toutes se révélèrent issues de contamination par des rétrovirus animaux au sein des laboratoires ou bien par la détection de la polymérase γ , enzyme confondue de nombreuses fois avec la RT du fait

de sa sensibilité au traitement par une ribonucléase. Cette sensibilité est due au fait qu'elle utilise l'ARN comme amorce et non comme matrice (Coffin, 2015).

Toutes ces déceptions et ces recherches vaines firent qu'à la fin des années 1970, de nombreux laboratoires abandonnèrent la recherche et le scepticisme de la communauté sur l'existence de tels virus chez l'Homme ne fit qu'augmenter (Voisset et al., 2008). En effet, lorsque l'on regarde le programme du « Cold Spring Harbor Symposium » qui fut, cette année-là, consacrée aux virus oncogènes, pas une seule conférence, sur les 125 au total, ne mentionna les virus oncogènes chez l'Homme.

Encore une fois dans l'histoire de la science, les avancées technologiques permirent de faire évoluer la situation et de permettre aux plus téméraires de poursuivre les recherches. C'est ainsi que l'équipe de Robert Gallo et ses collaborateurs firent d'importantes avancées dans la détection de l'activité de la RT afin d'augmenter la sensibilité de détection et de ne plus la confondre avec d'autres polymérases comme ce fut le cas auparavant (Bhattacharyya et al., 1973; Bobrow et al., 1972; Robert et al., 1972; Sarin et al., 1974). De plus, de nombreux rétrovirus animaux étant décrits comme associés à des leucémies, la recherche d'un rétrovirus humain s'est orientée vers ce type de maladie. C'est ainsi qu'en 1980, l'équipe de Robert Gallo mit en culture des lymphocytes T issus d'un patient de 28 ans atteint d'une leucémie cutanée à cellules T aussi appelée *mycosis fungoides*. Pour réaliser cette prouesse, des cellules issues d'une biopsie de nœuds lymphatiques et des cellules du sang furent cultivées en présence d'Interleukine 2 (IL-2) préalablement découverte par le groupe de Gallo en 1976 (Morgan et al., 1976). La lignée ainsi établie, après une centaine de passages en laboratoire, devint indépendante à l'IL-2 et fut nommée HUT-102 (Poiesz et al., 1980). A partir de cette lignée, de nombreuses études furent réalisées afin de confirmer la découverte d'un nouveau rétrovirus humain. Tout d'abord le caryotype standard fut réalisé afin d'exclure d'éventuelles contaminations par un rétrovirus d'origine animale comme cela fut le cas auparavant. Puis une observation au microscope électronique permit de révéler la présence du bourgeonnement de particules virales de type C à la surface des cellules (**figure 1**). Les particules virales furent purifiées sur gradient de sucrose et une activité de transcriptase inverse fut détectée confirmant le caractère rétroviral du virus. Afin d'exclure une nouvelle fois toute contamination, l'équipe mit en évidence qu'aucun des anticorps dirigés contre les différentes RT animales connues ne

pouvait neutraliser l'activité de la RT nouvellement découverte. La morphologie des particules virales, le profil protéique des virions ainsi que l'activité de la RT différente de celles des autres rétrovirus animaux connus, permirent de conclure à l'isolation d'un nouveau rétrovirus humain appelé HTLV pour *Human cutaneous T cell Lymphoma* (**figure 2**). La caractérisation par la suite des séquences nucléotidiques et des protéines antigéniques différentes d'autres rétrovirus ne firent que renforcer l'hypothèse d'un nouveau rétrovirus (Kalyanaraman et al., 1981; Reitz et al., 1981). Un an plus tard, l'équipe de Gallo mit en évidence la détection d'anticorps spécifiques dirigés contre les différentes protéines du HTLV dans le sérum du premier patient (Posner et al., 1981). Enfin, la détection de ces mêmes particules virales de type C dans une nouvelle lignée établie à partir d'un patient atteint d'un syndrome de Sézarie (Leucémie à cellule T) renforça l'hypothèse d'un nouveau rétrovirus humain (Poiesz et al., 1981).

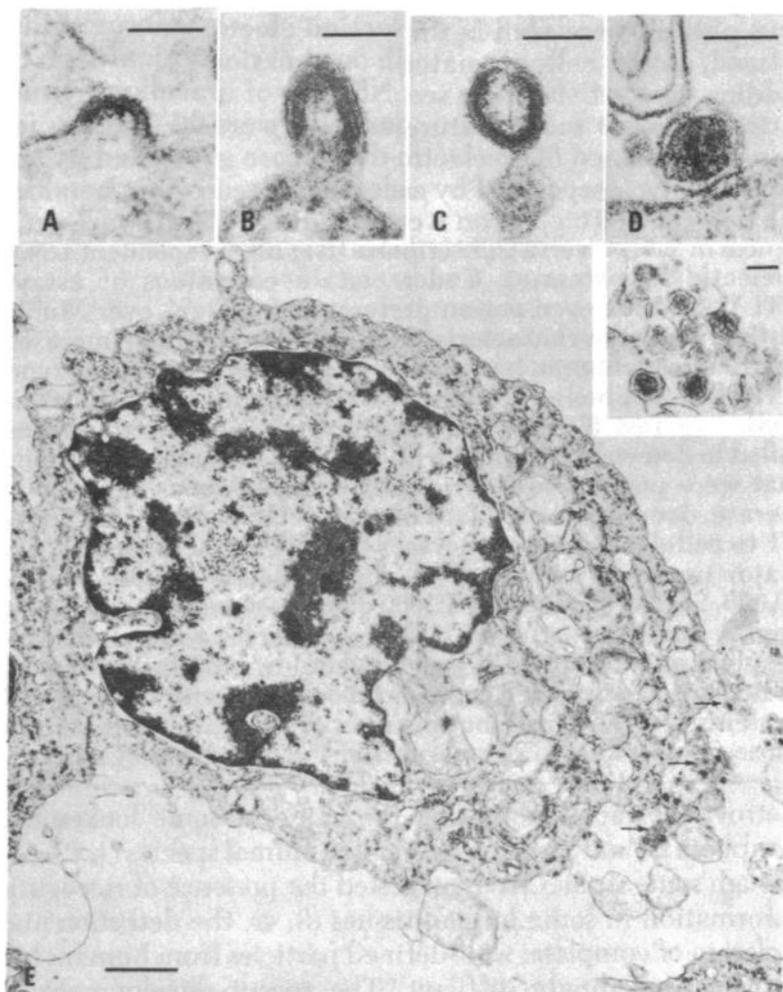


Figure 1 : Premières observations du bourgeonnement du virus HTLV-1 dans des cellules HUT-102 par l'équipe du Dr Robert Gallo. D'après (Coffin, 2015)

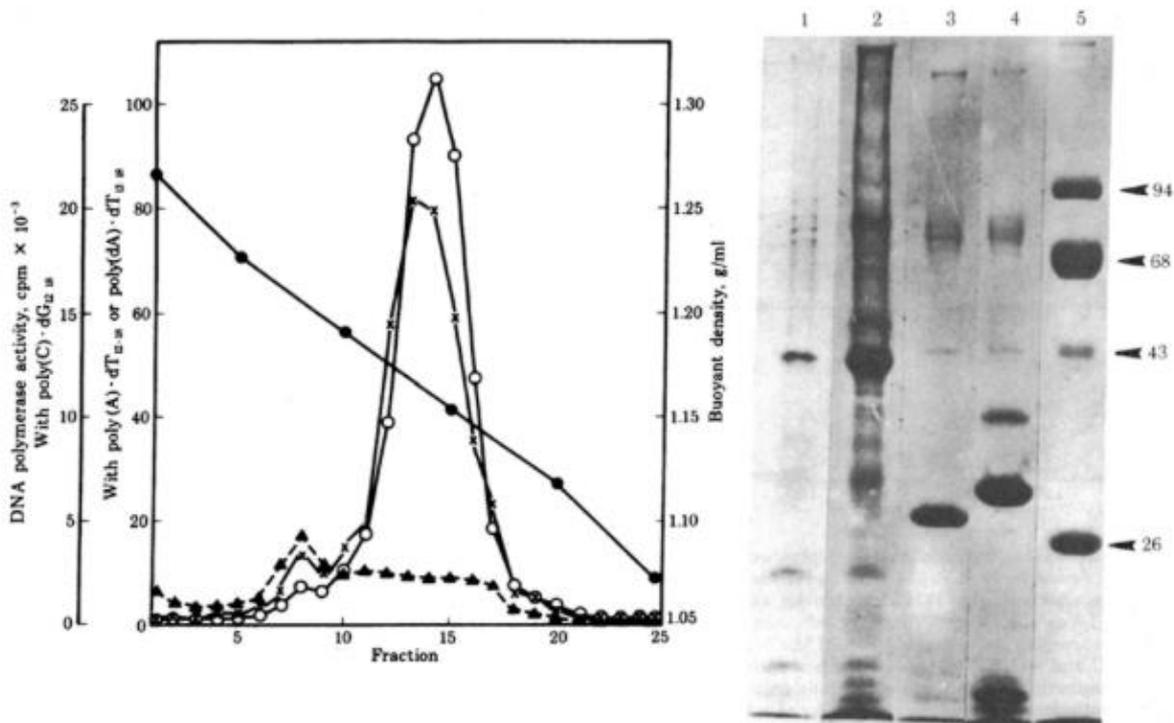


Figure 2 : Caractérisation de la particule virale de type C issue des cellules HUT-102.

Sur le panel de gauche, analyse de l'activité de la reverse transcriptase issue des particules virales purifiées sur gradient de sucrose. Sur le panel de droite, analyse par électrophorèse des protéines virales issues de différents rétrovirus. Ainsi on retrouve sur les pistes 1 et 2 le virus HTLV-1 issu des lignées HUT-102, sur la piste 3 le virus du sarcome simien, sur la piste 4 le virus de la leucémie murine et sur la piste 5 des marqueurs de poids moléculaire. D'après (Poiesz et al., 1980)

Au même moment, de l'autre côté du pacifique, un cluster de patients atteints d'une forme de leucémie à cellules T fut décrit dans la population Japonaise au Sud Ouest de l'île comme le relate Robert Gallo lors d'un workshop à Kyoto en 1981 (Gallo, 1981). En effet, en 1977, l'équipe de Takashi Uchiyama décrit chez 16 patients, dont 13 nés dans la ville de Kyushu, une forme de leucémie proche d'un syndrome de Sézarie ou d'un mycosis fongoides qu'ils nommèrent ATL pour Adult T-cell Leukemia (Uchiyama et al., 1977). La proximité géographique entre tous ces cas suggéra à l'équipe d'Uchiyama une possible cause virale à l'origine de la pathologie. Par la suite, Miyoshi réussit à établir la lignée MT-1 à partir de cellules d'un patient ATL en co-cultivant ces cellules avec du sang de cordon ombilical afin de pallier le manque de lymphokines purifiées, puis les lignées MT2 et MT4 (Miyoshi et al., 1980, 1981a). La lignée MT2 se révéla être issue de

lymphocytes de sang de cordon sains différents des cellules ATL, ce qui sera la première preuve de transmission du virus *de novo*. Hinuma mit en avant la présence de particules virales dans les lignées MT1 après observation au microscope électronique mais aussi la présence d'anticorps spécifiques aux antigènes présents dans les cellules MT1 chez tous les patients souffrant d'ATL (Hinuma et al., 1981). Et c'est enfin en 1982, que l'équipe de Mitsuaki Yoshida isola, à partir de la lignée MT2, des particules virales de type C et détecta une activité de transcriptase inverse dans le surnageant et la présence de génome proviral au sein de ces cellules. Ils décrivent donc eux aussi, l'existence d'un nouveau rétrovirus qu'ils appelèrent ATLV pour *Adult T cell Leukemia Virus* (Yoshida et al., 1982). Les équipes américaines et japonaises collaborèrent par la suite et se mirent d'accord sur le fait que le HTLV et le ATLV étaient les mêmes virus (Gallo et al., 1982). Comme l'explique Robert Gallo, la dénomination HTLV (*Human T cell Leukemia/Lymphoma Virus*) fut finalement conservée afin de rendre hommage aux travaux réalisés par son équipe aux Etats Unis et la leucémie associée au virus fut nommée ATL pour rendre hommage aux équipes japonaises (Gallo, 2005).

Les travaux des différentes équipes américaines et japonaises ont permis la découverte du premier et seul rétrovirus oncogène humain chez l'Homme à ce jour. Les différentes avancées techniques réalisées durant toutes ces années, comme la détection de l'activité de la transcriptase inverse ou bien les différentes conditions afin de permettre de valider la découverte d'un nouveau rétrovirus humain, ont conduit par la suite à la découverte d'autres rétrovirus humains comme HTLV-2 (Kalyanaraman et al., 1982) mais surtout du Virus de l'immunodéficience acquise (VIH) (Barré-Sinoussi et al., 1983). Le virus HTLV-1 est à ce jour un modèle unique pour la compréhension de l'oncogenèse chez l'Homme du fait de sa capacité à immortaliser et transformer les cellules mais aussi de part son unicité dans le monde des rétrovirus.

II- Pathologies associées.

De nombreuses pathologies ont été décrites comme étant associées au virus HTLV-1 avec cependant des degrés d'association très variables. Elles sont toutefois relativement rares puisqu'elles ne sont retrouvées que chez 3 à 7% des personnes infectées (Gessain, 2011).

II-1- La leucémie à cellules T de l'adulte (ATL).

II-1-1) Tableau clinique.

L'ATL est une lymphoprolifération maligne et agressive de lymphocytes T CD4+ se déclarant essentiellement de manière tardive chez des patients ayant été contaminés 40 à 60 ans avant l'apparition des premiers symptômes. Cette forme de leucémie est assez rare car elle ne touche que 5% des patients infectés par HTLV-1 avec une incidence de 2 à 5 cas pour 100 000 habitants en zone de forte endémie comme au Japon (Yamaguchi and Watanabe, 2002). Le facteur de risque principal pour cette pathologie semble être le passage du virus de manière verticale, de la mère à l'enfant, lors de l'allaitement avec une prévalence de la maladie plus importante chez les hommes que chez les femmes (ratio homme/femme de 1,4) (Gessain and Mahieux, 2012).

Plusieurs formes cliniques ont été décrites : les formes leucémiques aiguës, lymphomateuses, chroniques et indolentes (ou smoldering). Ces formes se différencient entre elles par des manifestations cliniques variées et un taux de survie variable (**Tableau 1**) (Utsunomiya et al., 2015).

Les formes leucémiques aiguës et lymphomateuses sont regroupées sous le terme de forme agressive et sont rapidement mortelles avec une médiane de survie de l'ordre de 6 mois. Elles sont caractérisées cliniquement par des adénopathies périphériques associées fréquemment à une hépatosplénomégalie, une hypercalcémie et des lésions cutanées variées. Des manifestations neurologiques, gastro-intestinales, osseuses ou pulmonaires sont aussi décrites et sont toujours associées à un mauvais pronostic (Yasunaga and Matsuoka, 2007). Ces deux formes sont caractérisées par une prolifération clonale de lymphocytes T CD4+ activés qui contiennent une ou plusieurs copies du virus. Dans les cas des formes leucémiques, l'hyperlymphocytose est caractéristique avec des cellules retrouvées dans le sang et la moelle osseuse, qui présentent des noyaux en forme de trèfles avec de la chromatine condensée, des nucléoles petits ou absents et un cytoplasme basophile (**figure 3**). Dans les formes lymphomateuses, les lymphocytes T CD4+ transformés envahissent les organes lymphoïdes et sont responsables d'un lymphome T à cellules pléomorphes. La forme chronique est de meilleur pronostic avec une médiane de survie de 24 mois. L'évolution est plus lente sans aucune hypercalcémie ni atteinte autre que ganglionnaire,

hépatosplénique et cutanée. Cette forme peut cependant évoluer vers une forme dite aiguë (Gessain, 2011).

Enfin, la forme indolente est beaucoup plus rare. Elle se caractérise par la présence de plus de 5% de lymphocytes matures anormaux et de lésions cutanées. Cette forme peut évoluer vers une forme chronique ou aiguë (Gonçalves et al., 2010). Les patients ATL étant fortement immunodéprimés, les infections opportunistes comme l'infection par *strongyloides stercoralis*, l'anguillulose ou bien des pneumonies à *Pneumo Cystis carinii* nécessitent une attention particulière et une prise en charge très rapide (Gabet et al., 2000; Stewart et al., 2011).

Le diagnostic de l'ATL pour les formes aiguës est relativement facile et est basé, en plus de la constatation des symptômes précédemment décrits, sur l'identification obligatoire de l'intégration clonale (PCR inverse). Ces techniques étant relativement coûteuses, il est facilement explicable que le taux de détection dans les pays les plus pauvres soit difficilement réalisable. Les formes chroniques et indolentes, quant à elles, sont plus difficiles à diagnostiquer car elles sont sensiblement proches d'un syndrome de Sezary, d'un mycosis fongoides et d'autres lymphomes T cutanés.

	Indolente	Chronique	Lymphome	Aigüe
Proportion de cas	5%	20%	20%	55%
Médiane de survie		24 mois	10 mois	6 mois
Survie à 4 ans	66%	27%	6%	5%
Symptômes				
% LT matures anormaux dans le sang périphérique	>5%	>5%	<1%	>5%
Lymphocytose absolue (> 4.10 ⁹ lymphocytes/L)	Non	Oui avec lymphocytose T (>3,5.10 ⁹ /L)	Non	Oui
Hypercalcémie ([Ca ²⁺]>2,74mmol/L)	Non	Non	Fréquente	Fréquente
Valeur de la lactate déshydrogénase (LDH) par rapport à la normale (limite haute)	Jusqu'à 1,5 fois	Jusqu'à 2 fois		
Lymphadénopathie	Non	Possible	Oui	Oui
Atteinte hépatique	Non	Possible	Fréquente	Fréquente
Atteinte de la rate	Non	Possible	Fréquente	Fréquente
Atteinte du système nerveux central	Non	Non	Possible	Possible
Atteinte des os	Non	Non	Possible	Possible
Atteinte du tractus gastro-intestinal	Non	Non	Possible	Possible
Effusion pleurale	Non	Non	Possible	Possible
Lésions pulmonaires	Possibles	Possibles	Possibles	Possibles
Lésions cutanées	Possibles	Possibles	Fréquentes	Fréquentes

Tableau 1 : Caractéristiques des différentes formes cliniques d'ATL.

Les formes aiguës et les formes lymphomateuses sont les formes les plus agressives et sont associées à un très mauvais pronostic. Les formes chroniques et indolentes sont de meilleur pronostic avec une médiane de survie plus longue et moins d'atteinte multi viscérale. Elles restent cependant associées à un taux de mortalité extrêmement élevé. D'après (Gessain, 2011; Utsunomiya et al., 2015).

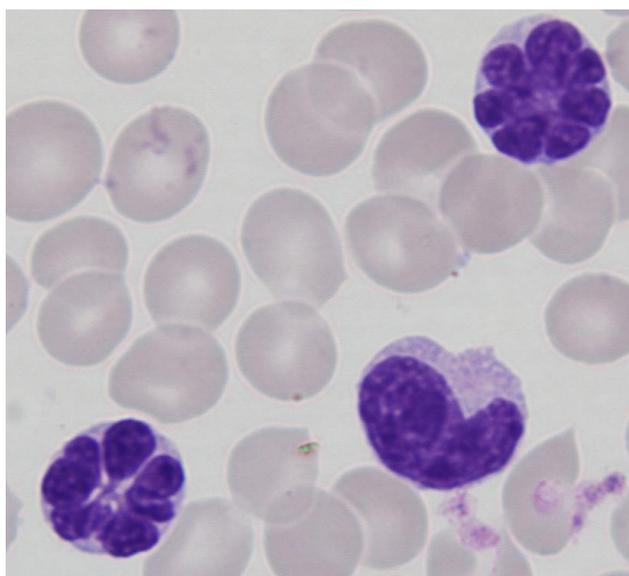


Figure 3 : Cellules leucémiques « en fleur » caractéristiques de l'ATL.

Observation de lymphocyte T leucémiques issue du sang périphérique d'un patient ATL avec la présence de noyaux convolués à l'origine de cette morphologie en fleur. D'après (Matsuoka, 2005).

II-1-2) Pathogenèse.

Les mécanismes à l'origine de la pathogenèse de l'ATL sont encore mal connus à ce jour. Il s'agit très probablement d'une carcinogenèse à plusieurs étapes dans laquelle on peut distinguer trois stades distincts (**figure 4**) (Gessain, 2011). Le premier correspond à une phase de primo infection lors d'un contact prolongé avec le virus durant l'allaitement. En effet 95% des patients ATL ont été infectés par cette voie (Gessain, 2011). La deuxième étape correspond à une expansion clonale des lymphocytes T CD4+ infectés. Cette hyperlymphocytose caractéristique est la résultante de nombreuses modulations de processus cellulaires clés par la protéine Tax du virus que l'on détaillera par la suite. En effet, Tax est, entre autre, capable de moduler la prolifération lymphocytaire, le cycle cellulaire, l'entrée en apoptose et différentes voies de signalisation conférant au lymphocyte les caractéristiques d'un phénotype dit « immortalisé » (Matsuoka and Jeang, 2011). Cette phase de prolifération clonale va durer entre 20 et 80 ans, période de latence durant laquelle va s'alterner expansion clonale lymphocytaire et réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T CD8+ dirigés contre la protéine virale Tax fortement immunogène. La troisième phase correspond à la sélection et à l'échappement d'un clone leucémique conférant alors à la cellule un phénotype dit « transformé ». En effet, suite à l'accumulation d'altérations génétiques favorisées par Tax au cours du temps, un clone transformé va alors échapper au contrôle du système immunitaire et va contribuer à l'apparition de la maladie (Majone et al., 1993; Matsuoka and Jeang, 2011).

De manière intéressante, dans plus de 50% des cas les clones sélectionnés n'expriment plus la protéine Tax soit du fait d'une délétion ou de mutations du LTR 5' ou d'une hyperméthylation de celui-ci, soit même à la délétion ou à l'hypermethylation du gène Tax conduisant dans tous les cas à l'absence de production de Tax dans ces cellules (Furukawa et al., 2001; Koiwa et al., 2002; Miyazaki et al., 2007; Taniguchi et al., 2005). Cependant, les transcrits HBZ sont eux toujours présents dans 100% des cas, laissant entendre une forte implication de HBZ dans la persistance des clones ATL (Satou et al., 2006). HBZ est en effet très peu immunogène, contrairement à Tax, permettant ainsi l'échappement au système immunitaire mais elle est également capable d'agir sous forme d'ARN sur la prolifération des clones en activant de nombreux gènes cellulaires et notamment le gène codant pour la sous-unité catalytique de la télomerase.

Le modèle actuel est tel qu'après accumulation de mutations sous l'influence de la protéine Tax au cours d'une longue période, un clone immortalisé va atteindre le stade de transformation sous l'effet d'HBZ. Il va alors proliférer, persister et être à l'origine du développement de la maladie. Les protéines auxiliaires p30 et p13 ainsi que la dérégulation de nombreux miRNA à l'origine de l'activation constitutive de différentes voies de signalisation, comme la voie NF- κ B, ont été décrites récemment comme participant aussi à l'apparition de ces clones leucémiques (Edwards et al., 2011; Jeang, 2010).

Il est intéressant de noter qu'au vu de l'absence de Tax dans les cellules ATL, la perte de Tax est donc un évènement majeur pour la sélection et l'apparition d'un clone transformé. Cependant, Tax est nécessaire en amont afin de permettre l'immortalisation lymphocytaire. Malgré le fait que Tax ne soit pas ou très peu exprimée par les cellules ATL, de nombreuses voies de signalisation à l'origine activées par Tax sont toujours actives (Kataoka et al., 2015). Une des hypothèses avancées serait que Tax favoriserait donc de nombreuses altérations génétiques qui seront ainsi maintenues en son absence. Comme décrit ci dessus, ces activations en absence de Tax sont aussi dues à la présence d'HBZ bien entendu mais aussi à la présence de miRNA (Moles and Nicot, 2015).

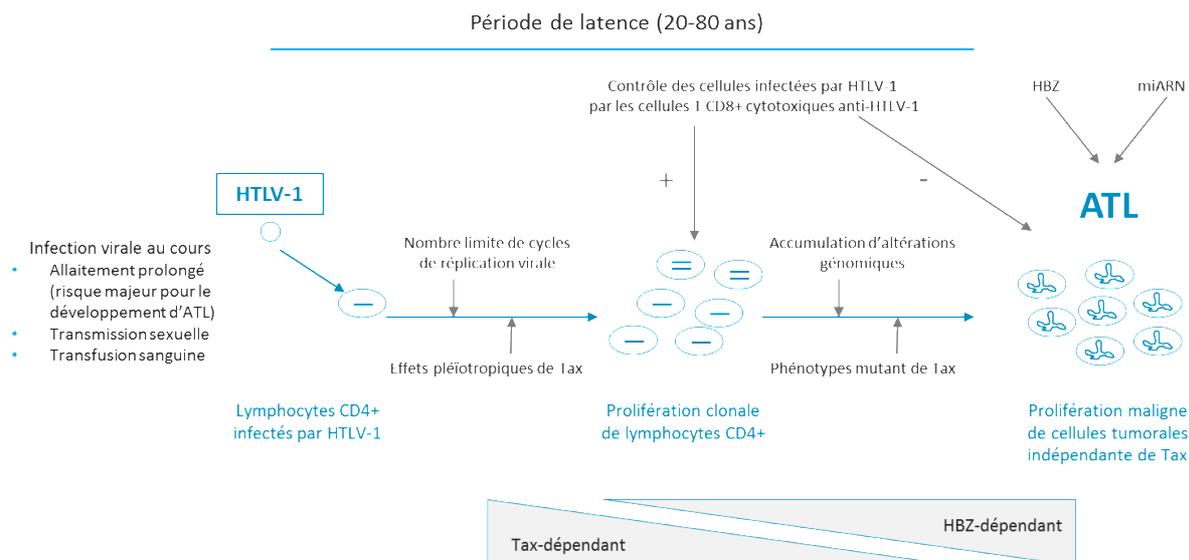


Figure 4 : Modèle actuel de développement de l'ATL.

Le modèle actuel de développement de l'ATL comprend trois phases. Une première phase dite de primo infection durant laquelle, suite à une transmission principalement par allaitement prolongé, le virus va infecter majoritairement les lymphocytes T CD4+. La deuxième phase, pouvant durer de 20 à 40 ans, est caractérisée par une prolifération clonale majoritairement de lymphocytes CD4+ immortalisés sous l'action de la protéine Tax, la production de celle-ci étant contrôlée par une réponse cytotoxique médiée par des lymphocytes T CD8+. Au cours du temps, les lymphocytes infectés vont accumuler de nombreuses altérations génétiques aboutissant à l'apparition de clones leucémiques n'exprimant plus Tax. Enfin, lors de la troisième phase, sous l'action de la protéine HBZ et l'intervention de miRNA, les cellules provenant du clone transformé vont proliférer et conduire au développement de l'ATL. Adapté de (Gessain, 2011).

II-1-3) Thérapies.

Le traitement classique *via* des polychimiothérapies usuelles utilisées dans le cas de lymphomes non Hodgkiniens et de leucémies lymphoïdes s'avère très décevant dans le cas des ATL avec 10% de survie à 4 ans pour les formes aiguës et une médiane de survie de l'ordre de 6 mois (Utsunomiya et al., 2015). La combinaison IFN- α /Zidovudine (AZT) est le traitement actuel de référence en Europe et aux Etats Unis avec de bons résultats pour les formes leucémiques, chroniques et indolentes donnant des rémissions prolongées et complètes. Les formes lymphomateuses répondent mal à ce traitement mais une association avec la chimiothérapie classique donne de meilleurs résultats (Bazarbachi et al., 2010). Récemment, des essais cliniques combinant INF- α /AZT et arsenic donnent des résultats très prometteurs avec des effets indésirables modérés chez les patients atteints de formes chroniques (Kchour et al., 2009). La combinaison INF- α et arsenic seul a aussi été testée donnant de bons résultats pour les formes

chroniques et lymphomateuses avec cependant une toxicité plus élevée que la combinaison INF- α /AZT/arsenic.

De nombreux essais cliniques testant l'association de différentes drogues comme l'utilisation d'histones déacetylases favorisant l'apoptose des cellules leucémiques, l'utilisation d'inhibiteur du protéasome comme le Bortezomib ou bien des inhibiteurs de la kinase mTOR fortement activée dans les ATL sont en cours (Utsunomiya et al., 2015). De nombreux anticorps monoclonaux comme le mogamulizumab ciblant les marqueurs CCR4 ou CD25 fortement exprimés à la surface des cellules ATL sont aussi à l'étude (Ishii et al., 2010).

Enfin, l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques donne des résultats très intéressants. Cependant, la mortalité due à cette intervention invasive ainsi que le taux de développement élevé de maladies opportunistes font que ce traitement est réservé aux patients jeunes atteints de formes très agressives (Marçais et al., 2012).

II-2- La paraparésie spastique tropicale TSP/HAM.

II-2-1) Tableau clinique.

La paraparésie spastique tropicale est une maladie de l'adulte avec une prédominance féminine (ratio homme/femme 0,4) dont les premiers symptômes apparaissent vers l'âge de 40-50 ans (Gessain and Mahieux, 2012). L'association entre infection par HTLV-1 et développement de la maladie fut établie pour la première fois en 1985 par Antoine Gessain et Guy de Thé en Martinique puis confirmée au Japon en 1986 (Gessain et al., 1985; Osame et al., 1986). L'incidence de la maladie est faible avec 0,25% à 3% de personnes infectées qui déclareront la maladie. Contrairement à l'ATL, la voie de contamination préférentielle se fait non pas lors d'un allaitement mais lors de transfusions sanguines ou de rapports sexuels (Gessain and Mahieux, 2012). Les symptômes sont, comme pour l'ATL, multiples et difficilement différenciables d'autres myélopathies. Dans la majorité des cas, le début d'apparition des symptômes est insidieux. Il est marqué par l'apparition de lombalgies irradiant dans les membres inférieurs associées à des sensations de raideurs et de faiblesses. Des troubles urinaires ainsi que l'impuissance pour les hommes sont fréquemment décrits. Les troubles du système nerveux périphérique sont rares et une atteinte des différents sphincters est importante au cours de la maladie (De Castro-Costa et al., 2006). La progression de la maladie est variable, cependant, 10 ans après le début des premiers symptômes, près de

la moitié des patients sont atteints d'une paraplégie spastique associée à des handicaps lourds (Gessain, 2011). L'âge de début précoce d'apparition des symptômes ainsi qu'une contamination transfusionnelle augurent d'une progression de la maladie plus rapide et de handicap beaucoup plus sévère (Gotuzzo et al., 2004). D'un point de vue biologique, la paraparésie spastique tropicale est caractérisée par une infiltration de cellules immunitaires (lymphocytes T CD4+ au début de la maladie puis CD8+ en fin de maladie majoritairement) au niveau de la substance blanche et grise de la moelle épinière. Cet infiltrat crée un environnement inflammatoire extrêmement important conduisant au cours du temps à une méningomyélite chronique associée à une démyélinisation et une dégénérescence axonale (Izumo, 2010). La moelle épinière est ainsi atrophiée principalement dans sa partie basse et de nombreuses lésions de la substance blanche apparaissent. Des infiltrats sont aussi retrouvés au niveau du cerveau (Mendes et al., 2014).

Le diagnostic de la maladie est associé, en plus des symptômes précédemment décrits, à la présence du virus chez les patients avec la détection d'une charge provirale élevée pouvant atteindre près de 30%, des anticorps spécifiques dirigés contre le virus, une pleiocytose à présence lymphocytaire modérée dans le liquide céphalo-rachidien et la détection de quelques cellules ATL-Like (noyaux en forme de fleurs) (Olindo et al., 2005). La charge provirale est déterminée en mesurant le nombre d'intégration du génome du virus HTLV-1 dans les cellules infectées.

II-2-2) Pathogénèse.

Malgré de nombreux travaux, la pathogénèse de la maladie est encore extrêmement mal connue et trois hypothèses sont actuellement discutées afin d'expliquer les différentes lésions de la moelle (Gessain and Mahieux, 2012; Saito, 2010) (**figure 5**). La première hypothèse avancée est basée sur une réponse cytotoxique médiée par les lymphocytes T CD8 contre les cellules gliales infectées par le virus. L'expression des antigènes viraux (notamment Tax) par ces cellules serait en effet reconnue et une destruction de ces cellules entraînerait des lésions au niveau de la moelle (Lehky et al., 1995). Cependant la notion de cellules du système nerveux infectées par HTLV-1 reste encore discutée notamment pour les cellules gliales et pour les astrocytes. La deuxième hypothèse repose sur un mécanisme dit « by stander » où un environnement cytokinique délétère au sein des infiltrats des cellules immunitaires détruirait la moelle

et le système nerveux central. En effet, les lymphocytes T CD8 dirigés contre les antigènes viraux ainsi que ceux infectés par HTLV-1 libèreraient du TNF- α et de l'INF- γ toxiques pour les cellules nerveuses (Kuroda and Matsui, 1993; Nakamura et al., 1993). Enfin, le troisième modèle repose sur une réponse auto-immune chez la personne infectée. Ainsi des lymphocytes T auto-réactifs ainsi que des anticorps dirigés au départ contre la protéine Tax cibleraient directement les cellules du système nerveux en reconnaissant par mimétisme moléculaire les protéines neuronales de l'hôte hnRNP A1 (Levin et al., 2002).

Quelque soit l'hypothèse retenue, le passage de la barrière hémato-encéphalique par le virus ou par les cellules infectées est obligatoire. Ce passage a pu être démontré par la détection de la protéine Tax dans le liquide céphalorachidien ainsi que par la présence de lymphocytes T infectés présentant le même site d'intégration du génome proviral que les lymphocytes infectés dans le sang du patient (Cartier and Ramirez, 2005; Cavrois et al., 2000). Ainsi, il y a bien passage de cellules infectées à travers la barrière hémato-encéphalique et non seulement passage du virus. Plusieurs études ont pu expliquer le franchissement de la barrière. La sécrétion de TNF- α par les lymphocytes infectés entraîne une altération des jonctions serrées des cellules endothéliales composant la barrière, favorisant ainsi le passage de virion par transcytose (Romero et al., 2000). De plus, cette sécrétion de TNF- α et d'IL-1 α par les cellules endothéliales entrainerait l'activation de la voie NF- κ B et la désorganisation des jonctions serrées entre les cellules favorisant le passage des cellules infectées (Afonso et al., 2008). La protéine Tax pourrait aussi jouer un rôle aussi dans la désorganisation de ces jonctions. Au vu de ces différents éléments, un mécanisme d'établissement de la maladie a pu être décrit comme pour l'ATL (**Figure 6**).

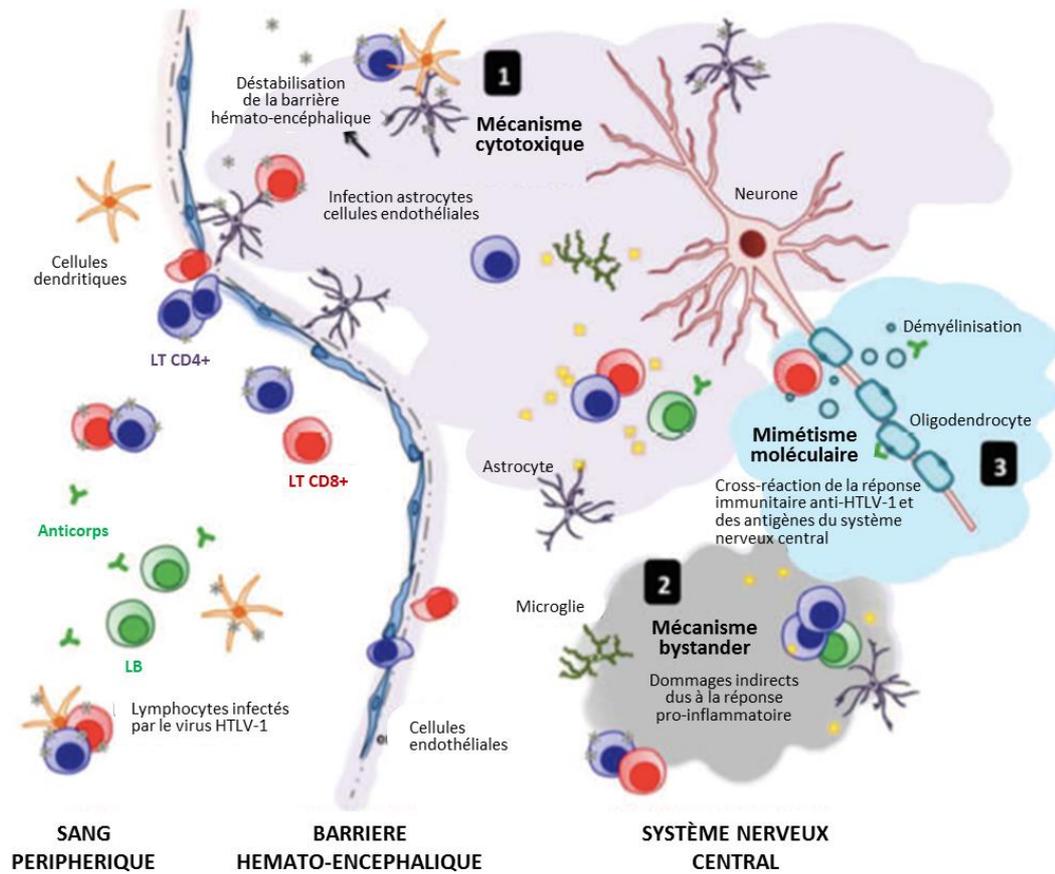


Figure 5 : Modèle présentant les mécanismes à l'origine des lésions de la moelle induites par le virus HTLV-1 dans de le cas de la TSP.

Suite au passage de la barrière hémato-encéphalique des lymphocytes T infectés vers le système nerveux central, de nombreuses lésions inflammatoires sont retrouvées chez les patients à l'origine des symptômes de la TSP. Trois modèles expliquant l'étiologie de ces lésions sont actuellement proposés. Un premier modèle (1) dit cytotoxique dans lequel les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques dirigés contre les antigènes viraux vont détruire massivement les cellules du système nerveux central. Un deuxième modèle (2) dit « bystander » dans lequel les cytokines pro inflammatoires secrétées par les lymphocytes T présents dans le système nerveux vont être responsables de l'altération de la moelle. Enfin un troisième modèle (3) dit auto-immun dans lequel les protéines du soi vont être directement ciblées par les cellules du système immunitaire a été décrit. Adapté de (Olière et al., 2011).

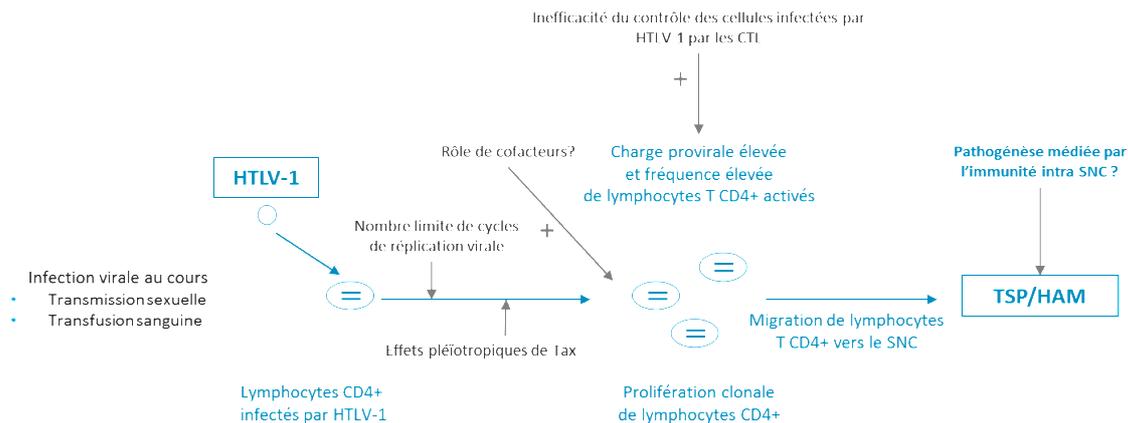


Figure 6 : Modèle actuelle du développement de la TSP.

Le modèle actuel du développement de la paraparésie spastique tropicale comporte trois étapes majeures. Une première étape dite de primo infection durant laquelle le virus va infecter majoritairement les lymphocytes T CD4+ après une transmission par transfusion sanguine essentiellement ou bien par transmission sexuelle. Va suivre alors une deuxième phase durant laquelle, sous l'influence de la protéine Tax, les lymphocytes infectés, majoritairement CD4+, vont proliférer puis une troisième étape où les lymphocytes infectés vont traverser la barrière hémato encéphaliques afin d'atteindre le système nerveux central. Une réponse immunitaire anti HTLV-1 au sein du système nerveux central va alors être mise en place par l'organisme, caractérisée par la présence d'infiltrats de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques au niveau de la moelle osseuse entraînant alors une inflammation et des lésions de la moelle. Adapté de (Gessain, 2011).

II-2-3) Traitements.

Le traitement de la TSP reste décevant et décourageant et il est toujours associé à des séquelles lourdes en fin de maladie. En effet, les dommages causés au système nerveux sont malheureusement irréversibles entraînant d'autres complications conduisant à une réduction de l'espérance de vie de l'ordre de 15 ans (Gessain and Mahieux, 2012). Plusieurs stratégies ont été employées afin de moduler la réponse immune et diminuer les lésions au niveau de la moelle épinière comme l'utilisation de corticothérapie, l'emploi d'INF α ou d'INF β 1a. La sévérité de la maladie étant fortement corrélée à la charge provirale plusieurs traitements visant à diminuer la présence du virus ont été mis en place comme l'utilisation d'analogues nucléosidiques comme la zidovudine ou la lamivudine afin d'empêcher la réplication virale. La mise en place de plasmaphérèse, l'utilisation de vitamine C, d'immunoglobulines, ou d'anticorps anti Il-2 humanisés ont aussi été testés et aucun de ces traitements n'a été satisfaisant (Gessain, 2011). A ce jour, l'emploi de valproate (VPA), un inhibiteur d'histone déacetylase, associé à la zidovudine, un inhibiteur de la transcriptase inverse, s'avère être le seul traitement prometteur. La stratégie étant de réactiver l'expression virale afin de permettre une action des antirétroviraux et de stimuler la réponse immunitaire. Ainsi le VPA entraîne une augmentation de la quantité de Tax et de Gag permettant d'engendrer une réponse

immunitaire efficace *via* les lymphocytes T CD8 (Belrose et al., 2011). Associée à la zidovudine, la réplication virale va être diminuée et l'infection de nouvelles cellules va être empêchée. Cette stratégie employée chez des singes infectés par le STLV-1 a pu montrer une forte diminution de la charge virale et une forte réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T Cytotoxiques (*LTC*) (Afonso et al., 2010). Cependant l'arrêt du traitement entraîne une ré-augmentation de la charge montrant les limites de la thérapie.

II-3- Autres pathologies associées à HTLV-1.

Plusieurs autres pathologies ont été associées à l'infection par le virus HTLV-1 avec des niveaux d'associations variables basés principalement sur des données épidémiologiques, virologiques et des modèles animaux (**Tableau 2**) (Proietti et al., 2005). L'association avec des uvéites a été particulièrement bien démontrée avec la détection de virus et de lymphocytes T infectés dans le corps vitreux de patients aux Caraïbes et au Japon notamment (Takahashi et al., 2000). Le virus peut également être associé à des dermatites infectieuses, des myosites et des polymyosites avec, encore une fois, des degrés d'associations avec le virus variables (**Tableau 2**). Enfin, certaines études ont montré que l'évolution vers le syndrome de l'immunodéficience acquise est plus rapide en cas de co-infection avec HTLV-1 ou HTLV-2 (Brites et al., 2009).

Maladies	Association
Adulte	
• Leucémie/Lymphome T de l'adulte (ATLL)	++++
• Paraparésie Spastique Tropicale (TSP)	++++
• Uvéite intermédiaire de l'adulte jeune (Japon/Caraïbe)	+++
• Dermatite infectieuse (rare)	+++
• Polymyosite, myosite à inclusion	+++
• Arthrite	+
• Syndrome de Sjögren	+
Enfant	
• Dermatite infectieuse (Jamaïque/Brésil/Afrique noire)	++++
• TSP (rare)	++++
• ATLL (très rare)	++++
++++ : association causale prouvée	
+++ : association causale probable	
+ : association possible dans certains cas	

Tableau 2 : Maladies associées à HTLV-1 et leurs degrés d'association avec le virus. Adapté de (Gessain, 2011).

III. Le virus HTLV-1 : Origine d'un rétrovirus pas comme les autres.

III-1- Phylogénie des PTLV

Le HTLV-1 appartient à la famille des *Retroviridae* du fait de sa capacité de rétro transcrire son génome ARN positif en ADN double brin grâce à la transcriptase inverse présente dans la particule virale puis de s'intégrer dans le génome de son hôte. Au sein de cette famille comportant 7 genres, les virus HTLV ont été classés lors du congrès de taxonomie de 1998 dans la genre des deltarétrovirus (Pringle, 1998) avec leur pendant simien STLV (Simian T-cell lymphotropic virus) ainsi que le virus de la leucémie bovine BLV (Bovine Leukemia Virus). Le BLV, à l'origine de leucémies, de lymphomes et de lymphosarcomes chez les bovins, est un rétrovirus B lymphotrope identifié et caractérisé bien avant le virus HTLV-1 en 1975 (Gilden et al., 1975). Malgré le fait qu'il diverge au sein de sa séquence du gène *pol* de près de 42% par rapport à la polymérase des virus HTLV-1 et HTLV-2 (Dube et al., 1997), le BLV partage de nombreux points communs avec les virus HTLV ce qui le classe de manière logique au sein des deltarétrovirus. En effet, le BLV partage avec les autres virus HTLV l'organisation de leur génome, leurs modes de transmissions, leur stratégie de réplication et leur pouvoir transformant, ce qui fait de BLV un modèle de choix pour l'étude des mécanismes oncogéniques induit par les rétrovirus oncogènes *in vivo* (Rodríguez et al., 2011). Ces 3 virus possèdent notamment une organisation génomique bien particulière avec la présence d'une région pX en 3' à partir de laquelle va être produite, entre autre, la protéine Tax (Rosen et al., 1986).

La comparaison des séquences nucléotidiques des séquences terminales répétées du génome (LTR) des virus HTLV-1 et STLV permit dans les années 1986 d'établir que les virus présentaient de très fortes homologues de séquences (90 à 95% en fonction des sous-types Africains ou Asiatiques respectivement) (Watanabe et al., 1986). Les mêmes observations ont été faites au fur et à mesure des découvertes des différents virus HTLV et STLV ce qui a conduit à les regrouper sous le nom de virus T lymphotropes des primates (PTLV, Primate T cell Lymphotropic Virus) (Gessain and de Thé, 1996). Malgré leurs fortes ressemblances, l'analyse des gènes *gag*, *pol*, *env* et *tax* de l'ensemble des génomes de PTLV répertoriés permet de les distinguer et de les classer en 4 groupes distincts : PTLV-1, PTLV-2, PTLV-3 et PTLV-4 (**Figure 7**) (Mahieux and Gessain, 2011).

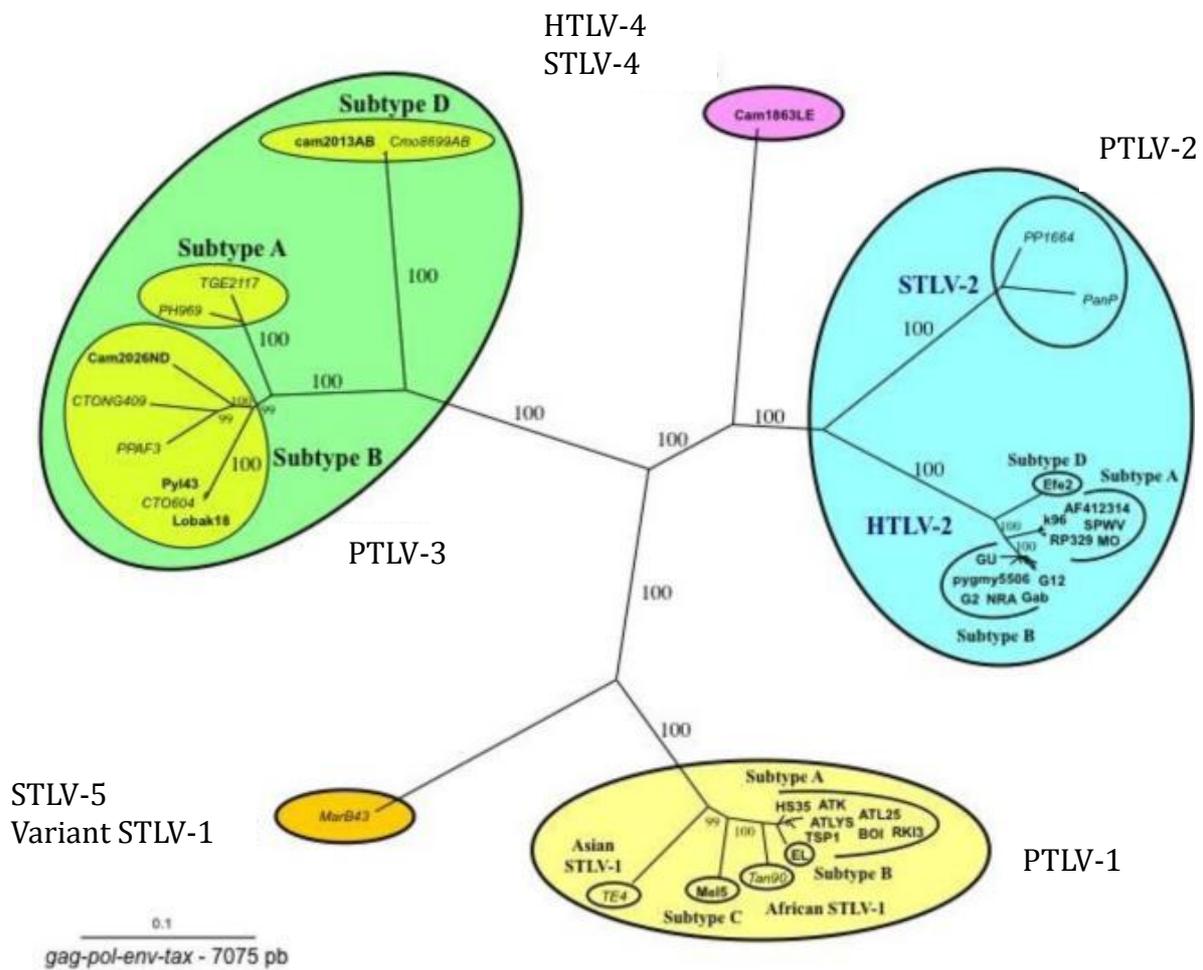


Figure 7 : Modèle actuel du développement de la TSP.

Cet arbre a été construit à partir des séquences concatémériques des gènes *gag-pol-env-tax* provenant de chacun des génomes des PTLV répertoriés dans les banques. Les quatre différents groupes viraux, PTLV-1, PTLV-2, PTLV-3 et PTLV-4, sont représentés en fonction de l'évolution de leurs séquences au cours du temps. Récemment, une nouvelle souche STLV-4, identique à 99% au niveau de la séquence nucléotidique du HTLV-4, a été découverte chez des gorilles au Cameroun (LeBreton et al., 2014). La souche MacB3 est représentée dans le groupe des STLV-5 car cette souche diverge de manière significative par rapport aux autres souches des virus PTLV-1 d'où sa classification en tant que variant STLV-1 (Liégeois et al., 2008). D'après (Mahieux and Gessain, 2011)

Les PTLV1 regroupent les virus HTLV-1 ainsi que les STLV-1 qui furent découverts peu de temps après le virus HTLV-1, en 1982, par l'équipe de Miyoshi au Japon dans des sérums de macaques, puis par la suite dans de nombreuses espèces de singes de l'ancien monde (Gessain, 1999; Miyoshi et al., 1982). Différentes analyses génétiques, notamment celle de la région codant la protéine d'enveloppe gp21, ont pu montrer une homologie de séquence nucléotidique entre les deux types de virus pouvant aller jusqu'à 95% dans certains cas, laissant envisager une probable transmission du singe à l'Homme (Koralnik et al., 1994). En se basant sur la transmission du HTLV-1 chez l'Homme qui se fait majoritairement par le passage de CD4+ infectés présents dans le lait, le sperme ou le sang (voir partie III-3 :Les modes de transmission du virus HTLV-1), il est raisonnablement envisageable que la transmission du singe vers l'Homme se fasse aussi par contact sanguin. En effet, le contact avec le sang d'un animal infecté lors de la chasse, de morsure ou bien lors de la consommation de viande de brousse est très répandu dans de nombreux pays d'Afrique Centrale (Gessain, 2011). Malgré la forte ressemblance entre ces virus, ils sont à l'origine de pathologies très différentes. En effet, malgré le caractère endémique du virus parmi les singes de l'ancien monde, on dénombre à ce jour seule une dizaine de cas de leucémies de type ATL chez le singe (avec en particulier une intégration clonale de provirus dans les cellules tumorales) et aucun cas de neuromyélopathie de type TSP/HAM (Gessain, 2011).

Le groupe des PTLV-2 est composé des HTLV-2 et STLV-2 qui présentent entre eux des divergences d'homologies de séquences nucléotidiques de 25%, contrairement aux virus HTLV-1 et STLV-1 qui sont quasi identiques (Van Brussel et al., 1998) (**figure 7**). A la différence des virus STLV-1 présents chez de nombreuses espèces de singes, les virus STLV-2 ont été retrouvés à ce jour seulement chez les bonobos (*pan paniscus*) (Giri et al., 1994). Enfin, en continuant une nouvelle fois avec les différences observées avec les PTLV-1, les PTLV-2 sont décrits comme étant peu pathogènes.

Le groupe des PTLV-3 est constitué des HTLV-3 et STLV-3 qui présentent des homologies de séquences nucléotidiques extrêmement importantes de l'ordre de 99% (Switzer et al., 2006) (**figure 7**). Ces virus font parties d'un groupe distinct des PTLV-1 et PTLV-2 car ils présentent des divergences au niveau de leurs séquences provirales de l'ordre de 30% avec HTLV-1 ou HTLV-2 (Calattini et al., 2006). La première souche de

STLV-3 fut obtenue en 1994 en co-cultivant des lymphocytes de sang de cordon humain avec des cellules sanguines primaires obtenues chez un babouin hamadryas africain (Goubau et al., 1994). Depuis, de nouvelles souches de STLV-3 ont été identifiées dans différentes espèces de singe d'Afrique Centrale, de l'Ouest et de l'Est. (Mahieux and Gessain, 2011). Le HTLV-3 fut décrit pour la première fois en 2005 chez deux camerounais asymptomatiques du sud du pays (Calattini et al., 2005; Wolfe et al., 2005) puis, de nouveau, en 2009, chez deux individus une nouvelle fois camerounais dont l'un était chasseur (Calattini et al., 2009). La proximité géographique entre toutes ces personnes infectées et le fait que l'un d'entre eux soit chasseur laissait penser une nouvelle fois à une transmission du singe vers l'Homme lors d'un contact sanguin avec un animal infecté. A ce jour, aucune pathologie n'est associée aux PTLV-3.

Enfin le groupe des PTLV-4 est constitué d'une souche d'HTLV-4 isolée chez un chasseur camerounais en 2005 (Wolfe et al., 2005) et d'une souche STLV-4 dont le réservoir naturel serait le gorille (LeBreton et al., 2014). Ces virus présentant 99% d'homologie de séquences nucléotidiques entre eux, laissent penser une nouvelle fois à une transmission du singe vers l'Homme (**figure7**). Ils ne présentent que 63% d'homologie de séquences nucléotidiques avec les autres virus HTLV ce qui les classe dans un groupe distinct. Le caractère pathologique des virus HTLV-4/STLV-4 reste encore à démontrer. Le patient Camerounais est mort en 2009 suite à une maladie causant fatigue et détresse respiratoire, cependant aucun lien avec HTLV-4 n'a pu être établi. De la même manière, certains gorilles infectés par STLV-4 ont présenté différents symptômes comme une atteinte neurologique ou bien des infections cutanées, mais le lien avec l'infection virale n'est pas établi (LeBreton et al., 2014).

III-2- Epidémiologie de l'infection par le HTLV-1

III-2-1) Répartition géographique.

