

Université de Montréal

**Caractérisation des transcrits antisens chez les rétrovirus
HTLV et étude comparative des fonctions des protéines
traduites à partir de ces transcrits antisens**

par
Émilie Larocque

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de docteur
en virologie et immunologie

avril, 2015

© Émilie Larocque, 2015

Résumé

Le premier membre de la famille des rétrovirus humains HTLV (Virus T-lymphotrope Humain), HTLV-1, a été découvert en 1980 et l'on estime aujourd'hui à plus de 10 millions le nombre d'individus infectés à travers le monde. Après une période de latence d'environ 40 ans, 5% des individus infectés développent des leucémies, des lymphomes adultes de lymphocytes T (ATLL) ou encore une myélopathie associée à HTLV-1/ paraparésie spastique tropicale (HAM/TSP). L'apparition de la maladie serait en grande partie orchestrée par deux protéines virales, soit Tax et *HTLV-1 bZIP factor* (HBZ). L'expression du génome viral se fait à partir d'un transcrite sens de pleine longueur suite à un épissage alternatif, à l'exception du gène *HBZ*. *HBZ* est produite à partir d'un transcrite antisens initié dans la séquence terminale longue répétée (LTR)³. Elle a été décrite comme étant capable de réguler négativement la transcription virale dépendante de Tax en se dimérisant avec des facteurs de transcription cellulaires tels que CREB-2 et certains membres de la famille Jun. *HBZ* a aussi un pouvoir prolifératif et bien que nous ne sachions toujours pas le mécanisme moléculaire menant à l'oncogenèse par *HBZ*, nous savons qu'elle module une multitude de voies de transduction de signaux, dont AP-1. Nous avons récemment mis en évidence un transcrite antisens nommé *Antisense Protein of HTLV-2 (APH-2)* chez HTLV-2 qui n'est associé qu'à une myélopathie apparentée au HAM/TSP. Ce n'est qu'en 2005 que HTLV-3 et HTLV-4 se sont rajoutés au groupe HTLV. Cependant, aucune corrélation avec le développement d'une quelconque maladie n'a été montrée jusqu'à ce jour. Le premier volet de ce projet de doctorat avait pour objectif de détecter et caractériser les transcrits antisens produits par HTLV-3 et HTLV-4 et d'étudier les protéines traduites à partir de ces transcrits pour ainsi évaluer leurs similitudes et/ou différences avec *HBZ* et *APH-2*. Nos études de localisation cellulaire réalisées par microscopie confocale ont montré que *APH-3* et *APH-4* sont des protéines nucléaires, se retrouvant sous la forme de granules et, dans le cas d'*APH-3*, partiellement cytoplasmique. Ces granules co-localisent en partie avec *HBZ*. Les analyses à l'aide d'un gène rapporteur luciférase contenant le LTR 5' de HTLV-1 ont montré que *APH-3* et *APH-4* peuvent aussi inhiber la transactivation du LTR 5' par Tax. Aussi, des études faisant appel au gène rapporteur précédé d'un promoteur de collagénase (site AP-1), ont montré que ces deux protéines, contrairement à *HBZ*, activent la transcription dépendante de tous les membres des facteurs de transcription de la famille Jun. De plus, les mutants ont montré que le motif fermeture éclair (LZ) atypique de ces protéines est impliqué dans cette régulation. En effet, *APH-3* et *APH-4* modulent la voie Jun-dépendante en se dimérisant *via* leur LZ atypique avec la famille Jun et semblent activer la voie par un mécanisme ne faisant pas par d'un domaine activateur autonome. Dans un deuxième volet, nous avons comme objectif d'approfondir nos connaissances sur la localisation nucléolaire de *HBZ*. Lors de nos analyses, nous avons identifié deux nouveaux partenaires d'interaction, B23 et la nucléoline, qui semblent être associés à sa localisation nucléolaire. En effet, ces interactions sont plus fortes suivant une délétion des domaines AD et bZIP de *HBZ* qui dans ce cas est localisée strictement au nucléole. De plus, bien que *APH-3* et *APH-4* puissent se localiser aux nucléoles, *HBZ* est la seule protéine traduite à partir d'un transcrite antisens pouvant interagir avec B23. Finalement, ces travaux ont clairement mis en évidence que HTLV-3 et HTLV-4 permettent la production de transcrits antisens comme chez d'autres rétrovirus. Les protéines traduites à partir de ces transcrits antisens jouent d'importants rôles dans la réplication rétrovirale mais semblent avoir

des fonctions différentes de celles de HBZ au niveau de la régulation de la transcription de la voie Jun. HBZ semble aussi jouer un rôle unique dans le nucléole en ciblant les protéines nucléolaires de la cellule. Ces études démontrent que les protéines produites à partir de transcrits antisens chez les rétrovirus HTLV partagent plusieurs ressemblances, mais démontrent aussi des différences. Ainsi, les APH pourraient, en tant qu'outil comparatif, aider à mieux cibler les mécanismes moléculaires importants utilisés par HBZ pour induire la pathogénèse associée à une infection par HTLV.

Mots-clés : Rétrovirus, HTLV, transcription antisens, APH, HBZ, Jun, Tax, nucléole, B23, C23, NoLS

Abstract

The first human T-cell lymphotropic virus (HTLV) family member was discovered in 1980 and it is estimated that approximately 10 million people are infected with HTLV-1 worldwide. After about 40 years, 5% of infected individuals will develop an adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) while another 4% will develop HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). It is believed that two viral proteins, Tax and HBZ, together orchestrate the oncogenic process. The viral proteins are expressed from an alternatively spliced sense transcript except for the *HBZ* gene. *HBZ* is translated from an antisense transcript initiated in the long terminal repeat (LTR)³. This viral protein is capable of inhibiting Tax transactivation of the LTR5' by dimerizing with cellular transcription factors such as CREB-2 and c-Jun. *HBZ* also has proliferating capacities and while the molecular mechanisms leading to the disease still need to be elucidated, it is well known that *HBZ* can modulate a multitude of signal transduction pathways like AP-1. We have recently discovered an antisense transcript termed *Antisense Protein of HTLV-2 (APH-2)* produced in HTLV-2. HTLV-2 is only associated to myelopathies resembling HAM/TSP. HTLV-3 and HTLV-4 were discovered in 2005 and have not been associated with any type of disease thus far. The first goal of this PhD project was hence to detect and characterize the antisense transcripts produced in HTLV-3 and HTLV-4, to study the functions of these translated proteins and to evaluate their similarities and/or differences shared with *HBZ* and *APH-2*. Our localization studies using confocal microscopy demonstrated that *APH-3* and *APH-4* are found in the nucleus as speckles, and for *APH-3*, also partially cytoplasmic. These two proteins can also partially colocalize with *HBZ*. Using a luciferase reporter plasmid bearing the HTLV-1 LTR5', we demonstrated that *APH-3* and *APH-4* could inhibit Tax transactivation of the LTR5'. We also used a luciferase reporter plasmid bearing the collagenase promoter, which bears an AP-1 site, and demonstrated that both viral proteins could activate transcription in the presence of any of the Jun family of transcription factors. We generated several mutants and the atypical leucine zipper (LZ) found in *APH-3* and *APH-4* is crucial for this regulation. In fact, *APH-3* and *APH-4* using their atypical LZ dimerize with Jun family members and activate this pathway using a mechanism other than an autonomous activation domain. Our next goal was to investigate the significance of the *HBZ* nucleolar localization. During this project, we identified two new interacting partners, B23 and nucleolin, which seem to be associated with its nucleolar localization. In fact, these interactions are stronger when *HBZ* is deleted of its AD and bZIP domains and hence when *HBZ* demonstrates a stronger nucleolar distribution. Moreover, while *APH-3* and *APH-4* are also found in the nucleolus, *HBZ* is the only antisense protein able to interact with B23. Finally, this work clearly demonstrates that HTLV-3 and HTLV-4 can produce an antisense transcript alike other retroviruses. The encoded proteins play an important role in retroviral replication and seem to regulate Jun-dependant transcription differently than *HBZ*. *HBZ* also seems to have a unique role in the nucleoli by targeting specific cellular nucleolar proteins. Similarities but also differences are shared between the antisense proteins. Thus, the *APH* proteins represent a good comparative tool in order to better understand the molecular mechanisms involved in HTLV induced diseases.

Keywords : Retrovirus, HTLV, antisense transcription, APH, HBZ, Jun, Tax, nucleoli, B23, C23, NoLS

Table des matières

LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	XI
LISTE DES SYMBOLES.....	XVIII
REMERCIEMENTS	XX
CHAPITRE I.....	2
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	2
1.1. GÉNÉRALITÉ SUR LES RÉTROVIRUS	2
1.1.1. Classification.....	2
1.1.2. Caractéristiques	3
1.2. LES RÉTROVIRUS HTLV	4
1.2.1. Origine	4
1.2.2. Distribution et transmission	5
1.2.3. Maladies associées.....	12
1.2.4. Structure du virion	16
1.2.5. Réplication	17
1.2.6. Organisation génomique.....	24
1.2.7. La persistance virale.....	36
1.3. TRANSCRIPTION ANTISENS.....	38
1.3.1. Généralités	38
1.3.2. Transcription antisens chez les rétrovirus	41
1.3.3. Transcription antisens chez HTLV.....	42
1.4. LA PROTÉINE HBZ	46
1.4.1 Organisation de HBZ	46
1.4.2. Localisation cellulaire de HBZ.....	47
1.4.3. Fonctions de HBZ.....	48
1.4.4. HBZ et la réponse des lymphocytes T CD8+	56
1.5. LA PROTÉINE APH-2.....	57
PROBLÉMATIQUE	59
CHAPITRE II	61

HUMAN T-CELL LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE 3 (HTLV-3)- AND HTLV-4-DERIVED ANTISENSE TRANSCRIPTS ENCODE PROTEINS WITH SIMILAR TAX-INHIBITING FUNCTIONS BUT DISTINCT SUBCELLULAR LOCALIZATION..... 61

2.1. ABSTRACT 63

2.2. INTRODUCTION 64

2.3 MATERIALS AND METHODS 66

 2.3.1. *Cell lines and antibodies* 66

 2.3.2. *Plasmids* 66

 2.3.3. *RT-PCR* 68

 2.3.4. *5' and 3' RACE analyses* 69

 2.3.5. *Transfection and promoter studies* 70

 2.3.6. *Confocal microscopy* 71

 2.3.7. *Western blot (WB) analysis* 71

2.4. RESULTS 72

 2.4.1. *Detection of spliced antisense transcripts from HTLV-3 and HTLV-4* 72

 2.4.2. *APH-3 and APH-4 transcripts have multiple initiation sites and are polyadenylated* 73

 2.4.3. *Cellular localization of APH-3 and APH-4* 74

 2.4.4. *Partial co-localization between HBZ and APH-3 and APH-4* 76

 2.4.5. *Promoter studies on both HTLV-3 and HTLV-4 antisense transcripts* 76

 2.4.6. *Tax-driven HTLV LTR activation is inhibited by APH-3 and APH-4 expression and is dose-dependent* 77

2.5. DISCUSSION 78

2.6. ACKNOWLEDGMENTS 81

CHAPITRE III 93

HUMAN T-CELL LEUKEMIA VIRUS TYPE 3 (HTLV-3) AND HTLV-4 ANTISENSE-TRANSCRIPT-ENCODED PROTEINS INTERACT AND TRANSACTIVATE JUN FAMILY-DEPENDENT TRANSCRIPTION VIA THEIR ATYPICAL BZIP MOTIF. 93

2.1. ABSTRACT 95

3.2. INTRODUCTION 96

3.3. MATERIALS AND METHODS 98

 3.3.1. *Cell lines* 98

 3.3.2. *Plasmid constructs* 99

 3.3.3. *Immunofluorescence microscopy analysis* 100

3.3.4. <i>Transfection and luciferase assay</i>	100
3.3.5. <i>Generation of stable cell line and transfection</i>	101
3.3.6. <i>Yeast two hybrid assay</i>	102
3.3.7. <i>GAL4-based activation domain assay</i>	102
3.3.8. <i>Western Blot</i>	102
3.3.9. <i>Co-immunoprecipitation experiments</i>	103
3.3.10. <i>Statistical analysis</i>	103
3.4. RESULTS.....	104
3.4.2. <i>APH-3 and APH-4 augment Jun activation in the context of chromatin and upstream of a heterologous promoter.</i>	105
3.4.3. <i>APH-3 and APH-4 activate the hTERT promoter.</i>	106
3.4.4. <i>APH-3 and APH-4 interact with c-Jun, JunB and JunD.</i>	106
3.4.5. <i>Lack of an activation domain for APH-3 and APH-4.</i>	107
3.4.6. <i>The atypical bZIP motifs of APH-3 and APH-4 are required for their modulation of Jun transactivation potential.</i>	108
3.4.7. <i>Implication of leucine residues in the APH-3 and APH-4 LZ domain in the up-regulation of the Jun transactivation potential.</i>	109
3.5. DISCUSSION.....	111
3.6. ACKNOWLEDGMENTS	115
CHAPITRE IV	129
HTLV-1 BASIC LEUCINE ZIPPER FACTOR, HBZ INTERACTS WITH B23 IN THE NUCLEOLUS.....	129
4.1. ABSTRACT.....	131
4.2. INTRODUCTION	132
4.3. MATERIALS AND METHODS	135
4.3.1. <i>Cell lines</i>	135
4.3.2. <i>Plasmid constructs</i>	135
4.3.3. <i>Cell transfection</i>	136
4.3.4. <i>Immunofluorescence microscopy analysis</i>	136
4.3.5. <i>Co-immunoprecipitation experiments</i>	136
4.4. RESULTS.....	137
4.4.1. <i>sHBZ and uHBZ interact in vivo with the nucleolar protein B23.</i>	137

4.4.2. Antisense-transcript encoded protein from HTLV-2, HTLV-3 and HTLV-4 are not capable to interact with B23.....	138
4.4.4. sHBZ does not affect the interaction between B23 and C23.....	139
4.4.5. sHBZ does not interact with B23 through its HoD or HeD domains.....	140
4.4.6. The interaction between sHBZ and B23 or C23 is dependent on its nucleolar localization.....	140
4.5. DISCUSSION.....	141
DISCUSSION	157
5.1 DISCUSSION COMPLÉMENTAIRE AU CHAPITRE II	157
5.1.1. Détection et caractérisation des nouveaux transcrits antisens produits par HTLV-3 et HTLV-4.....	157
5.1.3. Localisation des protéines APH-3 et APH-4.....	159
5.1.4. Détection des protéines APH-3 et APH-4 par western blot.....	164
5.1.5. Inhibition de la trans-activation tax-dépendante.....	165
5.2 DISCUSSION COMPLÉMENTAIRE AU CHAPITRE III	167
5.2.1 Le motif bZIP atypique de APH-3 et APH-4.....	167
5.2.3. Activation de la transcription AP-1 dépendante.....	172
5.2.4. Activation du promoteur de hTERT	177
5.3. DISCUSSION COMPLÉMENTAIRE AU CHAPITRE IV	178
5.3.1. Interaction entre HBZ et les protéines majeures du nucléole.....	178
5.3.2. Est-ce que l'interaction avec B23 et C23 est indépendante?.....	183
5.3.3. Quand a lieu l'interaction entre sHBZ et B23 ou C23?.....	184
5.3.4. Interaction entre sHBZ et les composants du nucléole.....	185
5.3.5. Rôle de HBZ dans le nucléole	186
CONCLUSION	193
BIBLIOGRAPHIE.....	194
ANNEXE.....	I

Liste des figures

Figure 1.1. Distribution des sous-types HTLV-1 à travers le monde.....	8
Figure 1.2 Structure du rétrovirus HTLV-1.....	17
Figure 1.3 Mécanisme moléculaire de la transcription inverse.....	20
Figure 1.4 Schéma du cycle viral de HTLV-1.....	23
Figure 1.5 Schéma du LTR de HTLV-1 incluant les régions amplificatrices.....	26
Figure 1.6 Structure secondaire du LTR de HTLV-1.....	27
Figure 1.7 Position des ORF dans le génome de HTLV-1 et des transcrits.....	30
Figure 1.8 Comparaison des domaines structuraux et fonctionnels de Tax 1, Tax 2, Tax 3 et Tax 4.....	36
Figure 1.9 Position de l'ORF de HBZ sur le brin complémentaire du génome viral.....	44
Figure 1.10. Schéma de la structure génomique de HTLV-1 et HTLV-2.....	45
Figure 1.11. Structure moléculaire de HBZ.....	47
Figure 1.12. Implication de HBZ sur la régulation de la transcription de HTLV-1 dépendante Tax.....	49
Figure 1.13. Rôle de HBZ sur la régulation de la transcription par les facteurs transcriptionnels de la famille Jun.....	52
Figure 1.14. Les rôles opposés de HBZ et Tax dans plusieurs voie de signalisation.....	54
Figure 2.1. Position of antisense ORF in HTLV-3 and HTLV-4 genomes.....	82
Figure 2.2. Detection of spliced HTLV-3 and HTLV-4 antisense transcripts.....	83

Figure 2.3. Identification of transcription initiation sites and poly(A) addition sites for <i>APH-3</i> and <i>APH-4</i> transcripts.....	85
Figure 2.4. Predicted amino acid sequences of APH-3 and APH-4.....	86
Figure 2.5. APH-3 and APH-4 demonstrate different cellular localizations.....	87
Figure 2.6. Partial colocalization of APH-3 and APH-4 with HBZ.....	89
Figure 2.7. Antisense expression is upregulated in Jurkat T cells after activation.....	90
Figure 2.8. APH-3 and APH-4 repress Tax1- and Tax3-dependent transactivation of the HTLV-1 LTR.....	91
Figure 3.1. APH-3 and APH-4 activate Jun-dependent transcription of the collagenase promoter.....	116
Figure 3.2. APH-3 and APH-4 activate Jun-dependent transcription in a heterologous promoter and in the environment of chromatin.....	117
Figure 3.3. APH-3 and APH-4 augment hTERT promoter activation by Jun factors.....	118
Figure 3.4. APH-3 and APH-4 interact with each Jun family member.....	119
Figure 3.5. Absence of an activation domain in the N-terminal region of APH-3 and APH-4.....	120
Figure 3.6. Deletion of the APH-3 and APH-4 atypical leucine zipper (LZ) region abolishes the increased transactivation potential of JunB, c-Jun, and Jun-D.....	121
Figure 3.7. Partial deletion of the atypical LZ region of APH-3 and APH-4 inhibits the increased transactivation potential of JunB, c-Jun, and Jun-D.....	123
Figure 3.8. Leucine residues in the APH-3 and APH-4 atypical LZ region are important for the upregulation of Jun transactivation potential.....	125

Figure 3.9. Atypical leucine zipper region in APH-3 and APH-4 is necessary for increased Jun transactivation potential and its interaction.....	127
Figure 4.1. sHBZ and uHBZ interact <i>in vivo</i> with the nucleolar protein B23.....	148
Figure 4.2. Antisense protein of HTLV-3 or -4 do not interact with B23.....	150
Figure 4.3. sHBZ interacts with another major nucleolar protein, C23.....	151
Figure 4.4. sHBZ does not alter the interaction between B23 and C23.....	152
Figure 4.5. sHBZ does not interact with B23 through its HeD or HoD domain.....	153
Figure 4.6. The interaction between sHBZ and B23 or C23 is dependent on its nucleolar localization.....	156
Figure 5.1 : Représentation schématique et structurale d'un motif coiled coil dimérisé.....	166
Annexe Figure 1. Localisation cellulaire des protéines GFP fusionnées avec un fragment de APH-3.....	i
Annexe Figure 2. Localisation cellulaire des protéines GFP fusionnées avec un double fragment de APH-3.....	ii
Annexe Figure 3. Localisation cellulaire des protéines GFP fusionnées avec un fragment de APH-4.....	iii

Liste des tableaux

Table 4.1. Primers used to generate the pRed-B23 deletion mutants.....	147
--	-----

Liste des abréviations

3-MA		3-méthyladénine
A		adénine
AD	<i>Activation Domain</i>	domaine d'activation
ADN		acide désoxyribonucléique
ADNc		acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNr		acide désoxyribonucléique ribosomal
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>	
APH	<i>Antisense Protein of HTLV</i>	
ARN		acide ribonucléique
ARNm		acide ribonucléique messenger
ARN pol II		ARN polymérase de type II
ARNt		acide ribonucléique de transfert
ASP	<i>AntiSense Protein</i>	
ATF	<i>Activating Transcription Factor</i>	
ATL	<i>Adult T-cell Leukemia</i>	leucémie à cellule T chez l'adulte
ATLL	<i>Adult T-cell Leukemia/Lymphoma</i>	
ATLV	<i>Adult T-cell Leukemia virus</i>	virus T-leucémique adulte
ATP		adenosine-5'-triphosphate
BER	<i>Base Excision Repair</i>	
BIV	<i>Bovine Leukemia Virus</i>	virus leucémique bovin
bp	<i>base pair</i>	paire de base
bpV[pic]	<i>dipotassium bisperoxo (picolinato) oxovanadate</i>	
BR1/BR2	<i>Basic Region</i>	région basique
bZIP	<i>Basic Leucine Zipper</i>	fermeture éclair basique
C		cytosine
CA		capside
CBP/p300	<i>CREB Binding Protein / E1A Binding Protein p300</i>	

CD4 / 8	<i>Cluster of Differentiation 4 / 8</i>	
CDK	<i>Cyclin-Dependent Kinase</i>	
C/EBP	<i>CCAAT/Enhancer Binding Protein</i>	
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i>	acide désoxyribonucléique complémentaire
CoIP		co-immunoprécipitation
CPSF	<i>Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor</i>	
CRE	<i>cAMP Response Element</i>	
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding Protein</i>	
CRM1	<i>Chromosome Region maintenance 1</i>	
CRS	<i>Cis-acting Repressive Sequence</i>	séquence répressive agissant en cis
CTL	<i>Cytotoxic T Lymphocyte</i>	lymphocyte T cytotoxique
DBD	<i>DNA-Binding Domain</i>	domaine de liaison à l'ADN
DC		cellule dendritique
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	
dNTP		désoxyribonucléotide triphosphate
DTT		dithiothréitol
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>	Chimiluminescence
EDTA		acide éthylènediaminetétraacétique
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>	
Env		enveloppe
FIV	<i>Feline Immunodeficiency Virus</i>	virus d'immunodéficience féline
G		guanine
Gag	<i>Group-Specific Antigen</i>	
GLUT-1	<i>Glucose Transporter-1</i>	
GTP	<i>Guanosine-5'-Triphosphate</i>	
HAM/TSP:	<i>HTLV-1-Associated Myelopathy / Tropical Spastic Paraparesis</i>	myélopathie associée à HTLV-1/paraparésie spastique tropicale
HAT	<i>Histone AcetylTransferase</i>	histone acétyl transférase

HBZ	<i>HTLV-1 bZIP factor</i>	
HDAC	<i>Histone deacetylase</i>	histone déacétylase
HPIV-1	<i>Human ParaInfluenza Virus-1</i>	virus parainfluenze humain-1
HPV	<i>Human Papilloma Virus</i>	virus du papillome humain
HSPG	<i>Heparan Sulfate Proteoglycans</i>	
hTERT	<i>Human Telomerase Reverse Transcriptase</i>	télomerase humaine
HTLV	<i>Human T-cell Lymphotropic Virus</i>	virus T-lymphotrope humain
HSV-1	<i>Herpes Simplex Virus-1</i>	Virus de l'herpès simplex-1
IBV		virus de la bronchite infectieuse
ICAM-1	<i>Intravellular Cellular Adhesion Molecule-1</i>	
IDU	<i>Intravenous Drug User</i>	utilisateur de drogue intraveineuse
IL		interleukine
IN		intégrase
IP		immunoprécipitation
IRES	<i>Internal Ribosome Entry Site</i>	
JEV	<i>Japanese Encephalitis virus</i>	virus encéphalite japonais
L		leucine
LEF	<i>Lymphocyte Enhancer Factor</i>	
LFA-1	<i>Leukocyte Function-associated Antigen-1</i>	
LT		lymphocyte T
LTR	<i>long terminal repeat</i>	séquence terminale longue répétée
(MgCO ₃) ₄ · Mg(OH) ₂ ·5 H ₂ O		magnésium hydroxycarbonate 5-hydrate
MgSO ₄		sulfate de magnésium
MLV:	<i>Murine Leukemia Virus</i>	virus leucémique murin
MMR	<i>Mismatch Repair</i>	
mRFP	<i>Monomeric Red Fluorescent Protein</i>	
mRNA:	<i>messenger ribonucleic acid</i>	acide ribonucléique messenger

MTOC		centre d'organisation des microtubules
NaCl		chlorure de sodium
NaF		fluorure de sodium
Na ₂ PO ₄		tétraoxophosphate de disodium
NC		nucléocapside
NER	<i>Nucleotide Excision Repair</i>	
NFAT	<i>Nuclear Factor of activated T cells</i>	
NF-kB	<i>Nuclear Factor-Kappa B</i>	
NK	<i>Natural Killer</i>	
NES	<i>Nuclear Export Signal</i>	signal d'exportation nucléaire
NLS	<i>Nuclear Localisation Signal</i>	signal de localisation nucléaire
NoLS	<i>Nucleolar Localisation Signal</i>	signal de localisation nucléolaire
NOR		région organisatrice nucléolaire
NP-1	<i>Neuropilin-1</i>	
NP-40	<i>nonyl phenoxy polyethoxy ethanol</i>	
nt		nucléotide
ORF	<i>Open Reading Frame</i>	cadre de lecture ouvert
pb		paire de bases
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>	cellules mononuclées du sang périphérique
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>	
PBS	<i>Primer Binding Site</i>	site de liaison des amorces
PCAF	<i>P300/CBP Associated Factor</i>	
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>	amplification en chaîne par polymérase
PHA-P	<i>Phytohemagglutinin</i>	
PI	<i>Propidium Iodide</i>	Iodure de propidium
PIC	<i>Pre-Initiation Complex</i>	complexe de pré-initiation
PMA	<i>phorbol-12-myristate-13-acetate</i>	
PMD	<i>PDZ Domain Binding Motif</i>	
PML	<i>Promyelocytic Leukemia</i>	
PNB		corps prénucléolaire
Pol		polymérase

poly A		polyadénylation
PTM	<i>Post-Translational Modification</i>	Modification post traductionnelle
PTP	<i>Protein Tyrosine Phosphatase</i>	
Pro		protéase
PVDF	<i>Polyvinylidene Difluoride</i>	
PVL	<i>ProViral Load</i>	
PTLV	<i>Primate T-cell Lymphotropic Virus</i>	virus T-lymphotrope primate
R		région unique répétée
RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>	
RexRE	<i>Rex Response Element</i>	
RLU	<i>Relative Light Unit</i>	
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>	Acide ribonucléique
RNP		ribonucléoprotéine
ROS		Dérivés réactifs de l'oxygène
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>	
RT		réverse transcriptase ou transcriptase inverse
SA		site accepteur d'épissage
SD		site donneur d'épissage
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>	
shRNA	<i>Short Hairpin RNA</i>	
SILAC	<i>Stable Isotope Labeling by Amino acid in cell Culture</i>	marquage isotopique stable par des acides aminés dans une culture de cellules
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>	
SNB	<i>SUMO-1 nuclear body</i>	
SU		protéine d'enveloppe de surface
SUMO	<i>Small Ubiquitin-like Modifier</i>	
TCF	<i>T-cell Factor Transcription</i>	
TCR	<i>T-Cell Receptor</i>	récepteur des cellules T
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>	
TM		protéine d'enveloppe transmembranaire

TNF α	<i>Tumor Necrosis Factorα</i>	
Treg		lymphocyte T régulateur
TSS	<i>Transcription Start Site</i>	Site d'initiation de la transcription
U		uracile
U3		unique en 3'
U5		unique en 5'
V		valine
VRS		virus respiratoire syncytial
WB	<i>Western Blot</i>	
Wnt	<i>Wingless</i>	

Liste des symboles

aa : acide aminé

h : heure

kb : kilobase

kDa : kilodalton

mM : micromolaire

min : minute

ml : millilitre

mM : millimolaire

ng : nanogramme

nm : nanomètre

U : unité

μg : milligramme

μg : microgramme

V : volt

α : alpha

β : bêta

% : pourcentage

≈ : environ

°C : degré Celsius

À ma famille

Remerciements

Il est important pour moi de débiter cette thèse en remerciant les gens qui m'ont entourée lors de mon doctorat. Je tiens d'abord à remercier mes directeurs de recherche Benoit Barbeau et Guy Lemay. Voilà déjà plusieurs années que j'ai débuté mon doctorat dans le laboratoire de Benoit où j'ai pu mûrir en tant que scientifique, mais aussi m'amuser. Benoit a toujours su m'encourager lorsque je manquais de confiance. Il savait plus que moi ce dont j'étais capable de réaliser et pour cela, je lui en serai toujours reconnaissante. Ce fut six merveilleuses années.

J'aimerais également remercier mes collègues de laboratoire, autant les anciens que les nouveaux membres. Votre présence a rendu mon expérience dès plus agréable. Un merci spécial à Cynthia Torresilla pour ses nombreux conseils scientifiques, mais aussi pour son amitié. J'aimerais aussi remercier Amandine Vargas dont sa motivation contagieuse m'a permis de me dépasser. Je la remercie aussi pour être simplement une de mes amies les plus chères. Je remercie également Maude Éthier-Chiasson pour son amitié précieuse et pour avoir toujours été là pour moi.

Un très grand merci à mes parents, Jean-Claude et Francine, et à mon frère, Jasmin pour leur amour, leur appui et leurs encouragements constants durant ces nombreuses années. Je sais à quel point vous êtes fiers de moi aujourd'hui.

Enfin, Simon. Si quelqu'un autour de moi a pu comprendre ce qu'implique faire un doctorat c'est bien toi. Comme pour les ascensions lors de nos périples dans les plus hautes montagnes des Andes, tu as su pendant ces dernières années quand m'enlever du poids lorsque la charge était rendue trop lourde, m'encourager lorsque j'avais de la difficulté à faire quelques pas, mais aussi prendre ma main et apprécier chaque moment du présent afin de vivre cette aventure incroyable ensemble. Nous voilà aujourd'hui, un autre sommet de franchi.

Chapitre I

État des connaissances

1.1. Généralité sur les rétrovirus

1.1.1. Classification

La première identification d'un virus remonte à la fin du 19^e siècle. Ce fut un virus de plante maintenant connu sous le nom du virus de la mosaïque du tabac. À l'époque, la définition d'un virus fut un sujet de discussion très controversée jusqu'à ce qu'André Lwoff, virologue français, suggère qu'un virus devrait être considéré comme étant sa propre entité (Lwoff 1957). Ainsi, l'« International Committee on Taxonomy of Viruses » (ICTV) classe maintenant les virus selon le type de matériel génétique, la symétrie de la capsid, la présence ou l'absence d'une enveloppe lipidique et enfin la taille du virion et de la capsid, une taxonomie basée sur le théorème d'André Lwoff (Flint 2004). Nous retrouvons ainsi les rétrovirus dans la famille des *Retroviridae* qui comptent parmi eux deux sous-familles : les *Orthoretrovirinae* et les *Spumaretrovirinae*. Cette dernière ne compte qu'un seul genre, les spumavirus. Les *Orthoretrovirinae* sont quant à eux divisés en six genres; alpharétrovirus, betarétrovirus, deltarétrovirus, epsilon-rétrovirus, gammarétrovirus et, certainement le plus connu, lentirétrovirus (Burmeister 2001). Les virus T-lymphotropes primates (*Primate T-cell Leukemia Virus*; PTLV) regroupant le virus T-lymphotrope humain (*Human T-cell Leukemia Virus*; HTLV), virus T-lymphotrope simien (*Simian T-cell Leukemia Virus*; STLV) ainsi que le virus leucémique bovin (*Bovine Leukemia Virus*; BLV), font partie du genre deltarétrovirus (Burmeister 2001). En parallèle à cette taxonomie, David Baltimore a développé une classification complémentaire en se basant sur le génome viral et le mode de synthèse d'ARNm, dans laquelle les *Retroviridae* représentent une classe unique, soit la classe VI, de

par leur génome diploïde qui, contrairement aux autres génomes ARN simple brin positif, forme un ADN intermédiaire à l'aide de leur transcriptase inverse (Cann 2012; Flint 2004).

Nous pouvons également diviser les rétrovirus en deux grandes catégories selon leur structure génomique. Les rétrovirus dits simples dont les alpharétrovirus, les betarétrovirus et les gammarétrovirus, ne contiennent que les gènes *gag*, *pro*, *pol* et *env* codant pour les protéines structurales et enzymatiques (Flint 2004). Les rétrovirus complexes possèdent en plus de ceux-ci, des gènes codant pour des protéines dites régulatrices et accessoires, leur permettant d'exercer une régulation plus rigoureuse de l'expression des gènes viraux (Flint 2004). Les deltarétrovirus, les epsilon-rétrovirus et les lentirétrovirus ainsi que les spumarétrovirus sont tous des rétrovirus dits complexes.

1.1.2 Caractéristiques

Il existe plusieurs particularités qui caractérisent les rétrovirus. En premier lieu, leur génome composé d'ARN monocaténaire de polarité positive est le seul parmi tous les virus à être présent en deux copies dans le virion, il est donc dit diploïde (Cann 2012). Ce qui différencie aussi cette famille des autres virus connus est la synthèse d'un ADN double brin à partir de cet ARN simple brin positif qui nécessite un ARN de transfert (ARNt) cellulaire spécifique liant le *primer binding site* (PBS) présent dans le LTR 5' en plus d'une enzyme appelée transcriptase inverse (aussi appelée la reverse transcriptase; RT). D'ailleurs, la découverte de la RT a réformé le dogme de la biologie moléculaire qui auparavant insistait sur le fait que l'expression du matériel génétique était unidirectionnelle (Flint 2004). Une deuxième enzyme particulière à cette famille, soit l'intégrase (IN), permet au virus de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte, ce qui en conséquence, altère la génétique de la cellule infectée (Flint 2004). Une fois intégré, le provirus ne compte que sur deux enzymes cellulaires, l'ADN polymérase et l'ARN polymérase II, afin de répliquer son génome (Cann 2012).

1.2. Les rétrovirus HTLV

1.2.1. Origine

Ce n'est qu'au début des années 80 que le premier rétrovirus humain a été découvert simultanément par deux équipes. Il a d'abord été isolé des cellules d'un patient américain avec un diagnostic de lymphome cutané à cellules T (aussi appelé syndrome de Sézary) et fut nommé HTLV-1 (Poiesz et al. 1980). Peu de temps après cette découverte, ce même virus a été isolé au Japon à partir des cellules d'un patient souffrant d'une leucémie à cellules T chez l'adulte (ATL) et fut nommé virus T-leucémique adulte (*Adult T cell leukemia Virus*; ATLTV) (Yoshida et al. 1982). L'année suivante, un nouveau membre de la famille HTLV, HTLV-2, a pu être isolé d'un patient atteint d'un lymphome cutané à cellules T (Kalyanaraman et al. 1982). Ce n'est qu'en 2005 que les rétrovirus HTLV de type 3 (HTLV-3) et HTLV de type 4 (HTLV-4) ont par la suite été découverts en Afrique chez des camerounais grâce à une réactivité croisée avec les anticorps spécifiques à HTLV-1 et HTLV-2 lors d'examens sérologiques (Calattini et al. 2005; Wolfe et al. 2005). Nous comptons jusqu'à maintenant quatre membres faisant partie des HTLV.

Les études phylogénétiques basées sur la séquence du LTR et du gène *env* ont mis en évidence l'existence de sept sous-types (génotypes) de HTLV-1 jusqu'à présent, dont les principaux sont les sous-types A (cosmopolite), sous-type B (Zaïre), sous-type C (Mélanésie) et sous-type D (pygmées) (Koralnik et al. 1994; Mahieux et al. 1997; Gessain and Cassar 2012). De nombreuses études ont mis en lumière la grande homologie qui existait entre certains sous-types de HTLV-1 et STLV-1 (jusqu'à 98%) et ont clairement montré que HTLV-1 provenait d'une transmission de son homologue simien chez l'Homme (Gessain and Cassar 2012; Watanabe et al. 1986; Sherman et al. 1992; Saksena et al. 1992; Fukasawa et al. 1987; Koralnik et al. 1994; Ibrahim et al. 1995). En effet, STLV aurait été transmis à l'Homme, il y a des milliers d'années (et encore aujourd'hui) dû à un nombre élevé d'expositions causées par la consommation de viande de brousse et les morsures lorsque les singes étaient gardés comme animaux de compagnie (Slattery et al. 1999; Koralnik et al. 1994;

Kazanji et al. 2014). Notons que seuls les singes asiatiques et africains sont porteurs de HTLV-1 (Koralnik et al. 1994; Watanabe et al. 1986; Miyoshi et al. 1983; Miyoshi et al. 1982). Selon certains chercheurs, l'ancêtre de HTLV-1/STLV-1 serait originaire de l'Asie ou de l'Indonésie dû aux nombreux variants des souches présentes dans des populations isolées en Mélanésie dont en Papouasie Nouvelle-Guinée et dans les îles Salomon (Watanabe et al. 1986; Sherman et al. 1992; Saksena et al. 1992; Koralnik et al. 1994; Liu et al. 1996). Selon eux, la propagation en Afrique aurait ensuite suivi la transmission en Mélanésie. Il est cependant plus envisageable que HTLV-1/STLV-1 soit originaire d'Afrique (Vandamme et al. 1994), puisque ce continent présente une plus grande variété de sous-types HTLV-1/STLV-1 suggérant une longue période d'adaptation du virus chez les primates non humains africains (Gessain and Cassar 2012). De plus, la distribution de HTLV-1/STLV-1 est comparable à celle du VIH/VIS, HTLV-2/STLV-2, HTLV-3/STLV-3 et HTLV-4 (Goubau et al. 1993; Goubau et al. 1994) (Froment et al. 1993; Calattini et al. 2005; Wolfe et al. 2005; Courgnaud et al. 2004; Meertens and Gessain 2003; Van Dooren et al. 2001; Sharp and Hahn 2011). Même si l'origine exacte de HTLV-1/STLV-1 est encore mal comprise, il est maintenant supposé que l'apparition de HTLV-1 chez l'Homme soit le résultat de trois importantes transmissions interespèces différentes, dont une en Afrique de l'Ouest, une en Afrique Centrale et une autre en Indonésie correspondant aux sous-types A, B et C respectivement (Liu et al. 1996).

1.2.2. Distribution et transmission

1.2.2.1. Distribution

Une étude a récemment estimé la prévalence mondiale de HTLV-1 à 5-10 millions de personnes infectées (Gessain and Cassar 2012). Cependant, dû au manque d'études épidémiologiques, ce chiffre ne tient compte que des principales foyers endémiques, dont l'Afrique Sub-Saharienne, le sud-ouest du Japon, le sud-est de l'Asie, l'Amérique du Sud, les Caraïbes, le Moyen-Orient, la Roumanie et l'Australo-Mélanésie (Gessain and Cassar 2012). Nous comptons présentement sept sous-types (génotypes) de HTLV-1 à travers le monde, sous-type A (cosmopolite), sous-type B (Zaire ou Central), sous-type C (Mélanésie), sous-type

D (pygmées) et les moins fréquents, soit les sous-types E, F et G (Figure 1.1). En Afrique, nous y retrouvons tous les sous-types à l'exception du sous-type C ainsi que le sous-groupe japonais faisant partie du sous-type A. Nous y comptons aussi le plus grand nombre d'individus séropositifs pour HTLV-1 (Gessain and Cassar 2012). Plus précisément, l'Afrique Central et l'Afrique de l'Ouest montrent les prévalences les plus élevées pouvant atteindre 25% dans une région du sud-est du Gabon (Delaporte et al. 1989a; Delaporte et al. 1989b; Le Hesran et al. 1994). Autrement, la prévalence varie entre 0,2-3% en fonction du pays et de l'étude (Gessain and Cassar 2012).

En Asie, le Japon représente le bassin le plus important d'infection par HTLV-1 ; près d'un million d'individus sont infectés (prévalence de 0,32%) (Gessain and Cassar 2012). De plus petites régions endémiques sont aussi trouvées en Chine, en Iran et à Taiwan. Au Japon, nous retrouvons le sous-type Cosmopolite qui inclut les sous-groupes Transcontinental et Japonais. Une analyse phylogénétique a récemment montré que ces sous-groupes avaient évolué séparément et directement à partir du sous-type Cosmopolite (Eguchi et al. 2009). Il a alors été proposé que les sous-groupes Transcontinental et Japonais auraient divergé en Asie avant leur arrivée au Japon et que les trajets migratoires des Mongoloïdes lors de la préhistoire auraient introduit HTLV-1 à deux reprises dans ce pays (Eguchi et al. 2009; Miura et al. 1994). Cette hypothèse supporterait la présence des différents sous-groupes dans les populations d'ethnies distinctes (Ainu, Ryukyuan et Wajin), telle que proposée dans les années 80 (Ishida and Hinuma 1986).

Le sous-type Cosmopolite est aussi répandu à travers les Amériques. Malgré le peu d'études épidémiologiques sur HTLV-1 en Amérique du Nord, il est estimé qu'il y a près de 100 000 personnes vivant avec une infection par ce rétrovirus aux États-Unis (Gessain and Cassar 2012). Au Canada, une séroprévalence de 0,56% a été montrée chez les amérindiens de la Colombie-Britannique ayant fréquenté une clinique de traitement de toxicomanie et de 2,8% chez la tribu Nuu-Chah-Nulth habitant l'île de Vancouver (Martin et al. 2002; Peters et al. 2000). Les sous-groupes Transcontinental et Japonais sont d'ailleurs prépondérants chez le peuple amérindien de la Colombie-Britannique, et leur présence suggère une transmission lors du trajet migratoire il y a plus de 10,000 ans par le détroit de Behring (Miura et al. 1994;

Andonov et al. 2012; Dekaban et al. 1994; Peters et al. 2000; Picard et al. 1995). Ce mouvement migratoire expliquerait aussi la présence de ces mêmes sous-types en Amérique Centrale et du Sud (Gessain and Cassar 2012). Aujourd'hui, ce trajet du nord de l'Asie vers l'Amérique par le détroit de Béring est cependant contesté par certaines études anthropologiques.

L'Amérique centrale et du Sud représente aussi un bassin important pour HTLV-1. En effet, sa prévalence est estimée à 1,6 million de personnes infectées (Gessain and Cassar 2012). En plus des sous-groupes Transcontinental et Japonais, nous y retrouvons aussi le sous-groupe d'Afrique de l'Ouest (Awa). Ce dernier aurait fait son apparition lors de la traite des esclaves, tout comme son apparition dans les Caraïbes (Gessain and Cassar 2012; Miura et al. 1994). Entre 250,000-525,000 personnes sont porteuses de HTLV-1 dans les Caraïbes (Gessain and Cassar 2012).

À l'autre extrémité du monde, en Australo-Mélanésie, nous retrouvons le sous-type du HTLV-1 le plus divergent, soit le sous-type C ou Mélanésien. En effet, ce sous-type peut être sous-divisé en trois sous-familles qui sont basées sur leur région géographique : Papouasie-Nouvelle Guinée, Solomon/Vanuatum et Australien (Gessain et al. 1991; Bastian et al. 1993; Cassar et al. 2013). Malgré cette diversité, cette région ne représente qu'un petit foyer d'infection (6,000- 12,000 cas d'infection) venant de l'Asie du Sud-Est (Gessain and Cassar 2012).

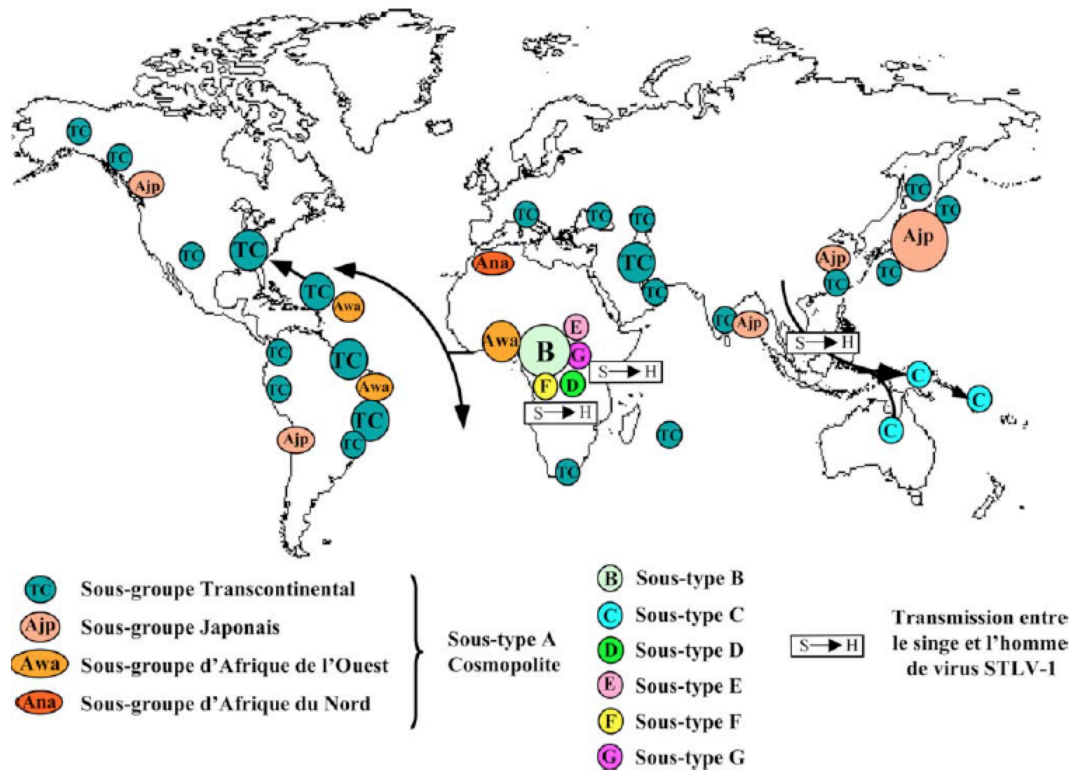


Figure 1.1. : Distribution des sous-types HTLV-1 à travers le monde. Le sous-type Cosmopolite (A) est le plus répandu à travers le monde. Les génotypes B, D, E, F et G sont spécifiques à l'Afrique tandis que le génotype C est spécifique à la région Australo-Malésienne. Image tirée de (Gessain and Cassar 2012).

Aux États-Unis et possiblement à travers l'Amérique, les infections par le virus HTLV-2 prennent une plus grande proportion (approximativement 197 000 personnes infectées aux États-Unis) que celles par HTLV-1 (Chang et al. 2014; Paiva and Casseb 2015). Comme ce dernier, HTLV-2 est aussi répandu en Amérique et en Afrique Centrale chez les indigènes (Paiva and Casseb 2015). Nous observons une prévalence de 1,6% chez la tribu Nuu-Chah-Nulth habitant l'île de Vancouver alors que la proportion de gens infectés dans la population en général aux États-Unis est estimée à 0,1-0,2% (Chang et al. 2014; Peters et al. 2000). Cependant, HTLV-2 touche particulièrement les utilisateurs de drogues intraveineuses (*Intravenous Drug User*; IDU). En effet, une étude réunissant plusieurs centres de traitement de toxicomanie a montré une prévalence de 20% de séropositivité pour HTLV-2 chez les IDU

aux États-Unis (Briggs et al. 1995). Une étude similaire a été réalisée au Canada où 1,8% des amérindiens de la Colombie-Britannique ayant fréquenté une clinique de traitement de toxicomanie ont testé positif pour HTLV-2 alors qu'au sud du Vietnam, une proportion alarmante de 60% a été rapportée chez les toxicomanes (Martin et al. 2002; Roucoux and Murphy 2004). Ainsi, ce virus est surtout répandu chez les IDU à travers le monde (Briggs et al. 1995; Cimarelli et al. 1995; Egan et al. 1999; Etzel et al. 2001; Fukushima et al. 1995; Khabbaz et al. 1991). Bien qu'un chiffre précis n'a pu être déterminé, il est estimé que plusieurs millions de personnes sont infectées par HTLV-2 à travers le monde (Roucoux and Murphy 2004).

Jusqu'à présent, quatre personnes, tous des hommes de plus de 55 ans, vivants dans la forêt tropicale du sud du Cameroun et pratiquant la chasse, ont été identifiés porteurs du virus HTLV-3 (Calattini et al. 2005; Calattini et al. 2009; Wolfe et al. 2005; Zheng et al. 2010). Ces quatre isolats de virus diffèrent de l'un à l'autre et reflètent possiblement la diversité de ce virus en Afrique. En effet, il a été démontré que quatre sous-types de son homologue simien, STLV-3, existaient en Afrique (STLV-3A, STLV-3B, STLV-3C et STLV-3D) (Gessain et al. 2013).

Jusqu'à présent, seul un homme de 48 ans, chasseur habitant aussi la forêt tropicale du sud du Cameroun, a été identifié comme étant infecté par HTLV-4 (Wolfe et al. 2005). Ce virus présente entre 62 à 71% d'identité avec les autres HTLV au niveau de sa séquence nucléotidique (Switzer et al. 2009). Étant équidistant des autres membres PTLV sur l'arbre phylogénétique, HTLV-4 forme son propre groupe et est d'autant plus le seul virus en faisant partie puisqu'aucun homologue simien n'a été trouvé jusqu'à ce jour (Wolfe et al. 2005; Sintasath et al. 2009b; Sintasath et al. 2009a). Selon une analyse d'horloge moléculaire, HTLV-4 est le membre des virus HTLV le plus ancien (Switzer et al. 2009).

1.2.2.1. Transmission et propagation

La transmission de HTLV, même si ardue, se fait de façon horizontale ou verticale par le transfert de cellules infectées entre deux personnes par trois routes principales : le sang, un contact sexuel et mère-enfant. Les rapports sexuels non protégés entre deux personnes, plusieurs partenaires sexuels, la présence de plaies ou d'ulcères génitales et la prostitution sont tous associés à une infection par HTLV-1 ((Roucoux et al. 2005) pour revue ((Proietti et al. 2005)). La mode de transmission le plus efficace se fait cependant par une exposition à du sang contaminé avec HTLV-1 par voie intraveineuse (pour revue (Proietti et al. 2005)). Dans le passé, une proportion d'infection de 40-50% avait été observée suite à une transfusion avec du sang contaminé (Okochi et al. 1984; Manns et al. 1992). Les dons de sang sont aujourd'hui testés pour HTLV-1 ce qui réduit de façon drastique la propagation, mais les IDU demeurent un réservoir important. La transmission peut également se faire de façon verticale, c'est-à-dire de la mère à l'enfant à travers le placenta, lors de l'accouchement ou de l'allaitement maternel, mais reste relativement faible (Gallo 2005; Carneiro-Proietti et al. 2014). En effet, une proportion de 10-25% de transmission a été montrée lors de l'allaitement lorsque celui-ci était d'une durée prolongée de plus de 6 mois (Hino 2011). Cette transmission est aussi favorable lorsque la charge virale est élevée (Ureta-Vidal et al. 1999). La transmission à travers le placenta ou lors de l'accouchement est négligeable contrairement au VIH-1 et VIH-2 (Fujino and Nagata 2000).

1.2.2.1.1 Mécanismes de transmission

Au niveau cellulaire, le virus HTLV-1 utilise deux voies afin de se propager: par une infection *de novo* ou par prolifération clonale. Puisque très peu de particules virales infectieuses sont produites lors d'une infection par HTLV-1 contrairement au VIH (Derse et al. 2001; Pique and Jones 2012; Wei et al. 1995; Ho et al. 1995), le virus priorise un contact cellule-cellule entre deux LT CD4+ ou une cellule dendritique (*Dendritic Cell*; DC) et un LT

CD4+ (Derse et al. 2001; Jones et al. 2008), afin de se propager lors du premier stade de l'infection (Pique and Jones 2012). En effet, une infection *de novo* par un contact cellule-cellule est 100 fois plus efficace que par un virus dit *cell-free* (Delamarre et al. 1997). Notons que les DC peuvent cependant être infectées par HTLV-1 sans avoir la nécessité d'un contact cellule-cellule. Jusqu'à présent, trois mécanismes ont été décrits pour une transmission cellule-cellule efficace.

Le premier se fait *via* la formation d'une synapse virologique entre une cellule infectée et une cellule saine. D'abord, la transmission débute par un rapprochement étroit entre deux cellules qui forment entre elles une jonction nommée synapse virologique. À cette jonction, une accumulation de protéines Gag (p19 et p15) et Env est observée (Igakura et al. 2003). Cette translocation de protéines est médiée par la polarisation du centre d'organisation des microtubules (MTOC) dans la cellule infectée vers la synapse virologique (Igakura et al. 2003). La polarisation du MTOC est engendrée par Tax ainsi que par un signal produit par la cellule saine grâce aux molécules de surface de cellules T ICAM-1 et LFA-1 (Nejmeddine et al. 2005; Barnard et al. 2005). Les récepteurs cellulaires de HTLV-1, le transporteur de glucose 1 (*Glucose transporter 1*; GLUT1) et la neuropiline-1 (NRP-1) sont aussi retrouvés à la synapse virologique (Ghez et al. 2006). Après une courte période, la protéine Gag ainsi que l'ARN génomique du HTLV-1 sont transportés à travers la synapse virologique vers la cellule saine, infectant ainsi cette cellule (Igakura et al. 2003). Des particules virales peuvent aussi bourgeonner dans la synapse virologique et infecter la cellule saine par un mécanisme qui est encore mal compris (Majorovits et al. 2008).

Récemment, un deuxième mécanisme de transmission par contact cellule-cellule a été montré. Celui-ci se fait par la formation de conduits cellulaires engendrés par la protéine virale p8 permettant d'établir un contact entre deux cellules à une certaine distance (Van Prooyen et al. 2010b). Une augmentation de molécules LFA-1 à la surface des lymphocytes est induite par cette protéine virale, ce qui engendre un rapprochement entre les lymphocytes *via* LFA-1/ICAM-1 et facilite ainsi la transmission virale (Van Prooyen et al. 2010b). Il a également été démontré que p8 augmentait le nombre et la longueur de ces conduits et ainsi le nombre de contacts entre les cellules (Van Prooyen et al. 2010b).

Enfin, un troisième mécanisme augmentant la transmission virale par un contact cellule-cellule est par l'entremise d'un agrégat de virions à la surface des LT CD4+ entouré d'une matrice extracellulaire rappelant un biofilm bactérien (Pais-Correia et al. 2010).

Lors de la phase chronique de l'infection par HTLV-1, la prolifération polyclonale est le mode de propagation principal et permet en partie, au virus de persister (Zane et al. 2009). Cette propagation s'effectue ainsi lors de la mitose et n'engendre aucune mutation dans la séquence nucléotidique du virus, contrairement au taux élevé de mutation lors de l'étape de transcription inverse durant une infection *de novo* (Gessain et al. 1992; Ina and Gojobori 1990). Cependant, cette prolifération et l'abondance d'un clone sont associées à l'intégration du provirus dans certaines régions du génome cellulaire : dans un site transcriptionnellement actif (un gène cellulaire), près d'un promoteur (site de liaison à des facteurs de transcription ou d'ilots CpG) ou près d'histones associées à des promoteurs transcriptionnellement actifs du génome cellulaire (Barbeau et al. 2014; Cook et al. 2014; Meekings et al. 2008). Il a aussi été montré que la prolifération d'un clone corrèle proportionnellement avec une orientation similaire du provirus à celle du gène (Meekings et al. 2008; Gillet et al. 2011; Melamed et al. 2013). À l'aide de leur nouvelle méthode *DivE*, l'équipe de Bangham a récemment estimé ce nombre d'espèces de clones infectés à plus de 29,000 en circulation chez un individu asymptomatique (Laydon et al. 2014). De façon intéressante, la maladie est généralement caractérisée par un monoclonal qui se retrouve en grande proportion dans les cellules tumorales (Yoshida et al. 1984).

1.2.3. Maladies associées

1.2.3.1. ATL

La majorité des gens infectés par HTLV-1 demeurent asymptomatiques tout au long de leur vie. Ce n'est qu'une proportion de 2 à 5% de ces gens qui, après une période de latence d'environ 40 ans, développeront une maladie agressive et mortelle, soit une leucémie à cellules T chez l'adulte (*Adult T Cell Leukemia/Lymphoma*; ATLL) (Murphy et al. 1989). En

effet, HTLV-1 est l'agent causatif de l'ATLL, et, d'un point de vue historique, ce rétrovirus est le premier à avoir été véritablement associé à un cancer chez l'humain. L'ATLL est caractérisée par une prolifération monoclonale non contrôlée des LT CD4+ infectés entraînant des leucémies ou des lymphomes associés à des lésions de la peau, une hypercalcémie et dans plusieurs cas, une immunodéficience (Burmeister 2001; Kiyokawa et al. 1987; Richardson et al. 1990). Ces cellules leucémiques sont identifiées en microscopie optique par leur noyau typiquement multilobé ressemblant à une fleur, leur chromatine condensée, le peu ou l'absence de nucléoles et un cytoplasme pouvant être coloré avec un agent basique (Uchiyama 1997; Nicot 2005). Un facteur de risque très important associé au développement de l'ATLL est une charge provirale (PVL) élevée quoique plusieurs patients asymptomatiques ont aussi une PVL élevée (Demontis et al. 2013). De plus, il a été montré qu'il pouvait y avoir des cas d'ATLL où il y avait présence de plus d'un clone dans les cellules tumorales (Cook et al. 2014; Tsukasaki et al. 1997).

Même si la population du sud-ouest du Japon et des Caraïbes a plus tendance à développer l'ATLL, aucun génotype viral (ou mutations) n'a encore été associé à cette maladie (Gessain and Cassar 2012). Selon les symptômes manifestés et la proportion de cellules leucémiques dans le sang, quatre sous-types cliniques de l'ATLL ont été identifiés: « smoldering », chronique, lymphome et aiguë (en ordre de gravité). Les personnes atteintes par les sous-types lymphome ou aiguë finissent par en décéder en moins d'un an malgré les traitements offerts aujourd'hui (voir ci-dessous) (Tamura 1996; Nicot 2005). Contrairement à HTLV-1, le virus HTLV-2 n'est pas associé à une leucémie malgré le fait qu'une lymphocytose bénigne est observée (Araujo and Hall 2004; Bartman et al. 2008).

1.2.3.2. HAM/TSP

La myélopathie associée à HTLV-1/paraparésie spastique tropicale (*HTLV-1 Associated Myelopathy/ Tropical Spastic Paraparesis*; HAM/TSP) est une myélopathie chronique observée après seulement quelques années d'infection chez 0,25 à 4% des gens infectés par HTLV-1 (Gessain et al. 1985; Osame et al. 1986; Osame et al. 1990; Iwasaki

1990). Nous observons une prévalence particulièrement élevée dans les Caraïbes. La manifestation de cette maladie est caractérisée par une paraparésie spastique (perte de sensibilité des extrémités et un mauvais fonctionnement du sphincter) causée par une infiltration de lymphocytes dans le système nerveux central entraînant une démyélinisation de celui-ci (Nakagawa et al. 1996). Une charge provirale élevée semble prédisposer les individus infectés à cette maladie; cependant ces résultats ont récemment été contestés (Gessain et al. 1990; Nagai et al. 1998; Barbeau et al. 2014). Quelques cas de désordres neurologiques pouvant s'apparenter au HAM/TSP ont été rapportés chez des patients infectés par HTLV-2, dont plusieurs étaient co-infectés par le VIH-1 (Araujo and Hall 2004; Berger et al. 1992; Rosenblatt et al. 1992; Harrington et al. 1993; Jacobson et al. 1993; Feuer and Green 2005). Il est ainsi difficile d'évaluer si HTLV-2 est la cause de ces désordres observés.

1.2.3.3. Autres maladies

Plusieurs conditions autoimmunes ont aussi une forte association avec HTLV-1, dont le HAID (*HTLV-1 Associated Infective Dermatitis*), un eczéma chronique du derme souvent accompagné d'une co-infection bactérienne (LaGrenade et al. 1990; McGill et al. 2012). Les enfants infectés lors d'une transmission mère-enfant sont généralement plus susceptibles à développer cette maladie vers l'âge de deux ans ainsi qu'à développer le HAM/TSP à l'âge adulte (McGill et al. 2012). Certaines personnes infectées par HTLV-1 vont aussi souffrir d'une uvéite nommée HAU (*HTLV-1 Associated Uveitis*) compromettant la vision de la personne (Mochizuki et al. 1992). Des lymphocytes T infectés, des particules virales ainsi que des protéines virales sont observés au site d'inflammation oculaire (pour revue (Kamoi and Mochizuki 2012)). Enfin, certains individus souffrent aussi d'arthropathie inflammatoire chronique au niveau des membres inférieurs et supérieurs (*HTLV-1 Associated Arthropathy*) (Nishioka et al. 1989) et de polymyosite (Morgan et al. 1989).

Contrairement à HTLV-1, aucune corrélation avec le développement d'une quelconque maladie n'a été observée jusqu'à présent chez les quelques patients infectés par HTLV-3 et HTLV-4, certainement dû au manque de données disponibles (Calattini et al.

2005; Calattini et al. 2009; Wolfe et al. 2005; Zheng et al. 2010). Des études longitudinales sont donc requises afin d'évaluer la pathogénicité de ces virus.

1.2.3.4. Traitements pour ATL

Le traitement habituel pour contrer l'ATL consiste en une chimiothérapie combinatoire, telle que la combinaison VCAP-AMP-VECP qui s'avère une des méthodes les plus efficaces jusqu'à présent (Tsukasaki et al. 2007). Une thérapie antivirale, soit des doses d'interféron alpha ($IFN\alpha$) combiné au zidovudine (AZT), montre aussi de bons résultats, en excluant cependant les cas de lymphomes (Kchour et al. 2007; Gill et al. 1995). En effet, le choix du traitement dépendra du sous-type cancéreux (« smoldering », chronique, lymphome ou aiguë) ainsi que de son pronostic basé sur certaines données cliniques et moléculaires dont le niveau d'albumine et de LDH, l'âge, le nombre de lésions, la présence ou non d'hypercalcémie, certains marqueurs génétiques, etc. (Tsukasaki et al. 2009; Utsunomiya et al. 2015). Les cas les plus agressifs de l'ATL doivent suivre un traitement de chimiothérapie suivi d'une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (CSH) (Tsukasaki and Tobinai 2013). Le développement d'analogues de purine, d'inhibiteurs de HDAC et d'anticorps monoclonaux ouvrira certainement la voie à de nouveaux traitements dans l'avenir (Tsukasaki and Tobinai 2013). Des essais cliniques de phase I et II ont déjà montré que l'utilisation d'un anticorps monoclonal CCR4 était efficace pour réduire le nombre de cellules T régulatrices dans les cas de rechute de l'ATL (Yamamoto et al. 2010; Ishii et al. 2010).

Malgré ces avancées, le pourcentage de survie après trois ans n'est que de 24% chez les patients atteints des formes les plus agressives de l'ATLL (Tsukasaki et al. 2007). De nouveaux traitements sont donc absolument nécessaires afin que les gens atteints de l'ATLL puissent avoir une plus longue et une meilleure qualité de vie en espérant un jour être en rémission complète.

1.2.4. Structure du virion

Basée sur ses caractéristiques morphologiques, la particule virale de HTLV-1 est qualifiée de virus de type C et a généralement une taille entre 80-100 nm (Coffin 1997). Chaque particule virale contient deux brins d'ARN positifs monocaténares. Ces deux brins sont associés à des protéines virales, telles que la transcriptase inverse (p62/p32), l'intégrase (IN ou p14), la protéase (Pro ou p28) et la nucléocapside (p15) (Verdonck. 2007). Ce complexe ribonucléoprotéique est protégé par un manteau ayant une forme icosaédrique et constitué de dimères de capsid (p24), ces derniers étant entourés d'une matrice (p19) (Flint 2004). Ensuite, une enveloppe formée d'une bicouche lipidique obtenue à partir de la membrane cellulaire lors du bourgeonnement entoure la matrice et présente à sa surface deux glycoprotéines; glycoprotéine transmembranaire (TM ou gp21) et de surface (SU ou gp46).

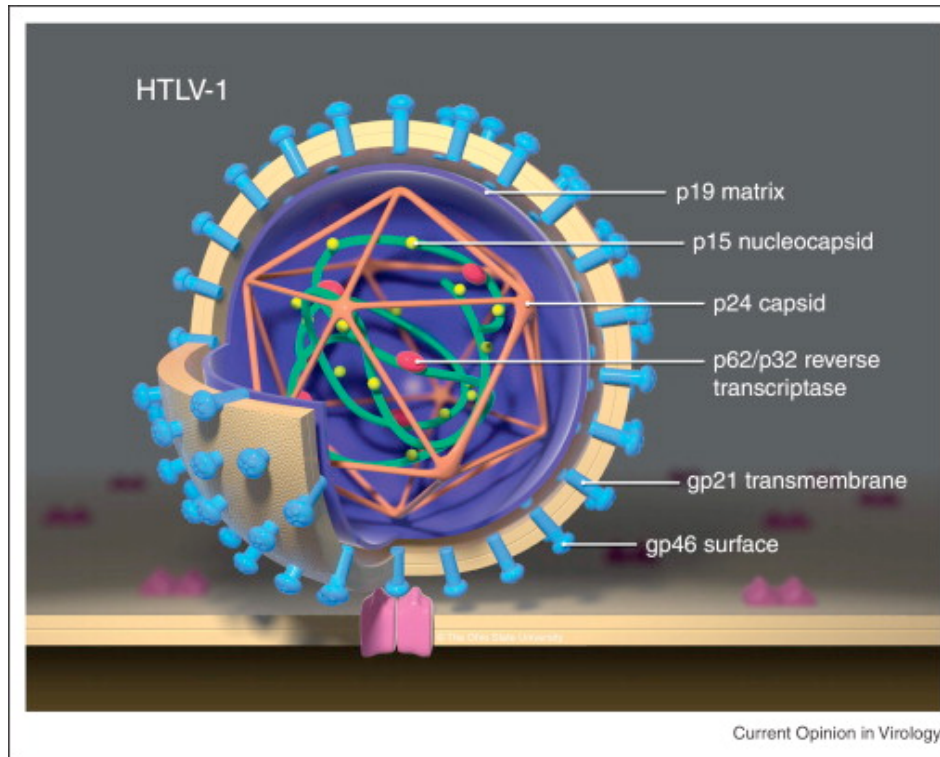


Figure 1.2. : Structure du rétrovirus HTLV-1. Le virion contient deux brins d'ARN positifs monocaténares associés à la transcriptase inverse et la nucléocapside, le tout étant entouré par une capsid. La capsid est entourée d'une matrice et ensuite d'une enveloppe constituée d'une bicouche lipidique présentant les glycoprotéines transmembranaires et de surface. Image tirée de (Lairmore et al. 2012).

1.2.5. Réplication

L'entrée :

La première étape du cycle viral consiste en la reconnaissance de la glycoprotéine de surface (SU gp46) et ses récepteurs cellulaires : le sulfate d'héparane de protéoglycans (*heparan sulfate proteoglycans*; HSPG), la NRP-1 et le GLUT-1 (Ghez et al. 2006; Manel et al. 2003; Coskun and Sutton 2005; Jin et al. 2006). Cette interaction entre la SU et ses récepteurs dicte le tropisme viral et permet ainsi à HTLV-1 de cibler plusieurs types cellulaires dont les LT CD4+ et CD8+, mais aussi les monocytes, les cellules dendritiques et

les lymphocytes B (Jones et al. 2008; Koyanagi et al. 1993). Cependant, une infection abortive est observée chez les monocytes due à une induction de l'apoptose médiée par le facteur de restriction SAMHD1 (Sze et al. 2013). Donc, même si HTLV-1 peut infecter plusieurs types cellulaires, celui-ci a une préférence pour les LT CD4+ de par son interaction avec le récepteur le plus important, HSPG. Plus précisément, ce sont les LT CD4+ activés, les LT mémoires (CD45RO+) et les LT régulateurs (Treg) qui sont ciblés par HTLV-1 (Yamano et al. 2004; Yamano et al. 2009; Richardson et al. 1990; Yoshie et al. 2002). Une étude récente a cependant montré que, lors de l'infection initiale par HTLV-1, celui-ci infectait sans discrimination les lymphocytes T CD4+ et CD8+, mais qu'une préférence pour les lymphocytes T CD4+ se manifestait lors de la phase chronique de la prolifération clonale (Kannian et al. 2012). À l'inverse, HTLV-2 infecte majoritairement les cellules T CD8+ et n'utilise que NRP-1 et GLUT-1 (Jones et al. 2006; Feuer and Green 2005). HTLV-3 utilise également GLUT-1, NRP-1 et HSPG afin d'infecter les LT CD4+ et CD8+ activés, mais d'autres récepteurs cellulaires sont nécessairement impliqués puisque HTLV-3 peut aussi infecter les LT CD4+ naïfs (Jones et al. 2009). Les récepteurs cellulaires utilisés par HTLV-4 n'ont pas encore fait sujet d'étude.

Pour pénétrer dans la cellule, une phase d'attachement du virus à la cellule hôte est d'abord initiée en formant une interaction entre sa protéine SU et le récepteur HSPG (Jones et al. 2011). Cette interaction permet ensuite la formation d'un complexe entre SU, HSPG et NRP-1 nouvellement recrutés, ce qui engendre la liaison du virus à la cellule hôte (Jones et al. 2011). Ce complexe induirait un changement de conformation de la SU permettant à celle-ci d'interagir avec GLUT-1. Ces trois récepteurs forment ainsi un complexe (Ghez et al. 2006). Ce n'est que lorsque GLUT-1 s'ajoute au complexe qu'un changement de conformation entre la SU et la TM permet d'activer la TM gp21 en rendant son peptide de fusion accessible et ainsi engendre la fusion entre le virus et la membrane cellulaire menant ainsi à son entrée (Jones et al. 2011).

Décapsidation et transcription inverse :

La décapsidation du virus est prise en charge par les enzymes cellulaires dans le cytoplasme. Cette étape permet de libérer le génome viral afin que celui-ci soit rétrotranscrit

en un ADN double brin. La transcription inverse est un processus complexe et hautement régulé qui dépend des diverses activités catalytiques de la transcriptase inverse (RT). Malgré la présence d'un génome diploïde dans le virion, une seule molécule est rétrotranscrite alors que l'autre molécule servira à « corriger » des mutations néfastes pour la viabilité et/ou encore augmenter la variabilité du virus par recombinaison, phénomène très peu fréquent chez HTLV-1 (Temin 1991). Ainsi, l'ARNt^{Pro} (Seiki, M. 1982) empaqueté avec le génome viral lors de l'assemblage du virion, interagit avec la RT et lie une séquence de 18nt nommée site de liaison des amorces (*Primer Binding Site*; PBS) retrouvée à l'extrémité 5' du génome (voir structure génomique pour plus de détails) (Figure 1.3) (Seiki et al. 1982; Flint 2004). À partir du PBS, la RT synthétise un segment d'ADN négatif d'environ 100nt (régions R et U5). L'activité RNaseH de la RT permet ensuite de dégrader la partie ARN de l'hétéroduplexe ARN:ADN laissant un bout de brin d'ADN simple brin au niveau des régions R et U5. C'est à ce moment que se fait le premier saut à l'extrémité 3': l'ADN simple brin négatif saute et s'hybride à la séquence ARN R du brin positif en 3'. La RT commence ensuite la synthèse d'ADN du brin négatif et digère partiellement le brin ARN positif générant ainsi des amorces ARN. Grâce à une structure secondaire, la séquence ARN complémentaire à la petite séquence d'ADN de 11nt nommée PPT (*Polypurine Tract*) résiste à l'activité RNaseH de la RT. Cette résistance permet à l'ARN complémentaire d'agir en tant qu'amorce pour la synthèse de l'ADN du brin positif jusqu'au dernier nucléotide liant l'ARNt. Une fois celle-ci accomplie, les amorces ARNt et PPT sont enlevées par la RT. En parallèle, la RT synthétise aussi plusieurs fragments d'ADN positifs en amont du PTT. Après ces étapes s'en suit le deuxième saut initié par l'hybridation des séquences simple brin du PBS, retrouvées aux deux extrémités, formant ainsi un intermédiaire circulaire. Grâce à son activité hélicase, la RT entraîne un déplacement des brins aux extrémités PBS et PPT, ce qui permet de compléter l'élongation du brin ADN positif et de générer une molécule linéaire. Nous retrouvons maintenant deux LTR identiques caractérisés par la présence de régions U3, R et U5 qui permettront l'intégration du virus dans le génome cellulaire.

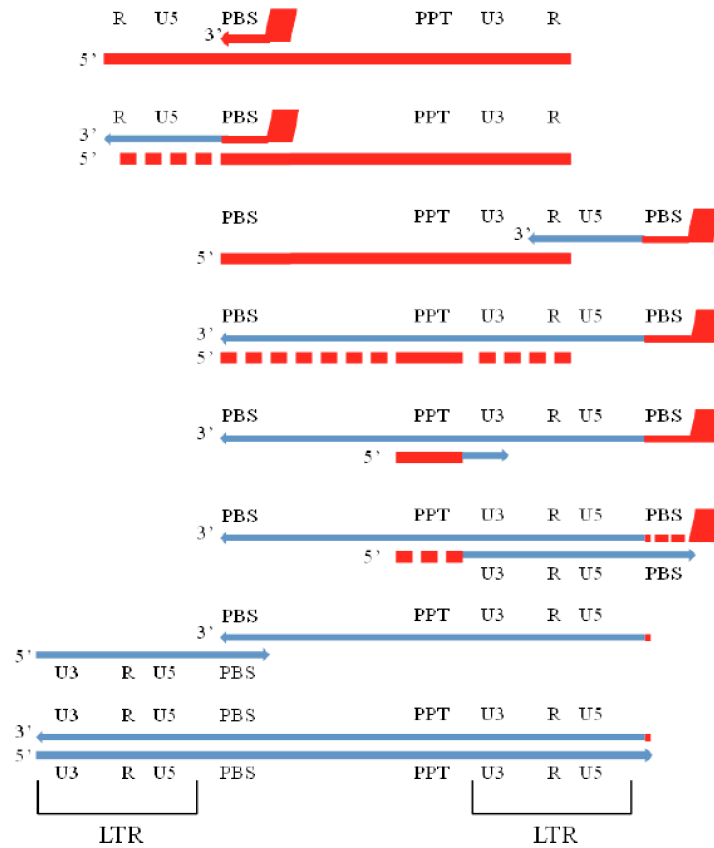


Figure 1.3: Mécanisme moléculaire de la transcription inverse. Lors de la transcription inverse, le génome viral est rétrotranscrit en ADN double brin grâce à l'orchestration par les différentes fonctions de la transcriptase inverse soit ADN polymérase ARN- et ADN-dépendant, RNaseH et hélicase. Image tirée de (Beilhartz and Gotte 2010).