Le virus HTLV-1 n'est pas un virus ubiquitaire. Il est reparti dans le monde sous forme de cluster de populations très localisées où le virus peut être endémique (plus de 5% de personnes infectées) (Gessain and Cassar, 2012). De manière intéressante, on retrouve, à côté de ces zones de forte endémie, des zones où le virus est faiblement représenté (1 à 5% de personnes infectées) voire totalement absent (Gonçalves et al., 2010). Cette répartition extrêmement particulière en foyer géographique ou bien au sein d'ethnies

peut en partie être expliquée par un effet fondateur au sein de la population locale, suivi d'une transmission et d'une persistance efficace de génération en génération dues à des conditions environnementales ou socio-culturelles (consommation de viande de brousse, pratique de la chasse, etc). Cette hypothèse est appuyée par une étude de Proietti qui montre que, parmi les populations porteuses du virus qui migrent vers des régions où le virus n'est pas présent, il y a une diminution de la séroprévalence au cours des générations suivantes (Proietti et al., 2005).

En 1993, Guy de Thé et Bomford estimèrent entre 10 et 20 millions le nombre de personnes infectées dans le monde (de Thé and Bomford, 1993). Plus récemment, Olivier Cassar et Antoine Gessain ont affiné ce nombre en estimant à 5 millions le nombre de personnes actuellement porteuses du virus sur la planète en se basant sur des échantillons de donneurs de sang dans des zones de fortes endémies ainsi que sur des données épidémiologiques provenant de femmes enceintes dans différentes populations adultes (Gessain and Cassar, 2012). Ce chiffre est sûrement en dessous de la réalité du fait de biais épidémiologiques dûs surtout au manque d'accès aux données dans les pays comme la Chine, l'Inde, le Maghreb ou bien l'Afrique de l'Est. Les principaux foyers de fortes endémies ainsi décrits sont situés dans le Sud du Japon, les Caraïbes, certaines régions du Moyen Orient comme l'Iran, l'Amérique Centrale et du Sud avec la Colombie et la Guyane française ainsi que le Sud du Gabon. Des foyers isolés d'infection sont décrits dans quelques régions d'Australo Mélanésie ainsi qu'en Amérique du Nord et en Europe, particulièrement en Roumanie dont le foyer est le plus important d'Europe. **(Figure 8)**.

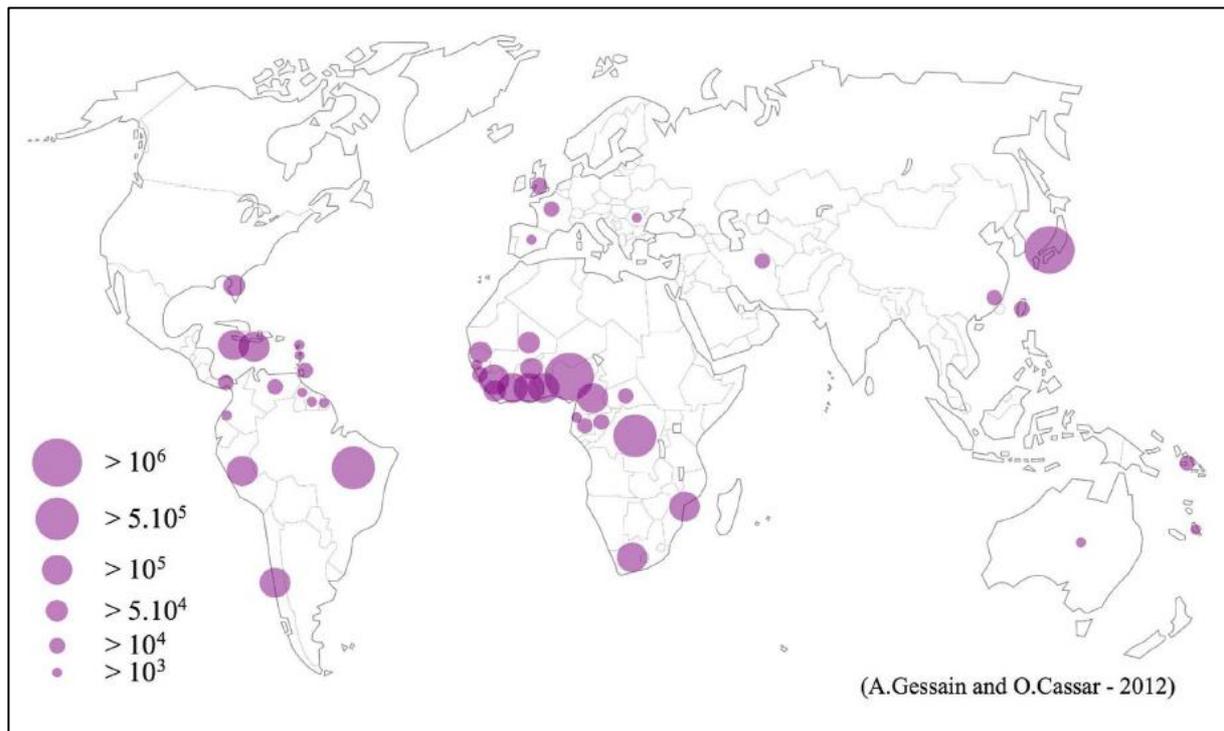


Figure 8 : Répartition géographique des principaux foyers d'infection par HTLV-1 dans le monde.

Cette carte représente le nombre de personnes infectées par le virus HTLV-1 dans le monde. Ce nombre est estimé à partir de données épidémiologiques obtenues par 1,5 millions d'échantillons issus de femmes enceintes, de donneurs de sang ou de populations d'adultes spécifiques. Les foyers de prévalence sont représentés en violet, la surface des cercles correspond à l'importance de l'infection. Ainsi, on peut remarquer que la distribution du virus est répartie dans des zones spécifiques en Amérique du Sud, aux Caraïbes, au Japon ou bien en Afrique. Il est intéressant de noter la forte prévalence du virus en Roumanie. D'après (Gessain and Cassar, 2012).

III-2-2) Epidémiologie moléculaire.

Contrairement aux autres rétrovirus, le génome du virus HTLV-1 est extrêmement stable et présente de très faibles taux de mutation. Ceci s'explique du fait que le virus utilise préférentiellement un mode de répllication par expansion clonale plutôt que d'utiliser sa transcriptase inverse. En effet, une fois le provirus intégré dans le génome de la cellule hôte, la répllication de son génome se fera avec celle du génome cellulaire, en utilisant directement l'ADN polymérase cellulaire lors des évènements mitotiques. Le virus profite donc de la polymérase cellulaire qui est beaucoup plus fidèle que la RT virale (10^6 moins d'erreur en moins que la RT) ainsi que des enzymes de la machinerie de réparation du génome, lui conférant ainsi une grande stabilité génomique (Wattel et al., 1995). Ainsi, la faible variation au niveau des séquences nucléotidiques des virus HTLV-1 mais aussi HTLV-2 est un outil extraordinaire en génétique des populations. Il permet de suivre au cours du temps, la migration des personnes infectées participant

ainsi à une meilleure compréhension de l'origine, de l'évolution et des modes de disséminations de ces rétrovirus (Gessain et al., 1992; Yanagihara, 1994).

Malgré cette grande stabilité génomique, il existe des variants moléculaires liés à l'origine géographique du virus (Slattery et al., 1999). Parmi les 7 génotypes viraux identifiés à ce jour, on peut en distinguer 4 principaux qui ont été particulièrement caractérisés (Van Dooren et al., 2001) (**figure 9**).

Le sous-type A, dit sous-type Cosmopolitain, est le premier sous-type à avoir été identifié. Il est aussi le plus répandu à travers le monde et au sein de nombreuses populations (**figure 9**). On peut ainsi le retrouver le plus fréquemment au Japon, dans les Amériques, dans la région Caraïbes, en Afrique du Nord, de l'Ouest et du Sud, au Moyen Orient et en Inde ainsi que dans certaines îles du Pacifique. De plus, il s'agit du seul sous-type présent en Europe retrouvé d'une part dans les rares zones endémiques comme la Roumanie et chez les populations de migrants de zones endémiques (Antilles et Afrique de l'Ouest) (Gessain and Cassar, 2012). La variabilité de séquence au sein du sous-type A est extrêmement faible, ce qui relève d'une apparition récente, de quelques milliers d'années, au sein des populations. Malgré cela, on peut dénombrer au sein de ces sous-types, quatre sous-groupes que l'on peut différencier notamment par des variations au sein des séquences de leurs LTR (*Long Terminal Repeat*). Ainsi comme représenté dans la figure 9, on retrouve le sous-groupe d'Afrique du Nord « Ana », le sous-groupe japonais « Ajp », le transcontinental « TC » et celui d'Afrique de l'Ouest « Awa » (Gessain and Cassar, 2012).

Le sous-type B correspond au sous-type d'Afrique Centrale dont la séquence nucléotidique diverge de près de 3% au niveau du gène *env* des virus du sous-type A (**figure 9**). Il fut découvert en 1985 chez un patient Zaïrois atteint d'une ATL. Comme pour le sous-type A, il existe au sein du sous-type B une grande diversité de sous-groupes semblant spécifiques de l'origine géographique des différents isolats (Zaire, Gabon, Cameroun) (Mahieux et al., 1997).

Le sous-type C, ou sous-groupe Mélanésien, est le plus divergent de tous les sous-groupes ce qui lui confère une origine évolutive beaucoup plus ancienne que les autres (6 à 10% de variation au niveau de leurs séquences nucléotidiques par rapport au sous-type Cosmopolitain) (**figure 9**). Il fut décrit initialement chez des Mélanésiens

vivant en Papouasie Nouvelle Guinée et dans les Iles Salomon. On le retrouve à l'heure actuelle chez les aborigènes d'Australie et chez les habitants de l'archipel du Vanuatu (Cassar et al., 2007). L'apparition de ce sous-groupe chez l'Homme est à mettre en relation avec une possible transmission d'un STLV du singe vers l'Homme au cours de longues périodes d'évolution (Wolfe et al., 2005).

Enfin, le dernier sous-type appelé D, fut initialement décrit en 1997 chez trois habitants de la partie Ouest de l'Afrique Centrale (Cameroun, Gabon et République centrafricaine) (Mahieux et al., 1997). Il représente une faible part des souches virales HTLV-1 de ces régions par rapport au sous-type B beaucoup plus présent (**figure 9**).

Mise à part les quatre grands sous-types majoritaires décrits ci-dessus, il existe trois autres souches virales d'HTLV-1 (E, F et G), bien distinctes, retrouvées chez des habitants d'Afrique Centrale (**figure 9**). Cependant leurs distributions géographiques et leurs fréquences restent mal connues. Avec la présence de ces différents sous-types dans des régions géographiques bien particulières, il était légitime de se demander si un sous-type était associé plus qu'un autre aux différentes pathologies induites par le virus HTLV-1. Cependant à ce jour, aucun lien entre développement d'ATL ou bien de TSP n'a été mis en évidence avec un sous-type particulier (Komurian et al., 1991).

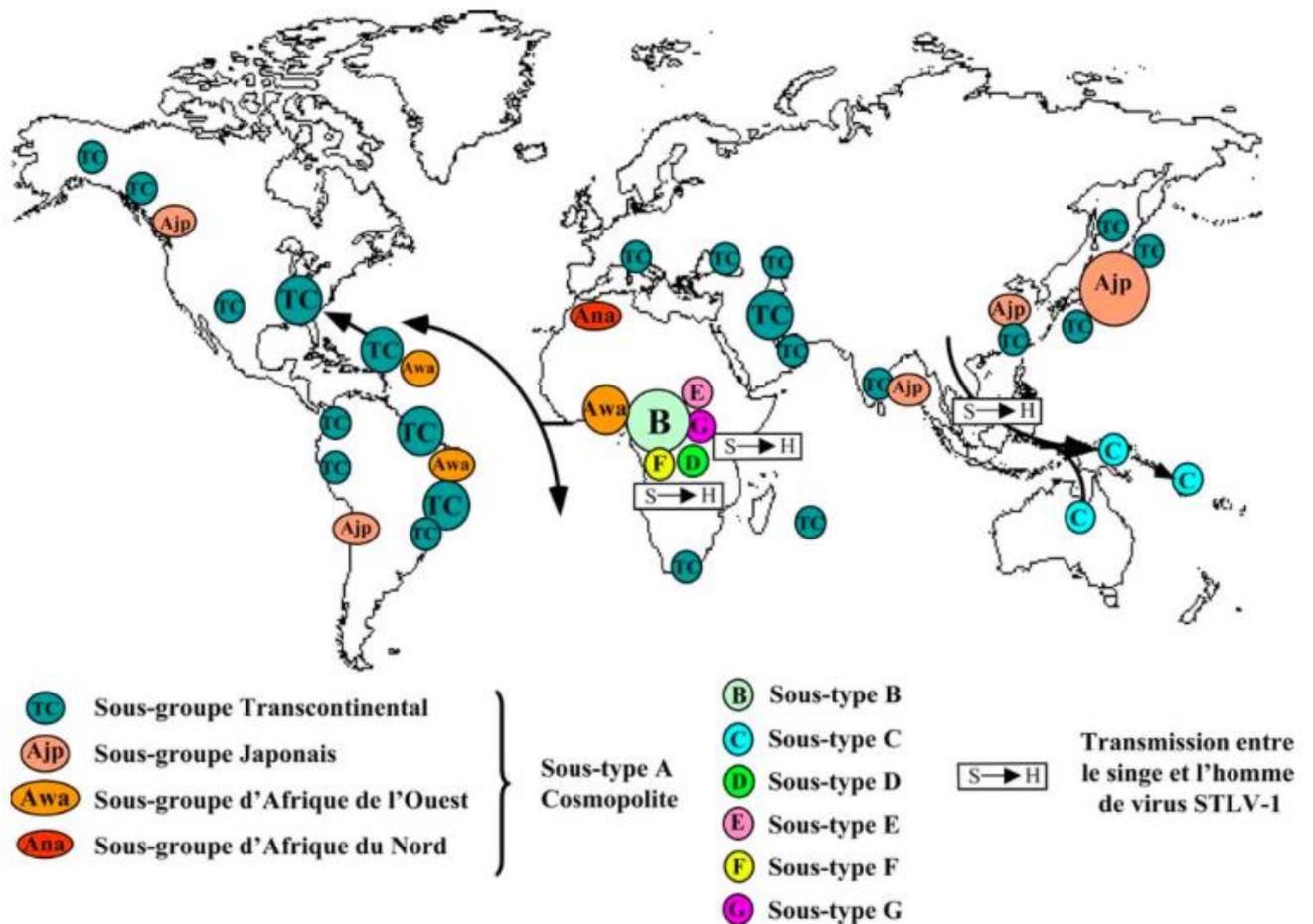


Figure 9 : Répartition géographique des différents sous-types moléculaires d'HTLV-1.

Les 7 sous-types d'HTLV-1 (A à G) sont représentés sur cette carte en fonction de leurs localisations géographiques. Chaque sous-type a une localisation géographique propre mis à part le sous-type A qui est divisé en 4 sous-groupes retrouvés partout dans le monde. Les probables transmissions du singe vers l'Homme sont représentées par des flèches ainsi que les migrations de populations à l'origine de la dissémination du virus. D'après (Gessain and Cassar, 2012)

III-3- Les modes de transmissions du HTLV-1.

Il existe trois modes de transmission décrit pour le virus HTLV-1 (**figure 10**). Tout d'abord, la transmission horizontale, c'est à dire de la mère à l'enfant, a été mise en évidence dans les années 1980 au Japon (Hino, 2011). La transmission de la mère à l'enfant se fait principalement lors d'un allaitement prolongé d'une durée supérieure à six mois avec un taux de transmission de l'ordre de 10 à 25% (Percher et al., 2016). D'autres facteurs de risques favorisent la transmission par allaitement comme la présence d'une charge virale élevée dans le sérum, le lait ou le sang de la mère (Li et al., 2004) ou bien une correspondance d'histocompatibilité (CMH1) entre la mère et l'enfant

(Biggar et al., 2006). Enfin, une transmission avant la naissance est aussi à envisager dans de moindres mesures durant la grossesse (passage de cellules infectées transplacentaires) ou bien lors d'un accouchement par césarienne avec exposition au sang maternel infecté (5%) (Paiva et al., 2014).

Le virus HTLV-1, étant présent dans les sécrétions génitales, peut se transmettre comme d'autres MST (*Maladies Sexuellement Transmissibles*) par voies sexuelles ce qui est la deuxième cause d'infection par le virus (**figure 10**). Des facteurs aggravants comme une contamination avec d'autres MST (Syphilis, HSV-2) provoquant ainsi une altération des muqueuses génitales et anales (ulcères, inflammation, lésions) augmente la transmission du virus par voies sexuelles (Paiva et al., 2014). La transmission de l'homme vers la femme est plus efficace ce qui pourrait expliquer une séroprévalence plus forte chez la femme avec l'âge.

Enfin, la transmission par transfusion sanguine est une des voies de contamination les plus efficaces (**figure 10**). En effet, 40% des receveurs contaminés deviennent séropositifs au bout de 50 jours après transfusion de composés sanguins contenant des lymphocytes T infectés (Manns et al., 1992). De manière intéressante, la transfusion de plasma ne permet pas de transmettre le virus, celui-ci étant extrêmement peu présent sous forme de particules virales circulantes (Sullivan et al., 1991). La transmission *via* le partage de seringues lors d'injection de drogues entre toxicomanes est aussi une voie de transmission sanguine qui se développe de nos jours.

Au vu des différents modes de contamination du virus, des moyens de prévention ont été appliqués afin de réduire et d'endiguer la propagation de celui-ci. La principale mesure prise pour éviter la transmission de la mère à l'enfant est le dépistage systématique des femmes enceintes afin d'éviter ou de réduire la durée de l'allaitement dans le cas d'une séroprévalence acquise. Cette mesure fut très efficace au Japon où une campagne de prévention mise en place en 1987 a permis de réduire le risque de transmission de 25 à 2,5% en nourrissant les nouveaux nés uniquement aux biberons (Hino, 2011). Dans le cas de la transmission par voies sexuelles, les campagnes d'informations et l'utilisation de préservatif permettent d'éviter tout risque de transmission comme dans le cas d'autres MST. Le risque de contamination par voie sanguine est aujourd'hui quasi nul dans tous les pays qui ont mis en place un dépistage

obligatoire des anticorps spécifiques chez les donneurs de sang comme c'est le cas la France en 1989 (Couroucé et al., 1998). Enfin, afin de pallier la transmission *via* des seringues contaminées, la prévention se base essentiellement sur l'information auprès des toxicomanes afin qu'ils n'échangent pas les seringues. Malgré des mesures efficaces de préventions existantes, certaines comme la réduction de l'allaitement ou bien l'analyse des produits sanguins sont difficiles à mettre en place dans les pays les plus pauvres ou en développement comme l'Afrique empêchant, à ce jour, l'éradication du virus dans certaines zones de fortes endémies.

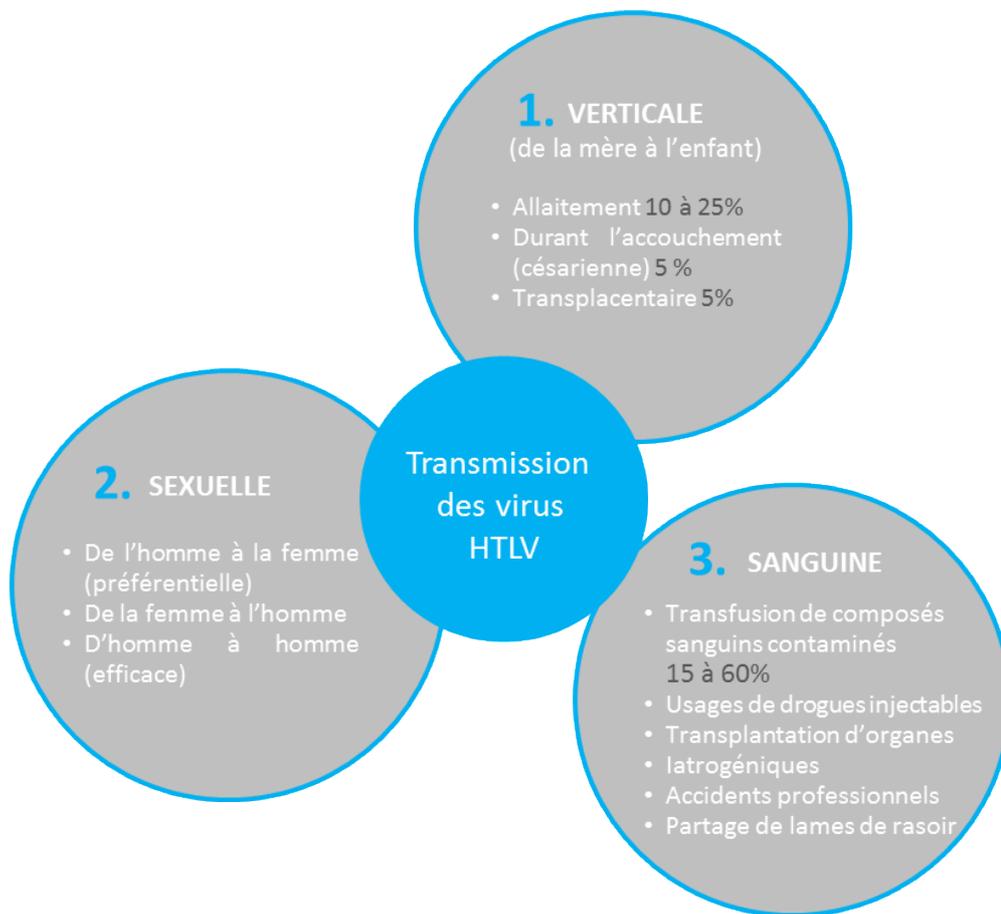


Figure 10 : Les différents mode de transmission des virus HTLV.

IV. Le virus HTLV-1 : anatomie d'un rétrovirus de type complexe.

IV-1. Structure de la particule virale

Dès sa découverte en 1980, la particule virale du virus HTLV-1, décrite par Isao Miyoshi dans la lignée MT2, se révéla comme étant caractéristique d'une particule de rétrovirus de type C : une particule de forme sphérique légèrement irrégulière qui présente un cœur central de densité variable entourée d'une enveloppe dépourvue de spicules à la surface (**figure 11 A**). Lorsqu'elle fut observée en microscopie électronique en 1992, la taille de la particule virale fut estimée à 95 nm de moyenne puis, plus récemment grâce à des études de microscopie cryo-électronique, cette taille fut revue à la baisse avec une estimation des virions à 73nm de diamètre avec toutefois des variations pouvant aller de 30 à 273nm (**figure 11 C**). Cette particule est entourée d'une enveloppe bi-lipidique d'origine cellulaire issue du bourgeonnement des particules néoproductes à la membrane cellulaire. Au sein de cette enveloppe sont ancrées les glycoprotéines virales composées de deux sous-unités : une sous-unité de surface SU (pour *Surface Unit*) ou gp46 et une sous-unité transmembranaire TM (pour *Transmembrane Unit*) ou gp21 (Verdonck et al., 2007) (**figure 11 B**). L'enveloppe est associée aux protéines de matrice MA (ou p19) qui ont la capacité de s'organiser en hexamère et, d'ainsi, s'ancrer à la sous-unité TM de l'enveloppe (Rayne et al., 2004). Les protéines de matrice sont indispensables à la structure de la particule virale et elles permettent de faire le lien entre l'enveloppe et la capsid du virion. La capsid, composée de protéines p24 ou CA, est décrite comme étant de forme icosaédrique. Elle renferme le complexe ribonucléotidique composé de deux copies d'ARN simple brin de polarité positive associées aux protéines de la nucléocapsid p15 ou NC ainsi qu'à la transcriptase inverse (RT), l'intégrase (IN) et à la protéase virale (Pro) (Verdonck et al., 2007) (**figure 11 B**).

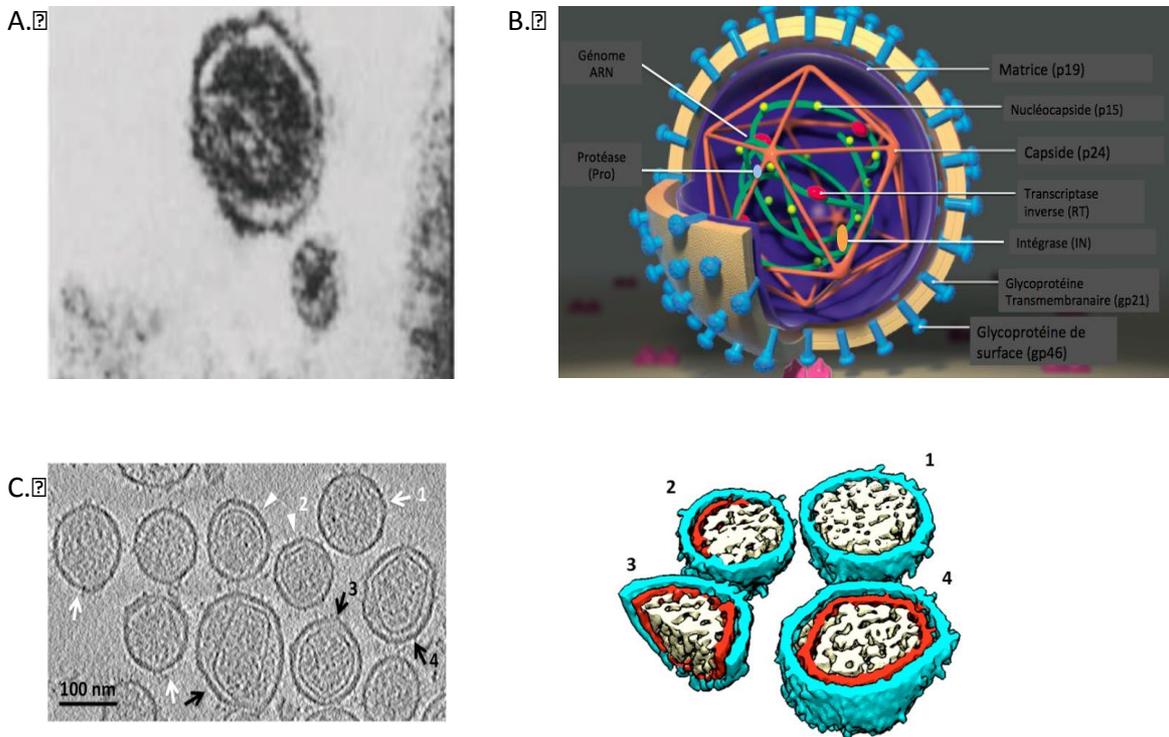


Figure 11 : Analyse morphologique et structure de la particule virale HTLV-1.

A. Caractérisation d'une particule virale mature du rétrovirus HTLV-1 en microscopie électronique produite à partir de la lignée MT2. D'après (Miyoshi et al., 1981b).

B. Représentation schématique du virion HTLV-1 et de ses principaux composants. Adapté de (Lairmore et al., 2012).

C. Analyse morphologique de la particule HTLV-1 purifiée à partir de la lignée MT2 et observée en microscopie cryo-ET (panneau de gauche). Les flèches noires représentent les particules matures. Les quatre particules ont été modélisées par tomographie (panneau de droite). En bleu on retrouve l'enveloppe virale, en rouge la capsidie et en beige le « noyau » viral contenant le génome ainsi que les différentes protéines associées. D'après (Cao et al., 2015).

IV-2. Génome et synthèse des protéines virales.

Le génome du virus HTLV-1 est décrit comme étant caractéristique d'un rétrovirus dit complexe. Au sein de la particule virale, le génome est constitué de deux copies identiques d'ARN simple brin de polarité positive de 8,5 Kilobases. Ces deux ARN, classiquement coiffés en 5' et polyadénylés en 3', sont encadrés par deux séquences répétées R et de régions uniques (U5 pour la partie 5' et U3 pour la partie 3') (**figure 12**). En plus de retrouver les gènes codant pour les protéines de structures rétrovirales classiques gag et env, du gène codant pour la polymérase (Pol) et pour la protéase (Pro), on retrouve dans la partie 3' du génome une région nommée initialement pX du fait de sa fonction inconnue lors de sa découverte (Kannian and Green, 2010) (**figure 12**). A partir de cette région vont être transcrites les protéines auxiliaires et régulatrices du virus. Sous forme provirale, c'est à dire une fois que le génome ADN double brin est intégré dans le génome cellulaire, il est encadré par deux séquences identiques aux extrémités appelées LTR (U3-R-U5). Ces LTR possèdent des éléments de régulation (régions promotrices et signaux de polyadénylations) nécessaires à la transcription du génome proviral (Arpin-André et al., 2014) (**figure 12**). Afin de produire les différentes protéines virales à partir du génome viral relativement restreint, différentes stratégies ont été mises en places par le virus. En effet, différents ARNm de tailles variables mono ou doublement épissés vont être produits comme décrit par la suite (**figure 12**).

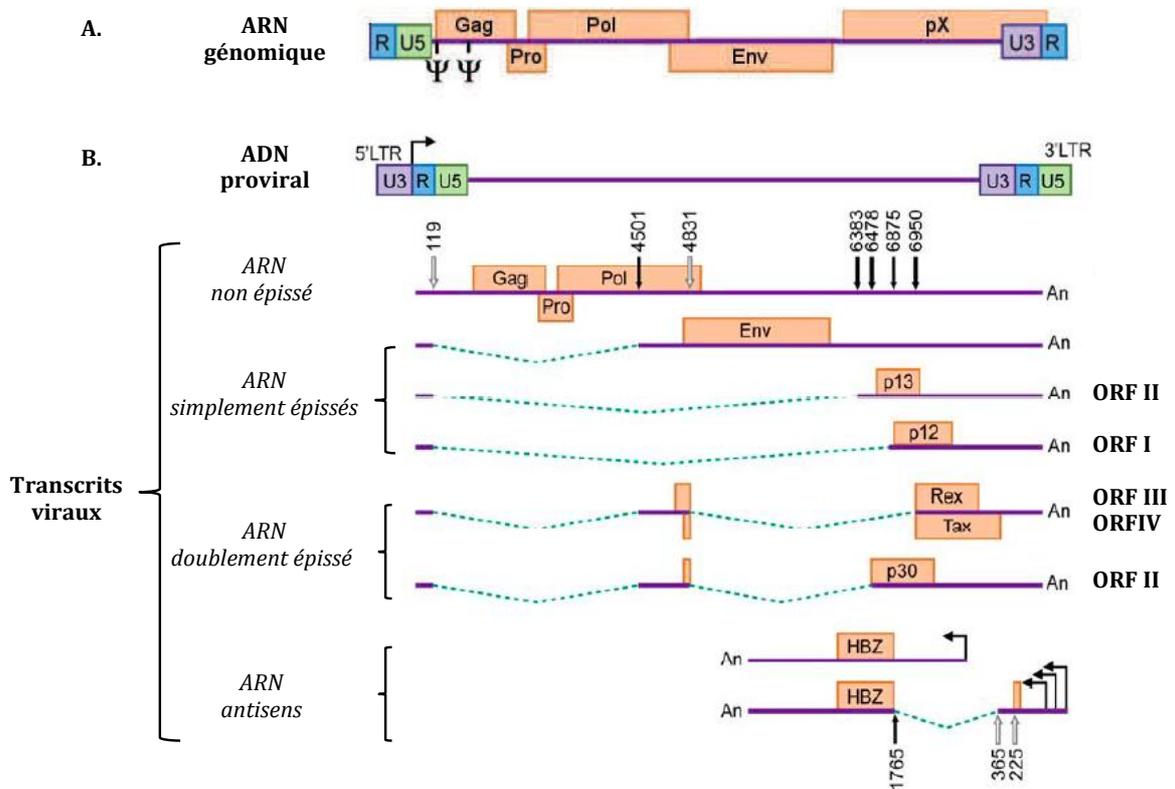


Figure 12 : Organisation génomique du virus HTLV-1.

A. Représentation schématique du génome ARN simple brin d'HTLV-1 présent au sein de la particule virale. Les LTR, composés de séquences répétées R et de séquences uniques U5 en 5' et U3 en 3', sont présents de part et d'autre de la séquence génomique. Les gènes *gag*, *pro*, *pol* et *env* classiques des rétrovirus se trouvent dans la partie 5' du génome alors que la région pX spécifique des *Deltarétrovirus* se situe dans la partie 3' du génome. Les deux séquences d'encapsidation identifiées dans le génome du BLV sont indiquées par le symbole ψ . Adapté de (Kannian and Green, 2010).

B. Représentation schématique du génome proviral d'HTLV-1 et des ses transcrits viraux. Comparé au génome viral ARN, le génome proviral comprend deux LTR identiques à ses deux extrémités. Les ARNm transcrits à partir des LTR 5' (majoritaire) et 3' (minoritaire) sont indiqués ainsi que leurs différents épissages. Les traits en pointillés représentent les introns épissés. Les quatre ORF codant pour les protéines régulatrices et auxiliaires sont indiquées sur le côté droit de la figure. Enfin les sites accepteurs d'épissage sont indiqués par des flèches noires et les sites donneurs d'épissages par les flèches blanches. Adapté de (Kannian and Green, 2010).

IV-2-1) Les protéines de structures et les enzymes virales.

A partir de l'ARN génomique, non épissé, sont produites les protéines Gag, Pro et Pol. Ces protéines sont issues de la synthèse de trois précurseurs polyprotéiques, gag, gag-pro et gag-pro-pol, qui, après clivage, vont donner les protéines MA, CA et NC citées ci-dessus et les enzymes du virus IN et RT (**figure 13 A**). Une partie des ARNm génomiques n'est pas traduite et est encapsidée dans les nouvelles particules virales en formation grâce à des séquences d'encapsidation conservées comme retrouvées chez le BLV (Mansky and Gajary, 2002) (**figure 13 A**). De la même façon, les sous-unités transmembranaires TM (gp21) et de surface SU (gp46), seront produites après clivage du précurseur Env (gp61) par une protéase d'origine cellulaire (Lairmore and Franchini, 2007).

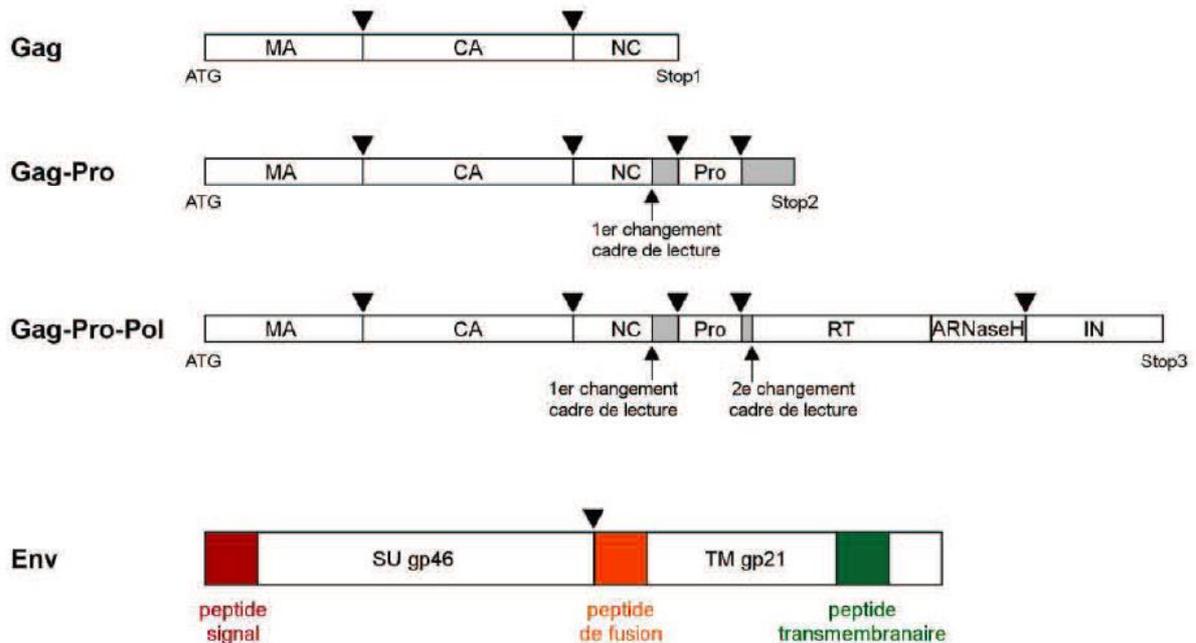


Figure 13 : Organisation des clivages des précurseurs polyprotéiques à l'origine des protéines de structures et des enzymes virales.

Trois précurseurs (gag, gag-pro et gag-pro-pol) sont traduits à partir de l'ARN de longueur génomique et sont ensuite clivés par la protéase virale pour donner les protéines de matrice (MA), de capsid (CA), de nucléocapsid (NC), la protéase (Pro), la transcriptase inverse à activité ARNaseH (RT) ainsi que l'intégrase (IN). Le précurseur de l'enveloppe représenté en bas de la figure est, quant à lui, clivé par une protéase cellulaire en deux sous-unités SU (gp46) et TM (gp21). Les différents sites de clivage sont indiqués par les triangles noirs. Adapté de (Lairmore and Franchini, 2007).

IV-2-2) Les protéines régulatrices et auxiliaires.

A partir de la région pX, dont on connaît maintenant la fonction, vont être produites les protéines régulatrices et auxiliaires du virus à partir de quatre cadres ouverts de lecture (ORF I, ORF II, ORF III et ORF IV) (Kannian and Green, 2010) (**figure 13B**). Cela est possible grâce à de nombreux épissages alternatifs et à des séquences internes d'initiation de la traduction. Ainsi, à partir de l'ORF I, va être traduite la protéine auxiliaire p12 qui peut elle-même être clivée pour donner la protéine p8. Les protéines auxiliaires p13 et p30 sont codées par l'ORF II respectivement à partir de deux ARN simplement et doublement épissés. Ces protéines sont décrites comme n'étant pas nécessaires à la multiplication du virus *in vitro* mais elles sont importantes pour l'établissement de l'infection et la persistance du virus *in vivo*. En effet, différents travaux chez le lapin ont pu montrer que les protéines p12 et p8 sont nécessaires pour l'infectiosité du virus alors que les protéines p13 et p30 sont quant à elles nécessaires au maintien de la charge virale et à la persistance du virus (Bartoe et al., 2000; Collins et al., 1998). D'autres études réalisées cette fois-ci chez le macaque montrent que l'invalidation des protéines p12, p8 et p30 empêche la persistance du virus *in vivo* (Valeri et al., 2010). Pour ce faire, les protéines auxiliaires sont impliquées dans la modulation d'un grand nombre de mécanismes comme la prolifération lymphocytaire, l'apoptose ou bien la régulation du cycle cellulaire (pour revue, Edwards et al., 2011; Fukumoto, 2013). Enfin, à partir d'un transcrit doublement épissé issus des ORF III et IV, seront traduites les protéines Rex et Tax. Ces deux protéines sont dites régulatrices car elles sont essentielles à la multiplication virale *in vitro* comme *in vivo*. Rex est nécessaire pour l'export nucléaire des ARNm viraux (non épissés ou mono épissés) (Younis and Green, 2005). Tax, quant à elle, est une protéine majeure impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération lymphocytaire, la transcription virale, le contrôle du cycle cellulaire pour ne citer qu'eux. Nous reviendrons plus en détail sur la protéine Tax (voir chapitre V : un virus oncogène).

IV-2-3) Les transcrits anti sens et la protéine HBZ.

C'est en 1989 que la transcription du brin négatif du génome proviral à partir du LTR 3' a été découverte et c'est seulement treize ans plus tard que la traduction de ces transcrits anti sens a été prouvée (Gaudray et al., 2002; Larocca et al., 1989). Ainsi, il a été décrit à ce jour deux formes majoritaires d'ARNm à l'origine des protéines HBZ. Une

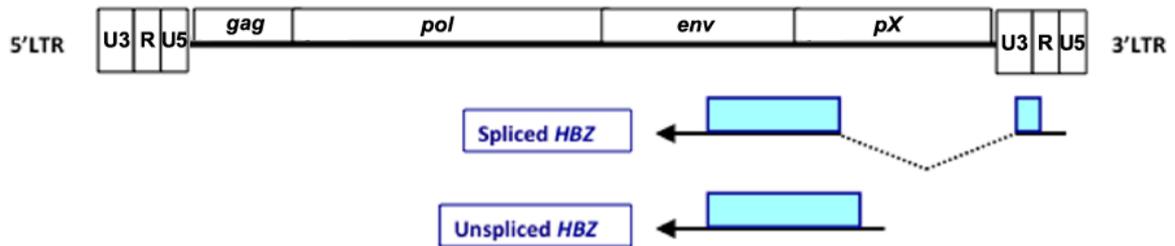
forme non épissée appelée usHBZ (*UnSpliced HBZ*) et une forme épissée appelée sHBZ (*Spliced HBZ*) ou SP1 (pour revue, Barbeau and Mesnard, 2015) (**figure 14 A**). De ces deux formes d'ARNm sont issues deux protéines différant entre elles de 7 acides aminés présents dans leurs parties C-Terminales leur conférant, entre autre, une demi-vie supérieure pour la forme épissée sHBZ/SP1 par rapport à usHBZ. En outre, la forme sHBZ/SP1 est détectée chez les patients ATL contrairement à la forme usHBZ et ceci est corrélé à la présence quatre fois supérieure de transcrits sHBZ/SP1 par rapport à la forme usHBZ. Les études actuelles et les descriptions sur le rôle d'HBZ ont donc été majoritairement réalisées sur la forme sHBZ/SP1 que l'on appellera HBZ dans le suite du manuscrit (Ma et al., 2016).

La protéine HBZ fait depuis sa découverte l'objet de nombreuses études du fait qu'elle est la seule encore fortement exprimée chez les patients ATL, ce qui laisse penser à une implication clé dans l'oncogenèse virale. Le pouvoir oncogénique de la protéine HBZ a été démontré *in vivo* chez des souris transgéniques montrant que l'expression d'HBZ entraînait l'apparition de dermatites et de lymphomes (Mitagami et al., 2015; Satou et al., 2011). HBZ est aussi capable d'interagir avec de nombreuses protéines cellulaires tout comme Tax modulant ainsi la transcription de gènes viraux et cellulaires (**figure 14 B**). Pour se faire, HBZ, de par son domaine b-ZIP homologue au domaine b-Zip des facteurs de transcriptions de la famille ATF/CREB, est capable d'interagir avec CREB1/2 et d'autres membres de cette famille dont c-Jun, JunD, JunB mais également avec CBP/P300 ou bien des facteurs de la voie NF-kB (Ma et al., 2016). Il est admis que le rôle d'HBZ est de contrer les activités Tax, en contrebalançant l'activation excessive par Tax de certaine voies de signalisation comme la voie NF-kB favorisant ainsi la latence virale (échappement au système immunitaire car HBZ est faiblement immunogène). HBZ participerait également au maintien de la prolifération lymphocytaire par différents mécanismes que nous détaillerons par la suite (voir chapitre V-5 : un autre acteur responsable de la transformation : la protéine HBZ) (Basbous et al., 2003; Clerc et al., 2008; Lemasson et al., 2007; Thébault et al., 2004; Zhao et al., 2009a).

Il est intéressant de noter qu'HBZ est aussi active en tant qu'ARN et pas seulement en tant que protéine. Il a été montré que la forme sHBZ/SP1 favorisait la prolifération de cellules ATL alors que la forme usHBZ ne le peut pas. Une des explications avancées est que l'ARN sHBZ/SP1 formerait des structures tiges-boucles au niveau des éléments de réponses à Rex (RxRE) du LTR 3' favorisant ainsi la prolifération des cellules ATL

(Yoshida et al., 2008). La prolifération est aussi favorisée car l'ARNm de HBZ est capable d'induire la transcription du facteur de transcription E2F1 et de ces gènes cibles ainsi que le passage G1/S du cycle cellulaire (Satou et al., 2006).

A.



B.

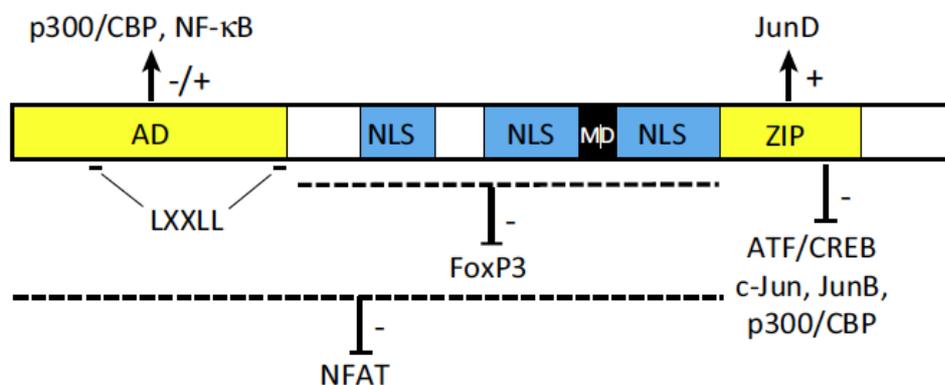


Figure 14 : Représentation des transcrits HBZ et structure de la protéine.

A. Deux variants d'HBZ sont transcrits : la forme, dite épissée, appelée spliced HBZ (sHBZ) ou SP1 est transcrite à partir de la région R-U5 du LTR 3' alors que la forme non épissée appelée unspliced HBZ ou usHBZ à son promoteur dans l'intron de la forme sHBZ/SP1. La forme sHBZ/SP1 est quatre fois plus exprimée chez les patients ATL comparée à la forme usHBZ, elle est, par conséquent, la plus étudiée. D'après (Zhao and Matsuoka, 2012).

B. Représentation schématique de la structure de la protéine HBZ. La protéine HBZ contient différents domaines : un domaine d'activation appelé AD (Activation Domain) qui a la particularité de se lier aux facteurs de transcription p300/CBP ou bien aux facteurs de transcription de la famille NF-κB, un domaine Bzip conférant à la protéine de multiples interactions avec les protéines de la famille ATF/CREB ou bien les facteurs de transcription de la famille Jun. Trois séquences NLS ont aussi été décrites pour la protéine. La forme sHBZ/SP1 diffère de la forme usHBZ de 7 acides aminés au niveau de leur région C terminale. D'après (Barbeau and Mesnard, 2015)

IV-3. Cellules cibles et cycle viral.

Le virus HTLV-1 possède un cycle de réplication que l'on considère semblable à celui des autres rétrovirus. Le cycle peut être décomposé en deux phases : une phase dite précoce allant de l'entrée du virus jusqu'à l'intégration de son génome au sein de la cellule hôte et une deuxième phase dite tardive caractérisée par la synthèse des transcrits permettant la production des protéines virales et la formation des nouvelles particules. Ce cycle est décrit dans la figure 15 ci dessous.

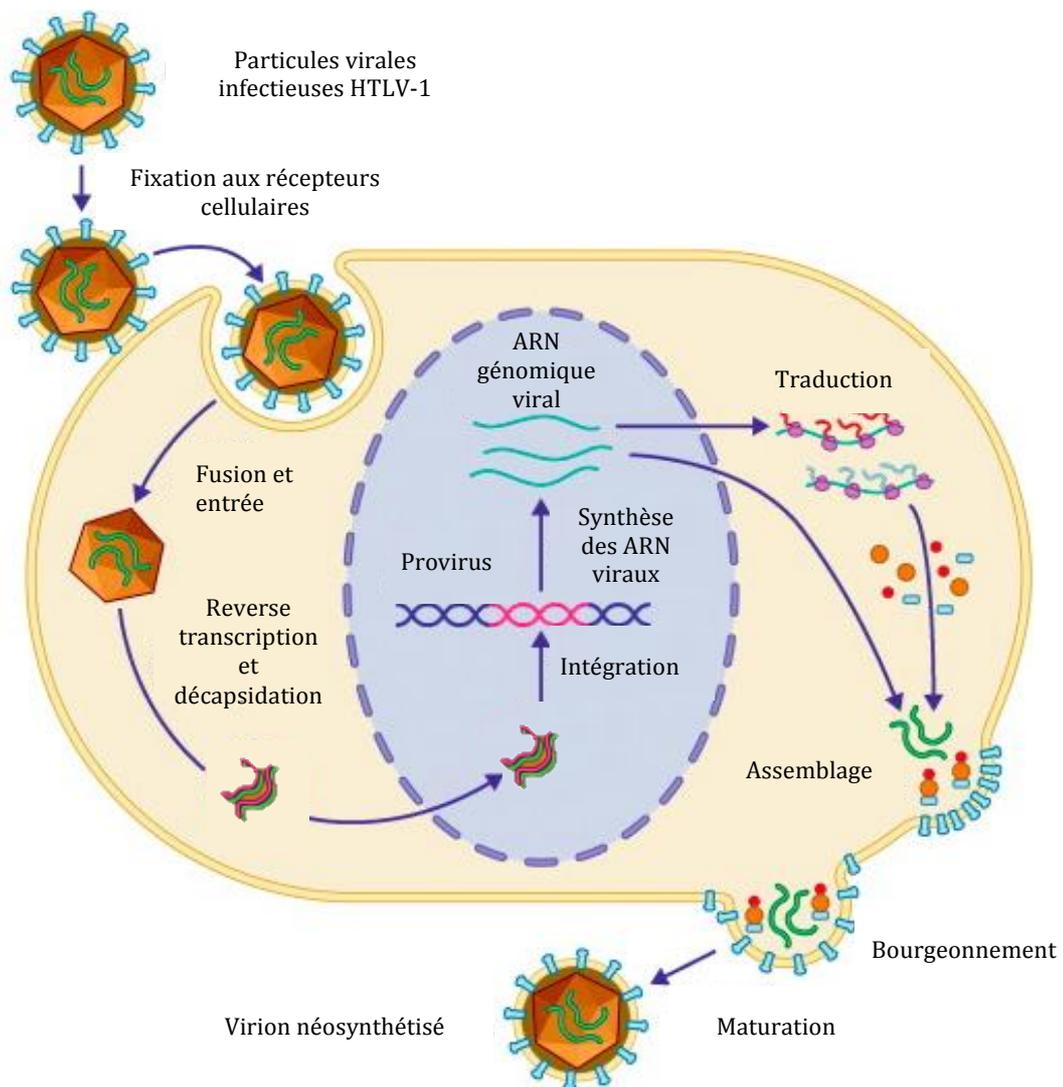


Figure 15 : Cycle de multiplication du virus HTLV-1.

Représentation schématisée du cycle de multiplication du virus HTLV-1 comprenant deux phases. Une phase précoce correspondant à l'attachement du virus au niveau des récepteurs d'entrée cellulaire suivie de la fusion de la particule virale à la membrane plasmique et le relargage de la capsid dans le cytoplasme. Le virus va alors être décapsidé et les ARN génomiques vont être rétro-transcrits en ADN proviral capable de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte. A noter que le complexe de préintégration du HTLV-1 n'est pas capable, comme celui des lentivirus de traverser l'enveloppe nucléaire, l'intégration du génome du HTLV-1 nécessitant donc la division de la cellule. La phase tardive, quant à elle, comprend la transcription de l'ADN proviral afin de former les nouveaux composants viraux qui vont être assemblés sous la membrane plasmique. Les virions neosynthétisés sortent des cellules par bourgeonnement pour donner naissance à de nouvelles particules virales infectieuses. Adapté de (Lairmore et al., 2012).

IV-3-1 : Les phases précoces de l'infection : de l'entrée à l'intégration

Le virus HTLV-1 a préférentiellement un tropisme pour les lymphocytes T CD4+ *in vivo*. En effet, 90% du génome proviral du virus est retrouvé dans ces lymphocytes chez des patients atteints d'ATL ou bien de TSP (Richardson et al., 1990). Le virus peut aussi infecter d'autres types cellulaires de manière moins importantes comme les lymphocytes T CD8+, les lymphocytes B, les monocytes, les lymphocytes T Natural Killer, les cellules dendritiques, myéloïdes et plasmacytoïdes ce qui lui confère de vastes réservoirs pour la persistance virale (Azakami et al., 2009; Carpentier et al., 2015; Jones et al., 2008; Koyanagi et al., 1993; Nagai et al., 2001). Dans tous les cas, les mécanismes d'entrée du virus ont été décrit et il en résulte que l'attachement du virus et l'entrée au sein des cellules cibles se font *via* l'intermédiaire de trois partenaires bien distincts : les HSPG (Heparan Sulfate Proteoglycans), la NRP-1 (neuropiline 1) et le récepteur GLUT-1 (*Glucose Transporter 1*) (Ghez et al., 2006; Manel et al., 2003; Piñon et al., 2003) (**figure 16**). Ainsi, la sous-unité SU du virus se lie *via* son domaine CTD (pour *C-Terminal Domain*) aux récepteurs d'attachements formés par les HSPG induisant une accumulation des particules virales à la surface des cellules cibles. Par la suite, NRP-1 possédant une région de liaison aux HSPG, il y a rapprochement des HSPG liés au virus avec NRP-1. La sous-unité SU du virus va se lier à son tour à NRP-1, représentant le récepteur de liaison *via* son domaine RBD (*Receptor Binding Domain*) contenant un motif KKPNR et permettant ainsi la liaison des particules virales à la membrane cellulaire. Ceci déclenche un changement de conformation de la sous-unité virale SU, permettant l'exposition de deux résidus, D106 et Y114, situés au niveau du domaine RBD. Ces résidus vont interagir avec le récepteur au glucose GLUT-1 qui est le récepteur de fusion, induisant ainsi la fusion des membranes cellulaires et virales *via* l'insertion du peptide de fusion situé dans la sous-unité TM du virus (**figure 16**).

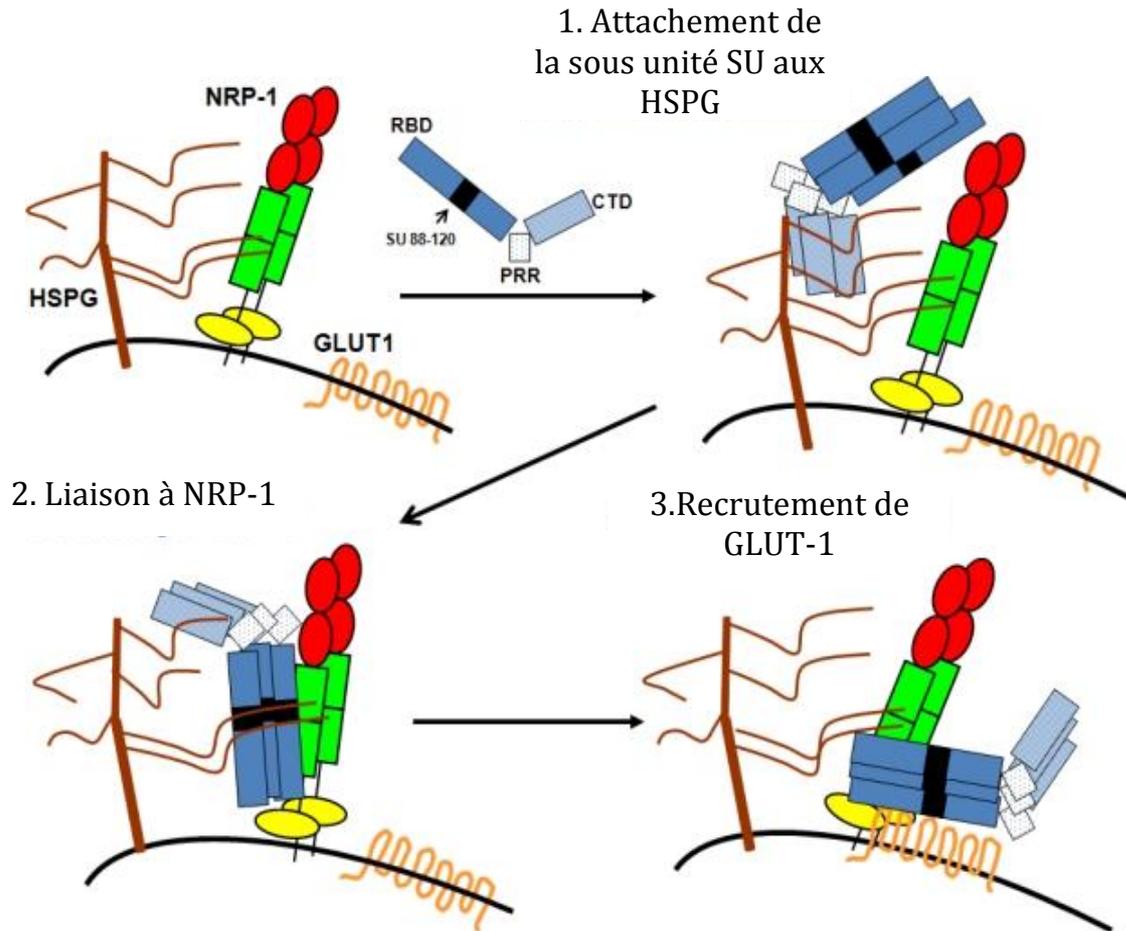


Figure 16 : Modèle de coopération entre HSPG, NRP-1 et GLUT-1 et la sous unité SU du virus HTLV-1 permettant l'entrée du virus dans les cellules cibles.