Translocation et intégration :

Dans le cytoplasme, un complexe nucléoprotéique nommé complexe de pré-intégration (*PreIntegration Complex; PIC*) est formé de multimères de l'IN, de l'ADN viral et autres protéines virales dont la capsid et la nucléocapsid. Ce complexe permet à l'IN d'induire une coupure aux dinucléotides 5'-TG... ..CA-3' de l'ADN viral générant un 5'-PO₄ et 3'-OH aux dinucléotides TG et CA, respectivement. Contrairement au VIH, le PIC est ensuite transloqué vers le noyau passivement, puisqu'il dépend de la mitose, lorsque la membrane nucléaire est

altérée (Coffin 1997). Dans le noyau, le complexe de l'IN et de l'ADN viral va permettre au 3'-OH de ce dernier de cibler une liaison phosphodiester sur les deux brins de l'ADN cellulaire à une distance séparée de 6pb chez HTLV-1 et ainsi se liquer par un mécanisme similaire à un transposon (Flint 2004). La distance séparant le site ciblé sur chacun des brins de l'ADN cellulaire crée un espacement de 6pb entre l'extrémité 5'-PO₄ du virus et l'ADN cellulaire. Un processus de réparation est induit par les enzymes cellulaires synthétisant ainsi une courte séquence répétée de 6pb de part et d'autre de l'ADN viral. Cet ADN viral est maintenant appelé le provirus.

Il a longtemps été pensé que le virus s'intégrait au hasard dans le génome de la cellule, mais de nouvelles études ont permis de mettre en évidence que tel n'était pas exactement le cas (Derse et al. 2007). Le provirus favorise son intégration dans un gène ou une région transcriptionnellement active (euchromatine), à proximité d'un promoteur ou d'un marqueur épigénétique activateur suggérant un biais pour une conformation épigénétique favorable de l'ADN cellulaire lors de l'intégration (Derse et al. 2007; Niederer et al. 2014; Gillet et al. 2011; Melamed et al. 2013; Meekings et al. 2008). Il a aussi récemment été montré qu'un seul événement d'intégration du génome viral est généralement observé dans la cellule infectée (Cook et al. 2012; Cook et al. 2014). De façon intéressante, l'expression du provirus semble être régulée non seulement par son site d'intégration, mais aussi par le sens d'orientation du provirus (Gillet et al. 2011; Melamed et al. 2013).

Transcription de l'ADN viral :

Le provirus dépend de la protéine virale trans-activatrice Tax en combinaison avec des facteurs de transcription cellulaire (voir section sur la protéine Tax pour plus de détails) pour initier la transcription de son génome viral à partir du LTR 5' par l'ARN polymérase II. Plusieurs mécanismes permettront la synthèse de la totalité des protéines virales: certains transcrits seront complets alors que d'autres seront alternativement épissés. Également, certaines protéines seront produites suite à des changements de cadre de lecture lors de la traduction et des événements de clivage protéolytique conduiront à la maturation de certaines protéines virales. Cependant, d'autres transcrits complets seront conservés en tant que génome viral qui sera encapsidé pour l'assemblage d'un virion.

Assemblage de la particule virale et maturation:

D'abord, les précurseurs Gag et Gag-Pro-Pol sont traduits et forment les précurseurs polyprotéiques qui seront encapsidés dans le virion immature. Le transcrit mono-épissé codant la protéine de l'enveloppe est quant à lui traduit en surface du réticulum endoplasmique puis subit une glycosylation dans l'appareil de Golgi. Cette polyprotéine est ensuite clivée lors de sa migration à la membrane plasmique de la cellule infectée. Un virion se forme à la membrane plasmique grâce à l'assemblage de l'ARN génomique avec les précurseurs Gag, Gag-Pro-Pol et les protéines d'enveloppe constituées des deux sous-unités TM et SU. Les virions peuvent ensuite être relargués hors de la cellule par bourgeonnement où ils continueront leur maturation. Finalement, la protéase virale induira un clivage des précurseurs polyprotéiques gag et gag-pro-pol afin d'obtenir les protéines structurales et enzymatiques nécessaires au prochain événement d'infection *de novo* (Coffin 1997).

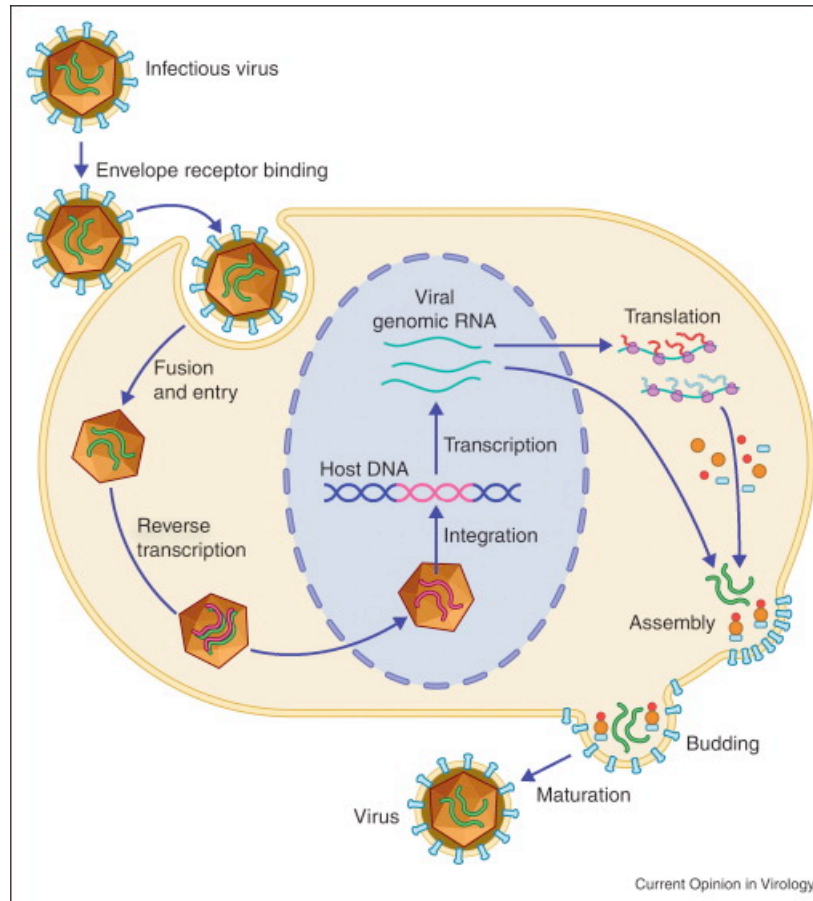


Figure 1.4. : Schéma du cycle viral de HTLV-1. Le virus s'attache aux récepteurs cellulaires *via* les glycoprotéines. Les membranes fusionnent permettant la pénétration de la capside dans la cellule. Ensuite, il y a décapsidation et transcription inverse de l'ARN viral en ADN double brin. Suite à la formation du complexe de pré-intégration (PIC) dans le cytoplasme, celui-ci atteint le noyau passivement suite à une division cellulaire, pour ensuite être intégré à l'ADN chromosomal grâce à l'intégrase. Après la transcription, l'ARNm transloqué dans le cytoplasme est traduit, permettant l'assemblage des protéines virales avec l'ARN génomique et produisant ainsi un virion prêt à bourgeonner. Image tirée de (Lairmore et al. 2012).

1.2.6. Organisation génomique

1.2.6.1. Régions non traduites

Le génome des rétrovirus HTLV est constitué d'environ 9kb coiffé en 5' et polyadénylé en 3' (Comité international de taxonomie des virus, 2011). Une fois l'ARN génomique rétro-transcrit en ADN double brin et intégré au génome cellulaire, nous retrouvons les gènes communs à tous les rétrovirus : *Gag*, *Pro*, *Pol* et *Env* et les gènes uniques à HTLV-1 dans la région pX. Ces gènes sont bordés par deux régions non traduites d'environ 754pb appelées LTR qui sont essentielles pour la transcription inverse, l'intégration de l'ADN double brin viral au génome cellulaire ainsi que l'expression des gènes viraux. Les LTR ne sont générés que lors de la transcription inverse et peuvent être divisés en trois segments nommés U3 (Unique en 3'), R et U5 (Unique en 5') (voir section répllication pour leur génération).

La région U3, le promoteur viral

La région U3 est présente à l'extrémité 3' de l'ARN génomique et contient le promoteur viral. Celui-ci contient une boîte TATA ainsi qu'un amplificateur caractérisé par trois répétitions de 21pb qui sont des éléments de réponse à Tax nommés TRE-1 (*Tax Responsive Element-1*), contenant chacun un site CRE imparfait (motif octamérique), flanqué par une région riche en GC (Figure 1.5) (Shimotohno et al. 1986; Kimzey and Dynan 1998). Un nombre important de facteurs de transcription cellulaires peut activer la transcription basale de HTLV-1. Notamment CREB, CREB-2, CREM, ATF-1, SP1, SP3, Fos et Jun lient tous le LTR 5' de manière dépendante au TRE-1 afin d'activer la transcription virale basale (Jeang et al. 1988; Datta et al. 2000; Wessner et al. 1995; Wessner et al. 1997; Wessner and Wigdahl 1997; Tillmann and Wigdahl 1994; Barnhart et al. 1997; Jeang et al. 1991). Nous retrouvons aussi une autre région nommée TRE-2, située entre le TRE-1 proximal et central (Figure 1.5) (Marriott et al. 1989). Celui-ci contient des éléments de réponse liant les facteurs SP1/NF- κ B, Ets et NF-1 qui contrôlent l'activation de la transcription (Marriott et al. 1989;

Bosselut et al. 1990; Nyborg and Dynan 1990; Gitlin et al. 1991; Fujisawa et al. 1986; Datta et al. 2000). D'autres facteurs de transcription peuvent réguler la transcription basale du génome viral dont Elk, SRF et XBP-1 (Ku et al. 2008; Livengood and Nyborg 2004; Winter et al. 2007). Suite à l'expression de la protéine virale Tax, la transcription du génome viral peut maintenant être régulée sous son contrôle. En effet, Tax peut former un complexe ternaire avec les facteurs de transcription de la famille CREB/ATF (*CRE Binding Protein*) via leur domaine bZIP et augmenter son affinité au niveau du TRE sur le promoteur viral (Zhao and Giam 1992; Jin and Jeang 1997). La région riche en GC de part et d'autre de ce motif octamérique, participe à la stabilité du complexe Tax-CREB-ADN et en outre à la liaison du CREB sur le promoteur afin de diriger la transcription virale ((Kimzey and Dynan 1998; Lundblad et al. 1998). Selon des analyses de footprinting *in vivo*, le TRE-1 proximal et le TRE-2 sont les régions les plus importantes pour la régulation de la transcription (Datta et al. 2000).

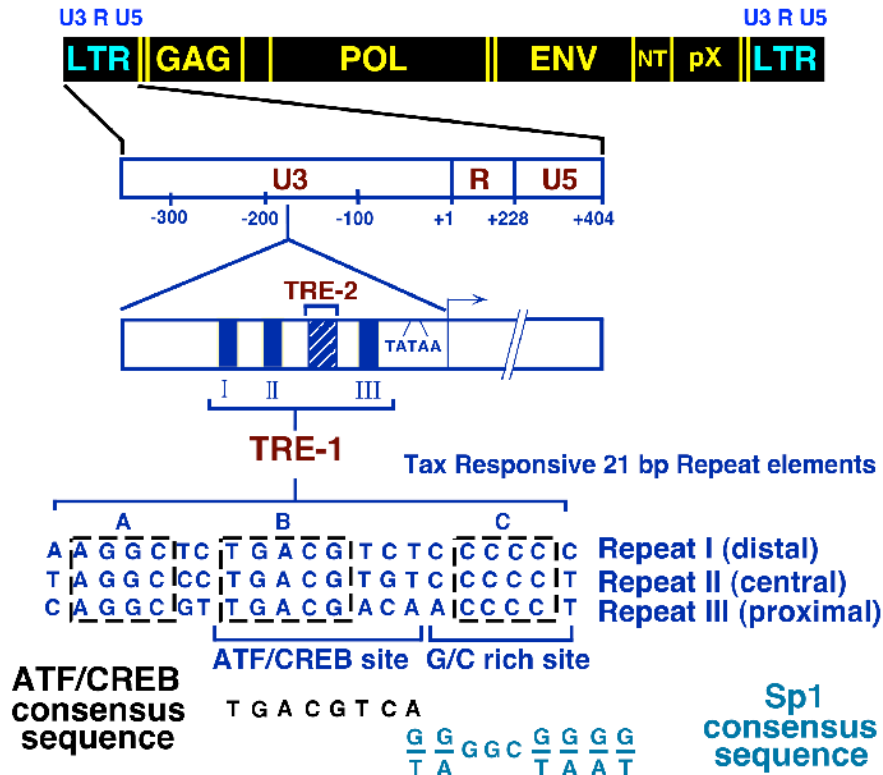


Figure 1.5. Schéma du LTR de HTLV-1 incluant les régions amplificatrices. Nous retrouvons en ordre le TRE-1 distal, central et proximal dans la région U3 du LTR. La région TRE-2 est située entre le TRE-1 central et proximal. Chaque séquence TRE-1 contient un site CRE consensus bordé de part et d'autre d'une région riche en GC. Image tirée de : <https://www.bioscience.org/2000/v5/d/yao/fulltext.htm>

Les régions R et U5

La région R, qui représente des répétitions terminales de l'ARN viral et du provirus, est relativement longue chez HTLV (environ 230pb) (Seiki et al. 1982; Seiki et al. 1983). Au début de celle-ci, et adjacent à la région U3, nous retrouvons le site d'initiation de la transcription (+1). Le site de polyadénylation se trouve quant à lui en aval de la jonction des régions R et U5 (Figure 1.6) (Bar-Shira et al. 1991). La terminaison de la transcription et la polyadénylation des transcrits sont dépendantes de deux éléments régulateurs *cis* à proximité du site de polyadénylation: un signal de polyadénylation caractérisé par la séquence

AAUAAA généralement située à 10-30pb du site de polyadénylation et une séquence d'environ 20 nucléotides riches en GU (Fitzgerald and Shenk 1981; McDevitt et al. 1986). Chez HTLV-1, ce signal de polyadénylation se retrouve cependant à 276pb en amont du site de polyadénylation dans la région U3 (Bar-Shira et al. 1991; Seiki et al. 1983). Une structure secondaire en forme de tige-boucle représentant le RexRE (*Rex Responsive Element*) du LTR de HTLV rapproche le signal de polyadénylation au site de polyadénylation (Figure 2.5) (Seiki et al. 1982; Seiki et al. 1983; Toyoshima et al. 1990). Nous pouvons aussi retrouver une région de 16nt riche en GU suivant le site de polyadénylation dans la région U5 (Bar-Shira et al. 1991). Malgré le fait que les deux LTR soient identiques, seul le LTR 3' est impliqué dans la terminaison de la transcription et la polyadénylation des transcrits. Ceci est possible dû au fait que le signal de polyadénylation est positionné en amont du site d'initiation de la transcription dans le LTR 5', ce qui empêche une terminaison précoce des transcrits (Figure 1.6) (Bar-Shira et al. 1991; Seiki et al. 1983).

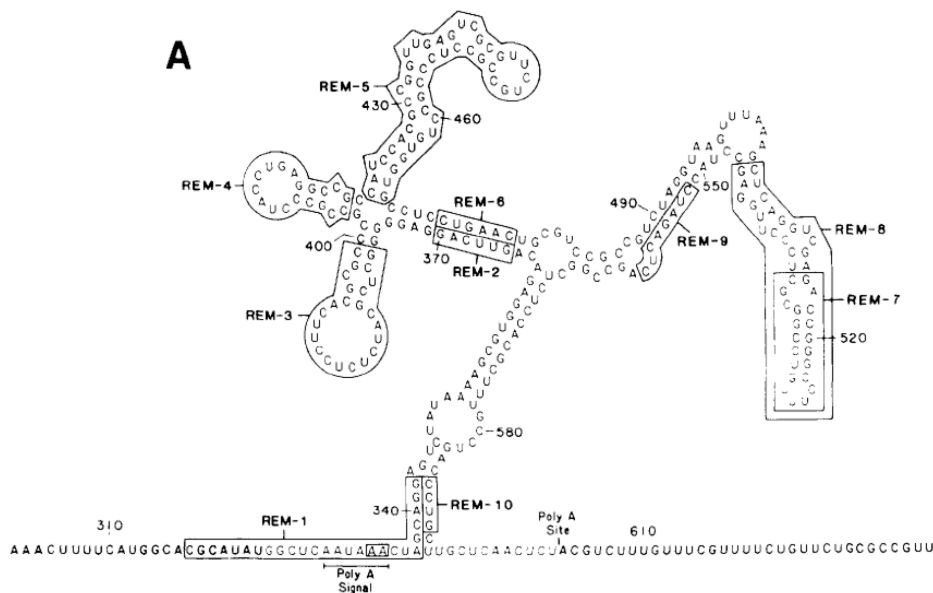


Figure 1.6. : Structure secondaire du LTR de HTLV-1. Dû à la formation d'une structure secondaire en forme de tige boucle, le signal poly(A) dans la région U3 se trouve maintenant à proximité du site poly(A), qui lui est situé à la jonction R et U5. Image tirée de (Ahmed et al. 1990).

Dans la région U5, nous trouvons en plus de la région riche en GU, une séquence CRS (*Cis acting Repressive Sequence*) qui induit la rétention des transcrits dans le noyau et qui réprime ainsi leur traduction (Seiki et al. 1990). Cette séquence n'est retrouvée que dans les transcrits contenant un intron puisque la séquence se situe au site donneur d'épissage (SD). Nous retrouvons adjacent à la région U5 une séquence de 18pb, le PBS, qui est le site de reconnaissance d'un ARNt cellulaire spécifique et est nécessaire à l'initiation de la transcription inverse. Le PBS dans la séquence de HTLV-1 est reconnu spécifiquement par l'ARNt^{Pro} (Seiki et al. 1982). Adjacent au PBS et en amont du gène *Gag* se trouve deux séquences d'encapsidation (E ou Ψ) formant chacune une structure secondaire d'ARN en forme de tige-boucle importante pour l'encapsidation du génome viral et ainsi la réplication du virus (Mansky and Gajary 2002). En amont du LTR 3' se trouve une courte séquence nommée PPT (polypurine-tract) dirigeant la synthèse du brin ADN positif lors de la transcription inverse (voir section réplication) (Coffin 1997).

1.2.6.2. Gènes de structure

Gag-Pro-Pol

Trois types de transcrit sont exprimés par le génome de HTLV-1 et suivent une cinétique d'expression dite précoce ou tardive dépendante de Rex (Figure 1.7) (Rende et al. 2012; Rende et al. 2011). Le premier type consiste en un ARNm complet non épissé de 9kb servant de génome viral à être encapsidé dans le futur virion ou de transcrit pour l'expression des gènes structuraux et enzymatiques *Gag*, *Pro* et *Pol*. Le premier précurseur produit est la polyprotéine Gag cruciale pour l'encapsidation du génome viral. De plus, le gène *Gag* code pour les protéines de structure interne essentielles à l'assemblage du virion, telles que la nucléocapside, NC (15kDa), la capsid, CA (24 kDa) et la matrice, MA (19kDa) suite à un clivage protéolytique lors du bourgeonnement (Coffin 1997). Un changement de cadre de lecture par le ribosome (*ribosome frameshift*) permet la traduction du précurseur Gag-Pro

tandis qu'un second changement de cadre de lecture permet la production du précurseur Gag-Pro-Pol (Coffin 1997). Le gène *Pol* code pour la transcriptase inverse contenant une activité d'ADN polymérase, ARN polymérase, RNaseH et hélicase, tandis que l'intégrase est une enzyme cruciale pour l'intégration du génome dans l'hôte (Coffin 1997). Le gène *Pro* code pour la protéase qui, sous forme d'homodimère, induit un clivage protéolytique des précurseurs Gag et Gag-Pro-Pol lors du bourgeonnement, processus essentiel à la formation d'un virion infectieux (Coffin 1997).

Env

Le transcrit du gène *Env* est le seul faisant partie du deuxième type: un transcrit mono-épissé de 4Kb généré à partir d'un épissage alternatif. Le gène *Env* code pour les glycoprotéines de surface (SU) (gp46) et transmembranaire (TM) (gp21) essentielles pour l'entrée du virion lors de l'infection.

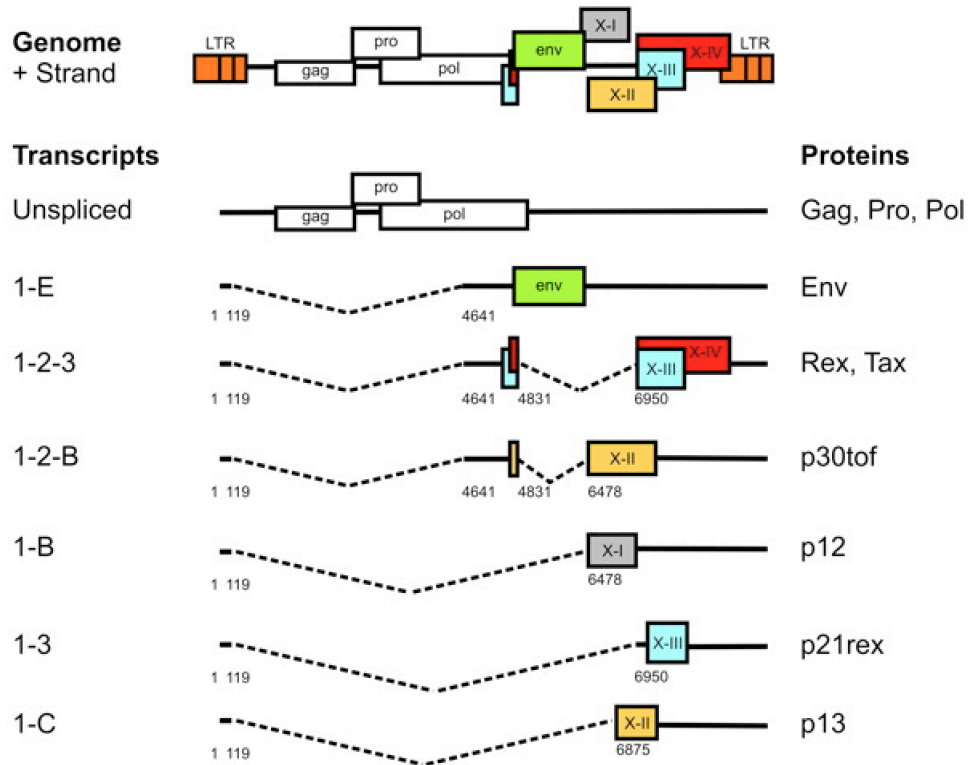


Figure 1.7. Position des ORF dans le génome de HTLV-1 et des transcrits. Nous retrouvons le génome de HTLV-1 avec la position des différents ORF. Le positionnement des différents transcrits incluant les sites d'épissage y est schématisé. Image tirée de (Rende et al. 2011).

1.2.6.3. Gènes de la région pX

La région pX située entre le gène *Env* et le LTR 3' contient les gènes uniques à HTLV-1: *OrfI*, *OrfII*, *OrfIII* et *OrfIV*. L'expression de ces gènes dépend des transcrits épissés alternativement de 2Kb et codant pour les protéines dites régulatrices et accessoires. L'*OrfI* produit un ARNm mono-épissé générant la protéine p12 (Bindhu et al. 2004; Ciminale et al. 1992). La protéine p12 peut subir un clivage protéolytique en amino produisant ainsi p8. Il a été montré que p12 lie le récepteur de IL-2, ce qui engendre ainsi une activation de la voie Jak/Stat5, active les cellules T et donc leur prolifération. Cette protéine peut aussi réduire

l'expression du CMHI à la surface des cellules en induisant sa dégradation et donc diminuer la présentation antigénique et la réponse antivirale (Van Prooyen et al. 2010a). Il a été mis en évidence que la protéine p8, quant à elle, augmente le nombre et la longueur des conduits cellulaires des cellules T contribuant ainsi à la transmission virale (Van Prooyen et al. 2010b). Deux protéines sont également produites à partir de l'*OrfII* : p30 (Tof) et p13, issues de l'ARNm doublement épissé et mono-épissé respectivement, où p13 ne représente que la partie C-terminale de p30 (Ciminale et al. 1992; Bindhu et al. 2004). Il a été montré que p30 retient les ARNm de Tax et Rex dans le noyau ce qui réduit la réplication virale et contribue conséquemment à la latence virale (Nicot et al. 2004; Ghorbel et al. 2006; Sinha-Datta et al. 2007). La protéine p30 favorise aussi la propagation virale et la survie cellulaire en modulant le cycle cellulaire en activant le passage de la phase G2 à M (Datta et al. 2007). Tous ces ARNm sont exprimés tardivement lors d'une infection et leur niveau demeure très faible comparativement aux autres gènes viraux (Rende et al. 2011). Cependant, ceci ne les empêche pas de jouer un rôle important *in vivo* dans l'infektivité et la persistance virale (pour revue (Edwards et al. 2011)).

Les premiers gènes exprimés lors d'une infection par HTLV-1 sont *ORF III* et *ORF IV*. Ces *Orf* codent pour les protéines dites régulatrices Tax(p40)/Rex(p27Rex) produites à partir d'ARNm doublement épissés (Rende et al. 2011). L'ARNm de p27Rex peut être alternativement épissé produisant ainsi une protéine tronquée p21Rex. Tax et Rex jouent un rôle crucial lors de la réplication virale au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel.

La protéine Rex

Rex est une phosphoprotéine de 27kDa localisée dans le noyau, principalement dans les nucléoles et est capable de lier l'ARN. Elle permet d'induire l'expression des gènes structuraux et enzymatiques lors de la phase tardive (Rex-dépendante), ce qui permet de provoquer une infection productive (Ballaun et al. 1991). Lorsqu'un niveau de protéine Rex est accumulé dans le noyau, Rex peut lier spécifiquement les ARNm viraux contenant un intron (transcrits Gag, Gag-Pro, Gag-Pro-Pol et Env) et les diriger vers le cytoplasme afin que ceux-ci soient traduits efficacement (Toyoshima et al. 1990; Rende et al. 2011). Quoique la sélection de ces transcrits par Rex demeure mal comprise, la liaison à ces transcrits repose sur

une interaction entre Rex et deux éléments retrouvés en cis: le RexRE (*Rex Responsive Element*), une structure secondaire stable de 205nt à quatre boucles formées à partir d'une séquence dans les régions U3 et R du LTR et le CRS (*Cis-acting Repressive Sequence*) situé au niveau du site donneur d'épissage (SD) (Toyoshima et al. 1990; Black et al. 1991a; Black et al. 1991b; Younis and Green 2005). Ces éléments permettent à Rex de stabiliser ces transcrits non épissés et monoépissés et empêche l'épissage de ces ARNm (Nakano and Watanabe 2012). L'activité du transport nucléo-cytoplasmique de ces ARNm par Rex passe par la voie CRM1 grâce à son signal d'exportation nucléaire (Hakata et al. 1998). Rex retourne ensuite aux nucléoles par une interaction avec la protéine cellulaire B23 et continue ainsi de se déplacer entre ces deux compartiments (Adachi et al. 1993). Rex est donc une protéine régulatrice indispensable pour la réplication virale et pour l'établissement d'une infection persistante par HTLV-1 (Ye et al. 2003).

La protéine tronquée de Rex, p21Rex, contient quant à elle une délétion N-terminale des acides aminés riches en arginine où se trouve généralement le signal de localisation nucléaire et le signal de liaison à l'ARN (Kubota et al. 1996). Cette forme tronquée peut inhiber la localisation et la fonction de p27Rex (Kubota et al. 1996; Ciminale et al. 1997).

La protéine Tax

Transactivation du LTR 5' par Tax

Tax est une protéine régulatrice jouant un rôle primordial dans la réplication virale ainsi que dans la transformation cellulaire. Cette protéine nucléaire de 40kDa est un puissant transactivateur et dirige la transcription des gènes viraux à partir du LTR 5' (pour revue (Boxus et al. 2008)). Dans la région U3 du LTR, un homodimère de Tax forme un complexe avec un homodimère CREB non phosphorylé (ou autres protéines de la famille bZIP dont CREM, ATF-1, ATF-2, ATF-3, ATF-4, CREB-2 et XBP-1), ce qui d'abord augmente la

dimérisation de CREB et ensuite intensifie sa liaison aux trois répétitions de 21pb (TRE-1) contenant une séquence CRE (Kashanchi and Brady 2005; Rosen et al. 1987; Fujisawa et al. 1986; Kwok et al. 1996; Zhao and Giam 1992; Grassmann et al. 2005; Perini et al. 1995; Wagner and Green 1993). La transactivation par Tax peut également se faire par l'entremise d'un homodimère CREB-2 non phosphorylé ou autres protéines de la famille bZIP, par exemple CREM, ATF-1, ATF-2, ATF-3, ATF-4 et XBP-1 (Azran et al. 2004; Boxus et al. 2008). Suivant la formation de ce complexe sur le promoteur viral, les coactivateurs avec une activité histone acétyltransférases (HAT) CBP (*CREB Binding Protein*), p300 et pCAF (*p300/CBP Associated Factor*) sont recrutées par Tax et permettent d'induire une acétylation des histones et ainsi un changement de conformation de la chromatine facilitant la transcription virale par le recrutement de la machinerie cellulaire (Kwok et al. 1996; Georges et al. 2003; Harrod et al. 1998; Jiang et al. 1999; Nyborg et al. 2010). Tax peut aussi favoriser la transcription des gènes viraux en recrutant un des facteurs du complexe de pré-initiation de la transcription, soit TBP, et ainsi augmenter sa liaison au LTR (Boxus et al. 2008).

Tax régule aussi indirectement la transcription des gènes cellulaires en modulant l'activité de plusieurs facteurs de transcription tels que NF- κ B, CREB/ATF-1, SRF, SP1, AP-1 et NFAT, tous impliqués dans les signaux de transduction chez les cellules T (Lin et al. 2005; Winter and Marriott 2007; Beck et al. 2003).

Tax et la transformation cellulaire

Tax est une protéine avec un pouvoir oncogénique. Connue pour sa capacité d'immortaliser les lymphocytes T *in vitro* et d'induire des tumeurs chez des souris transgéniques, Tax affecte plusieurs processus biologiques pouvant mener à une transformation (Rosin et al. 1998; Grossman et al. 1995). En effet, Tax induit la prolifération cellulaire, module le cycle cellulaire en plus d'induire des dommages dans l'ADN de son hôte et d'inhiber la réparation de l'ADN (pour revue ((Matsuoka and Jeang 2011))). Au niveau moléculaire, l'activation constitutive de la voie NF- κ B semble être une étape cruciale de l'activité transformante de Tax *in vitro* et *in vivo*, certainement dû à son rôle primordial dans la réponse innée et adaptative contre les infections virales (Matsumoto et al. 1997; Kashanchi and Brady 2005; Yamaoka et al. 1996). Cette activation se fait en modulant la voie canonique

(p50/RelA) et non canonique (p52/RelB) de NF- κ B. D'abord dans la voie canonique, Tax va interagir et activer IKK γ (NEMO), ce qui induit la phosphorylation de IKK α et IKK β et conséquemment entraîne la dégradation de I κ B (*Inhibitor of Factor NF- κ B*) par le protéasome (Chu et al. 1999; Harhaj and Sun 1999; Moriuchi et al. 1999; Suzuki et al. 1993; Watanabe et al. 1993; Yin et al. 1998). Ceci permet de libérer l'hétérodimère p50 (NF- κ B1)/p65 (RelA) et de transloquer le complexe NF- κ B dans le noyau pour activer la transcription. Une modulation de la voie non canonique est aussi engendrée; Tax promeut la protéolyse de p100 en p52 (NF- κ B2) en recrutant IKK α (Xiao et al. 2001). Un troisième mécanisme permettant à Tax d'activer la voie NF- κ B se fait par l'entremise de la protéine cellulaire Tax1BP1 (Tax-1 binding protein) (Chin et al. 2007). Tax1BP1 recrute la protéine inhibitrice de NF- κ B, A20, à la protéine TRAF6 empêchant sa polyubiquitination et ainsi permettant l'activation de la voie NF- κ B.

Une autre voie ciblée par Tax et impliquée dans la prolifération cellulaire est la voie Akt. Tax lie PI3K, ce qui engendre sa phosphorylation et active ainsi la transcription des gènes AP-1 dépendant en aval (Peloponese and Jeang 2006).

Tax peut aussi dérégler le cycle cellulaire en phase G1-S en augmentant l'expression de cyclin D2, cyclin E, E2F1, et en activant CDK2, CDK4 et CDK6 (Schmitt et al. 1998; Iwanaga et al. 2001). Tax peut aussi agir sur le cycle cellulaire et l'apoptose en inactivant p53, en réduisant le niveau des inhibiteurs de CDK p19^{INK4D} et p27^{KIP} et en augmentant la phosphorylation de pRB (Azran et al. 2004; Iwanaga et al. 2001; Neuveut et al. 1998; Tabakin-Fix et al. 2006).

Tax induit aussi des dommages à l'ADN en induisant la production des dérivés réactifs de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*; ROS) ainsi qu'en inhibant plusieurs mécanismes de réparation de l'ADN chez l'hôte, dont le BER (*Base Excision Repair*), le NER (*Nucleotide Excision Repair*) et le MMR (*Mismatch Repair*) (Kinjo et al. 2010; Jeang et al. 1990; Kao and Marriott 1999; Morimoto et al. 2005). L'ensemble de ces modulations contribue nécessairement à l'éventuelle transformation de la cellule.

Tax2, Tax3 et Tax 4

Dans le but d'expliquer la disparité entre les virus HTLV-1 et HTLV-2 au niveau de leur association à des pathologies différentes, plusieurs équipes de recherche ont analysé les différences moléculaires entre les protéines Tax 1 et Tax 2, considérant les nombreuses mises en évidence de l'implication de Tax 1 dans l'oncogenèse précoce. De façon intéressante, les cellules CTLL-2 interleukine-2 dépendantes deviennent indépendantes à cette interleukine suite à l'expression de Tax 1 (Tsubata et al. 2005). Tax 2 peut également transformer cette lignée *in vitro*, mais moins efficacement que Tax 1 (Kondo et al. 2006; Higuchi et al. 2007). Le pouvoir transformant de Tax 1 dépend de son domaine PDM (*PDZ domain binding motif*) ((S/T)XV-COOH) présent en C-terminal (Figure 1.8) (Shoji et al. 2009). Ce domaine lui permet d'activer la voie NF- κ B et d'inactiver d'autres protéines possédant un domaine PDM, telles que certaines protéines suppressives de tumeur (par exemple, Dlg1 et Scribble) (Tsubata et al. 2005; Suzuki et al. 1999; Okajima et al. 2008). Un tel domaine est également présent chez d'autres protéines pouvant transformer les cellules, comme la protéine E6 du virus du papillome humain (*Human papilloma Virus*; HPV) de type 16 et E4ORF1 de l'adénovirus de type 9 (Aoyagi et al. 2010). Une autre région localisée entre les acides aminés 225-232 de Tax 1 s'avère nécessaire pour la transformation cellulaire (Shoji et al. 2009). Il est intéressant de noter que ces deux domaines sont absents dans la séquence de Tax 2 et Tax 4, alors que le domaine PDM est conservé chez Tax 3, laissant donc croire que HTLV-3 pourrait potentiellement être associé à une transformation cellulaire des lymphocytes T tout comme HTLV-1 (Figure 1.8) (Tsubata et al. 2005; Higuchi et al. 2007; Switzer et al. 2009; Switzer et al. 2006b; Calattini et al. 2006; Shoji et al. 2009; Chevalier et al. 2006). D'ailleurs, il a été démontré que Tax 3 a la capacité d'activer la voie NF- κ B dans une lignée lymphocytaire (Chevalier et al. 2006).

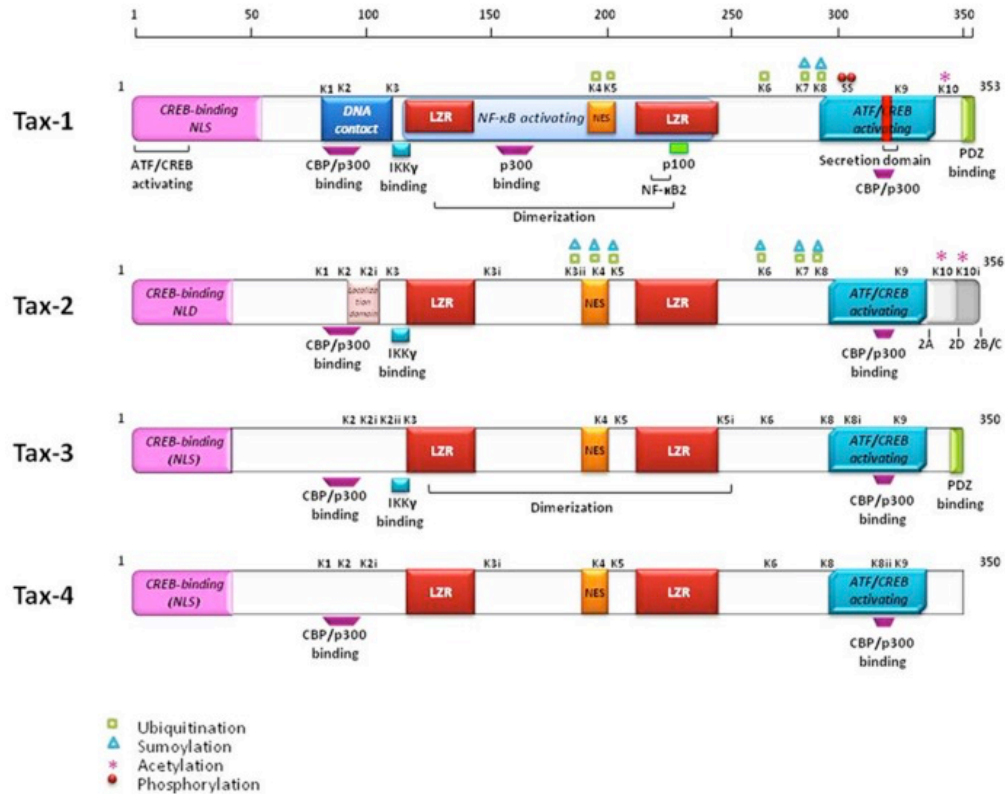


Figure 1.8. Comparaison des domaines structuraux et fonctionnels de Tax 1, Tax 2, Tax 3 et Tax 4. Tax 1, Tax 2, Tax 3 et Tax 4 ont plusieurs domaines homologues. Cependant, le domaine de liaison PDZ situé à l'extrémité 3' n'est présent que chez Tax 1 et Tax 3. Image tirée de (Romanelli et al. 2013).

1.2.7. La persistance virale

1.2.7.1. La réponse CTL et la persistance virale

Une réponse humorale dirigée contre les protéines immunodominantes Gag, Env et Tax ainsi que les protéines Rex et p12 a été observée chez les patients infectés par HTLV-1 (Enose-Akahata et al. 2012; Manns et al. 1999; Dekaban et al. 2000; Chen et al. 1997). Cette réponse est cependant peu efficace pour éliminer le virus puisque très peu de particules virales sont en circulation (Derse et al. 2001; Jones et al. 2008; Pique and Jones 2012; Cook et al.

2014). Il a aussi été montré que les cellules infectées par HTLV-1 sont résistantes aux cellules Natural Killer (NK) qui ne peuvent reconnaître les cellules infectées dû à l'absence de modulation de l'expression du CMH 1 ainsi que des ligands NCR et NKG2D (activateurs de NK) à la surface des cellules infectées (Yoshida et al. 2000; Banerjee et al. 2007).

La réponse des LT cytotoxiques CD8⁺ (CTL) de l'hôte contribue largement à l'élimination des cellules infectées et cette réponse est continuellement activée chez les individus infectés par HTLV-1 (Hanon et al. 2000; Bangham 2000). Malgré cette forte réponse, HTLV-1 parvient à induire une infection persistante montrée par la présence d'une charge provirale (PVL) tout au long de la vie de la personne infectée (Nagai et al. 1996). L'efficacité de cette réponse CTL est le principal mode de défense de l'hôte qui déterminera les conséquences qui s'ensuivent suite à une infection par HTLV-1 (Bangham 2009). Bien que la PVL demeure constante pendant plusieurs années chez l'individu infecté, elle varie énormément d'un individu à un autre, peu importe si la personne infectée est atteinte d'une maladie associée ou si elle est asymptomatique (Tosswill et al. 1998; Kwaan et al. 2006; Gillet et al. 2011; Demontis et al. 2013). En effet, la PVL dépendra en partie de l'efficacité de la réponse CTL de l'hôte mais aussi de la prolifération clonale de cellules infectées (Bangham 2009; Gillet et al. 2011; Rowan and Bangham 2012). Ainsi, la PVL, la réponse CTL et la prolifération clonale contribuent nécessairement à la persistance virale (Zane et al. 2009; Gillet et al. 2011; Cavrois et al. 1996).

1.2.7.2. Tax, la réponse CTL et la persistance

La réponse CTL est principalement dirigée contre la protéine immunodominante Tax et cette forte réponse cellulaire s'avère efficace à éliminer les cellules infectées Tax⁺ (Kannagi et al. 1991; Goon et al. 2004; Hanon et al. 2000). L'accumulation des preuves de l'implication de Tax dans la transformation cellulaire démontre sans aucun doute son rôle dans les étapes précoces de l'ATL. Cependant, une telle réponse pourrait rendre difficile la survie du virus et de la cellule transformée (Bangham 2003). Il n'est donc pas surprenant que, lors de la manifestation de l'ATL, l'expression de Tax soit fortement réprimée (Miyazaki et al. 2007).

Soixante cinq pourcent des cellules ATL sont Tax-, ce qui permet au virus d'échapper à cette réponse CTL efficace et qui en conséquence lui permet de persister (Cook et al. 2014). Plusieurs mécanismes sont utilisés afin d'induire la persistance virale dans le but de réduire la transcription des gènes sens incluant Tax et donc d'induire une latence virale. En effet, le LTR 5' est souvent éliminé avant ou après l'intégration du provirus ou hyperméthylé dans les cellules ATLL entraînant une inhibition de l'expression de Tax (Miyazaki et al. 2007; Matsuoka and Jeang 2007; Koiwa et al. 2002; Tamiya et al. 1996). De plus, il a aussi été montré que APOBEC induisait des mutations non-sens dans le provirus (sauf dans le gène de *HBZ*) (Fan et al. 2010). Le gène *Tax* subit aussi des délétions dans son exon deux (Miyazaki et al. 2007; Takeda et al. 2004). Enfin, lorsque le provirus est intégré dans la même orientation qu'un gène, une inhibition de l'expression de Tax est observée ainsi qu'une abondance clonale des cellules ATL (Melamed et al. 2013; Gillet et al. 2011; Doi et al. 2005). En résumé, Tax n'est donc pas essentiel pour maintenir la survie et la prolifération des cellules ATL *in vivo* et le mécanisme de pathogenèse menant à l'ATL reste toujours mal compris. Contrairement à Tax, le transcrit antisens de HTLV-1, *HBZ*, est exprimé dans les cellules ATL (Murata et al. 2006; Satou et al. 2006). De plus, le niveau d'expression de sHBZ corrèle avec la charge provirale et est 6 fois plus élevé dans les cellules ATL que les lignées transformées par HTLV-1 (MT-2, HUT-102 et OMT) (Usui et al. 2008; Saito et al. 2009; Li et al. 2009). De plus, malgré la délétion du LTR 5' dans les provirus de type 2, sHBZ est toujours exprimé et utilise un signal de polyadénylation cellulaire lorsque le signal est délété dans son génome viral (Miyazaki et al. 2007). La transcription antisens semble ainsi être un mécanisme utilisé par le virus lors des étapes tardives de la leucémogénèse.

1.3. Transcription antisens

1.3.1. Généralités

Par définition, un transcrit antisens naturel (NAT) est un transcrit produit à partir du brin opposé ayant une complémentarité avec un transcrit produit à partir du brin sens (Beck

and Warren 1988; Vanhee-Brossollet and Vaquero 1998). Les NAT sont produits à partir de promoteurs indépendants, cryptiques ou bidirectionnels, ces derniers étant les plus répandus (Pelechano and Steinmetz 2013; Core et al. 2008). L'orientation de ces paires de transcrits sens et antisens (S/AS) est organisée de manière divergente (tête-à-tête), convergente (queue à queue) ou complètement chevauchante (Carninci et al. 2005; Katayama et al. 2005). La transcription bidirectionnelle est majoritairement organisée de manière divergente, les sites d'initiation de la transcription (TSS) étant séparés de 1000pb (Uesaka et al. 2014; Trinklein et al. 2004). Ainsi, ces paires de transcrits S/AS produits à partir de ces promoteurs sont soit 1) codant/codant, 2) codant/non codant ou 3) non codant/non codant. Suite à l'étude FANTOM3, il est maintenant estimé que plus de 20% des transcrits sont attribués à des transcrits antisens chez la souris suggérant que la transcription antisens est répandue chez les mammifères (Carninci et al. 2005; Katayama et al. 2005).

Deux types de NAT sont retrouvés dans les organismes et peuvent être divisés en fonction du locus du brin sens: les cis-NAT sont transcrits à partir du même endroit que le transcrit sens alors que les trans-NAT sont issus d'une région différente du transcrit sens malgré leur complémentarité (Vanhee-Brossollet and Vaquero 1998). La formation d'un duplex ARN:ARN entre le transcrit sens et le transcrit antisens engendre une régulation rigoureuse de l'expression génique (Pelechano and Steinmetz 2013). Les premières études sur les NAT ont été réalisées chez les phages λ et les bactéries. Il a été montré que ceux-ci jouent un rôle dans la régulation de l'expression des gènes et la réplication de plasmide (Pestka et al. 1984; Rubenstein et al. 1984; Mizuno et al. 1984; Izant and Weintraub 1984; Bovre 1969; Hoopes and McClure 1985). La détection de NAT a rapidement suivi chez les organismes eucaryotes, tels que *S. cerevisiae*, *C. elegans*, la drosophile et les eucaryotes plus complexes, comme le rat, la souris et l'être humain (Lee et al. 1993; Hongay et al. 2006; Lankenau et al. 1994; Murphy and Knee 1994; Bedford et al. 1995; Miyajima et al. 1989). Les NAT sont même présents chez les virus, particulièrement dans la famille Herpesviridae (incluant le virus d'Epstein-Barr; EBV, le virus simplex humain-1; HSV-1 et le virus Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus; HHV-8) et les Hepadnaviridae (incluant le virus Woodchuck; WHV, et les virus de l'hépatite B (HBV) et D (HDV) (Prang et al. 1995; Gordon et al. 1988; Stevens

et al. 1987; Croen et al. 1987; Xu and Ganem; Shimoda et al. 1998; Moriyama et al. 2003; Lai 1995).

Depuis les dix dernières années, plusieurs études ont identifié divers mécanismes utilisés par les transcrits antisens pour réguler l'expression génique (pour revue (Pelechano and Steinmetz 2013)). Lors de l'initiation de la transcription d'un gène codant, un NAT ou simplement la transcription d'un NAT peut 1) réduire l'expression du gène codant en entraînant une compétition pour la polymérase ou les facteurs de transcription; en recrutant le complexe répresseur de remodelage de la chromatine (PRC2) au locus; en induisant la méthylation des îlots CpG ou 2) augmenter l'expression du gène codant en protégeant les îlots CpG contre la méthylation; en induisant une accumulation de l'ARN polymérase à proximité; en enlevant les nucléosomes, ce qui entraîne un remodelage de la chromatine active. Pendant la transcription, l'interférence transcriptionnelle peut aussi survenir suite à une collision des ARN polymérases issues de la transcription simultanée des brins sens et antisens. La formation d'un duplex entre un NAT et un transcrit sens peut aussi masquer un site d'épissage priorisant la production de certains isoformes. Au niveau post-transcriptionnel, les NAT peuvent également augmenter la stabilité d'un ARNm en masquant un site de liaison pour les miARN ou augmenter la traduction d'un transcrit sens en liant d'autres protéines.

Une autre fonction attribuée aux NAT est la possibilité de coder pour une protéine (Vanhee-Brossollet and Vaquero 1998). Jusqu'à présent, il a été montré que plusieurs de ces transcrits antisens avaient le potentiel de générer une protéine puisque ceux-ci contiennent un ou des ORF dans leur transcrit (Dolnick 1993; Armstrong and Krystal 1992; Kimelman and Kirschner 1989). Chez le virus HSV-1, deux protéines traduites à partir de ces NAT ont pu être détectées *in vivo* (Doerig et al. 1991; Lagunoff and Roizman 1994; Gordon et al. 1988). Malgré cela, la traduction des transcrits antisens demeure un domaine controversé.

1.3.2. Transcription antisens chez les rétrovirus

Pendant plusieurs années, les chercheurs crurent que l'expression des gènes rétroviraux dépendait d'un seul transcrite sens initié à partir du LTR 5' et épissé alternativement. Cependant, grâce à des analyses bio-informatiques, la présence d'un ORF sur le brin de polarité négative du VIH-1 fut suggérée pour la première fois (Peeters et al. 1996; Michael et al. 1994b; Ludwig et al. 2006; Miller 1988). Quelques années plus tard, divers transcrits produits à partir de ce brin complémentaire ont pu être mis en évidence à partir de lignées cellulaires infectées et de cellules de patients infectés (Michael et al. 1994a). Un transcrite de 2,3Kb, localisé sur le même locus que le gène *env*, suscita beaucoup d'intérêts puisque celui-ci semblait pouvoir générer une protéine hydrophobe de 20kDa nommée ASP (*Antisense Protein*) (Vanhee-Brossollet et al. 1995; Miller 1988; Michael et al. 1994a; Ludwig et al. 2006). Notre équipe a caractérisé ce transcrite antisens par les techniques de RACE démontrant que le transcrite est initié à partir du LTR 3', contient plusieurs sites d'initiation, est non épissé et est polyadénylé (Landry et al. 2007). Nous avons aussi pu détecter le transcrite d'ASP dans des lignées transfectées avec un clone proviral ainsi que dans des lignées infectées, mais son expression semble plus importante dans les lignées monocytaires (Landry et al. 2007; Laverdure et al. 2012). De façon intéressante, l'expression d'ASP est induite par des activateurs de cellules T ou par la protéine transactivatrice Tat du VIH-1 (Landry et al. 2007). Plusieurs équipes ont étudié la possible fonction du transcrite ASP. En effet, le transcrite d'ASP peut agir comme ARN long non codant et cibler le LTR 5', ce qui provoque des modificateurs épigénétiques réprimant la transcription à partir de ce promoteur et inhibe ainsi la réplication virale (Saayman et al. 2014; Kobayashi-Ishihara et al. 2012). D'autre part, une version optimisée d'ASP a mené à une première détection par immunobuvardage, microscopie confocale et cytométrie en flux dans des lignées de différentes origines (Clerc et al. 2011; Torresilla et al. 2013). Il était d'autant plus intéressant de démontrer que ASP induit l'autophagie et que son expression est augmentée lorsque ce processus est inhibé par des agents chimiques dont le 3-méthyladényl (3-MA) et la bafilomycine A1 nous permettant ainsi de la détecter à partir de son propre promoteur viral (Torresilla et al. 2013). Considérant l'importance de l'autophagie pour la réplication du VIH (Campbell and Spector 2013), nous avons montré que la répression de la réplication virale est moins importante avec un virus

mutant pour ASP comparativement au virus sauvage dans des cellules monocytaires infectées dans lesquelles l'autophagie a été inhibée (Torresilla et al. 2013). Ceci dit, le rôle exact du transcrite et de la protéine ASP lors d'une infection par le VIH-1 demeure toujours inconnu pour le moment.

Un autre lentivirus chez lequel la transcription antisens a été caractérisée est le virus d'immunodéficience féline (*Feline Immunodeficiency Virus* ; FIV) (Briquet et al. 2001). Cet ORF est conservé dans une vingtaine d'isolats, est complémentaire au gène de l'enveloppe et contient la séquence RRE en antisens, tout comme celui retrouvé chez le VIH-1. Cet ARNm coderait également pour une protéine hydrophobe si ce transcrite était traduit *in vivo* (Briquet et al. 2001).

Le virus leucémique murin (*Murine Leukemia Virus* ; MLV) est le premier rétrovirus simple pour lequel un transcrite antisens a été mis en évidence (Rasmussen et al. 2010). Ce transcrite initié dans le LTR 3' a été détecté dans des lymphomes de cellules B et de cellules T induits par différentes souches de MLV (Rasmussen et al. 2010). Rasmussen et al. ont montré que la protéine traduite *in vitro* à partir de cet ARNm a induit la croissance des cellules de réticulosarcomes (Rasmussen et al. 2010). Toutes ces évidences laissent croire que la transcription antisens puisse jouer un rôle important chez la famille des rétrovirus simples et complexes puisque ces ORF ont été conservés au cours de l'évolution.

1.3.3. Transcription antisens chez HTLV

1.3.3.1. Caractérisation et régulation du transcrite antisens chez HTLV-1

Deux transcrits antisens d'une taille de 2.5Kb et de 2.9Kb ont été détectés chez HTLV-1 en 1989 par Larocca (1989). Selon leurs analyses, plusieurs ORF seraient présents sur ce brin antisens, situés entre un site d'initiation de la transcription et une queue polyA (Larocca et al. 1989). Après plus d'une décennie, une nouvelle protéine virale nommée *HTLV-1 bZIP factor* (HBZ), traduite à partir du brin complémentaire du génome viral, a enfin été détectée lors d'un criblage double-hybride chez la levure. Cette étude a été réalisée à partir d'une

librairie de cDNA d'une lignée cellulaire chroniquement infectée par HTLV-1 (MT-2) dans le but de trouver de nouveaux partenaires interagissant avec le domaine bZIP de CREB-2 (Gaudray et al. 2002).

Deux isoformes de HBZ seraient produits à partir d'un transcrit non épissé (uHBZ) et d'un transcrit épissé (HBZ SP1 ou sHBZ) (Figure 1.9) (Cavanagh et al. 2006; Murata et al. 2006). Selon les analyses, cet épissage entraîne l'utilisation d'un AUG alternatif présent dans le LTR 3', ce qui induit le remplacement de 7 aa par 4 nouveaux aa en N-terminal de la protéine (Murata et al. 2006; Cavanagh et al. 2006; Gaudray et al. 2002). En effet, ces deux isoformes migrent différemment sur SDS-PAGE, sHBZ étant détecté à 31kDa et uHBZ présentant une migration plus lente (Murata et al. 2006). Les transcrits de HBZ ont été entièrement caractérisés. Ceux-ci sont polyadénylés et comportent plusieurs sites d'initiation dans leur promoteur respectif situé dans la région pX pour uHBZ et dans les régions R et U5 du LTR 3' pour sHBZ (Figure 1.9) (Cavanagh et al. 2006; Murata et al. 2006; Yoshida et al. 2008). Il a aussi été montré que le niveau d'expression de l'ARNm de sHBZ était en fait quatre fois plus élevé que celui de uHBZ dans les cellules infectées par HTLV-1 (Usui, T. 2008). Dans les cellules ATL, le transcrit épissé et l'isoforme synthétisé semblent aussi être prédominants (Cavanagh et al. 2006; Murata et al. 2006; Satou et al. 2006). Les LTR 5' et 3' sont quasi identiques en terme de liaison de facteurs de transcription cellulaires dans les cellules infectées par HTLV-1 et les cellules ATL et il a même été suggéré que ces deux promoteurs subissaient une régulation transcriptionnelle similaire dépendante de Tax et de HDAC (Lemasson et al. 2004). Les promoteurs de uHBZ et sHBZ ne possèdent pas de boîte TATA, mais sont transactivés par Tax de façon CREB-dépendante à partir des séquences répétées TRE-1 dans le LTR 3' (Yoshida et al. 2008; Landry et al. 2009). L'effet de Tax sur le niveau de transcription antisens semble cependant varier selon le site d'intégration du provirus (Landry et al. 2009). Toutefois, une différence au niveau de l'expression de ces transcrits est tout de même observée. Cette disparité peut en partie être expliquée par le fait que le promoteur de sHBZ est beaucoup plus puissant que celui de uHBZ (Yoshida et al. 2008). Bien que les promoteurs de sHBZ et uHBZ soient régulés par Tax, sHBZ dépend d'un autre mécanisme plus important. Dans les cellules ATL, la transcription de sHBZ est majoritairement contrôlée par le facteur de transcription SP1 qui se lie à son site consensus

dans le LTR 3' (Yoshida et al. 2008). De plus, un hétérodimère constitué du facteur de transcription JunD et sHBZ formerait un complexe avec SP1 sur le promoteur afin d'activer la transcription de sHBZ, ce qui suggère que sHBZ s'autorégulerait de façon positive (Gazon et al. 2012). Il a aussi été suggéré qu'une structure secondaire pouvait se former au niveau de l'exon 1 de sHBZ où se trouve sur le brin sens le RexRE, ce qui lui permettrait d'interagir avec des facteurs cellulaires (Kannian and Green 2010). Le transcrite de HBZ est aussi régulé au niveau post-transcriptionnel puisque 90% de l'ARNm de HBZ est retenu dans le noyau et empêche que celui-ci soit traduit efficacement (Rende et al. 2011). Enfin, il est à noter qu'au niveau protéique, sHBZ démontre une demi-vie plus longue que uHBZ (Yoshida et al. 2008).

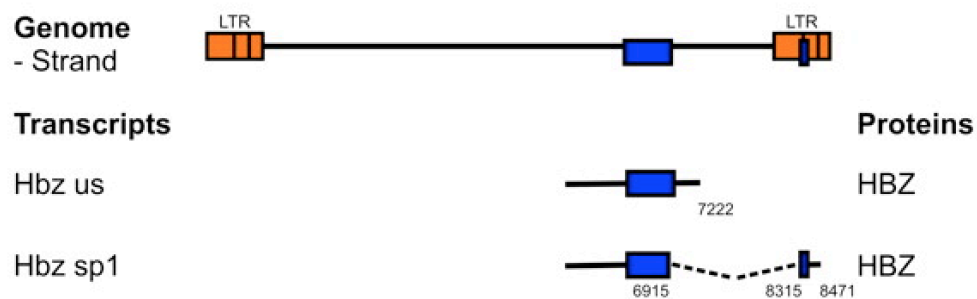


Figure 1.9. Position de l'ORF de HBZ sur le brin complémentaire du génome viral. L'ORF de HBZ est situé entre le gène *Tax* et *Env* sur le brin complémentaire de HTLV-1. Nous observons que les transcrits *uHBZ* et *sHBZ* diffèrent dans leur extrémité 5' alors que leur extrémité 3' est identique. Image tirée de (Rende et al. 2011).

1.3.3.2. Prédiction d'ORF chez les autres HTLV

L'équipe de Switzer a suggéré la présence d'un ORF sur le brin complémentaire du génome de HTLV-2 entre le gène *Tax* et *Env*, mais qui, selon les analyses *in silico*, ne contiendrait pas un domaine bZIP contrairement à HBZ (Switzer et al. 2006b). Au cours des

dernières années, nous avons détecté et caractérisé ce transcrit antisens produit à partir de l'ORF nommé *APH-2* (*Antisense Protein of HTLV-2*). Ce transcrit partage plusieurs caractéristiques avec le transcrit *sHBZ*: il contient plusieurs sites d'initiation à partir du LTR 3', il est épissé, son intron et ses régions UTR 5' et 3' sont d'une taille similaire à celle des régions équivalentes de *sHBZ* et il est polyadénylé (Figure 1.10) (Halin et al. 2009; Barbeau et al. 2013). De plus, les transcrits d'*APH-2* sont détectés dans des lignées infectées et des cellules de patients infectés par HTLV-2 (Halin et al. 2009). Il a aussi été rapporté que le transcrit de *APH-2* était retenu dans le noyau (Bender et al. 2012). La régulation de son expression n'a toutefois pas encore fait le sujet d'étude (Barbeau et al. 2013).

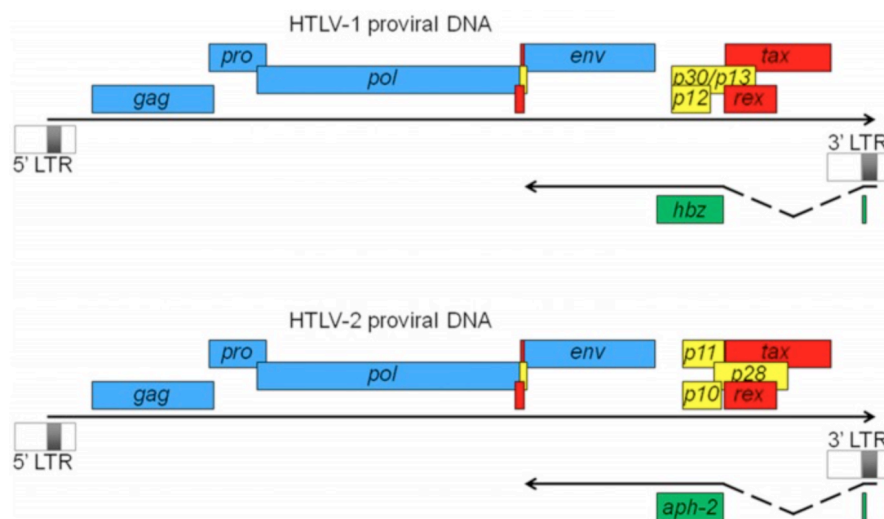


Figure 1.10. Schéma de la structure génomique de HTLV-1 et HTLV-2. Position de chacun des ORF sur le brin complémentaire du génome viral, situés par rapport aux gènes sens. Image tirée de (Barbeau et al. 2013).

1.4. La protéine HBZ

1.4.1 Organisation de HBZ

sHBZ est entre autres un facteur de transcription de la famille bZIP. Ce type de motif est retrouvé chez les facteurs de transcription eucaryotiques et est conséquemment impliqué dans la régulation de l'expression génique. Cette protéine possède un domaine bZIP retrouvé à l'extrémité carboxyle. Les domaines bZIP ont deux fonctions : la reconnaissance d'une séquence d'ADN spécifique et la capacité à former des dimères. La première activité se fait via une région riche en résidus basiques (*DNA Binding Domain*; DBD) permettant l'interaction avec la séquence d'acide nucléique au niveau du sillon majeur (Landschulz et al. 1988). Nous retrouvons la séquence consensus (R/K)XX(R/K)N(R/K)XAAXX(S/C)RX(R/K)(R/K) où l'asparagine et l'arginine espacées de 7 résidus sont conservées dans la presque totalité des domaines basiques cellulaires (Adya et al. 1994). La formation de dimères se fait grâce au motif fermeture éclair (*Leucine zipper*; LZ) adjacent au DBD et défini comme une leucine présente en position « d » d'un heptade ayant la séquence répétée (abcdefg)_n sur une longueur d'environ 30 à 40 acides aminés. Ceci permet au peptide, lorsqu'il se replie, de former une hélice α amphipatique dite « *coiled-coil* » (O'Shea et al. 1989; O'Shea et al. 1991; Landschulz et al. 1988). Cette position stratégique des leucines leur permet de se retrouver d'un seul côté de l'hélice à tous les deux tours, formant un côté hydrophobe et lui permettant ainsi de constituer un homodimère ou un hétérodimère avec une autre hélice α (*coiled-coil*) par une interaction *knobs-into-holes* (Alber 1992; Busch and Sassone-Corsi 1990; O'Shea et al. 1989). Le LZ de sHBZ est caractérisé par cinq heptades de leucine (en plus d'une isoleucine en 5' du motif LZ) et est précédé par un DBD qui est non-fonctionnel (Hivin et al. 2005; Switzer et al. 2006b). En plus de ce motif, HBZ a un domaine d'activation en N-terminal, riche en acides aminés acidiqes et présente deux motif LXXLL-*like*. Dans la partie centrale de la protéine se trouvent deux régions basiques BR1 et BR2 (Figure 1.11). Nous retrouvons, adjacent au DBD, un domaine modulateur (EQRERK) (Hivin et al. 2006; Clerc et al. 2009).

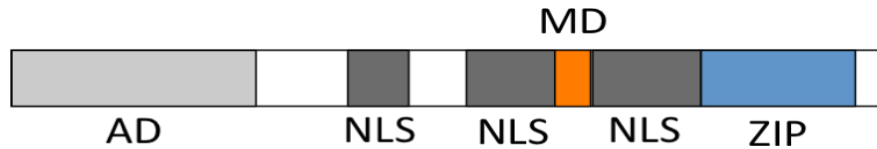


Figure 1.11. Structure moléculaire de HBZ. En N-terminal se trouve un domaine d'activation (AD), suivi de deux régions basiques BR1 et BR2. Un domaine de liaison à l'ADN (DBD) précède le domaine « *Leucine Zipper* » (LZ). Image modifiée de (Hivin et al. 2005).

1.4.2. Localisation cellulaire de HBZ

La première étude portant sur la localisation cellulaire de HBZ a permis de déterminer que cette nouvelle protéine virale est représentée par des structures ponctuées au noyau (Gaudray et al. 2002). Des mutants de délétions dans la séquence de HBZ fusionnée à la protéine fluorescente GFP ont montré que cette localisation est médiée par trois régions riches en acides aminés basiques BR1, BR2 et DBD, agissant chacun en tant que signal de localisation nucléaire nommé NLS (*Nuclear Localisation Signal*) (Hivin et al. 2005). Seulement deux de ces NLS sont suffisants pour induire une localisation nucléaire à HBZ peu importe leur combinaison (Hivin et al. 2005). Puisqu'il existe plusieurs sous-compartiments nucléaires, cette même étude a tenté d'identifier le sous-compartiment auquel sont associées ces structures. Les auteurs ont découvert une absence de colocalisation avec les corps Cajal, les compartiments de facteur d'épissage et les *promyelocytic leukemia oncoprotein bodies* (PML). Les structures ponctuées au noyau furent donc appelées « *HBZ-speckles* ». Ces structures seraient en fait le résultat d'une interaction protéique avec les facteurs de transcription Jun médiée par le bZIP de HBZ (Hivin et al. 2007). Contrairement à uHBZ, sHBZ localise non seulement au noyau sous forme de granule, mais co-localise aussi aux

nucléoles avec la nucléoline (C23) (Murata et al. 2006). Il a été émis comme hypothèse que le signal de localisation nucléolaire (*Nucleolar Localization Signal*; NoLS) ou le signal de rétention nucléolaire (*Nucleolar Retention Signal*; NoRS) de sHBZ est imbriqué dans son NLS (Hivin et al. 2005). Quant à uHBZ, celle-ci colocalise dans les régions périnucléolaires avec un membre de la famille des protéines HP1 (*Heterochromatin-associated proteins*) (Hivin et al. 2005). De façon intéressante, une analyse d'immunohistochimie (IHC) a confirmé une localisation nucléaire et nucléolaire de sHBZ chez les cellules ATL primaires (Murata et al. 2006).

1.4.3. Fonctions de HBZ

Des études *in vitro* ont montré que sHBZ est dispensable pour établir une infection et une immortalisation précoce, mais qu'elle était nécessaire à la réplication virale et la persistance virale *in vivo* (Arnold et al. 2008) (Arnold et al. 2008). En effet, cette étude a mis en lumière que des lapins infectés avec un virus HTLV-1 mutant pour sHBZ avaient une charge provirale et une réponse anticorps plus faible que les lapins infectés avec le virus sauvage (Arnold et al. 2008). sHBZ agit de trois différentes façons afin d'augmenter la charge provirale et d'induire une infection persistante: induction d'une latence virale, induction d'une prolifération clonale et dérégulation des Treg (Cook et al. 2014).

1.4.3.1. HBZ et l'inhibition de l'expression virale

L'inhibition de l'expression virale engendrée par HBZ se fait par plusieurs mécanismes. Le mécanisme principal consiste en la formation d'un complexe entre les protéines HBZ (épissé et non épissé) et CREB-2 par l'entremise de leur motif bZIP. Ceci empêche ce dernier de se lier au TRE et d'interagir avec Tax et prévient ainsi l'activation de la transcription virale (Figure 1.12) (Gaudray et al. 2002; Yoshida et al. 2008; Basbous et al. 2003; Lemasson et al. 2007; Cavanagh et al. 2006). Une diminution de l'expression virale et

d'une production de virions est conséquemment engendrée par cette interaction compétitive (Lemasson et al. 2007).

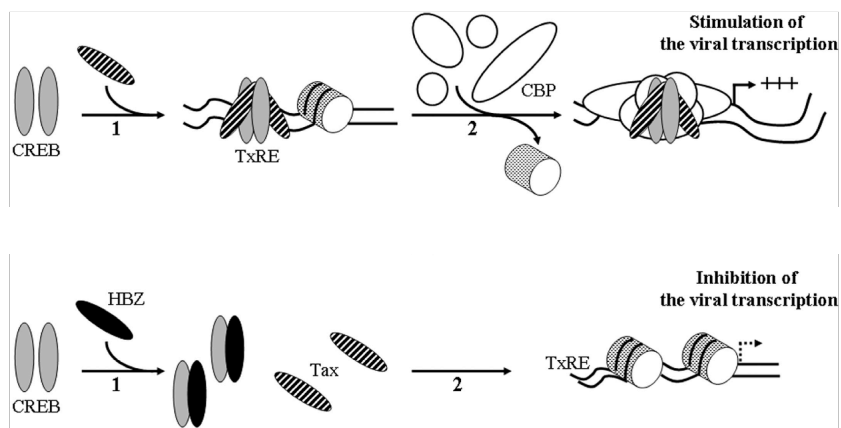


Figure 1.12. Implication de HBZ sur la régulation de la transcription de HTLV-1 dépendante de Tax. Tax et CREB forment un complexe en se liant au TxRE. CBP/p300 vient se lier au complexe et la transcription virale est stimulée. Lorsque HBZ se lie à CREB, Tax et CREB ne peuvent plus former un complexe. La transcription virale est conséquemment inhibée. Image tirée et modifiée de (Barbeau and Mesnard 2007).

Afin de réduire la transcription virale induite par Tax, un deuxième mécanisme implique une interaction entre sHBZ, via ces motifs LXXLL-like, et p300/CBP, via son domaine KIX, empêchant ainsi Tax d'interagir avec ce dernier (Clerc et al. 2008). En effet, le domaine KIX de p300/CBP contient deux surfaces de liaison pour les facteurs de transcription et sHBZ se lie à la région où se lie Tax, engendrant une compétition entre ces deux protéines virales (Vendel et al. 2003; Cook et al. 2011). L'interaction entre sHBZ et p300/CBP empêche donc le complexe Tax/CREB de recruter les coactivateurs sur le LTR 5' (Figure 1.14) (Cook et al. 2011; Clerc et al. 2008). Il a aussi été observé qu'une interaction entre HBZ et c-Jun

pouvait inhiber la transcription virale basale en séquestrant c-Jun dans des corps nucléaires et en interagissant directement avec le protéasome 26S (Figure 1.13 et 1.14) (Clerc et al. 2009; Basbous et al. 2003).

Finalement, HBZ inhibe l'exportation Rex-dépendante des ARNm contenant un intron (*Gag*, *Gag-Pro*, *Gag-Pro-Pol* et *Env*) ce qui engendre une diminution de la production de virions (Philip et al. 2014). En effet, la proportion de transcrits de Rex retenu dans le noyau est significativement plus élevée dans des cellules latentes que dans des cellules permettant une infection productive (Philip et al. 2014).

1.4.3.2. HBZ et la prolifération des lymphocytes T

De nombreuses études ont montré l'implication de sHBZ dans la prolifération des cellules ATL. En effet, des lignées ATL (TL-Om1 et Mt-1) et des lignées de LT transformés par HTLV-1 (SLB-1) inhibées pour l'expression de HBZ par des shRNA ont un taux de prolifération et un nombre de cellules en phase S réduits (Satou et al. 2006; Arnold et al. 2008). En utilisant la stratégie inverse, c'est-à-dire lorsque sHBZ est exprimé stablement dans une lignée de LT humain IL-2-dépendante (Kit 225), on observe une augmentation de la prolifération cellulaire et une augmentation de cellules en phase S en absence d'IL-2, phénomène non observé avec uHBZ (Satou et al. 2006; Yoshida et al. 2008). De plus, cette étude suggère que le pouvoir proliférateur de sHBZ est attribué à l'action de son transcrit (Satou et al. 2006). Les propriétés oncogéniques de sHBZ ont aussi été illustrées chez des souris transgéniques exprimant sHBZ sous le contrôle d'un promoteur/amplificateur CD4 (tg sHBZ). Ces souris ont un nombre significativement plus élevé de LT CD4⁺ dans la rate et développent des lymphomes de LT avec une infiltration des organes ainsi qu'une inflammation chronique ressemblant aux pathologies observées chez les patients atteints d'ATL ou de HAM/TSP (Satou et al. 2006; Zhao et al. 2014; Satou et al. 2011; Yamamoto-Taguchi et al. 2013). De plus, lorsque l'on injecte un virus HTLV-1 déficient pour HBZ dans des souris NOD.Cg-PrkdcSCIDIL2rgtm1Wjl/SzJ (NOG), on observe une réduction de la formation de tumeur et de l'infiltration de cellules tumorales dans les organes (foie, cœur, poumons, reins et pancréas) comparativement aux souris injectées avec le virus sauvage (Arnold et al. 2008).