La sous unité SU du virus HTLV-1 va interagir *via* son domaine CTD avec les chaînes d'héparane sulfate des HSPG permettant un premier attachement de la particule virale à la surface des cellules cibles. Les HSPG interagissant également avec NRP-1, le récepteur va alors être recruté permettant l'interaction du domaine RBD de la sous unité SU avec NRP-1. Suite à cette liaison, un changement de conformation au niveau de la sous unité SU du virus va se produire et ceci va permettre l'interaction du complexe HSPG/NRP-1/SU avec le récepteur GLUT-1 déclenchant la fusion de la membrane virale avec la membrane cellulaire. Adapté de (Pique and Jones, 2012).

Une fois les membranes virales et cellulaires fusionnées, la capsid virale va être relâchée dans le cytoplasme et au sein de celle-ci, le virus va alors rétro-transcrire son génome ARN en ADN double brin grâce à sa RT (Telesnitsky and Goff, 1997). Ce mécanisme classique chez les rétrovirus est représenté et décrit dans la figure 17. L'ADN double brin néoformé va alors être associé à des protéines cellulaires et virales comme la nucléocapside (NC) ou bien l'intégrase (IN) pour former un complexe de pré-intégration (PIC). Contrairement aux lentivirus comme le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le complexe de pré-intégration du HTLV-1 ne peut franchir la membrane nucléaire et le virus va alors attendre que celle-ci soit désorganisée lors d'évènements

mitotiques pour pouvoir s'intégrer au génome cellulaire (**figure 15**). L'intégration du génome viral se fait *via* son intégrase, aux niveaux de régions chromatiniennes fortement transcrites comme des régions de liaison aux facteurs de transcription p53 et STAT-1 (Bangham et al., 2014; Gillet et al., 2011).

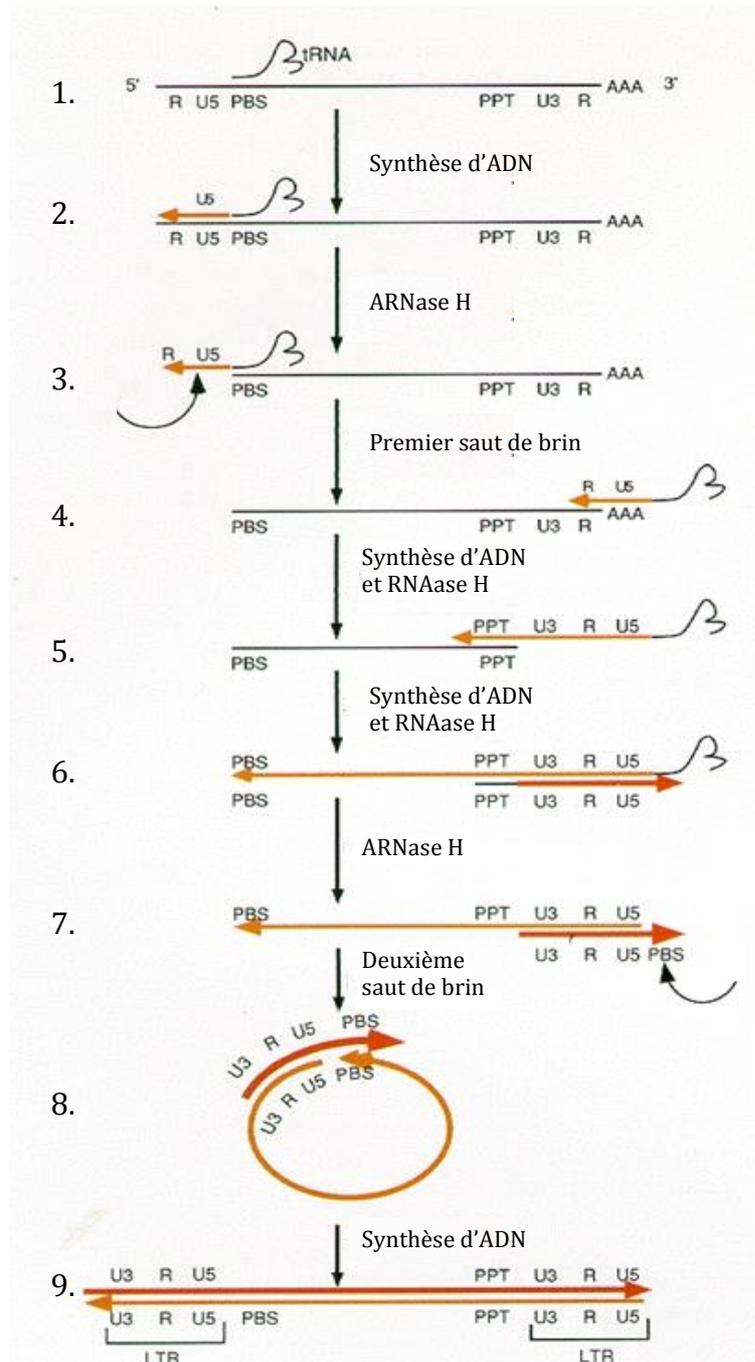


Figure 17 : Modèle classique de transcription inverse chez les rétrovirus.

Représentation schématique du mécanisme de transcription inverse permettant aux rétrovirus de transcrire leur génome ARN en ADN double brin sous l'action de la Transcriptase inverse (RT). (1) L'ARNt cellulaire spécifique de la proline va se fixer au niveau d'une région PBS présente sur l'ARN viral. (2) À partir de l'ARNt utilisé comme amorce, la RT va commencer à synthétiser un premier fragment correspondant aux régions R et U5 du LTR. (3) Pendant la synthèse de l'ADN néo synthétisé, la RT grâce à son activité ARNase H va hydrolyser le brin ARN matrice correspondant à la région R et U5. (4) Afin de poursuivre la synthèse du brin d'ADN, un premier saut va être réalisé au niveau de la région R située à l'extrémité 3' de l'ARN viral. (5) Une fois le saut effectué, la RT va pouvoir poursuivre la synthèse du brin d'ADN néo synthétisé tout en hydrolysant le brin ARN matrice sauf au niveau d'une région dite PPT résistante à l'activité de l'enzyme. (6) Une fois le premier brin d'ADN néo synthétisé, la synthèse du brin complémentaire va être réalisée à partir de la région PPT qui va servir d'amorce. (7) L'ARNt ainsi que la séquence PPT vont être hydrolysés. (8) Un deuxième saut de brin de l'ADN va être réalisé au niveau de la séquence PBS située au niveau de l'extrémité 3' du premier brin synthétisé. L'hybridation des séquences PBS va conduire à une circularisation partielle du génome permettant la fin de la synthèse. (9) La dernière étape conduit à l'obtention de la double hélice d'ADN viral avec ses deux extrémités les séquences LTR complètes.

IV-3-2- Les phases tardives de l'infection : de la synthèse des transcrits viraux au bourgeonnement viral.

Une fois le génome proviral intégré, les différents ARNm viraux précédemment décrits vont être transcrits, épissés et traduits par les machineries cellulaires afin de former les protéines de structures nécessaires à l'assemblage de nouvelles particules virales. La protéine Tax nécessaire à l'activation optimale du promoteur viral contenu dans le LTR 5' n'est pas présente dans la particule. Néanmoins une transcription basale du LTR 5' peut se faire grâce à de nombreux facteurs de transcriptions cellulaires comme sp1, elk1, SRF et XBP-1 (Ku et al., 2008; Livengood and Nyborg, 2004; Winter et al., 2007). Cette transcription basale va permettre la production d'un niveau faible de transcrits codant Tax et la protéine va ensuite s'accumuler pour permettre une forte activation de la transcription à partir des promoteurs viraux. Nous détaillerons par la suite plus en détail la transcription du LTR 5' par Tax (voir chapitre V-4 : détournement de la machinerie de transcription).

Une fois transcrits, les ARNm viraux doivent être exportés dans le cytoplasme afin de pouvoir être traduits ou encapsidés dans le cas de l'ARNm génomique. Or, dans les cellules eucaryotes, le passage à travers les pores nucléaires vers le cytoplasme est couplé à l'épissage des ARNm. C'est pourquoi on retrouve au début de l'infection une grande quantité des protéines Tax et Rex, issues d'ARNm doublement épissés. Pour permettre le passage des ARNm non épissés ou mono épissés, la protéine Rex intervient pour les prendre en charge et permettre leur export (Hidaka et al., 1988). Rex contient une séquence d'import nucléaire NLS (*Nuclear Localisation Signal*) qui va lui permettre, une fois produite, de revenir dans le noyau. Elle va alors se fixer au niveau de l'extrémité 3' des ARNm viraux contenant un élément de réponse à Rex (RxRE) empêchant ainsi leur épissage mais aussi leur dégradation en augmentant leur stabilité (Gröne et al., 1996; Seiki et al., 1983). Une séquence comparable à la séquence RxRE a été retrouvée en 5' des ARNm. Une fois fixée au ARNm, la protéine Rex va s'oligomériser et se fixer à l'exportine 1 aussi appelée CRM1 (*Chromosome Region Maintenance interacting protein 1*) grâce à son signal d'export nucléaire pour pouvoir acheminer les ARNm dans le cytoplasme (Hakata et al., 1998).

Il est intéressant de noter la double stratégie employée par les protéines Tax et Rex dans la régulation des différents transcrits. Tax va réguler l'expression du génome viral au niveau transcriptionnel alors que Rex va le réguler au niveau post-transcriptionnel.

Ainsi, au tout début de la transcription, on observe une accumulation des transcrits Tax/Rex permettant leur traduction rapide, puisque ceux-ci sont doublement épissés. Néanmoins, un gradient favorise la production de Tax par rapport à Rex, Tax allant pouvoir transactiver fortement le promoteur viral. Au cours du temps, la quantité de Rex va cependant s'accumuler permettant ainsi une stabilisation des ARNm non épissés ou mono épissés et leur export nucléaire au détriment des ARN doublement épissés Tax/Rex. Rex favorise donc la production des protéines auxiliaires et protéines de structure afin de produire de nouveaux virions (Rende et al., 2011). La protéine auxiliaire p30, nucléaire et nucléolaire, a aussi été décrite comme régulant le génome viral en empêchant l'export des ARNm Tax/Rex dans le cytoplasme (Ghorbel et al., 2006; Nicot et al., 2004).

Une fois les différents ARNm transcrits et exportés, ils peuvent être traduits afin de donner les précurseurs polyprotéiques précédemment décrits. Le précurseur Env des glycoprotéines de l'enveloppe virale est produit au sein du réticulum endoplasmique puis clivé au niveau de l'appareil Golgi libérant les sous-unités SU et TM. Ces sous-unités sont alors exportées, associées en trimères à la membrane plasmique pour s'y intégrer (Pique et al., 1992). Les précurseurs Gag, Gag-Pro et Gag-pro-Pol sont, quant à eux, traduits directement dans le cytoplasme puis exportés, grâce à leur résidus N-terminaux myristylés, au niveau de la membrane plasmique près des sous-unités SU et TM déjà intégrées (Fogarty et al., 2011). Va alors suivre l'ARN génomique viral, préalablement exporté par Rex, en se liant au précurseur Gag (Morcock et al., 2000). Le précurseur Gag contient dans son domaine MA deux motifs, PPPY et PTAP, dont le rôle est de recruter la machinerie de bourgeonnement présente aux niveaux des corps multivésiculaires de la cellule ce qui va permettre la libération des virions (Blot et al., 2004; Heidecker et al., 2004). Après la libération, les virions subissent une maturation avec le clivage par la protéase virale des différents précurseurs. Cette réorganisation est visible au microscope électronique (**figure 18**).

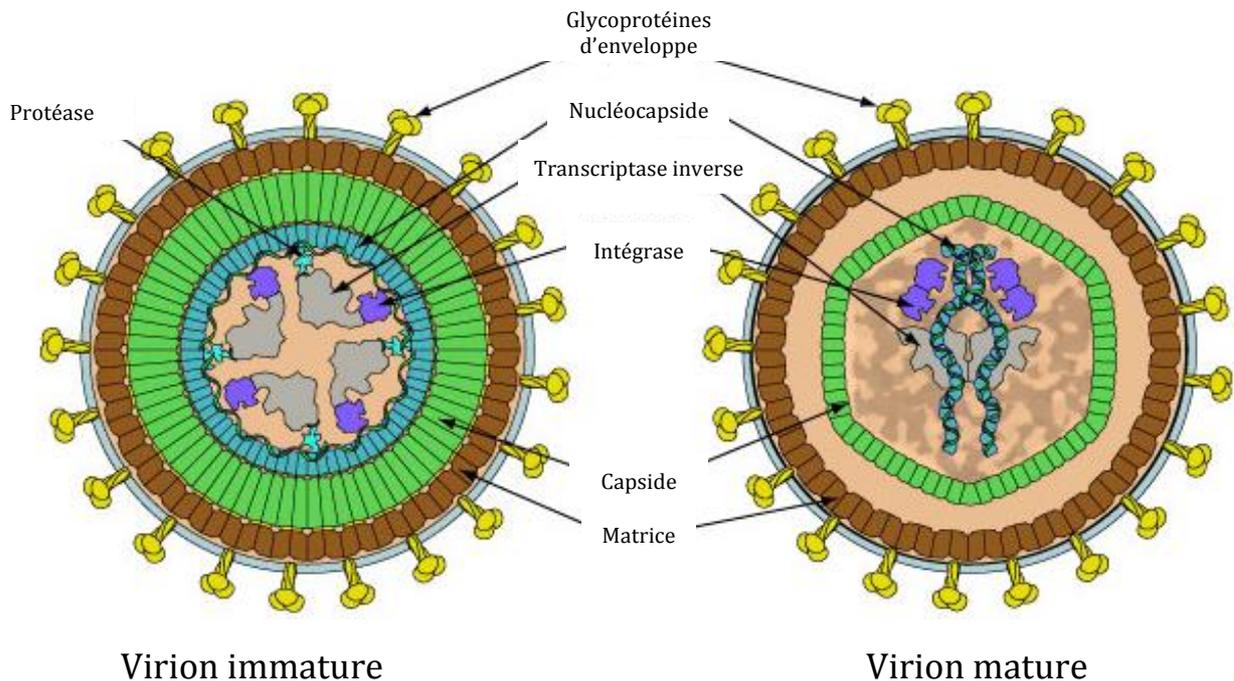


Figure 18 : Réorganisation structurale des particules virales d'HTLV-1.

Représentation schématique de la particule virale mature du virus HTLV-1 après clivage des précurseurs Gag-Pro et Gag-Pro-Pol entraînant un changement de la conformation de la particule et la libération des protéines de structure et des enzymes virales. Adapté de Viral Zone (http://viralzone.expasy.org/all_by_species/91.html).

Une fois la particule virale relâchée dans le milieu extracellulaire, elle doit pouvoir infecter d'autres cellules aux alentours. Cependant l'infectiosité du virus HTLV-1 est extrêmement faible, c'est pourquoi plusieurs stratégies de transmission ont été mises en place par le virus ce qui contribue à son échappement au système immunitaire.

IV-4-Mécanismes d'infections et échappement au système immunitaire.

IV-4-1- Transmission cellule-cellule.

Bien que certaines études aient décrit l'infection de lymphocytes B ou de lymphocytes T par des particules HTLV-1 libres *in vitro*, aucun cas d'infection humaine n'a été observé après transfusion de produits sanguins acellulaires, laissant penser que le virus est incapable d'infecter d'autres cellules *via* des particules virales libres dans le milieu extracellulaire (Rizkallah et al., 2015a). *In vitro*, à l'exception notable des cellules

dendritiques, l'infection des cellules cibles n'est possible qu'après un contact étroit avec une cellule infectée ce qui permet d'augmenter d'un facteur 10000 l'efficacité de l'infection (Mazurov et al., 2010). La transmission cellule-cellule semble donc être le mode préférentiel d'infection utilisé par le HTLV-1 et plusieurs stratégies sont actuellement décrites pour expliquer cette transmission (Pique and Jones, 2012) (**figure 19**).

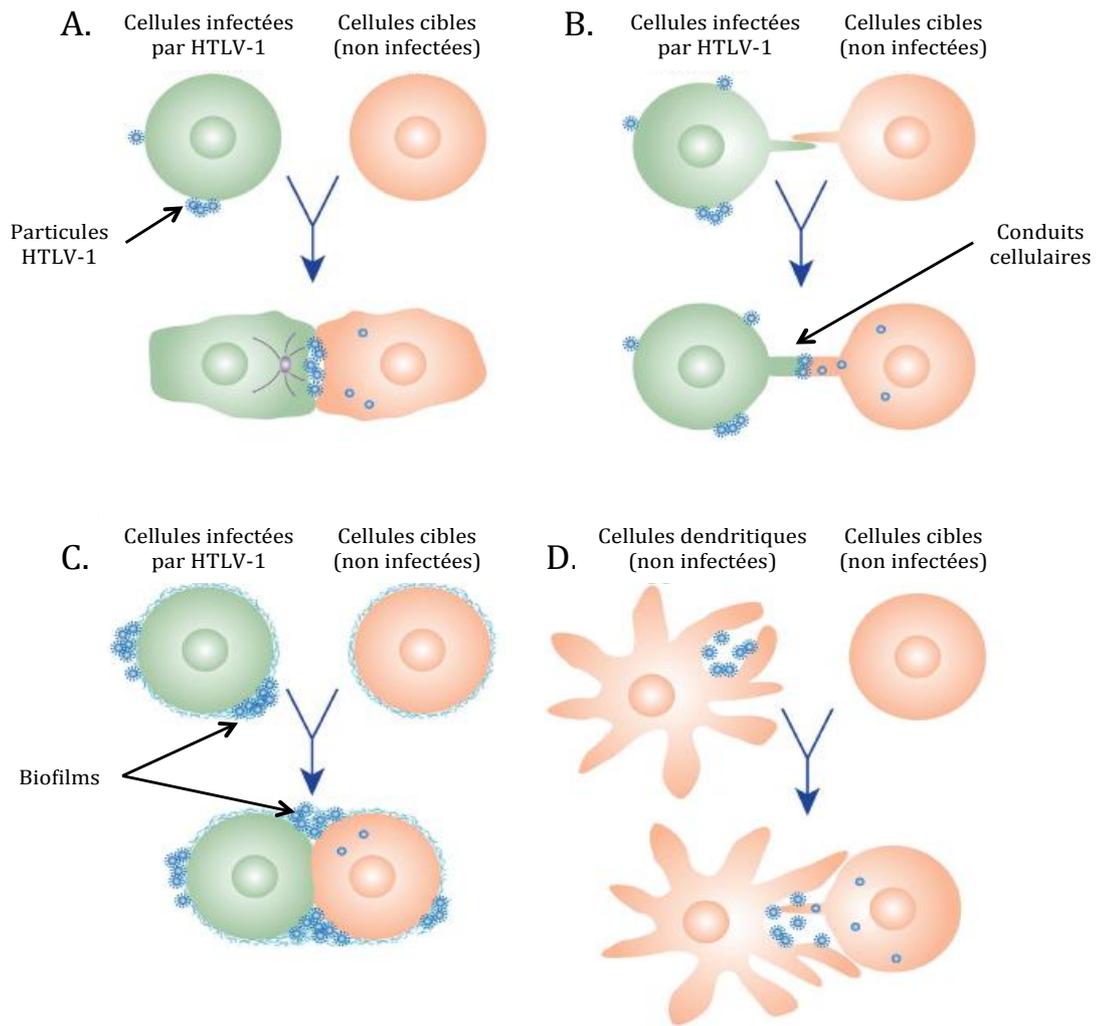


Figure 19 : Les différents mode de transmission cellule-cellule du virus HTLV-1.

A. La synapse virologique permet le passage des particules virales néoformées entre une cellule infectée et une cellule cible non infectée. La formation de la synapse se fait par une réorganisation du MTOC (en gris sur la figure). Les particules relâchées au sein de la synapse peuvent donc infecter directement les cellules cibles sans contact avec le milieu extérieur, réduisant ainsi l'exposition au système immunitaire.

B. Les conduits cellulaires sont des expansions membranaires permettant le passage de virus d'une cellule infectée à une cellule non infectée.

C. Le biofilm est un amas de protéines extracellulaires formé à la surface des cellules infectées par le virus. Lors d'un contact avec une cellule non infectée, le biofilm est transféré afin d'infecter la cellule.

D. L'infection en *trans* est un mécanisme utilisé par le virus pour transiter *via* les cellules dendritiques vers d'autres cellules. Les cellules dendritiques ne sont pas infectées mais elles portent à leur surface les particules virales qui seront transmises aux cellules non infectées. Adapté de (Pique and Jones, 2012).

Comme décrit en 2003 par l'équipe de C. Bangham, le contact entre un lymphocyte T infecté par HTLV-1 et un lymphocyte T non infecté cible permet le passage des nouvelles particules à travers une structure qui s'apparente partiellement à une synapse immunologique nommée par homologie synapse virologique (Igakura et al., 2003) (**figure 19 A**). La synapse virologique est initiée suite à l'interaction stable entre la cellule infectée présentant des protéines d'adhésion ICAM1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) et la cellule cible présentant des protéines LFA-1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen 1*). Cette liaison va alors entraîner une polarisation du centre organisateur des microtubules (MTOC, *Microtubule Organizing Center*), régulée par la protéine Tax qui co-localise partiellement avec le MTOC (Igakura et al., 2003). Cette réorganisation, qui fait intervenir les réseaux d'actine et de tubuline dans la cellule, va permettre d'apporter au sein du contact étroit néo-formé les protéines virales Gag et Env ainsi que le génome ARN viral. Le contact cellule-cellule est renforcé suite à l'intervention des protéines virales p8 et p12 qui vont permettre d'augmenter respectivement la quantité de ICAM-1 et de LFA-1 au sein de la synapse (Kim et al., 2006b; Van Prooyen et al., 2010). Enfin, il a été observé un regroupement de taline, une molécule d'adhésion cellulaire, au niveau de la zone de contact renforçant ainsi la synapse. La synapse virologique permet donc le passage de particules virales au sein d'une fente synaptique entre deux cellules permettant ainsi au virus d'être peu exposé au système immunitaire.

En dehors du contact établi lors de la synapse virologique, il a été décrit que le virus pouvait aussi être transmis *via* un agrégat viral ou biofilm viral (**figure 19 B**). Ce biofilm est concentré à la surface des cellules productivement infectées. Il est composé essentiellement de collagène, de galectine-3, d'agrane et de glycosides complexes. On y retrouve aussi la présence de téthérine qui, contrairement à ce qui est observé pour le VIH-1, favoriserait le maintien du virus au niveau de la membrane plasmique et augmenterait son transfert lors d'un contact cellule-cellule (Pais-Correia et al., 2010). Ainsi, le biofilm viral représente un autre mécanisme utilisé par le virus pour pouvoir infecter une cellule cible sans être détecté par le système immunitaire (Rizkallah et al., 2015b)

En outre, en plus des synapses virologiques et des agrégats viraux, on trouve, au niveau des cellules infectées, des protrusions nommées conduits qui pourrait permettre la stabilisation des contacts entre les cellules mais aussi des échanges de protéines cytoplasmiques entre les cellules (**figure 19 C**). Il a été décrit que la protéine virale p8 augmente le nombre de ces conduits et a la capacité de passer *via* ces conduits d'une cellule infectée à une cellule cible stimulant ainsi l'expression de LFA-1 dans la cellule cible (Van Prooyen et al., 2010). Ainsi, la formation de conduits permettrait de stabiliser des contacts entre les cellules et le passage de particules virales d'une cellule à l'autre sans détection par le système immunitaire.

Enfin, le virus peut aussi passer d'une cellule dendritique à un lymphocyte T CD4+ lors d'un contact établi lors de la présentation d'un antigène (**figure 19 D**). Cette infection peut avoir lieu en *trans* c'est à dire que la cellule dendritique porte à sa surface des particules virales mais elle n'est pas infectée (Jones et al., 2008). Lors de la présentation d'un antigène à un lymphocyte T CD4+ les virions pourront alors être transmis. La protéine DC-SIGN (*DC-Specific ICAM-3Grabbing Non-integrin*) a été identifiée comme importante dans cette transmission. L'infection peut également avoir lieu en « cis » lorsque la cellule dendritique est infectée et productrice de particules virales.

Ces différents modes de transmission sont limités aux stades précoces de l'infection. Pour établir une persistance virale sur le long terme, le virus utilise une autre stratégie de propagation et d'échappement à la réponse immune *via* l'expansion clonale.

IV-4-2- La réplication du HTLV-1 par expansion clonale.

Comme mentionné ci-dessus, il existe une très grande stabilité génomique du virus HTLV-1. Cela peut être expliqué soit par une grande fidélité de sa transcriptase inverse contrairement aux autres rétrovirus, soit du fait qu'il se réplique essentiellement sous forme provirale grâce à la machinerie cellulaire lors d'évènements mitotiques.

Le taux d'erreur de la transcriptase inverse du HTLV-1 est de l'ordre de 7.10^{-6} mutations par paire de base et par cycle de multiplication ce qui est plus faible que pour le VIH-1, mais qui ne peut expliquer cette grande stabilité génomique (Mansky, 2000). Concernant la deuxième hypothèse, différentes études réalisées chez des patients

infectés par le HTLV-1 ont montré le caractère oligoclonal des lymphocytes infectés. En effet, au sein d'un même patient, la majorité des clones retrouvés présentent un génome proviral intégré au même endroit au niveau de la chromatine indiquant que ces clones sont issus de la même cellule (Wattel et al., 1995). Plus l'infection est précoce, plus le nombre de clones uniques est important chez une personne infectée (Tanaka et al., 2005).

Le modèle actuel est donc que lors de la phase précoce de l'infection, le virus va se répliquer et va être transmis aux cellules voisines par la production de nouvelles particules virales, entraînant une prolifération polyclonale de lymphocytes T. Puis rapidement, durant une phase dite chronique, le virus va se répliquer sous forme de provirus en utilisant la mitose et la machinerie cellulaire afin de persister au sein de l'individu et ainsi échapper au système immunitaire. Lors de l'expansion clonale, les lymphocytes sont immortalisés et sont dépendants de l'IL-2 pour se multiplier. Puis au cours du temps, l'augmentation de l'instabilité génomique et l'accumulation de différentes mutations sous l'effet de la protéine Tax va entraîner l'apparition d'un clone pré-leucémique à l'origine du développement de l'ATL (**figure 20**) (Bangham et al., 2014; Semmes, 2006). Ainsi chez un individu infecté, on retrouve différents clones, mais un seul sera à l'origine du développement de la maladie.

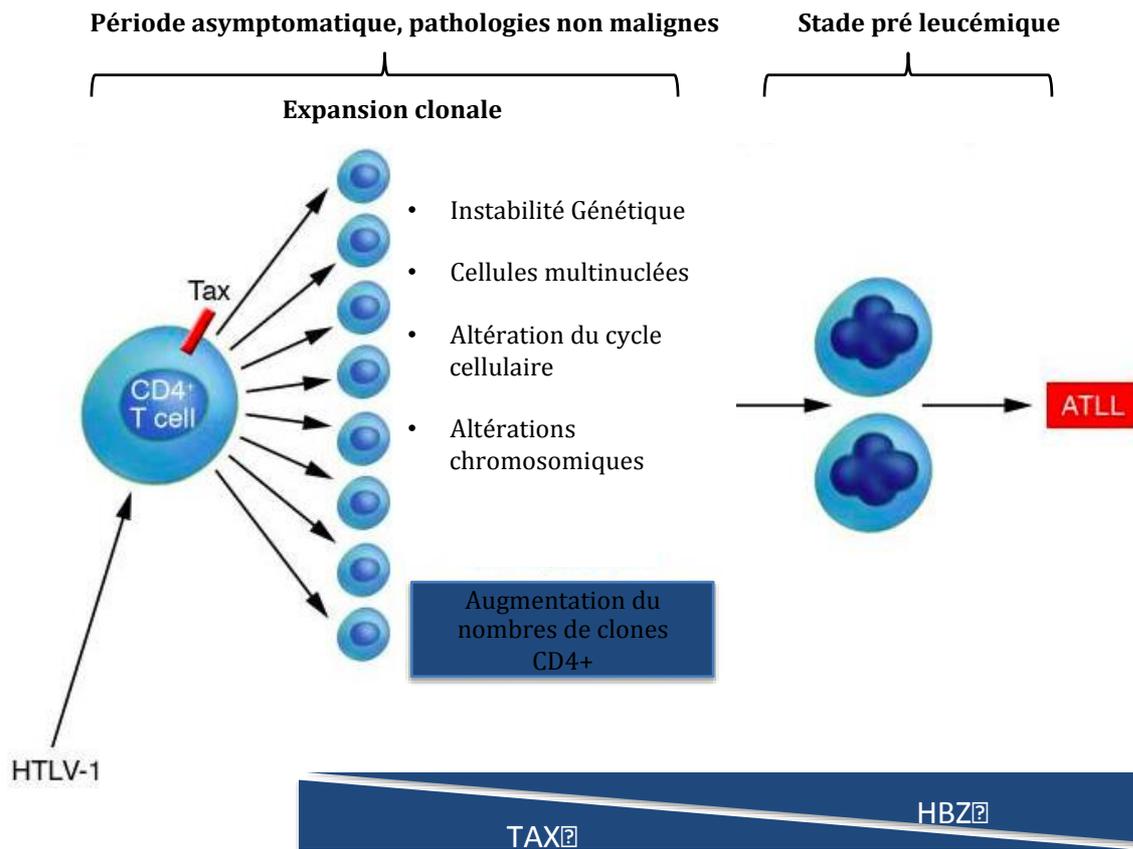


Figure 20 : Modèle d'expansion clonale des lymphocytes CD4+.

Après avoir infecté les lymphocytes CD4+, le virus HTLV-1 va se multiplier par expansion clonale dans ces cellules. Sous l'effet de Tax, de nombreuses instabilités génétiques, des altérations du cycle cellulaire ou bien des altérations chromosomiques vont entraîner l'apparition d'un clone pré-leucémique. Ce clone va pouvoir par la suite acquérir un phénotype transformé à l'origine du développement de l'ATL. Adapté de (Semmes, 2006)

V. HTLV-1 : un virus oncogène.

Le virus HTLV-1 est le seul rétrovirus humain oncogène chez l'Homme découvert à ce jour. Comme décrit précédemment, le processus amenant à la leucémie est un phénomène extrêmement long résultant de nombreuses accumulations d'altérations au sein de la cellule. Ces altérations sont principalement dues à la protéine Tax du virus qui, au cours du temps, va moduler un grand nombre de processus cellulaires clés comme des voies de signalisations cruciales (voie NF- κ B, voie PI3K-Akt ou celle des MAPK), l'activation du cycle cellulaire, l'échappement à l'apoptose afin d'induire une survie et prolifération lymphocytaire massive à l'origine de la leucémie, conférant alors aux lymphocytes un phénotype dit « immortalisé ». Les pouvoirs oncogéniques de Tax ont en

effet été démontrés *in vitro* par la transformation de fibroblastes de rongeurs et par l'immortalisation de lymphocytes T primaires humains (Grassmann et al., 1992; Robek and Ratner, 1999; Tanaka et al., 1990). *In vivo*, des études sur la souris exprimant Tax en tant que transgène ont pu montrer que l'expression de la protéine Tax seule était à l'origine de tumeur dont des leucémies semblables à l'ATL chez l'Homme (Grossman et al., 1995; Hasegawa et al., 2006). Tax est aussi une protéine capitale dans la transcription virale et celle de nombreux gènes cellulaires favorisant leur expression. Toutes les capacités oncogéniques de la protéine sont dues à son aptitude à interagir et à détourner de nombreuses protéines cellulaires (Boxus et al., 2008; Currer et al., 2012). Malgré le fait que dans la grande majorité des cas les cellules ATL n'expriment plus Tax, les événements conduisant à l'immortalisation par Tax sont conservés dans ces cellules et ils sont cruciaux pour permettre la transformation lymphocytaire par la suite. (Kataoka et al., 2015).

Au sein du laboratoire, Tax et ses interactions avec d'autres partenaires entraînant l'activation des voies de signalisation et la transcription des gènes viraux sont particulièrement étudiées. Nos travaux se sont donc portés sur l'étude de cette protéine et nous discuterons au cours de cette partie des différentes voies dérégulées par Tax favorisant la transcription virale et induisant l'immortalisation des lymphocytes T.

V-1- Modulation des principales voies de signalisations cellulaires.

V-1-1) La voie MAP Kinase.

Les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) forment une famille de protéines kinases cytosoliques organisées en voies de signalisation permettant suite à un stimulus extérieur tel que des facteurs de croissance, des hormones ou des facteurs de stress, de phosphoryler de nombreux effecteurs cytosoliques ou nucléaires afin de moduler le cycle cellulaire, l'apoptose, la différenciation ou la prolifération. Le signal extracellulaire est transduit au niveau de récepteurs membranaires de type tyrosine kinase ou couplé aux protéines G et les MAP3K, première MAPK de la série, vont être activés *via* des protéines adaptatrices ou des petites protéines G comme Ras. Les MAP3K vont à leur tour phosphoryler, sur une sérine ou une thréonine, une deuxième kinase, la MAPK Kinase (MAPKK), entraînant son activation. Enfin cette deuxième kinase va phosphoryler une troisième kinase, la MAPK, l'activant alors, ce qui lui permettra d'activer les différents effecteurs cellulaires (Keshet and Seger, 2010) (**figure 21**).

La voie des MAPK est la voie de signalisation cellulaire la plus vaste comprenant près de 200 composants au sein desquels quatre cascades principales ont été clairement identifiées : p38, JNK (*c-Jun N-Terminal Kinase*), ERK5 et ERK (*Extracellular signal Regulated Kinase*). La dérégulation de ces cascades a été décrite comme étant associée au développement de nombreux cancers , notamment l'ATL (Low and Zhang, 2016). En effet, l'activation constitutive de la voie JNK a été décrite dans des cellules de patients ATL ainsi que dans des lymphocytes T humains transformés par HTLV-1 *in vitro* (Arnulf et al., 2002; Xu et al., 1996). La protéine Tax est capable d'activer la voie des MAPK en interagissant avec différents acteurs clés comme les protéines JNK1 ou MEKK1 (Jin et al., 1997; Yin et al., 1998). Tax interagit également avec la MAP3K TAK1 et sa sous-unité régulatrice TAB2, décrite comme étant constitutionnellement active dans les lymphocytes T infectés par HTLV-1, entraînant l'activation des cascades JNK et p38 (Wu and Sun, 2007). Enfin Tax peut aussi interagir avec les petites protéines G suggérant une activation de la voie Erk *via* la protéine Ras (Wu et al., 2004).

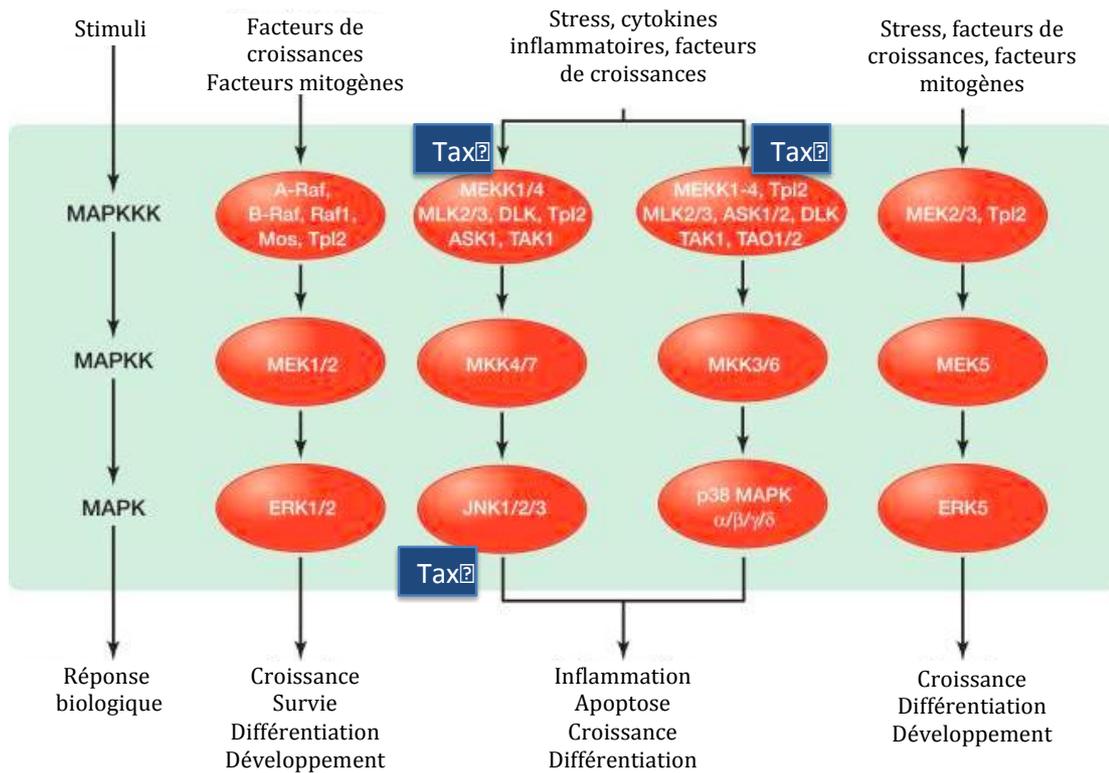


Figure 21 : Activation et modulation de la voie MAPK par Tax.

Représentation schématique des quatre cascades principales d'activation de la voie des MAPK en réponse à différents stimuli. L'activation de la voie des MAPK entraîne une cascade de phosphorylation permettant de moduler et de réguler divers processus biologiques comme la survie cellulaire, la croissance ou bien le développement. Tax active, de manière constitutive, de nombreux facteurs de la voie comme JNK1, MEKK1 ou bien TAK1 représenté ci-dessus par un carré bleu. Adapté de (Morrison, 2012).

V-1-2) La voie PI3K-Akt.

La voie de signalisation de la phosphoinositide-3-kinase est une voie de régulation majeure dans le contrôle de la prolifération, la survie cellulaire ou l'apoptose (Cheaib et al., 2015) (**figure 22**). Elle est activée suite à la fixation de facteurs de croissance ou d'hormones comme l'EGF (*Epidermal Growth factor*) sur des récepteurs tyrosine kinase qui vont se dimériser et s'autophosphoryler. Suite à cette activation, la PI3K va être recrutée directement au niveau du récepteur *via* son interaction avec sa sous-unité régulatrice p85 ou bien *via* l'intermédiaire de protéine GRB2 (*GRB2-Associated Binding Protein*) ou GAB (*Growth factor Receptor-Bound protein 2*). Cette interaction va activer la sous-unité catalytique p110 de la PI3K, ce qui va engendrer la phosphorylation de PIP2 (*Phosphatidylinositol-(4,5)-biphosphate*) en PIP3 (*Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphate*). PIP3 va, à son tour, recruter les protéines kinases PDK1 et Akt (Cheaib et al., 2015).

Akt est une protéine centrale de la voie car, suite à son activation, elle est capable de réguler les protéines p53, les facteurs NF- κ B, CREB ou bien les protéines du complexe mTOR empêchant ainsi l'entrée en apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire entre autre. La nécessité que cette voie soit transitoire est primordiale. C'est pourquoi une boucle de rétrocontrôle négatif médiée par la protéine PTEN qui va déphosphoryler PIP3 ou bien par la protéine LKB1 qui va inhiber le complexe mTOR est finement régulée dans la cellule (Cully et al., 2006) (**figure 22**).

Comme pour la voie des MAPK, la voie PI3K-Akt est décrite comme étant dérégulée et active dans de nombreux cancers dont l'ATL. En effet, une activation de la voie a été décrite dans des cellules de patients ATL ou bien dans des lignées transformées par HTLV-1 (Ikezoe et al., 2007; Jeong et al., 2005). Cette activation de la voie est médiée par la protéine Tax qui interagit avec la sous-unité p85 de la PI3K favorisant ainsi l'activité de la sous-unité catalytique p110 (Peloponese and Jeang, 2006). Tax semble pouvoir agir au niveau du complexe mTOR en agissant sur des effecteurs en aval (Yoshita et al., 2012). Enfin, Tax va réprimer l'expression des répresseurs négatifs comme PTEN entraînant une activation de la voie (Fukuda et al., 2012) (**figure 22**).

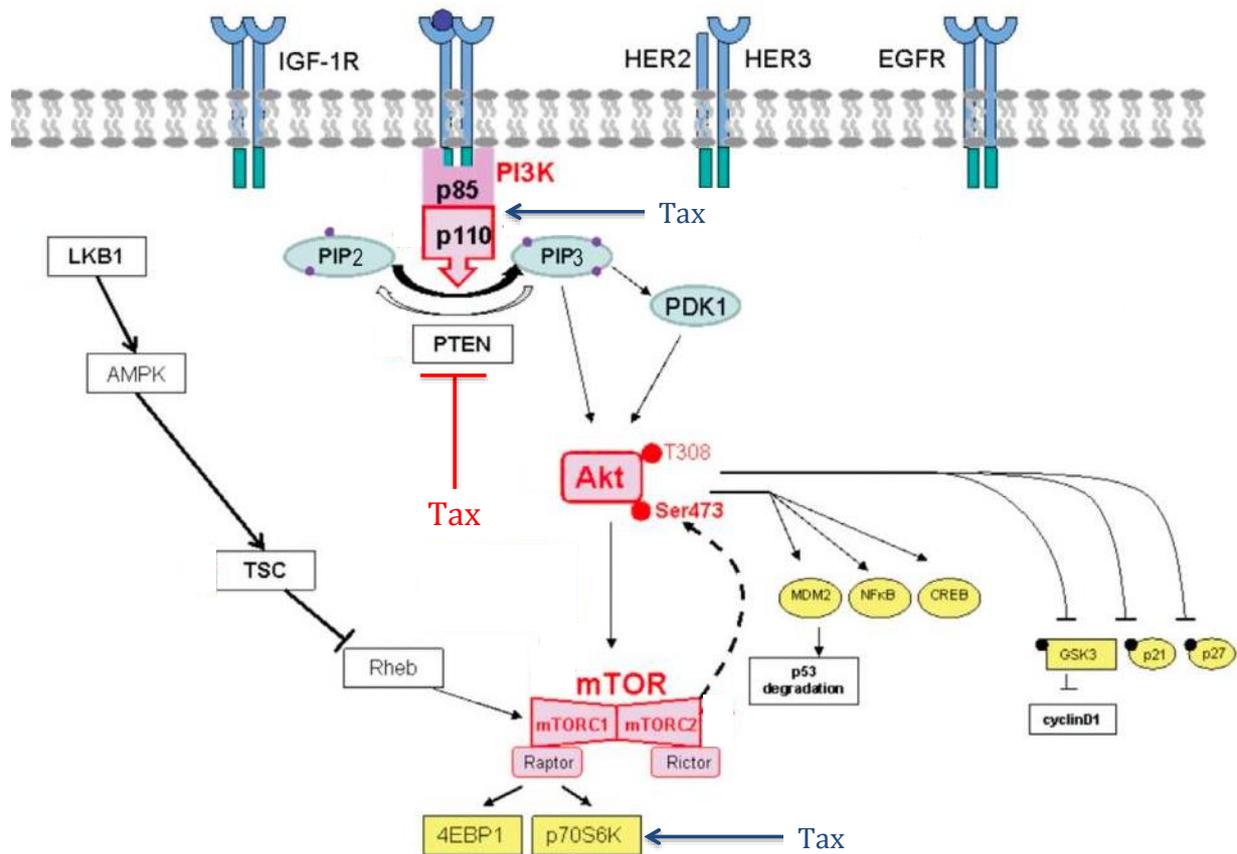


Figure 22 : Activation et modulation de la voie PI3K-Akt par Tax.

Suite à la fixation de ligand comme l'EGF au niveau de récepteur tyrosine kinase, la PI3K, composée de la sous unité p85 et p110, va être recrutée sous la membrane. Le recrutement de la PI3K va entraîner la phosphorylation de PIP2 en PIP3 induisant le recrutement de Akt. Akt va induire la phosphorylation de nombreux effecteurs impliqués dans la survie cellulaire ou bien la prolifération. Tax va activer cette voie à différents niveaux. Tout d'abord, Tax va inhiber PTEN à l'origine du contrôle de la phosphorylation de PIP3 en PIP2 afin de réguler l'activation de la voie. Puis, Tax va interagir avec la sous unité p85 de PI3K ou avec les effecteurs en aval de mTOR afin de l'activer de manière constitutive. Adapté de (Cheaib et al., 2015)

V-1-3) La voie NF-κB.

La voie NF-κB est une cascade de signalisation cellulaire qui contrôle l'activation de la transcription de gènes clés impliqués dans la prolifération, l'inflammation, la réponse immunitaire, l'apoptose et l'oncogenèse (Xiao and Fu, 2011). Cette voie fait intervenir différents facteurs de transcription, très conservés au cours de l'évolution, fonctionnant en homo ou hétérodimères (**figure 23**). Ces facteurs de transcription appartiennent à la famille Rel composée de p65 (RelA), c-Rel, RelB, NF-κB1 (p50/p105) et NF-κB2 (p52/p100). Ces protéines possèdent toutes dans leurs parties N-terminales un domaine RHD (*Rel Homology Domain*) leur permettant d'une part de pouvoir être transloquées dans le noyau grâce à la présence d'une séquence NLS et d'autre part de se lier directement à l'ADN au niveau d'éléments de réponse κB. Les protéines RelA, RelB et

c-Rel possèdent, de plus, un domaine de transactivation TAD (*TAD Transactivating Domain*) leur permettant d'interagir directement avec la machinerie transcriptionnelle. En revanche les protéines p50 et p52 n'ayant pas de domaine TAD, forment des dimères avec c-Rel et RelA ou RelB respectivement pour être fonctionnelles. Il est à noter que les protéines p50 et p52 sont synthétisées sous la forme de précurseurs protéiques, respectivement p105 et p100, qui sont clivés par la suite pour donner naissance aux formes matures (**figure 23**).

Lorsque la cellule n'est soumise à aucun signal, les facteurs de transcription sont liés à des inhibiteurs cytoplasmiques IκB (*Inhibitors of κB*) empêchant ainsi leur import nucléaire et l'activation anarchique de la voie en se liant directement aux domaines TAD (Vallabhapurapu and Karin, 2009). Lors d'un stimulus activateur, les inhibiteurs IκB sont dégradés, entraînant la libération des facteurs de transcription et le démasquage du motif NLS, permettant donc leur translocation dans le noyau.

En fonction des types de signaux reçus par la cellule, deux voies NF-κB distinctes peuvent être activées.

La première, appelée voie canonique, est caractérisée par l'induction de la translocation de RelA/p65. Elle est composée du complexe IKK (*IκB Kinase*) formé de deux sous-unités catalytiques, IKKα et IKKβ, associées à une sous-unité régulatrice IKKγ (ou NEMO, *NF-κB Essential Modulator*). Ce complexe peut être activé par certaines cytokines (IL-1, TNFα, *Tumor Necrosis Factor α*) ou par la liaison de ligands aux TLR (*Toll-Like Receptors*) ce qui va déclencher la translocation nucléaire du dimère p50/p65 qui va se fixer aux éléments de réponses κB sur le génome et activer la transcription de gènes cibles. Pour que le complexe soit activé, le signal doit être transduit *via* des protéines adaptatrices TRAF6 (*Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor*), TRAF2 ou TRAF5 qui vont-elles-même activer la kinase TAK1 (*Transforming growth factor β Activated Kinase 1*). TAK-1 va alors phosphoryler et activer IKKα et IKKβ qui, à leur tour, vont phosphoryler IκBα, induisant alors sa polyubiquitination et sa dégradation *via* le protéasome 26S et libérant ainsi les facteurs de transcription p50/p65 (**figure 24**).

La seconde voie, qui est qualifiée de non canonique (ou alterne) par opposition à la première, est caractérisée par l'induction de la translocation de RelB. La kinase NIK (*NF-κB Inducing Kinase*) est l'élément central de l'activation de cette voie. Suite des signaux plus limités que dans la voie canonique, comme les protéines BAFF (*B-Cell Activating*

Factor), la lymphotoxine β , le ligand de CD40, RANKL (*Receptor Activator of NF-kB Ligand*) ou TWEAK (*TNF-Like Weak Inducer of Apoptosis*), les protéines TRAF2 et TRAF3 vont être dégradées entraînant la libération de NIK et son accumulation dans le cytoplasme. NIK va alors s'autophosphoryler entraînant la phosphorylation et l'activation de IKK α . Les dimères IKK α , suite à leur activation, vont se lier aux dimères RelB/p100 entraînant la phosphorylation de p100 et son clivage en p52. Puis, le dimère RelB/p52 migre dans le noyau pour exercer son activité transcriptionnelle (**figure 24**).

Comme pour les voies MAPK et PI3P-Akt, la voie NF-kB a été décrite comme étant perturbée dans de nombreux cancers (Xiao and Fu, 2011). L'ATL ne fait pas exception et il a été montré une activation constitutive de la voie dans les cellules de patients ATL ainsi que dans des lymphocytes transformés par HTLV-1 ou encore dans des cellules n'exprimant que Tax (Kfoury et al., 2012). Tax agit donc à différents endroits de la voie pour l'activer de manière permanente (**figure 24**). Il est intéressant de noter que dans le cas des ATL, l'implication des miRNA a été associée à une activation de la voie en absence de Tax (Moles and Nicot, 2015).

Pour la voie canonique, Tax s'associe directement au complexe IKK *via* l'interaction avec NEMO et entraîne son activation *via* sa phosphorylation (Curren et al., 2012; Harhaj and Sun, 1999; Kfoury et al., 2012). Le mécanisme à l'origine de la phosphorylation du complexe est toujours un élément de controverse et il est admis que le recrutement par Tax de nombreuses kinases comme NIK, TAK1 ou bien MEKK1 permettrait la phosphorylation de celui-ci. Tax est aussi capable de se lier directement aux inhibiteurs I κ B et notamment I κ B α *via* leurs motifs ankyrines favorisant ainsi leur dégradation *via* le protéasome indépendamment de leur activation physiologique (Hirai et al., 1994; Suzuki et al., 1995). De plus, Tax est peut se lier au protéasome au niveau des sous-unités HsN3 et HC9, favorisant l'interaction avec les I κ B et leurs dégradations (Rousset et al., 1996). En se liant aux inhibiteurs I κ B, Tax va permettre la libération et la translocation des dimères p50/RelA dans le noyau. Enfin, Tax est aussi capable de se lier à RelA et de favoriser son interaction aux éléments de réponses kB des promoteurs cibles (**figure 24**).

La voie non canonique est aussi ciblée par Tax. Tax est capable d'interagir avec p100 et d'entraîner son clivage en p52 (Higuchi et al., 2007; Lanoix et al., 1994) (**figure 24**). De

manière intéressante, le clivage de p100 en p52 n'est pas dépendant de l'activation de NIK. En effet, il a été montré dans ce cas particulier que Tax formerait un complexe comprenant IKK α et p100. Cette liaison entre ces trois partenaires favoriserait la phosphorylation des sérines 866 et 870 de p100 puis son ubiquitination entraînant alors son clivage en p52 (Xiao et al., 2001). De plus, l'activation de la voie non canonique par Tax permet une stimulation de la voie canonique. En effet, l'activation de la voie non canonique entraîne la répression de l'expression du gène WWOX connu pour inhiber spécifiquement la voie canonique (Fu et al., 2011) (**figure 24**).

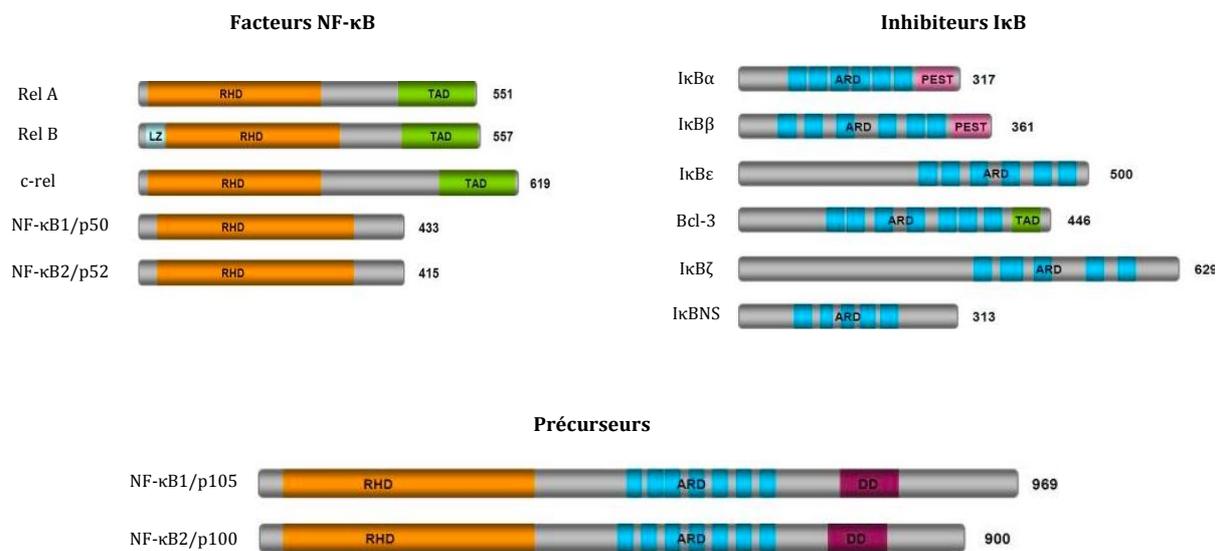


Figure 23 : Structure protéique des inhibiteurs IκB et des facteurs NFκB.

Les facteurs NFκB ont tous en commun un domaine d'homologie à Rel (RHD) présent dans leur partie N-Terminale, ici représenté en orange, leur permettant de s'homodimeriser ou de s'hétérodimeriser, de se lier à l'ADN ou d'être transloqués dans le noyau. Les facteurs Rel A, Rel B et c-Rel possèdent dans leur partie C-Terminale un domaine TAD permettant d'activer la transcription. Les inhibiteurs IκB possèdent des domaines ankyrines (ARD), représentés en bleu, leur permettant d'interagir avec les domaines RHD des facteurs NFκB entraînant leur rétention dans le cytoplasme. Les protéines p105 et p100, précurseurs des protéines p50 et p52 respectivement, contiennent à la fois des domaines TAD et des domaines ARD. Adapté de (Xiao and Fu, 2011).

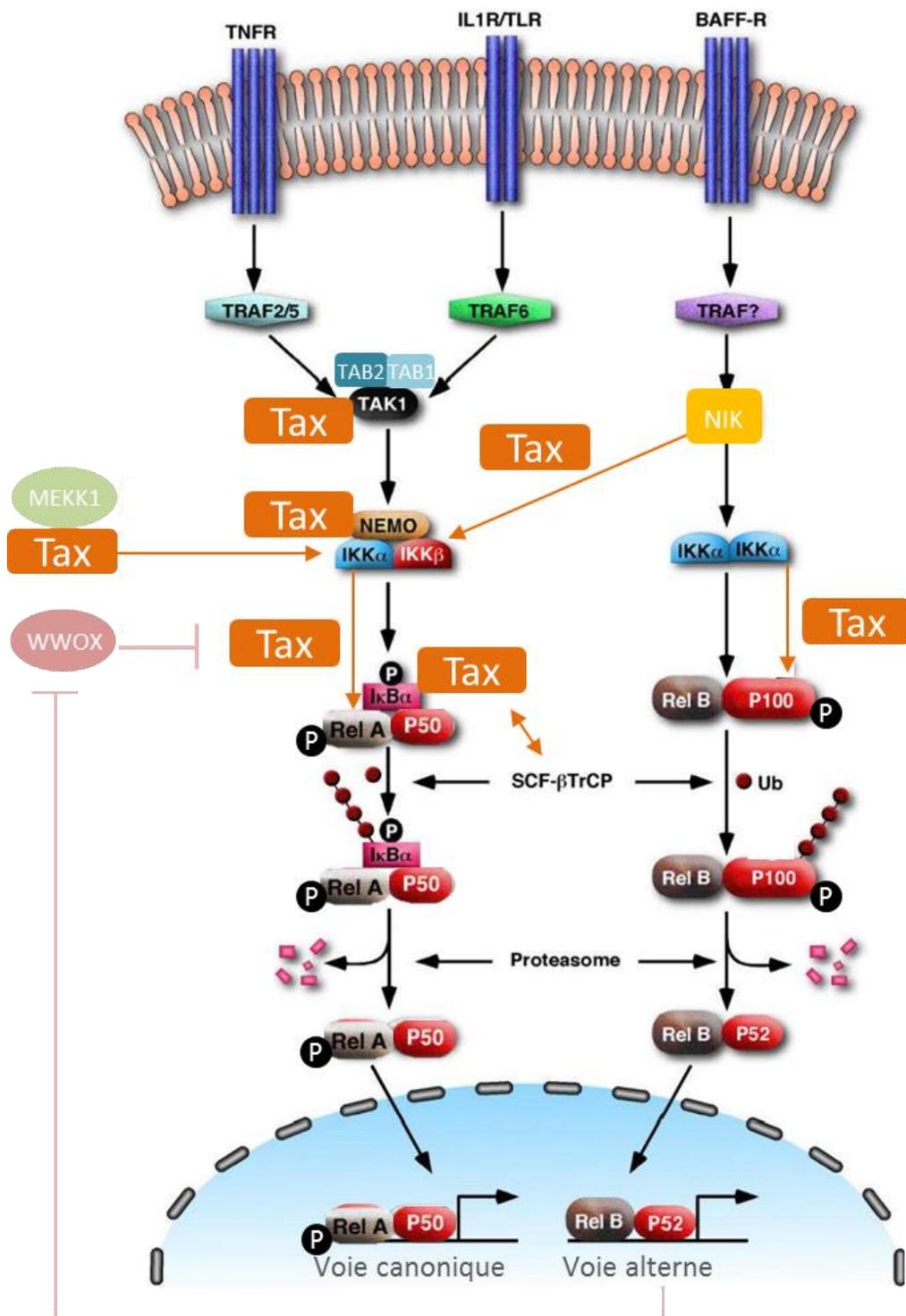


Figure 24 : Activation et modulation de la voie NF-κB par Tax.