Même si HBZ semble intervenir dans les étapes tardives du processus de leucémogénèse, le mécanisme moléculaire menant à l'oncogénèse par sHBZ demeure toujours mal compris. Toutefois, il est clair que HBZ module l'expression de plusieurs facteurs de transcription cellulaire et voies de transduction du signal (voir ci-dessous).

1.4.3.3. Fonctions moléculaires de HBZ

1.4.3.3.1. HBZ et les facteurs de transcription bZIP

Il a été montré que HBZ module la voie AP-1 en interagissant avec le bZIP des facteurs de transcription Jun. Des études ont mis en évidence la capacité de HBZ à inhiber l'activité transcriptionnelle de c-Jun en favorisant sa dégradation par le protéasome (Figure 1.13) (Basbous et al. 2003; Matsumoto et al. 2005; Hivin et al. 2006). Plus précisément, en générant un HBZ chimère contenant le domaine de liaison à l'ADN de c-Fos, une étude a montré que cette diminution de la transcription était en effet due à la séquestration de c-Jun relocalisé dans les corps nucléaires et non due à la faible efficacité d'HBZ à se lier à l'ADN (Clerc et al. 2009). Cette relocalisation entraîne une baisse de la transcription puisque c-Jun n'est plus en mesure de se lier au site AP-1. HBZ inhibe également la transcription dépendante de JunB en modifiant sa localisation cellulaire dans les corps nucléaires (Basbous et al. 2003; Hivin et al. 2007).

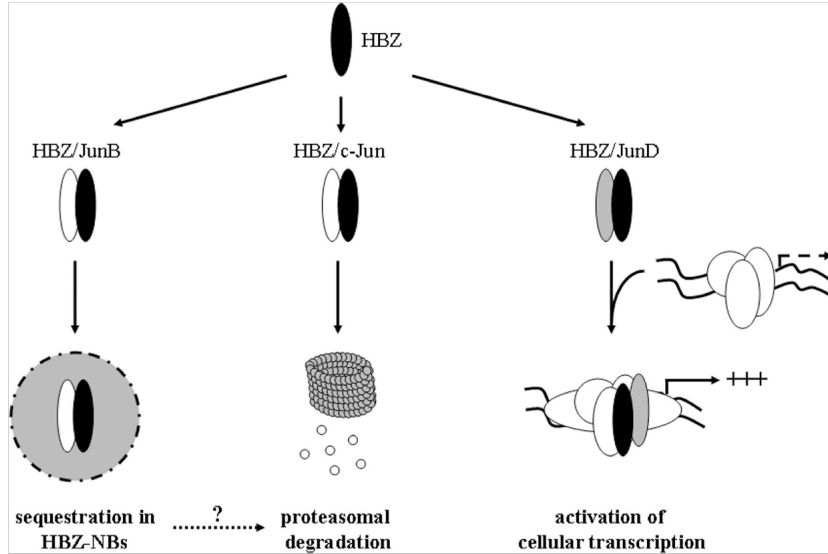


Figure 1.13. Rôle de HBZ sur la régulation de la transcription par les facteurs transcriptionnels de la famille Jun. HBZ inhibe l’activation de la transcription régulée par JunB et c-Jun en séquestrant JunB dans des corps nucléaires inactifs (gauche) et en engendrant la dégradation de c-Jun par le protéasome (centre). Cependant, HBZ module l’activité transcriptionnelle dépendante de JunD de façon positive (droite). Image tirée de (Barbeau and Mesnard 2007).

Contrairement aux autres protéines Jun, lorsque HBZ interagit avec JunD, la transcription dépendante de cette dernière est augmentée (Figure 1.13) (Thébault et al. 2004). Il a aussi été montré que l’hétérodimère HBZ/JunD interagit avec le facteur de transcription Sp1 (Kuhlmann et al. 2007). Ce complexe ternaire peut se lier au promoteur de la télomérase humaine (*hTERT*) afin d’activer la transcription de cette dernière. Parallèlement, le promoteur de *hTERT* est régulé négativement par un complexe formé de JunD et du suppresseur de tumeur ménine qui recrute des histones déacétylases (HDAC) à la région promotrice. Dans les cellules exprimant HBZ, un complexe ternaire formé de JunD/ménine/sHBZ devient activateur en recrutant le coactivateur p300 sur le promoteur de *hTERT* pour ainsi augmenter sa transcription (Borowiak et al. 2013). De façon intéressante, une corrélation a été observée

entre l'augmentation de la transcription de *hTERT* et les cellules ATL suggérant que HBZ joue possiblement un rôle dans cette augmentation (Uchida et al. 1999).

Finalement, d'autres facteurs de transcription de la famille bZIP ont été identifiés comme partenaires d'interaction avec HBZ : CREB, CREM, ATF-1, ATF-2, ATF-3 MAFB, MAFG, CEBPG, et CREBZF (Reinke et al. 2010b; Lemasson et al. 2007; Hagiya et al. 2011; Ohshima et al. 2010). Ainsi, HBZ régule la capacité transactivatrice de plusieurs proto-oncogènes.

1.4.3.3.2. HBZ et la voie NF- κ B

Comme mentionné précédemment, Tax active de façon constitutive les voies NF- κ B afin de transformer et induire la prolifération des cellules infectées (Matsuoka and Jeang 2007). Cependant, ceci engendre une hyperactivation qui s'autorégule négativement en induisant une sénescence médiée par la stabilisation des ARNm des inhibiteurs de kinase cycline-dépendante p21^{CIP1} et p27^{KIP1} par p65(RelA) (Zhi et al. 2011). Toutefois, sHBZ peut retarder cette sénescence en réprimant la voie classique de NF- κ B (Zhi et al. 2011). Le mode d'action de sHBZ dans ce contexte consiste en une interaction avec les domaines AD de p65(RelA), et son domaine bZIP, inhibant ainsi la liaison de p65 au promoteur (Figure 1. 14). De plus, HBZ augmente l'expression de *PDLIM2*, une ubiquitine ligase E3, ce qui augmente l'ubiquitination de p65 et induit sa dégradation (Zhao et al. 2009). La répression du promoteur de NF- κ B entraîne une diminution des gènes impliqués dans l'immunité innée et la réponse inflammatoire, notamment *IRF4* et *IL-2RA* (Zhi et al. 2011; Zhao et al. 2009). Il a aussi été montré que, lors d'une infection productive, une hyperactivation de NF- κ B et une sénescence cellulaire sont engendrées par Tax alors qu'une infection latente est plutôt associée à une activité de NF- κ B et une prolifération cellulaire normale (Philip et al. 2014).

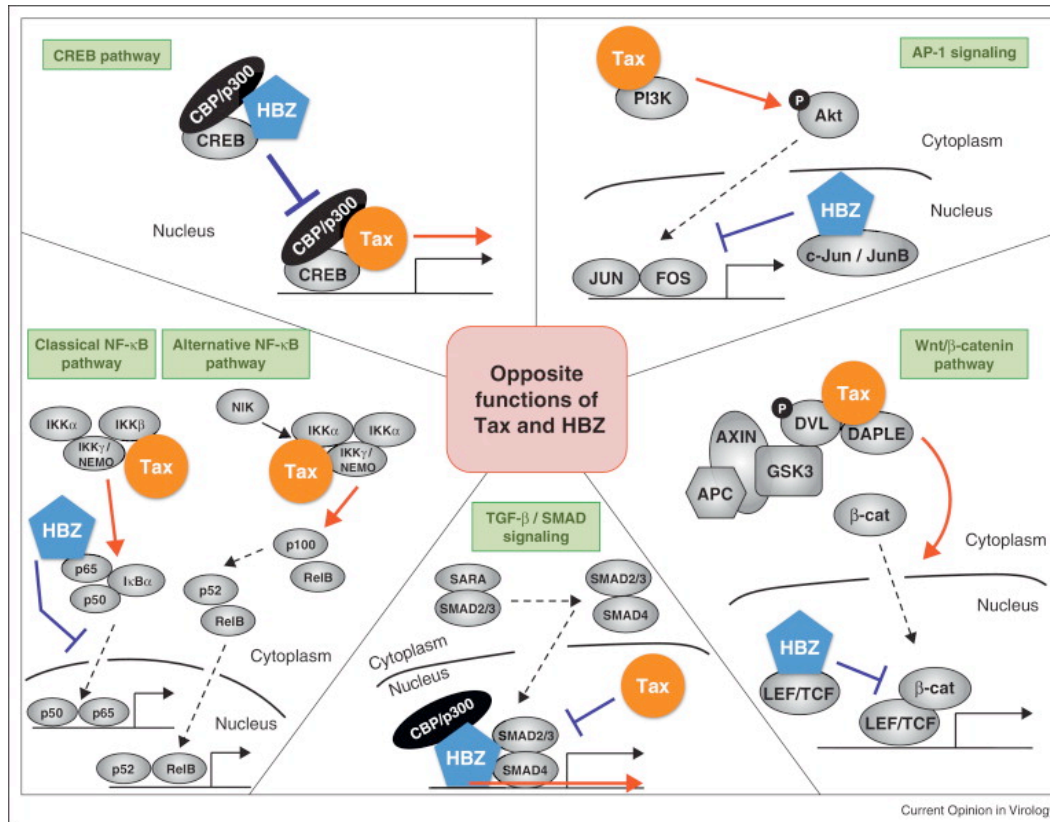


Figure 1.14. Les rôles opposés de HBZ et Tax dans plusieurs voies de signalisation. En haut à gauche. Alors que Tax active la voie de CREB par l'entremise de CREB et CBP/P300, HBZ compétitionne avec Tax pour ces facteurs de transcription et réprime la transctivation du promoteur médié par Tax. En bas à gauche. Tax active les voies NF-κB classique et non classique. HBZ réprime l'activation de la voie NF-κB classique en empêchant p65 de lier le promoteur. En haut à droite. Tax active la voie AP-1 indirectement en activant la voie PI3K tandis que HBZ régule négativement cette voie en séquestrant JunB et c-Jun dans des corps nucléaires. En bas à droite. Tax forme un complexe avec DAPLE et Dvl, ce qui engendre un activation de la voie Wnt canonique. HBZ peut inhiber l'activation de cette voie en interagissant en aval avec Lef/TCF-1 dans le noyau. En bas au centre. Alors que Tax réprime la voie TGFβ, HBZ active cette voie en formant un complexe avec Smad-3 et p300 sur le promoteur. Image tirée de (Matsuoka and Yasunaga 2013).

1.4.3.3.3. HBZ et la voie Wnt

Il a été montré que sHBZ induisait une dérégulation de la voie canonique Wnt (Wnt/β-catenin) (Figure 1.14). Cette voie régule plusieurs processus biologiques dont la

différenciation cellulaire, la prolifération cellulaire et l'apoptose alors que la voie non canonique (Wnt-Ca²⁺) lui est antagoniste (McDonald and Silver 2009; Staal and Clevers 2005). Dans les cellules infectées par HTLV-1, Tax peut activer la voie canonique Wnt (Wnt/ β -catenin) au niveau transcriptionnel en interagissant avec DAPLE et Dvl2. L'expression de sHBZ réprime cependant l'activation de cette voie en interagissant avec LEF1 (partenaire nucléaire de la β -catenin), ce qui empêche sa liaison au site TCF/LEF sur l'ADN et inhibe l'activation de la transcription Wnt/ β -catenin dépendante (Figure 1.14) (Ma et al. 2013). Cette régulation est donc responsable de l'absence d'activation de la voie Wnt canonique dans les cellules infectées par HTLV-1 et ceci est nécessaire pour engendrer la prolifération des cellules ATL (Ma et al. 2013). Parallèlement à son effet sur la voie canonique, sHBZ active la voie non canonique de Wnt en augmentant dans les cellules infectées l'expression de *Wnt5a* au niveau transcriptionnel par la voie TGF β . La surexpression de *Wnt5a* a en outre été montrée pour être impliquée dans la prolifération et la migration des cellules ATL (Ma et al. 2013).

1.4.3.4. HBZ et la modulation de l'immunogénicité des cellules infectées

HTLV-1 infecte les LT CD4⁺ effectrices (CD3⁺/CD4⁺/CD8⁻/CD25⁺/HLA-DR⁺/CCR4⁺) et mémoires (CD4⁺/CD45RO⁺) (Richardson et al. 1990). Cependant, les cellules ATL et 60% des cellules infectées par HTLV-1 expriment CD4, CD25 ainsi que FoxP3, marqueurs typiques des cellules T régulatrices (Treg) (Toulza et al. 2008; Satou et al. 2012). De plus, chez un modèle de souris Tg exprimant sHBZ sous le contrôle du promoteur/amplificateur CD4, une augmentation du nombre des LT CD4⁺ effecteurs/mémoires a pu être observée *in vivo*, mais aussi des cellules CD4⁺FoxP3⁺ suggérant fortement que le sous-type Treg est autant ciblé par le virus (Satou et al. 2011). De façon intéressante, sHBZ induit l'expression du gène *FoxP3* en formant un complexe tertiaire avec Smad-3 et p300 ce qui intensifie l'activation de l'élément de réponse Smad *via* la voie TGF β (Figure 1.14) (Zhao et al. 2011). Paradoxalement, sHBZ induit une augmentation de la prolifération des Treg, mais aussi une inhibition de leur activité immunosuppressive. En effet,

des souris tg-sHBZ démontrent un phénotype de Treg CTLA-4^{low}, GITR^{low}, CD103^{high}, CD25^{low} et CCR4^{high} (Satou et al. 2011). L'expression des marqueurs CTLA-4, GITR et CD25, généralement induite par FoxP3 en collaboration avec NFAT, est réprimée par une interaction entre sHBZ et ces deux derniers. Ceci contribue ainsi à la non-fonctionnalité des Treg (Satou et al. 2011; Zhao et al. 2011).

D'autre part, HBZ induit spécifiquement la prolifération des Treg induites dans les organes lymphoïdes secondaires (iTreg) chez les souris Tg-sHBZ et les patients HAM/TSP, alors que les Treg générées dans le thymus (nTreg) ne sont pas affectées (Yamamoto-Taguchi et al. 2013; Thornton et al. 2010). Ces iTreg spléniques de souris Tg-sHBZ perdent cependant l'expression de FoxP3 après sept jours de culture *ex vivo* et produisent de l'IFN γ en grande quantité. sHBZ a ainsi la capacité de moduler l'immunogénicité des cellules infectées en induisant un phénotype anti-inflammatoire, mais aussi pro-inflammatoire dans d'autres circonstances pouvant ainsi contribuer à la persistance virale et aux maladies inflammatoires observées chez les souris transgéniques et chez certains patients infectés par HTLV-1 (Yamamoto-Taguchi et al. 2013; Miyazato and Matsuoka 2014).

HBZ peut aussi moduler l'immunité cellulaire, contribuant à l'immunodéficiences associée à une infection par HTLV-1. En effet, Sugata et al ont observé une réduction de la production d'IFN γ et d'IL-2 par les cellules T CD4+ des souris Tg HBZ due entre autres à la répression par HBZ de la transcription du gène de l'IFN γ (Sugata et al. 2012). Ce mécanisme inhibe ainsi les voies de signalisation NFAT et AP-1 ce qui réduit la réponse immunitaire et rend les souris tg-HBZ plus susceptibles à une infection par HSV-2 et *Listeria monocytogenes* (Sugata et al. 2012).

1.4.4. HBZ et la réponse CTL

Récemment, il a été montré que HBZ est une protéine immunogénique, quoique faible et peu dominante comparativement à Tax (Macnamara et al. 2010; Suemori et al. 2009). En effet, l'existence de CTL HBZ spécifiques a récemment été mise en évidence *ex vivo* à partir

de cellules venant de patients asymptomatiques et ATL (Macnamara et al. 2010; Hilburn et al. 2011; Suemori et al. 2009). Cette étude a montré que l'expression d'allèles HLA de classe 1 pouvant lier fortement HBZ était associée à une production d'IL-2 et une charge provirale faible chez les patients HTLV-1 asymptomatiques et diminuait ainsi les risques de développer le HAM/TSP (Macnamara et al. 2010; Hilburn et al. 2011). Une analyse classique de lyse cellulaire a également montré que les cellules CD4+CD25+ de patients asymptomatiques ou HAM/TSP peuvent être efficacement lysées par une lignée CTL HBZ spécifique alors que les cellules ATL y sont résistantes (Macnamara et al. 2010; Suemori et al. 2009). Finalement, une réponse CTL efficace dirigée contre les cellules HBZ positives, même si peu fréquente, offre une réponse protectrice en contrôlant la PVL et réduit du coup la prédisposition aux maladies associées à une infection par HTLV-1 (Hilburn et al. 2011).

1.5. La protéine APH-2

APH-2 (*Antisense Protein of HTLV-2*) est la protéine traduite à partir du transcrit antisens chez HTLV-2. Cette protéine nucléaire et non nucléolaire de 25kDa (183aa) ne contient pas un domaine bZIP conventionnel comme sHBZ selon les analyses bio-informatiques (Halin et al. 2009). Une région contenant des leucines positionnées en forme de heptade a pu être identifiée. Cependant, deux de ces leucines ne suivent pas l'espacement classique observé chez les motifs LZ. Un motif LXXLL-like est aussi présent dans la région centrale (aa 64-68) ainsi qu'un LXXLL classique à l'extrémité C-terminale de la protéine (aa 179-183) (Halin et al. 2009). APH-2 peut inhiber la transactivation Tax 2-dépendante du LTR 5' par l'entremise d'une interaction entre APH-2 et CREB (Halin et al. 2009; Yin et al. 2012). Contrairement à HBZ, cette interaction est médiée par le motif LXXLL d'APH-2 plutôt que par le motif bZIP non conventionnel (Halin et al. 2009; Yin et al. 2012; Gaudray et al. 2002). Il a aussi été démontré que le potentiel d'inhibition engendré par APH-2 sur la transactivation du LTR 5' de HTLV-2 Tax 2-dépendante est moins important que l'inhibition de la transactivation Tax 1-dépendante sur le LTR 5' de HTLV-1 par sHBZ (Yin et al. 2012). Finalement, APH-2 est incapable de former un complexe avec le coactivateur p300,

contrairement à HBZ, et ne peut donc inhiber la transactivation du LTR en réduisant la présence de ce dernier sur le promoteur viral comme observé avec HBZ (Halin et al. 2009).

Lors de ce doctorat, Marban et al ont mis en évidence qu'APH-2 régule aussi la voie AP-1, mais différemment de sHBZ (Marban et al. 2012). En effet, APH-2 interagit *via* son domaine bZIP non conventionnel avec les facteurs de transcription JunB et c-Jun afin d'augmenter la transcription AP-1 dépendante. En présence de Tax 2B, APH-2 forme un complexe avec ce dernier et inhibe l'activation de la voie AP-1 (Marban et al. 2012). Une telle interaction n'a jamais pu être détectée entre sHBZ et Tax 1.

Bien que HTLV-2 soit un virus non leucémique, une lymphocytose non bénigne est associée à cette infection (Bartman et al. 2008). Considérant le rôle de sHBZ dans la prolifération cellulaire, une équipe s'est intéressée au rôle potentiel d'APH-2 dans cette lymphocytose. Bien qu'ils aient pu démontrer que la présence d'APH-2 corrèle avec la charge provirale, APH-2 est incapable d'induire une prolifération IL-2 indépendante des LT CD4+ *in vitro* (Douceron et al. 2012). Ainsi, sHBZ et APH-2 semblent jouer des rôles différents même si elles interviennent dans les mêmes voies de transduction du signal. Alors qu'*in vitro*, sHBZ et APH-2 sont dispensables lors de l'immortalisation des cellules T infectées par HTLV-1 et HTLV-2, APH-2 ne semble pas être impliquée dans la persistance virale contrairement à sHBZ (Arnold et al. 2008; Yin et al. 2012). Au contraire, on observe une augmentation de la PVL et de la réponse humorale chez des lapins infectés avec un virus HTLV-2 mutant pour APH-2. Les auteurs ont ainsi suggéré qu'APH-2 contribue potentiellement à la plus faible virulence de HTLV-2 (Yin et al. 2012).

Suite à la découverte des nouveaux rétrovirus HTLV-3 et HTLV-4, un ORF sur le brin complémentaire de leur génome viral a également été prédit au même endroit que HBZ et APH-2 (Chevalier et al. 2008; Switzer et al. 2009). Les analyses *in silico* n'ont pu prédire de domaine bZIP dans leur séquence. Aucune étude sur l'expression d'un transcrit antisens chez HTLV-3 et HTLV-4 n'avait été publiée avant ce projet de doctorat.

Problématique

Les rétrovirus humains sont des virus à ARN simple brin de polarité positive chez lesquels la production de la totalité des protéines dépend de l'expression d'un transcrite sens pleine longueur épissé alternativement. Récemment, notre équipe a mis en évidence un nouveau mécanisme permettant aux rétrovirus d'exprimer leurs gènes; la transcription qui jusqu'alors n'avait qu'un sens se réalise aussi dans le sens inverse du sens conventionnel. Cette transcription dite antisens est initiée à partir de la séquence terminale longue répétée en 3' (*Long Terminal Repeat*; LTR) du virus T-lymphotrope humain (*Human T-cell leukemia/lymphotropic virus*; HTLV-1) et permet ainsi la production d'une nouvelle protéine virale nommée *HTLV-1 bZIP factor* (HBZ). HTLV-1 est un virus ciblant les lymphocytes T (LT) CD4+ effecteurs et mémoires et qui persiste tout au long de la vie de la personne infectée malgré une forte réponse immunitaire dirigée contre la protéine immunodominante Tax. De plus, HTLV-1 est l'agent causal d'une leucémie agressive de type T (*Adult T-cell Leukemia/Lymphoma*) entraînant rapidement la mort de la personne atteinte et dont le mécanisme d'oncogenèse est encore mal compris. Les cellules leucémiques démontrent cependant quelques caractéristiques importantes : i) elles sont en latence virale; ii) elles n'expriment qu'un seul gène, *HBZ*; iii) et le nucléole est le compartiment où se retrouve principalement HBZ. L'identification de cette nouvelle protéine virale a donc suscité beaucoup d'intérêt quant à son rôle dans le processus de leucémogénèse. En effet, les modèles animaux ont pu démontrer que HBZ est une protéine avec un pouvoir prolifératif, oncogénique et qu'elle est impliquée dans la réplication virale et la persistance virale. Bien que nous ne sachions toujours pas le mécanisme moléculaire menant à l'oncogenèse par HBZ, nous savons qu'elle module une multitude de voies de transduction de signaux, dont celles d'AP-1, NF- κ B, Wnt et TGF β .

Notre équipe et nos collaborateurs ont tout récemment mis en évidence une deuxième protéine virale nommée APH-2 (*Antisense Protein of HTLV-2*), codée par le brin antisens du rétrovirus non leucémogénique HTLV-2. Tout comme HBZ, APH-2 peut inhiber la transactivation par Tax du LTR 5' menant à l'expression des gènes viraux alors que ces deux protéines virales modulent différemment la voie AP-1. Bien que HBZ et APH-2 soient

impliquées dans des processus similaires, *in vivo* ces protéines démontrent des rôles contraires : chez le modèle du lapin, contrairement à HBZ, l'établissement d'une infection persistante par HTLV-2 ne requiert pas l'expression d'APH-2. Au contraire, APH-2 semble plutôt contribuer à la faible virulence de HTLV-2.

En 2005, les membres HTLV-3 et HTLV-4 se sont rajoutés au groupe HTLV. Très peu d'informations sont connues jusqu'à présent sur ces deux rétrovirus, mais un ORF est également prédit sur le brin complémentaire à une position similaire du gène de *HBZ* et *APH-2*. Au début de ce doctorat, nous avons émis l'hypothèse que ***la transcription antisens est un phénomène conservé chez la famille des rétrovirus et que les différences entre les protéines traduites à partir de ces transcrits antisens sont en partie la cause des différences du développement de la leucémie associée à une infection par HTLV-1.*** La première partie de ce travail de doctorat avait donc comme objectif de détecter et caractériser les transcrits antisens produits par HTLV-3 et HTLV-4 par les techniques RT-PCR et RACE-PCR, d'étudier les protéines traduites à partir de ces transcrits par l'entremise de vecteurs d'expression et ainsi d'évaluer leurs similitudes et/ou différences avec HBZ en terme de leur localisation cellulaire par microscopie confocale, leur rôle sur la transcription virale et les voies de signalisation à l'aide de gènes rapporteurs ainsi que leurs domaines fonctionnels par mutagenèse. Dans un deuxième temps, l'objectif était d'élucider le rôle de sHBZ dans les nucléoles en identifiant des partenaires d'interaction spécifiques comparativement aux autres protéines antisens considérant les nombreuses évidences reliant les virus et la modification des nucléoles suite à une infection, mais également lors du développement d'un cancer.

Chapitre II

Human T-cell lymphotropic virus type 3 (HTLV-3)- and HTLV-4-derived antisense transcripts encode proteins with similar Tax-inhibiting functions but distinct subcellular localization.

Émilie Larocque^{1,6}, Marilène Halin^{1,6}, Sébastien Landry^{1,5}, Susan Marriott³, William M. Switzer⁴ and Benoit Barbeau^{1,2*}

¹Département des Sciences Biologiques and ²Centre de recherche BioMed, Université du Québec à Montréal, 2080 Saint-Urbain, Montréal, Québec, Canada H2X 3X8, ³Department of Molecular Virology and Microbiology, Baylor College of Medicine, Houston TX 77030; ⁴Laboratory Branch, Division of HIV/AIDS Prevention, National Center for HIV, AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB prevention, Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA 30333

Contribution des auteurs :

Ce premier article a été rédigé par moi-même Émilie Larocque avec l'aide de Marilène Halin et du Dr Barbeau. Les expériences ont été effectuées par Marilène Halin et moi-même dont plus de 50% de mon travail lors de mon doctorat. J'ai réalisé les expériences de détection des transcrits dans les Jurkat et la caractérisation de l'extrémité 5' des transcrits. J'ai effectué les études de localisation cellulaire dans les COS-7 et Jurkat ainsi que généré les constructions pour l'étude de colocalisation. J'ai aussi fait les expériences de western blot sur les différentes fractions cellulaires et les tests d'inhibition de la transactivation. Sébastien Landry a participé aux idées scientifiques. Les vecteurs d'expression de Tax 3 et Tax 4 ont été fournis par Dre Susan Marriott. Aussi, Dr Switzer nous a fourni les ADN proviraux de HTLV-3 et HTLV-4. De plus, cette étude a été menée entièrement dans le laboratoire de Dr Barbeau. L'article a été publié en décembre 2011 dans la revue *Journal of Virology* (facteur d'impact 4, 648 en 2013/2014). Il a donc été modifié en vue de la publication afin de répondre à leurs critères de soumission. Vous retrouverez la bibliographie associée à cet article à la fin de la thèse dans le but de réduire la quantité de papier.

2.1. Abstract

The human T-cell lymphotropic virus (HTLV) retrovirus family is composed of the well-known HTLV type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 and the most recently discovered HTLV-3 and HTLV-4. Like other retroviruses, HTLV-1 and HTLV-2 gene expression has been thought to be orchestrated through a single transcript. However, recent reports have demonstrated the unique potential of both HTLV-1 and HTLV-2 to produce an antisense transcript. Furthermore, these unexpected and newly identified transcripts lead to the synthesis of viral proteins termed HBZ (HTLV-1 basic leucine zipper) and APH-2 (antisense protein of HTLV-2), respectively. As potential open reading frames are present on the antisense strand of HTLV-3 and HTLV-4, we tested whether *in vitro* antisense transcription occurred in these viruses and whether these transcripts had a coding potential. Using HTLV-3 and HTLV-4 proviral DNA constructs, antisense transcripts were detected by reverse transcriptase PCR. These transcripts are spliced and polyadenylated and initiate at multiple sites from the 3' long terminal repeat (LTR). The resulting proteins, termed APH-3 and APH-4, are devoid of a typical basic leucine zipper domain but contain basic amino acid-rich regions. Confocal microscopy and Western blotting experiments demonstrated a nucleus-restricted pattern for APH-4, while APH-3 was localized both in the cytoplasm and in the nucleus. Both proteins showed partial colocalization with nucleoli and HBZ-associated structures. Finally, both proteins inhibited Tax1- and Tax3-mediated HTLV-1 and HTLV-3 LTR activation. These results further demonstrate that retroviral antisense transcription is not exclusive to HTLV-1 and HTLV-2 and that APH-3 and APH-4 could impact HTLV-3 and HTLV-4 replication.

2.2. Introduction

Human T-cell lymphotropic viruses (HTLVs) are human deltaretroviruses that are part of the primate T-cell lymphotropic virus (PTLV) group that also includes simian T-cell lymphotropic viruses (STLVs). Most research have been conducted on the two first identified members of this family i.e. HTLV-1, the first retrovirus to be isolated in humans (Miyoshi et al. 1981; Poiesz et al. 1980; Poiesz et al. 1981; Yoshida et al. 1982), and HTLV-2. HTLV-1 has a significant impact on human health as this virus is the etiological agent of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). Unlike HTLV-1, HTLV-2 has been linked to HAM-like pathologies, but not to leukemia, although patients infected with HTLV-2 demonstrate a higher lymphocyte count compared to non-infected patients (Bartman et al. 2008). Recently, two new HTLVs, termed HTLV-3 and HTLV-4, have been isolated, the former being closely related to STLV-3 (Calattini et al. 2006; Calattini et al. 2005; Wolfe et al. 2005). Currently, these viruses have been identified in a relatively low number of persons from Africa and no diseases, such as large granuloma leukemia (Duong et al. 2008; Thomas et al. 2010), have yet been associated with these viruses.

The discovery of these two retroviruses led to a series of recent studies for further characterization. These studies have demonstrated that HTLV-3 and HTLV-4 share a similar genomic organization to HTLV-1 and HTLV-2, and weak but reproducible cross-reactivity were observed in serologic assays employing HTLV-1 and HTLV-2 antigens (Calattini et al. 2006; Calattini et al. 2005; Switzer et al. 2006b; Wolfe et al. 2005; Switzer et al. 2006a). Further studies focusing on the Tax3 protein of HTLV-3 have found that its intracellular localization, its domains (such as the PDZ domain binding motif) and its transactivation activity are similar to HTLV-1 Tax (Calattini et al. 2006; Chevalier et al. 2006). A recent study also provided evidence that the HTLV-3 genome, when reconstituted, produces infectious particles (Chevalier et al. 2008). Interestingly, like HTLV-1, the existence of a potential open reading frame (ORF) called HBZ for HTLV-1 basic leucine zipper (bZIP), which could be produced from the antisense strand, has been suggested for both new human viruses (Chevalier et al. 2008; Calattini et al. 2006; Switzer et al. 2006b; Switzer et al. 2009).

Previous studies have shed light on the existence of this HBZ protein encoded by the antisense strand of the HTLV-1 genome (Gaudray et al. 2002). Typically, two HBZ isoforms are produced, one of which is more abundant and depends on a spliced transcript (Murata et al. 2006; Cavanagh et al. 2006; Satou et al. 2006). Both HBZ isoforms block Tax-induced and basal HTLV-1 transcription and interact with several Jun family members, rendering some of them inactive through degradation or by possible sequestration in transcriptionally inactive nuclear bodies (Basbous et al. 2003; Hivin et al. 2007; Thébault et al. 2004; Matsumoto et al. 2005). However, subsequent studies have demonstrated that HBZ interacts with and activates JunD, thereby augmenting gene expression of the telomerase hTERT component through this transcription factor (Thébault et al. 2004; Hivin et al. 2006; Kuhlmann et al. 2007). Other transcription factors such as NF- κ B and MafG are additional targets of HBZ, likely contributing to the disturbance of gene expression in HTLV-1-infected cells (Zhao et al. 2009; Reinke et al. 2010b). A number of reports have also demonstrated that HBZ is expressed in cells from ATLL patients, therefore implicating this viral protein in the development of ATLL, in part through its hyperproliferative action on T cells (Barbeau and Mesnard 2007; Matsuoka and Jeang 2007; Mesnard et al. 2006; Usui et al. 2008; Arnold et al. 2008; Satou et al. 2006).

Antisense transcription has also been suggested in other retroviruses like HIV-1 (Briquet et al. 2001; Briquet and Vaquero 2002; Michael et al. 1994a; Peeters et al. 1996; Tagieva and Vaquero 1997; Vanhee-Brossollet et al. 1995; Landry et al. 2007; Arnold et al. 2008). We have recently demonstrated that antisense transcription could be detected in HTLV-2 and that the encoded antisense protein of HTLV-2 (APH-2) shares a Tax-inhibiting activity like HBZ (Halin et al. 2009). Based on these former results and given that previous sequence analysis studies have predicted the possible existence of antisense transcription in HTLV-3 and HTLV-4, we have investigated the presence of antisense transcripts in these new viruses and their potential coding capacity. Our results indicate that both viruses produce a spliced and polyadenylated antisense transcript. The encoded proteins show distinct localization; the HTLV-3 antisense protein being both nuclear and cytoplasmic, while the HTLV-4 counterpart being almost exclusively contained in the nucleus. However, both

antisense proteins inhibited Tax-mediated HTLV LTR activation. These important results indicate the potentially essential role of antisense proteins in retroviral replication.

2.3 Materials and Methods

2.3.1. Cell lines and antibodies

293T and COS-7 cell lines were maintained in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (PAA Laboratories Inc., Toronto, Canada). The T-cell line Jurkat E6.1 was maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS. The anti-Myc antibody (9E10) and mouse anti-GAPDH antibody were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz USA). The ECLTM sheep anti-mouse IgG antibody coupled to horseradish peroxidase was obtained from GE Healthcare Inc. (Buckinghamshire UK), and the goat anti-mouse IgG antibody coupled to the Alexa fluor 488 (A11001) was obtained from Invitrogen Canada Inc. (Burlington, Canada). The anti-Lap2 antibody (L6043) is from Sigma-Aldrich (Oakville, Canada). Anti-HTLV-1 Tax polyclonal antibodies were kindly provided by Dr. Jean-Michel Mesnard (Université Montpellier I, Montpellier, France).

2.3.2. Plasmids

Both HTLV-3 (2026ND) and HTLV-4 (pUC-HT4v2) proviral DNAs were cloned in pUC18. The pHTLV-3 DEcoRV construct was derived from the HTLV-3 (2026ND) proviral DNA clone by EcoRV/XhoI digestion thereby deleting 4359pb of the 5' end of the proviral sequence. The pHTLV-3-as-luc vector was derived from pHTLV-3 DEcoRV by cloning the luciferase gene from pGL3-basic in frame in the second exon of APH-3. Briefly, PacI and BstZ171 restriction sites were added to pHTLV-3 DEcoRV with the PhusionTM Site-Directed Mutagenesis Kit using the reverse primer 5'-**ATAGTATACTGCAATCCCAGGAACTG**-3' (BstZ171 restriction site in bold) and forward primer 5'-**ATATTAATTAATGTCTCCGGGGCTAGG**-3' (PacI restriction site in bold). The luciferase gene was amplified using the reverse primer 5'-

ATATTAATTAAGGAAGACGCCAAAAACATAAAGAA-3' (PacI restriction site in bold) and forward primer 5'-**ATAGTATACTACCACATTTGTAGAGGTTTTAG-3'** (BstZ171 restriction site in bold). Luciferase amplicons were ligated into the pHTLV-3 DEcoRV digested vector resulting in pHTLV-3-as-luc. The pHTLV-4 DSacI construct was produced by digesting HTLV-4 (pUC-HT4v2) proviral DNA with SacI/HindIII, thereby deleting 3213pb of the 5' end of the proviral sequence. The pHTLV-4-as-luc vector was obtained by cloning the luciferase gene in frame into the second exon of APH-4 at position 7037 (sense transcript) of pHTLV-4D6560 (construct containing the last 2183bp of the HTLV-4 genome in the pUC18 vector) by amplifying the luciferase gene with reverse primer 5'-**ATAGTATACAGAGGAGATGCCTGGTA-3'** and forward primer 5'-**ATATTAATTAATGGTGTGAGACCTTCTTTG-3'**. The pHTLV-1 luc vector contains the HTLV-1 LTR 3' region cloned into the XhoI/HindIII sites of the pGL2-Basic vector (Promega) (Geleziunas et al. 1998). The Tax1-expressing vector has been previously described (Matsumoto et al. 1997). The pCMV-Tax3 vector contains the Tax3-coding region under the control of the CMV promoter region in the pcDNA3.1Zeo (+). The pMycAPH-3 and pMycAPH-4 expression vectors were generated by PCR amplifying the coding regions of APH-3 and APH-4 using primers that contain the sequence of a Myc tag at its 5' end. Briefly, APH-3 was amplified using the reverse primer 5'-**ATGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGATGGCTCGATCCCGAAGCGG-3'** (Myc tag in bold) and forward primer 5'-**ATATCTAGATTATAACAGATCTGCTACCTCCTGTAG-3'** (XbaI restriction site in bold). APH-4 was amplified using reverse primer 5'-**ATGGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGATGGACACTCGAGAATTTTTAGGGG-3'** (Myc tag in bold) and forward primer 5'-**ATATCTAGATTATAATAACTCCGCCAATACACCCAAC-3'** (XbaI restriction site in bold). Amplified products were digested by XbaI and ligated into pcDNA3.1Zeo (+) digested with XbaI/EcoRV. pAPH-3-GFP and pAPH-4-GFP were generated by amplifying APH-3 using the forward primer 5'-**ATAGAATTCATGGCTCGATCCCGAAGCGG-3'** (EcoRI restriction site in bold) and the reverse primer 5'-**ATAACCGGTGCTAACAGATCTGCTACCTCCTGTAG-3'** (AgeI restriction site in bold), and APH-4 using the forward primer 5'-

ATAGAATTCATGGACTCGAGAATTTTTAGGGG-3' (EcoRI restriction site in bold) and the reverse primer 5'-ATA**ACCGGT**GCTAATAACTCCGCCAATACACCCAACA-3' (AgeI restriction site in bold). Amplified products were ligated into EcoRI/AgeI-digested pGFP-N1. To minimize synthesis of free GFP, the methionine initiation codon from the GFP reporter gene was mutated to a leucine (TTG) using the PhusionTM Site-Directed Mutagenesis Kit for both APH-3-GFP and APH-4-GFP constructs. The forward and reverse primers for APH-3-GFP were 5'-GCAGATCTGTTATTGGTGAGCAAGG-3' and 5'-TACCTCCTGTAGCAGGAGGCTAT-3'. As for APH-4-GFP, the forward and reverse primers were 5'-CGGAGTTATTATTGGTGAGCAAGGG-3' and 5'-CCAATACACCCAACAGGTCCC-3'. The HBZ-mRFP construct was generated by amplifying the HBZ SP1 cDNA with the forward primer 5'-ATA**AGCTT**ATGGCGGCCTCAGG-3' (HindIII restriction site in bold) and the reverse primer 5'-ATGA**ATTCT**TGCAACCACATCGCCT-3' (EcoRI restriction site in bold). The amplified products were then digested and ligated into pcDNA3.1Zeo(+)-mRFP (kindly provided by Dr. Matthew Weitzman, The Salk Institute, La Jolla CA). The Nucleolin-DsRed expression vector has been previously described and expresses a chimeric form of nucleolin (Gomez Corredor and Archambault 2009). The pRcActin-LacZ vector contains the β-galactosidase gene under control of the β-actin promoter. An expression vector encoding the unspliced HBZ isoform tagged with the Myc epitope was obtained from Dr. Jean-Michel Mesnard (Thébault et al. 2004). The HBZ exon 1 sequence (unspliced HBZ) in this vector was modified for HBZ SP1 exon 1 by reverse PCR using the forward and reverse primers 5'-ATGGCGGCCTCAGGGCTGTTTCGATGCTTGCCCTG-3' and 5'-GGGGATCCACTAGTCCAGTGTG-3'. The resulting vector was termed pHBZ-SP1-Myc. From this plasmid, pAPH-3Myc and pAPH-4Myc expression vectors were generated by excising the HBZ cDNA with EcoRI and HindIII restriction enzymes and cloning APH-3 and APH-4 cDNAs amplified with EcoRI- and HindIII-containing primers.