La voie NF-κB est activée de manière constitutive par la protéine Tax. Dans ce schéma, les effets activateurs de la protéine Tax sont représentés en orange alors que les effets répresseurs, notamment médiés par la protéine WWOX, sont représentés en rose. Adapté de (Chen, 2005)

V-1-4) La voie AP-1.

L'activation des différentes voies de signalisation précédemment décrites résulte en la production de nombreux facteurs de transcriptions regroupés dans la famille des protéines AP-1. Les protéines AP-1 sont regroupées en 5 familles : Jun (c-Jun, JunB, JunC), Fos (c-Fos, Fos-B, Fra-1, Fra-2), CREB/ATF (CREB-1, CREB-2,...) et Maf (*Musculoaponeurotic Fibrosarcoma*). Elles ont en commun un domaine B-Zip permettant des interactions homotypiques de type « coiled coil ». Les facteurs AP-1 sont transcriptionnellement actifs sous formes d'homodimères ou d'hétérodimères pour la famille Jun (figure). Les membres de la famille Fos sont cependant non actifs sous forme d'homodimère et nécessitent l'interaction avec un membre de la famille Jun. Ces nombreuses combinaisons sont spécifiques à des séquences consensus sur les promoteurs de gènes cibles.

Dans le cas des ATL, la voie AP-1 est, bien entendu, fortement activée étant donné que les voies MAPK ou bien PI3K en amont sont directement activées par la protéine Tax (Fujii et al., 2000; Mori et al., 2000). Ainsi Tax est capable de stimuler la production de c-Fos, Fos-B, Fra-1, Fra-2, c-Jun, Jun-B et Jun-D dans des lignées transformées par le virus HTLV-1 et d'augmenter la liaison de ces facteurs au niveau de site de réponse AP-1 (Iwai et al., 2001; Peloponese and Jeang, 2006).

Au vu de l'interconnexion qui existe entre les différents acteurs de la famille AP-1, Tax est donc capable de moduler les différentes voies de la cellule en même temps amplifiant ainsi son effet. Ainsi, Tax va déréguler l'expression de nombreux gènes impliqués dans la régulation de la prolifération et de la différenciation lymphocytaire, de l'apoptose ou bien de la production de cytokines expliquant en partie les mécanismes aboutissant à l'immortalisation lymphocytaire.

V-2- Détournement du cycle cellulaire et de l'apoptose.

La dérégulation des acteurs contrôlant le cycle cellulaire et l'entrée en apoptose sont une étape clé pour Tax dans l'induction de la prolifération et de la survie des cellules infectées.

V-2-1) Cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire est composé de 4 phases (**figure 25**). La première correspond à la phase G1 durant laquelle la cellule va croître et se préparer à la réplication. La phase S qui suit correspond à la réplication du génome puis suit la phase G2, phase de croissance et de préparation à la mitose, puis la phase M durant laquelle la mitose va être réalisée à proprement parler. Le passage d'une phase à l'autre est un processus biologique extrêmement régulé par des kinases dépendantes de cyclines CDK (*Cycline Dependant Kinase*) associées bien entendu à des cyclines. Les complexes cdk/cycline sont eux même régulés par des phosphatases ou bien des kinases faisant partie de la famille des inhibiteurs de CDK. Ainsi on peut décrire les protéines de la familles Cip/Kip qui agissent sur tous les complexes cdk/cyclines et les protéines de la famille INK4 régulant spécifiquement les complexes CDK(4/6)/cycline D (**figure 25**). Les complexes cdk/cyclines ainsi que leurs inhibiteurs assurent donc un contrôle qualité tout au long du cycle cellulaire évitant ainsi toutes anomalies. Quatre points de contrôles sont ainsi décrits lors de l'avancement du cycle. Le premier appelé point de restriction permet, en fonction de l'état cellulaire, le passage en phase G1 ou de rester en phase de quiescence G0. Un deuxième point de contrôle se trouve durant la phase S évitant ainsi de poursuivre en cas d'anomalie au cours de la réplication. Un troisième point de contrôle entre la phase G2/M est présent permettant de vérifier que le matériel génétique a bien été dupliqué pour la mitose. Enfin, un quatrième point de contrôle est effectué lors de l'alignement des chromosomes au centre du fuseau mitotique avant la division (**figure 25**).

La protéine Tax va agir à différents endroits du cycle cellulaire et notamment lors de la transition G1/S induisant ainsi une division cellulaire anarchique. Ainsi, le premier effet identifié est l'accélération du passage entre la phase G1 et la phase S par Tax. D'un point de vue mécanistique, le passage dépend de la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Rb) qui va ainsi libérer le facteur de transcription E2F qui contrôle les

promoteurs des gènes nécessaires au passage en phase S (**figure 25**). Pour augmenter la transition, Tax va interagir à différents points stratégiques. Tout d'abord Tax va augmenter l'expression des cyclines D1 et D2 impliquées dans la progression du cycle (Akagi et al., 1996; Huang et al., 2001; Kim et al., 2010). Cette augmentation, aussi retrouvée dans les cellules ATL, va favoriser l'association de la cycline 2 avec CDK6 mais également avec CDK4 et CDK2 (Santiago et al., 1999). De plus, grâce à l'activation de la voie $\kappa\kappa\kappa$, Tax va augmenter l'expression des CDK2, CDK4 et CDK6, de la cycline E et du facteur de transcription E2F. Parallèlement, Tax va réprimer l'expression des répresseurs p18^{Ink4c}, p19^{Ink4d}, p27^{Kip1}, p16^{Ink4a} et p15^{Ink4b} levant ainsi toute inhibition sur CDK4 (Akagi et al., 1996; Iwanaga et al., 2001). De plus, Tax va interagir avec les complexes CDK/cyclineD favorisant la phosphorylation de Rb. Enfin, une étude a montré que Tax avait la capacité d'interagir directement avec Rb hypophosphorylé favorisant sa dégradation *via* le protéasome (Kehn et al., 2005).

Il a récemment été décrit que Tax accélérerait la durée de la phase S en activant beaucoup plus précocement des origines de réplication censées être tardives favorisant ainsi la réplication cellulaire. Pour ce faire Tax entraîne une hyperacétylation des histones en recrutant l'hélicase MCM2-2 et l'histone acétylase p300 (Boxus et al., 2012)

En perturbant ces différents points de contrôle, Tax va ainsi favoriser la prolifération lymphocytaire.

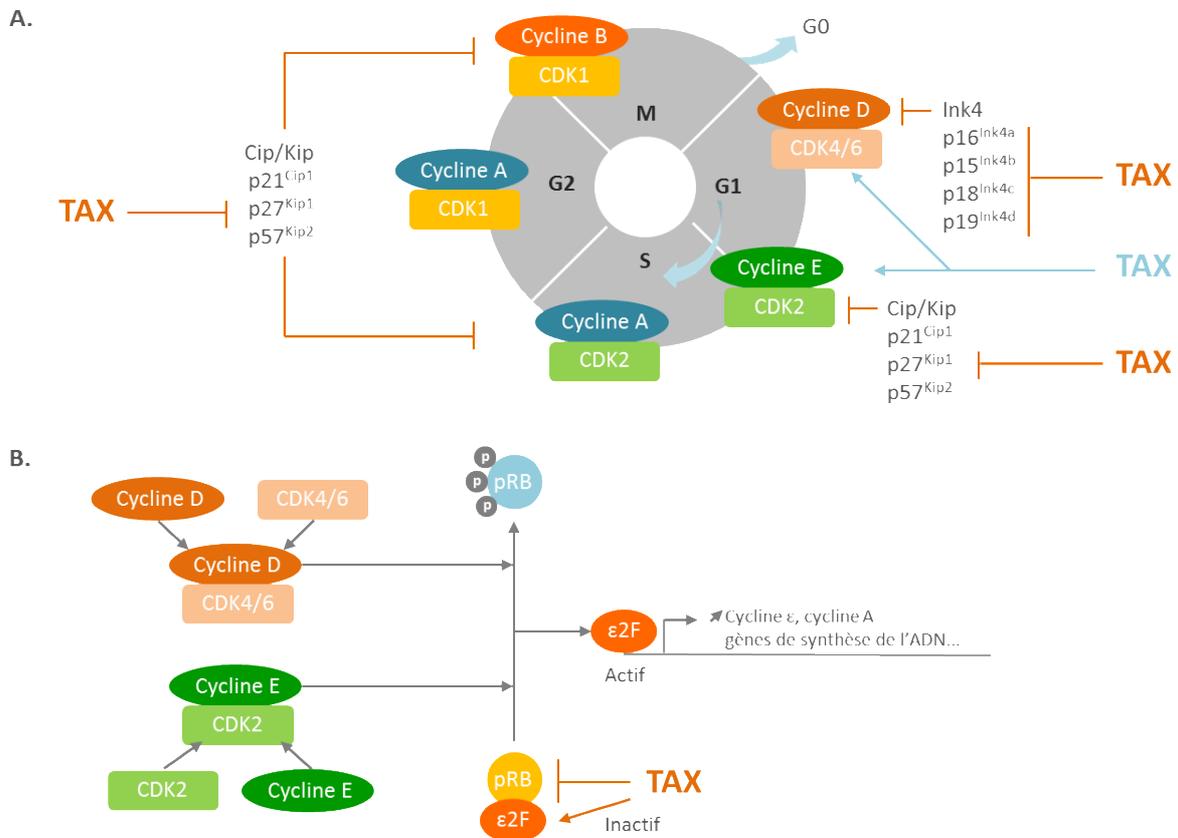


Figure 25 : Modulation du cycle cellulaire par Tax.

A. Représentation du cycle cellulaire eucaryote composé de 4 phases G1, S, G2 et M. La progression entre chaque phase est finement régulée par des complexes CDK/cyclines comme indiqué dans ce schéma. Le passage G1/S est régulé par les complexes CDK (4/6)/cycline D et par les complexes CDK2/cycline E. Tax favorise la transition G1/S en stimulant l'expression ou l'activité des activateurs du cycle (représenté par les flèches bleues) et bloque l'expression des répresseurs (représenté par les flèches oranges).

B. Représentation schématique de la régulation de la protéine du rétinoblastome Rb dans la transition G1/S. Lors de cette transition, les complexes cycline E/CDK2 et cycline D/CDK (4/6) vont induire l'hyperphosphorylation de la protéine Rb libérant ainsi le facteur de transcription E2F. Tax interagit avec la forme hypophosphorylée de la protéine Rb notée pRB et induit sa dégradation par le protéasome (représentée par une flèche orange) favorisant la libération du facteur E2F, gouvernant l'expression des gènes nécessaires au passage en phase S.

V-2-2) Stimulation de la production de cytokines.

Un autre moyen mis en place par Tax pour stimuler la prolifération lymphocytaire est sa capacité à induire la production de cytokine ainsi que de leurs récepteurs à la membrane des cellules infectées. Il a été rapidement décrit que Tax stimulait la sécrétion d'IL-2 ainsi que l'expression de la chaîne α de son récepteur mettant en avant l'implication de la stimulation autocrine et paracrine des interleukines dans la prolifération

lymphocytaire médiée par Tax (Inoue et al., 1986; Maruyama et al., 1987). Les mêmes observations ont été réalisées par l'équipe de Mizuguchi en décrivant une augmentation de la production d'IL-21 et de son récepteur entraînant la prolifération des lymphocytes T (Mizuguchi et al., 2009). Enfin, une augmentation de la quantité d'IL-13, ainsi qu'une nouvelle fois de son récepteur, a été décrite chez des patients ATL suggérant l'importance de la dérégulation de ces boucles d'interleukines (Wäldele et al., 2004).

V-2-3) Blocage de l'entrée en apoptose.

Parallèlement à la stimulation lymphocytaire, Tax va jouer un rôle important dans la survie des lymphocytes infectés en dérégulant les mécanismes d'entrée en apoptose. Pour se faire, Tax a la capacité d'induire la production de toute une batterie de molécules anti apoptotique comme Bcl-Xl (Mori et al., 2001), les protéines inhibitrices de l'apoptose IAP (*Inhibitors of Apoptosis protein*) (Wäldele et al., 2006), la survivine (Kawakami et al., 1999), c-Flip (*cellular Flice-Like Inhibitory protein*) (Krueger et al., 2006), CXCR7 (Jin et al., 2009) ou bien Bcl-3 (Saito et al., 2010) (**figure 26**).

A l'inverse, Tax a aussi la capacité de réprimer les protéines pro-apoptotique comme Bax, Bim et Bid (Brauweiler et al., 1997; Mühleisen et al., 2014). De manière intéressante, toutes ces activations sont dépendantes de la production de facteur NF-kB ou CREB, montrant une nouvelle fois l'interconnexion qui existe entre les différentes voies dérégulées par Tax (**figure 26**).

A l'exception de c-Flip, toutes les protéines anti apoptotiques stimulées par Tax bloquent la voie intrinsèque de l'apoptose. Cette voie, aussi appelée voie mitochondriale, est principalement activée par un stress cellulaire contrairement à la voie extrinsèque qui est activée par la liaison de ligands extracellulaires au niveau de récepteurs de mort (fas, CD95, DR4 ou DR5). Malgré le fait que Tax cible préférentiellement la voie intrinsèque, la voie extrinsèque n'est pas en reste et il a été montré que Tax ciblait particulièrement la protéine p53 (**figure 26**).

P53 est, en effet, la protéine majeure produite lors de la réponse extrinsèque suite à un stress cellulaire, comme des lésions de l'ADN ou une prolifération cellulaire non contrôlé par exemple. Ainsi, p53 a la capacité d'induire la transcription de nombreux gènes entraînant l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou l'entrée en apoptose si aucune réparation n'est possible. Au vu de ses fonctions, p53 est communément appelée « la protéine gardienne du génome » et elle est une cible essentielle pour Tax. Afin de

l'inactiver, Tax va recruter les facteurs CBP/p300 nécessaire à p53 pour pouvoir induire la transcription de gène cible (Ariumi et al., 2000). Tax a aussi la capacité d'induire la phosphorylation de p65 (RelA) favorisant ainsi sa liaison à p53. En effet, lorsqu'aucun signal de stress n'est détecté, p53 est liée à p65 phosphorylée au niveau de ses promoteurs cibles mais elle est inactive et n'entraîne pas de transcription. Tax, *via* sa capacité à activer la sous-unité catalytique IKK β du complexe IKK, va entraîner la phosphorylation de p65 favorisant sa liaison à p53 (Jeong et al., 2004). Dans tout les cas, Tax n'interagit pas directement avec p53 et ne l'empêche pas de se fixer au niveau de ses promoteurs cibles sur l'ADN.

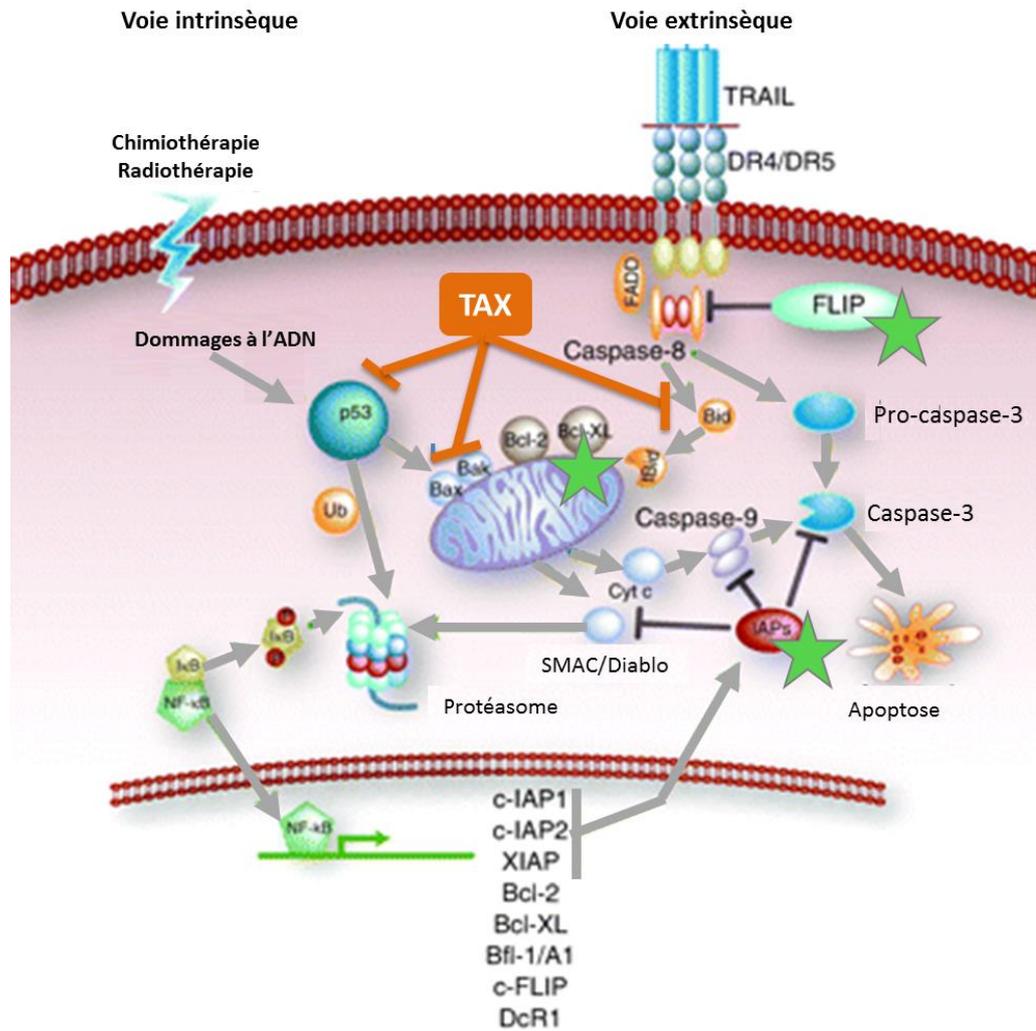


Figure 26 : Dérégulation des mécanismes d'apoptose par Tax.

Le schéma représente les voies intrinsèques (mitochondriales) ou bien extrinsèques de l'apoptose. La voie intrinsèque est activée en réponse à un stress cellulaire comme l'induction de dommage à l'ADN ou bien la détection d'anomalies au niveau du cycle et implique l'activation du facteur de transcription p53. La voie extrinsèque quand à elle est activée par des signaux de morts cellulaires (DR4/DR5, fas, . .). Tax agit sur les deux voies et plus spécifiquement sur la voie intrinsèque en stimulant la production des protéines anti apoptotique de la famille IAP, BCL-XL ou encore FLIP (représenté par une flèche orange). Ces molécules sont exprimées suite à une activation de la voie NF-kB, phénomène amplifié puisque Tax stimule et active de manière constitutive cette voie. De plus, Tax réprime l'expression des protéines pro-apoptotique comme Bax, Bim et Bid en réprimant le facteur de transcription p53 (représenté par une étoile verte). Adapté de (de Vries et al., 2006).

V-3-Induction d'altération génétique.

De nombreuses anomalies génétiques comme des délétions, des insertions, des mutations diverses ou bien des aberrations chromosomiques comme des aneuploïdies ou des translocations sont retrouvées dans les cellules ATL, conférant aux noyaux de ces cellules leur aspect caractéristique en forme de fleurs avec un nombre élevé de micronuclei (Itoyama et al., 1990; Matsuoka and Jeang, 2007). Ces aberrations contribuent fortement à l'initiation de la transformation lymphocytaire et elles sont médiée principalement par la protéine Tax.

Une des premières causes de cette accumulation d'anomalies génétiques est due à la capacité de Tax d'inhiber les différentes machineries de détection d'erreurs génomiques et de réparation de l'ADN (**figure 27**). Tax est, en effet, capable de réprimer la réparation de l'ADN par excision de nucléotides appelés NER (*Nucleotide Excision Repair*) (Kao and Marriott, 1999). Ce mécanisme de réparation permet de diminuer les lésions de l'ADN comme la formation de dimères de pyrimidines suite à une exposition aux UV pouvant bloquer ainsi l'ADN polymérase lors de la réplication. Pour induire l'inhibition du NER, il a été décrit que Tax ciblait directement la sous-unité catalytique PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) de l'ADN polymérase ainsi que la protéine p53 (Lemoine et al., 2000). Tax est aussi capable de bloquer un autre mécanisme de réparation de l'ADN appelé BER (*Base Excision Repair*) qui est impliqué dans la réparation de cassures simples brins de l'ADN ainsi que des sites abasiques entraînant un endommagement des bases (**figure 27**). Pour ce faire, Tax cible l'ADN polymérase β en réprimant son expression (Jeang et al., 1990). Le dernier mécanisme de réparation d'anomalie simple brin est appelé MMR (*Mismatch Repair*). Il intervient lors de la détection d'un mésappariement entre deux bases qui sont censées être complémentaires. Une dérégulation des enzymes impliquées dans l'exécution de ce mécanisme a été retrouvée dans les ATL. De plus, une diminution de la machinerie de réparation MMR a été montrée dans des cellules exprimant Tax (Morimoto et al., 2005; Nicot, 2015). En plus d'inhiber les machineries de réparation des mutations simple brin, Tax est aussi capable d'interférer avec les machineries permettant la réparation de cassures doubles brins. Ainsi les mécanismes de recombinaisons homologues (*RH*) et de religatures d'extrémités non homologues NHEJ (*Non Homologous Non Joining*) sont inhibés par Tax qui va recruter dans des foyers nucléaires les différentes enzymes et

protéines impliquées dans la réparation. Tax séquestre les facteurs MDC1 (*Mediator of DNA Damage Checkpoint 1*), BRCA-1 (*Breast Cancer 1*), DNA-PK (*DNA Dependent Protein Kinase*) et la protéine Ku80, empêchant la reconnaissance des cassures doubles brins (Belgnaoui et al., 2010; Ducu et al., 2011).

L'inhibition de ces enzymes de réparation ainsi que le fait que Tax inhibe l'entrée en apoptose des lymphocytes infectés conduisent à une accumulation d'anomalies génétiques, créant un environnement favorable à la transformation. L'accumulation de mutations génétiques est aussi accentuée par la protéine Tax elle-même, qui a la capacité d'induire la production de ROS (*Reactive Oxygen Species*) altérant directement l'ADN (Choi and Harhaj, 2014).

Enfin, l'aspect caractéristique des noyaux des cellules ATL en forme de fleurs est directement lié à l'apparition d'aberrations chromosomiques. Tax est responsable de ces malformations en agissant en divers points. Tout d'abord comme décrit précédemment, le blocage des machineries de réparation de l'ADN empêche la résolution des différentes mutations pouvant intervenir au sein du génome. L'apparition de cassure doubles brins entraîne l'apparition d'extrémité 3'OH libre de part et d'autre des cassures favorisant ainsi les remaniements chromosomiques au sein de micronuclei (Majone and Jeang, 2000). Le raccourcissement des télomères a aussi été décrit dans les ATL sous l'influence de Tax contribuant à la fusion de chromosomes entre eux. Ainsi Tax va collaborer avec la protéine TAL1 (T-cell Acute Lymphoblastic leukemia 1) pour réprimer la sous-unité catalytique de la télomerase hTERT (Terme et al., 2009; Zane et al., 2012). Enfin, il a été décrit que les cellules ATL présentaient une aneuploïdie c'est à dire un nombre aberrant de chromosomes (Afonso et al., 2007). Cela est, encore une fois, dû à la protéine Tax qui va agir lors de la mitose au niveau du fuseau mitotique à l'origine de la ségrégation chromosomique. Pour ce faire, Tax va entraîner une fragmentation des centrosomes à l'origine de la formation du fuseau mitotique en interagissant avec RanBP1 (Peloponese et al., 2005). Tax a aussi la capacité d'empêcher la duplication des centrosomes en interagissant avec la protéine TAX1BP2 créant ainsi une ségrégation unique. Enfin, Tax va se lier aux protéines HsMad1 et HsMad2 au niveau des centrosomes empêchant ainsi la détection d'une anomalie lors d'une ségrégation anormale durant la mitose (Jin et al., 1998).

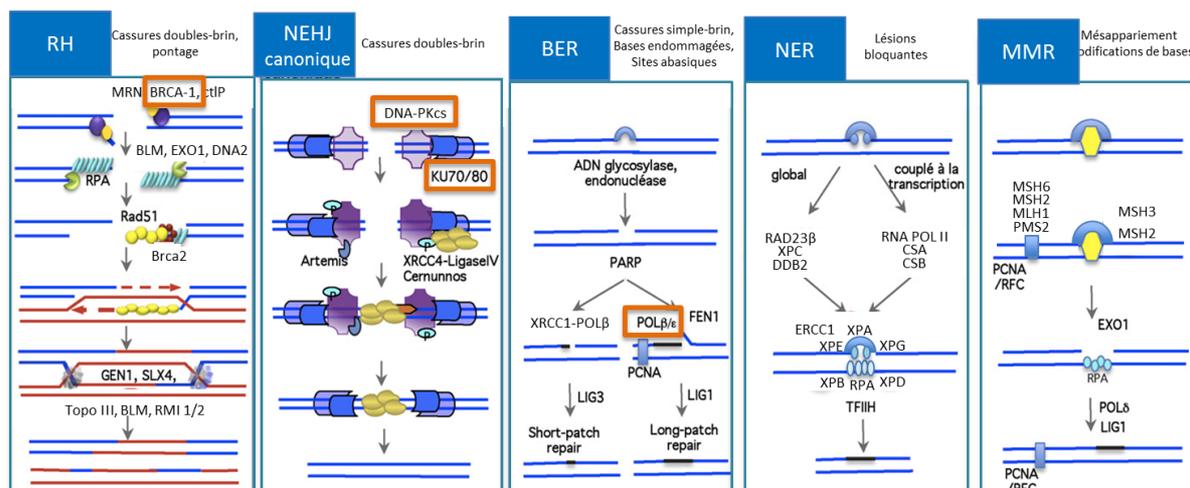


Figure 27 : Représentation des différentes voies de réparation de l'ADN et de leur modulation par Tax.

Les différentes voies de réparations associées à chaque type de dommage à l'ADN sont représentées ici de manière schématique. Tax module toutes ces voies en interagissant avec différents partenaires. Les protéines entourées en orange ci dessus sont cibles de la protéine Tax. Bien que la voie MMR soit dérégulé dans les ATL, aucune cible moléculaire ciblée par Tax n'a pour le moment été découverte. Adapté de (Rass et al., 2012)

V-4- Détournement de la machinerie de transcription.

Au vu des différentes caractéristiques précédemment décrites au cours de ce manuscrit, la production de la protéine Tax est cruciale pour l'établissement de la lymphomagenèse. Afin de pouvoir déréguler les différentes voies de signalisation cellulaire, Tax va devoir être produite en grande quantité par le virus. Pour ce faire, Tax a la capacité de stimuler la transcription de son propre promoteur en détournant la machinerie de transcription cellulaire (figure 28).

Comme décrit précédemment, afin d'initier la transcription des protéines virales, la transcription basale du LTR 5' est nécessaire. Elle dépend notamment du recrutement de facteurs de transcription de la famille AP-1 composée des dimères fos et jun incluant c-Jun, Jun-B, Jun-C, c-Fos, Fos-B, Fra-1 et Fra-2 (Fujii et al., 1995; Jeang et al., 1991). Une fois la protéine Tax exprimée, elle va alors avoir la capacité de transcrire de manière importante le LTR 5' du virus.

Tout d'abord Tax va interagir avec l'histone déacetylase HDAC-1 ainsi qu'avec des méthyltransferase (HMT) ou des déméthyltransferase (HDM) afin de provoquer une décondensation de la chromatine favorable à un recrutement de différents complexes de la machinerie transcriptionnelle, levant ainsi la répression des promoteurs viraux (Boxus et al., 2008; Lu et al., 2004) (figure 28). Après cette étape, Tax ne pouvant se lier seule

directement à l'ADN va recruter les facteurs de transcriptions cellulaires de la famille CREB/ATF en se liant au niveau de leurs domaines b-ZIP, permettant leurs fixations au niveau des éléments TRE (Tax Response element) présents au niveau de la région U3 du LTR (Kim et al., 2010; Zhao and Giam, 1992). Cette région contient trois séquences de 21pb nommées vCRE (*viral cAMP Responsive Element*) composées d'un motif octamérique [TGACG(T/A)(C/G)(T/A) flanqué en 5' d'une région riche en G et en 3' d'une région riche en C.

Les facteurs CREB/ATF peuvent se lier au niveau de ces séquences car elles présentent un motif très similaire à l'élément de réponse à l'AMP cyclique ou CRE (cAMP response element) de séquence [TGACGTCA]. La dimérisation de Tax est nécessaire au recrutement et à la dimérisation des facteurs CREB/ATF (CREB 1 et CREB 2) sur le promoteur viral (Jin and Jeang, 1997; Tie et al., 1996). Le complexe ternaire ainsi formé est stabilisé par une interaction avec le petit sillon de l'ADN au niveau des régions riches en G et en C de chaque côté des éléments TRE (Lundblad et al., 1998). Suite à la formation du complexe avec CREB, Tax va recruter les co-activateurs CBP/p300 permettant la formation d'un complexe quaternaire (Harrod et al., 2000). Différentes études récentes ont pu montrer que la stabilisation du complexe quaternaire était fortement dépendante de la phosphorylation de CREB sur le sérine 133 (Geiger et al., 2008). De plus, il a été montré que le niveau de CREB phosphorylé dans des lignées infectées par HTLV-1 était supérieur à des lignées non infectées et que l'expression de Tax dans des cellules 293T augmente la phosphorylation de CREB (Kim et al., 2007; Trevisan et al., 2004). Tous ces résultats vont dans le sens d'un rôle clé de la phosphorylation de CREB dans la formation du complexe et dans l'activation de la transcription du LTR 5'.

De plus, d'autres co-activateurs correspondant aux protéines TORC1, 2 et 3 ont récemment été décrits comme recrutés par Tax et comme permettant une transactivation optimale du promoteur viral (Koga et al., 2004; Siu et al., 2006) (**figure 28**).

Finalement à ce complexe multi protéique s'ajoute aussi PCAF (CBP/p300 associated factor) qui va permettre, avec les autres partenaires du complexe, une acétylation des histones. Ceci va entraîner une décondensation de la chromatine et le recrutement de la machinerie de transcription cellulaire notamment le facteur de transcription TFIID et

l'ARN polymérase II sur le promoteur viral (Lu et al., 2002). Pour faciliter l'accès du complexe au niveau de la chromatine, le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (Switch/Sucrose Non Fermentable) est également recruté par la protéine Tax (Easley et al., 2010) (**figure 28**).

Toujours pour favoriser et optimiser la transcription du LTR 5', Tax va interagir directement avec TAFII28 (*TBP-Associated Factor II 28*) et TBP (*TATA Binding Protein*), les deux sous-unités catalytiques de TFIID, ainsi qu'avec le complexe TF(II)A favorisant le recrutement des facteurs de transcriptions généraux sur le promoteur et sur la séquence cis-régulatrice TATA (Caron et al., 1997). Enfin, une fois le complexe de transcription fixé sur le promoteur, Tax va aussi promouvoir l'élongation de la transcription. Pour ce faire, Tax va recruter la kinase dépendante des cyclines CDK9 et la cycline T1 qui correspondent aux deux sous-unités du complexe P-TEFb (*Positive Transcription Elongation Factor b*) favorisant son recrutement sur le promoteur viral (Zhou et al., 2006). Tax va aussi phosphoryler l'ARN polymérase II au niveau de la sérine 2 de son domaine C-Terminal, lui permettant ainsi de réaliser l'élongation.

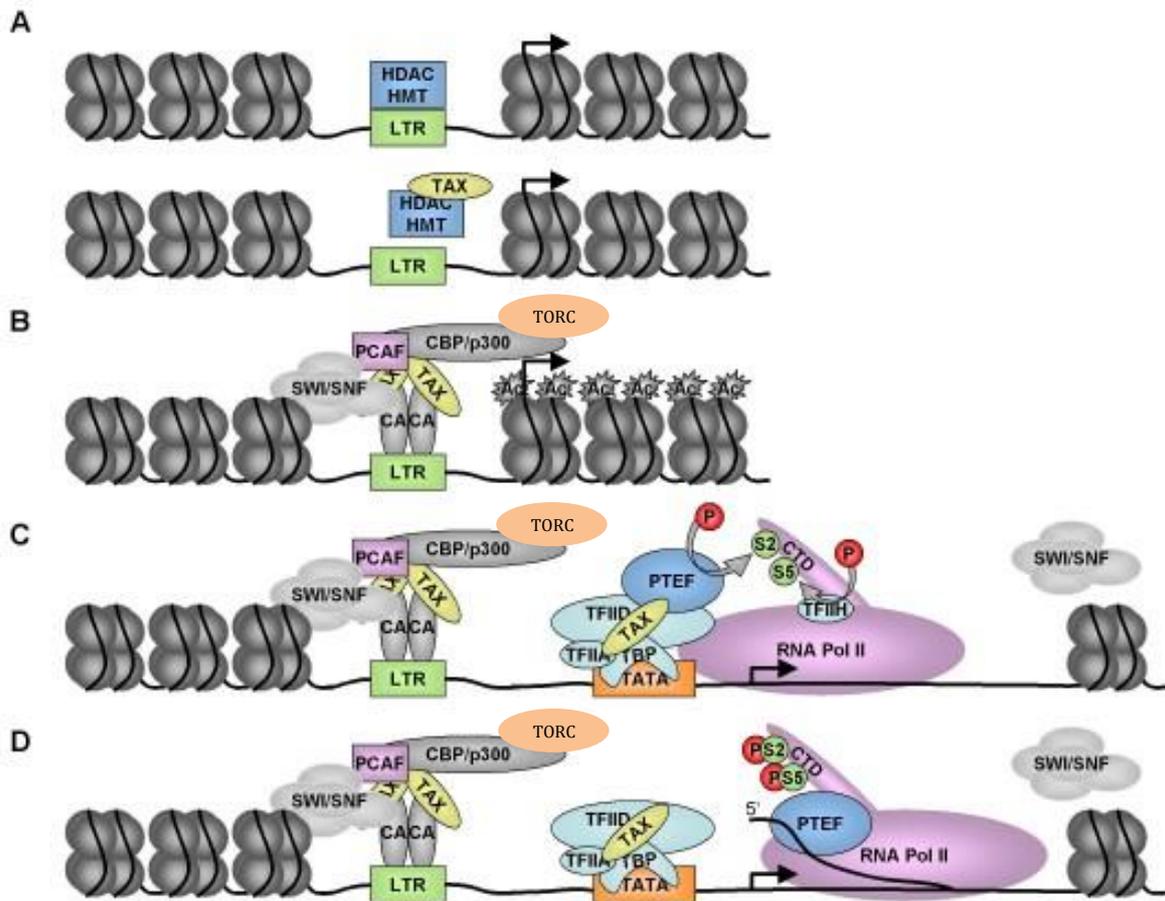


Figure 28 : Model actuel d'activation du LTR 5' du virus HTLV-1 induite par Tax.

Représentation schématique du modèle actuel d'activation du LTR 5' du virus HTLV-1 dépendant de Tax. **A.** Afin de permettre le recrutement des différents facteurs permettant la transcription virale, Tax interagit avec l'histone déacetylase HDAC-1 ainsi qu'avec différentes histones méthyltransferase (HMT) afin de moduler la compaction de la chromatine. **B.** Tax recrute différents facteurs de transcriptions afin de former un complexe composé de dimère de CREB phosphorylés (CA, CREB/ATF), des enzymes de modifications des histones (CBP/p300, PCAF), des enzymes SWI/SNF impliquées dans le remodelage de la chromatine et les cofacteurs TORC afin de stabiliser le complexe. Ce complexe se fixe via CREB au niveau d'élément vCRE (*viral AMPc elements*) situées dans une région de 21pb appelée TRE (*Tax Responsive Element*). **C.** Tax favorise la fixation des facteurs de transcriptions TFIIA et TFIID au niveau de la boîte TATA du LTR induisant le recrutement de l'ARN pol II. **D.** Tax recrute le facteur P-TEFb qui va permettre la phosphorylation du domaine C-Terminal de l'ARN pol II permettant le début de l'élongation et de la transcription. Le complexe SWI/SNF prévient l'arrêt de l'élongation en amont de la polymérase. Adapté de (Boxus et al., 2008)

En plus de pouvoir stimuler sa propre transcription, la protéine Tax, en se liant avec diverses protéines de la machinerie de transcription, va pouvoir déréguler l'expression de nombreux gènes cellulaires. Tax a, en effet, la capacité d'induire l'expression du promoteur de l'IL-17 ou bien de c-Fos en recrutant les facteurs CREB/ATF ainsi que de stimuler les LTR de virus endogènes comme HERV-W8 ou HERV-H (Alexandre and Verrier, 1991; Dodon et al., 2004). En fonction du site d'intégration de ces virus, la stimulation de ces LTR pourrait contribuer à une prédisposition chez des personnes infectées à développer des maladies (Toufaily et al., 2011). Le recrutement des facteurs

CREB/ATF peut également entraîner un effet répresseur sur certains types de promoteur comme ceux des gènes codant pour la cycline A et D3 ou pour l'ADN polymérase α (Kibler and Jeang, 2001). Cette répression serait due à une compétition exercée par Tax qui recruterait tous les co-activateurs au niveau de gène fortement transcrits par celui-ci.

Enfin, comme décrit précédemment, Tax peut interagir avec de nombreux facteurs de transcription comme ceux de la voie AP-1, SRF ou NF- κ B lui permettant de réguler l'expression de centaines de gènes cellulaires. Tax est donc une véritable protéine chef d'orchestre qui, avec ses fonctions pléiotropes, va pouvoir agir à tous les niveaux en interagissant avec toutes les voies de signalisation pour pouvoir induire non seulement l'immortalisation mais également un environnement favorable à la transformation lymphocytaire.

V-5-Un autre acteur responsable de la transformation : la protéine HBZ.

Bien que le sujet de cette thèse soit essentiellement basé sur la protéine Tax, il était cependant nécessaire à mon sens de faire un bref aparté sur les effets de HBZ. Comme dit précédemment dans l'introduction, plusieurs éléments comme le fait qu'HBZ entraîne l'apparition de dermatites et de lymphomes chez des lapins ainsi que chez des souris transgéniques ou bien le fait que dans la grande majorité des cas seul HBZ est exprimée dans les cellules de patients ATL suggèrent un rôle extrêmement important de l'expression d'HBZ dans l'oncogenèse virale (Zhao and Matsuoka, 2012).

Un des rôles communément admis par la communauté scientifique à propos d'HBZ est celui de contrebalancer l'activation excessive de la protéine Tax et de diminuer ses effets hyper activateurs afin de favoriser la latence virale et l'échappement d'un clone transformé au système immunitaire. En effet, il a été démontré que la protéine HBZ est faiblement immunogène par rapport à la protéine Tax (Shiohama et al., 2016). Afin de réguler l'expression de la protéine Tax, il a tout d'abord été démontré que HBZ avait la capacité de diminuer la transcription du LTR 5' (Gaudray et al., 2002) (**figure 29**). Comme son nom l'indique, la protéine HBZ contient en C Terminale un domaine bZip qui va interagir avec la plupart des facteurs de transcription contenant un domaine bZIP comme les facteurs ATF-1, CREB1/2, c-Jun, Jun-B et Jun-D empêchant alors le recrutement de ces facteurs par Tax au niveau du promoteur (Lemasson et al., 2007). De plus, *via* son domaine N-Terminal, HBZ va interagir avec le co-activateur CBP/p300 en

se liant à son domaine KIX, empêchant ainsi la formation du complexe quaternaire formé par Tax au niveau des éléments vCRE situées au niveau du TRE (Clerc et al., 2008). Le recrutement de ces différents acteurs n'empêche en rien la transcription du LTR 3' qui est sensiblement différente de l'activation du 5'. En effet la transcription au niveau du LTR 3' est fortement dépendante de facteur sp1 (Yoshida et al., 2008). La transcription est donc constitutionnellement active dans la cellule. De plus, il est intéressant de noter que Tax pourrait, en interagissant une nouvelle fois avec CREB, se fixer au éléments de réponses vCRE présent aussi au niveau du LTR 3' pour favoriser la transcription de HBZ (Landry et al., 2009).

En plus de réprimer la transcription du LTR5', HBZ a aussi la capacité de moduler les différentes voies de signalisation activées par Tax (**figure 29**). En effet, il a été démontré que HBZ avait la capacité de réprimer l'activation de la voie canonique de la voie NF-kB en empêchant d'une part la liaison de p65 au niveau de ces éléments de réponses sur l'ADN et d'autre part en favorisant la dégradation de p65 via PDML2, une E3 ligase ciblant p65 et entraînant sa dégradation *via* le protéasome (Yan et al., 2009; Zhao et al., 2009b). Il est intéressant de noter qu'en présence d'une forte quantité de Tax au début de l'infection, HBZ seule ne suffit pas à réprimer la voie canonique. Cependant, HBZ pourrait avoir un rôle majeur lors de l'échappement d'un clone leucémique n'exprimant plus Tax en maintenant l'activation de la voie non canonique, favorisant ainsi la persistance du clone transformé. De plus, la forte expression de Tax entraîne la senescence cellulaire due en particulier à l'hyperactivation de la voie NF-kB. Il a été montré que HBZ est capable de moduler ou bien de lever cette senescence en réprimant l'activation de la voie (Philip et al., 2014). La balance entre Tax et HBZ est donc un point crucial dans l'établissement et la persistance du clone leucémique. Une autre étude du même groupe met en avant cette fois ci le rôle d'HBZ dans la persistance viral. En effet, il est montré qu'HBZ est capable d'induire la latence virale en inhibant la protéine Rex et en diminuant l'activation de la voie NF-kB par Tax (Zhi et al., 2011). HBZ affecte aussi la voie AP-1 qui est fortement dérégulée par Tax comme vu précédemment. HBZ interagit avec les facteurs c-Jun et Jun-B et empêchent leur fixation au niveau de l'ADN (**figure 29**). HBZ a aussi la capacité d'induire la dégradation de c-Jun ou de le séquestrer dans des corps nucléaires empêchant, dans tous les cas, qu'il puisse exercer son activité (Basbous et al., 2003; Isono et al., 2008; Matsumoto et al., 2005).

De manière intéressante, nous pouvons encore une fois mettre en avant le double rôle d'HBZ. En effet, en interagissant avec les facteurs de transcriptions AP-1, HBZ réprime l'activation médiée par Tax mais HBZ est aussi capable d'interagir avec ces facteurs pour induire la prolifération lymphocytaire. En effet, HBZ favorise la transcription de Jun-D et forme des dimères avec lui pour stimuler l'expression du gène hTERT, une sous-unité catalytique de la télomérase humaine fortement impliquée dans l'immortalisation et la transformation lymphocytaire (Thébault et al., 2004). De manière intéressante, le recrutement de Jun-D est aussi décrit pour favoriser la transcription du LTR 3' du virus. HBZ contribue, tout comme Tax, à la création d'instabilité génomique en stimulant la transcription de miRNA comme les miR17 et miR21 (Vernin et al., 2014). Enfin, HBZ est aussi impliqué dans l'inhibition de l'apoptose en interagissant avec le facteur de transcription Foxo3a entraînant alors une répression des facteurs pro apoptotiques Bim et fasL (Tanaka-Nakanishi et al., 2014).

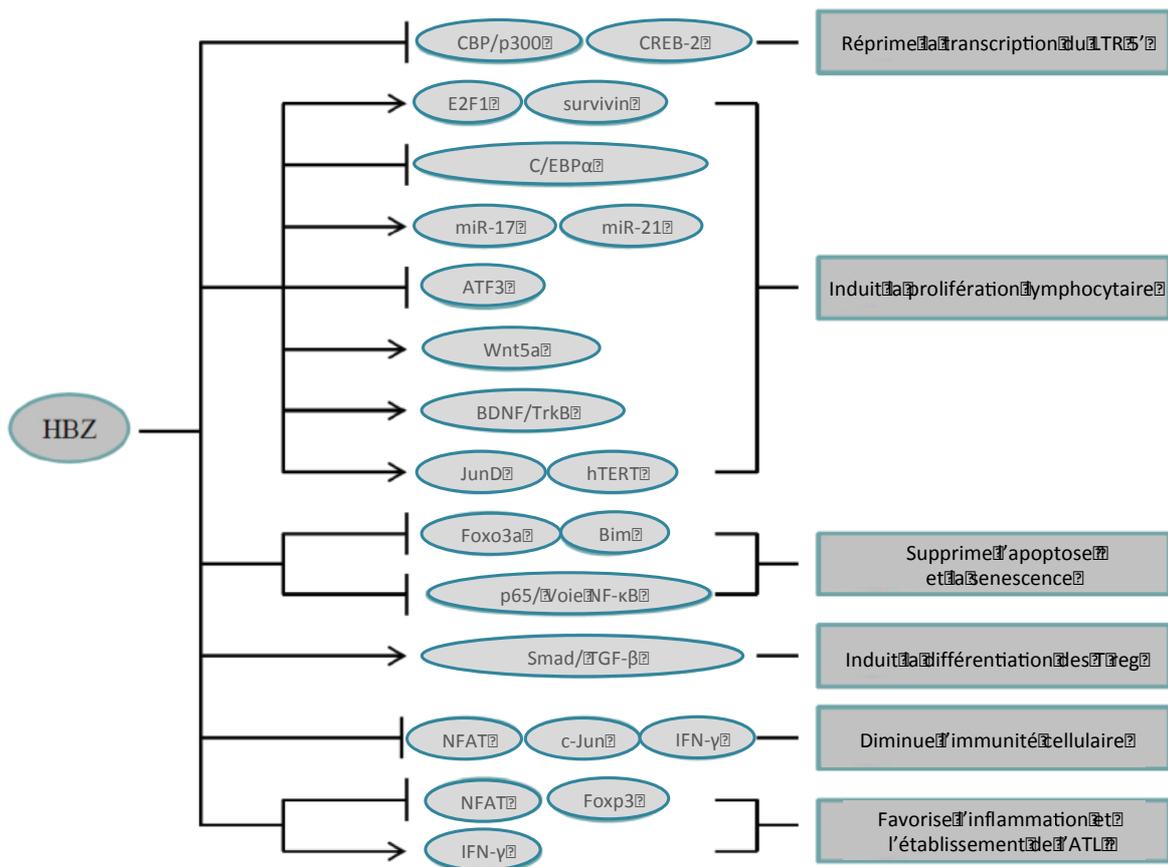


Figure 29 : Les multiples fonctions de HBZ.

Schéma bilan représentant les différentes fonctions de HBZ conduisant à la transformation lymphocytaire et à l'établissement de l'ATL. Adapté de (Zhao, 2016)

HBZ est donc une protéine majeure impliquée dans le développement de la phase leucémique. La balance d'expression Tax/HBZ est considérée comme l'évènement clé gouvernant la transition immortalisation (impliquant majoritairement Tax) et la transformation (impliquant majoritairement HBZ). Elle permet de réguler l'expression de Tax et de contrebalancer ces effets délétères dus à l'activation excessive des voies de signalisation cellulaires. HBZ joue aussi un rôle majeur lors de la sélection d'un clone leucémique en lui permettant d'échapper au système immunitaire, d'induire la persistance virale et d'empêcher les mécanismes d'apoptose favorisant ainsi l'expansion clonale. L'établissement de la leucémie n'est donc pas la résultante de la seule expression de Tax mais de l'action successive de Tax puis HBZ.

Au sein du laboratoire, nous nous intéressons particulièrement à la protéine Tax et à ses effets contribuant à l'immortalisation et favorisant la transformation lymphocytaire. Comme décrit précédemment, Tax a la capacité d'induire de nombreuses voies de signalisation en interagissant avec de multiples partenaires. Cette capacité de Tax à interagir et à détourner l'activité d'enzymes ou de facteurs de transcription est cruciale pour déréguler les mécanismes conduisant à l'immortalisation mais cela est aussi extrêmement important pour que Tax puisse transactiver le LTR 5' et stimuler sa propre expression. La transcription du LTR 5' médiée par Tax est la résultante du recrutement de nombreuses protéines formant un complexe de transactivation dont une des étapes clés est le recrutement et la fixation de dimère de CREB au niveau d'éléments de réponses vCRE (Viral c-AMPcyclique Element) situés au niveau des TRE. La stabilité du complexe et la formation de celui-ci est notamment dépendante de l'état de phosphorylation des dimères de CREB. La phosphorylation de CREB est cruciale. Elle est augmentée dans les lignées transformées par HTLV-1 et Tax induit directement cette phosphorylation.

De manière intéressante, CREB est aussi décrite dans la littérature comme étant régulé par différentes modifications post traductionnelles comme l'acétylation mais aussi par une autre modification dérégulée dans de nombreux cancer : l'O-GlcNAcylation. La partie suivante présente donc les connaissances concernant le processus de O-GlcNAcylation.

VI- La O-GlcNAcylation : une modification post traductionnelle cruciale.

VI-1- Généralités :

La O-N-acetylglucosaminylation ou O-GlcNAcylation est une modification dynamique et réversible décrite pour la première fois en 1984 par G.W Hart et Torres (Torres and Hart, 1984). Elle consiste en l'ajout d'un résidu monosaccharidique N-acetylglucosamine sur une thréonine ou une sérine de protéines cibles (Fardini et al., 2013). Aucun site consensus n'a, à ce jour, été décrit cependant il est admis que la modification cible préférentiellement les séquences peptidiques riches en sérines et thréonines avec une proline en position -2 et -3 et sur des motifs de type PV-PV-V-gS/T-S /T ou encore P-X-gT-X-A (Alfaro et al., 2012; Trinidad et al., 2012; Wang et al., 2010a).

Cette modification affecte les protéines cytosoliques, nucléaires ou mitochondriales. Elle est extrêmement conservée au cours de l'évolution et on la retrouve chez de nombreux organismes comme les virus (CMV, *CytoMegalovirus*), les bactéries (*Listeria Monocitigenes*), les parasites (*Toxoplasma Gondii*), les nématodes, les insectes et les mammifères reflétant son caractère fondamental (Greis et al., 1994; Hanover et al., 2005; Perez-Cervera et al., 2011; Schirm et al., 2004; Torres and Hart, 1984).

La O-GlcNAcylation régule de nombreux processus fondamentaux dans la cellule en ciblant un très grand nombre de protéines comme des facteurs de transcription (CREB, c-Fos, sp1, Jun), des enzymes phosphatases/kinases (Akt, GSK3), des composants du cytosquelette (vimentine, vinculine, Tau), les effecteurs de la voie NF-kB (RelA, IKK, TAK1), des protéines du cycle cellulaire (p21,p17), du pore nucléaire (NUP 180, NUP153) ou bien des acteurs majeurs de la traduction comme l'ARN polymérase II (Hart, 2014). Les protéines impliquées dans les mécanismes épigénétiques comme les histones ainsi que des enzymes ciblant la méthylation de l'ADN (enzymes TET) sont aussi cibles de cette modification (Sakabe et al., 2010; Zhang et al., 2014). A ce jour, plus de 1 000 protéines ont été référencées sur la data base dbOGAP (<https://wangj27.u.hpc.mssm.edu/hulab/OGAP.html>) et ce nombre ne fait que croître.

La O-GlcNAcylation est gouvernée uniquement par un couple d'enzymes formant le complexe nommé OGlcNAzyme (Whisenhunt, 2006). Ces deux enzymes sont l'OGT (*O-linked-N-acetylglucosaminyltransferase*) qui transfère, à partir de son substrat UDP-

GlcNAc, un résidu GlcNAc sur les protéines cibles et l'OGA (*O-GlcNAc Hydrolase*) qui est capable d'hydrolyser et de retirer ce résidu (Hart, 2014).

VI-2- L'OGT (O-linked-N-acetylglucosaminyltransferase).

VI-2-1-Découverte et structure.

L'OGT fut découverte et caractérisée en 1990 par l'équipe d'Hart à partir d'extrait de réticulocytes de lapin, puis chez le rat deux ans plus tard à partir d'extraits de foie (Haltiwanger et al., 1990, 1992). Par la suite le clonage de l'OGT dans différentes espèces a permis de mettre en avant la forte conservation de sa séquence au cours de l'évolution. En effet, l'OGT humaine comprend 99% d'homologie avec la séquence nucléotidique de l'OGT de rat et 61% d'homologie sont retrouvés entre l'OGT de rat et celle de *Caenorhabditis elegans* (Kreppel et al., 1997; Lubas et al., 1997). La haute conservation de l'enzyme au cours de l'évolution peut s'expliquer du fait de son rôle primordial au cours du développement chez les mammifères. En effet, l'inactivation du gène *OGT* est létale dès le 4^{ème} jour de développement embryonnaire chez la souris. De plus, l'inactivation de l'OGT conduit à des perturbations au niveau de la fonction cellulaire en induisant l'entrée en apoptose des lymphocytes T ou bien l'arrêt de la croissance des fibroblastes associé à une altération de l'expression des gènes codant pour c-myc, sp1 ou bien l'inhibiteur de la cycline kinase p27 (O'Donnell et al., 2004; Shafi et al., 2000).

Le caractère fondamental de l'OGT est renforcé du fait qu'elle est codée par un seul gène que l'on retrouve chez l'Homme sur le chromosome X au niveau de région Xq13.1, région au niveau du centrosome caractérisée comme étant fragile et associée à des maladies neurologiques comme la maladie de Parkinson (Shafi et al., 2000).

Chez l'Homme, trois formes d'OGT, résultant de différents épissages, ont été décrites présentant un domaine C-Terminal identique mais avec des variations dans la partie N-Terminale, leur conférant ainsi une localisation différente (Hanover et al., 2003) (**figure 30**).

On retrouve ainsi une première forme de 110 kDa qui est la forme la plus abondamment présente au sein de la cellule avec une localisation aussi bien nucléaire que cytoplasmique. Cette forme appelée ncOGT (*Nuclear and Cytoplasmic OGT*) est présente de manière ubiquitaire mais montre cependant des niveaux d'expression variables en fonction du type cellulaire. En effet, elle est très abondante dans le cerveau ainsi que dans les cellules pancréatiques (Hanover et al., 1999; Slawson and Hart, 2011). La

deuxième forme appelée sOGT (*short OGT*) est, comme son nom l'indique, la forme la plus courte d'une taille de 78kDa. Sa répartition est identique à celle de la forme longue. Enfin, une troisième forme, dite intermédiaire, de 103 kDa appelée mOGT (*mitochondrial OGT*) à la particularité de contenir au niveau de sa partie N-Terminale une séquence MTS (*Mitochondria Targetting Sequence*) lui conférant un adressage au niveau de la membrane interne mitochondriale (Love et al., 2003).

D'un point de vue général, la structure protéique de l'OGT peut être divisée en trois parties distinctes (**figure 30**). Dans la région N terminale on retrouve plusieurs répétitions de domaines TPR (*Tetratricopeptide repeat*) dont le nombre varie en fonction des différentes formes de l'OGT. Ainsi la forme longue possède 12 répétitions alors que la forme mitochondriale et la forme courte en possèdent 9 et 3 respectivement **figure 30**. Ces domaines sont impliqués dans les interactions protéines-protéines et permettent la liaison de l'OGT à ses différents substrats. En effet, si la délétion de ses régions n'entraîne pas d'inhibition de l'activité de l'enzyme, elle entraîne une modulation de la reconnaissance de ses substrats. Le nombre variable de régions TPR des différentes isoformes de l'OGT peut donc expliquer la spécificité de chacune de ces formes pour leurs substrats. Les domaines TPR sont aussi impliqués dans la multimérisation de l'OGT, celle-ci pouvant se réaliser entre les différentes isoformes (Iyer and Hart, 2003).

Les régions N- terminale et C- terminale sont séparées par une région très peu conservée en termes de longueur et de séquence d'acides aminés. Cette région appelée « linker » a été décrite chez l'Homme et chez *C.Elegans* comme contenant une séquence NLS d'adressage nucléaire (Lubas et al., 1997).

Enfin, la région C-Terminale est commune aux différentes isoformes de l'OGT et elle est décrite comme contenant la région catalytique de l'enzyme. En effet, la délétion de la partie C-terminale jusqu'au domaine linker entraîne une perte de l'activité enzymatique de l'OGT (Lubas and Hanover, 2000). Ce domaine est constitué de deux régions homologues appelées CD I et CD II pour *Conserved Domain I et II*. Le domaine CD I pourrait contenir les sites de liaison à la partie UDP de l'UDP-GlcNAc tandis que le motif CD II contient un motif « Lectin Like » (Roos and Hanover, 2000) (**figure 30**).



Figure 30 : Structure des trois isoformes de l'OGT et de leurs différents domaines.

Trois isoformes ont été décrites à ce jour : une forme longue appelée ncOGT, une forme mitochondriale appelée mOGT et une forme courte sOGT. Les trois formes ont un commun un domaine C Terminale contenant les domaines catalytiques CD I et CD II ainsi qu'un domaine de liaison au phosphoinositide PPO. Dans la partie N Terminale, on retrouve la présence des domaines TPR impliqués dans les interactions protéine-protéine dont le nombre varie en fonction des isoformes. La forme mOGT contient un domaine MTS (Mitochondria Targetting Sequence) permettant sa localisation mitochondriale. Adapté de (Ruan et al., 2013).

VI-2-2- Modifications post traductionnelles de l'OGT.

L'OGT est ciblée par de nombreuses modifications post traductionnelles dont le rôle est aujourd'hui encore discuté au sein de la communauté scientifique.

L'OGT est tout d'abord ciblée par la phosphorylation. En effet plusieurs sites de phosphorylation ont été décrits au niveau des domaines TPR sur les sérines 3, 4, 10, 11, 15 et 20 ainsi que sur la thréonine 325 (Olsen et al., 2010). Un autre site de phosphorylation a été décrit dans la région C- Terminale au niveau de la tyrosine 989. Plusieurs kinases ont été impliquées dans la phosphorylation de l'OGT comme CAMK IV (*Calcium/Calmodulin-dependent Kinase IV*), CAMK II ou PKA (*protein kinase A*) (Song et al., 2008). La phosphorylation de l'OGT permettrait une activation de l'enzyme et lui conférerait une spécificité de substrat en fonction du site phosphorylé (Whelan et al., 2008).

L'OGT est aussi cible de O-GlcNAcylation, suggérant une boucle de rétrocontrôle. Plusieurs sites d'O-GlcNAcylation ont été décrits au niveau des domaines TPR ou dans la partie catalytique (Khidekel et al., 2007; Tai et al., 2004). Cependant, le rôle précis de la O-GlcNAcylation de l'OGT reste encore à élucider.

Enfin, l'OGT est aussi cible de S-Nitrosylation. Suite à une stimulation de macrophages par du LPS, l'OGT est dénitrosylée, entraînant une augmentation de son activité (Ryu and Do, 2011). La nitrosylation agit donc comme régulateur négatif de l'OGT.

VI-2-3- Inhibiteurs pharmacologiques de l'OGT.

La découverte d'inhibiteurs fut tardive, c'est pourquoi des inhibiteurs de la GFAT (*Glutamine Fructose-6-phosphate Amido Transferase*), enzyme de la voie des hexosamines que nous décrirons par la suite, furent initialement utilisés pour réduire artificiellement le niveau d'O-GlcNAcylation. L'alloxane, un analogue structural de l'uracile, fut découvert le premier (Konrad et al., 2002). Cependant de nombreux effets délétères dus à l'accumulation de ROS (*Reactive Oxygen Species*) au sein de la cellule ont été observés pouvant biaiser les résultats quant au rôle propre de l'inhibition de l'enzyme (Marin et al., 2011). Récemment, suite à de nombreux cribles à haut débit, différents inhibiteurs ont été décrits dont l'UDP-5SGlcNAc qui se révèle être un excellent inhibiteur ciblant la voie de sauvetage de production d'UDP-GlcNAc (Trapannone et al., 2016).

VI-3- L'OGA (N-Acetyl-β-D glucosaminidase ou OGlcNAcase).

VI-3-1-Découverte et structure.

L'OGA fut découverte en 1994 à partir d'extraits cytosoliques de rate puis par la suite à partir d'extraits de cerveau de bovins (Dong and Hart, 1994). Elle fut initialement décrite comme l'héxosaminidase C au vu de sa structure proche des héxosaminidases lysosomales de type A et B. Cependant, à la différence des autres héxosaminidases lysosomales, l'OGA est soluble, sa localisation est principalement cytoplasmique et son activité enzymatique optimale s'effectue à un pH neutre (5,5 à 7) (Braidman et al., 1974). Tout comme pour l'OGT, la séquence de l'OGA est très conservée au cours de l'évolution et des expériences d'inactivation du gène ont montré un rôle crucial de l'enzyme dans le développement embryonnaire entraînant une mort néonatale chez la souris (Yang et al., 2012). En 2001, Gao et ses collègues ont cloné et séquencé le gène codant pour l'OGA à partir d'extrait de cerveau humain révélant une homologie de séquence avec le gène MGEA5 (*Meningioma-Expressed Antigen 5*) (Gao et al., 2001). La protéine MGEA5 est une hyaluronidase impliquée dans une réponse auto-immune chez des patients atteints de méningiome (Heckel et al., 1998).

Chez l'Homme, le gène *OGA* se situe sur le chromosome 10 en position 10q24, locus impliqué dans les prédispositions à la maladie d'Alzheimer et au diabète de type 2 chez certaines populations mexicano-américaines (Lehman et al., 2005; Myers et al., 2000).

Deux transcrits issus d'un épissage alternatif ont été décrit conduisant à la production de deux formes de l'OGA différant dans leurs parties C-Terminales (Comtesse et al., 2001) (**figure 31**). Ainsi on trouve une première forme de 130 kDa très majoritairement exprimée dans le cytoplasme appelée NCOAT (*Nuclear and Cytoplasmic OGlcNAc Transferase and Acetyltrasnferase*) ou fOGA (*Full-lenght OGA*) et une forme plus courte amputée de son domaine HAT (*Histone Acetyl transferase*), dont la localisation serait préférentiellement nucléaire (Macauley and Vocadlo, 2009).

L'OGA peut donc être divisée en fonction de la forme produite en deux parties : un domaine N-Terminal contenant l'activité héxosaminidase et un domaine C-Terminal associé à une activité acétyltransferase (**figure 31**). Cependant, il est à noter que l'activité acétyltransferase est encore discutée car elle n'a pour le moment pas été décrite *in vivo* (Toleman et al., 2004). Les parties N-Terminale et C-Terminale sont séparées par une région de liaison présentant un site de clivage par la caspase 3 n'altérant pas l'activité catalytique de l'enzyme (Butkinaree et al., 2008). De manière intéressante, cette région de liaison a été décrite comme étant le lieu d'interaction avec les six premiers domaines TPR de l'OGT, permettant ainsi la formation du complexe OGlcNAzyme (Whisenhunt, 2006) (**figure 31**). Enfin, contrairement à l'OGT, les différentes formes de l'OGA ne semble pas se multimériser.

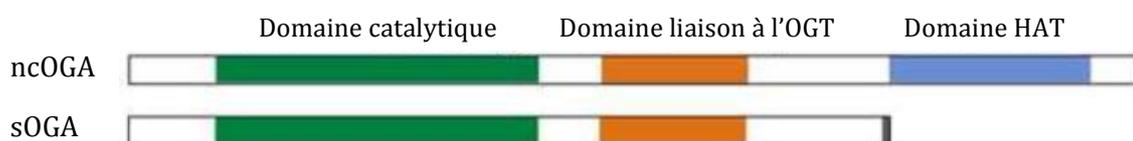


Figure 31 : Structure des deux isoformes de l'OGA et leurs différents domaines.

Deux isoformes de l'OGA ont été décrites à ce jour : une forme longue appelée ncOGA et une forme courte sOGA amputée du domaine HAT (Histone Acetyl Transferase). Les deux isoformes ont en commun un domaine de liaison pour l'OGT et le domaine catalytique associé à l'activité hydrolase de l'enzyme dans la partie N Terminale. Adapté de (Ruan et al., 2013).

VI-3-2-Modifications post-traductionnelles de l'OGA.

Les études et, par conséquent, les fonctions connues des modifications post-traductionnelles de l'OGA sont beaucoup moins nombreuses que pour l'OGT. Cependant, tout comme l'OGT, l'OGA est aussi cible de phosphorylation. Plusieurs sites ont été décrits aussi bien chez le rat que chez l'Homme comme les sérines 364, 859, 867 et 873

(Olsen et al., 2010). Un site consensus pour la caséine kinase II a été décrit au niveau de la sérine 364 (Rigbolt et al., 2011). Les sites de phosphorylation sont repartis tout au long des différents domaines de l'OGA et aucune fonction particulière n'a été décrite à ce jour. L'OGA est aussi cible de O-GlcNAcylation sur la sérine 405, modification dont le rôle n'a pas été élucidé (Khidekel et al., 2007).

VI-3-3-Inhibiteurs de l'OGA.

De nombreux inhibiteurs de l'OGA ont été découverts et décrits. Le PUGNAc fut le plus utilisé, cependant sa spécificité pour l'OGA fut remise en cause puisque l'inhibiteur cible également les héxosaminidases A et B (Haltiwanger et al., 1998; Kim et al., 2006a). La Streptozotocine (STZ) fut aussi utilisée, cependant cette drogue est particulièrement toxique pour les cellules eucaryotes (Pathak et al., 2008). Plus récemment des inhibiteurs comme le ThiametG ou le NButGT ont été évalués, qui ont la particularité d'être stables et spécifiques (Maccauley et al., 2010; Yuzwa et al., 2008).

VI-4-La voie de biosynthèse des héxosamines.

Afin de réaliser son activité catalytique, l'OGT a besoin d'uridine 5-diphospho N-acétylglucosamine ou UDP-GlcNAc comme substrat. Pour ce faire, l'UDP-GlcNAc est produit à partir du glucose suite à une cascade de réactions enzymatiques regroupées dans la voie de biosynthèse des héxosamines (*HBP, Hexosamine Biosynthetic Pathway*) (**figure 32**). Ainsi, une fois entré dans la cellule *via* des transporteurs du glucose GLUT, le glucose va être phosphorylé immédiatement par une hexokinase afin de former du glucose-6-phosphate. Ce dernier entre dans trois voies métaboliques :

- la voie des pentoses phosphates,
- la formation de glycogène,
- après épimérisation par la glucose-6-phosphate isomerase, fournir du fructose-6-phosphate à la cellule qui sera orienté, dans sa grande majorité, dans la glycolyse, source d'énergie principale de la cellule.

Le reste du fructose-6-phosphate, correspondant à environ 2 à 5% du glucose intracellulaire, sera utilisé par la voie HBP afin de fournir de l'UDP-GlcNAc.

La voie HBP commence par la formation de glucosamine-6-phosphate à partir du fructose-6-phosphate grâce à l'intervention de l'enzyme GFAT (*Glutamine Fructose-6-*

phosphate Amido Transferase) (**figure 32**). Par la suite, la glucosamine-6-phosphate va être acétylé sous l'action de la Glucosamine-6-phosphate Acétyltransferase pour donner du N-acétylglucosamine-6-phosphate (GlcNAc-6-P) qui sera à son tour converti en N-acétylglucosamine-1-phosphate (GlcNAc-1-P) par l'acétylglucosamine phosphomutase (**figure 32**). Enfin, l'UDP-GlcNAc pyrophosphorylase va terminer la voie HBP en permettant la formation d'UDP-GlcNAc à partir du N-acétylglucosamine-1-phosphate. L'UDP-GlcNAc ainsi disponible va être pris en charge par l'OGT afin de réguler le niveau d'O-GlcNAcylation intracellulaire. De manière intéressante, une voie, dite de sauvetage, est aussi présente dans la cellule afin de récupérer le N-acétylglucosamine hydrolysé par l'OGA pour être réincorporé dans la voie HBP et ainsi produire de nouveau de l'UDP-GlcNAc. Pour se faire, la N-acétylglucosamine hydrolysée va être phosphorylée par la GlcNAc kinase et réintégrée sous forme de GlcNAc-6-phosphate dans la voie HBP (**figure 32**).

La voie HBP est régulée principalement par l'enzyme GFAT, qui est l'enzyme limitante inhibée directement par le produit final de la voie, l'UDP-GlcNAc, mettant en avant une boucle de rétrocontrôle négatif pour réguler la quantité d'UDP-GlcNAc intracellulaire (Broschat et al., 2002) (**figure 32**). Plusieurs analogues de la glutamine comme le 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON) ou bien l'azasérine ont été décrits comme inhibant la GFAT, diminuant de ce fait la O-GlcNAcylation (Milewski, 2002). À l'inverse, la glucosamine va augmenter le niveau d'O-GlcNAcylation intracellulaire en favorisant l'activité de l'OGT. En effet, la glucosamine va passer outre la GFAT en donnant directement la glucosamine-6-phosphate (Copeland et al., 2008).

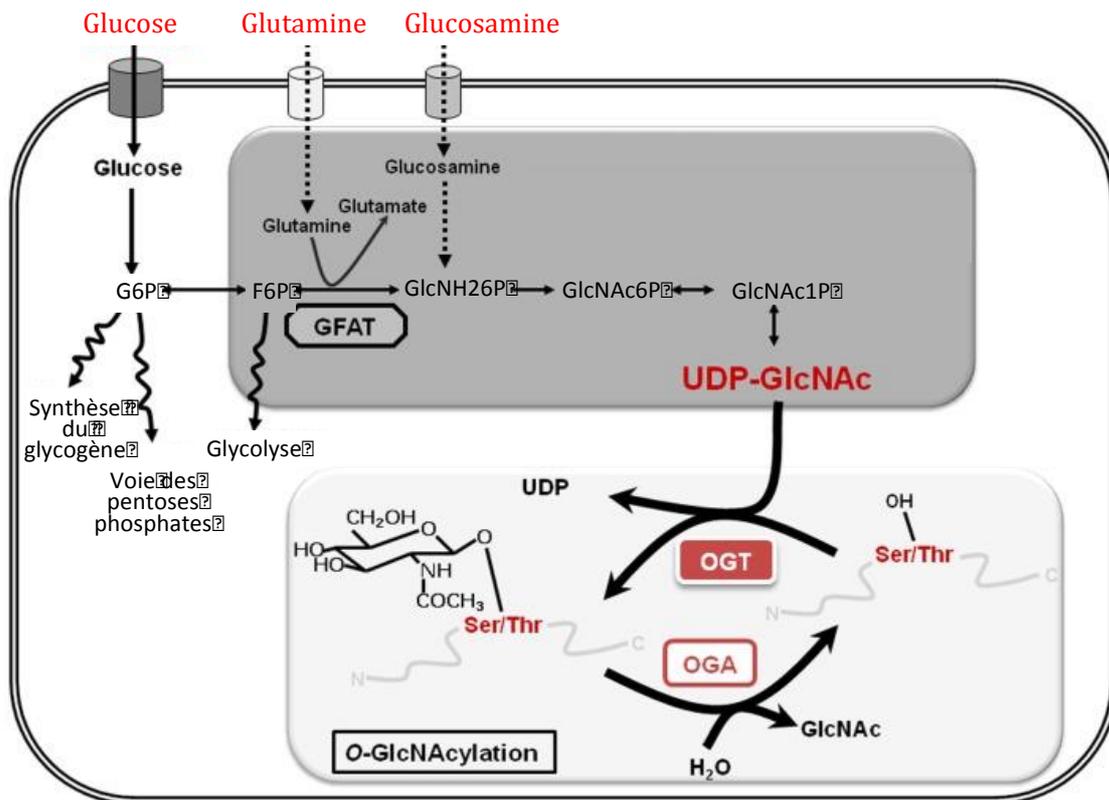


Figure 32 : La voie des hexosamines.

Représentation schématique de la voie des hexosamines avec les différentes enzymes impliquées dans la cascade de signalisation. Le glucose, la glutamine ainsi que la glucosamine peuvent entrer dans cette voie afin d'aboutir à la production d'UDP-GlcNAc. LA majorité du glucose entrant dans la cellule est cependant à destination de la synthèse de glycogène et pour la voie des pentoses phosphates. Seul 2 à 5% du glucose sera utilisé dans la voie des hexosamines. Adapté de (Dehennaut et al., 2014).

VI-5-Phosphorylation et O-GlcNAcylation : le yin et le yang.

De nombreuses études ont mis en avant la connexion qui existe entre phosphorylation et O-GlcNAcylation. Cette réciprocité entre les deux modifications a été appelée phénomène de « yin-yang » (figure 33). Ainsi, il a été montré qu'un traitement avec des inhibiteurs de phosphatases comme l'acide okadaïque entraînait une diminution de la O-GlcNAcylation des protéines principalement à localisation nucléaire (Lefebvre et al., 1999). A l'inverse, l'inhibition des kinases PKA ou PKC induit une augmentation de la O-GlcNAcylation de ces mêmes protéines (Griffith and Schmitz, 1999). La régulation entre phosphorylation et O-GlcNAcylation est cependant plus complexe car une inhibition de la kinase GSK3 β entraîne soit une augmentation de la O-GlcNAcylation de certaines protéines (principalement de protéines de choc thermique ou des protéines du cytosquelette) soit une diminution de la O-GlcNAcylation d'autres protéines comme des

facteurs de transcription (HCF1) ou bien des protéines de liaison à l'ARN (HnRNP K) (Wang et al., 2007).

De même, la modulation des enzymes du complexe OGLcNAzyme, en sur-exprimant ou en diminuant l'expression de l'OGA ou de l'OGT, impacte directement la balance O-GlcNAcylation/phosphorylation. Ainsi une diminution de l'expression de l'OGA entraîne une diminution de la phosphorylation globale et une inactivation ou une modulation des kinases GSK3 β ou AKT par exemple (Vosseller et al., 2002; Wang et al., 2008). De même, la surexpression de l'OGT entraîne une augmentation ou une diminution de la phosphorylation de différents sites de protéines du fuseau mitotique montrant une nouvelle fois une modulation spécifique en fonction des protéines (Wang et al., 2010b). Cette spécificité peut être expliquée par la relation qui existe entre le complexe OGLcNAzyme et des complexes phosphatases/kinases comme le complexe OGT/OGA/AuroraKinaseB/PP1c qui régule la phosphorylation et la O-GlcNAcylation des protéines du cytosquelette, comme la vimentine, lors de la mitose (Slawson et al., 2008). Il existe donc, par la formation de complexes multi-protéiques, une régulation fine des protéines ou des facteurs de transcription. La régulation phosphorylation/O-GlcNAcylation peut ainsi être compétitive et toucher les mêmes résidus thréonines ou sérines comme pour c-myc ou l'ARN pol II (Chou et al., 1995a; Comer and Hart, 2001). Dans le cas de c-myc, la compétition entre O-GlcNAcylation et phosphorylation de la sérine 58 pourrait moduler sa localisation cellulaire ainsi que son activité (Li and Yi, 2014). Cette compétition peut également avoir lieu sur des sites adjacents, comme dans le cas de p53 pour laquelle il est décrit que la phosphorylation de la thréonine 155 entraîne la dégradation de la protéine par la voie du protéasome. De manière intéressante, la O-GlcNAcylation de p53 au niveau de la sérine 149 bloque la dégradation de la protéine en empêchant la phosphorylation de la thréonine 155 (Yang et al., 2006).

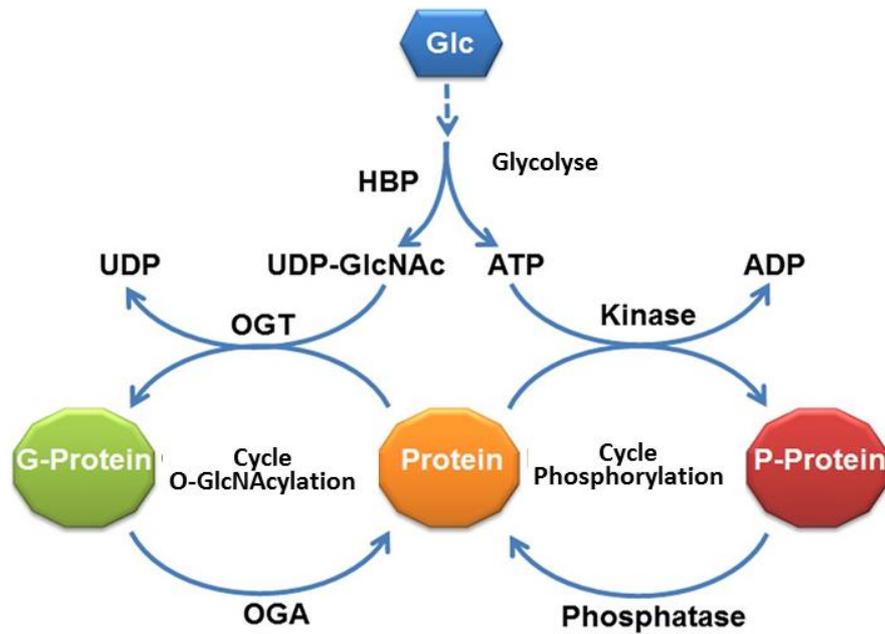


Figure 33 : Relation entre O-GlcNAcylation et phosphorylation, « le Yin et le Yang ».

L'alternance entre phosphorylation et O-GlcNAcylation est donc un processus extrêmement fin permettant des régulations très précises en fonction de l'état cellulaire et de l'environnement dans lequel la cellule se trouve. Au vu des nombreuses protéines ciblées par O-GlcNAcylation, cette modification est cruciale pour la régulation des processus cellulaires fondamentaux et il n'est pas surprenant qu'une perturbation dans la régulation de la O-GlcNAcylation soit associée à de nombreuses pathologies, dont le cancer. Dans notre étude, nous nous sommes particulièrement intéressés à la régulation de la transcription du promoteur du HTLV-1 par la O-GlcNAcylation. Nous détaillerons donc par la suite, après avoir montré la corrélation entre O-GlcNAcylation et cancer, l'implication de la O-GlcNAcylation dans la régulation de la transcription ainsi que son implication dans la modulation de l'état de compaction de la chromatine.

VI-6- O-GlcNAcylation et cancer.

Une modulation de la O-GlcNAcylation ainsi que des variations d'expression de l'OGT et de l'OGA ont été décrites dans de nombreux types de cancer (Fardini et al., 2013).

D'un point de vue général, le développement tumoral est souvent associé à une augmentation de la O-GlcNAcylation, liée à une surexpression de l'OGT. Ce phénomène est retrouvé dans le cas du cancer du sein, du colon, du foie ou de la prostate (Gu et al.,

2010; Krześlak et al., 2012a; Mi et al., 2011; Zhu et al., 2012). A l'inverse, dans le cas de leucémies chroniques, un niveau de O-GlcNAcylation plus faible ainsi qu'une augmentation de l'activité de l'OGA seraient associés à un développement tumoral plus agressif (Shi et al., 2010). De manière intéressante, il ne semble pas y avoir de corrélation entre le niveau d'OGA et ces différents cancers. Ainsi certaines études montrent une diminution du niveau de l'OGA dans le cas de cancers du sein et des ovaires, d'hépatocarcinomes ou de cancers de la vessie (Gu et al., 2010; Krześlak et al., 2012a; Rozanski et al., 2012; Zhu et al., 2012). D'autres études réalisées dans des cancers du poumon montrent que le niveau d'OGA ne semble pas varier (Mi et al., 2011) alors que son niveau d'expression semble augmenter dans le cas de cancer de l'endomètre, du sein ou de la thyroïde (Krześlak et al., 2012b; Slawson et al., 2001). Dans tous les cas, la perturbation des enzymes responsables de la O-GlcNAcylation semblent être impliquée dans le processus tumoral. Ainsi, l'inactivation de l'OGT dans des cellules tumorales mammaires inhibe la prolifération cellulaire, l'invasion, la migration et la croissance tumorale (Caldwell et al., 2010). De manière intéressante, les mêmes résultats sont obtenus lors de la surexpression de l'OGA dans des cellules tumorales mammaires sans cependant avoir d'effet sur la croissance des tumeurs (Gu et al., 2010). De même, dans le cas de cancers du poumon ou du colon, l'inhibition de l'OGT réduit le potentiel invasif des cellules cancéreuses mais ne diminue pas la prolifération cellulaire (Mi et al., 2011). Enfin, certaines études ont permis de corréler le niveau d'expression de l'OGA et de l'OGT en fonction du grade de la tumeur, permettant une potentielle application diagnostique. Ainsi, Krzeslak *et al* montre une expression plus importante de l'OGT dans des tumeurs mammaires et endométriales de stade II et III comparé à celles du stade I. De manière intéressante, le niveau d'OGA est beaucoup plus bas pour le stade II et III que pour le stade I (Krześlak et al., 2012a). Les mêmes observations ont été réalisées dans le cas de tumeurs de la vessie. Ainsi, dans l'urine des patients, le niveau de transcrite de l'OGT est fortement augmenté dans le cas de tumeurs avancées et le niveau de l'OGA est diminué (Rozanski et al., 2012).

VI-7- O-GlcNAcylation et facteurs de transcription.

De nombreux facteurs de transcription cruciaux dans le développement de cancer ont été décrits comme étant régulés et modulés par O-GlcNAcylation, nous citerons ici les principaux (**figure 34**).

C'est le cas du facteur de transcription oncogénique c-myc, responsable, entre autre, de la stimulation du cycle cellulaire et de la réplication, qui est exprimé à très faible niveau dans les cellules mais retrouvé surexprimé dans le cas de nombreux cancers (Meyer and Penn, 2008) (**figure 34**). Suite à un signal de prolifération, c-myc va être phosphorylé au niveau de la sérine 62 puis, afin que l'évènement soit transitoire, la kinase GSK3 β va phosphoryler c-myc au niveau de la thréonine 58, induisant alors la dégradation de la protéine (Gregory et al., 2003). La thréonine 58 a été décrite comme étant un « point chaud » muté dans de nombreux lymphomes empêchant ainsi la dégradation de c-myc et augmentant sa stabilité. De manière intéressante, il a été montré que la thréonine 58 est aussi cible de la O-GlcNAcylation et que la mutation de la sérine 62 ou de la GSK3 β augmente la O-GlcNAcylation de la thréonine 58 de c-myc ainsi que sa stabilité. Ceci laisse penser que l'augmentation de la O-GlcNAcylation de c-myc au niveau de la thréonine 58 empêcherait alors sa phosphorylation et par conséquent sa dégradation (Chou et al., 1995a; Li and Yi, 2014). De plus, il a été montré que dans des lignées issues de cancers prostatiques, l'OGT est surexprimée en association avec une augmentation de la O-GlcNAcylation de c-myc. Enfin, l'inhibition pharmacologique de l'OGT entraîne une diminution de la O-GlcNAcylation de c-myc et de sa stabilité dans ces mêmes cellules (Itkonen et al., 2013). Une étude à récemment montré que l'inhibition de l'OGT dans des lignées pancréatiques entraîne la diminution de la prolifération cellulaire associée à une perte d'expression de c-myc (Itkonen et al., 2016).

La protéine p53, décrite comme la protéine gardienne du génome et retrouvée comme mutée dans plus de 50% des cancers, est aussi cible de O-GlcNAcylation (Aschauer and Muller, 2016) (**figure 35**). La protéine p53, suite à différents signaux de stress, va être phosphorylée empêchant alors sa liaison à l'E3 ligase MDM2 et donc sa dégradation (Dai and Gu, 2010). Par la suite, la dégradation de p53 va être médiée par sa phosphorylation par COP9 sur la thréonine 155, empêchant ainsi la liaison de p53 à l'ADN. Il a été montré que la O-GlcNAcylation de la sérine 149 empêchait la phosphorylation de la thréonine

155 favorisant ainsi sa stabilité et son activité (Yang et al., 2006).

Les facteurs de transcription de la voie NF- κ B, sont aussi régulés par O-GlcNAcylation (**figure 34**). Ainsi, il a été montré dans des cellules pancréatiques que la O-GlcNAcylation de p65 augmente l'activation des kinases IKK α et IKK β (Ma et al., 2013). De plus, la O-GlcNAcylation de p65 au niveau de la thréonine 352 favorise son activité transcriptionnelle en diminuant son interaction avec l'inhibiteur I κ B α (Yang et al., 2008). Une autre étude a montré que la O-GlcNAcylation de p65 au niveau de la thréonine 305 était nécessaire pour permettre l'acétylation de p65 par p300, permettant alors d'activer la voie NF- κ B en réponse à une stimulation au TNF- α (Allison et al., 2012). La O-GlcNAcylation de p65 peut aussi être associée à une répression de la voie NF- κ B comme montré dans des cellules musculaires lisses de l'aorte chez le rat où les auteurs montrent que l'augmentation de la O-GlcNAcylation de p65 au niveau de la sérine 536 favorise son interaction avec I κ B α et entraîne donc une diminution de l'activation de la voie NF- κ B induite par le TNF- α (Xing et al., 2011). Le complexe IKK est aussi ciblé par O-GlcNAcylation, en particulier IKK β qui est O-GlcNAcylé sur la sérine 733 favorisant ainsi sa phosphorylation et l'activation de la voie (Kawauchi et al., 2009). L'implication de la O-GlcNAcylation sur la voie NF- κ B nécessite cependant encore des études et semble être cellule-dépendante.

D'autres facteurs de transcription et protéines sont aussi cibles de la O-GlcNAcylation et pourraient avoir un rôle dans la tumorigenèse. Ainsi, la O-GlcNAcylation du récepteur aux œstrogènes β est impliqué dans le développement de tumeurs mammaires (Cheng and Hart, 2001), celle de la β -caténine (Olivier-Van Stichelen et al., 2012) ou de FOXM1 dans l'induction du cycle cellulaire et celle de ChREBP dans la croissance cellulaire et la régulation de la dépendance des cellules cancéreuses au glucose pour ne citer qu'eux (Józwiak et al., 2014). La modulation de la voie PIP3/AKT est également modulée par O-GlcNAcylation (Kanwal et al., 2013) et celle-ci intervient également dans les fonctions des métalloprotéines MMPs ou de la E-cadherine dans l'invasion métastatique (**figure 34**).

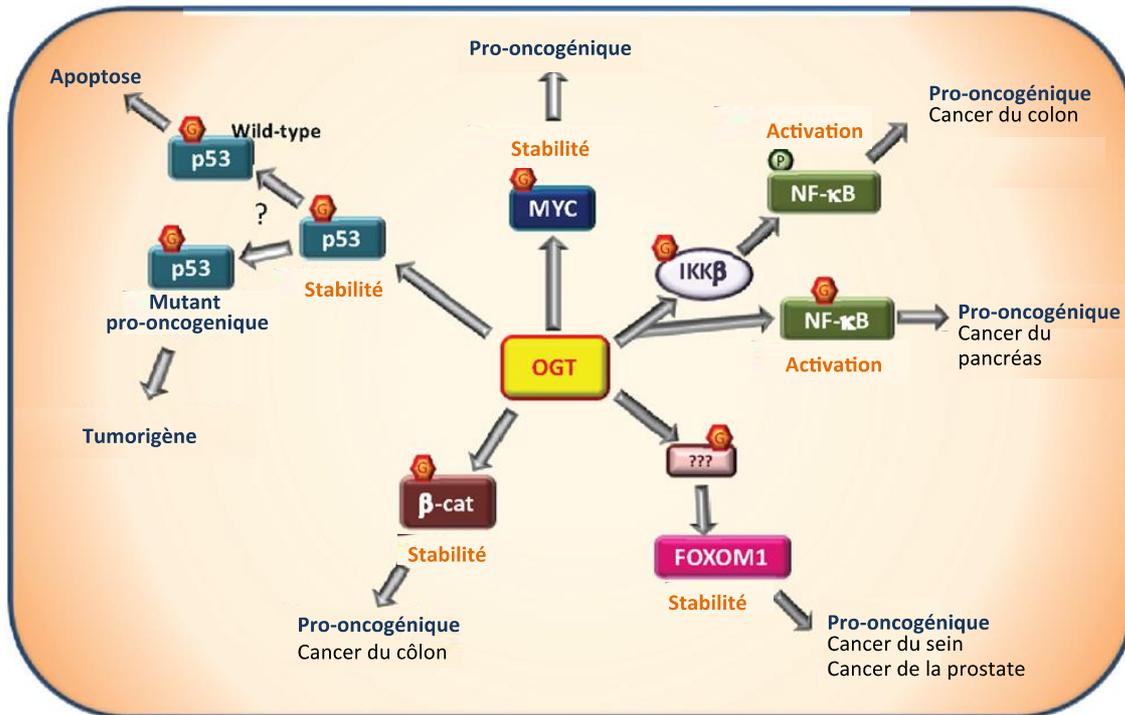


Figure 34 : Les différents facteurs de transcriptions régulé par O-GlcNAcylation et leurs implications dans le cancer.

Ici sont représentés les principaux facteurs de transcriptions régulés par phosphorylation et par O-GlcNAcylation dont la perturbation a été montré comme modulé dans différents cancers. Adapté de (Fardini et al., 2013)

VI-8- O-GlcNAcylation, transcription et régulations épigénétiques.

La modulation de l'expression des gènes par des marques épigénétiques et son implication dans le développement tumoral est extrêmement étudiée depuis quelques années. Dans le cas du virus HTLV-1, la modulation de la compaction de la chromatine est cruciale afin de permettre l'expression des gènes viraux (voir paragraphe V-4 : détournement de la machinerie de transcription). Le niveau de compaction de la chromatine est dépendant de son regroupement autour de structures multi-protéiques appelées nucléosome. Les nucléosomes sont composés de l'ADN enroulé autour de structures protéiques complexes appelées histones. Les histones dites « de cœur », composés de deux copies des histones H2A, H2B, H3 et H4, forment un complexe octamérique autour duquel l'ADN de 143 pb va s'enrouler. Ce complexe octamérique et l'ADN vont enfin être fixés par l'intermédiaire de l'histone H1 qui va verrouiller l'ADN au sein du nucléosome. La compaction et la relaxation de la chromatine vont être

dépendantes de modifications post-traductionnelles ciblant les histones. Celles-ci sont cibles de phosphorylation, d'acétylation, de méthylation, de SUMOylation, ADP-Ribosylation, d'ubiquitination mais également de O-GlcNAcylation, l'ensemble de ces modifications composant le « code histone » (Dehennaut et al., 2014). De manière générale, l'acétylation des histones est associée à une décondensation de la chromatine et, par conséquent, à la transcription des gènes alors que la méthylation peut à la fois être une marque activatrice ou bien une marque répressive en fonction des lysines ciblées, du nombre de résidus méthylés ajoutés et de l'association avec d'autres modifications. De plus, la phosphorylation, en fonction des conditions, est associée aussi à une répression ou une activation (Su and Denu, 2016).

L'implication de la O-GlcNAcylation des histones sur la régulation de l'expression des gènes nécessite encore de nombreuses études afin d'établir le véritable rôle de ce langage complexe. A ce jour, de nombreux sites de O-GlcNAcylation des histones ont été cependant décrits. Ainsi l'histone H2A est O-GlcNAcylée au niveau de la thréonine 101, la sérine 36 pour H2B, la sérine 110 pour l'histone H3 et la sérine 47 pour l'histone H4 (Sakabe et al., 2010). Plusieurs études ont montré que la O-GlcNAcylation des histones fluctue tout au long du cycle cellulaire avec un niveau très faible en phase S (Zhang et al., 2011). De manière intéressante, suite à un stress cellulaire impliquant les protéines de choc thermique, la O-GlcNAcylation des histones augmente, faisant penser que la O-GlcNAcylation serait associée à un état de répression de la chromatine (Sakabe et al., 2010). La O-GlcNAcylation peut, encore une fois, entrer en compétition avec la phosphorylation afin de réguler plus finement les marques des histones. Par exemple, il a été montré qu'un traitement à la glucosamine augmente la O-GlcNAcylation de la sérine 110 de l'histone H3 mais diminue sa phosphorylation (Zhang et al., 2011). Les travaux sur le rôle de la sérine 110 sont toujours en cours mais cette balance entre phosphorylation et O-GlcNAcylation serait impliquée dans la ségrégation et la compaction des chromosomes durant la mitose (Sawicka and Seiser, 2012). De plus, le traitement par la glucosamine entraîne une diminution des marques répressives H3K9Me3 et une augmentation des marques activatrices H3K4Me3, suggérant que la O-GlcNAcylation peut aussi moduler d'autres modifications post-traductionnelles. Un autre exemple d'effet coopératif peut être cité pour l'histone H2B qui va être O-GlcNAcylé au niveau de la sérine 112, ce qui va favoriser sa monoubiquitination sur la lysine 120 (Fujiki et al., 2011).

Afin de cibler les histones et de moduler la compaction de la chromatine, différents complexes ont été décrits, comme le complexe AuroraB/PP1/ OGT/OGA impliqué dans la phosphorylation des sérines 10 et 28 de l'histone H3 (Slawson et al., 2008) ou un complexe entre l'OGT et CARM1 (*co-activator associated arginine methyltransferase 1*) induisant une diminution de la phosphorylation de CARM1 et de son activité méthyltransférase sur l'arginine 7 de l'histone H3 (Sakabe and Hart, 2010).

L'OGT peut aussi interagir avec d'autres enzymes comme les enzymes de la famille TET impliquées dans la déméthylation des îlots CpG de l'ADN et, par conséquent, sa compaction. Les enzymes TET sont primordiales pour la transcription de gènes et sont décrites comme étant mutées dans différents cancers myéloïdes (Mariappa et al., 2013). Ainsi, il a été montré que l'OGT interagissait avec TET2 et TET3 sans influencer leurs localisations ni leurs O-GlcNAcylation (Chen et al., 2013). Cependant, cette interaction permettrait le recrutement de l'OGT au niveau des histones afin de moduler leur O-GlcNAcylation comme le montre une étude où l'OGT est retrouvée au niveau de nombreux sites d'initiation de la transcription ciblés par TET2. Au niveau de ces sites, la O-GlcNAcylation de la sérine 112 de H2B est augmentée (Chen et al., 2013). Le complexe OGT/TET peut aussi être associé à d'autres régulateurs de la chromatine comme sin3A ou HCF1 (Vella et al., 2013).

Cette modulation de la compaction de la chromatine va permettre le recrutement de nombreux facteurs de transcription afin de réguler de nombreux gènes. Ces facteurs peuvent être également régulés par O-GlcNAcylation comme dans le cas de sp1, STAT5a, CREB ou bien TORC2 (Ozcan et al., 2010). Ainsi la O-GlcNAcylation de sp1 permet sa translocation nucléaire ainsi que la transcription de ses gènes cibles comme la calmoduline en diminuant son état de phosphorylation (Majumdar et al., 2006). D'autres études montrent que la O-GlcNAcylation de sp1 empêche son interaction avec d'autres facteurs de transcription comme le co-activateur TAF110 ou Elf-1, inhibant ainsi son activité transcriptionnelle. STAT5 est modifiée par O-GlcNAcylation sur la thréonine 92 lui permettant d'interagir avec le co-activateur CBP, induisant ainsi la transcription de ses gènes cibles (Gewinner et al., 2004). L'ARN pol II est aussi régulé par O-GlcNAcylation au niveau de sa partie C-terminale entraînant un changement de conformation, empêchant l'accès au site de phosphorylation nécessaire à son activité (Comer and Hart, 2001). De plus, TORC2 a été décrit comme ciblée et régulée par O-

GlcNAcylation dans des hépatocytes. Après analyses au spectromètre de masse, sept sites de O-GlcNAcylation ont été décrits dont deux se sont révélés cruciaux : les sérines 70 et 71. De manière intéressante, la phosphorylation de ces sites entraîne la séquestration de TORC2 dans le cytoplasme. Il a ainsi été montré que l'augmentation de la O-GlcNAcylation de TORC2 au niveau des sérines 70 et 71 empêche la phosphorylation et permet une translocation de TORC2 au sein du noyau (Al-Hakim et al., 2005; Srean et al., 2004). Ainsi TORC2 pourra se lier à CREB afin d'induire la transcription de gène cible. Enfin, la protéine CREB est modifiée par O-GlcNAcylation sur différents résidus : les thréonines 259, 261, 227 et 228 ainsi que sur les sérines 40 et 260 (Lamarre-Vincent and Hsieh-Wilson, 2003; Rexach et al., 2012). Cependant la sérine 40 semble être le site majeur de O-GlcNAcylation. Différentes études montrent que la O-GlcNAcylation de CREB empêcherait sa liaison avec TAFII 130 diminuant ainsi son activité transcriptionnelle (Lamarre-Vincent and Hsieh-Wilson, 2003).

De manière intéressante, la plupart des facteurs de transcriptions cités ci-dessus sont impliqués dans la régulation de la transcription des gènes viraux du HTLV-1. Ainsi comme décrit dans le paragraphe V-4, le facteur sp1 est nécessaire à l'activation basale du LTR 5' en absence de Tax et à l'activation du LTR 3' dépendante de HBZ, CBP et le co-facteur TORC2 sont quand à eux recrutés par Tax au niveau du LTR 5' afin de former un complexe quaternaire stable pour favoriser la transcription. De plus, l'ARN pol II, recrutée aussi lors de l'activation du LTR 5' de HTLV-1 est ciblée et régulée par O-GlcNAcylation. Enfin, la protéine CREB, élément crucial à l'origine de l'activation du promoteur viral, est aussi régulée par O-GlcNAcylation. Or, comme décrit précédemment, le recrutement de CREB par Tax ainsi que la stabilité du complexe quaternaire de transcription, est fortement dépendant de son état de phosphorylation. De plus, la phosphorylation de CREB a été retrouvée comme étant augmentée dans des lignées HTLV-1 et l'expression de Tax dans des cellules 293 T augmente le niveau de phosphorylation de CREB, renforçant l'importance de la phosphorylation de CREB dans l'activation du LTR 5'.

Au vu de l'interconnexion qui existe entre O-GlcNAcylation et phosphorylation, je me suis donc demandé durant ma thèse s'il existait une régulation de CREB par O-GlcNAcylation dans le cas de la transcription du génome du virus HTLV-1 induite par

Tax et de son impact sur l'activation du LTR 5'. De plus, du fait que la O-GlcNAcylation est une modification post traductionnelle cruciale dans la régulation de nombreux processus décrits comme étant modulés dans le cas de pathologies comme le cancer, j'ai étudié pour la première fois si il existait une modulation des enzymes du complexe OGlcNAzyme dans le cadre de l'infection par le virus HTLV-1.

Cette étude a fait l'objet d'une publication qui est actuellement en révision dans la revue « Plos Pathogens ».

Résultats

VII. Présentation de l'article (en révision dans Plos Pathogens).

HIJACKING OF THE O-GlcNACZYME COMPLEX BY THE HTLV-1 TAX ONCOPROTEIN FACILITATES VIRAL TRANSCRIPTION

Damien Groussaud*, Mostafa Khair*, Armelle Tollenaere, Laetitia Waast, Mei-Shiue Kuo², Yann Fardini , Mouloud Souidi , Laurence Benit , Claudine Pique^{\$} and Tarik Issad^{\$}

L'oncoprotéine Tax du virus HTLV-1 joue un rôle majeur dans l'établissement de la leucémie mais aussi dans la réplication du virus. En effet, Tax régule la transcription du promoteur viral situé au sein du LTR 5' du virus, gouvernant ainsi sa propre production. Pour ce faire, Tax recrute des dimères du facteur de transcription cellulaire CREB, sous forme phosphorylée, au niveau d'éléments de réponse à l'AMP cyclique (vCRE) situés dans la partie U3 du LTR. La phosphorylation de CREB est un processus crucial pour le recrutement par Tax des différentes protéines permettant de former le complexe à l'origine de la transactivation du promoteur viral. Cependant CREB est aussi ciblé et régulé par OGlcNAcylation, une modification cruciale qui permet de réguler avec la phosphorylation la stabilité et l'activité de nombreux facteurs de transcription. Du fait que Tax module et régule de nombreux processus cellulaires clés en détournant de nombreuses machineries de modifications cellulaires et que la OGlcNAcylation a été décrite comme modulée dans de nombreux types de cancers, nous avons donc voulu étudier pour la première fois s'il existait une modulation de la OGlcNAcylation dans le cas de l'infection par le virus HTLV-1. Pour ce faire, nous avons étudié le statut des enzymes de la OGlcNAcylation dans des lignées de lymphocytes T transformés par le virus HTLV-1 et l'impact de la OGlcNAcylation de CREB sur l'activation du promoteur viral.

Plusieurs approches expérimentales ont été utilisées dans cette étude pour répondre à notre problématique. Afin de justifier de la pertinence de nos résultats, nous avons directement travaillé dans des lignées de lymphocytes T transformés par le virus HTLV-1. Nous avons également mis en place, différents outils novateurs afin de mesurer le niveau d'OGlcNAcylation intracellulaire et l'activité de l'OGA. Enfin, différentes

expériences de biologie moléculaire dont des expériences d'immunoprecipitation de la chromatine (ChIP) ont été réalisées afin d'observer l'effet de la modulation de la OGlcnAcylation de CREB sur la formation du complexe de transactivation au sein du LTR 5'.

Ces travaux nous ont permis de montrer que l'expression de l'OGA est augmentée aussi bien en ARNm qu'en protéine dans les lignées de lymphocytes T transformés par le virus en comparaison avec des lignées T contrôles, alors que l'expression de l'OGT ne varie pas. De plus, l'augmentation de l'expression de l'OGA est corrélée à une diminution de l'activité spécifique de l'enzyme : les lymphocytes T transformés par le HTLV-1 produisent plus d'OGA mais celle-ci est moins active. De manière intéressante, nous avons observé que l'expression de Tax dans des lignées de lymphocytes T transformés par le virus mais n'exprimant pas Tax est suffisante pour d'une part inhiber l'activité de l'OGA et d'autre part, augmenter le niveau d'OGlcnAcylation de CREB. Grâce à des expériences de biochimie, nous avons pu montrer que l'inhibition de l'OGA est induite par la liaison de Tax avec le complexe OGlcnAzyme, provoquant de ce fait une modulation du complexe. Par la suite, nous avons évalué, grâce à un traitement pharmacologique inhibant l'activité de l'OGA, l'impact de l'augmentation de la OGlcnAcylation de CREB sur l'activation du promoteur viral. Nous avons pu montrer que l'inhibition de l'OGA entraîne une augmentation de la transactivation du promoteur viral par Tax, associée à une augmentation du recrutement de p-CREB sur les éléments v-CRE. Enfin, nous avons démontré que les enzymes du complexe OGlcnAzyme sont également recrutées au niveau de la région promotrice du LTR.

Ces résultats révèlent donc pour la première fois la relation qui existe entre Tax et la OGlcnAcylation et nous permettent de proposer un nouveau modèle d'activation du LTR viral. La compréhension des mécanismes à l'origine de la production et de la régulation des protéines virales à l'origine du développement de la leucémie induite par le virus HTLV-1 s'avère cruciales afin de permettre la mise en place de nouvelles thérapies. Enfin, cette étude montre une nouvelle fois l'importance de la OGlcnAcylation dans l'oncogenèse en démontrant pour la première fois une modulation de la machinerie d'OGlcnAcylation dans le cadre de leucémie induite par HTLV-1.

VIII. ARTICLE.

HIJACKING OF THE O-GlcNACZYME COMPLEX BY THE HTLV-1 TAX ONCOPROTEIN FACILITATES VIRAL TRANSCRIPTION

Damien Groussaud^{1*}, Mostafa Khair^{2*}, Armelle I Tollenaere¹, Laetitia Waast¹, Mei-Shiue Kuo², Yann Fardini², Mouloud Souidi¹, Laurence Benit¹, Claudine Pique^{1\$} and Tarik Issad^{2\$}

¹ Retrovirus, Quiescence and Proliferation Team and ² Insulin Signaling, Glucose Sensing and Glucotoxicity Team. Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

* and \$ These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: Claudine Pique, email: claudine.pique@inserm.fr and Tarik Issad, email: tarik.issad@inserm.fr.

ABSTRACT

The HTLV-1 Tax oncoprotein plays a key role in both HTLV-1-replication and HTLV-1-associated pathologies, notably adult T-cell leukemia. Tax governs the transcription from the viral 5'LTR, enhancing thereby its own expression, via the recruitment of dimers of phosphorylated CREB to cAMP-response elements located in the U3 region (vCRE). In addition to phosphorylation, CREB is also susceptible to O-GlcNAcylation, another reversible post-translational modification involved in a wide range of diseases, including cancer. O-GlcNAcylation consists in the addition of O-linked-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) on serine or threonine residues; a process controlled by two enzymes that form the O-GlcNAcylase functional complex: O-GlcNAc transferase (OGT) that transfers O-GlcNAc, and O-GlcNAcase (OGA) that removes it. In this study, we used a combination of enzymatic, biochemical and molecular biology assays to investigate the status of O-GlcNAcylation enzymes in HTLV-1-transformed T cells and their impact on CREB O-GlcNAcylation and transcriptional activity. We found that OGA mRNA and protein expression levels are increased in HTLV-1-transformed T cells as compared to control T cell lines while OGT expression is unchanged. However, higher OGA production coincides with a reduction of OGA specific activity, showing that HTLV-1-transformed T cells produced high level of a less active form of OGA. Introducing Tax into the Tax-negative HTLV-1-transformed TL-

om1 T cells is sufficient to inhibit OGA activity and increase CREB O-GlcNAcylation. Indeed, Tax was found to interact with the OGT/OGA complex and to inhibit the activity of OGT-bound OGA. Pharmacological inhibition of OGA in Tax-positive HTLV-1-transformed T cells enhances both HTLV-1-LTR transactivation and phospho-CREB recruitment to the LTR. Finally, both OGT and OGA are recruited to the LTR. These findings reveal the interplay between Tax and the O-GlcNAcylation pathway and identify new key molecular actors involved in the assembly of the Tax-dependent transactivation complex.

AUTHOR SUMMARY

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

INTRODUCTION

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

The oncogenic power of HTLV-1 is due in large part to the properties of the viral oncoprotein Tax. Tax is a powerful inducer of T-cell proliferation through its ability to activate a broad range of cellular promoters, promote cell cycle and inhibit apoptosis and repair machineries (reviewed in [3]). As a consequence, Tax has been shown to induce immortalization of primary T cells *in vitro* [4] as well as tumor formation in transgenic animals [5]. Tax is also critical for HTLV-1 gene expression by virtue of its capacity to transactivate the 5' LTR that controls the transcription of all HTLV-1 structural, enzymatic, regulatory, including Tax itself, and auxiliary genes with the exception of the antisens product HBZ [6]. 5'LTR transactivation depends on Tax interaction with the cellular transcription factor cAMP response element binding protein (CREB) that, together with Tax, binds to three conserved copies of a cyclic AMP-response element located in the LTR U3 region (viral CRE/vCRE). The binding of Tax/CREB complexes to the vCRE then allows the recruitment of the transducer of regulated CREB-dependent transcription (TORC) [7] and of the CREB binding protein (CBP) [8] and CBP-associated factor (p/CAF) [9] general co-activators and ultimately, of components of the basal transcription machinery (reviewed in [10]).

CREB-mediated activation of cellular promoters has been shown to critically depend on CREB phosphorylation at Ser133 [11, 12]. It was initially proposed that CREB phosphorylation was dispensable in the context of Tax transactivation of the HTLV-1 promoter [13, 14]. However, further studies demonstrated on one hand that the transactivation complex contains pSer¹³³-CREB and on the other hand, that Tax is able to increase CREB phosphorylation [15-17].

In addition to phosphorylation, CREB was also shown to be subjected to other post-translational modifications, including acetylation [18] and O-GlcNAcylation [19, 20]. O-GlcNAcylation is a reversible post-translational modification that regulates the activity, stability and sub-cellular localisation of cytosolic and nuclear proteins [21]. O-GlcNAcylation consists in the addition of N-Acetyl glucosamine (GlcNAc) on serine and threonine residues.

Only a unique couple of enzymes controls O-GlcNAc level on proteins: OGT (O-GlcNAc transferase), which adds the GlcNAc motif on proteins, and OGA (O-GlcNAcase), which removes it [22]. OGT and OGA are known to be physically associated in a molecular complex (GlcNAzyme complex), and this association was shown previously to be important for their regulatory activity on cell signaling and transcriptional processes [23]. Numerous reports have reported alterations in OGT, OGA and O-GlcNAc levels in solid tumors as well as hematopoietic cancer cells [24]. O-GlcNAcylation may promote tumor development through perturbation of signalling pathways and cell cycle regulators [24, 25]. In addition, major oncogenic factors were shown to be directly O-GlcNAcylated [24, 25]. Finally, O-GlcNAcylation has been also recently recognized as a novel epigenetic mark (reviewed in [26]).

By using a combination of enzymatic, BRET-based and biochemical assays, we report here that the HTLV-1 Tax protein binds to the O-GlcNAzyme complex, blocks the activity of OGA and increases the O-GlcNAcylation of both CREB and phospho-CREB in HTLV-1-transformed T cells. Moreover, we show that OGA inhibition in HTLV-1-transformed T cells enhances Tax-induced LTR transactivation and binding of phospho-CREB to the vCRE and that both OGT and OGA are recruited to the vCRE region. These findings identify new functional interacting partners of Tax and expand our understanding of the composition of the transactivation complex assembled by Tax on the HTLV-1 5' LTR promoter in HTLV-1-infected T cells.

RESULTS

Expression of OGT and OGA in HTLV-1-transformed T cells

Because OGT and OGA expression is altered in numerous cancer cell types [24], we evaluated the expression levels of these enzymes in T cell lines transformed or not by HTLV-1. We found that both OGA mRNA (Fig. 1A) and protein (Fig. 1C) levels were higher in five HTLV-1-transformed T cells as compared to four controls transformed T cells. In contrast, no major difference in either mRNA or protein expression was found for OGT between the two groups of T cell lines (Fig. 1B and 1C).

The enzymatic OGA activity in each T cell line was then quantified. Cells were lysed and equal amounts of total proteins were used to measure either total OGA enzymatic activity or OGA protein level. Similar or slightly higher OGA activity was found in HTLV-1-transformed T cells as compared to control transformed T cells (Fig. 1D, histogram).

However, when corrected by the amount of OGA protein present in each assay, determined by quantification of the signal obtained by western-blotting using the same cell extracts (Fig. 1D, Blot OGA), specific OGA activity was found to be significantly lower in HTLV-1-transformed T-cells than in control transformed T cells (Fig. 1E). These findings show that OGA production is increased at both mRNA and protein levels in HTLV-1-transformed T cells but that the activity of the enzyme is impaired in these cells.

Effect of Tax on OGA activity and cellular O-GlcNAcylation

The HTLV-1 Tax protein is capable of interacting with and deregulating numerous cellular activities. Whether Tax was involved in OGA deregulation was therefore investigated by transfecting a Tax expressor plasmid into the Tax-negative HTLV-1-transformed TL-om1 T cell line and evaluating OGA activity 24 hours post-transfection. We observed that Tax-expressing TL-om1 T cells exhibited lower OGA activity as compared to TL-om1 T cells transfected with the control plasmid (Fig. 2A). This reduction in OGA activity was not due to a change in OGA expression level, as shown on Figure 2B. However, this coincided with an increase in the level of total O-GlcNAcylated proteins (Fig. 2B, O-GlcNAc). This suggested that Tax expression was sufficient to inhibit OGA activity, increasing thereby the O-GlcNAcylation level of cellular proteins.

In order to confirm that Tax protein affects the O-GlcNAc cycling in TL-om1 T cells, we developed a BRET based biosensor that permits to evaluate the O-GlcNAcylation/de-GlcNAcylation balance in living cells. We observed that the BRET signal was significantly increased in Tax transfected TL-om1 T cells as compared to cells transfected with the control plasmid (Fig. 2C, left panel), as shown by the amplitude of the delta BRET (right panel). Hence, inhibition of OGA activity by Tax indeed enhanced O-GlcNAcylation.

Since TL-om1 T cells still express the viral antisens product HBZ, we investigated the effect of Tax in an HTLV-1-independent context. In transfected HEK-293T cells, Tax expression also resulted in a marked increase in the BRET signal of the biosensor (Fig. 2D). Furthermore, this coincided with a significant reduction in OGA enzymatic activity in cell extracts from Tax-transfected HEK-293T cells, as compared to control cells (Fig. 2E). This indicates that OGA inhibition found in Tax-transfected TL-om1 T cells is directly mediated by Tax.