2.3.3. RT-PCR

Total RNA was extracted with the TRIzol reagent (Invitrogen) from 293T cells and Jurkat at 48 h post-transfection. PolyA⁺ RNA was purified from total RNA using Oligotex

mRNA Mini Kit (QIAGEN, Mississauga, Canada) according to manufacturer's instructions. RT-PCR analyses were conducted using an oligo(dT) primer (Invitrogen). Briefly, total RNA (5 mg) was mixed with 1 ml of 10 mM of the oligo(dT) primer. The RNA:RT primer mix was heated at 70°C and incubated 2 h at 42°C in the presence of 1X AMV reaction buffer, 1 mM dNTPs, 10 U of SUPERase-In RNase inhibitor (Ambion) and 15 U AMV reverse transcriptase (USB). Synthesized cDNAs from 293T cells were PCR amplified with reverse primer LTR-HTLV-3as1 (5'-CAAGCCTCGCTGCTGACAGC-3') and forward primer env-HTLV-3-s8 (5'-GACGCCCTGGCCCCAACAG-3') to amplify the antisense transcript of HTLV-3 and reverse primer LTR-HTLV4as2 (5'-CGGCGGCGTCTCAACTGATTG-3') and forward primer env-HTLV4s1 (5'-ACGAGTCCCCCATATGTCCAAA-3') to amplify the antisense transcript of HTLV-4. PCR conditions were as followed: a first step of denaturation at 94°C for 5 min followed by 35 cycles of denaturation (94°C for 1 min), annealing (60°C for 1 min), extension (72°C for 1 min) and a final extension at 72°C for 5 min. The synthesized cDNAs from transfected Jurkats cells were PCR amplified in the same conditions as for transfected 293T cells with reverse primer LTR-HTLV-3as1 (see above) and forward primer env-HTLV-3-s3 (5' -CAGCATCGCAGTCAGCCCTA-3') for detection of the antisense transcript of HTLV-3 and reverse primer LTR-HTLV4as2 (see above) and forward primer env-HTLV-4as5 (5' -GGTCCATGCACTTCCGTTGTTGATGACG-3') for detection of the antisense transcript of HTLV-4.

2.3.4. 5'and 3' RACE analyses

Total RNA was isolated from 293T cells at 48 h post-transfection. Initiation sites of APH-3 and APH-4 transcripts were then determined using the FirstChoice RLM-RACE kit (Ambion) according to manufacturer's instructions. cDNAs were synthesized in the presence of the supplied 5'RACE adapter. PCR amplification was performed using 5'RACE outer and inner primers, and different primers derived from the ORF sequences: H3race-em-1 (5'-GCCATTCCCCTGAAGCATGTC-3') and H3race-em-2 (5'-GCTCCTCTGCAGTCAACACCG-3') for the HTLV-3 antisense transcript, and 5RACEH4-1

(5'-GTCTGTTCCAAGCCAGCTGATAACCGAAAT-3') and 5RACEH4-2 (5'-CTCCTAAGTTATGGTTACATTCCTCCTCCAG3') for the HTLV-4 antisense transcript. Amplified products were then cloned in the pDrive vector and sequenced. To identify the polyA signal, cDNAs were synthesised from polyA+ RNA isolated from transfected 293T cells in the presence of the supplied 3'RACE adapter. PCR amplification was performed using 3'RACE outer and inner primers and a primer derived from the sequence downstream of the ORFs: 23-2 (5'-GGAGAGGAACCACACTGGATCAT-3') for the HTLV-3 antisense transcript and 23-5 (5'-GAGTCAGGACATGCTCTAGGTCT-3') for the HTLV-4 antisense transcript. Amplified products were cloned into SmaI-digested pBlueScript KS and sequenced. All PCR conditions were performed according to manufacturer's instructions.

2.3.5. Transfection and promoter studies

293T cells (4×10^5) were transfected with 10 mg luciferase-expressing DNA constructs using the calcium phosphate protocol as previously described (Fortin et al. 1997) or using the LipofectamineTM Reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Jurkat cells were transfected by electroporation with 15 mg luciferase-expressing DNA constructs using the Gene Pulser Xcell system (BioRad, Hercules, CA) (960 mF, 250 V). Transfected 293T cells were lysed 48h post-transfection and luciferase activity was determined with an MLX microplate luminometer (Dynex Technologies) as previously described (Barbeau et al. 2001). Each sample was co-transfected with pRcActin-LacZ for normalization of transfection efficiency. b-galactosidase activities were measured using the Galacto-LightTM kit (Applied Biosystems, Bedford, MS) according to the manufacturer's protocol. Luciferase activity is presented as normalized Relative Light Units (RLU/b-gal) and represent the calculated mean \pm SD of three transfected samples. For Jurkat transfection, cells were resuspended at 2.5×10^7 /ml of complete medium, transfected in bulk and separated at 16 h post-transfection into various treatment groups at a density of 1×10^5 cells/well (100ml) in 96-well plates. Cells were left untreated or treated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) at 20 ng/ml (Sigma-Aldrich, Oakville, Canada), phytohemagglutinin (PHA-P) at 3 mg/ml (Sigma-Aldrich), ionomycin

(Sigma-Aldrich) at 1 mM, bpV [pic] (Alexis Corporation, Lausen, Switzerland) at 15 mM, forskolin (Sigma-Aldrich) at 10 mM and TNFa (Sigma-Aldrich) at 20 ng/ml. Luciferase activity was monitored at 8 h post-stimulation.

2.3.6. Confocal microscopy

COS-7 cells were seeded in 6-well plates containing a 1.5 mm thick coverslip for 24 h and then transfected using the LipofectamineTM Reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Jurkat cells were microporated with the MP-100 device (Digital Bio, Montreal, Qc) with 1.5×10^5 cells and 1 mg of expression vectors at 1350V, 1 pulse, 30ms. For Jurkat cells, 1 h before fixing cells, Jurkat cells were seeded on a coverslip treated with poly-Lysine. At 36 h post-transfection, cells were washed with PBS, fixed with 4 % paraformaldehyde for 15 min and permeabilized with 0.1 % Triton X-100 for 5 min at room temperature. Cells were then washed three times with PBS and incubated with the anti-Myc 9E10 antibody (dilution 1:400) for 1 h at room temperature. Samples were washed three times with PBS and incubated with goat anti-mouse IgG coupled to Alexa fluor 488 for 45 min at room temperature and washed again with PBS. Cells were incubated in a 2.5 mg/ml propidium iodide (PI) solution. Coverslips were then mounted in a drop of ProLong Antifade (Invitrogen). For live cell imaging, cells were cultured on a Lab-Tek Chambered Coverglass (Thermo Fisher Scientific, Rochester USA) for 24 h and then transfected using the LipofectamineTM Reagent (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Cells were observed 36 h and 48 h post-transfection with a MRC1024 confocal laser-scanning microscope (BioRad, Hercules, USA).

2.3.7. Western blot (WB) analysis

Total extracts were prepared as previously described (Vargas et al. 2009). Cytoplasmic and nuclear extracts from transfected COS-7 and 293T cells were prepared using NE-PER[®] Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Fisher Scientific) according to manufacturer's instructions. Equal quantities of extracts were run on an 10%-SDS PAGE gel

and transferred to PVDF membranes (Millipore, Mississauga, Canada). The blot was next blocked in PBS/5% milk and incubated with either anti-Myc 9E10 (1:1000), anti-HTLV-1 Tax (1:100) or anti-GAPDH (1:1000) antibodies. After several washes, signals were revealed by adding horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-mouse IgG antibodies (dilution 1:10000) followed by incubation with the BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) (Roche Diagnostic, Indianapolis, USA). Membranes were exposed on Amersham hyperfilms ECL (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK). To detect Tax, the SignalBoost™ Immunoreaction Enhancer kit was used to amplify the signal (EMD Bioscience, San Diego USA).

2.4. Results

2.4.1. Detection of spliced antisense transcripts from HTLV-3 and HTLV-4

Previous studies have predicted the presence of an ORF in the antisense strand of HTLV-3 and HTLV-4 (Calattini et al. 2006; Chevalier et al. 2008; Switzer et al. 2006b; Switzer et al. 2009). Since antisense proteins have been shown to exist in HTLV-1 and HTLV-2, we asked whether the newly discovered HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses express similar antisense proteins. Initial *in silico* analysis of HTLV-3 (strains 2026NB and Lobak) and HTLV-4 proviral DNAs revealed the existence of ORFs in the antisense strand between the *tax* and *env* genes (Figure 2.1A and 1B) (Switzer et al.2006b; Switzer et al.2009). Both HTLV-3 strains presented an homology of 93 % at the amino acid level for this ORF. We also identified the presence of a shorter antisense ORF in the proviral DNA of the Pyl 43 HTLV-3 strain, which contains a 366 nucleotide deletion in the pX region, leading to removal of more than 50% of the predicted carboxyl end of the antisense ORF (Calattini et al. 2006). These ORFs were termed APH (Antisense Protein of HTLV)-3 and APH-4. The encoded proteins are predicted to be 221 and 158 amino acids in length for HTLV-3 and HTLV-4, respectively.

To demonstrate the existence of antisense transcripts in these retroviruses, we first performed RT-PCR analyses. The proviral DNA constructs were first deleted of their 5'LTR

regions to minimize interference from sense transcription (Figure 2.1). The resulting pHTLV-3 DEcoRV and pHTLV-4 DSacI constructs were transfected into 293T and Jurkat cells, and RNA extracted from these cells was analysed by RT-PCR using forward and reverse primers derived from the 3'LTR and APH-3/APH-4 regions, respectively (Figure 2.2). The choice and position of primers were based on the previously described splicing pattern of the antisense HBZ transcript of HTLV-1 (Murata et al. 2006; Cavanagh et al. 2006; Satou et al. 2006). The results of RT-PCR analyses revealed the presence of antisense transcripts, which were successfully amplified using different sets of primers (Figure 2.2A, B and D and data not shown). In addition, the size of these transcripts supported the occurrence of splicing. The HTLV-3 antisense transcript splice donor (SD) and splice acceptor (SA) were positioned at nt 8556 and 7218, respectively, while the corresponding HTLV-4 antisense transcript SD and SA sites were at nt 8422 and 7089. The position of the splice sites and length of the intronic regions were well conserved between HTLV-3 and HTLV-4. Similar to the HTLV-1 HBZ transcript, the splicing of *APH-3* and *APH-4* transcripts led to the addition of an N-terminal amino acid sequence containing a methionine initiation codon derived from exon 1 (in the 3' LTR) to the corresponding ORF sequence (Figure 2.2C). For APH-3, nine amino acids were added from exon 1 while for APH-4, four amino acids were added from exon 1. Interestingly, if the unspliced mRNA could encode for a different APH isoform in both HTLV-3 and HTLV-4, the resulting APH isoform would initiate downstream of the splice acceptor site, leading to a shorter isoform than the protein encoded by the spliced transcripts unlike HBZ. Thus, these results demonstrate that both viruses are capable of producing a spliced antisense transcript with the potential to encode a protein. Unspliced transcripts were not analysed in these experiments.

2.4.2. *APH-3* and *APH-4* transcripts have multiple initiation sites and are polyadenylated

To more precisely characterize APH-3 and APH-4 transcripts, we performed 5'RACE analyses (Figure 2.3). Total RNA was isolated from 293T cells transfected with proviral DNA-deleted versions (for HTLV-3, nt. 4731 to 8918; for HTLV-4, nt. 4873 to 8742), that

contained the 3' LTR and presumed antisense ORF. Based on our 5' RACE analyses, four different initiation sites were detected for the APH-3 transcripts (Figure 2.3A), while as many as seven initiation sites located at the end of the 3' LTR were detected for *APH-4* transcripts (Figure 2.3B).

We next wanted to characterize the 3' end of both antisense transcripts (Figure 2.3C and D). Again, proviral DNA-deleted versions of HTLV-3 and HTLV-4 were transfected into 293T cells and polyA⁺ RNA was used to identify the 3' end of the transcripts by 3' RACE analysis. As depicted in Figure 3C and D, both transcripts were cleaved and polyadenylated at a single site between a consensus polyA signal and a GU-rich sequence, which is often found in proximity to the polyA tail addition site. Interestingly, although the sequence of the dinucleotide targeted for cleavage was different for both retroviruses (AG for HTLV-3 and CC for HTLV-4), they occurred at an equal distance (19 nt) from the polyA signal. Based on the overall position of transcription initiation sites and polyA addition sites, the size of the APH-3 and APH-4 transcripts were determined to be 2.5 kb and 2.4 kb, respectively.

2.4.3. Cellular localization of APH-3 and APH-4

Comparison of the predicted APH-3 and APH-4 sequences to the published HBZ and APH-2 sequences (Figure 2.4) revealed that APH-3 and APH-4 do not contain a classical basic leucine zipper (bZIP) motif. Basic-rich (BR) regions were, however, found at positions similar to that of the HBZ BR region (Hivin et al. 2005) and could function as nuclear localization signals (NLSs). In addition, LXXLL and LXXLL-like motifs, known to be responsible for the interaction of HBZ with CBP/p300 (Clerc et al. 2008), were identified in the predicted APH-2, APH-3 and APH-4 AA sequences. These motifs were however positioned in different regions than for equivalent motifs in HBZ. Following amino acid comparison between all four antisense proteins, we found that APH-3 and APH-4 presented 35.8% and 33.6% homology with HBZ respectively, showing an important level of differences between these proteins. Interestingly, APH-3 and APH-4 appeared to be more closely related to APH-2, respectively showing 50.6% and 71% homology.

We next determined the subcellular localization of APH-3 and APH-4 using expression vectors for both proteins tagged with a Myc epitope at their amino ends. COS-7 and Jurkat cells were transfected with APH-3 and APH-4 expression vectors and analyzed by confocal microscopy. In these analyses, although APH-3 mainly localized in the nucleus, detectable cytoplasmic staining was also observed (Figure 2.5A and 5B). Similar staining was also noted in transfected 293T cells (data not shown). Of note, a cytoplasmic aggregate was usually present in cells transfected with the expression vector of APH-3, which likely results from overexpression. In COS-7 cells transfected with the Myc-tagged APH-4 expression vector, APH-4 was in the nucleus, similar to HBZ. Confocal microscopy was also used to examine cells transfected with c-terminal tagged APH expression vectors and showed similar results (data not shown) indicating that the added tag and its position likely did not contribute to the subcellular distribution of APH-3 and APH-4.

To further analyze the subcellular localization of APH-3 and APH-4, live cell imaging experiments were conducted in COS-7 cells transiently transfected with either APH-3-GFP or APH-4-GFP expression vectors. As illustrated in Figure 5C, the APH-3-GFP fusion protein was observed in the nucleus and, to a lesser extent, in the cytoplasm at 48 h post-transfection. In contrast, the APH-4-GFP fusion protein exclusively localized to the nucleus. The GFP protein itself when expressed in COS-7 cells demonstrated a more diffuse signal different from the distribution of our fusion proteins. Hence, the subcellular localization of these fusion proteins was similar to the Myc tag constructs. Transfection experiments in 293T cells demonstrated similar results (data not shown). To determine whether APH-3 and APH-4 had a nucleolar localization (Figure 2.5D), we co-transfected APH-3-GFP or APH-4-GFP expression vectors with a Nucleolin-DsRed expression vector in COS-7 cells. As shown in this figure, APH-3 and APH-4 indeed showed partial nucleolar localization at 48 h post-transfection.

To further confirm their subcellular distribution, WB analyses were performed on nuclear and cytoplasmic extracts prepared from 293T and COS-7 cells transfected with Myc-tagged HBZ, APH-3 or APH-4 expression vectors (Figure 2.5E and 2.5F). APH-3 migrated at the expected size (28 kDa) while APH-4 migrated at a lower molecular weight, i.e 18 kDa,

than the predicted size of 22 kDa. In previous reports (Arnold et al. 2006; Cavanagh et al. 2006), HBZ have also been shown to migrate differently from its predicted size of 27 kDa. As expected, both APH-4 and HBZ were mainly present in nuclear extracts, with a minor signal in cytoplasmic extracts. On the other hand, APH-3 was present in both extracts, although it was present at higher levels in the nucleus. Interestingly, a higher molecular weight signal was apparent mostly in 293T cells. Together, these results suggest that HBZ, APH-3 and APH-4 all localize primarily to the nucleus. The localization of APH-4 was very similar to that of HBZ. The localization of APH-3, while primarily localized in the nucleus, showed a signal in the cytoplasm.

2.4.4. Partial co-localization between HBZ and APH-3 and APH-4

As APH-3 and APH-4 present similarities with HBZ, cellular co-localization of these proteins was assessed. COS-7 cells were transiently co-transfected with APH-3-GFP or APH-4-GFP expression vectors along with an HBZ SP1-mRFP expression vector and analyzed 48 h post-transfection (Figure 2.6B and 2.6C). The majority of the punctuated structures specific to APH-3 and APH-4 fusion proteins co-localized with HBZ SP1-mRFP in the nucleus, although certain speckled structures did not. As expected, the cytoplasmic signals observed in APH-3-GFP-expressing cells did not co-localize with HBZ (Figure 2.6B). As a control, free GFP and free mRFP expressed in COS-7 cells appeared as homogenous signals different from those seen with the antisense GFP fusion proteins (Figure 2.6A).

2.4.5. Promoter studies on both HTLV-3 and HTLV-4 antisense transcripts

To characterize *APH-3* and *APH-4* gene expression, promoter activity was analysed in Jurkat cells using constructs in which a luciferase reporter gene along with a polyA signal was inserted in frame with the amino acid sequence present in exon 2 of both APH-3 and APH-4 (Figure 2.7A). Jurkat cells were subsequently transfected and then either left untreated or stimulated with a series of known T-cell activators. Interestingly, in unstimulated conditions, luciferase activity was lower for the HTLV-3 LTR construct (9.22 ± 0.92 RLU) when

compared to the HTLV-4 LTR (232.69 ± 30.24 RLU). Both reporters responded similarly to the stimulators and tended to be most responsive to the addition of the PTP inhibitor, bpV[pic], a strong T-cell activating agent (Figure 2.7B).

2.4.6. Tax-driven HTLV LTR activation is inhibited by APH-3 and APH-4 expression and is dose-dependent

Former studies demonstrated that HBZ inhibits Tax-mediated activation of HTLV-1 LTR-driven sense expression (Gaudray et al. 2002; Cavanagh et al. 2006). In addition, this inhibition is mediated at least partially by direct interaction with CREB-2 through its leucine zipper domain. As APH-3 and APH-4 do not contain a typical leucine zipper domain, we asked whether they would affect Tax-mediated HTLV-1 LTR activation (Figure 2.8A). HBZ, APH-3 or APH-4 expression vectors were transfected in 293T cells along with pHTLV-1 Luc and a Tax1 expression vector. Results indicated that both APH-3 and APH-4 could block HTLV-1 LTR transactivation by Tax1 as potently as HBZ. The analysis further demonstrated that higher levels of the APH-3 or APH-4 expression vectors led to more pronounced inhibition of Tax1-mediated HTLV-1 LTR transactivation. To verify that repression of the HTLV-1 LTR was not due to reduced Tax1 expression mediated by inhibition of the CMV promoter in the Tax expression vector or variability in the expression of the antisense proteins, 293T cell lysates from transfected cells were examined by western blot. Variations in Tax1 levels were observed between samples but could not account for the significant effect of APH-3 and APH-4 on Tax-mediated LTR activation. The intensity of the GAPDH signal was also comparable.

We next wanted to determine whether the three antisense proteins could inhibit the Tax protein from another HTLV virus and also on its own promoter. Hence, expression vectors for APH-3, APH-4 and HBZ were transfected into 293T cells along with expression vector for Tax3 and pHTLV-1 Luc or pHTLV-3 Luc (Figure 2.8B and 2.8C). Our data demonstrated that HBZ, APH-3 and APH-4 blocked Tax3 activation of both HTLV-1 and HTLV-3 LTRs.

These results therefore indicated that, although APH-3 and APH-4 lack a prototypical bZIP domain, both proteins can suppress the activation of the HTLV-1 LTR and HTLV-3 LTR mediated by either Tax1 or Tax3 and could therefore play a similar role in HTLV-3 and HTLV-4 replication.

2.5. Discussion

HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses have been recently identified in primate hunters from Cameroon, who showed no signs of illness though thorough medical exams were not performed (Calattini et al. 2005; Wolfe et al. 2005). Studies of the viral genomes demonstrated that a number of retroviral genes in these novel HTLVs are shared with the distantly related HTLV-1 and HTLV-2 viruses (Wolfe et al. 2005; Calattini et al. 2006; Chevalier et al. 2006). Since evidence indicated that the newly discovered antisense-encoded HBZ gene is important in both HTLV-1 replication and ATLL development (Mesnard et al. 2006; Barbeau and Mesnard 2007; Matsuoka and Jeang 2007), the goal of this study was to determine whether similar antisense transcripts existed in these new viruses, and to assess the possible functional relevance of their encoded proteins.

RT-PCR analyses and RACE experiments conclusively indicated that the antisense transcripts of HTLV-3 and HTLV-4 are spliced and polyadenylated. The splicing pattern was similar to that of HBZ with a similar intronic size. Although more analyses are needed, current results argue for a low abundance of unspliced transcripts and therefore suggest that no other isoform could be produced from the antisense transcript. In addition, unlike HBZ, translation of APH-3 and APH-4 from such unspliced transcripts would result in the deletion of 15 and 24 amino acids from the NH₂ end, respectively when compared to their own isoforms derived from spliced mRNAs. Consensus polyA signal and GU-rich sequences were also identified in proximity to the polyA addition site for both HTLV-3 and HTLV-4 transcripts reminiscent of the HBZ transcript. In fact, the position of the polyA addition site

for *APH-3* and *APH-4* RNA is equivalent to the *HBZ* gene and likely reveals specific constraints associated with antisense transcription.

Analysis of the amino acid composition of both *APH-3* and *APH-4* and their comparison to *HBZ* demonstrated significant differences. First, analysis of *APH-3* and *APH-4* amino acid sequences did not predict a typical bZIP domain, a marked difference with *HBZ*. However, this region is conserved in predicted antisense ORF from *STLV-3* strains and in two of three *HTLV-3* strains, suggesting a possible role (Switzer et al. 2006b). In addition, basic regions were identified and LXXLL and LXXLL-like motifs (known to be responsible for binding p300/CBP) were also observed but their positions were different than for *HBZ*. Confocal and WB experiments further indicated that *APH-3* and *APH-4* are both nuclear (at least partly for *APH-3*). The NLS sequence, which mediates nuclear targeting, remains to be identified for *APH-3* and *APH-4* but might involve regions similar to those responsible for nuclear localisation of *HBZ*. Furthermore, like *HBZ*, both *APH-3* and *APH-4* co-localized with the nucleolus. Another interesting observation was the cytoplasmic localization of *APH-3* observed in 293T, COS-7 and Jurkat cells. This observation might indicate the existence of a nuclear export signal in *APH-3* or an imperfect NLS. Of note, a higher molecular weight signal was observed in our WB analysis in *APH-3*-expressing cells. This raises the possibility that nuclear localization for *APH-3* (and possibly for *HBZ* and *APH-4*) could be modulated by post-translational modifications, such as phosphorylation or sumoylation. Interestingly, sumoylation has been shown to affect the subcellular localization of the *HTLV-1* Tax (Lamsoul et al. 2005). Further experiments will be required to determine if this is the case for other *HTLV*-derived antisense proteins.

Studies of *APH-3* and *APH-4* promoters using a luciferase reporter gene showed that their activity was stimulated by known T-cell activators, albeit weakly. Similar results have been obtained with the *HBZ* promoter (Cavanagh et al. 2006). It might be expected that, as for *HBZ* expression, Tax expression would induce their expression *via* equivalent TRE sequences within the U3 region of the LTR (Landry et al. 2009; Yoshida et al. 2008). Current experiments are addressing this possibility.

The HTLV-1 LTR has been previously shown to be activated by Tax3 (Calattini et al. 2006). Our analyses revealed that both APH-3 and APH-4 proteins could inhibit Tax1- and Tax3-mediated HTLV-1 LTR and HTLV-3 LTR activation. These results highlight the possibility, as we have previously demonstrated, that the leucine zipper domain is not the only amino acid segment responsible for Tax inhibition by HBZ (Clerc et al. 2008). Hence, the mechanism of Tax inhibition for other HTLVs is likely different from HBZ and might be influenced by differences in the subcellular distribution of different antisense proteins. Alternatively, although the corresponding leucine zipper domains of APH-3 and APH-4 do not share a typical consensus sequence, they are predicted to form a leucine zipper-like coiled-coil domain that could mediate interactions with cellular proteins and be required for APH-3 and APH-4 Tax-inhibiting function. It should nonetheless be underscored that differences in the distribution of HBZ, APH-3 and APH-4 could affect their ability to modulate cellular gene expression and might alter their capacity to modify cellular proliferation and/or transformation.

Our data demonstrate that antisense transcription is a common mode of expression in HTLV viruses and likely STLV family members since sequence analysis similarly demonstrates potential APH coding regions (data not shown). Our former study confirmed that a spliced antisense transcript and encoded protein was produced from the HTLV-2 virus (Halin et al. 2009), a virus which has not been related to any haematological malignancies. Interestingly, the APH-2 protein produced from this transcript does not contain a consensus bZIP domain and does not co-localize to the nucleolus (Halin et al. 2009). Furthermore, APH-2 could block Tax2 activation of the HTLV-2 LTR. Similarities and differences between these retroviral antisense transcripts, and the subcellular localization and function of their encoded proteins, highlight the importance of the antisense-encoded HTLV genes in viral replication. Further studies are required to determine the exact mechanism of action of these proteins. Furthermore, a link between HBZ and ATLL development has been suggested (Matsuoka and Jeang 2007; Barbeau and Mesnard 2007; Mesnard et al. 2006). It is not currently known if HTLV-3 and HTLV-4 are associated with human diseases, and future studies will help to assess this possibility as well as the possible association of viral proteins (including APH-3 and APH-4) with the disease process. Finally, it will be exciting to

determine if other human and non-human retroviruses also produce antisense transcripts with a coding capacity.

2.6. Acknowledgments

This work was supported by a grant to B.B. from The Cancer Research Society (CRS) Inc. M.H. was supported by an institutional Hydro-Quebec scholarship and S.L. held a CIHR Ph.D. scholarship. B.B. holds a Canada Research Chair in human retrovirology (Tier 2). We are thankful to Dr. David Derse for providing us with both HTLV-3 (2026ND) and HTLV-4 (pUC-HT4v2) plasmid DNAs. We also thank Denis Flipo for excellent technical support with confocal microscopy experiments. Use of trade names is for identification only and does not imply endorsement by the U.S. Department of Health and Human Services, the Public Health Service, or the Centers for Disease Control and Prevention. The findings and conclusions in this report are those of the authors and do not necessarily represent the views of the Centers for Disease Control and Prevention. The authors declare no competing financial interests.

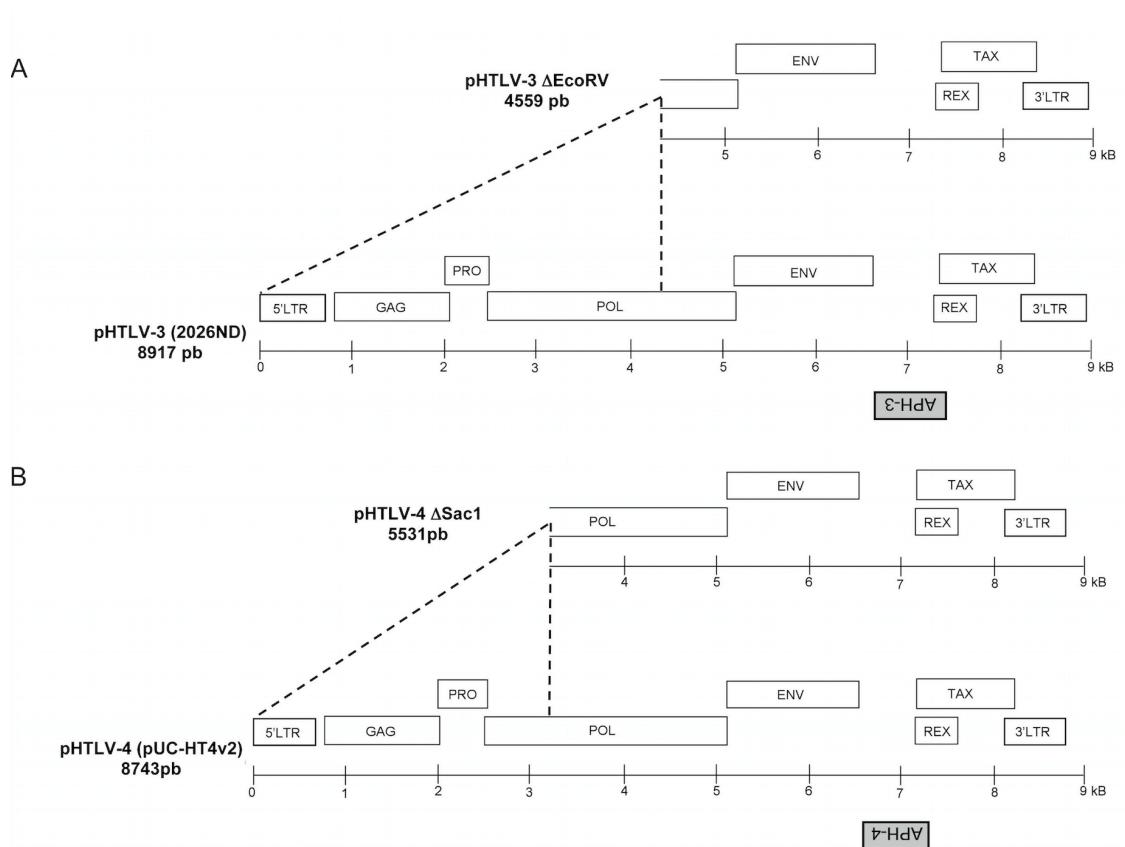


Figure 2.1. Position of antisense ORF in HTLV-3 and HTLV-4 genomes. The HTLV-3 2026ND (A) and HTLV-4 HT4v2 (B) molecular clones and known genes are depicted. The positions of the putative APH-3 and APH-4 ORFs from the antisense strand are indicated below each proviral DNA. Versions of these vectors with 5' deletions, termed pHTLV-3 Δ EcoRV and pHTLV-4 Δ SacI, are also presented. The size of the proviral DNA (full-length version or version with 5'-end deletion) is indicated for each rétrovirus

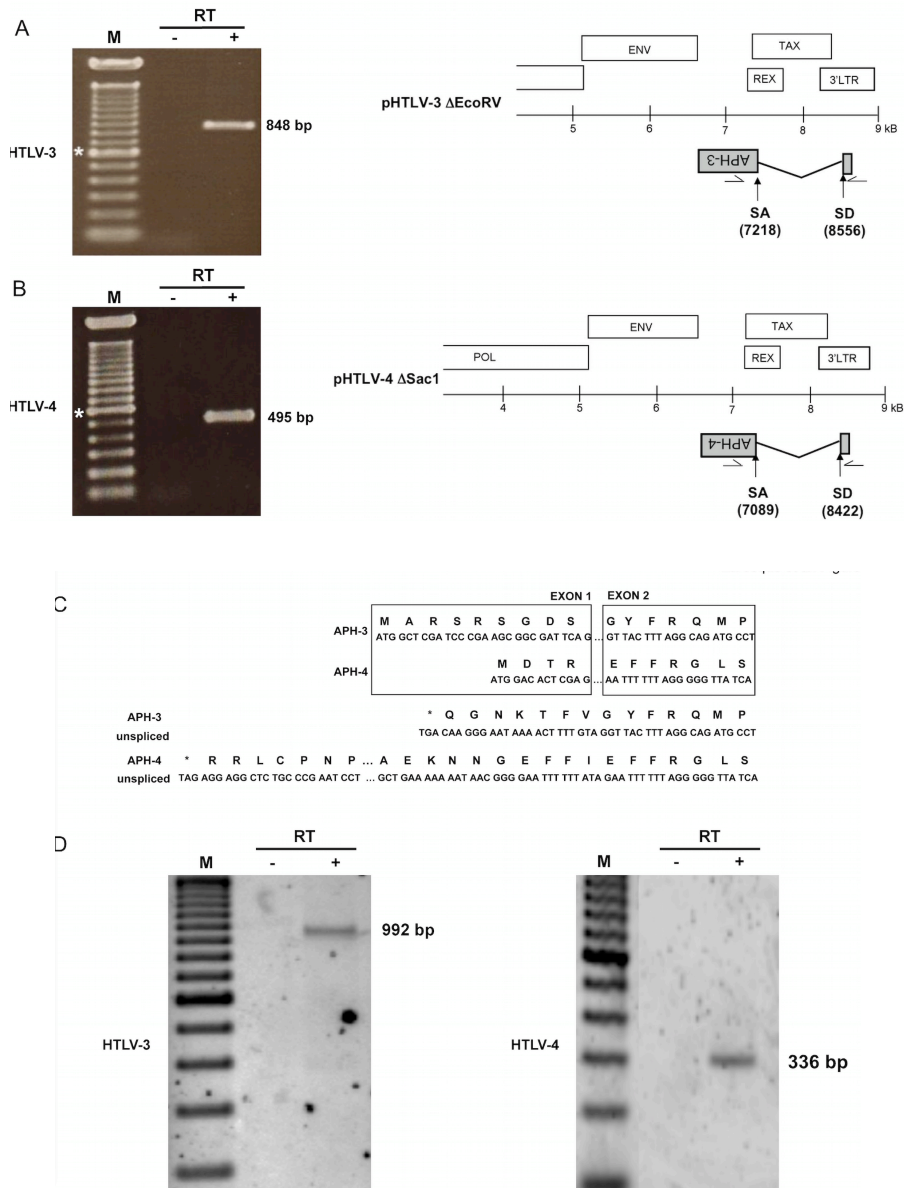


Figure 2.2. Detection of spliced HTLV-3 and HTLV-4 antisense transcripts. 293T cells were transfected with either pHTLV-3 Δ EcoRV (A) or pHTLV-4 Δ SacI (B). RNA was extracted and analyzed by RT-PCR for the presence of antisense transcripts using the primer combinations LTR-HTLV-3as1/env-HTLV-3s8 (A) or LTR-HTLV-4as2/env-HTLV-4s1 (B). Spliced transcripts for each proviral DNA are depicted, and the positions of the SD and SA sites are indicated below (nucleotidic positioning from sense strand). Lanes: -, negative control (no RT added in RT step before PCR); M, 100-bp marker (*, 600 bp); +, test lane. (C)

Amino acid sequence deduced from spliced *APH-3* and *APH-4* RNA next to the splice junction. The amino acid sequence is shown above each nucleotide sequence. The nucleotide and amino acid sequences predicted for unspliced transcripts are provided for comparison. Asterisks, in-frame stop codons. (D) Jurkat cells were transfected with pHTLV-3 Δ EcoRV or pHTLV-4 Δ SacI, and RNA was extracted and analyzed by RT-PCR as described above using the primer combination LTR-HTLV-3as1/env-HTLV-3s3 (left) or LTR-HTLV-4as2/env-HTLV-4as5 (right).