Tax interaction with the O-GlcNAcylase complex

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

We then studied the effect of Tax expression on the formation of the OGT/OGA complex by BRET in HEK-293T cells co-transfected with OGT-Rluc and OGA-YFP constructs. As shown in Figure 3B, such complex could be readily detected as a BRET signal between OGT-Rluc and OGA-YFP. A higher BRET signal was found upon Tax expression, suggesting that Tax may affect OGT/OGA interaction. To further analyze the effect of Tax on OGT/OGA interaction, BRET saturation assays were performed (Fig. 3C). This analysis permits to determine whether a change in BRET signal between two partners corresponds to the recruitment of one partner to the other (increased affinity reflected by decreased BRET50) [27] or, rather, reflects a conformational change within the complex that modifies the relative orientation between the luciferase and the YFP, resulting in a higher efficiency of energy transfer [28]. Analysis of the saturation curves using Prime software indicates that Tax expression resulted in a decrease in BRET50 (Fig. 3C and 3D), suggesting that Tax may regulate O-GlcNAcylation by increasing the association of OGA with OGT.

To test this hypothesis, we set up an immunoprecipitation assay in order to evaluate the activity of OGA within the OGT-OGA complex in the presence or absence of Tax. HEK-293T cells were co-transfected with OGT-Luc, OGA-YFP and/or Tax plasmids. The level of luciferase was first measured in the immunoprecipitates to normalize the amount of precipitated OGT. Western blot analysis showed that both OGA and Tax were bound to OGT (Fig. 3E, left panel), confirming the interaction of Tax with the O-GlcNAcylase complex. Moreover, in the presence of Tax, a slight but significant increase in the amount of OGA co-precipitated with OGT was observed (Fig. 3E, right panel). This was in good agreement with the above BRET saturation data showing that Tax increases the proportion of OGA associated with OGT. We next measured the enzymatic OGA activity in the complex and found that Tax significantly reduced the activity of OGA co-precipitated with OGT (Fig. 3F). Taken

together, these data support the notion that Tax regulates O-GlcNAcylation by modulating OGT/OGA interaction.

Effect of Tax on CREB O-GlcNAcylation

Tax activates the viral LTR via the recruitment of CREB, which has been shown previously to be modified by O-GlcNAcylation [19, 20]. We first compared the level of CREB O-GlcNAcylation between C8166 T cells and TL-om1 T cells that naturally express Tax or not, respectively. To this end, O-GlcNAcylated cellular proteins were captured on wheat germ lectin agarose beads (WGA) and analyzed by western blot. The WGA/lysate ratio for CREB was higher in C8166 than in TL-om1 T cells (Fig. 4A, left panel). Interestingly, higher WGA/lysate ratio, indicating higher binding to WGA in C8166 T cells, was observed as well for phospho-CREB (Fig. 4A, right panel).

To confirm the involvement of Tax in this observation, the level of CREB O-GlcNAcylation was compared in TL-om1 T cells expressing or not Tax. The level of WGA-bound CREB was higher in TL-om1 cells expressing Tax than in control cells (Fig. 4B). A higher level of total O-GlcNAcylated proteins were also found in Tax-expressing TL-om1 T cells (Fig. 4B). In contrast, Tax expression had no effect on WGA binding of the insulin receptor, which is retained to the lectin through its complex stable N- and O-glycan chains, showing that equivalent amounts of proteins were analyzed in each condition [29]. These data provide the notion that Tax expression is sufficient to increase CREB O-GlcNAcylation.

Effect of O-GlcNAcylation on the HTLV-1 promoter

The impact of modulating the O-GlcNAcylation of CREB on Tax-mediated transactivation of the HTLV-1 LTR was next examined. Tax-expressing HTLV-1-transformed C8166 T cells were pretreated for 24h with the OGA inhibitor Thiamet G, then transfected with the HTLV-1-LTR-Firefly Luciferase construct and the pRL-TK normalization plasmid, and then incubated again with Thiamet G for an additional period of 24h. Thiamet G treatment dramatically increased the Firefly/Renilla ratio in C8166 T cells as compared to untreated cells (Fig. 5A).

To assess whether the increase in LTR transactivation by Tax upon OGA inhibition was linked to higher CREB binding to the promoter, chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments were performed. C8166 T cells were treated for 48 hours with Thiamet G and ChIP were performed using an anti-phospho CREB (Ser 133) and primers specific for the distal U3 vCRE sequence. Thiamet G treatment resulted in higher amount of amplified vCRE

products as compared to untreated cells (Fig. 5B). Similar data were obtained with a primer pair amplifying the three vCRE regions (data not shown).

Whether OGT and OGA were recruited to the vCRE region was finally investigated in HTLV-1-transformed C8166 T cells. Both anti-OGT and anti-OGA ChIP allowed the amplification of vCRE-specific products to levels significantly higher than the control IgG (Fig. 5C). Moreover, very low amplification signals were detected with primers targeting alpha-satellite (α -sat) regions, showing the specificity of the anti-OGT and anti-OGA ChIPs. Similar results were obtained with another HTLV-1-transformed T cell line MT2 (Fig. 5D). Moreover, binding of OGT and OGA to the vCRE sequence was also detected in IL-2-dependent HTLV-1-immortalized primary T cells (Fig. 5E). Hence, increasing O-GlcNAcylation facilitates phospho-CREB binding to the vCRE and both OGT and OGA belong to the vCRE-bound transactivation complex assembled in either HTLV-1-immortalized or transformed T cells.

DISCUSSION

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

We observed that HTLV-1-transformed T cells express higher level of OGA than control transformed T cells, but that this coincides with a dramatic reduction in the specific activity of OGA. Importantly, expressing only Tax was sufficient to inhibit OGA activity and increase total O-GlcNAcylation both in HEK-293T adherent cells and in T cells. Noteworthy, previous studies reported that pharmacological inhibition of OGA also leads to OGA accumulation, presumably as the result of a feedback regulatory mechanism compensating for lower activity [30, 31]. We propose therefore that the increased OGA expression found in HTLV-1 transformed T cells is a direct response to OGA inhibition by Tax, through a yet unknown mechanism. Whatever this mechanism, our results reveal that Tax indeed behaves as an OGA inhibitor and enhancer of O-GlcNAcylation.

Using BRET experiments, we observed that Tax interacts with the GlcNAcylase complex, and that Tax expression significantly increases recruitment of OGT to OGA. Moreover, in presence of Tax, OGA enzymatic activity in the complex was reduced. This suggests that

OGT may directly or indirectly regulate OGA activity. O-GlcNAcylation of OGA by OGT has been described previously, although its functional consequences have not been explored [32, 33]. In addition, OGT has been shown to interact with a number of kinases that may also phosphorylate and negatively regulate OGA activity. It is also possible that Tax directly affects OGA activity, independently of OGT. Clearly, further experiments are needed to unravel the mechanism by which Tax regulates OGA activity, resulting in increased protein O-GlcNAcylation.

Our data also revealed that an important consequence of Tax-dependent enhancement in O-GlcNAcylation is the increased O-GlcNAcylation of CREB. CREB activity is known to be regulated by phosphorylation on Ser133, and CREB phosphorylation is mandatory for Tax-mediated LTR transactivation. Competition between phosphorylation and O-GlcNAcylation has been observed on several proteins. Interestingly, in our experiments, increased O-GlcNAcylation appears to occur on both total and phosphorylated CREB. Consistent with this, enhancing O-GlcNAcylation via Thiamet G strongly increases the recruitment of phosphorylated CREB to the vCRE region of the LTR (Fig. 5B). Although in some cases O-GlcNAcylation and phosphorylation can compete one with the other for the same residue, in other situations, these modifications occur on different residues and can act synergically [34]. Our data suggest that the latter scenario appears to be the case in the case of Tax-induced O-GlcNAcylation of CREB.

The activation of the HTLV-1 5'LTR depends on the formation of a complex assembled by Tax which contains also phospho-CREB [15-17], the co-activators TORC1/2 [7], the histone chaperone NAP1 [35], CBP/p300 [8] and p/CAF [9]. Strikingly, CREB [20], CBP [36] and TORC2 [37] have been shown to be O-GlcNAcylated, and O-GlcNAcylation of the C-terminal domain of the RNA polymerase II has been reported as well [38, 39]. Moreover, O-GlcNAcylation belongs to the post-translational modifications targeting histones and is therefore now considered as a new epigenetic mark governing chromatin dynamic (reviewed in [26, 40]). Our data draw therefore a novel model for the HTLV-1 5'LTR activation in which via the deposition of the O-GlcNAzyme complex onto the vCRE region, Tax facilitates the O-GlcNAcylation of transcription factors and co-factors while concomitantly modulating local chromatin architecture. This ultimately increases promoter activation, as documented here by the positive effect of OGA inhibition on the transcription of the HTLV-1-LTR reporter construct (Fig. 5A). Importantly, recruitment of OGT and OGA to the 5'LTR was found in both HTLV-1-immortalized primary T cell and HTLV-1-transformed T cell lines.

This provides the notion that the O-GlcNAcylase complex plays a key role in both HTLV-1-replication *in vivo* and HTLV-1-induced pathologies.

Only few studies have investigated the impact of O-GlcNAcylation on virus transcription. It has been shown that enhancing O-GlcNAcylation inhibits the expression of human immunodeficiency virus type 1 or herpes virus simplex [41, 42]. In these cases, the effect was linked to the modification of transcription factors, SP1 and HCF-1 respectively, involved in virus expression. Our data showing that O-GlcNAcylation increases the transactivation of the HTLV-1 LTR provide therefore the first example of a positive impact of the O-GlcNAcylation machinery on viral transcription via the recruitment of the GlcNAcylase complex to the viral promoter.

MATERIALS AND METHODS

Cells and Transfections

HEK-293T cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 1 mM pyruvate and antibiotics (Invitrogen) and were transfected using the lipofectamine reagent (Invitrogen). The HTLV-1-transformed T-cell lines C8166, MT2 and TL-om1 were grown in RPMI 1640 medium containing 25mM glucose and supplemented as above but with the addition of 20 mM HEPES and 5mL of 100X non-essential aminoacid solution (Invitrogen) and were transfected by nucleofection using the cell line nucleofector kit V (Lonza, France) and the program O-017. The HTLV-1-immortalized CIB T cells were generated from peripheral blood mononuclear cells of a TSP/HAM patient as described in [43]. These cells were grown in supplemented RPMI medium in the presence of 50U/ml of IL-2 (Roche, France).

Plasmids

The pSG5M empty vector, pSG5M-Tax, HTLV-1-LTR-Luc and pRL-TK plasmids were described elsewhere [44]. The pcDNA3Rluc8 plasmid was a kind gift of Prof. Gambhir [45]. The pcDNA3.1 Rluc 8-Tax plasmid was generated following PCR amplification of the Tax sequence from the pSG5M-Tax vector using primers creating NheI restriction sites at both extremities of Tax cDNA (forward : GGCGCTAGCCACCATGGCCCACTTCCCAGGG; reverse : GCCGCTAGCTCCGA-CTTCTGTTTCTCGGAAATG). The PCR product was then inserted into the pcDNA3.1 RLuc8 after NheI digestion. YFP-OGA has been described previously [46]. Rluc8-OGT was generated by inserting OGT coding sequence [47] into the

pcDNA3.1 Rluc8 vector after HindIII/ BamHI digestion. YPet-OGT was obtained by insertion of cDNA OGT sequence into YPet-pcDNA3 vector after digestion with EcoRV-ApaI.

To monitor O-GlcNAcylation in living cells, we developed a BRET-biosensor based on the previously described FRET OS2-O-GlcNAc biosensor [48] by replacing the CFP by an Rluc8 sequence. The BRET biosensor is composed of Rluc8 fused to the fimbrial adhesin lectin domain GafD, a known OGT substrate peptide derived from casein kinase II placed between two flexible linkers (GGSGG) followed by a variant of the yellow fluorescent protein Venus [48].

Antibodies and reagents

Tax was detected using sera from HTLV-1 infected individuals or the anti-Tax monoclonal antibody (mab) 168-A51 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, USA). The following primary antibodies were used: anti-OGT (Sigma, DM-17 06264), anti-OGA (Santa Cruz, sc135093 or Sigma, SAB4200311), anti-CREB (Millipore, CS 203204), anti-CREB ser133 (Millipore, CS 204400), anti-actin (Santa Cruz, sc1616) and anti-tubulin (GeneTex, GT114). HRP-conjugated anti-human, anti-mouse and anti-rabbit IgG (Promega) were used as secondary antibodies. Thiamet G (Sigma, SML 0244) was used at 10 μ M concentration in the different experiments.

Luciferase assays

C8166 T cells (2x10⁶/12 well) were cotransfected by nucleofection with 500 ng of the HTLV-1-LTR-Firefly Luciferase reporter plasmid, 50 ng of the Renilla reporter plasmid pRL-TK and 0.5 μ g of the control or the Tax plasmids. Luciferase activity was quantified using the Dual Luciferase Assay System (Promega) and values were normalized with Renilla activity.

Cell lysis, immunoprecipitation, Wheat Germ Lectin precipitation and immunoblot

At 24 h post-transfection, cells were lysed in lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH8, 1% NP40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS and 150 mM NaCl) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Roche). Immunoprecipitations were carried out as follow: cell lysates were incubated overnight with primary antibodies at 4°C, and antibody complexes were captured on protein G-sepharose beads (GE Healthcare) 1 h at 4°C. Sepharose beads were then washed 5 times in wash buffer (120 mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH8, 0.2 mM NaF, 0.2 mM EGTA, 0.2% deoxycholate, 0.5% NP40) before elution in Laemmli buffer. In some

experiments, O-GlcNAcylated proteins were precipitated on 40 ml of WGL-agarose (WGA) beads (Vector Laboratories, Paris, France) for 2h at 4°C and then eluted in Laemmli buffer as described in [46]. Immunoprecipitated, WGL-agarose precipitated proteins, and total cell lysates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and blotted with specific antibodies.

RNA extraction and qRT-PCR

Total RNAs were prepared with the Nucleospin RNAII kit (Macherey Nagel, France) and 1µg of RNA was reverse transcribed using the Maxima first strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific, France), according to the manufacturer's procedure. Real-time-PCR was performed in the Lightcycler 2.0 (Roche, France) on 10 ng of reverse transcribed RNA using the following primers: OGT (forward : GCCCTGGGTCGCTTGGAAGA, reverse : TGC CAC AGC TCT GTCAAAA) OGA primers (forward : TCTGCGGTGTGGTGGGAAGGA , reverse : TGGGGTTAGAAAAAGTGATA) and the housekeeping gene HPRT (forward 5'TGACACTGGCAAAACAATGCA3', reverse 5'GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT3') for normalization. PCR was conducted using the Sybr Green method with the following conditions: a first step of denaturation at 95°C for 8 min, followed by 40 cycles of denaturation (95°C for 0 sec), annealing (60°C for 10 sec), and extension (72°C for 8 sec) and a final step of melting curve (95°C for 0 sec, then 65°C for 15 sec and finally 95°C for 0 sec).

CHIP experiments

ChIP experiments were performed using the kit ChIP-IT high sensitivity from active motif. 10 µg of chromatin were used for each condition. Primer pairs that specifically amplify the distal vCRE (position 201-275: Forward 5'ATCATAAGCTCAGACCTCCGGGAA3', reverse 5'CCTGAGGACGGCTTGACAAACAT3') or the three vCREs (position 5-273: Forward 5'AATGACCATGAGCCCCA3', reverse 5'GTGAGGGGTTGTCGTCA3') in the U3 region were used for PCR.

BRET measurements

HEK-293T cells were transfected in 12 well plates as described previously [49] using 300 ng of each cDNA construct, unless otherwise stated in the figure legend. One day after transfection, cells were transferred into 96-well microplate, and BRET measurements were carried out on the following day. TL-om1 T cells were transfected by nucleofection in 12 well

plates. On the following day, cells were distributed into 96 well microplate and BRET measurements were performed.

For BRET measurements, cells were pre-incubated for 5 min in PBS in the presence of 5 μ M coelenterazine. Light-emission acquisition at 485 nm and 530 nm was then started, and signal acquisition was performed every minute during 20-30 min using TECAN Infinite F200 Pro apparatus. BRET signal was expressed in milliBRET units (mBU). The BRET unit has been defined previously as the ratio 530 nm/485 nm obtained when the two partners are present, corrected by the ratio 530 nm/485 nm obtained under the same experimental conditions, when only the partner fused to Renilla luciferase is present in the assay [50]. Each measurement corresponded to the signal emitted by the whole population of cells present in a well (i.e., approximately 4×10^4 HEK 293 cells or 10^6 TL-om1 T cells).

OGA activity

OGA activity was measured using 4-methylumbellifery-N-acetyl β -D-glucosamine (MU-GlcNAc, Sigma), which is converted into fluorescent 4-methylumbelliferon upon hydrolysis by OGA and other hexosaminidase [51]. 4-methylumbelliferon fluorescence was measured at 448 nm after excitation at 362 after 30 min and 60 min incubation at 37 °C, to ensure that the determination was performed during the linear phase of the reaction. To determine the concentration of 4-methylumbelliferon, a standard curve was performed in each experiment using commercial 4-methylumbelliferon (Sigma). To specifically determine OGA activity, all reactions were performed in absence or presence of the highly specific OGA inhibitor ThiametG. The difference of the fluorescent signal obtained in absence and presence of Thiamet G reflected the amount of 4-methylumbelliferon produced by OGA.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH, for the anti-Tax mab, S.S Gambhir for the Rluc8 cDNA, L.K. Mahal for the OS2-O-GlcNAc biosensor cDNA and E. Harhaj for the TL-om1 T cells. This work was supported by a grant from the INSERM Plan Cancer. DG and AIT are recipients of a PhD grant from the Ligue Nationale contre le Cancer or Université Paris Descartes, respectively.

Author Contributions

DG and MK designed and performed the work, analyzed the data and contributed to paper writing. AIT performed ChIP experiments, analyzed the data and edited the paper. LW performed RT-qPCR experiments and edited the paper. MSK, YF and MS contributed to biochemical experiments. L.B. designed and supervised plasmid constructs. CP and TI conceived and supervised the study and wrote the paper.

REFERENCES

1. Gessain A, Cassar O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol.* 2012; 3: 388.
2. Martin F, Taylor GP, Jacobson S. Inflammatory manifestations of HTLV-1 and their therapeutic options. *Expert Rev Clin Immunol.* 2014; 10: 1531-46.
3. Currer R, Van Duyne R, Jaworski E, Guendel I, Sampey G, Das R, et al. HTLV tax: a fascinating multifunctional co-regulator of viral and cellular pathways. *Front Microbiol.* 2012 Nov 30;3:406.
4. Bellon M, Baydoun HH, Yao Y, Nicot C. HTLV-I Tax-dependent and -independent events associated with immortalization of human primary T lymphocytes. *Blood.* 2010; 115: 2441-8.
5. Hasegawa H, Sawa H, Lewis MJ, Orba Y, Sheehy N, Yamamoto Y, et al. Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat Med.* 2006; 12: 466-72.
6. Barbeau B, Mesnard JM. Making sense out of antisense transcription in human T-cell lymphotropic viruses (HTLVs). *Viruses.* 2011; 3: 456-68.
7. Siu YT, Chin KT, Siu KL, Yee Wai Choy E, Jeang KT, et al. TORC1 and TORC2 coactivators are required for tax activation of the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeats. *J Virol.* 2006; 80: 7052-9.

8. Georges SA, Giebler HA, Cole PA, Luger K, Laybourn PJ, Nyborg JK. Tax recruitment of CBP/p300, via the KIX domain, reveals a potent requirement for acetyltransferase activity that is chromatin dependent and histone tail independent. *Mol Cell Biol.* 2003; 23: 3392-404.
9. Harrod R, Kuo YL, Tang Y, Yao Y, Vassilev A, Nakatani Y, et al. p300 and p300/cAMP-responsive element-binding protein associated factor interact with human T-cell lymphotropic virus type-1 Tax in a multi-histone acetyltransferase/activator-enhancer complex. *J Biol Chem.* 2000; 275: 11852-7.
10. Nyborg JK, Egan D, Sharma N. The HTLV-1 Tax protein: revealing mechanisms of transcriptional activation through histone acetylation and nucleosome disassembly. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1799: 266-74.
11. Naqvi S, Martin KJ, Arthur JS. CREB phosphorylation at Ser133 regulates transcription via distinct mechanisms downstream of cAMP and MAPK signalling. *Biochem J.* 2014; 458: 469-79.
12. Parker D, Ferreri K, Nakajima T, LaMorte VJ, Evans R, Koerber SC, et al. Phosphorylation of CREB at Ser-133 induces complex formation with CREB-binding protein via a direct mechanism. *Mol Cell Biol.* 1996; 16: 694-703.
13. Anderson MG, Dynan WS. Quantitative studies of the effect of HTLV-I Tax protein on CREB protein-DNA binding. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22: 3194-201.
14. Kwok RP, Laurance ME, Lundblad JR, Goldman PS, Shih H, Connor LM, et al. Control of cAMP-regulated enhancers by the viral transactivator Tax through CREB and the co-activator CBP. *Nature.* 1996; 380: 642-6.
15. Geiger TR, Sharma N, Kim YM, Nyborg JK. The human T-cell leukemia virus type 1 tax protein confers CBP/p300 recruitment and transcriptional activation properties to phosphorylated CREB. *Mol Cell Biol.* 2008; 28: 1383-92.
16. Kim YM, Ramirez JA, Mick JE, Giebler HA, Yan JP, Nyborg JK. Molecular characterization of the Tax-containing HTLV-1 enhancer complex reveals a prominent role for CREB phosphorylation in Tax transactivation. *J Biol Chem.* 2007; 282: 18750-7.
17. Kim YM, Geiger TR, Egan DI, Sharma N, Nyborg JK. The HTLV-1 tax protein cooperates with phosphorylated CREB, TORC2 and p300 to activate CRE-dependent cyclin D1 transcription. *Oncogene.* 2010; 29: 2142-52.
18. Lu Q, Hutchins AE, Doyle CM, Lundblad JR, Kwok RP. Acetylation of cAMP-responsive element-binding protein (CREB) by CREB-binding protein enhances CREB-dependent transcription. *J Biol Chem.* 2003; 278: 15727-34.
19. Lamarre-Vincent N, Hsieh-Wilson LC. Dynamic glycosylation of the transcription factor CREB: a potential role in gene regulation. *J Am Chem Soc.* 2003; 125: 6612-3.

20. Rexach JE, Clark PM, Mason DE, Neve RL, Peters EC, Hsieh-Wilson LC. Dynamic O-GlcNAc modification regulates CREB-mediated gene expression and memory formation. *Nat Chem Biol.* 2012; 8: 253-61.
21. Hart GW, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature.* 2007; 446: 1017-22.
22. Issad T, Kuo M. O-GlcNAc modification of transcription factors, glucose sensing and glucotoxicity. *Trends Endocrinol Metab.* 2008; 19: 380-9.
23. Whisenhunt TR, Yang X, Bowe DB, Paterson AJ, Van Tine BA, Kudlow JE. Disrupting the enzyme complex regulating O-GlcNAcylation blocks signaling and development. *Glycobiology.* 2006; 16: 551-63.
24. Fardini Y, Dehennaut V, Lefebvre T, Issad T. O-GlcNAcylation: A New Cancer Hallmark? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013; 4: 99.
25. Kanwal S, Fardini Y, Pagesy P, N'Tumba-Byn T, Pierre-Eugène C, Masson E, et al. O-GlcNAcylation-inducing treatments inhibit estrogen receptor α expression and confer resistance to 4-OH-tamoxifen in human breast cancer-derived MCF-7 cells. *PLoS One.* 2013; 8: 9539-9544.
26. Gambetta MC, Muller J. A critical perspective of the diverse roles of O-GlcNAc transferase in chromatin. *Chromosoma.* 2015; 124: 429-42.
27. Nouaille S, Blanquart C, Zilberfarb V, Boute N, Perdereau D, Burnol AF, et al. Interaction between the insulin receptor and Grb14: a dynamic study in living cells using BRET. *Biochem Pharmacol.* 2006; 72: 1355-66.
28. Lacasa D, Boute N, Issad T. Interaction of the insulin receptor with the receptor-like protein tyrosine phosphatases PTPalpha and PTPepsilon in living cells. *Mol Pharmacol.* 2005; 67: 1206-13.
29. Issad T, Combettes M, Ferre P. Isoproterenol inhibits insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of the insulin receptor without increasing its serine/threonine phosphorylation. *Eur J Biochem.* 1995; 234: 108-15.
30. Slawson C, Zachara NE, Vosseller K, Cheung WD, Lane MD, Hart GW. Perturbations in O-linked beta-N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *J Biol Chem.* 2005; 280: 32944-56.
31. Zhang Z, Tan EP, VandenHull NJ, Peterson KR, Slawson C. O-GlcNAcase Expression is Sensitive to Changes in O-GlcNAc Homeostasis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014; 5: 206.
32. Lazarus BD, Love DC, Hanover JA. Recombinant O-GlcNAc transferase isoforms: identification of O-GlcNAcase, yes tyrosine kinase, and tau as isoform-specific substrates. *Glycobiology.* 2006; 16: 415-21.

33. Rexach JE, Rogers CJ, Yu SH, Tao J, Sun YE, Hsieh-Wilson LC. Quantification of O-glycosylation stoichiometry and dynamics using resolvable mass tags. *Nat Chem Biol.* 2010; 6: 645-51.
34. Hu P, Shimoji S, Hart GW. Site-specific interplay between O-GlcNAcylation and phosphorylation in cellular regulation. *FEBS Lett.* 2010; 584: 2526-38.
35. 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 U S A.* 2008; 105: 7959-63.
36. Nagel AK, Schilling M, Comte-Walters S, Berkaw MN, Ball LE. Identification of O-linked N-acetylglucosamine (O-GlcNAc)-modified osteoblast proteins by electron transfer dissociation tandem mass spectrometry reveals proteins critical for bone formation. *Mol Cell Proteomics.* 2013; 12: 945-55.
37. Dentin R, Hedrick S, Xie J, Yates J, 3rd, Montminy M. Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRT2. *Science.* 2008; 319: 1402-5.
38. Kelly WG, Dahmus ME, Hart GW. RNA polymerase II is a glycoprotein. Modification of the COOH-terminal domain by O-GlcNAc. *J Biol Chem* 1993; 268: 10416-24.
39. Lu L, Fan D, Hu CW, Worth M, Ma ZX, Jiang J. Distributive O-GlcNAcylation on the Highly Repetitive C-Terminal Domain of RNA Polymerase II. *Biochemistry.* 2016; 55:1149-58.
40. Dehennaut V, Leprince D, Lefebvre T. O-GlcNAcylation, an Epigenetic Mark. Focus on the Histone Code, TET Family Proteins, and Polycomb Group Proteins. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014; 5:155.
41. Daou S, Mashtalir N, Hammond-Martel I, Pak H, Yu H, Sui G, Vogel JL, et al. Crosstalk between O-GlcNAcylation and proteolytic cleavage regulates the host cell factor-1 maturation pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108: 2747-52.
42. Jochmann R, Thureau M, Jung S, Hofmann C, Naschberger E, Kremmer E, et al. O-linked N-acetylglucosaminylation of Sp1 inhibits the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *J Virol.* 2009; 83: 3704-18.
43. Ozden S, Cochet M, Mikol J, Teixeira A, Gessain A, Pique C. Direct evidence for a chronic CD8+-T-cell-mediated immune reaction to tax within the muscle of a human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1-infected patient with sporadic inclusion body myositis. *J Virol.* 2004; 78: 10320-7.
44. Nasr R, Chiari E, El-Sabban M, Mahieux R, Kfoury Y, Abdulhay M, et al. Tax ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of NF-kappaB activation. *Blood.* 2006; 107: 4021-9.

45. De A, Loening AM, Gambhir SS. An improved bioluminescence resonance energy transfer strategy for imaging intracellular events in single cells and living subjects. *Cancer Res.* 2007; 67: 7175-83.
46. Fardini Y, Masson E, Boudah O, Ben Jouira R, Cosson C, Pierre-Eugene C, et al. O-GlcNAcylation of FoxO1 in pancreatic β cells promotes Akt inhibition through an IGFBP1-mediated autocrine mechanism. *Faseb J.* 2014; 28: 1010-21.
47. Kuo M, Zilberfarb V, Gangneux N, Christeff N, Issad T. O-glycosylation of FoxO1 increases its transcriptional activity towards the glucose 6-phosphatase gene. *FEBS Lett.* 2008; 582: 829-34.
48. Carrillo LD, Froemming JA, Mahal LK. Targeted in vivo O-GlcNAc sensors reveal discrete compartment-specific dynamics during signal transduction. *J Biol Chem.* 2011; 286: 6650-8.
49. Blanquart C, Achi J, Issad T. Characterization of IRA/IRB hybrid insulin receptors using bioluminescence resonance energy transfer. *Biochem Pharmacol.* 2008; 76: 873-83.
50. Issad T, Boute N, Pernet K. A homogenous assay to monitor the activity of the insulin receptor using Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *Biochem Pharmacol.* 2002; 64: 813-7.
51. Kim EJ, Kang DO, Love DC, Hanover JA. Enzymatic characterization of O-GlcNAcase isoforms using a fluorogenic GlcNAc substrate. *Carbohydr Res.* 2006; 341: 971-82.

FIGURE LEGENDS

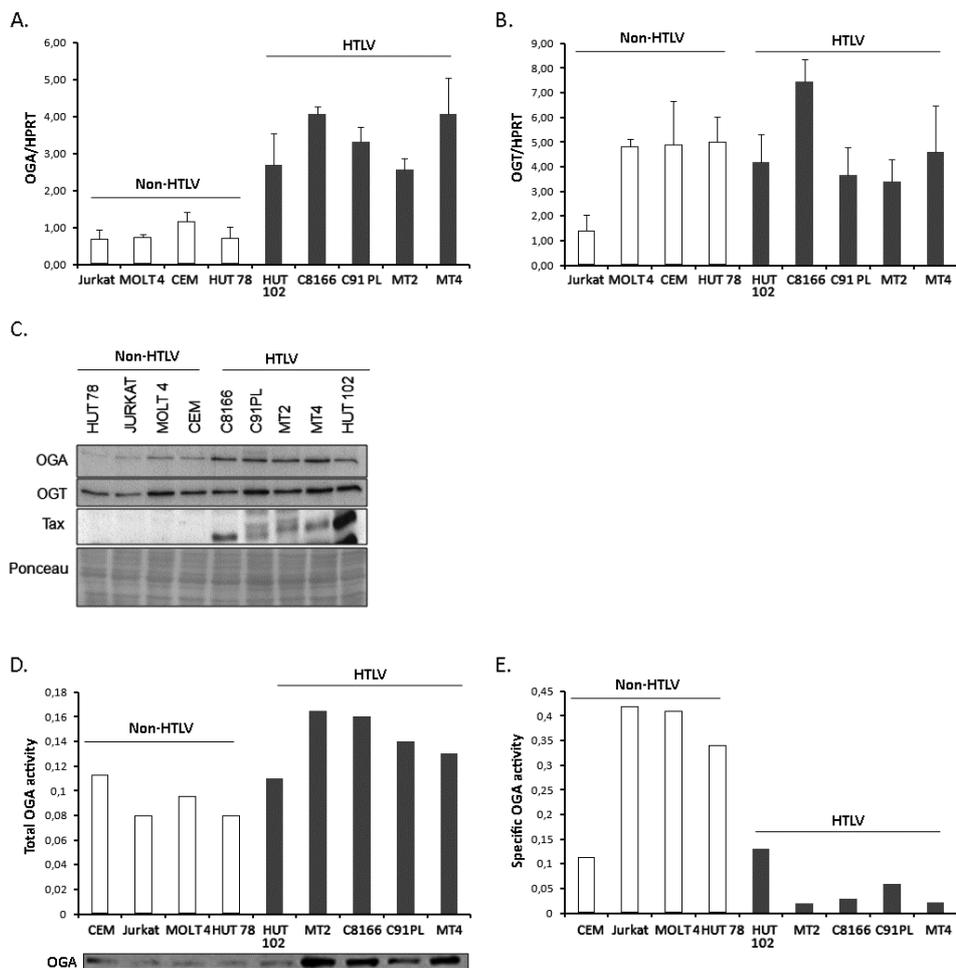


FIGURE 1

Figure 1. Comparison of OGT or OGA expression levels and OGA activity between HTLV-1-transformed T cells and control transformed T cells.

(A, B) RT-qPCR experiments for comparing the amount of OGA (A) or OGT (B) mRNA in non-HTLV-1 (white bars) or in HTLV-1-transformed T cells (black bars) normalized to the level of HPRT mRNA. Results correspond to two independent experiments performed in triplicates. (C) Western blot experiments showing the amount of OGA, OGT or Tax proteins in non-HTLV-1 (white bars) or in HTLV-1-transformed T cells (black bars). Protein loading on each lane is indicated by ponceau staining of the membrane. Results correspond to one representative experiment out of 3 (D) OGA activity in non-HTLV-1 (white bars) or in HTLV-1-transformed T cell extracts (black bars). The activity was normalized to the protein concentration in the extract. The lower panel shows the level of OGA protein in each cell line. (E) Calculation of the specific activity of OGA in non-HTLV-1 (white bars) or in HTLV-1-transformed T cells (black bars). For each cell line, the total OGA activity was normalized to the quantity of OGA protein shown in (D). Results correspond to one representative experiment out of 3.

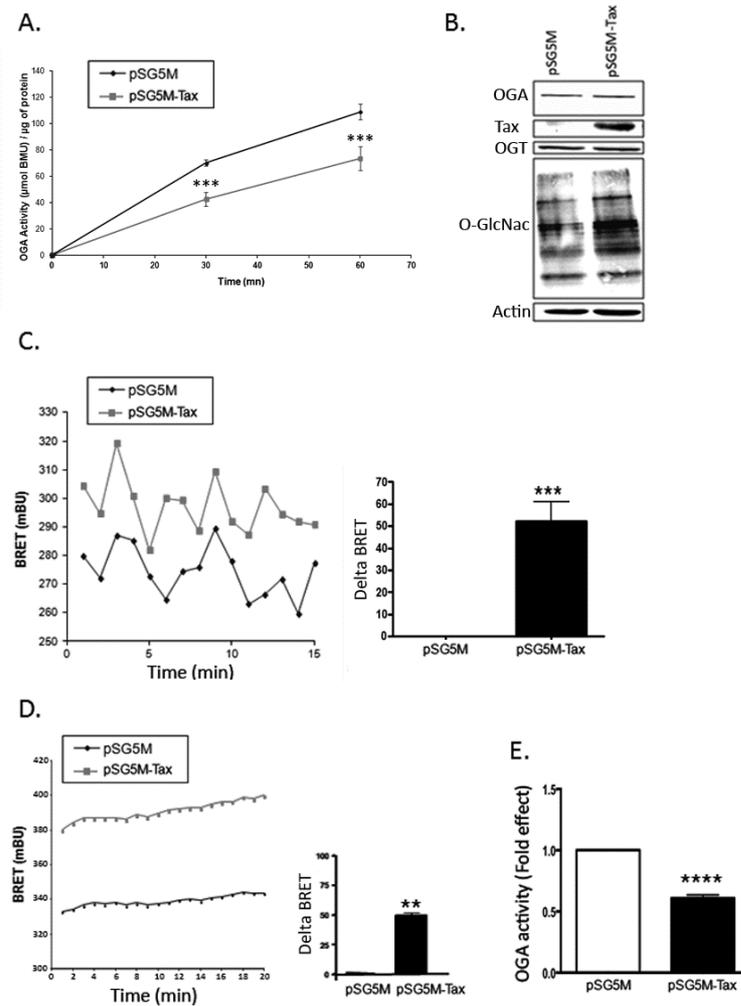


FIGURE 2

Figure 2. Effect of Tax expression on OGA activity and O-GlcNAcylation in TL-om1 T cells and HEK-293T cells.

(A) OGA activity was measured at two different time-points in extracts from TL-om1 cells transfected with either the control or Tax plasmid. Results are means \pm SEM of 4 independent experiments. (B) Cell extracts from the same experiments were submitted to western-blotting to evaluate the general O-GlcNAcylation (O-GlcNac) profile as well as OGA, OGT and Tax expression. (C-D) TL-om1 (C) or HEK-293T cells (D) cells were transfected with the O-GlcNac BRET biosensor and either the control or Tax plasmid and BRET experiments were performed 24h after transfection. BRET measurements were started 5 min after the addition of coelenterazine. Left panel: a typical BRET experiment is shown. Right panel: Mean delta BRET (increased BRET signal induced by Tax expression). Results are means \pm SEM of 3 independent experiments. (E) OGA activity was measured in extracts from HEK-293T cells transfected with either the control or Tax plasmid. Cells were extracted and OGA activity was measured at 30 min. Results are means \pm SEM of 3 independent experiments. Statistical significance was calculated using the student's t test.

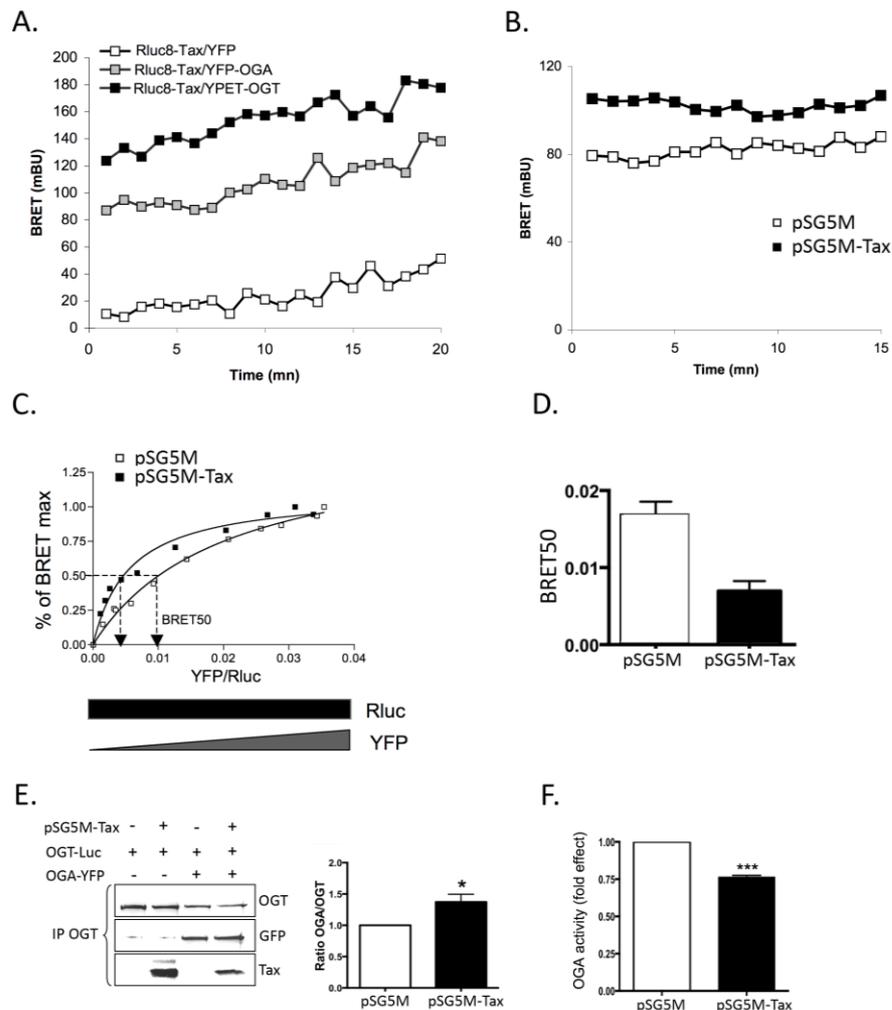


FIGURE 3

Figure 3. Interaction of Tax with the GlcNAcylase complex.

(A) HEK-293T cells were co-transfected with Rluc8-Tax and YFP, YFP-OGA or YPET-OGT (600ng/well each) and BRET experiments were performed 48h after transfection. BRET measurements were started 5 min after the addition of coelenterazine (B) HEK-293T cells were co-transfected with YFP-OGA and Rluc8-OGT (600ng/well each) and either the control or Tax plasmid (500ng/well each) and BRET experiments were performed 48h after transfection. (C) For BRET saturation assays, HEK-293T cells were co-transfected with a constant amount of cDNA coding for Rluc8-OGT (300 ng/well) and increasing amount of cDNA coding for OGA-YFP (10 to 1000 ng/well) and either the control or Tax plasmid. BRET signal, luciferase and fluorescence levels were measured 48h post-transfection. BRET signals were plotted as a function of the ratio of YFP-OGA fluorescence to Rluc8-OGT luminescence. The curves were fitted using non-linear regression equation assuming a single binding site (GraphPad Prism). (D) Effect of Tax expression on the BRET50 derived from BRET saturation curves using GraphPad Prism. (E) HEK-293T cells were co-transfected with either the control or Tax plasmid, Rluc8-OGT, YFP-OGA, or both. After immunoprecipitation with anti-OGT antibody, western-blotting was performed with the indicated antibodies (Left panel). Quantification of the OGA/OGT ratio in 4 independent experiments (right panel). (F) After immunoprecipitation as described in (E), the OGA activity present in the immune complex was measured using a fluorogenic assay. Statistical analysis was performed using Student's t test. Results are mean \pm SEM of 4 to 7 independent experiments.

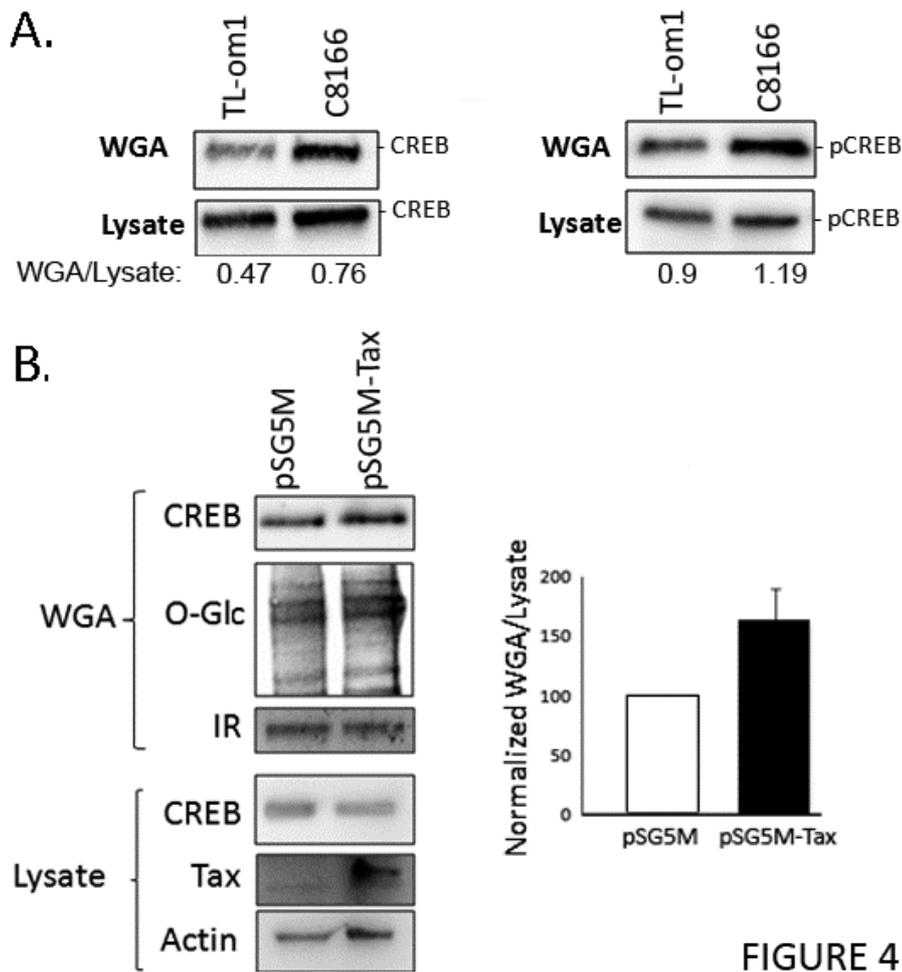


FIGURE 4

Figure 4. Effect of Tax on CREB O-GlcNAcylation in HTLV-1-transformed T cells.

(A) Comparison of CREB O-GlcNAcylation in TL-om1 T cells expressing or not Tax. TL-om1 T cells were nucleofected with either the control or Tax plasmid and total cellular proteins were prepared two days post-transfection. Total proteins (lysates) or O-GlcNAcylated proteins purified via binding to wheat germ lectin agarose beads (WGA) were separated by SDS-PAGE and blotted with either an anti-CREB (left panel) or anti-phospho-CREB (Ser¹³³) (right panel) specific antibody. Results correspond to one representative experiment out of 2 (B) Comparison of CREB O-GlcNAcylation in C8166 or TL-om1 T cells that express or not Tax, respectively. Proteins prepared as above were analyzed using an anti-CREB antibody (left panel). Calculation of the WGA/lysate ratio for CREB in two independent experiments (right panel).

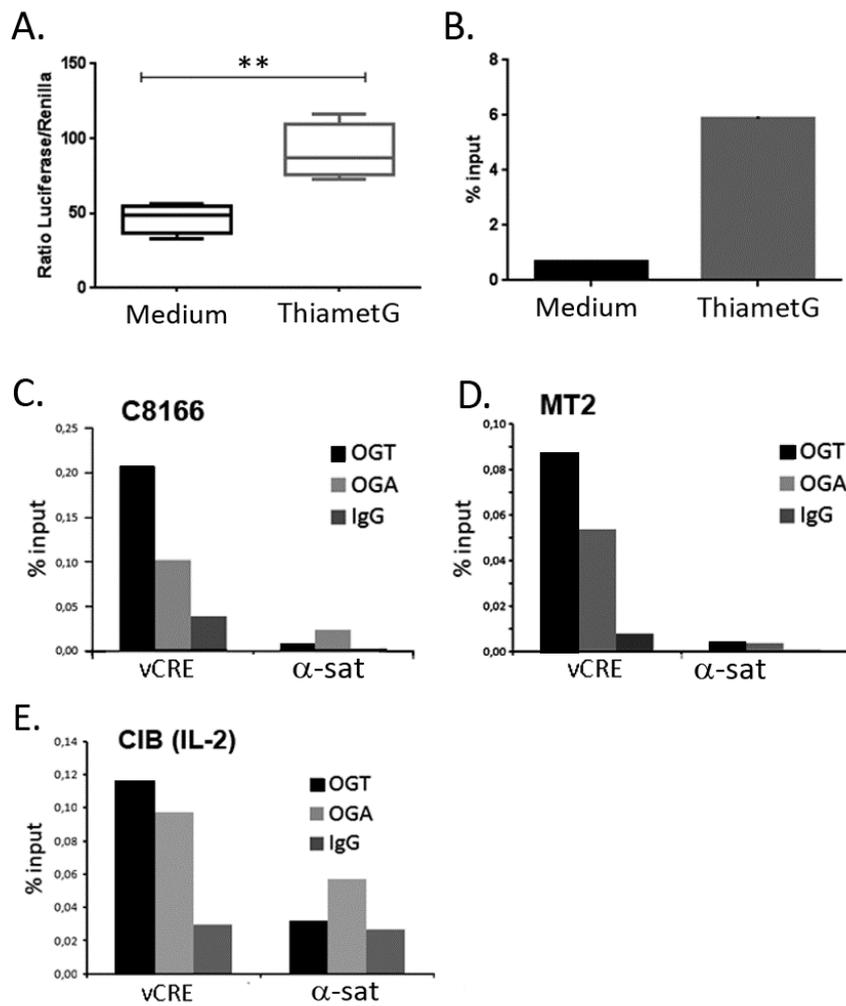


FIGURE 5

Figure 5. Effect of O-GlcNAcylation on the HTLV-1 LTR. **(A)** Transactivation assay. C8166 T cells preincubated for 24h with medium containing or not the OGA inhibitor Thiamet G were transfected with the HTLV-1-LTR-luciferase reporter plasmid and pRL-TK normalization plasmid and incubated or not with Thiamet G for an additional period of 24h. Luciferase production was then measured using the dual luciferase assay. Results are from 4 independent experiments performed in duplicates. Statistical analysis was performed using Student's t test. **(B)** Anti-phospho-CREB ChIP experiments. C8166 T cells were cultivated with or without Thiamet G for 48h before chromatin preparation. Chromatin was precipitated with an anti-phospho-CREB (Ser¹³³) and recovered DNA was amplified using a pair of primers specific for the vCRE sequence. Results correspond to one representative experiment out of 2. **(C-E)** Anti-OGT or OGA ChIP experiments performed on C8166 **(C)** and MT2 **(D)** HTLV-1-transformed T cells or in HTLV-1-immortalized CIB T cells **(E)**. Cells were treated as above and chromatin was precipitated using anti-OGT or OGA antibody. Recovered DNA was amplified using pair of primers specific for the vCRE sequence or for alpha-satellite sequences as negative control. Results correspond to one representative experiment out of 2.

Discussion

IX. DISCUSSION.

L'expression des protéines virales et en particulier celle de la protéine Tax est cruciale dans les mécanismes aboutissant à l'établissement de l'oncogenèse associée au HTLV-1. En effet, Tax est une protéine oncogénique impliquée dans la modulation de nombreux processus cellulaires cruciaux comme la modulation du cycle cellulaire, l'activation des voies de signalisation comme la voie NF-kB ou l'induction d'altérations génétiques (pour revue, Currer et al., 2012). Tous ces processus conduisent à l'immortalisation lymphocytaire, première étape avant la transformation, menant au développement de l'ATL. L'étude, la caractérisation et la compréhension des mécanismes d'activation du LTR 5' à l'origine de la transcription des ARNm de Tax et des autres protéines virales sont donc de la plus haute importance afin d'envisager d'éventuelles thérapies.

Pour activer son promoteur localisé dans le LTR 5', Tax recrute différents cofacteurs au niveau d'éléments de réponses vCRE, site de réponse à l'AMPc, présents dans la région U3. Tax va ainsi recruter des dimères de CREB phosphorylés ainsi que d'autres protéines telles que CBP, p300 ou bien TORC afin de former un complexe de transactivation permettant d'initier la transcription. La phosphorylation de CREB est une étape cruciale dans la formation de ce complexe médié par Tax (Geiger et al., 2008). En effet, Tax va recruter les dimères de CREB phosphorylés et va augmenter la phosphorylation de CREB (Kim et al., 2007; Trevisan et al., 2004). En plus de la phosphorylation, CREB est aussi régulé par d'autres modifications post traductionnelles dont la O-GlcNAcylation, décrite comme régulant, avec la phosphorylation, l'activité et la stabilité de nombreux facteurs de transcription. La O-GlcNAcylation s'avère être une modification traductionnelle cruciale impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires telle que l'apoptose, la prolifération lymphocytaire ou bien l'activation de nombreuses voies de signalisation (pour revue, Hart, 2014). Il est, par conséquent aisément compréhensible qu'une modulation de la O-GlcNAcylation soit impliquée dans de nombreuses maladies dont le cancer.

Dans cette étude, grâce à une combinaison de différentes approches expérimentales, nous avons montré pour la première fois que dans le cas de l'infection par HTLV-1, il existait une modulation de la O-GlcNAcylation et que cela impactait directement la régulation du LTR 5' du virus.

I. Etude du statut d'O-GlcNAcylation dans des lignées transformées par HTLV-1.

La O-GlcNAcylation a été montrée comme dérégulée dans de nombreux types de cancers comme celui du sein, de l'endomètre, de la thyroïde ou bien de leucémies chroniques (pour revue, Fardini et al., 2013). Dans le cas de la leucémie induite par le virus HTLV-1, nous avons voulu évaluer pour la première fois le statut de la O-GlcNAcylation et de ses enzymes dans des lignées de lymphocytes T transformés par le virus. Nous avons observé que dans différentes lignées de lymphocytes T transformés par HTLV-1, le niveau d'expression en ARNm de l'OGA ainsi que l'expression de la protéine étaient fortement augmentés par rapport à des lignées de lymphocytes T contrôles. De manière intéressante, le niveau de l'OGT, quant à lui, ne variait pas que ce soit en ARN ou en protéine laissant penser que seule l'OGA était modulée. Nous avons par la suite mesuré l'activité enzymatique de l'OGA grâce à un test fluorométrique, et avons constaté que l'activité globale de l'enzyme ne variait pas de manière significative entre les différentes lignées. Cependant, lorsque cette activité globale a été corrigée par la quantité d'enzymes présentes dans les lignées, nous avons pu montrer que l'activité spécifique de l'OGA était fortement diminuée dans les cas des lymphocytes T infectés par le virus. Il y a donc plus d'OGA exprimée qui est, cependant, moins active laissant penser à une boucle de rétrocontrôle mise en place par la cellule. Il est à noter que le même phénomène a déjà été observé dans différentes études après traitement avec du PUGNAc, un inhibiteur de l'OGA, entraînant également une augmentation de l'expression de l'enzyme (Slawson et al., 2005; Zhang et al., 2014). Notre hypothèse est donc que l'inhibition de l'OGA entraîne une compensation par la cellule conduisant à l'augmentation du niveau d'expression de l'OGA par un mécanisme qui pour l'instant nous est inconnu. Bien qu'il semblerait que seule l'OGA soit modulée, il serait intéressant de pouvoir mesurer l'activité catalytique de l'OGT dans les lignées transformées par le virus. Les seuls tests disponibles lors de notre étude étaient basés, pour la plupart, sur l'utilisation de substrat de l'OGT marqué radioactivement nécessitant des infrastructures bien particulières que nous n'avons pas mis en place au sein du laboratoire. L'équipe du Dr Tarik Issad travaille sur la mise au point d'une technique permettant de suivre par fluorescence l'activité de l'OGT. Cependant, pour des raisons de sensibilité, cette mesure se fait pour le moment en

surexprimant l'OGT dans des 293T rendant pour le moment délicat la détection de l'activité endogène dans des lymphocytes.

II. Tax et la modulation de la O-GlcNAcylation.

La protéine Tax est décrite comme pouvant déréguler de nombreux processus cellulaires clés comme des voies de signalisation, le cycle cellulaire ou bien l'apoptose à l'origine de l'immortalisation lymphocytaire. Pour ce faire, Tax a la capacité d'interagir et de détourner de nombreuses protéines clés comme la protéine p65 dans le cas de l'activation de la voie NF-kB ou bien le facteur de transcription CREB qu'elle va séquestrer au niveau du LTR 5' pour l'activer (pour revue, Currer et al., 2012). Ces interactions sont, en grande partie, dues au fait que Tax a la capacité d'être modulée par de nombreuses modifications post traductionnelles comme l'ubiquitination, la SUMOylation ou bien la phosphorylation. La protéine Tax se révéla donc être une excellente candidate pour expliquer la modulation de l'activité catalytique de l'OGA. Nous avons donc, dans un premier temps, voulu savoir si la protéine Tax était ciblée par O-GlcNAcylation en purifiant la protéine Tax-His et en évaluant son niveau d'O-GlcNAcylation par immunoblot avec un anticorps anti-OGlcNAc RL2. Dans ce système, nous n'avons pas pu détecter la O-GlcNAcylation de Tax.. Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'impact de l'expression de Tax sur l'activité enzymatique de l'OGA et sur le niveau d'O-GlcNAcylation cellulaire. Grâce à une sonde fluorescente développée par l'équipe du Dr Tarik Issad, nous avons montré que l'expression de Tax dans les cellules 293T était associée à une augmentation du niveau de O-GlcNAcylation total pouvant s'expliquer par une inhibition de l'activité enzymatique de l'OGA. De manière intéressante, lors de la surexpression de la protéine Tax dans les cellules TLom-1, une lignée de lymphocytes T transformés par HTLV-1 mais n'exprimant plus la protéine Tax, l'activité OGA s'avère être drastiquement diminuée et associée à une augmentation de la O-GlcNAcylation. Les cellules TLom-1 se sont révélées être un modèle intéressant du fait de leur relevance physiologique. Cependant, ces cellules expriment toujours les ARNm et la protéine HBZ produits à partir du LTR 3'. Nous ne pouvons donc pas exclure que l'inhibition de l'OGA observée lors de la réexpression de la protéine dans les TLom-1 ne soit pas associée à HBZ. Ainsi, l'activité de l'OGA a été mesurée dans des cellules 293 T exprimant Tax et nous avons également observé une diminution de son activité. Ceci

révèle l'implication directe de Tax dans l'inhibition de l'activité de l'OGA. Tax est donc nécessaire et suffisante pour induire une inhibition de l'OGA, associée à une augmentation du niveau de O-GlcNAcylation cellulaire.