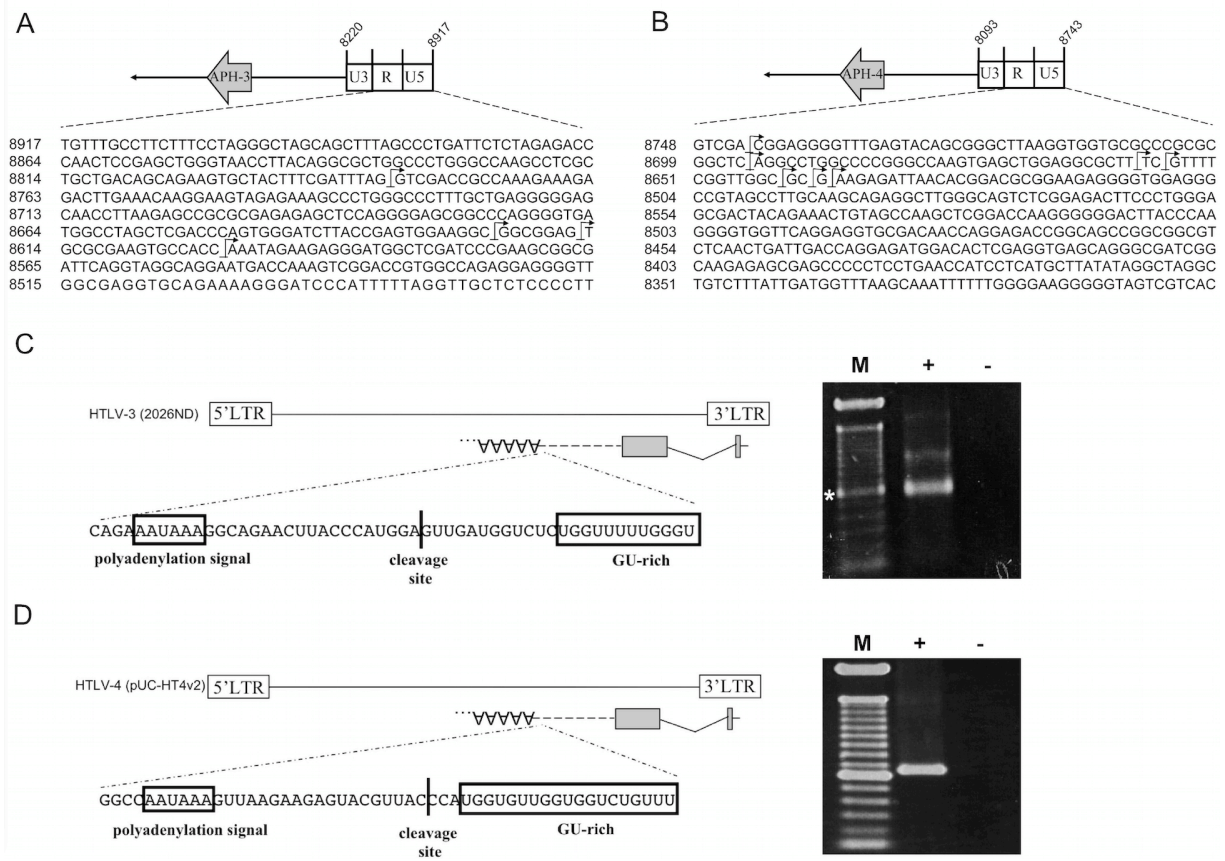


Figure 2.3. Identification of transcription initiation sites and poly(A) addition sites for *APH-3* and *APH-4* transcripts. Cultured 293T cells were transfected with versions of either pHTLV-3 (nt 4731 to 8918 containing the 3' LTR and the antisense ORF) (A and C) or pHTLV-4 (nt 4873 to 8742 containing the 3'LTR and the antisense ORF) (B and D) from which proviral DNA was deleted. RNA was extracted at 48 h posttransfection and analyzed by 5' or 3' RLM-RACE. (A and B) The antisense nucleotide sequence of the 3' LTR is depicted, and initiation sites are shown by arrows. (C and D) The positions of the *APH-3* and *APH-4* mRNAs (grey boxes) and of the 3' poly(A) tails are shown. In the sequence below, the position of the cleavage site and the sequences of the poly(A) signal and GU-rich elements are shown. Lanes: +, test lane; -, PCR amplification with no prior RT step; M, 100-bp marker (*, 600 bp).

```

      20                               40
HBZ  MA-A-SG---LFR-CLPV-SCPEDLLVE-EL-VDGLLS-LEEE---L---KDKE--E-- 39
APH-2 MD-PQ--D--YFRR-LP-LG---DQ---GE--A---S-L-TSG--V-----PP- 26
APH-3 MARSRSGDSGYFRQ-MPVLA-P-ETAIPGTVPV--VYSCISTSGGSLTSRSLGPPV 53
APH-4 MD-TR--E--FFRG-LS--S-E-DR---AK-KV-----S---T-----P-- 22

      60                               80                               100
HBZ  ---EEAVL---DGLLSLE-EESRG-R-LR-----RGP-P-GEKAP-PRGE-T-HRDR 77
APH-2 -PGE---P-----R--RT---A--K---G-R-PL--GSGSVS-E- 47
APH-3 LTAEEP-LTPVETLLNL-CERS-G-RD-QMDMLQGNGKRPRG-R-PL--GS-S-SKDL 100
APH-4 ---EE--M-P-----G-----S-GAR--R-----AR-K---G-R-PL--GSGGAN-D- 46

      120                               140                               160
HBZ  Q-R-RAEEKRKRK-KE-REKEE-E-KQ-IAEYLK--RKE---EEKARR-RR-RAEKK 120
APH-2 QVR-DS---R-RRL--LAE-EQREI-LKL---L---Q-ER---EE--RE-RR-RKER- 81
APH-3 GY-WKS---R---LDDLAQ-EQ-E--Q-L---LSYWR-ERKKKEE--RR-RRCR-EE- 137
APH-4 GTR-KS---RLRAL--V-D-EQAEI-QRL---L---R-EQ---EE--KEARR-R-ER- 80

      180                               200                               220
HBZ  AADVARRKQE-EQER-R-ERK-WR-QGAEKAKQHSARKE-KMQE-LGIDGYTRQL-EG 170
APH-2 ---L-R---EKDQKR-R-EREE-RHQ-----Q---L-EC-I-GLLGFDFGFC-DLLQG 116
APH-3 ---L-----E-ERKRQKKER--R-Q-----Q---L-DC-I-DMLGFEGFC-DLLEG 169
APH-4 ---L-Q---ERERKR-K-EREA-RHQ-----Q---R-KC-M-DLLGFEGYC-DLLQG 115

      240                               260                               280
HBZ  EVESLEAERRK--L-----LQE--K-----E-----DL-MGE--V---N 194
APH-2 YVDFLEGE-KKV-LWEE-CERGLEELFE---AI--IQFESGLDIG-GDSSGI-EGCG 163
APH-3 YIDFLERESQQ--L-RAGCEESLEEF-WYMDG-WG-Q--GVDI-EGDSSGLC--CT 215
APH-4 YIDVLEKE-RK-DL-EEECNHNHNLGELFR--LSA--GLE-QT-LDIW-GDSSGLAE-CG 162

      300
HBZ  YW-QGR-----L---E-A-MWLQ 206
APH-2 -WVNGRGTNHGDLL-QKLAGL-L- 183
APH-3 -WVSSRGESHSL-LLLQEVADL-L- 235
APH-4 -WVNGRGTNHGDLL-GVLAEL-L- 182

```

Figure 2.4. Predicted amino acid sequences of APH-3 and APH-4. The amino acid sequences of APH-3 and APH-4 were deduced from the resulting antisense transcripts produced by the 2026ND (HTLV-3) and HT4v2 (HTLV-4) strains, respectively. Both sequences were compared to the amino acid sequence of the HBZ-SP1 isoform and to the previously reported sequence of the HTLV-2-derived APH-2 antisense protein. The described BR2, BR1, and DNA-binding domain (DBD) are indicated above the HBZ sequence, while the LZ domain is displayed in a box. LXXLL and LXXLL-like motifs are underlined in both APH-3 and APH-4 amino acid sequences.

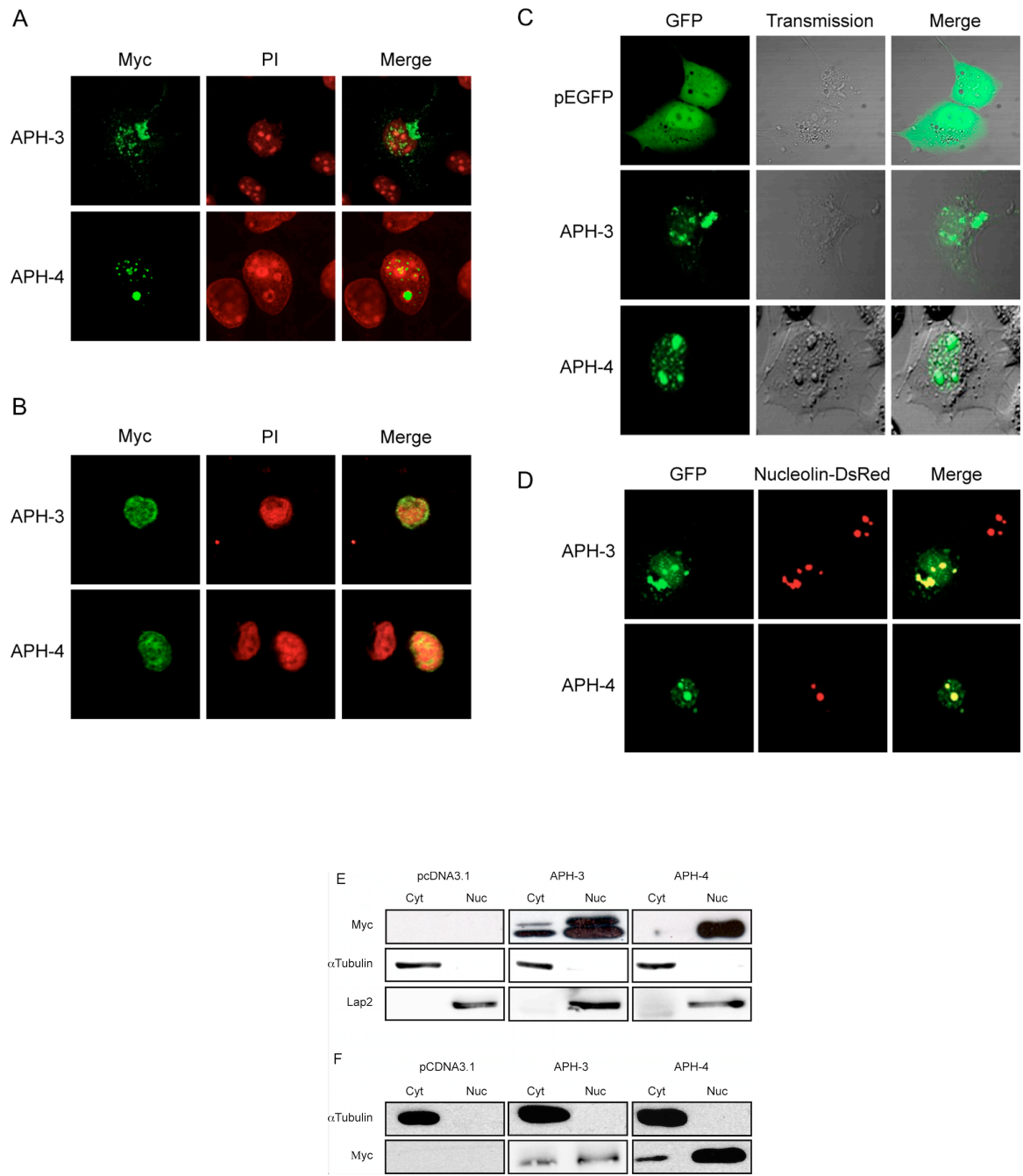


Figure 2.5. APH-3 and APH-4 demonstrate different cellular localizations. (A and B) pMycAPH-3 and pMycAPH-4 expression vectors were transfected into COS-7 (A) or Jurkat (B) cells. At 36 h posttransfection, cells were fixed and stained as described in Materials and Methods. Cells were mounted in ProLong antifade reagent in the presence of propidium

iodide. Images are representative of those for the entire population of transfected cells. Panels on the right show the merging of both Myc (green) and PI (red) signals. Samples were observed with a Bio-Rad laser scanning confocal microscope (MRC-1024ES) with a $\times 60$ objective under oil immersion and with a numerical aperture of 1.4. Images were acquired with the LaserSharp software. (C) The parental pGFP-N1, pAPH-3-GFP, and pAPH-4-GFP expression vectors were transfected into COS-7 cells. At 36 h posttransfection, cells were visualized by confocal microscopy. Panels on the left show the GFP signal, the middle panels show phase-contrast, and the panels on the right show merging of both the phase-contrast and GFP signals. (D) pAPH-3-GFP and pAPH-4-GFP expression vectors were cotransfected into COS-7 cells with pNucleolin-dsRed. At 48 h posttransfection, cells were observed by confocal microscopy. Panels on the left show the GFP signal, the middle panels show the Nucleolin-dsRed signal, and the panels on the right show merged GFP and Nucleolin-dsRed signals. Samples were maintained in supplemented DMEM during observation. For both panels C and D, a Bio-Rad laser scanning confocal microscope (MRC-1024ES) was used to visualize positive cells with a $\times 20$ objective under water immersion and with a numerical aperture of 0.75. (E) Cell lysates (50 μg) from 293T cells transfected with pHBZ-Myc, pMycAPH-3, or pMycAPH-4 were separated into cytoplasmic (Cyt) and nuclear (Nuc) fractions, subjected to electrophoresis on a 12% bis-Tris gel, and analyzed by Western blotting with anti-Myc, anti- α -tubulin, and anti-Lap-2 antibodies. Cells transfected with the pcDNA3.1/Myc parental vector served as a negative control (pcDNA3.1). (F) Cell lysates (50 μg) from COS-7 cells transfected with pHBZ-Myc, pMycAPH-3, or pMycAPH-4 were separated into cytoplasmic (Cyt) and nuclear (Nuc) fractions, subjected to electrophoresis on a 12% bis-Tris gel, and analyzed by Western blotting with anti-Myc and anti- α -tubulin antibodies.

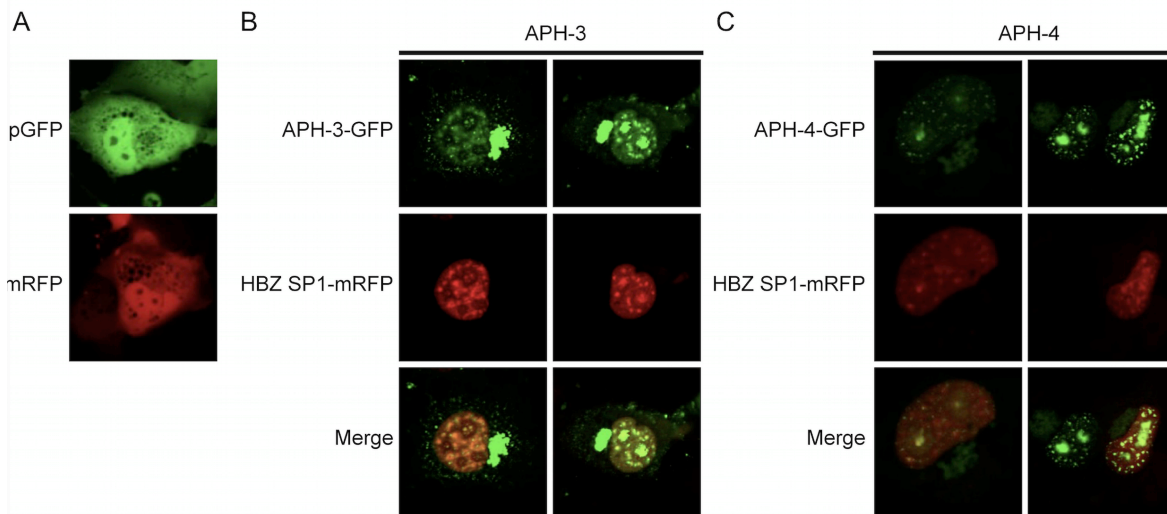


Figure 2.6. Partial colocalization of APH-3 and APH-4 with HBZ. (A) Parental vectors pGFP-N1 and pcDNA3.1Zeo(+)-mRFP were transfected into COS-7 cells and visualized by confocal microscopy. (B and C) pAPH-3–GFP (B) and pAPH-4–GFP (C) expression vectors were cotransfected with HBZ SP1-mRFP into COS-7 cells. At 48 h posttransfection, cells were observed by confocal microscopy. Panels on the top show the GFP signal, middle panels show the mRFP signal, and panels at the bottom show merging of both GFP and mRFP signals. Samples were maintained in supplemented DMEM during observation. A Bio-Rad laser scanning confocal microscope (MRC-1024ES) was used to visualize positive cells with a $\times 20$ objective under water immersion and with a numerical aperture of 0.75.

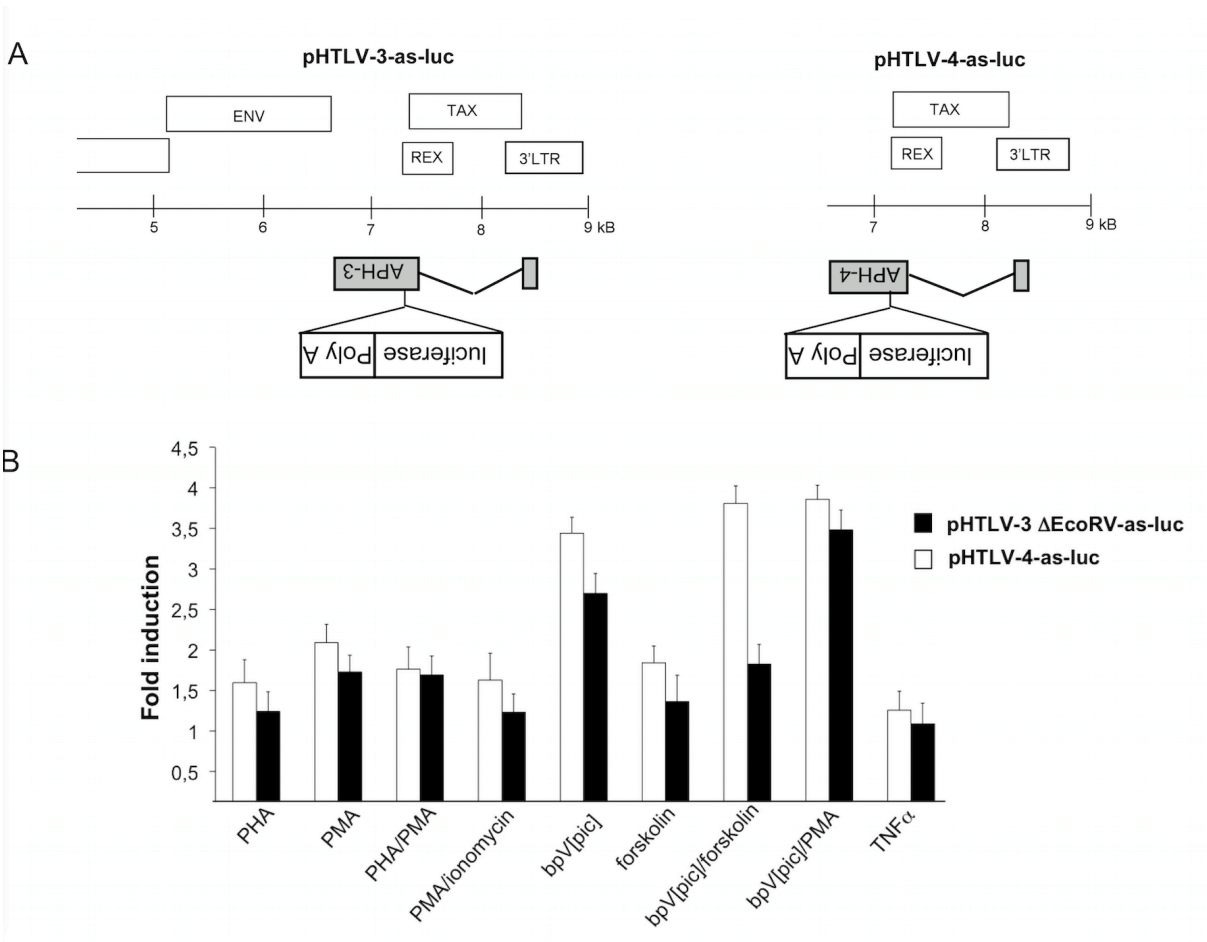


Figure 2.7. Antisense expression is upregulated in Jurkat T cells after activation. (A) The firefly luciferase reporter gene was inserted in frame with exon 2 of both APH-3 and APH-4 along with a poly(A) signal cassette at the 3' end to generate pHTLV-3-as-luc and pHTLV-4-as-luc. (B) Both luciferase-encoding constructs were transfected into Jurkat T cells and were then stimulated for 8 h with PHA, PMA, ionomycin, bpV[pic], forskolin, TNF- α , or different combinations of these agents. Luciferase activity was measured from cell lysates of three independently stimulated samples, and the average fold induction (\pm standard deviation) is presented, where unstimulated cells are assigned a value of 1. These results are representative of four independent experiments.

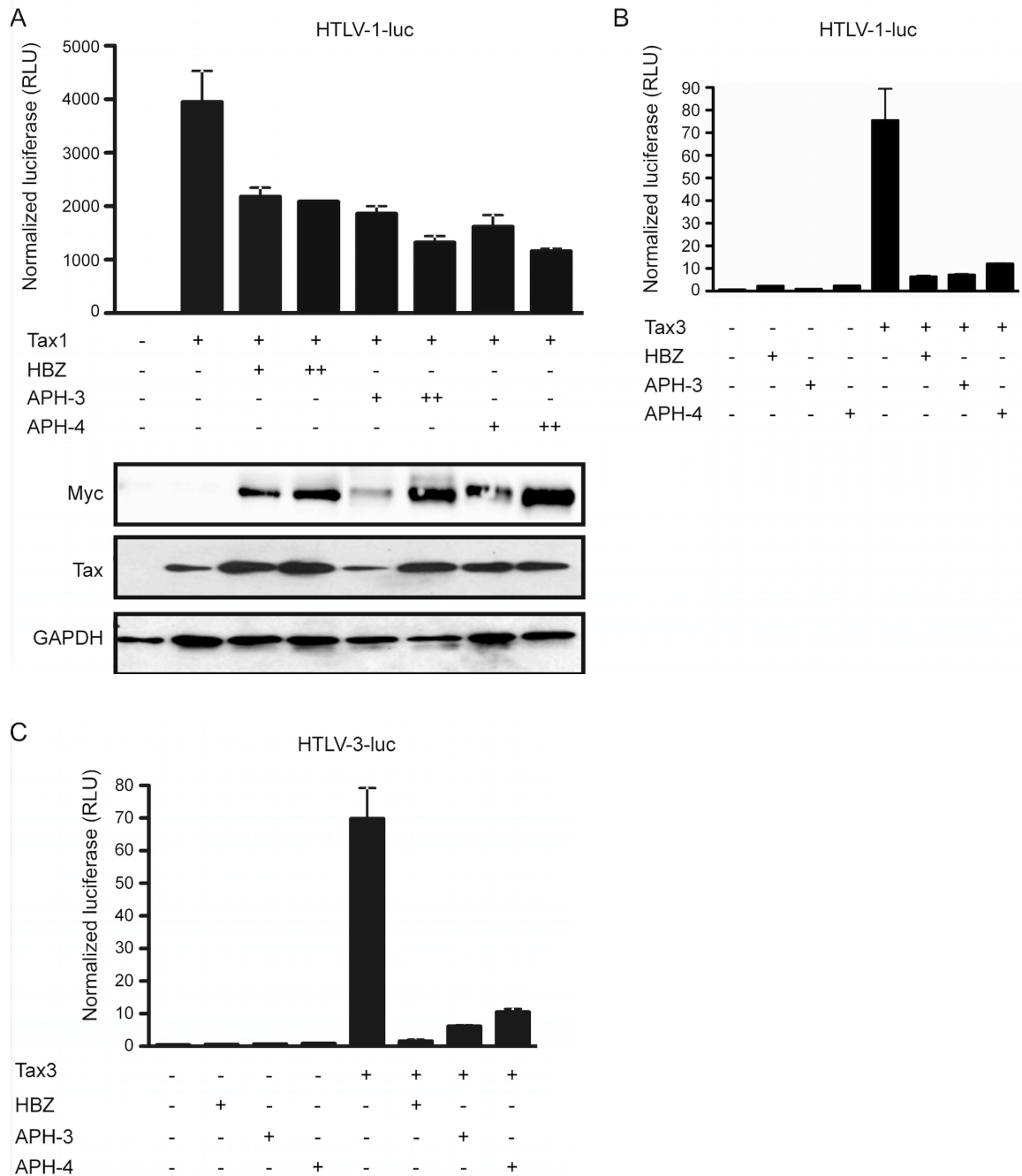


Figure 2.8. APH-3 and APH-4 repress Tax1- and Tax3-dependent transactivation of the HTLV-1 LTR. (A) 293T cells were transiently cotransfected with pHTLV-1 luc and pCMVTax1 together with 0.2 μ g or 0.4 μ g pHBZ-SP1-Myc, pMycAPH-3, pMycAPH-4, or the empty vector pcDNA3.1 and pRcActin-lacZ. Cells were lysed at 48 h posttransfection. These results represent those from three independent experiments. (Bottom set of panels) Cell

lysates (25 μ g) were prepared from these transfections and analyzed by Western blotting using mouse anti-Myc (upper), anti-Tax serum (middle), and mouse anti-GAPDH (bottom). (B) 293T cells were transiently transfected with pHTLV-1 luc and pCMVTax3 together with pHBZ-SP1-Myc, pMycAPH-3, pMycAPH-4, or the empty vector pcDNA3.1 and pRcActin-lacZ. (C) 293T cells were transiently cotransfected with pHTLV-3 luc and pCMVTax3 along with pHBZ-SP1-Myc, pMycAPH-3, pMycAPH-4, or the empty vector pcDNA3.1 and pRcActin-lacZ. The presented luciferase activities are averages of three independent transfection experiments and are depicted as the average normalized luciferase activity \pm standard deviation. These results represent those from three independent experiments.

Chapitre III

Human T-cell leukemia virus type 3 (HTLV-3) and HTLV-4 antisense-transcript-encoded proteins interact and transactivate Jun family-dependent transcription via their atypical bZIP motif.

**Émilie Larocque^{1,2,3}, Charlotte André-Arpin⁴, Malgorzata Borowiak⁵, Guy Lemay³,
William M. Switzer⁶, Madeleine Duc Dodon⁵, Jean-Michel Mesnard⁴ and Benoit
Barbeau^{1,2#}**

¹Département des Sciences Biologiques et ²Centre de recherche BioMed, Université du Québec à Montréal, 2080 Saint-Urbain, Montréal, Québec, Canada H2X 3X8, ³Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, case postale 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7, ⁴Université Montpellier 1, CNRS, UM5236, CPBS, F-34965 Montpellier, France, ⁵Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, Unité Mixte de Recherche 5239, Centre National de la Recherche Scientifique, Ecole Normale Supérieure, UMS3444 BioSciences Lyon-Gerland, 69364 Lyon Cedex 07, France, ⁶Laboratory Branch, Division of HIV/AIDS Prevention, National Center for HIV, STD, and TB Prevention, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA 30333.

Contributions :

Ce deuxième article a été rédigé par moi-même Émilie Larocque avec l'aide du Dr Barbeau. Les expériences ont été effectuées en majorité par moi-même. Certaines expériences précises ont été réalisées par Charlotte André-Arpin et Malgorzata Borowiak. J'ai réalisé les expériences de test de transactivation avec les différents promoteurs dans les 293T et certaines des expériences dans les CEM. J'ai généré tous les mutants de APH-3 et APH-4. J'ai aussi réalisé les expériences de co-immunoprécipitation, microscopie confocale et western blot. Dr Switzer nous a fourni les ADN proviraux de HTLV-3 et HTLV-4. Dr Mesnard nous a aussi fourni plusieurs des constructions plasmidiques. Dr Guy Lemay, Dr Switzer, Dre Duc Dodon et Dr Mesnard nous ont fait part de leurs commentaires constructifs sur le manuscrit. Cette étude a été menée en grande majorité dans le laboratoire de Dr Barbeau et partiellement dans le laboratoire de Dr Mesnard et Dre Duc Dodon. L'article a été publié en décembre 2014 dans la revue *Journal of Virology* (facteur d'impact 4, 648 en 2013/2014). Il a donc été modifié en vue de la publication afin de répondre à leurs critères de soumission. Vous trouverez la bibliographie associée à cet article à la fin de la thèse dans le but de réduire la quantité de papier.

2.1. Abstract

Human T-cell leukemia virus types 3 and 4 (HTLV-3 and HTLV-4) are recently isolated retroviruses. We have previously characterized HTLV-3- and HTLV-4-encoded antisense genes, termed APH-3 and APH-4, respectively, which, in contrast to HBZ, the HTLV-1 homologue, do not contain a typical bZIP. As HBZ differentially modulates the transactivation potential of various Jun family members, the effect of APH-3 and APH-4 on JunD-, c-Jun-, and JunB-mediated transcriptional activation was investigated. We first showed that APH-3 and APH-4 upregulated the transactivation potential of all tested Jun family members. Using a human telomerase catalytic subunit (hTERT) promoter construct, our results also highlighted that, unlike HBZ, which solely modulates hTERT expression via JunD, both APH-3 and APH-4 acted positively on the transactivation of the hTERT promoter mediated by tested Jun factors. Coimmunoprecipitation experiments demonstrated that these Jun proteins interacted with APH-3 and APH-4. Although no activation domain was identified for APH proteins, the activation domain of c-Jun was very important in the observed upregulation of its activation potential. We further showed that APH-3 and APH-4 required their putative bZIP-like domains and corresponding leucine residues for interaction and modulation of the transactivation potential of Jun factors. Our results demonstrate that HTLV-encoded antisense proteins behave differently, and that the bZIP-like domains of both APH-3 and APH-4 have retained their interaction potential for Jun members. These studies are important in assessing the differences between HBZ and other antisense proteins, which might further contribute to determining the role of HBZ in HTLV-1-associated diseases. IMPORTANCE HBZ, the antisense transcript-encoded protein from HTLV-1, is now well recognized as a potential factor for adult T-cell leukemia/lymphoma development. In order to better appreciate the mechanism of action of HBZ, comparison to antisense proteins from other HTLV viruses is important. Little is known in relation to the seemingly nonpathogenic HTLV-3 and HTLV-4 viruses, and studies of their antisense proteins are limited to our previously reported study. Here, we demonstrate that Jun transcription factors are differently affected by APH-3 and APH-4 compared to HBZ. These intriguing findings suggest that these proteins act differently on viral replication but also on cellular gene expression, and that

highlighting their differences of action might lead to important information allowing us to understand the link between HTLV-1 HBZ and ATL in infected individuals.

3.2. Introduction

Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) is the etiological agent of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP) (Poiesz et al. 1980; Miyoshi et al. 1981; Poiesz et al. 1981; Yoshida et al. 1982). Although a significant number of individuals are estimated to be infected with HTLV-1 globally, less than 5% of infected individuals will eventually develop ATL (Mortreux et al. 2003). HTLV-2 is genetically related to HTLV-1 and shares most viral genes but differs by having a preferential tropism toward CD8 + T cells compared to a CD4+ T cell tropism for HTLV-1 (Feuer and Green 2005). However, recent studies suggest this preference might not be clearly present during early infection (Kannian et al. 2012). Furthermore, HTLV-2 infection has a clinical presentation distinct from HTLV-1 and has only been linked to HAM-like pathologies and not to leukemia (Douceron et al. 2012; Araujo and Hall 2004; Yin et al. 2012). Recently, two new HTLV viruses, termed HTLV-3 and HTLV-4, emerged in nonhuman primate hunters from Cameroon (Calattini et al. 2005; Calattini et al. 2006; Wolfe et al. 2005). Although HTLV-3 presents certain similarities to HTLV-1, such as a Tax protein with common functional features, diseases have not been reported in HTLV-3-infected individuals (nor individuals infected by HTLV-4) thus far, but further epidemiologic studies are needed to determine the public health significance of these emerging viral infections (Duong et al. 2008; Thomas et al. 2010; Chevalier et al. 2012).

The mechanism by which HTLV-1 induces ATL is not well understood but has been associated with its transactivator protein (Tax) (Cheng et al. 2012). Tax is essential for HTLV-1 replication by its capacity to activate transcription factors acting on the long terminal repeat (LTR) activity but can also transform human primary CD4+ T cells and induce different tumors in mice (Franchini 1995; Benvenisty et al. 1992; Coscoy et al. 1998; Grossman et al. 1995). Cellular transformation depends on the ability of Tax to interfere with cell cycle

modulation and apoptosis, to induce genetic instability and to regulate multiple transcription factors including CREB, SRF, AP-1 (Yamaoka et al. 1996; Mortreux et al. 2003; Zhao et al. 2009; Reinke et al. 2010b). However, Tax is often not expressed in cells from ATL patients in part due to epigenetic changes or genetic inactivation and is thus dispensable at least during late stages of leukemogenesis (Matsuoka and Jeang 2007). Selective pressure mediated by a strong anti-Tax immune response might also down-regulate Tax expression in ATL cells (Hanon et al. 2000).

HTLV-1 also encodes a protein expressed from the antisense strand and termed HBZ (HTLV-I basic leucine zipper (bZIP)). HBZ exists as two different isoforms derived from unspliced or spliced transcripts (Gaudray et al. 2002; Cavanagh et al. 2006; Satou et al. 2006; Murata et al. 2006). Unlike the *tax* gene, the abundant spliced *HBZ* transcript is detected in most ATL cell lines and PBLs from infected patients (Cavanagh et al. 2006; Satou et al. 2006; Murata et al. 2006). HBZ has been linked to cell proliferation, induction of T-cell lymphomas and systemic inflammation in transgenic mice and its expression correlates with high proviral load and severity of HAM symptoms (Arnold et al. 2008; Satou et al. 2011; Saito et al. 2009). HBZ interacts with several transcription factors through its basic leucine zipper (bZIP) motif including the bZIP-containing Jun factors which blocks basal and Tax-induced HTLV-1 transcription (Matsumoto et al. 2005; Basbous et al. 2003; Ohshima et al. 2010; Hivin et al. 2007; Gaudray et al. 2002; Reinke et al. 2010b; Zhao et al. 2009).

The AP-1 family of transcription factors belongs to the bZIP class of DNA binding proteins. Protein-protein interactions are dependent on the ZIP region, which is characterized by leucine heptad repeats forming an α -helix-based coiled coil structure (O'Shea et al. 1989; Kouzarides and Ziff 1988; Landschulz et al. 1988). Most AP-1 homo or heterodimers bind to TPA-responsive elements (TRE) (Angel et al. 1987; Sassone-Corsi et al. 1988), while the CREB/c-Jun heterodimer binds cAMP-responsive elements (CRE) (Benbrook and Jones 1990) through a basic-rich region positioned upstream of the leucine zipper (Kouzarides and Ziff 1988; Landschulz et al. 1988). AP-1 dimers tightly modulate transcription of various genes involved in cellular processes such as transformation, proliferation, survival and apoptosis (Ransone et al. 1989a; Shaulian and Karin 2001). Interestingly, HBZ has been shown to

interact with several Jun family members, inactivating them through possible sequestration in transcriptionally inactive nuclear bodies or by degradation (Basbous et al. 2003; Matsumoto et al. 2005; Thébault et al. 2004; Hivin et al. 2007; Isono et al. 2008). In contrast, former studies have shown that HBZ may also interact and augment the JunD transactivation potential and increase expression of both HBZ and the human telomerase catalytic subunit (hTERT) (Kuhlmann et al. 2007; Gazon et al. 2012).