De manière surprenante, la surexpression de Tax dans les cellules TLom-1 est associée à une inhibition de l'OGA mais cela n'est pas suffisant pour augmenter l'expression de l'enzyme, comme observé dans les lignées de lymphocytes T transformés par le HTLV-1. Il est possible que l'augmentation de l'OGA par un mécanisme de compensation suite à son inhibition soit un processus d'adaptation à long terme, qui n'a donc pas pu être observé pendant les temps courts de l'expérience. Cette hypothèse est directement corrélée avec la physiopathologie de l'ATL qui est la résultante d'une série d'altérations et de modulations cellulaires, sous l'effet des protéines Tax et HBZ en grande partie, se développant sur 20 à 80 ans (Gessain, 2011). De manière intéressante, nos expériences préliminaires réalisées sur des cellules sanguines de patients ATL ont montré l'expression de formes de l'OGA de tailles différentes des trois formes décrites à ce jour. Ces formes peuvent être la résultante de différents clivages de l'OGA qui pourrait être associés à une activité enzymatique diminuée. Chez les patients ATL, la protéine Tax n'est plus exprimée, cependant les différents effets de la protéine qui ont conduit à l'immortalisation lymphocytaire sont toujours présents. L'hypothèse actuelle est que la cellule va acquérir un grand nombre d'altérations génétiques sous l'effet de Tax qui vont être conservées, par accumulation de mutations au niveau des cibles de Tax, chez le clone à l'origine de la leucémie même en absence de Tax (Matsuoka and Jeang, 2011). Les différentes formes de l'OGA retrouvées peuvent donc être la résultante de ces altérations. L'OGA serait donc moins active même en absence de Tax. Nous avons voulu mesurer l'activité enzymatique de l'OGA dans ces échantillons de patients et avons observé une diminution dans certains cas. Néanmoins, le nombre limité d'échantillons que nous avons pu tester ne nous a pas permis de détecter une réduction statistiquement significative.

III. Tax et la modulation du complexe OGlcNAzyme.

La nature du mécanisme d'action à l'origine de l'inhibition de l'OGA était un point important à élucider dans la compréhension du phénomène observé au cours de notre étude. Tax a la particularité d'interagir avec de nombreuses protéines afin de moduler leurs activités. Notre première hypothèse a donc été de déterminer si Tax interagissait avec les enzymes du complexe OGlcNAzyme. Pour ce faire différentes constructions plasmidiques ont été générées au sein du laboratoire afin de pouvoir étudier par la technique de transfert de bioluminescence (BRET), réalisées en collaboration avec le Dr Mostafa Khair, les interactions entre Tax et les membres du complexe. Ainsi, nous avons observé que Tax interagissait aussi bien avec l'OGT qu'avec l'OGA, avec cependant une plus forte interaction avec l'OGT, relevée par un signal de BRET plus important. Ces interactions OGT/Tax et OGA/Tax ont aussi été confirmées par co-immunoprecipitation avec encore une fois un signal beaucoup plus important pour la liaison Tax/OGT. De manière intéressante, la présence de Tax entraîne un changement d'affinité entre l'OGA et l'OGT au sein du complexe mesuré par BRET et par BRET saturation nous permettant de supposer que Tax inhiberait l'activité de l'OGA en modulant l'affinité au sein du complexe OGlcNAzyme. Cette hypothèse fut confirmée par des expériences d'immunoprecipitations où l'on a mesuré au sein du complexe OGlcNAzyme l'activité de l'OGA en présence de Tax. Les résultats ont montré que l'activité de l'OGA au sein du complexe était significativement diminuée en présence de Tax. Cependant, malgré ces différentes observations, nous ne savons pas à l'heure actuelle en quoi le changement d'affinité entre l'OGA et l'OGT, médié par Tax, peut entraîner une diminution de l'activité de l'OGA. Plusieurs hypothèses peuvent être avancées comme le fait que Tax, en augmentant l'affinité entre l'OGA et l'OGT, pourrait masquer le site catalytique de l'OGA entraînant alors un encombrement stérique à l'origine de l'inhibition. De plus, il a été décrit dans la littérature que l'OGA pouvait être OGlcNAcylée par l'OGT (Lazarus et al., 2006; Zhang et al., 2014). Nous pouvons donc imaginer que la O-GlcNAcylation de l'OGA par l'OGT puisse moduler l'activité catalytique de l'enzyme. Enfin, il a été décrit que l'OGT interagissait avec de nombreuses kinases comme la kinase AuroraB laissant imaginer qu'une régulation par phosphorylation de l'OGA puisse aussi moduler son activité (Slawson et al., 2008). Quoiqu'il en soit, le mécanisme reste encore à élucider.

IV. Impact de la modulation de la O-GlcNAcylation.

Nous avons découvert qu'un des impacts de l'inhibition de l'activité enzymatique de l'OGA par Tax concerne CREB et la transactivation du LTR 5'. En effet, nous avons montré que dans les TLoM-1, la réexpression de Tax était associée à une augmentation de la liaison de CREB, à une lectine capable de lier les protéines O-GlcNAcylées, suggérant un effet sur la O-GlcNAcylation de cette protéine. La phosphorylation de CREB sur la sérine 133 est nécessaire afin de former le complexe de transcription recruté par Tax au niveau du LTR composé notamment par CBP, P300 et les co-activateurs TORC (Geiger et al., 2008; Kim et al., 2010) . Il a, de plus, été montré dans la littérature que le niveau de CREB phosphorylé dans les lignées de lymphocytes T transformés par HTLV-1 est plus élevé et que Tax entraîne l'augmentation de la phosphorylation de CREB (Kim et al., 2007; Trevisan et al., 2004). De plus, il est admis que la phosphorylation et la O-GlcNAcylation agissent de manière dynamique en compétition ou bien de manière synergique pour réguler l'activité de facteur de transcription et CREB n'échappe pas à la règle. En effet, CREB a été décrit comme étant régulé par phosphorylation sur la sérine 133 mais aussi par O-GlcNAcylation au niveau des thréonines 227, 228, 259 et 261 ainsi que sur les sérines 40 et 260 (Lamarre-Vincent and Hsieh-Wilson, 2003; Rexach et al., 2012) . Cependant des expériences de mutations des différents sites de O-GlcNAcylation ont montré que la serine 40 s'avère être le site majeur d'O-GlcNAcylation de la protéine. Au vu de ces résultats et de ces données, nous avons voulu savoir si la O-GlcNAcylation de CREB pouvait agir de manière positive ou bien négative dans la formation du complexe de transcription nécessaire à l'activation du LTR 5'. De manière intéressante, un traitement pharmacologique avec du ThiametG, permettant d'inhiber spécifiquement l'activité de l'OGA, est associé à une augmentation à la fois de l'activation du LTR 5' du virus HTLV-1 et du recrutement de CREB phosphorylé au niveau des éléments du LTR 5'. Ces résultats semblent donc être en faveur d'un effet coopératif entre phosphorylation et O-GlcNAcylation. Nous pouvons donc supposer dans notre étude que l'inhibition de l'OGA par Tax entraîne une augmentation de la O-GlcNAcylation de CREB favorisant alors sa phosphorylation, son recrutement et son activité transcriptionnelle. Cependant, une autre hypothèse est envisageable dans notre mécanisme puisque nous n'avons pas montré de manière directe que Tax augmente la O-GlcNAcylation de CREB. Nous ne pouvons pas exclure que l'augmentation de la liaison

de CREB à la lectine ne soit pas due à son interaction avec une autre protéine du complexe de transcription également régulée par O-GlcNAcylation. De façon intéressante, une étude récente montre dans des cellules neuronales que la PKA, kinase à l'origine de la phosphorylation de différents substrats dont CREB, est régulée au niveau de ses sous unités catalytiques par O-GlcNAcylation (Xie et al., 2016). L'O-GlcNAcylation de la PKA entraîne une augmentation de son activité et est associé à une forte augmentation de la phosphorylation de CREB. Ainsi dans notre modèle, nous ne pouvons exclure que la PKA ne soit pas modulée par O-GlcNAcylation, ce qui expliquerait l'augmentation de la phosphorylation de CREB et son recrutement associé à une activation du LTR 5'. En outre, différents éléments nous poussent à compléter notre interprétation comme le fait que la O-GlcNAcylation de CREB sur la serine 40 a été associée à une répression de son activité transcriptionnelle ou que la PKA contribue à l'activation du LTR 5' par Tax (Kadison et al., 1990; Rexach et al., 2012). En effet dans ces études, les auteurs montrent qu'en invalidant la PKA, l'activation du LTR en présence de Tax est toujours effective mais cependant beaucoup moins efficace qu'en présence de la PKA (Kadison et al., 1990; Turgeman and Aboud, 1998). Au vu de ces récentes observations, nous avons entrepris d'étudier le niveau d'O-GlcNAcylation de la PKA dans les lignées de lymphocytes T transformés par le HTLV-1 ainsi que son activité. Enfin, afin de déterminer de manière précise si CREB est plus O-GlcNAcylée en présence de Tax et quel est son effet sur la transcription du LTR, différents mutant de CREB au niveau des sérines 40 et 133 sont en train d'être produits au sein du laboratoire.

V- Conclusion et perspectives.

Nous pouvons, grâce à cette étude, proposer un nouveau modèle de transactivation du LTR 5' dans lequel Tax, en se liant au complexe OGlcNAzyme, va entraîner un changement de conformation entre l'OGA et l'OGT ce qui va conduire à une inhibition de l'activité catalytique de l'OGA (**figure 35 A**). De plus, le fait de retrouver CREB, Tax ainsi que l'OGA et l'OGT au sein des éléments vCRE du LTR 5' nous permet de supposer que Tax recrute ce complexe au niveau du LTR 5' afin d'augmenter la O-GlcNAcylation de CREB ou d'une autre protéine cellulaire comme la PKA permettant une augmentation de la phosphorylation de CREB (**figure 35 A et B**). Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) vont être réalisées afin de déterminer la présence de la PKA au

sein du complexe. De manière intéressante, le complexe OGlcNAzyme est retrouvé aussi bien dans des lignées transformées par le virus que dans des lignées immortalisées montrant que ce mécanisme est important aussi bien dans les phases précoces lors de la réplication du virus *in vivo* mais aussi dans des phases tardives, dans le développement de la maladie. En effet, le complexe a aussi été décrit comme recruté dans des CIB, des cellules primaires immortalisées par HTLV-1 mais toujours dépendantes de l'IL-2. Ces cellules nous permettent d'étudier les phases précoces du virus car elles ne sont pas transformées.

Nous avons également voulu avoir une idée de l'importance de ce mécanisme dans la prolifération des lignées de lymphocytes T transformés par le HTLV-1. Nous avons observé que cultiver des cellules C8166, lymphocytes T transformés par HTLV-1 et exprimant Tax, dans un milieu pauvre en glucose entraîne une perte de l'expression de Tax aussi bien en ARNm qu'en protéine montrant l'importance de la O-GlcNAcylation dans le processus de transactivation du LTR 5' à l'origine de la production des protéines virales.

De plus, d'autres protéines recrutées au sein du complexe de transcription ont été décrites comme étant modulées par O-GlcNAcylation dans la littérature. Ainsi, TORC 2 a été montrée comme étant OGlcNAcyliée au niveau des sérines 70 et 71, ce qui serait associé à une translocation de la protéine au sein du noyau. En effet, les mêmes sites sont ciblés par phosphorylation et ceci induit la séquestration de TORC 2 dans le cytoplasme (Al-Hakim et al., 2005; Srean et al., 2004). Le niveau de TORC OGlcNAcylié pourrait être observé dans notre système de surexpression dans les cellules TLOm-1 ainsi que dans les lignées HTLV-1. Le facteur de transcription CBP, lui aussi recruté au sein du complexe, a été décrit comme OGlcNAcylié mais l'impact de sa O-GlcNAcylation n'a pour le moment pas été décrit (Rexach et al., 2012).

La modulation de la O-GlcNAcylation par Tax pourrait aussi avoir un impact sur la O-GlcNAcylation des histones. En effet, le fait que Tax puisse recruter l'OGT ainsi que l'OGA au niveau de la chromatine peut laisser envisager que la O-GlcNAcylation des histones serait modulée afin de permettre une décompaction de la chromatine et de favoriser l'assemblage du complexe de transcription sur le LTR 5' et l'expression des gènes. L'implication de la O-GlcNAcylation des histones reste encore à déterminer cependant les études laissent à penser que la O-GlcNAcylation régule très finement avec d'autres modifications post traductionnelles l'état de compaction chromatinien (Dehennaut et al.,

2014). La modulation de l'état de la chromatine peut aussi être médiée via les enzymes TET impliquées dans la déméthylation des îlots cpG (Mariappa et al., 2013). Il a été montré que TET2 était retrouvée en complexe avec l'OGT au niveau de promoteur cellulaire fortement transcrit et au sein du laboratoire, nous avons pu montrer une interaction entre Tax et TET2 laissant penser à un probable complexe entre l'OGT/Tax/TET2. L'Arn pol II responsable de l'initiation de l'élongation, est aussi cible de O-GlcNAcylation au niveau de sa partie C-terminale (Comer and Hart, 2001). Cependant cette O-GlcNAcylation serait associée à une répression de son activité. Dans le cas du virus HTLV-1, nous pouvons envisager que Tax, en se liant au complexe OGlcNAzyme, pourrait le séquestrer au niveau du LTR 5' ou bien au niveau d'autres cibles empêchant alors cette fois-ci la O-GlcNAcylation de certains facteurs. Le niveau de O-GlcNAcylation de l'ARN pol II serait intéressant à observer dans les lignées de lymphocytes T transformés par le HTLV-1 et dans notre système de surexpression dans les cellules Tlom-1. Quoi qu'il en soit, notre hypothèse est que la modulation de l'activité du complexe OGlcNAzyme par Tax entrainerait un environnement d'O-GlcNAcylation favorable à la transcription virale (**figure 35 C**).

Comme décrit dans ce manuscrit, le processus à l'origine du développement de l'ATL est un mécanisme en plusieurs parties (Gessain, 2011). Ainsi on peut décrire une première phase d'immortalisation due à l'expression de la protéine Tax et une phase de transformation lymphocytaire où la protéine HBZ sera la seule à intervenir. Durant la dernière phase la protéine Tax n'est plus exprimée du à une perte d'expression du LTR 5' suite à une hyperméthylation, à l'apparition de mutation non sens ou bien à une délétion. Il serait intéressant de déterminer si la protéine HBZ pourrait interagir elle aussi avec le complexe OGlcNAzyme en absence de Tax. L'expression du LTR 3' est fortement dépendante de sp1 qui est ciblé par O-GlcNAcylation (Majumdar et al., 2006). Il serait intéressant d'évaluer dans les cellules Tlom-1 le niveau d'O-GlcNAcylation de sp1 et son impact sur l'activation du LTR 3'.

Enfin, au vu des capacités de Tax à moduler de multiples voies cellulaires conduisant à l'immortalisation lymphocytaire, nous pouvons imaginer que le détournement de la machinerie d'O-GlcNAcylation puisse moduler d'autres facteurs de transcription clés dans la cellule. Ainsi, nous nous sommes intéressés à la protéine p65 qui est une cible cruciale pour Tax afin d'activer de manière constitutive la voie NF-kB. La O-

GlcNAcylation de p65 a été associée dans la littérature en fonction du type cellulaire, en majorité à des effets activateurs même si des effets répresseurs sont décrits. En effet, il a été montré que la O-GlcNAcylation de p65 favorisait l'activation des sous unités IKK α et IKK β du complexe NEMO favorisant l'activation de la voie NF-kB (Ma et al., 2013). De plus, la O-GlcNAcylation de p65 a aussi été décrite comme diminuant son interaction avec l'inhibiteur I κ B α , favorisant ainsi son activité transcriptionnelle (Yang et al., 2008). La O-GlcNAcylation de p65 par l'OGT sur la thréonine 305 a aussi été montrée comme étant nécessaire à l'acétylation de p65 par p300 afin de permettre son activité transcriptionnelle en réponse à une stimulation au TNF- α (Allison et al., 2012). Dans le cas des lignées transformées par le virus HTLV-1, nos résultats préliminaires ont montré que la protéine p65 était plus fortement O-GlcNAcylée par rapport à des lymphocytes contrôles, laissant penser à une éventuelle modulation de la voie NF-kB.

Cette étude a donc été novatrice en montrant pour la première fois l'impact positif du détournement de la machinerie de la O-GlcNAcylation dans la régulation de l'expression des protéines virales d'HTLV-1 médiée par la protéine Tax. Elle permet aussi de poser de nouvelles questions quand à l'implication de la O-GlcNAcylation dans le développement de l'oncogenèse induite par le virus HTLV-1 mais également dans la compréhension de mécanismes généraux dans l'établissement des différents cancers.

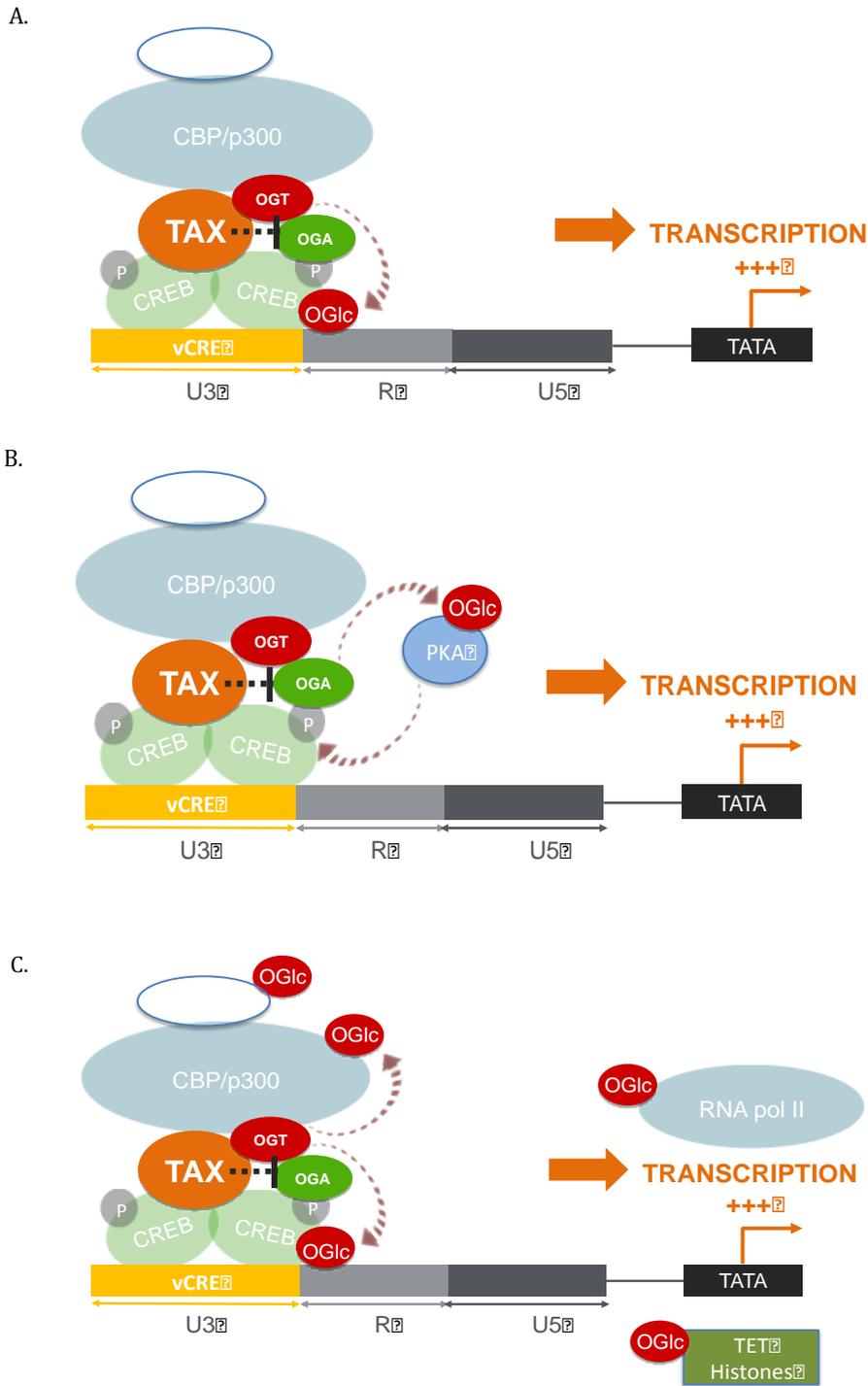


Figure 35 : Modèle hypothétique de transcription du LTR viral.

A. Représentation schématique dans lequel Tax recrute le complexe OGT/OGlc sur le LTR 5' entrainant alors une inhibition de l'OGA augmentant ainsi la O-GlcNAcylation de CREB et sa phosphorylation.

B. Représentation schématique dans laquelle Tax en se liant au complexe OGT/OGlc entraine une inhibition de l'OGA ce qui va augmenter la O-GlcNAcylation de la PKA. La PKA est alors plus active ce qui entraine une augmentation de la phosphorylation de CREB et l'activation du LTR.

C. Représentation schématique indiquant les différents facteurs de transcriptions pouvant être modulé par O-GlcNAcylation entrainant une augmentation de la transactivation du LTR.

Bibliographie

- Achong, B.G., Mansell, P.W., Epstein, M.A., and Clifford, P. (1971). An unusual virus in cultures from a human nasopharyngeal carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* *46*, 299–307.
- Afonso, P.V., Zamborlini, A., Saïb, A., and Mahieux, R. (2007). Centrosome and retroviruses: the dangerous liaisons. *Retrovirology* *4*, 27.
- Afonso, P.V., Ozden, S., Cumont, M.-C., Seilhean, D., Cartier, L., Rezaie, P., Mason, S., Lambert, S., Huerre, M., Gessain, A., et al. (2008). Alteration of blood-brain barrier integrity by retroviral infection. *PLoS Pathog.* *4*, e1000205.
- Afonso, P.V., Mekaouche, M., Mortreux, F., Toulza, F., Moriceau, A., Wattel, E., Gessain, A., Bangham, C.R.M., Dubreuil, G., Plumelle, Y., et al. (2010). Highly active antiretroviral treatment against HTLV-1 infection combining reverse transcriptase and HDAC inhibitors. *Blood* *116*, 3802–3808.
- Akagi, T., Ono, H., and Shimotohno, K. (1996). Expression of cell-cycle regulatory genes in HTLV-I infected T-cell lines: possible involvement of Tax1 in the altered expression of cyclin D2, p18Ink4 and p21Waf1/Cip1/Sdi1. *Oncogene* *12*, 1645–1652.
- Alexandre, C., and Verrier, B. (1991). Four regulatory elements in the human c-fos promoter mediate transactivation by HTLV-1 Tax protein. *Oncogene* *6*, 543–551.
- Alfaro, J.F., Gong, C.-X., Monroe, M.E., Aldrich, J.T., Clauss, T.R.W., Purvine, S.O., Wang, Z., Camp, D.G., Shabanowitz, J., Stanley, P., et al. (2012). Tandem mass spectrometry identifies many mouse brain O-GlcNAcylated proteins including EGF domain-specific O-GlcNAc transferase targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 7280–7285.
- Al-Hakim, A.K., Göransson, O., Deak, M., Toth, R., Campbell, D.G., Morrice, N.A., Prescott, A.R., and Alessi, D.R. (2005). 14-3-3 cooperates with LKB1 to regulate the activity and localization of QSK and SIK. *J. Cell Sci.* *118*, 5661–5673.
- Allison, D.F., Wamsley, J.J., Kumar, M., Li, D., Gray, L.G., Hart, G.W., Jones, D.R., and Mayo, M.W. (2012). Modification of RelA by O-linked N-acetylglucosamine links glucose metabolism to NF- κ B acetylation and transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 16888–16893.
- Ariumi, Y., Kaida, A., Lin, J.Y., Hirota, M., Masui, O., Yamaoka, S., Taya, Y., and Shimotohno, K. (2000). HTLV-1 tax oncoprotein represses the p53-mediated trans-activation function through coactivator CBP sequestration. *Oncogene* *19*, 1491–1499.
- Arnulf, B., Villemain, A., Nicot, C., Mordelet, E., Charneau, P., Kersual, J., Zermati, Y., Mauviel, A., Bazarbachi, A., and Hermine, O. (2002). Human T-cell lymphotropic virus oncoprotein Tax represses TGF-beta 1 signaling in human T cells via c-Jun activation: a potential mechanism of HTLV-I leukemogenesis. *Blood* *100*, 4129–4138.
- Arpin-André, C., Laverdure, S., Barbeau, B., Gross, A., and Mesnard, J.-M. (2014). Construction of a reporter vector for analysis of bidirectional transcriptional activity of retrovirus LTR. *Plasmid* *74*, 45–51.
- Aschauer, L., and Muller, P.A.J. (2016). Novel targets and interaction partners of mutant p53 Gain-Of-Function. *Biochem. Soc. Trans.* *44*, 460–466.

- Azakami, K., Sato, T., Araya, N., Utsunomiya, A., Kubota, R., Suzuki, K., Hasegawa, D., Izumi, T., Fujita, H., Aratani, S., et al. (2009). Severe loss of invariant NKT cells exhibiting anti-HTLV-1 activity in patients with HTLV-1-associated disorders. *Blood* *114*, 3208–3215.
- Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* *226*, 1209–1211.
- Bangham, C.R.M., Cook, L.B., and Melamed, A. (2014). HTLV-1 clonality in adult T-cell leukaemia and non-malignant HTLV-1 infection. *Semin. Cancer Biol.* *26*, 89–98.
- Barbeau, B., and Mesnard, J.-M. (2015). Does chronic infection in retroviruses have a sense? *Trends Microbiol.* *23*, 367–375.
- Barré-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vézinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* *220*, 868–871.
- Bartoe, J.T., Albrecht, B., Collins, N.D., Robek, M.D., Ratner, L., Green, P.L., and Lairmore, M.D. (2000). Functional role of pX open reading frame II of human T-lymphotropic virus type 1 in maintenance of viral loads in vivo. *J. Virol.* *74*, 1094–1100.
- Basbous, J., Arpin, C., Gaudray, G., Piechaczyk, M., Devaux, C., and Mesnard, J.-M. (2003). The HBZ factor of human T-cell leukemia virus type I dimerizes with transcription factors JunB and c-Jun and modulates their transcriptional activity. *J. Biol. Chem.* *278*, 43620–43627.
- Bazarbachi, A., Plumelle, Y., Carlos Ramos, J., Tortevoeye, P., Otroock, Z., Taylor, G., Gessain, A., Harrington, W., Panelatti, G., and Hermine, O. (2010). Meta-analysis on the use of zidovudine and interferon-alfa in adult T-cell leukemia/lymphoma showing improved survival in the leukemic subtypes. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *28*, 4177–4183.
- Belgnaoui, S.M., Fryrear, K.A., Nyalwidhe, J.O., Guo, X., and Semmes, O.J. (2010). The viral oncoprotein tax sequesters DNA damage response factors by tethering MDC1 to chromatin. *J. Biol. Chem.* *285*, 32897–32905.
- Belrose, G., Gross, A., Olindo, S., Lézin, A., Dueymes, M., Komla-Soukha, I., Smadja, D., Tanaka, Y., Willems, L., Mesnard, J.-M., et al. (2011). Effects of valproate on Tax and HBZ expression in HTLV-1 and HAM/TSP T lymphocytes. *Blood* *118*, 2483–2491.
- Bhattacharyya, J., Xuma, M., Reitz, M., Sarin, P.S., and Gallo, R.C. (1973). Utilization of mammalian 70S RNA by a purified reverse transcriptase from human myelocytic leukemic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *54*, 324–334.
- Biggar, R.J., Ng, J., Kim, N., Hisada, M., Li, H.-C., Cranston, B., Hanchard, B., and Maloney, E.M. (2006). Human leukocyte antigen concordance and the transmission risk via breast-feeding of human T cell lymphotropic virus type I. *J. Infect. Dis.* *193*, 277–282.

- Blot, V., Perugi, F., Gay, B., Prévost, M.-C., Briant, L., Tangy, F., Abriel, H., Staub, O., Dokh lar, M.-C., and Pique, C. (2004). 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.* *117*, 2357–2367.
- Blumberg, B.S., Larouz , B., London, W.T., Werner, B., Hesser, J.E., Millman, I., Saimot, G., and Payet, M. (1975). The relation of infection with the hepatitis B agent to primary hepatic carcinoma. *Am. J. Pathol.* *81*, 669–682.
- Bobrow, S.N., Smith, R.G., Reitz, M.S., and Gallo, R.C. (1972). Stimulated normal human lymphocytes contain a ribonuclease-sensitive DNA polymerase distinct from viral RNA-directed DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *69*, 3228–3232.
- Boxus, M., Twizere, J.-C., Legros, S., Dewulf, J.-F., Kettmann, R., and Willems, L. (2008). The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology* *5*, 76.
- Boxus, M., Twizere, J.-C., Legros, S., Kettmann, R., and Willems, L. (2012). Interaction of HTLV-1 Tax with minichromosome maintenance proteins accelerates the replication timing program. *Blood* *119*, 151–160.
- Braidman, I., Carroll, M., Dance, N., Robinson, D., Poenaru, L., Weber, A., Dreyfus, J.C., Overdijk, B., and Hooghwinkel, G.J. (1974). Characterisation of human N-acetyl-beta-hexosaminidase C. *FEBS Lett.* *41*, 181–184.
- Brauweiler, A., Garrus, J.E., Reed, J.C., and Nyborg, J.K. (1997). Repression of bax gene expression by the HTLV-1 Tax protein: implications for suppression of apoptosis in virally infected cells. *Virology* *231*, 135–140.
- Brites, C., Sampalo, J., and Oliveira, A. (2009). HIV/human T-cell lymphotropic virus coinfection revisited: impact on AIDS progression. *AIDS Rev.* *11*, 8–16.
- Broschat, K.O., Gorka, C., Page, J.D., Martin-Berger, C.L., Davies, M.S., Huang Hc, H., Gulve, E.A., Salsgiver, W.J., and Kasten, T.P. (2002). Kinetic characterization of human glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase I: potent feedback inhibition by glucosamine 6-phosphate. *J. Biol. Chem.* *277*, 14764–14770.
- Butkinaree, C., Cheung, W.D., Park, S., Park, K., Barber, M., and Hart, G.W. (2008). Characterization of beta-N-acetylglucosaminidase cleavage by caspase-3 during apoptosis. *J. Biol. Chem.* *283*, 23557–23566.
- Calattini, S., Chevalier, S.A., Duprez, R., Bassot, S., Froment, A., Mahieux, R., and Gessain, A. (2005). Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology* *2*, 30.
- Calattini, S., Chevalier, S.A., Duprez, R., Afonso, P., Froment, A., Gessain, A., and Mahieux, R. (2006). Human T-cell lymphotropic virus type 3: complete nucleotide sequence and characterization of the human tax3 protein. *J. Virol.* *80*, 9876–9888.
- Calattini, S., Betsem, E., Bassot, S., Chevalier, S.A., Mahieux, R., Froment, A., and Gessain, A. (2009). New strain of human T lymphotropic virus (HTLV) type 3 in a Pygmy from Cameroon with peculiar HTLV serologic results. *J. Infect. Dis.* *199*, 561–564.

- Caldwell, S.A., Jackson, S.R., Shahriari, K.S., Lynch, T.P., Sethi, G., Walker, S., Vosseller, K., and Reginato, M.J. (2010). Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene* 29, 2831–2842.
- Cao, S., Maldonado, J.O., Grigsby, I.F., Mansky, L.M., and Zhang, W. (2015). Analysis of human T-cell leukemia virus type 1 particles by using cryo-electron tomography. *J. Virol.* 89, 2430–2435.
- Caron, C., Mengus, G., Dubrowskaya, V., Roisin, A., Davidson, I., and Jalinot, P. (1997). Human TAF(II)28 interacts with the human T cell leukemia virus type I Tax transactivator and promotes its transcriptional activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3662–3667.
- Carpentier, A., Barez, P.-Y., Hamaidia, M., Gazon, H., de Brogniez, A., Perike, S., Gillet, N., and Willems, L. (2015). Modes of Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Transmission, Replication and Persistence. *Viruses* 7, 3603–3624.
- Cartier, L., and Ramirez, E. (2005). Presence of HTLV-I Tax protein in cerebrospinal fluid from HAM/TSP patients. *Arch. Virol.* 150, 743–753.
- Cassar, O., Capuano, C., Bassot, S., Charavay, F., Duprez, R., Afonso, P.V., Abel, M., Walter, H., Mera, W., Martin, P.M.V., et al. (2007). Human T lymphotropic virus type 1 subtype C melanesian genetic variants of the Vanuatu Archipelago and Solomon Islands share a common ancestor. *J. Infect. Dis.* 196, 510–521.
- Cavrois, M., Gessain, A., Gout, O., Wain-Hobson, S., and Wattel, E. (2000). Common human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) integration sites in cerebrospinal fluid and blood lymphocytes of patients with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis indicate that HTLV-1 crosses the blood-brain barrier via clonal HTLV-1-infected cells. *J. Infect. Dis.* 182, 1044–1050.
- Cheab, B., Auguste, A., and Leary, A. (2015). The PI3K/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer: therapeutic opportunities and challenges. *Chin. J. Cancer* 34, 4–16.
- Chen, Z.J. (2005). Ubiquitin Signaling in the NF- κ B Pathway. *Nat. Cell Biol.* 7, 758–765.
- Chen, Q., Chen, Y., Bian, C., Fujiki, R., and Yu, X. (2013). TET2 promotes histone O-GlcNAcylation during gene transcription. *Nature* 493, 561–564.
- Cheng, X., and Hart, G.W. (2001). Alternative O-glycosylation/O-phosphorylation of serine-16 in murine estrogen receptor beta: post-translational regulation of turnover and transactivation activity. *J. Biol. Chem.* 276, 10570–10575.
- Choi, Y.B., and Harhaj, E.W. (2014). Functional implications of mitochondrial reactive oxygen species generated by oncogenic viruses. *Front. Biol.* 9, 423–436.
- Chou, T.Y., Hart, G.W., and Dang, C.V. (1995a). c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J. Biol. Chem.* 270, 18961–18965.

Chou, T.Y., Hart, G.W., and Dang, C.V. (1995b). c-Myc is glycosylated at threonine 58, a known phosphorylation site and a mutational hot spot in lymphomas. *J. Biol. Chem.* *270*, 18961–18965.

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

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

Collins, N.D., Newbound, G.C., Albrecht, B., Beard, J.L., Ratner, L., and Lairmore, M.D. (1998). Selective ablation of human T-cell lymphotropic virus type 1 p12I reduces viral infectivity in vivo. *Blood* *91*, 4701–4707.

Comer, F.I., and Hart, G.W. (2001). Reciprocity between O-GlcNAc and O-phosphate on the carboxyl terminal domain of RNA polymerase II. *Biochemistry (Mosc.)* *40*, 7845–7852.

Comtesse, N., Maldener, E., and Meese, E. (2001). Identification of a nuclear variant of MGEA5, a cytoplasmic hyaluronidase and a beta-N-acetylglucosaminidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *283*, 634–640.

Copeland, R.J., Bullen, J.W., and Hart, G.W. (2008). Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: roles in insulin resistance and glucose toxicity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *295*, E17–E28.

Couroucé, A.M., Pillonel, J., Lemaire, J.M., and Saura, C. (1998). HTLV testing in blood transfusion. *Vox Sang.* *74 Suppl 2*, 165–169.

Cully, M., You, H., Levine, A.J., and Mak, T.W. (2006). Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 184–192.

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

Dai, C., and Gu, W. (2010). p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol. Med.* *16*, 528–536.

De Castro-Costa, C.M., Araújo, A.Q.C., Barreto, M.M., Takayanagui, O.M., Sohler, M.P., da Silva, E.L.M., de Paula, S.M.B., Ishak, R., Ribas, J.G.R., Roviroso, L.C., et al. (2006). Proposal for diagnostic criteria of tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM). *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *22*, 931–935.

Dehennaut, V., Leprince, D., and Lefebvre, T. (2014). O-GlcNAcylation, an epigenetic mark. Focus on the histone code, TET family proteins, and polycomb group proteins. *Mol. Struct. Endocrinol.* *5*, 155.

- Dodon, M.D., Li, Z., Hamaia, S., and Gazzolo, L. (2004). Tax protein of human T-cell leukaemia virus type 1 induces interleukin 17 gene expression in T cells. *J. Gen. Virol.* *85*, 1921–1932.
- Dong, D.L., and Hart, G.W. (1994). Purification and characterization of an O-GlcNAc selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J. Biol. Chem.* *269*, 19321–19330.
- Dube, S., Bachman, S., Spicer, T., Love, J., Choi, D., Esteban, E., Ferrer, J.F., and Poiesz, B.J. (1997). Degenerate and specific PCR assays for the detection of bovine leukaemia virus and primate T cell leukaemia/lymphoma virus pol DNA and RNA: phylogenetic comparisons of amplified sequences from cattle and primates from around the world. *J. Gen. Virol.* *78 (Pt 6)*, 1389–1398.
- Ducu, R.I., Dayaram, T., and Marriott, S.J. (2011). The HTLV-1 Tax oncoprotein represses Ku80 gene expression. *Virology* *416*, 1–8.
- Easley, R., Carpio, L., Guendel, I., Klase, Z., Choi, S., Kehn-Hall, K., Brady, J.N., and Kashanchi, F. (2010). Human T-lymphotropic virus type 1 transcription and chromatin-remodeling complexes. *J. Virol.* *84*, 4755–4768.
- Edwards, D., Fenizia, C., Gold, H., de Castro-Amarante, M.F., Buchmann, C., Pise-Masison, C.A., and Franchini, G. (2011). Orf-I and orf-II-encoded proteins in HTLV-1 infection and persistence. *Viruses* *3*, 861–885.
- Epstein, M.A., Henle, G., Achong, B.G., and Barr, Y.M. (1965). MORPHOLOGICAL AND BIOLOGICAL STUDIES ON A VIRUS IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *J. Exp. Med.* *121*, 761–770.
- Fardini, Y., Dehennaut, V., Lefebvre, T., and Issad, T. (2013). O-GlcNAcylation: A New Cancer Hallmark? *Front. Endocrinol.* *4*.
- Fogarty, K.H., Zhang, W., Grigsby, I.F., Johnson, J.L., Chen, Y., Mueller, J.D., and Mansky, L.M. (2011). New insights into HTLV-1 particle structure, assembly, and Gag-Gag interactions in living cells. *Viruses* *3*, 770–793.
- Fu, J., Qu, Z., Yan, P., Ishikawa, C., Aqeilan, R.I., Rabson, A.B., and Xiao, G. (2011). The tumor suppressor gene WWOX links the canonical and noncanonical NF- κ B pathways in HTLV-I Tax-mediated tumorigenesis. *Blood* *117*, 1652–1661.
- Fujii, M., Tsuchiya, H., Meng, X.B., and Seiki, M. (1995). c-Jun, c-Fos and their family members activate the transcription mediated by three 21-bp repetitive sequences in the HTLV-I long terminal repeat. *Intervirology* *38*, 221–228.
- Fujii, M., Iwai, K., Oie, M., Fukushi, M., Yamamoto, N., Kannagi, M., and Mori, N. (2000). Activation of oncogenic transcription factor AP-1 in T cells infected with human T cell leukemia virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *16*, 1603–1606.
- Fujiki, R., Hashiba, W., Sekine, H., Yokoyama, A., Chikanishi, T., Ito, S., Imai, Y., Kim, J., He, H.H., Igarashi, K., et al. (2011). GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. *Nature* *480*, 557–560.

- Fukuda, R.-I., Tsuchiya, K., Suzuki, K., Itoh, K., Fujita, J., Utsunomiya, A., and Tsuji, T. (2012). HTLV-I Tax regulates the cellular proliferation through the down-regulation of PIP3-phosphatase expressions via the NF- κ B pathway. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 3, 95–104.
- Fukumoto, R. (2013). Human T-lymphotropic virus type 1 non-structural proteins: Requirements for latent infection. *Cancer Sci.* 104, 983–988.
- Furukawa, Y., Kubota, R., Tara, M., Izumo, S., and Osame, M. (2001). Existence of escape mutant in HTLV-I tax during the development of adult T-cell leukemia. *Blood* 97, 987–993.
- Gabet, A.S., Mortreux, F., Talarmin, A., Plumelle, Y., Leclercq, I., Leroy, A., Gessain, A., Clity, E., Joubert, M., and Wattel, E. (2000). High circulating proviral load with oligoclonal expansion of HTLV-1 bearing T cells in HTLV-1 carriers with strongyloidiasis. *Oncogene* 19, 4954–4960.
- Gallo, R.C. (1981). Kyoto Workshop on some specific recent advances in human tumor virology. *Cancer Res.* 41, 4738–4739.
- Gallo, R.C. (2005). The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology* 2, 17.
- Gallo, R.C., Blattner, W.A., Reitz, M.S., and Ito, Y. (1982). HTLV: the virus of adult T-cell leukaemia in Japan and elsewhere. *Lancet Lond. Engl.* 1, 683.
- Gao, Y., Wells, L., Comer, F.I., Parker, G.J., and Hart, G.W. (2001). Dynamic O-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-N-acetylglucosaminidase from human brain. *J. Biol. Chem.* 276, 9838–9845.
- Gaudray, G., Gachon, F., Basbous, J., Biard-Piechaczyk, M., Devaux, C., and Mesnard, J.-M. (2002). The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. *J. Virol.* 76, 12813–12822.
- Geiger, T.R., Sharma, N., Kim, Y.-M., and Nyborg, J.K. (2008). The human T-cell leukemia virus type 1 tax protein confers CBP/p300 recruitment and transcriptional activation properties to phosphorylated CREB. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1383–1392.
- Gessain, A. (1999). Origine et diversité génétique des HTLV-I/STLV-I : des singes et des hommes. *Virologie* 3, 403–417.
- Gessain, A. (2011). [Human retrovirus HTLV-1: descriptive and molecular epidemiology, origin, evolution, diagnosis and associated diseases]. *Bull. Société Pathol. Exot.* 1990 104, 167–180.
- Gessain, A., and Cassar, O. (2012). Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front. Microbiol.* 3, 388.

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

Gessain, A., and de Thé, G. (1996). Geographic and molecular epidemiology of primate T lymphotropic retroviruses: HTLV-I, HTLV-II, STLV-I, STLV-PP, and PTLV-L. *Adv. Virus Res.* 47, 377–426.

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

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

Gewinner, C., Hart, G., Zachara, N., Cole, R., Beisenherz-Huss, C., and Groner, B. (2004). The coactivator of transcription CREB-binding protein interacts preferentially with the glycosylated form of Stat5. *J. Biol. Chem.* 279, 3563–3572.

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

Ghorbel, S., Sinha-Datta, U., Dundr, M., Brown, M., Franchini, G., and Nicot, C. (2006). Human T-cell leukemia virus type I p30 nuclear/nucleolar retention is mediated through interactions with RNA and a constituent of the 60 S ribosomal subunit. *J. Biol. Chem.* 281, 37150–37158.

Gilden, R.V., Long, C.W., Hanson, M., Toni, R., Charman, H.P., Oroszlan, S., Miller, J.M., and Van der Maaten, M.J. (1975). Characteristics of the major internal protein and RNA-dependent DNA polymerase of bovine leukaemia virus. *J. Gen. Virol.* 29, 305–314.

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

Giri, A., Markham, P., Digilio, L., Hurteau, G., Gallo, R.C., and Franchini, G. (1994). Isolation of a novel simian T-cell lymphotropic virus from *Pan paniscus* that is distantly related to the human T-cell leukemia/lymphotropic virus types I and II. *J. Virol.* 68, 8392–8395.

Gonçalves, D.U., Proietti, F.A., Ribas, J.G.R., Araújo, M.G., Pinheiro, S.R., Guedes, A.C., and Carneiro-Proietti, A.B.F. (2010). Epidemiology, Treatment, and Prevention of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Associated Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 577–589.

Gotuzzo, E., Cabrera, J., Deza, L., Verdonck, K., Vandamme, A.-M., Cairampoma, R., Vizcarra, D., Cabada, M., Narvarte, G., and De las Casas, C. (2004). Clinical characteristics of patients in Peru with human T cell lymphotropic virus type 1-associated tropical spastic paraparesis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 39, 939–944.

- Goubau, P., Van Brussel, M., Vandamme, A.M., Liu, H.F., and Desmyter, J. (1994). A primate T-lymphotropic virus, PTLV-L, different from human T-lymphotropic viruses types I and II, in a wild-caught baboon (*Papio hamadryas*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 2848–2852.
- Grassmann, R., Berchtold, S., Radant, I., Alt, M., Fleckenstein, B., Sodroski, J.G., Haseltine, W.A., and Ramstedt, U. (1992). Role of human T-cell leukemia virus type 1 X region proteins in immortalization of primary human lymphocytes in culture. *J. Virol.* *66*, 4570–4575.
- Gregory, M.A., Qi, Y., and Hann, S.R. (2003). Phosphorylation by glycogen synthase kinase-3 controls c-myc proteolysis and subnuclear localization. *J. Biol. Chem.* *278*, 51606–51612.
- Greis, K.D., Gibson, W., and Hart, G.W. (1994). Site-specific glycosylation of the human cytomegalovirus tegument basic phosphoprotein (UL32) at serine 921 and serine 952. *J. Virol.* *68*, 8339–8349.
- Griffith, L.S., and Schmitz, B. (1999). O-linked N-acetylglucosamine levels in cerebellar neurons respond reciprocally to perturbations of phosphorylation. *Eur. J. Biochem. FEBS* *262*, 824–831.
- Gröne, M., Koch, C., and Grassmann, R. (1996). The HTLV-1 Rex protein induces nuclear accumulation of unspliced viral RNA by avoiding intron excision and degradation. *Virology* *218*, 316–325.
- Gross, L. (1951). "Spontaneous" leukemia developing in C3H mice following inoculation in infancy, with AK-leukemic extracts, or AK-embryos. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* *N 76*, 27–32.
- Grossman, W.J., Kimata, J.T., Wong, F.H., Zutter, M., Ley, T.J., and Ratner, L. (1995). Development of leukemia in mice transgenic for the tax gene of human T-cell leukemia virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 1057–1061.
- Gu, Y., Mi, W., Ge, Y., Liu, H., Fan, Q., Han, C., Yang, J., Han, F., Lu, X., and Yu, W. (2010). GlcNAcylation Plays an Essential Role in Breast Cancer Metastasis. *Cancer Res.* *70*, 6344–6351.
- Hakata, Y., Umemoto, T., Matsushita, S., and Shida, H. (1998). 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.* *72*, 6602–6607.
- Haltiwanger, R.S., Holt, G.D., and Hart, G.W. (1990). Enzymatic addition of O-GlcNAc to nuclear and cytoplasmic proteins. Identification of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:peptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* *265*, 2563–2568.
- Haltiwanger, R.S., Blomberg, M.A., and Hart, G.W. (1992). Glycosylation of nuclear and cytoplasmic proteins. Purification and characterization of a uridine diphospho-N-acetylglucosamine:polypeptide beta-N-acetylglucosaminyltransferase. *J. Biol. Chem.* *267*, 9005–9013.

- Haltiwanger, R.S., Grove, K., and Philipsberg, G.A. (1998). Modulation of O-linked N-acetylglucosamine levels on nuclear and cytoplasmic proteins in vivo using the peptide O-GlcNAc-beta-N-acetylglucosaminidase inhibitor O-(2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosylidene)amino-N-phenylcarbamate. *J. Biol. Chem.* *273*, 3611–3617.
- Hanover, J.A., Lai, Z., Lee, G., Lubas, W.A., and Sato, S.M. (1999). Elevated O-linked N-acetylglucosamine metabolism in pancreatic beta-cells. *Arch. Biochem. Biophys.* *362*, 38–45.
- Hanover, J.A., Yu, S., Lubas, W.B., Shin, S.H., Ragano-Caracciola, M., Kochran, J., and Love, D.C. (2003). Mitochondrial and nucleocytoplasmic isoforms of O-linked GlcNAc transferase encoded by a single mammalian gene. *Arch. Biochem. Biophys.* *409*, 287–297.
- Hanover, J.A., Forsythe, M.E., Hennessey, P.T., Brodigan, T.M., Love, D.C., Ashwell, G., and Krause, M. (2005). A *Caenorhabditis elegans* model of insulin resistance: altered macronutrient storage and dauer formation in an OGT-1 knockout. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 11266–11271.
- Harhaj, E.W., and Sun, S.C. (1999). IKKgamma serves as a docking subunit of the IkkappaB kinase (IKK) and mediates interaction of IKK with the human T-cell leukemia virus Tax protein. *J. Biol. Chem.* *274*, 22911–22914.
- Harrod, R., Kuo, Y.L., Tang, Y., Yao, Y., Vassilev, A., Nakatani, Y., and Giam, C.Z. (2000). 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.* *275*, 11852–11857.
- Hart, G.W. (2014). Three Decades of Research on O-GlcNAcylation - A Major Nutrient Sensor That Regulates Signaling, Transcription and Cellular Metabolism. *Front. Endocrinol.* *5*, 183.
- Hasegawa, H., Sawa, H., Lewis, M.J., Orba, Y., Sheehy, N., Yamamoto, Y., Ichinohe, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Katano, H., Takahashi, H., et al. (2006). Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat. Med.* *12*, 466–472.
- Heckel, D., Comtesse, N., Brass, N., Blin, N., Zang, K.D., and Meese, E. (1998). Novel immunogenic antigen homologous to hyaluronidase in meningioma. *Hum. Mol. Genet.* *7*, 1859–1872.
- Heidecker, G., Lloyd, P.A., Fox, K., Nagashima, K., and Derse, D. (2004). Late assembly motifs of human T-cell leukemia virus type 1 and their relative roles in particle release. *J. Virol.* *78*, 6636–6648.
- Herchenröder, O., Renne, R., Loncar, D., Cobb, E.K., Murthy, K.K., Schneider, J., Mergia, A., and Luciw, P.A. (1994). Isolation, cloning, and sequencing of simian foamy viruses from chimpanzees (SFVcpz): high homology to human foamy virus (HFV). *Virology* *201*, 187–199.

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

Higuchi, M., Tsubata, C., Kondo, R., Yoshida, S., Takahashi, M., Oie, M., Tanaka, Y., Mahieux, R., Matsuoka, M., and Fujii, M. (2007). Cooperation of NF-kappaB2/p100 activation and the PDZ domain binding motif signal in human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax1 but not HTLV-2 Tax2 is crucial for interleukin-2-independent growth transformation of a T-cell line. *J. Virol.* *81*, 11900–11907.

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

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

Hirai, H., Suzuki, T., Fujisawa, J., Inoue, J., and Yoshida, M. (1994). Tax protein of human T-cell leukemia virus type I binds to the ankyrin motifs of inhibitory factor kappa B and induces nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B proteins for transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 3584–3588.

Huang, Y., Ohtani, K., Iwanaga, R., Matsumura, Y., and Nakamura, M. (2001). Direct trans-activation of the human cyclin D2 gene by the oncogene product Tax of human T-cell leukemia virus type I. *Oncogene* *20*, 1094–1102.

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

Ikezoe, T., Nishioka, C., Bandobashi, K., Yang, Y., Kuwayama, Y., Adachi, Y., Takeuchi, T., Koeffler, H.P., and Taguchi, H. (2007). Longitudinal inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling by LY294002 and rapamycin induces growth arrest of adult T-cell leukemia cells. *Leuk. Res.* *31*, 673–682.

Inoue, J., Seiki, M., Taniguchi, T., Tsuru, S., and Yoshida, M. (1986). Induction of interleukin 2 receptor gene expression by p40x encoded by human T-cell leukemia virus type 1. *EMBO J.* *5*, 2883–2888.

Ishii, T., Ishida, T., Utsunomiya, A., Inagaki, A., Yano, H., Komatsu, H., Iida, S., Imada, K., Uchiyama, T., Akinaga, S., et al. (2010). Defucosylated humanized anti-CCR4 monoclonal antibody KW-0761 as a novel immunotherapeutic agent for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 1520–1531.

Isono, O., Ohshima, T., Saeki, Y., Matsumoto, J., Hijikata, M., Tanaka, K., and Shimotohno, K. (2008). Human T-cell Leukemia Virus Type 1 HBZ Protein Bypasses the Targeting Function of Ubiquitination. *J. Biol. Chem.* *283*, 34273–34282.

Itkonen, H.M., Minner, S., Guldvik, I.J., Sandmann, M.J., Tsourlakis, M.C., Berge, V., Svindland, A., Schlomm, T., and Mills, I.G. (2013). O-GlcNAc transferase integrates

metabolic pathways to regulate the stability of c-MYC in human prostate cancer cells. *Cancer Res.* *73*, 5277–5287.

Itkonen, H.M., Gorad, S.S., Duveau, D.Y., Martin, S.E.S., Barkovskaya, A., Bathen, T.F., Moestue, S.A., and Mills, I.G. (2016). Inhibition of O-GlcNAc transferase activity reprograms prostate cancer cell metabolism. *Oncotarget* *7*, 12464–12476.

Itoyama, T., Sadamori, N., Tokunaga, S., Sasagawa, I., Nakamura, H., Yao, E., Jubashi, T., Yamada, Y., Ikeda, S., and Ichimaru, M. (1990). Cytogenetic studies of human T-cell leukemia virus type I carriers. A family study. *Cancer Genet. Cytogenet.* *49*, 157–163.

Iwai, K., Mori, N., Oie, M., Yamamoto, N., and Fujii, M. (2001). Human T-cell leukemia virus type 1 tax protein activates transcription through AP-1 site by inducing DNA binding activity in T cells. *Virology* *279*, 38–46.

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

Iyer, S.P.N., and Hart, G.W. (2003). Roles of the tetratricopeptide repeat domain in O-GlcNAc transferase targeting and protein substrate specificity. *J. Biol. Chem.* *278*, 24608–24616.

Izumo, S. (2010). Neuropathology of HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP): The 50th Anniversary of Japanese Society of Neuropathology. *Neuropathol. Off. J. Jpn. Soc. Neuropathol.* *30*, 480–485.

Jeang, K.-T. (2010). Human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and oncogene or oncomiR addiction? *Oncotarget* *1*, 453–456.

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

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

Jeong, S.-J., Radonovich, M., Brady, J.N., and Pise-Masison, C.A. (2004). HTLV-I Tax induces a novel interaction between p65/RelA and p53 that results in inhibition of p53 transcriptional activity. *Blood* *104*, 1490–1497.

Jeong, S.-J., Pise-Masison, C.A., Radonovich, M.F., Park, H.U., and Brady, J.N. (2005). Activated AKT regulates NF-kappaB activation, p53 inhibition and cell survival in HTLV-1-transformed cells. *Oncogene* *24*, 6719–6728.

Jin, D.Y., and Jeang, K.T. (1997). HTLV-I Tax self-association in optimal trans-activation function. *Nucleic Acids Res.* *25*, 379–387.

Jin, D.Y., Teramoto, H., Giam, C.Z., Chun, R.F., Gutkind, J.S., and Jeang, K.T. (1997). A human suppressor of c-Jun N-terminal kinase 1 activation by tumor necrosis factor alpha. *J. Biol. Chem.* *272*, 25816–25823.

- Jin, D.Y., Spencer, F., and Jeang, K.T. (1998). Human T cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax targets the human mitotic checkpoint protein MAD1. *Cell* 93, 81–91.
- Jin, Z., Nagakubo, D., Shirakawa, A.-K., Nakayama, T., Shigeta, A., Hieshima, K., Yamada, Y., and Yoshie, O. (2009). CXCR7 is inducible by HTLV-1 Tax and promotes growth and survival of HTLV-1-infected T cells. *Int. J. Cancer* 125, 2229–2235.
- Jones, K.S., Petrow-Sadowski, C., Huang, Y.K., Bertolette, D.C., and Ruscetti, F.W. (2008). Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nat. Med.* 14, 429–436.
- Józwiak, P., Forma, E., Bryś, M., and Krześlak, A. (2014). O-GlcNAcylation and Metabolic Reprograming in Cancer. *Front. Endocrinol.* 5, 145.
- Kadison, P., Poteat, H.T., Klein, K.M., and Faller, D.V. (1990). Role of protein kinase A in tax transactivation of the human T-cell leukemia virus type I long terminal repeat. *J. Virol.* 64, 2141–2148.
- Kalyanaraman, V.S., Sarngadharan, M.G., Poiesz, B., Ruscetti, F.W., and Gallo, R.C. (1981). Immunological properties of a type C retrovirus isolated from cultured human T-lymphoma cells and comparison to other mammalian retroviruses. *J. Virol.* 38, 906–915.
- Kalyanaraman, V.S., Sarngadharan, M.G., Robert-Guroff, M., Miyoshi, I., Golde, D., and Gallo, R.C. (1982). A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* 218, 571–573.
- Kannian, P., and Green, P.L. (2010). Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular Biology and Oncogenesis. *Viruses* 2, 2037–2077.
- Kanwal, S., Fardini, Y., Pagesy, P., N'tumba-Byn, T., Pierre-Eugène, C., Masson, E., Hampe, C., and Issad, T. (2013). O-GlcNAcylation-inducing treatments inhibit estrogen receptor α expression and confer resistance to 4-OH-tamoxifen in human breast cancer-derived MCF-7 cells. *PLoS One* 8, e69150.
- Kao, S.Y., and Marriott, S.J. (1999). Disruption of nucleotide excision repair by the human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *J. Virol.* 73, 4299–4304.
- Kataoka, K., Nagata, Y., Kitanaka, A., Shiraishi, Y., Shimamura, T., Yasunaga, J., Totoki, Y., Chiba, K., Sato-Otsubo, A., Nagae, G., et al. (2015). Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nat. Genet.* 47, 1304–1315.
- Kawakami, A., Nakashima, T., Sakai, H., Urayama, S., Yamasaki, S., Hida, A., Tsuboi, M., Nakamura, H., Ida, H., Migita, K., et al. (1999). Inhibition of caspase cascade by HTLV-I tax through induction of NF-kappaB nuclear translocation. *Blood* 94, 3847–3854.
- Kawauchi, K., Araki, K., Tobiume, K., and Tanaka, N. (2009). Loss of p53 enhances catalytic activity of IKK through O-linked -N-acetyl glucosamine modification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 3431–3436.
- Khour, G., Tarhini, M., Kooshyar, M.-M., El Hajj, H., Wattel, E., Mahmoudi, M., Hatoum, H., Rahimi, H., Maleki, M., Rafatpanah, H., et al. (2009). Phase 2 study of the efficacy and

safety of the combination of arsenic trioxide, interferon alpha, and zidovudine in newly diagnosed chronic adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL). *Blood* 113, 6528–6532.

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

Keshet, Y., and Seger, R. (2010). The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 661, 3–38.

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

Khidekel, N., Ficarro, S.B., Clark, P.M., Bryan, M.C., Swaney, D.L., Rexach, J.E., Sun, Y.E., Coon, J.J., Peters, E.C., and Hsieh-Wilson, L.C. (2007). Probing the dynamics of O-GlcNAc glycosylation in the brain using quantitative proteomics. *Nat. Chem. Biol.* 3, 339–348.

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

Kim, E.J., Perreira, M., Thomas, C.J., and Hanover, J.A. (2006a). An O-GlcNAcase-specific inhibitor and substrate engineered by the extension of the N-acetyl moiety. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 4234–4235.

Kim, S.-J., Nair, A.M., Fernandez, S., Mathes, L., and Lairmore, M.D. (2006b). Enhancement of LFA-1-mediated T cell adhesion by human T lymphotropic virus type 1 p12I1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 5463–5470.

Kim, Y.-M., Ramirez, J.A., Mick, J.E., Giebler, H.A., Yan, J.-P., and Nyborg, J.K. (2007). Molecular Characterization of the Tax-containing HTLV-1 Enhancer Complex Reveals a Prominent Role for CREB Phosphorylation in Tax Transactivation. *J. Biol. Chem.* 282, 18750–18757.

Kim, Y.-M., Geiger, T.R., Egan, D.I., Sharma, N., and Nyborg, J.K. (2010). The HTLV-1 tax protein cooperates with phosphorylated CREB, TORC2 and p300 to activate CRE-dependent cyclin D1 transcription. *Oncogene* 29, 2142–2152.

Koga, H., Ohshima, T., and Shimotohno, K. (2004). Enhanced activation of tax-dependent transcription of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) long terminal repeat by TORC3. *J. Biol. Chem.* 279, 52978–52983.

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

Komurian, F., Pelloquin, F., and de Thé, G. (1991). In vivo genomic variability of human T-cell leukemia virus type I depends more upon geography than upon pathologies. *J. Virol.* 65, 3770–3778.

- Konrad, R.J., Zhang, F., Hale, J.E., Knierman, M.D., Becker, G.W., and Kudlow, J.E. (2002). Alloxan is an inhibitor of the enzyme O-linked N-acetylglucosamine transferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 207–212.
- Koralnik, I.J., Boeri, E., Saxinger, W.C., Monico, A.L., Fullen, J., Gessain, A., Guo, H.G., Gallo, R.C., Markham, P., and Kalyanaraman, V. (1994). Phylogenetic associations of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic virus type I strains: evidence for interspecies transmission. *J. Virol.* 68, 2693–2707.
- Koyanagi, Y., Itoyama, Y., Nakamura, N., Takamatsu, K., Kira, J., Iwamasa, T., Goto, I., and Yamamoto, N. (1993). In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology* 196, 25–33.
- Kreppel, L.K., Blomberg, M.A., and Hart, G.W. (1997). Dynamic glycosylation of nuclear and cytosolic proteins. Cloning and characterization of a unique O-GlcNAc transferase with multiple tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.* 272, 9308–9315.
- Krueger, A., Fas, S.C., Giaisi, M., Bleumink, M., Merling, A., Stumpf, C., Baumann, S., Holtkotte, D., Bosch, V., Krammer, P.H., et al. (2006). HTLV-1 Tax protects against CD95-mediated apoptosis by induction of the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP). *Blood* 107, 3933–3939.
- Krześlak, A., Forma, E., Bernaciak, M., Romanowicz, H., and Bryś, M. (2012a). Gene expression of O-GlcNAc cycling enzymes in human breast cancers. *Clin. Exp. Med.* 12, 61–65.
- Krześlak, A., Wójcik-Krowiranda, K., Forma, E., Bieńkiewicz, A., and Bryś, M. (2012b). Expression of genes encoding for enzymes associated with O-GlcNAcylation in endometrial carcinomas: clinicopathologic correlations. *Ginekol. Pol.* 83, 22–26.
- Ku, S.C.Y., Lee, J., Lau, J., Gurumurthy, M., Ng, R., Lwa, S.H., Lee, J., Klase, Z., Kashanchi, F., and Chao, S.-H. (2008). XBP-1, a novel human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) tax binding protein, activates HTLV-1 basal and tax-activated transcription. *J. Virol.* 82, 4343–4353.
- Kuroda, Y., and Matsui, M. (1993). Cerebrospinal fluid interferon-gamma is increased in HTLV-I-associated myelopathy. *J. Neuroimmunol.* 42, 223–226.
- Lairmore, M.D., Haines, R., and Anupam, R. (2012). Mechanisms of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and disease. *Curr. Opin. Virol.* 2, 474–481.
- Lamarre-Vincent, N., and Hsieh-Wilson, L.C. (2003). Dynamic glycosylation of the transcription factor CREB: a potential role in gene regulation. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 6612–6613.
- Landry, S., Halin, M., Vargas, A., Lemasson, I., Mesnard, J.-M., and Barbeau, B. (2009). Upregulation of human T-cell leukemia virus type 1 antisense transcription by the viral tax protein. *J. Virol.* 83, 2048–2054.

- Lanoix, J., Lacoste, J., Pepin, N., Rice, N., and Hiscott, J. (1994). Overproduction of NF κ B2 (I κ B) and c-Rel: a mechanism for HTLV-I Tax-mediated trans-activation via the NF- κ B signalling pathway. *Oncogene* 9, 841–852.
- Larocca, D., Chao, L.A., Seto, M.H., and Brunck, T.K. (1989). Human T-cell leukemia virus minus strand transcription in infected T-cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 1006–1013.
- Lazarus, B.D., Love, D.C., and Hanover, J.A. (2006). Recombinant O-GlcNAc transferase isoforms: identification of O-GlcNAcase, yes tyrosine kinase, and tau as isoform-specific substrates. *Glycobiology* 16, 415–421.
- LeBreton, M., Switzer, W.M., Djoko, C.F., Gillis, A., Jia, H., Sturgeon, M.M., Shankar, A., Zheng, H., Nkeunen, G., Tamoufe, U., et al. (2014). A gorilla reservoir for human T-lymphotropic virus type 4. *Emerg. Microbes Infect.* 3, e7.
- Lefebvre, T., Alonso, C., Mahboub, S., Dupire, M.J., Zanetta, J.P., Caillet-Boudin, M.L., and Michalski, J.C. (1999). Effect of okadaic acid on O-linked N-acetylglucosamine levels in a neuroblastoma cell line. *Biochim. Biophys. Acta* 1472, 71–81.
- Lehky, T.J., Fox, C.H., Koenig, S., Levin, M.C., Flerlage, N., Izumo, S., Sato, E., Raine, C.S., Osame, M., and Jacobson, S. (1995). Detection of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax RNA in the central nervous system of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by in situ hybridization. *Ann. Neurol.* 37, 167–175.
- Lehman, D.M., Fu, D.-J., Freeman, A.B., Hunt, K.J., Leach, R.J., Johnson-Pais, T., Hamlington, J., Dyer, T.D., Arya, R., Abboud, H., et al. (2005). A single nucleotide polymorphism in MGEA5 encoding O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D glucosaminidase is associated with type 2 diabetes in Mexican Americans. *Diabetes* 54, 1214–1221.
- Lemasson, I., Lewis, M.R., Polakowski, N., Hivin, P., Cavanagh, M.-H., Thébault, S., Barbeau, B., Nyborg, J.K., and Mesnard, J.-M. (2007). Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) bZIP protein interacts with the cellular transcription factor CREB to inhibit HTLV-1 transcription. *J. Virol.* 81, 1543–1553.
- Lemoine, F.J., Kao, S.Y., and Marriott, S.J. (2000). Suppression of DNA repair by HTLV type 1 Tax correlates with Tax trans-activation of proliferating cell nuclear antigen gene expression. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 16, 1623–1627.
- Levin, M.C., Lee, S.M., Kalume, F., Morcos, Y., Dohan, F.C., Hasty, K.A., Callaway, J.C., Zunt, J., Desiderio, D., and Stuart, J.M. (2002). Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease. *Nat. Med.* 8, 509–513.
- Li, Z., and Yi, W. (2014). Regulation of cancer metabolism by O-GlcNAcylation. *Glycoconj. J.* 31, 185–191.
- Li, H.-C., Biggar, R.J., Miley, W.J., Maloney, E.M., Cranston, B., Hanchard, B., and Hisada, M. (2004). Provirus load in breast milk and risk of mother-to-child transmission of human T lymphotropic virus type I. *J. Infect. Dis.* 190, 1275–1278.

- Liégeois, F., Lafay, B., Switzer, W.M., Locatelli, S., Mpoudi-Ngolé, E., Loul, S., Heneine, W., Delaporte, E., and Peeters, M. (2008). Identification and molecular characterization of new STLV-1 and STLV-3 strains in wild-caught nonhuman primates in Cameroon. *Virology* 371, 405–417.
- Livengood, J.A., and Nyborg, J.K. (2004). The high-affinity Sp1 binding site in the HTLV-1 promoter contributes to Tax-independent basal expression. *Nucleic Acids Res.* 32, 2829–2837.
- Love, D.C., Kochan, J., Cathey, R.L., Shin, S.-H., Hanover, J.A., and Kochran, J. (2003). Mitochondrial and nucleocytoplasmic targeting of O-linked GlcNAc transferase. *J. Cell Sci.* 116, 647–654.
- Low, H.B., and Zhang, Y. (2016). Regulatory Roles of MAPK Phosphatases in Cancer. *Immune Netw.* 16, 85–98.
- Lu, H., Pise-Masison, C.A., Fletcher, T.M., Schiltz, R.L., Nagaich, A.K., Radonovich, M., Hager, G., Cole, P.A., and Brady, J.N. (2002). Acetylation of nucleosomal histones by p300 facilitates transcription from tax-responsive human T-cell leukemia virus type 1 chromatin template. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4450–4462.
- Lu, H., Pise-Masison, C.A., Linton, R., Park, H.U., Schiltz, R.L., Sartorelli, V., and Brady, J.N. (2004). Tax relieves transcriptional repression by promoting histone deacetylase 1 release from the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *J. Virol.* 78, 6735–6743.
- Lubas, W.A., and Hanover, J.A. (2000). Functional expression of O-linked GlcNAc transferase. Domain structure and substrate specificity. *J. Biol. Chem.* 275, 10983–10988.
- Lubas, W.A., Frank, D.W., Krause, M., and Hanover, J.A. (1997). O-Linked GlcNAc transferase is a conserved nucleocytoplasmic protein containing tetratricopeptide repeats. *J. Biol. Chem.* 272, 9316–9324.
- Lundblad, J.R., Kwok, R.P., Laurance, M.E., Huang, M.S., Richards, J.P., Brennan, R.G., and Goodman, R.H. (1998). The human T-cell leukemia virus-1 transcriptional activator Tax enhances cAMP-responsive element-binding protein (CREB) binding activity through interactions with the DNA minor groove. *J. Biol. Chem.* 273, 19251–19259.
- Ma, G., Yasunaga, J., and Matsuoka, M. (2016). Multifaceted functions and roles of HBZ in HTLV-1 pathogenesis. *Retrovirology* 13.
- Ma, Z., Vocadlo, D.J., and Vosseller, K. (2013a). Hyper-O-GlcNAcylation Is Anti-apoptotic and Maintains Constitutive NF- B Activity in Pancreatic Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* 288, 15121–15130.
- Ma, Z., Vocadlo, D.J., and Vosseller, K. (2013b). Hyper-O-GlcNAcylation is anti-apoptotic and maintains constitutive NF-κB activity in pancreatic cancer cells. *J. Biol. Chem.* 288, 15121–15130.

- Macauley, M.S., and Vocadlo, D.J. (2009). Enzymatic characterization and inhibition of the nuclear variant of human O-GlcNAcase. *Carbohydr. Res.* *344*, 1079–1084.
- Macauley, M.S., Shan, X., Yuzwa, S.A., Gloster, T.M., and Vocadlo, D.J. (2010). Elevation of Global O-GlcNAc in rodents using a selective O-GlcNAcase inhibitor does not cause insulin resistance or perturb glucohomeostasis. *Chem. Biol.* *17*, 949–958.
- Mahieux, R., and Gessain, A. (2011). HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 Viruses: Discovery, Epidemiology, Serology and Molecular Aspects. *Viruses* *3*, 1074–1090.
- Mahieux, R., Ibrahim, F., Mauclere, P., Herve, V., Michel, P., Tekaiia, F., Chappey, C., Garin, B., Van Der Ryst, E., Guillemain, B., et al. (1997). Molecular epidemiology of 58 new African human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) strains: identification of a new and distinct HTLV-1 molecular subtype in Central Africa and in Pygmies. *J. Virol.* *71*, 1317–1333.
- Majone, F., and Jeang, K.T. (2000). Clastogenic effect of the human T-cell leukemia virus type I Tax oncoprotein correlates with unstabilized DNA breaks. *J. Biol. Chem.* *275*, 32906–32910.
- Majone, F., Semmes, O.J., and Jeang, K.T. (1993). Induction of micronuclei by HTLV-I Tax: a cellular assay for function. *Virology* *193*, 456–459.
- Majumdar, G., Harrington, A., Hungerford, J., Martinez-Hernandez, A., Gerling, I.C., Raghov, R., and Solomon, S. (2006). Insulin dynamically regulates calmodulin gene expression by sequential o-glycosylation and phosphorylation of sp1 and its subcellular compartmentalization in liver cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 3642–3650.
- Manel, N., Kim, F.J., Kinet, S., Taylor, N., Sitbon, M., and Battini, J.-L. (2003). The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell* *115*, 449–459.
- Manns, A., Wilks, R.J., Murphy, E.L., Haynes, G., Figueroa, J.P., Barnett, M., Hanchard, B., and Blattner, W.A. (1992). A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion. *Int. J. Cancer* *51*, 886–891.
- Mansky, L.M. (2000). In Vivo Analysis of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Reverse Transcription Accuracy. *J. Virol.* *74*, 9525–9531.
- Mansky, L.M., and Gajary, L.C. (2002). The primary nucleotide sequence of the bovine leukemia virus RNA packaging signal can influence efficient RNA packaging and virus replication. *Virology* *301*, 272–280.
- Marçais, A., Suarez, F., Sibon, D., Bazarbachi, A., and Hermine, O. (2012). Clinical trials of adult T-cell leukaemia/lymphoma treatment. *Leuk. Res. Treat.* *2012*, 932175.
- Mariappa, D., Pathak, S., and van Aalten, D.M.F. (2013). A sweet TET-à-tête-synergy of TET proteins and O-GlcNAc transferase in transcription. *EMBO J.* *32*, 612–613.
- Marin, D.P., Bolin, A.P., Macedo, R. de C.S., Sampaio, S.C., and Otton, R. (2011). ROS production in neutrophils from alloxan-induced diabetic rats treated in vivo with astaxanthin. *Int. Immunopharmacol.* *11*, 103–109.

- Maruyama, M., Shibuya, H., Harada, H., Hatakeyama, M., Seiki, M., Fujita, T., Inoue, J., Yoshida, M., and Taniguchi, T. (1987). Evidence for aberrant activation of the interleukin-2 autocrine loop by HTLV-1-encoded p40x and T3/Ti complex triggering. *Cell* *48*, 343–350.
- Matsumoto, J., Ohshima, T., Isono, O., and Shimotohno, K. (2005). HTLV-1 HBZ suppresses AP-1 activity by impairing both the DNA-binding ability and the stability of c-Jun protein. *Oncogene* *24*, 1001–1010.
- Matsuoka, M. (2005). Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). *Retrovirology* *2*, 27.
- Matsuoka, M., and Jeang, K.-T. (2007). Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat. Rev. Cancer* *7*, 270–280.
- Matsuoka, M., and Jeang, K.-T. (2011). Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation: viral infectivity, Tax, HBZ and therapy. *Oncogene* *30*, 1379–1389.
- Mazurov, D., Ilinskaya, A., Heidecker, G., Lloyd, P., and Derse, D. (2010). Quantitative comparison of HTLV-1 and HIV-1 cell-to-cell infection with new replication dependent vectors. *PLoS Pathog.* *6*, e1000788.
- Mendes, G.B., Kalil, R.S., Rosadas, C., de Freitas, M.R.G., and Puccioni-Sohler, M. (2014). Temporal lesions and widespread involvement of white matter associated with multi-organ inflammatory disease in human T-lymphotropic virus type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* *25*, 1–3.
- Meyer, N., and Penn, L.Z. (2008). Reflecting on 25 years with MYC. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 976–990.
- Mi, W., Gu, Y., Han, C., Liu, H., Fan, Q., Zhang, X., Cong, Q., and Yu, W. (2011). O-GlcNAcylation is a novel regulator of lung and colon cancer malignancy. *Biochim. Biophys. Acta* *1812*, 514–519.
- Milewski, S. (2002). Glucosamine-6-phosphate synthase--the multi-facets enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* *1597*, 173–192.
- Mitagami, Y., Yasunaga, J.-I., Kinosada, H., Ohshima, K., and Matsuoka, M. (2015). Interferon- γ Promotes Inflammation and Development of T-Cell Lymphoma in HTLV-1 bZIP Factor Transgenic Mice. *PLoS Pathog.* *11*, e1005120.
- Miyazaki, M., Yasunaga, J.-I., Taniguchi, Y., Tamiya, S., Nakahata, T., and Matsuoka, M. (2007). Preferential selection of human T-cell leukemia virus type 1 provirus lacking the 5' long terminal repeat during oncogenesis. *J. Virol.* *81*, 5714–5723.
- Miyoshi, I., Kubonishi, I., Sumida, M., Hiraki, S., Tsubota, T., Kimura, I., Miyamoto, K., and Sato, J. (1980). A novel T-cell line derived from adult T-cell leukemia. *Gan* *71*, 155–156.

- Miyoshi, I., Kubonishi, I., Yoshimoto, S., and Shiraishi, Y. (1981a). A T-cell line derived from normal human cord leukocytes by co-culturing with human leukemic T-cells. *Gan* 72, 978–981.
- Miyoshi, I., Kubonishi, I., Yoshimoto, S., Akagi, T., Ohtsuki, Y., Shiraishi, Y., Nagata, K., and Hinuma, Y. (1981b). Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature* 294, 770–771.
- Miyoshi, I., Yoshimoto, S., Fujishita, M., Taguchi, H., Kubonishi, I., Niiya, K., and Minezawa, M. (1982). Natural adult T-cell leukemia virus infection in Japanese monkeys. *Lancet Lond. Engl.* 2, 658.
- Mizuguchi, M., Asao, H., Hara, T., Higuchi, M., Fujii, M., and Nakamura, M. (2009). Transcriptional activation of the interleukin-21 gene and its receptor gene by human T-cell leukemia virus type 1 Tax in human T-cells. *J. Biol. Chem.* 284, 25501–25511.
- Moles, R., and Nicot, C. (2015). The Emerging Role of miRNAs in HTLV-1 Infection and ATLL Pathogenesis. *Viruses* 7, 4047–4074.
- Morcock, D.R., Kane, B.P., and Casas-Finet, J.R. (2000). Fluorescence and nucleic acid binding properties of the human T-cell leukemia virus-type 1 nucleocapsid protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1481, 381–394.
- Morgan, D.A., Ruscetti, F.W., and Gallo, R. (1976). Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science* 193, 1007–1008.
- Mori, N., Fujii, M., Iwai, K., Ikeda, S., Yamasaki, Y., Hata, T., Yamada, Y., Tanaka, Y., Tomonaga, M., and Yamamoto, N. (2000). Constitutive activation of transcription factor AP-1 in primary adult T-cell leukemia cells. *Blood* 95, 3915–3921.
- Mori, N., Fujii, M., Cheng, G., Ikeda, S., Yamasaki, Y., Yamada, Y., Tomonaga, M., and Yamamoto, N. (2001). Human T-cell leukemia virus type I tax protein induces the expression of anti-apoptotic gene Bcl-xL in human T-cells through nuclear factor-kappaB and c-AMP responsive element binding protein pathways. *Virus Genes* 22, 279–287.
- Morimoto, H., Tsukada, J., Kominato, Y., and Tanaka, Y. (2005). Reduced expression of human mismatch repair genes in adult T-cell leukemia. *Am. J. Hematol.* 78, 100–107.
- Morrison, D.K. (2012). MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4.
- Mühleisen, A., Giaisi, M., Köhler, R., Krammer, P.H., and Li-Weber, M. (2014). Tax contributes apoptosis resistance to HTLV-1-infected T cells via suppression of Bid and Bim expression. *Cell Death Dis.* 5, e1575.
- Myers, A., Holmans, P., Marshall, H., Kwon, J., Meyer, D., Ramic, D., Shears, S., Booth, J., DeVrieze, F.W., Crook, R., et al. (2000). Susceptibility locus for Alzheimer's disease on chromosome 10. *Science* 290, 2304–2305.

- Nagai, M., Brennan, M.B., Sakai, J.A., Mora, C.A., and Jacobson, S. (2001). CD8(+) T cells are an in vivo reservoir for human T-cell lymphotropic virus type I. *Blood* 98, 1858–1861.
- Nakamura, S., Nagano, I., Yoshioka, M., Shimazaki, S., Onodera, J., and Kogure, K. (1993). Detection of tumor necrosis factor-alpha-positive cells in cerebrospinal fluid of patients with HTLV-I-associated myelopathy. *J. Neuroimmunol.* 42, 127–130.
- Nicot, C. (2015). HTLV-I Tax-Mediated Inactivation of Cell Cycle Checkpoints and DNA Repair Pathways Contribute to Cellular Transformation: “A Random Mutagenesis Model.” *J. Cancer Sci.* 2.
- Nicot, C., Dundr, M., Johnson, J.M., Fullen, J.R., Alonzo, N., Fukumoto, R., Princler, G.L., Derse, D., Misteli, T., and Franchini, G. (2004). HTLV-1-encoded p30II is a post-transcriptional negative regulator of viral replication. *Nat. Med.* 10, 197–201.
- O’Donnell, N., Zachara, N.E., Hart, G.W., and Marth, J.D. (2004). Ogt-dependent X-chromosome-linked protein glycosylation is a requisite modification in somatic cell function and embryo viability. *Mol. Cell. Biol.* 24, 1680–1690.
- Olière, S., Douville, R., Sze, A., Belgnaoui, S.M., and Hiscott, J. (2011). Modulation of innate immune responses during human T-cell leukemia virus (HTLV-1) pathogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22, 197–210.
- Olindo, S., Lézin, A., Cabre, P., Merle, H., Saint-Vil, M., Edimonana Kaptue, M., Signate, A., Césaire, R., and Smadja, D. (2005). HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: a marker of disease progression. *J. Neurol. Sci.* 237, 53–59.
- Olivier-Van Stichelen, S., Drougat, L., Dehennaut, V., El Yazidi-Belkoura, I., Guinez, C., Mir, A.-M., Michalski, J.-C., Vercoutter-Edouart, A.-S., and Lefebvre, T. (2012). Serum-stimulated cell cycle entry promotes ncOGT synthesis required for cyclin D expression. *Oncogenesis* 1, e36.
- Olsen, J.V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C., Miller, M.L., Jensen, L.J., Gnad, F., Cox, J., Jensen, T.S., Nigg, E.A., et al. (2010). Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Sci. Signal.* 3, ra3.
- Osame, M., Usuku, K., Izumo, S., Ijichi, N., Amitani, H., Igata, A., Matsumoto, M., and Tara, M. (1986). HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet Lond. Engl.* 1, 1031–1032.
- Ozcan, S., Andrali, S.S., and Cantrell, J.E.L. (2010). Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification. *Biochim. Biophys. Acta* 1799, 353–364.
- Pais-Correia, A.-M., Sachse, M., Guadagnini, S., Robbiati, V., Lasserre, R., Gessain, A., Gout, O., Alcover, A., and Thoulouze, M.-I. (2010). Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat. Med.* 16, 83–89.
- Paiva, A., Casseb, J., Paiva, A., and Casseb, J. (2014). Sexual transmission of human T-cell lymphotropic virus type 1. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 47, 265–274.

Pathak, S., Dorfmüller, H.C., Borodkin, V.S., and van Aalten, D.M.F. (2008). Chemical dissection of the link between streptozotocin, O-GlcNAc, and pancreatic cell death. *Chem. Biol.* *15*, 799–807.

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

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

Percher, F., Jeannin, P., Martin-Latil, S., Gessain, A., Afonso, P.V., Vidy-Roche, A., and Ceccaldi, P.-E. (2016). Mother-to-Child Transmission of HTLV-1 Epidemiological Aspects, Mechanisms and Determinants of Mother-to-Child Transmission. *Viruses* *8*.

Perez-Cervera, Y., Harichaux, G., Schmidt, J., Debierre-Grockiego, F., Dehennaut, V., Bieker, U., Meurice, E., Lefebvre, T., and Schwarz, R.T. (2011). Direct evidence of O-GlcNAcylation in the apicomplexan *Toxoplasma gondii*: a biochemical and bioinformatic study. *Amino Acids* *40*, 847–856.

Philip, S., Zahoor, M.A., Zhi, H., Ho, Y.-K., and Giam, C.-Z. (2014). Regulation of human T-lymphotropic virus type I latency and reactivation by HBZ and Rex. *PLoS Pathog.* *10*, e1004040.

Piñon, J.D., Klasse, P.J., Jassal, S.R., Welson, S., Weber, J., Brighty, D.W., and Sattentau, Q.J. (2003). Human T-cell leukemia virus type 1 envelope glycoprotein gp46 interacts with cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J. Virol.* *77*, 9922–9930.

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

Pique, C., Pham, D., Tursz, T., and Dokh elar, M.C. (1992). Human T-cell leukemia virus type I envelope protein maturation process: requirements for syncytium formation. *J. Virol.* *66*, 906–913.

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

Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Reitz, M.S., Kalyanaraman, V.S., and Gallo, R.C. (1981). Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with S zary T-cell leukaemia. *Nature* *294*, 268–271.

Posner, L.E., Robert-Guroff, M., Kalyanaraman, V.S., Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Fossieck, B., Bunn, P.A., Minna, J.D., and Gallo, R.C. (1981). Natural antibodies to the human T cell lymphoma virus in patients with cutaneous T cell lymphomas. *J. Exp. Med.* *154*, 333–346.

Pringle, C.R. (1998). Virus taxonomy--San Diego 1998. *Arch. Virol.* *143*, 1449–1459.

- Proietti, F.A., Carneiro-Proietti, A.B.F., Catalan-Soares, B.C., and Murphy, E.L. (2005). Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 24, 6058–6068.
- Rass, E., Grabarz, A., Bertrand, P., and Lopez, B.-S. (2012). Réparation des cassures double-brin de l'ADN, un mécanisme peut en cacher un autre : la ligature d'extrémités non homologues alternative. *Cancer/Radiothérapie* 16, 1–10.
- Rayne, F., Kajava, A.V., Lalanne, J., and Mamoun, R.Z. (2004). In vivo homodimerisation of HTLV-1 Gag and MA gives clues to the retroviral capsid and TM envelope protein arrangement. *J. Mol. Biol.* 343, 903–916.
- Reitz, M.S., Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., and Gallo, R.C. (1981). Characterization and distribution of nucleic acid sequences of a novel type C retrovirus isolated from neoplastic human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 1887–1891.
- Rende, F., Cavallari, I., Corradin, A., Silic-Benussi, M., Toulza, F., Toffolo, G.M., Tanaka, Y., Jacobson, S., Taylor, G.P., D'Agostino, D.M., et al. (2011). Kinetics and intracellular compartmentalization of HTLV-1 gene expression: nuclear retention of HBZ mRNAs. *Blood* 117, 4855–4859.
- Rexach, J.E., Clark, P.M., Mason, D.E., Neve, R.L., Peters, E.C., and Hsieh-Wilson, L.C. (2012). Dynamic O-GlcNAc modification regulates CREB-mediated gene expression and memory formation. *Nat. Chem. Biol.* 8, 253–261.
- Richardson, J.H., Edwards, A.J., Cruickshank, J.K., Rudge, P., and Dalgleish, A.G. (1990). In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *J. Virol.* 64, 5682–5687.
- Rigbolt, K.T.G., Prokhorova, T.A., Akimov, V., Henningsen, J., Johansen, P.T., Kratchmarova, I., Kassem, M., Mann, M., Olsen, J.V., and Blagoev, B. (2011). System-wide temporal characterization of the proteome and phosphoproteome of human embryonic stem cell differentiation. *Sci. Signal.* 4, rs3.
- Rizkallah, G., Mahieux, R., and Dutartre, H. (2015a). [Intercellular transmission of HTLV-1: not all mechanisms have been revealed]. *Médecine Sci. MS* 31, 629–637.
- Rizkallah, G., Mahieux, R., and Dutartre, H. (2015b). [Intercellular transmission of HTLV-1: not all mechanisms have been revealed]. *Médecine Sci. MS* 31, 629–637.
- Robek, M.D., and Ratner, L. (1999). Immortalization of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type 1 Tax mutants expressed in a functional molecular clone. *J. Virol.* 73, 4856–4865.
- Robert, M.S., Smith, R.G., Gallo, R.C., Sarin, P.S., and Abrell, J.W. (1972). Viral and cellular DNA polymerase: comparison of activities with synthetic and natural RNA templates. *Science* 176, 798–800.
- Rodríguez, S.M., Florins, A., Gillet, N., de Brogniez, A., Sánchez-Alcaraz, M.T., Boxus, M., Boulanger, F., Gutiérrez, G., Trono, K., Alvarez, I., et al. (2011). Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses* 3, 1210–1248.

- Romero, I.A., Prevost, M.C., Perret, E., Adamson, P., Greenwood, J., Couraud, P.O., and Ozden, S. (2000). Interactions between brain endothelial cells and human T-cell leukemia virus type 1-infected lymphocytes: mechanisms of viral entry into the central nervous system. *J. Virol.* *74*, 6021–6030.
- Roos, M.D., and Hanover, J.A. (2000). Structure of O-linked GlcNAc transferase: mediator of glycan-dependent signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *271*, 275–280.
- Rosen, C.A., Sodroski, J.G., Willems, L., Kettmann, R., Campbell, K., Zaya, R., Burny, A., and Haseltine, W.A. (1986). The 3' region of bovine leukemia virus genome encodes a transactivator protein. *EMBO J.* *5*, 2585–2589.
- Rous, P. (1911). A SARCOMA OF THE FOWL TRANSMISSIBLE BY AN AGENT SEPARABLE FROM THE TUMOR CELLS. *J. Exp. Med.* *13*, 397–411.
- Rous, P., and Beard, J.W. (1935). THE PROGRESSION TO CARCINOMA OF VIRUS-INDUCED RABBIT PAPILLOMAS (SHOPE). *J. Exp. Med.* *62*, 523–548.
- Rousset, R., Desbois, C., Bantignies, F., and Jalinot, P. (1996). Effects on NF-kappa B1/p105 processing of the interaction between the HTLV-1 transactivator Tax and the proteasome. *Nature* *381*, 328–331.
- Rozanski, W., Krzeslak, A., Forma, E., Brys, M., Blewniewski, M., Wozniak, P., and Lipinski, M. (2012). Prediction of bladder cancer based on urinary content of MGEA5 and OGT mRNA level. *Clin. Lab.* *58*, 579–583.
- Ruan, H.-B., Singh, J.P., Li, M.-D., Wu, J., and Yang, X. (2013). Cracking the O-GlcNAc code in metabolism. *Trends Endocrinol. Metab.* *24*, 301–309.
- Ryu, I.-H., and Do, S.-I. (2011). Denitrosylation of S-nitrosylated OGT is triggered in LPS-stimulated innate immune response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *408*, 52–57.
- Saito, M. (2010). Immunogenetics and the Pathological Mechanisms of Human T-Cell Leukemia VirusType 1- (HTLV-1-)Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* *2010*, 478461.
- Saito, K., Saito, M., Taniura, N., Okuwa, T., and Ohara, Y. (2010). Activation of the PI3K-Akt pathway by human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) oncoprotein Tax increases Bcl3 expression, which is associated with enhanced growth of HTLV-1-infected T cells. *Virology* *403*, 173–180.
- Sakabe, K., and Hart, G.W. (2010). O-GlcNAc transferase regulates mitotic chromatin dynamics. *J. Biol. Chem.* *285*, 34460–34468.
- Sakabe, K., Wang, Z., and Hart, G.W. (2010). Beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 19915–19920.
- Santiago, F., Clark, E., Chong, S., Molina, C., Mozafari, F., Mahieux, R., Fujii, M., Azimi, N., and Kashanchi, F. (1999). Transcriptional up-regulation of the cyclin D2 gene and acquisition of new cyclin-dependent kinase partners in human T-cell leukemia virus type 1-infected cells. *J. Virol.* *73*, 9917–9927.

- Sarin, P.S., Abrell, J.W., and Gallo, R.C. (1974). Comparison of biochemical characteristics of reverse transcriptase from human acute leukemic cells and several RNA tumor viruses. *Basic Life Sci.* 3, 345–354.
- Satou, Y., Yasunaga, J., Yoshida, M., and Matsuoka, M. (2006). HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 720–725.
- Satou, Y., Yasunaga, J.-I., Zhao, T., Yoshida, M., Miyazato, P., Takai, K., Shimizu, K., Ohshima, K., Green, P.L., Ohkura, N., et al. (2011). HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation in vivo. *PLoS Pathog.* 7, e1001274.
- Sawicka, A., and Seiser, C. (2012). Histone H3 phosphorylation – A versatile chromatin modification for different occasions. *Biochimie* 94, 2193–2201.
- Schirm, M., Kalmokoff, M., Aubry, A., Thibault, P., Sandoz, M., and Logan, S.M. (2004). Flagellin from *Listeria monocytogenes* is glycosylated with beta-O-linked N-acetylglucosamine. *J. Bacteriol.* 186, 6721–6727.
- Screaton, R.A., Conkright, M.D., Katoh, Y., Best, J.L., Canettieri, G., Jeffries, S., Guzman, E., Niessen, S., Yates, J.R., Takemori, H., et al. (2004). The CREB coactivator TORC2 functions as a calcium- and cAMP-sensitive coincidence detector. *Cell* 119, 61–74.
- Seiki, M., Hattori, S., Hirayama, Y., and Yoshida, M. (1983). Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 3618–3622.
- Semmes, O.J. (2006). Adult T cell leukemia: a tale of two T cells. *J. Clin. Invest.* 116, 858–860.
- Shafi, R., Iyer, S.P., Ellies, L.G., O'Donnell, N., Marek, K.W., Chui, D., Hart, G.W., and Marth, J.D. (2000). The O-GlcNAc transferase gene resides on the X chromosome and is essential for embryonic stem cell viability and mouse ontogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 5735–5739.
- Shi, Y., Tomic, J., Wen, F., Shaha, S., Bahlo, A., Harrison, R., Dennis, J.W., Williams, R., Gross, B.J., Walker, S., et al. (2010). Aberrant O-GlcNAcylation characterizes chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 24, 1588–1598.
- Shiohama, Y., Naito, T., Matsuzaki, T., Tanaka, R., Tomoyose, T., Takashima, H., Fukushima, T., Tanaka, Y., and Saito, M. (2016). Absolute quantification of HTLV-1 basic leucine zipper factor (HBZ) protein and its plasma antibody in HTLV-1 infected individuals with different clinical status. *Retrovirology* 13, 29.
- Siu, Y.-T., Chin, K.-T., Siu, K.-L., Yee Wai Choy, E., Jeang, K.-T., and Jin, D.-Y. (2006). TORC1 and TORC2 coactivators are required for tax activation of the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeats. *J. Virol.* 80, 7052–7059.
- Slattery, J.P., Franchini, G., and Gessain, A. (1999). Genomic evolution, patterns of global dissemination, and interspecies transmission of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic viruses. *Genome Res.* 9, 525–540.

- Slawson, C., and Hart, G.W. (2011). O-GlcNAc signalling: implications for cancer cell biology. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 678–684.
- Slawson, C., Pidala, J., and Potter, R. (2001). Increased N-acetyl- β -glucosaminidase activity in primary breast carcinomas corresponds to a decrease in N-acetylglucosamine containing proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1537*, 147–157.
- Slawson, C., Zachara, N.E., Vosseller, K., Cheung, W.D., Lane, M.D., and Hart, G.W. (2005). Perturbations in O-linked beta-N-acetylglucosamine protein modification cause severe defects in mitotic progression and cytokinesis. *J. Biol. Chem.* *280*, 32944–32956.
- Slawson, C., Lakshmanan, T., Knapp, S., and Hart, G.W. (2008). A mitotic GlcNAcylation/phosphorylation signaling complex alters the posttranslational state of the cytoskeletal protein vimentin. *Mol. Biol. Cell* *19*, 4130–4140.
- Song, M., Kim, H.-S., Park, J.-M., Kim, S.-H., Kim, I.-H., Ryu, S.H., and Suh, P.-G. (2008). o-GlcNAc transferase is activated by CaMKIV-dependent phosphorylation under potassium chloride-induced depolarization in NG-108-15 cells. *Cell. Signal.* *20*, 94–104.
- Stewart, D.M., Ramanathan, R., Mahanty, S., Fedorko, D.P., Janik, J.E., and Morris, J.C. (2011). Disseminated *Strongyloides stercoralis* infection in HTLV-1-associated adult T-cell leukemia/lymphoma. *Acta Haematol.* *126*, 63–67.
- Su, Z., and Denu, J.M. (2016). Reading the Combinatorial Histone Language. *ACS Chem. Biol.* *11*, 564–574.
- Sullivan, M.T., Williams, A.E., Fang, C.T., Grandinetti, T., Poiesz, B.J., and Ehrlich, G.D. (1991). Transmission of human T-lymphotropic virus types I and II by blood transfusion. A retrospective study of recipients of blood components (1983 through 1988). The American Red Cross HTLV-I/II Collaborative Study Group. *Arch. Intern. Med.* *151*, 2043–2048.
- Suzuki, T., Hirai, H., Murakami, T., and Yoshida, M. (1995). Tax protein of HTLV-1 destabilizes the complexes of NF-kappa B and I kappa B-alpha and induces nuclear translocation of NF-kappa B for transcriptional activation. *Oncogene* *10*, 1199–1207.
- Switzer, W.M., Qari, S.H., Wolfe, N.D., Burke, D.S., Folks, T.M., and Heneine, W. (2006). Ancient origin and molecular features of the novel human T-lymphotropic virus type 3 revealed by complete genome analysis. *J. Virol.* *80*, 7427–7438.
- Tai, H.-C., Khidekel, N., Ficarro, S.B., Peters, E.C., and Hsieh-Wilson, L.C. (2004). Parallel identification of O-GlcNAc-modified proteins from cell lysates. *J. Am. Chem. Soc.* *126*, 10500–10501.
- Takahashi, T., Takase, H., Urano, T., Sugita, S., Miyata, K., Miyata, N., and Mochizuki, M. (2000). Clinical features of human T-lymphotropic virus type 1 uveitis: a long-term follow-up. *Ocul. Immunol. Inflamm.* *8*, 235–241.
- Tanaka, A., Takahashi, C., Yamaoka, S., Nosaka, T., Maki, M., and Hatanaka, M. (1990). Oncogenic transformation by the tax gene of human T-cell leukemia virus type I in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 1071–1075.

- Tanaka, G., Okayama, A., Watanabe, T., Aizawa, S., Stuver, S., Mueller, N., Hsieh, C.-C., and Tsubouchi, H. (2005). The clonal expansion of human T lymphotropic virus type 1-infected T cells: a comparison between seroconverters and long-term carriers. *J. Infect. Dis.* *191*, 1140–1147.
- Tanaka-Nakanishi, A., Yasunaga, J., Takai, K., and Matsuoka, M. (2014). HTLV-1 bZIP factor suppresses apoptosis by attenuating the function of FoxO3a and altering its localization. *Cancer Res.* *74*, 188–200.
- Taniguchi, Y., Nosaka, K., Yasunaga, J., Maeda, M., Mueller, N., Okayama, A., and Matsuoka, M. (2005). Silencing of human T-cell leukemia virus type I gene transcription by epigenetic mechanisms. *Retrovirology* *2*, 64.
- Telesnitsky, A., and Goff, S.P. (1997). Reverse Transcriptase and the Generation of Retroviral DNA. In *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus, eds. (Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press),.
- Temin, H.M., and Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* *226*, 1211–1213.
- Terme, J.-M., Mocquet, V., Kuhlmann, A.-S., Zane, L., Mortreux, F., Wattel, E., Duc Dodon, M., and Jalinot, P. (2009). Inhibition of the hTERT promoter by the proto-oncogenic protein TAL1. *Leukemia* *23*, 2081–2089.
- Thébault, S., Basbous, J., Hivin, P., Devaux, C., and Mesnard, J.-M. (2004). HBZ interacts with JunD and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett.* *562*, 165–170.
- de Thé, G., and Bomford, R. (1993). An HTLV-I vaccine: why, how, for whom? *AIDS Res. Hum. Retroviruses* *9*, 381–386.
- Tie, F., Adya, N., Greene, W.C., and Giam, C.Z. (1996). Interaction of the human T-lymphotropic virus type 1 Tax dimer with CREB and the viral 21-base-pair repeat. *J. Virol.* *70*, 8368–8374.
- Toleman, C., Paterson, A.J., Whisenhunt, T.R., and Kudlow, J.E. (2004). Characterization of the histone acetyltransferase (HAT) domain of a bifunctional protein with activable O-GlcNAcase and HAT activities. *J. Biol. Chem.* *279*, 53665–53673.
- Torres, C.R., and Hart, G.W. (1984). Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J. Biol. Chem.* *259*, 3308–3317.
- Toufaily, C., Landry, S., Leib-Mosch, C., Rassart, E., and Barbeau, B. (2011). Activation of LTRs from different human endogenous retrovirus (HERV) families by the HTLV-1 tax protein and T-cell activators. *Viruses* *3*, 2146–2159.
- Trapannone, R., Rafie, K., and van Aalten, D.M.F. (2016). O-GlcNAc transferase inhibitors: current tools and future challenges. *Biochem. Soc. Trans.* *44*, 88–93.
- Trevisan, R., Daprai, L., Acquasaliente, L., Ciminale, V., Chieco-Bianchi, L., and Saggiaro, D. (2004). Relevance of CREB phosphorylation in the anti-apoptotic function of human T-

lymphotropic virus type 1 tax protein in serum-deprived murine fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 299, 57–67.

Trinidad, J.C., Barkan, D.T., Gullledge, B.F., Thalhammer, A., Sali, A., Schoepfer, R., and Burlingame, A.L. (2012). Global identification and characterization of both O-GlcNAcylation and phosphorylation at the murine synapse. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 11, 215–229.

Turgeman, H., and Aboud, M. (1998). Evidence that protein kinase A activity is required for the basal and tax-stimulated transcriptional activity of human T-cell leukemia virus type-I long terminal repeat. *FEBS Lett.* 428, 183–187.

Uchiyama, T., Yodoi, J., Sagawa, K., Takatsuki, K., and Uchino, H. (1977). Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* 50, 481–492.

Utsunomiya, A., Choi, I., Chihara, D., and Seto, M. (2015). Recent advances in the treatment of adult T-cell leukemia-lymphomas. *Cancer Sci.* 106, 344–351.

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

Vallabhapurapu, S., and Karin, M. (2009). Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 693–733.

Van Brussel, M., Salemi, M., Liu, H.F., Gabriëls, J., Goubau, P., Desmyter, J., and Vandamme, A.M. (1998). The simian T-lymphotropic virus STLV-PP1664 from *Pan paniscus* is distinctly related to HTLV-2 but differs in genomic organization. *Virology* 243, 366–379.

Van Dooren, S., Salemi, M., and Vandamme, A.M. (2001). Dating the origin of the African human T-cell lymphotropic virus type-i (HTLV-I) subtypes. *Mol. Biol. Evol.* 18, 661–671.

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

Vella, P., Scelfo, A., Jammula, S., Chiacchiera, F., Williams, K., Cuomo, A., Roberto, A., Christensen, J., Bonaldi, T., Helin, K., et al. (2013). Tet proteins connect the O-linked N-acetylglucosamine transferase Ogt to chromatin in embryonic stem cells. *Mol. Cell* 49, 645–656.

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

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

- Voisset, C., Weiss, R.A., and Griffiths, D.J. (2008). Human RNA “rumor” viruses: the search for novel human retroviruses in chronic disease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 72, 157–196, table of contents.
- Vosseller, K., Wells, L., Lane, M.D., and Hart, G.W. (2002). Elevated nucleocytoplasmic glycosylation by O-GlcNAc results in insulin resistance associated with defects in Akt activation in 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 5313–5318.
- de Vries, E.G.E., Gietema, J.A., and de Jong, S. (2006). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand pathway and its therapeutic implications. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 12, 2390–2393.
- Wäldele, K., Schneider, G., Ruckes, T., and Grassmann, R. (2004). Interleukin-13 overexpression by tax transactivation: a potential autocrine stimulus in human T-cell leukemia virus-infected lymphocytes. *J. Virol.* 78, 6081–6090.
- Wäldele, K., Silbermann, K., Schneider, G., Ruckes, T., Cullen, B.R., and Grassmann, R. (2006). Requirement of the human T-cell leukemia virus (HTLV-1) tax-stimulated HIAP-1 gene for the survival of transformed lymphocytes. *Blood* 107, 4491–4499.
- Wang, Z., Pandey, A., and Hart, G.W. (2007). Dynamic interplay between O-linked N-acetylglucosaminylation and glycogen synthase kinase-3-dependent phosphorylation. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 6, 1365–1379.
- Wang, Z., Gucek, M., and Hart, G.W. (2008). Cross-talk between GlcNAcylation and phosphorylation: site-specific phosphorylation dynamics in response to globally elevated O-GlcNAc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 13793–13798.
- Wang, Z., Udeshi, N.D., O’Malley, M., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Hart, G.W. (2010a). Enrichment and site mapping of O-linked N-acetylglucosamine by a combination of chemical/enzymatic tagging, photochemical cleavage, and electron transfer dissociation mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics MCP* 9, 153–160.
- Wang, Z., Udeshi, N.D., Slawson, C., Compton, P.D., Sakabe, K., Cheung, W.D., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Hart, G.W. (2010b). Extensive crosstalk between O-GlcNAcylation and phosphorylation regulates cytokinesis. *Sci. Signal.* 3, ra2.
- Watanabe, T., Seiki, M., Hirayama, Y., and Yoshida, M. (1986). Human T-cell leukemia virus type I is a member of the African subtype of simian viruses (STLV). *Virology* 148, 385–388.
- Wattel, E., Vartanian, J.P., Pannetier, C., and Wain-Hobson, S. (1995). Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *J. Virol.* 69, 2863–2868.
- Whelan, S.A., Lane, M.D., and Hart, G.W. (2008). Regulation of the O-linked beta-N-acetylglucosamine transferase by insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 283, 21411–21417.
- Whisenhunt, T.R. (2006). Disrupting the enzyme complex regulating O-GlcNAcylation blocks signaling and development. *Glycobiology* 16, 551–563.

- Winter, H.Y., Dayaram, T., and Marriott, S.J. (2007). Activation of the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat by the ternary complex factor Elk-1. *J. Virol.* *81*, 13075–13081.
- Wolfe, N.D., Heneine, W., Carr, J.K., Garcia, A.D., Shanmugam, V., Tamoufe, U., Torimiro, J.N., Prosser, A.T., Lebreton, M., Mpoudi-Ngole, E., et al. (2005). Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 7994–7999.
- Wu, X., and Sun, S.-C. (2007). Retroviral oncoprotein Tax deregulates NF-kappaB by activating Tak1 and mediating the physical association of Tak1-IKK. *EMBO Rep.* *8*, 510–515.
- Wu, K., Bottazzi, M.E., de la Fuente, C., Deng, L., Gitlin, S.D., Maddukuri, A., Dadgar, S., Li, H., Vertes, A., Pumfery, A., et al. (2004). Protein profile of tax-associated complexes. *J. Biol. Chem.* *279*, 495–508.
- Xiao, G., and Fu, J. (2011). NF- κ B and cancer: a paradigm of Yin-Yang. *Am. J. Cancer Res.* *1*, 192–221.
- Xiao, G., Cvijic, M.E., Fong, A., Harhaj, E.W., Uhlik, M.T., Waterfield, M., and Sun, S.C. (2001). Retroviral oncoprotein Tax induces processing of NF-kappaB2/p100 in T cells: evidence for the involvement of IKKalpha. *EMBO J.* *20*, 6805–6815.
- Xie, S., Jin, N., Gu, J., Shi, J., Sun, J., Chu, D., Zhang, L., Dai, C.-L., Gu, J.-H., Gong, C.-X., et al. (2016). O-GlcNAcylation of protein kinase A catalytic subunits enhances its activity: a mechanism linked to learning and memory deficits in Alzheimer's disease. *Aging Cell* *15*, 455–464.
- Xing, D., Gong, K., Feng, W., Nozell, S.E., Chen, Y.-F., Chatham, J.C., and Oparil, S. (2011). O-GlcNAc Modification of NF κ B p65 Inhibits TNF- α -Induced Inflammatory Mediator Expression in Rat Aortic Smooth Muscle Cells. *PLoS ONE* *6*, e24021.
- Xu, X., Heidenreich, O., Kitajima, I., McGuire, K., Li, Q., Su, B., and Nerenberg, M. (1996). Constitutively activated JNK is associated with HTLV-1 mediated tumorigenesis. *Oncogene* *13*, 135–142.
- Yamaguchi, K., and Watanabe, T. (2002). Human T lymphotropic virus type-I and adult T-cell leukemia in Japan. *Int. J. Hematol.* *76 Suppl 2*, 240–245.
- Yan, P., Qu, Z., Ishikawa, C., Mori, N., and Xiao, G. (2009). Human T-cell leukemia virus type I-mediated repression of PDZ-LIM domain-containing protein 2 involves DNA methylation but independent of the viral oncoprotein tax. *Neoplasia N. Y. N* *11*, 1036–1041.
- Yanagihara, R. (1994). Geographic-specific genotypes or topotypes of human T-cell lymphotropic virus type I as markers for early and recent migrations of human populations. *Adv. Virus Res.* *43*, 147–186.

- Yang, W.H., Kim, J.E., Nam, H.W., Ju, J.W., Kim, H.S., Kim, Y.S., and Cho, J.W. (2006). Modification of p53 with O-linked N-acetylglucosamine regulates p53 activity and stability. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1074–1083.
- Yang, W.H., Park, S.Y., Nam, H.W., Kim, D.H., Kang, J.G., Kang, E.S., Kim, Y.S., Lee, H.C., Kim, K.S., and Cho, J.W. (2008). NF B activation is associated with its O-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 17345–17350.
- Yang, Y.R., Song, M., Lee, H., Jeon, Y., Choi, E.-J., Jang, H.-J., Moon, H.Y., Byun, H.-Y., Kim, E.-K., Kim, D.H., et al. (2012). O-GlcNAcase is essential for embryonic development and maintenance of genomic stability. *Aging Cell* *11*, 439–448.
- Yasunaga, J., and Matsuoka, M. (2007). Human T-cell leukemia virus type I induces adult T-cell leukemia: from clinical aspects to molecular mechanisms. *Cancer Control J. Moffitt Cancer Cent.* *14*, 133–140.
- Yin, M.J., Christerson, L.B., Yamamoto, Y., Kwak, Y.T., Xu, S., Mercurio, F., Barbosa, M., Cobb, M.H., and Gaynor, R.B. (1998). HTLV-I Tax protein binds to MEKK1 to stimulate I κ B kinase activity and NF- κ B activation. *Cell* *93*, 875–884.
- Yoshida, M., Miyoshi, I., and Hinuma, Y. (1982). Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *79*, 2031–2035.
- Yoshida, M., Satou, Y., Yasunaga, J.-I., Fujisawa, J.-I., and Matsuoka, M. (2008). Transcriptional control of spliced and unspliced human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ) gene. *J. Virol.* *82*, 9359–9368.
- Yoshita, M., Higuchi, M., Takahashi, M., Oie, M., Tanaka, Y., and Fujii, M. (2012). Activation of mTOR by human T-cell leukemia virus type 1 Tax is important for the transformation of mouse T cells to interleukin-2-independent growth. *Cancer Sci.* *103*, 369–374.
- Younis, I., and Green, P.L. (2005). The human T-cell leukemia virus Rex protein. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *10*, 431–445.
- Yuzwa, S.A., Macauley, M.S., Heinonen, J.E., Shan, X., Dennis, R.J., He, Y., Whitworth, G.E., Stubbs, K.A., McEachern, E.J., Davies, G.J., et al. (2008). A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. *Nat. Chem. Biol.* *4*, 483–490.
- Zane, L., Sibon, D., Capraro, V., Galia, P., Karam, M., Delfau-Larue, M.-H., Gilson, E., Gessain, A., Gout, O., Hermine, O., et al. (2012). HTLV-1 positive and negative T cells cloned from infected individuals display telomerase and telomere genes deregulation that predominate in activated but untransformed CD4+ T cells. *Int. J. Cancer* *131*, 821–833.
- Zhang, Q., Liu, X., Gao, W., Li, P., Hou, J., Li, J., and Wong, J. (2014a). Differential regulation of the ten-eleven translocation (TET) family of dioxygenases by O-linked β -N-acetylglucosamine transferase (OGT). *J. Biol. Chem.* *289*, 5986–5996.

- Zhang, S., Roche, K., Nasheuer, H.-P., and Lowndes, N.F. (2011). Modification of Histones by Sugar β -N-Acetylglucosamine (GlcNAc) Occurs on Multiple Residues, Including Histone H3 Serine 10, and Is Cell Cycle-regulated. *J. Biol. Chem.* *286*, 37483–37495.
- Zhang, Z., Tan, E.P., VandenHull, N.J., Peterson, K.R., and Slawson, C. (2014b). O-GlcNAcase Expression is Sensitive to Changes in O-GlcNAc Homeostasis. *Front. Endocrinol.* *5*, 206.
- Zhao, T. (2016). The Role of HBZ in HTLV-1-Induced Oncogenesis. *Viruses* *8*, 34.
- Zhao, L.J., and Giam, C.Z. (1992). 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. U. S. A.* *89*, 7070–7074.
- Zhao, T., and Matsuoka, M. (2012). HBZ and its roles in HTLV-1 oncogenesis. *Front. Microbiol.* *3*.
- Zhao, T., Yasunaga, J., Satou, Y., Nakao, M., Takahashi, M., Fujii, M., and Matsuoka, M. (2009a). Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF-kappaB. *Blood* *113*, 2755–2764.
- Zhao, T., Yasunaga, J., Satou, Y., Nakao, M., Takahashi, M., Fujii, M., and Matsuoka, M. (2009b). Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF-kappaB. *Blood* *113*, 2755–2764.
- Zhi, H., Yang, L., Kuo, Y.-L., Ho, Y.-K., Shih, H.-M., and Giam, C.-Z. (2011). NF- κ B Hyper-Activation by HTLV-1 Tax Induces Cellular Senescence, but Can Be Alleviated by the Viral Anti-Sense Protein HBZ. *PLoS Pathog.* *7*, e1002025.
- Zhou, M., Lu, H., Park, H., Wilson-Chiru, J., Linton, R., and Brady, J.N. (2006). Tax interacts with P-TEFb in a novel manner to stimulate human T-lymphotropic virus type 1 transcription. *J. Virol.* *80*, 4781–4791.
- Zhu, Q., Zhou, L., Yang, Z., Lai, M., Xie, H., Wu, L., Xing, C., Zhang, F., and Zheng, S. (2012). O-GlcNAcylation plays a role in tumor recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* *29*, 985–993.