Recently, we reported that HTLV-2 also produces an antisense protein, termed APH-2 (Halin et al. 2009). In addition, we have identified and partially characterized similar antisense proteins in HTLV-3 and HTLV-4, termed APH-3 and APH-4 (Larocque et al. 2011). Although these three new viral proteins lack a classical bZIP domain, they all share the capacity to act upon Tax-mediated HTLV LTR activation. Nonetheless, more recent studies have shown that HBZ and APH-2 utilize different mechanisms for downregulation of HTLV transcription raising questions about similar differences in APH-3 and APH-4 (Lemasson et al. 2007; Clerc et al. 2008; Halin et al. 2009; Yin et al. 2012). Herein, we investigated the potential modulation of Jun family members by APH-3 and APH-4 and demonstrate that, as opposed to HBZ, both viral proteins augment the transcriptional activation potential of JunD, c-Jun and JunB through their bZIP-like domain.

3.3. Materials and methods

3.3.1. Cell lines

293T, COS-7 and HeLa cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (PAA Laboratories Inc., Toronto, Canada). The CEM T-cell line was maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS. All cell lines were cultured in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

3.3.2. Plasmid constructs

HBZ-SP1, APH-3- and APH-4-expressing vectors have been previously described and express GFP chimeric or Myc-tagged proteins (pHBZ-SP1-Myc, pMycAPH-3, pMycAPH-4, pAPH-3-GFP and pAPH-4-GFP) (Larocque et al. 2011). Deletion mutants were generated from pMycAPH-3, pAPH-3-GFP, pMycAPH-4 or pAPH-4-GFP (Larocque et al. 2011) using the PhusionTM Site-Directed Mutagenesis Kit according to the manufacturer's instructions. The following forward and reverse primers were used to generate the APH-3 and APH-4 deletion mutants: 5'-GAG GAA TAC TTT TGG TAT ATG GAC TGT T-3' and 5'-GTC TAT ACA GTC CAG TTG CTG TCG-3' for APH-3 Δ 157-189; 5'-GGA GAA TTA TTT CGG TTA TCA GCT GG-3' and 5'-GTC CAT GCA CTT CCG TTG TTG ATG-3' for APH-4 Δ 103-135; 5'-GAG GGC TAT ATA GAC TTT TTG GAG-3' and 5'-GTC TAT ACA GTC CAG TTG CTG TCG-3 for APH-3 Δ 157-167; 5'-CAG CAG CTA CGC GCA GGC T-3' and 5'-TAG TAA GTC ACA AAA CCC CTC GAA C-3' for APH-3 Δ 168-178; 5'-GAG GAA TAC TTT TGG TAT ATG GAC TGT T-3' and 5'-GCT CTC CCG CTC CAA AAA GTC TA-3' for APH-3 Δ 179-189; 5'-CAA GGC TAT ATT GAT GTA TTA GAG AAG GAA-3' and 5'-GTC CAT GCA CTT CCG TTG TTG ATG-3' for APH-4 Δ 103-113; 5'-AAG GAT CTG GAG GAG GAA TGT AAC C-3' and 5'-CAA CAA GTC ACA ATA CCC CTC AAA CC-3' for APH-4 Δ 114-124; 5'-GGA GAA TTA TTT CGG TTA TCA GCT GG-3' and 5'-CCT TTC CTT CTC TAA TAC ATC AAT ATA GC-3' for APH-4 Δ 125-135. Point mutation constructs of APH-3 and APH-4 were also generated using the PhusionTM Site-Directed Mutagenesis Kit. The forward 5'-GTA GAG GGC TAT ATA GAC TTT GTG GA-3' and reverse 5'-TAA GTC ACA AAA CCC CTC GAA CCC-3' primers and forward 5'-GTG CAA GGC TAT ATT GAT GTA GTA GAG A-3' and reverse 5'-CAA GTC ACA ATA CCC CTC AAA CCC-3' primers were used to generate pMycAPH-3_{L167L174}-VV and pMycAPH-4_{L113L120}-VV, respectively. The reporter gene construct in which the collagenase promoter (bearing a single AP-1-binding site) is cloned upstream of the luciferase reporter gene was previously described (Thébault et al. 2004). The pAP-1-Luc vector (Stratagene) contains seven AP-1-binding sites upstream of a minimal promoter and the luciferase reporter gene. The wild-type c-Fos-, JunB-, c-Jun- and JunD-expressing vectors pcDNAc-Fos, pCMVJunDFlag, pcDNAJunB and pcDNAc-Jun and the dominant negative c-Jun pCMV-

TAM67 (deleted of its transactivating domain (amino acid 1-122)) mutant expression vector have all been previously described (Hivin et al. 2006). The pGL3-378 hTERT construct contains the human Telomerase RT promoter region (from -378 to +1) upstream of the luciferase reporter gene (Takakura et al. 2005). The pRcActin-LacZ vector expresses the β -galactosidase gene under the control of the human β -actin promoter. pCMV-Hyg expresses the hygromycin resistance gene. The pRL-TK vector expresses the Renilla luciferase reporter gene (Kuhlmann et al. 2007).

3.3.3. Immunofluorescence microscopy analysis

COS-7 cells were transfected with pAPH-3-GFP, pAPH-3 Δ 157-189-GFP, pAPH-4-GFP, pAPH-4 Δ 103-135-GFP or the control empty vector peGFP-N1. Thirty-six hours after transfection, cells were washed three times with PBS and incubated 5 min at 37°C with 1 μ g/mL Hoechst 33342 reagent (Invitrogen). Cells were then washed three times with PBS, replenished with supplemented DMEM and observed at room temperature using a plan fluor 40X objective and with a numerical aperture (NA) of 0.60 with a Nikon A1 laser-scanning confocal microscope (Nikon Canada, Mississauga, Canada).

3.3.4. Transfection and luciferase assay

293T cells (1×10^5) were transiently co-transfected with the collagenase luciferase reporter construct (0.4 mg) and either pCMVJunDFlag, pcDNAJunB or pcDNAc-Jun (0.2 mg) together with 0.4 mg of expression vectors for HBZ-SP1-Myc, wild-type or mutated MycAPH-3 or MycAPH-4, c-Fos or the empty vector pcDNA3.1 and pRcActin-lacZ (0.2 mg) using the LipofectamineTM 2000 reagent. Forty-eight hours post-transfection, cells were lysed and luciferase activity was determined with an MLX microplate luminometer (Dynex Technologies), as previously described (Barbeau et al. 2001). Each sample was normalized by β -Galactosidase activity for transfection efficiency using a Galacto-Light kit (Applied Biosystems, Bedford, MS) according to the manufacturer's protocol. For each sample,

luciferase activity is presented as fold induction of the normalized luciferase activity (RLU/ β -Gal) divided by the corresponding normalized luciferase activity from cell samples transfected with the luciferase reporter construct and empty expression vectors and represents the calculated mean \pm standard error of the mean (S.E.M.) of six transfected samples. CEM cells (1×10^7) were co-transfected with the collagenase luciferase reporter construct (1 mg), pcDNAc-Jun (1 mg) along with 2 mg of pHBZ-SP1-Myc, pMycAPH-2, pMycAPH-3, pMycAPH-4 or pcDNA3.1 and pRcActin-lacZ using the Gene Pulser Xcell™ Electroporation System (1200 μ F, 250 V; Bio-Rad, Hercules, CA), as previously described (Lemasson et al. 1998). HeLa cells were co-transfected using Polyfect (Qiagen) according to the manufacturer's instructions with 0.1 mg pGL3-378 hTERT and 0.025 mg pCMVJunD, 0.2 mg pcDNAJunB or pcDNAc-Jun along with 0.2 mg pHBZ-SP1-Myc, pMycAPH-3, pMycAPH-4 or pcDNA3.1. Each sample was cotransfected with a Renilla luciferase expression vector (pRL-TK, Promega) for normalization of transfection efficiency. Forty-eight hours post-transfection, activity was measured using the dual-luciferase reporter assay (Promega) according to the manufacturer's instructions. Luciferase activity is presented as fold induction of the value of the reporter plasmid alone.

3.3.5. Generation of stable cell line and transfection

293T cells (1×10^5) were stably transfected with the collagenase-luc vector (or pcDNA3.1 as a control) along with pCMV-Hyg (ratio 10 :1) using the Lipofectamine™ 2000 reagent. Cells were selected in the presence of 400 ng/ μ l hygromycin B and resulting clones were next pooled. Stable cell lines were then transiently co-transfected with pCMVJunDFlag, pcDNAJunB or pcDNAc-Jun together with pHBZ-SP1-Myc, pMycAPH-3, pMycAPH-4 or the empty vector pcDNA3.1 using the Lipofectamine™ 2000 reagent. Forty-eight hours post-transfection, cells were lysed and luciferase activity was quantified.

3.3.6. Yeast two hybrid assay

Wild type (WT), bZIP-deleted Jun cDNAs or c-Jun AD deletion mutants were cloned in frame with the Gal4 activation domain in the pGAD10 vector. Wild-type APH-4, APH-4 Δ 109-182 or APH-4 Δ 145-182 cDNAs were cloned in frame with the Gal4 DNA binding domain of the pGBT9 vector. Yeast two hybrid assay was performed in the *Saccharomyces cerevisiae* HF7c reporter strain, which contains the *E. coli lacZ* gene under the control of three copies of the GAL4-binding sequence. As previously described (Basbous et al. 2003), HF7c were co-transformed using the lithium acetate method with WT pGAD10-based expression vector or mutated JunD, c-Jun or JunB (or the empty vector) and with pGBT9 expression vectors for WT or mutated APH-4. Experiment was carried out on three independent pools of colonies per transformation as described in the Clontech protocol. The b-galactosidase activity was measured for each sample using ONPG as the substrate and then calculated in Miller units (Miller 1972).

3.3.7. GAL4-based activation domain assay

APH-3 and APH-4 were cloned in frame into the pBind vector containing the DNA binding domain of GAL4 (pBIND vector, Promega). CEM and 293T cells were co-transfected with pG5-luc, a luciferase reporter plasmid with a minimal TATA box promoter downstream of five GAL4-binding sites together with pBind APH-2, pBind APH-3, pBind APH-4, pBind HBZ (Gaudray et al. 2002) or the empty vector and pRcActin-lacZ for transfection efficiency, as described above. Luciferase activity was measured at 48 h post-transfection and is presented as normalized fold induction compared to luciferase activity from pBind-transfected cells. Data represent the calculated mean \pm SEM of two transfected samples.

3.3.8. Western Blot

40 μ g of total cell extracts were run on a 12% SDS-PAGE gel and transferred to PVDF membranes (Millipore, Mississauga, Canada). The blot was blocked in PBS/5% milk and

incubated with an anti-myc antibody (1:250) (supernatant of hybridoma purchased from the American Tissue Culture Collection (Manassas VA)). After several washes, horseradish peroxidase (HRP)-conjugated sheep anti-mouse IgG antibodies (1:5000) were added to the membranes, which were washed again several times and subsequently incubated with the BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD) (Roche Diagnostic, Indianapolis, USA). Membranes were analyzed with the Fusion FX7 apparatus (Vilber Lourmat, France).

3.3.9. Co-immunoprecipitation experiments

293T cells were co-transfected with pMycAPH-3 or pMycAPH-4 and pcDNA-JunB, pcDNA-c-Jun or pCMV-JunD-Flag using the LipofectamineTM 2000 reagent. Forty-eight hours post-transfection, cells were lysed with 50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA and 1% Triton. Immunoprecipitation was done using Dynabeads Protein G (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Briefly, 40 ml of Dynabeads Protein G (Invitrogen) was incubated 30 min at room temperature with 5 mg of anti-myc antibody. Total cell extracts were then incubated overnight at 4°C with the antibody-bead complex. Bound fractions were eluted with 20 ml of loading buffer and then separated using a 12% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane (Millipore, Mississauga, Canada). Membranes were blocked in PBS/5% milk or PBS/0.5% casein and incubated with anti-JunB (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz CA) (1:500), anti-c-Jun (Santa Cruz Biotechnology Inc) (1:200), anti-JunD (Santa Cruz Biotechnology Inc.) (0.4 mg/ml) or anti-myc (dilution 1:250) antibodies. After several washes, membranes were incubated with HRP-conjugated mouse IgG Trueblot® ULTRA (eBioscience, San Diego CA) (1:1000) or HRP-conjugated sheep anti-rabbit IgG antibodies (1:5000), washed several times and incubated with the BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD). Membranes were analyzed using the Fusion FX7 device.

3.3.10. Statistical analysis

Data are shown as mean \pm S.E.M. and analysed by one-way ANOVA analyses compared with Tuckey's test. Differences were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

3.4. Results

3.4.1. APH-3 and APH-4 increase the transactivation potential of Jun members.

While HBZ down-regulates Jun-B- and c-Jun-dependent transcription and up-regulates transcription dependent on JunD (Clerc et al. 2009; Mesnard et al. 2006; Barbeau and Mesnard 2007), it is unknown if APH-3 and APH-4 could similarly affect the Jun family of transcription factors. To test this possibility, 293T cells were transiently co-transfected with a construct expressing the luciferase reporter gene positioned downstream of the collagenase promoter (bearing one AP-1-binding site) and either pCMVJunDFlag, pCMVJunB or pCMVc-Jun together with pHBZ-SP1-Myc, pMycAPH-3, pMycAPH-4 or the empty vector. In Figure 3.1A-C, we confirm that HBZ down-regulates the transactivation potential of Jun B and c-Jun in the context of the collagenase promoter, while it incremented the activation potential of JunD (Barbeau and Mesnard 2007; Thébault et al. 2004). Surprisingly, both APH-3 and APH-4 further activated the transactivation potential of all three Jun family members, most difference being statistically significant when compared to cells only expressing the Jun factor. Western blot analyses of cellular extracts of transfected cells confirmed that these differences were not solely attributable to variable levels of either Jun factors or APH-3 and APH-4. APH-3 and APH-4, when expressed alone, also positively modulated Jun-mediated transcriptional activation, which suggests an effect of APH-3 and -4 on the transactivation potential of endogenous Jun factors. When an APH-2 expression vector was similarly co-transfected with the JunD expression vector in 293T cells, activation of the collagenase promoter mediated by JunD was again further induced, albeit at lesser level than for APH-3 and APH-4 (data not shown). However, the very low level of detectable APH-2 protein in transfected cells did not allow us to determine if APH-2 was less capable of inducing JunD-dependent activation of the collagenase promoter when compared to APH-3 and APH-4.

To further confirm these results, CEM cells were also transfected with c-Jun expression vectors and measured for collagenase promoter activity in the presence of HBZ, APH-2, APH-3 or APH-4 (Figure 3.1D left panel). Again, APH-2, APH-3 and APH-4 all

increased c-Jun-mediated activation of the collagenase promoter corroborating results in transfected 293T cells. However, due to the high intrinsic instability of APH-2, we were again unable to clearly state how the transactivation potential of this protein compared to APH-3 and APH-4. Since APH-4 most strongly increased c-Jun-dependent promoter activation, we next compared its transactivation potential to that of the c-Fos/c-Jun heterodimer. Comparable transactivation potentials of the collagenase promoter (about 300 fold) were obtained in CEM cells co-transfected by either c-Fos or APH-4 and the c-Jun expression vectors (Figure 3.1D right panel).

Our results thereby demonstrate that APH-3 and APH-4 positively up-regulate the activation of the collagenase promoter, and that the extent of this upregulation varies depending on the co-expressed Jun factor.

3.4.2. APH-3 and APH-4 augment Jun activation in the context of chromatin and upstream of a heterologous promoter.

The observed induction of the collagenase promoter by APH-3/APH-4 and Jun family members was further evaluated using 293T cells stably transfected with the collagenase promoter luciferase construct. These 293T cells were transfected with the JunD expression vector and APH-3 or APH-4 expression vectors. As expected, both APH-3 and APH-4 potently augmented luciferase activity in the presence of JunD (Figure 3.2 A-B). Interestingly, APH-4 alone also induced collagenase promoter activity.

We also conducted a series of transfections with a construct containing the luciferase reporter gene positioned downstream of a minimal promoter and seven copies of the AP-1 consensus sequence. We found that luciferase activity was induced by JunD, with increased induction when either APH-3 or APH-4 was expressed (Figure 3.2 C). Our results suggest that both APH-3 and APH-4 had a similar effect on the collagenase promoter in the context of the chromatin and that induction could also be confirmed with AP-1-binding sites positioned next to a minimal promoter.

3.4.3. APH-3 and APH-4 activate the hTERT promoter.

Previous studies reported that HBZ could increase promoter activity of the human telomerase hTERT gene by its ability to complex with JunD and Sp1 (Kuhlmann et al. 2007). Since both APH-3 and APH-4 induced the transactivation potential of the tested Jun family members, we next evaluated whether hTERT promoter activity could be equally up-regulated by APH-3 and APH-4. HeLa cells were transfected with a construct expressing the luciferase reporter gene positioned downstream of the hTERT minimal promoter (bearing Sp1- and c-myc-binding sites and no AP-1-binding sites) in combination with either pCMVJunDFlag, pcDNAJunB or pcDNAC-Jun and pHBZ-SP1-Myc, pMycAPH-3, pMycAPH-4 or the empty vector (Figure 3.3). As expected, HBZ demonstrated little c-Jun- and JunB-modulated hTERT promoter activity but augmented the activation mediated by JunD. In contrast, both APH-3 and APH-4 further induced hTERT promoter activity, regardless of the tested Jun family member. The most notable increase was again mediated by APH-4. In this cellular context, Western blot analyses indicated that HBZ, APH-3 and APH-4 showed comparable expression levels and did not alter CMV-driven Jun expression, when JunD expression vectors were transfected (Figure 3.3C). These results illustrate that both APH-3 and APH-4 strongly modulate the transactivation potential of Jun members in the context of the hTERT promoter.

3.4.4. APH-3 and APH-4 interact with c-Jun, JunB and JunD.

As our results clearly suggested that APH-3 and -4 functionally modulated Jun transcription factors, we next verified if APH-3 and APH-4 could interact directly with JunB, c-Jun and JunD. 293T cells were co-transfected with pcDNAJunB, pcDNAC-Jun or pCMVJunDFlag expression vectors with either pMycAPH-3 or pMycAPH-4 (Figure 3.4). In 293T cells co-transfected with the JunB expression vector, immunoprecipitation of APH-3 and APH-4 with an anti-myc antibody led to detection of JunB indicating that both proteins were indeed interacting with JunB (Figure 3.4A). Similar experiments using c-Jun and JunD expression vectors transfected in 293T cells with APH-3 or APH-4 expression vectors also showed potential interactions between c-Jun or JunD and either antisense proteins, as depicted

in Figure 3.4B-C. Our results thus suggest that both APH-3 and APH-4 were interacting with all three Jun family members.

3.4.5. Lack of an activation domain for APH-3 and APH-4.

As HBZ contains an activation domain (AD) at its NH₂ end (Gaudray et al. 2002; Thébault et al. 2004), we were interested in searching for a potential activation domain in both APH-3 and APH-4. To better understand the mechanism behind the activating capacity of APH-3 and APH-4 on the Jun transactivating potential, we first generated deletion mutants of the amino-terminal region of these two proteins (Δ 1-89 and Δ 1-36 for APH-3 and APH-4, respectively) corresponding to regions showing sequence similarity to the HBZ AD (Figure 3.5A). When each mutant was transfected with either c-Jun or JunD expression vector and the collagenase promoter-luciferase construct, measurement of luciferase activity showed no significant differences between WT and mutant APH proteins (Figure 3.5B-C). To further test for the presence of an activation domain in APH-3 and APH-4, expression vectors of chimeric proteins containing the entire ORF of all four antisense proteins, i.e. HBZ, APH-2, APH-3 and APH-4, fused to the GAL-4-binding domain were transfected with the pG5luc reporter vector containing five GAL4-binding sites adjacent to a minimal promoter in 293T or CEM cells (Figure 3.5D-E). Confirming the above results, chimeric APH-3 and APH-4 proteins were not efficient in inducing luciferase activity, unlike the chimeric HBZ protein which showed over 70 and 140 fold induction in 293T and CEM cells, respectively.

Since an activation domain was not identified for APH-3 and APH-4 in these experiments, we next tested if Jun members' ADs were involved in the observed APH/Jun-dependent induction of collagenase promoter activity. To test this, a dominant negative c-Jun mutant deleted of its activation domain, termed TAM67, was co-transfected along with expression vectors for the APH-4WT or a version deleted of its amino terminal region (APH-4 Δ 1-36) or further deleted up to the start of the bZIP domain (APH-4 Δ 1-80). As seen in Figure 3.5F, upon expression of APH-4 in transfected CEM cells, c-Jun strongly induced luciferase expression. In contrast, expression of the dominant negative c-JunTAM67 strongly hampered

APH-4-dependent up-regulation of its transactivation potential. Interestingly, although the APH-4 Δ 1-36 mutant was only modestly affected in its capacity to act upon c-Jun transactivation potential, the APH-4 Δ 1-80 mutant was more severely affected.

Collectively, these results indicate that APH-3 and APH-4 did not contain an HBZ-like AD and that the observed increase in the transactivation potential of Jun family members was dependent on the Jun AD.

3.4.6. The atypical bZIP motifs of APH-3 and APH-4 are required for their modulation of Jun transactivation potential.

APH-3 and APH-4 both possess a bZIP-like domain showing irregularly spaced leucines or isoleucines, which are not typical of leucine zipper (LZ) motifs. To determine if these atypical LZs affect Jun transactivation, we generated LZ-deleted APH-3 and APH-4 mutants (MycAPH-3 Δ 157-189 and pMycAPH-4 Δ 103-135) and assessed if these mutants acted differently on Jun family members (Figure 3.6A). Upon transfection in 293T cells, similar subcellular localization and expression levels were noted for both APH-3 and APH-4 mutants and their WT versions, as determined by Western blot analyses and confocal microscopy (Figure 3.6B, F). Mutated or WT APH-3 and APH-4 proteins were next co-expressed in 293T cells along with the Jun family members and their transactivation potential on the co-transfected collagenase-luc vector was determined. As demonstrated in Figure 3.6C-E, LZ-deleted APH-3 and APH-4 lost significant hyperactivating potential over Jun family members in the context of the collagenase promoter construct. Next, we tested if these LZ-deletions affected their ability to interact with Jun family members. Co-IP experiments were therefore conducted in 293T cells co-transfected with LZ-deficient APH-3 and APH-4 mutants (vs. WT expression vectors) and with the c-Jun expression vector (Figure 3.6G). As expected, when WT APH-3 or APH-4 was immunoprecipitated, c-Jun was detected following Western blot analyses. In contrast, immunoprecipitation of LZ-deleted APH-3 and APH-4 mutants led to a severe reduction in the abundance of c-Jun confirming a decreased binding efficiency of the deletion mutants to c-Jun.

To further analyse the region required for the modulatory function of APH-3 and APH-4 on Jun transactivation potential, smaller deletion mutants within the LZ region (APH-3 Δ 157-167, Δ 168-178 and Δ 179-189 or APH-4 Δ 103-113, Δ 114-124, Δ 125-135) were generated and tested by transfection in 293T cells along with Jun expression vectors and the collagenase promoter construct (Figure 3.7). Regardless of the Jun family member, all deleted mutants were strongly affected in their activating potential of the collagenase promoter, indicating that the entire LZ region in APH-3 and APH-4 was essential for optimal collagenase promoter activation (Figure 3.7B-D). Western blot analyses confirmed that these mutants were expressed at equivalent levels to their WT versions (Figure 3.7E).

These results show that the atypical bZIP domain in APH-3 and APH-4 is important for the up-regulatory function of both proteins on Jun-mediated collagenase promoter activation and that it also mediates the interaction with Jun transcription factors.

3.4.7. Implication of leucine residues in the APH-3 and APH-4 LZ domain in the up-regulation of the Jun transactivation potential.

Through *in silico* analyses, the position of certain leucines in the atypical LZ domain of APH-3 and APH-4 suggest a potential implication in the interaction of these antisense proteins with other bZIP factors (Figure 3.8A). To clearly define these residues in the modulatory function of APH-3 and APH-4 on Jun factors, two leucines similarly positioned in the various antisense proteins in the predicted atypical LZ domain were mutated to valine residues in both APH-3 and APH-4. When expressed in transfected 293T cells, both mutants showed comparable expression levels to similarly transfected WT versions (Figure 3.8E). Importantly, upon co-transfection with Jun expression vectors and the collagenase promoter reporter construct, mutated APH-3 $L_{167}L_{174}$ -VV and APH-4 $L_{113}L_{120}$ -VV demonstrated an important loss of Jun-mediated promoter activation (Figure 3.8B-D).

To further address the importance of the bZIP domain for the interaction of the two APH proteins with Jun family members, a yeast two-hybrid approach was performed (Figure 3.8F). APH-4 was used in these experiments as it provided the highest induction capacity on

Jun-induced promoter activation. WT or APH-4 mutants (APH-4 Δ 109-182, APH-4 Δ 145-182 and APH-4 L₁₁₃L₁₂₀-VV) fused to the GAL-4-binding domain were co-transformed in the HF7c yeast strains along with expression vectors of WT or bZIP-deleted c-Jun, JunB or JunD fused to the GAL4 activation domain. Upon measurement of β -galactosidase activity in transformed yeast cells, we first showed that lack of the bZIP domain in JunB, c-Jun and JunD importantly affected the interaction of APH-4 with these factors. Conversely, the loss of the bZIP domain in APH-4 (APH-4 Δ 109-182) and mutation of the two selected leucine residues in the previous experiments resulted in a significant reduction in the interaction between c-Jun and APH-4. The APH-4 double point mutant had however a lesser impact on APH-4/c-Jun interaction. As a control, an APH-4 Δ 144-182 mutant in which the COOH end of the protein was selectively deleted without altering the bZIP domain, led to an unchanged APH-4/c-Jun interaction.

In order to confirm these results, we next evaluated if the mutation of the two chosen leucine residues in the APH-3 and APH-4 double mutant affected its interacting potential with c-Jun. Co-IP experiments were hence conducted in 293T cells co-transfected with expression vectors for APH-3L₁₆₇L₁₇₄-VV or APH-4 L₁₁₃L₁₂₀-VV or wild-type and deletion mutant APH-3 and -4 expression vectors combined to the c-Jun expression vector (Figure 3.9). Co-IP analysis showed that the interaction between c-Jun and the APH-3L₁₆₇L₁₇₄-VV or APH-4 L₁₁₃L₁₂₀-VV mutant as well as with all tested deletion mutants of APH-3 and APH-4 was significantly reduced compared to the interaction between c-Jun and WT APH-3 and APH-4 (Figure 3.9A-B). We also compared the extent of c-Jun-dependent transactivation of the collagenase promoter upon co-expression of the various deletion mutants, double point mutants and WT versions. As shown in Figure 3.9C, when compared to WT APH-3 and APH-4, all deletion mutants and double point mutants demonstrated a comparable reduction in their capacity to increment the c-Jun transactivation potential. These results thereby strongly suggest that APH-3/APH-4 and Jun family members interact to augment Jun-dependant transactivation and that their association is dependent on atypical bZIP-like domains of APH proteins.

3.5. Discussion

While HTLV-3 and HTLV-4 are newly discovered deltaretroviruses and share a similar genomic structure with HTLV-1 and HTLV-2, little is known about their biology, pathogenic potential and person-to-person transmissibility. So far, no diseases have been reported for the limited number of persons infected with these two viruses and their geographic distribution has been restricted to Cameroon. *In vitro* characterization of these viruses may facilitate a better understanding of their biology and *in vivo* replication potential which can affect their pathogenicity and transmissibility. We have recently shown that both HTLV-3 and HTLV-4 produce antisense spliced transcripts encoding new viral proteins that we have termed antisense protein of HTLV-3 (APH-3) and -4 (APH-4) (Larocque et al. 2011). We also previously showed that APH-3 and APH-4 were capable of inhibiting the transactivation potential of Tax, similarly to HBZ and APH-2, despite the absence of a typical bZIP domain. Since HBZ regulates the AP-1 pathway through a bZIP-dependent interaction with Jun family members (Matsumoto et al. 2005; Basbous et al. 2003; Hivin et al. 2007), a comparative study between HBZ, APH-3 and APH-4 in terms of their modulation of the transactivation potential of Jun factors was conducted. In this report, we demonstrate that APH-3 and APH-4 activate Jun-dependent transcription through the AP-1-binding site present in the collagenase promoter by physically interacting with JunB, c-Jun and JunD. The transactivation potential of the three Jun family members was observed in different cell lines, in the context of the chromatin and of a minimal promoter and was mediated by the atypical bZIP-like region of APH-3 and APH-4.

AP-1-binding sites are found in multiple cellular promoters and thus APH-3 and APH-4 might thereby activate several cellular genes in infected cells. Other binding sites might also be targeted by Jun/APH heterodimers. In fact, we observed that APH-3 and APH-4 when co-expressed with Jun factors, activated the hTERT proximal minimal promoter, which only harbour Sp1- and c-myc-binding sites. A previous study similarly demonstrated that HBZ in association with JunD positively modulated hTERT promoter activity via a ternary complex involving Sp1 (Kuhlmann et al. 2007). However, JunB and c-Jun had no similar impact when HBZ was present. Our data thereby suggests that APH-3 and APH-4 allow the formation of a

ternary complex with Sp1 and all the different Jun family members. In this regard, the cellular localization of these heterodimers might dictate whether they are capable of inducing expression of the hTERT or any targeted genes, although preliminary data do not support a major relocalization of Jun factors by APH-3 or APH-4 upon co-expression (data not shown). It will nonetheless be necessary to investigate whether APH-3 and APH-4 do activate hTERT promoter activity via its Sp1-binding site through a similar HBZ/JunD/Sp1 complex.

When all four antisense-encoded proteins were compared, APH-4 generally showed the highest degree of transcription activation and displayed a comparable level to the c-fos-dependent activation potential of c-Jun. The c-Fos/c-Jun heterodimer has much greater activation potential than the c-Jun homodimer due to dimer stabilization (Kouzarides and Ziff 1988; Halazonetis et al. 1988) suggesting that the APH-4/c-Jun heterodimer might form a complex of higher stability than APH-3/c-Jun. Indeed, our co-IP experiments demonstrated higher levels of Jun factors complexed to APH-4 although varying protein levels of APH-3 and APH-4 in cellular extracts did not allow us to clearly conclude such a higher interaction. More experiments are needed to confirm these interactions between APH-3/4 and Jun factors and to determine if indeed APH-4 forms a more stable complex with Jun factors.

JunD transcriptional activation induced by HBZ has been reported to depend on the amino terminal region of HBZ, which contains an AD (Gaudray et al. 2002; Thébault et al. 2004). Through deletion mutants of the N-terminus and using a GAL4-based assay, our results suggest that the terminal amino regions do not possess an AD in both APH-3 and APH-4 and that the N-terminus is not required for optimal Jun transactivation potential. Using an activation domain-deficient c-Jun expression vector, transfection experiments supported the conclusion that APH-3- and APH-4-mediated transcription activation greatly depended on the Jun activation domain. Several possibilities might account for this intriguing capacity of APH-3 and APH-4 to act positively on the transactivation potential of both Jun transcription factors. First, a modulatory domain in HBZ (EQERRE), which lies adjacent to the DNA binding domain, has been shown to be in part responsible for its JunD-activating potential (Hivin et al. 2006). Such a charged amino acid-rich region also exists next to the leucine zipper-like motif of APH-3 and APH-4 (Larocque et al. 2011) and the presence of a similar domain in APH-3

and APH-4 might suggest an essential role of this domain on Jun factors. In fact, the APH-4 ($\Delta 1-80$) mutant showed a more important decrease in its capacity to positively modulate the transactivation potential of c-Jun vs. the APH-4 ($\Delta 1-36$) mutant, which could result from deletion of this charged amino acid region. It is also possible that APH-3 and APH-4 either directly or through the interaction with a ternary factor, increase the transactivation potential or binding of Jun to specific promoter regions. As an alternative mechanism, LXXLL-like motifs, which were previously shown to mediate HBZ interaction with CBP/p300 in an inhibitory manner (Clerc et al. 2008), are present in the amino acid sequence of both APH-3 and APH-4 (Larocque et al. 2011) and could instead potentiate the transactivation potential of Jun factors upon dimerization. We are currently exploring these various possibilities.

We also identified the APH-3 and APH-4 domains responsible for their interaction with Jun factors. Previous *in silico* analyses of their amino acid sequence did not predict a classical bZIP domain (Larocque et al. 2011; Switzer et al. 2006b; Switzer et al. 2009). The HBZ bZIP domain is responsible for HBZ/Jun interactions and subsequent modulation of Jun-dependent transcription and further impacts viral infectivity and persistence (Matsumoto et al. 2005; Basbous et al. 2003; Arnold et al. 2006; Arnold et al. 2008). Using deletion and site-specific mutagenesis, our results strongly suggest that the non-canonical bZIP found in APH-3 and APH-4 is functional and enables these proteins to interact and potentiate the transcriptional activation properties of all tested Jun family members. This is reminiscent of the atypical bZIP domain found in the EBV Zta transcription factor produced by the Epstein Barr virus, which has been previously demonstrated to form a weak coiled-coil structure. (Schelcher et al. 2007). Former reports have further indicated that the presence of less than five leucines in c-Jun and c-Fos leucine zippers is sufficient for dimer formation and that hydrophobic or charged residues between the heptad of leucines importantly contribute to the stabilization and dimerization specificity (Ransone et al. 1989b). A minimum number of leucine heptads could thereby be sufficient to maintain a functional bZIP enabling APH-3 and APH-4 to interact with other bZIP proteins. However, as APH-3 and APH-4 do not induce relocalization of c-Jun or other Jun family members (data not shown), these interactions might be weak, although they may retain an important regulatory role.

It is interesting to note that, in contrast to APH-2, which has also been shown to positively modulate the transactivation potential of Jun factors (Marban et al. 2012), a complex between APH-3/APH-4 and JunD was detected leading to activation of JunD-dependent transcription, similarly to HBZ (Marban et al. 2012; Thébault et al. 2004). Similar differences might exist in the interaction of the various HTLV antisense proteins with other transcription factors. Indeed, a recent study has demonstrated that, although both HBZ and APH-2 were able to down-regulate Tax-mediated LTR activation, this regulation was dependent on two different mechanisms (Yin et al. 2012). A LXXLL motif in the C-terminal region of APH-2 is responsible for the interaction with CREB and the resulting down-regulation of LTR activation by Tax, while HBZ rather necessitates its bZIP domain for this interaction, concomitantly with the LXXLL motif-dependent interaction with CBP/p300 (Yin et al. 2012; Lemasson et al. 2007; Clerc et al. 2008). We have shown that APH-3 and APH-4, when deleted of their LZ-like domain, can inhibit Tax-driven LTR activation as potently as WT, indicating that APH-3 and APH-4 might also similarly possess a CREB-interacting domain independent of its bZIP-like region (data not shown). As the C-terminal region of APH-2 has also been shown to interact with Tax2B, thereby inhibiting Tax2-dependent AP-1 activation (Marban et al. 2012), it will be important to determine if such an interaction might be occurring for other HTLV-encoded antisense proteins with their respective Tax proteins.

Using the rabbit model, Yin *et al.* (2012) have demonstrated that unlike HBZ, APH-2 is dispensable for viral persistence and viral replication (Yin et al. 2012). Furthermore, APH-2 does not induce IL-2-independent growth in an IL-2-dependent T cell line, as opposed to HBZ (Douceron et al. 2012), although both antisense genes share similar expression patterns (Kannian et al. 2012; Bender et al. 2012). It is therefore interesting that APH-2, like HBZ is expressed in most HTLV-2-infected cells and that this virus has been only associated with lymphocytosis but not to any form of leukemia (Halin et al. 2009; Bartman et al. 2008). Whether antisense proteins are important for these different clinical outcomes in infected patients is an important issue. A limited number of individuals have been found to be infected by HTLV-3 or HTLV-4 and diseases have not yet been reported in these persons (Duong et al. 2008; Thomas et al. 2010). On the basis of our new results, it will nonetheless be interesting to further investigate whether APH-3 or APH-4 could induce cell transformation or IL-2-

independent T-cell growth. Preliminary data has however shown that these proteins do not induce apoptosis, as assessed by the Annexin V marker (data not shown).

In conclusion, in this study, we have demonstrated that APH-3 and APH-4 significantly increase the transactivation potential of the various Jun family members in the context of various promoters. We have further shown that this modulatory function is dependent on the bZIP-like-domain of APH-3 and APH-4 mediating their interaction with different Jun factors. Although the exact mechanism by which these antisense proteins modulate Jun-dependent transcription needs to be further investigated, such functional comparisons between the four HTLV-encoded antisense proteins are important and will likely allow a better understanding of the unique association between HTLV-1 HBZ and ATL.

3.6. Acknowledgments

This work was supported by The Cancer Research Society (B.B.) and by a grant from the Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les hépatites virales (ANRS) (JMM). B.B. holds a Canada Research Chair in human retrovirology (Tier 2). E.L. holds a studentship from the Department of Microbiology and Immunology at Université de Montréal. M.B. was supported by the fellowship from the Fondation ARC for cancer research.

We would like to thank Denis Flipo for his excellent technical support for experiments related to confocal microscopy.

Use of trade names is for identification only and does not imply endorsement by the U.S. Department of Health and Human Services, the Public Health Service, or the Centers for Disease Control and Prevention. The findings and conclusions in this report are those of the authors and do not necessarily represent the views of the Centers for Disease Control and Prevention.

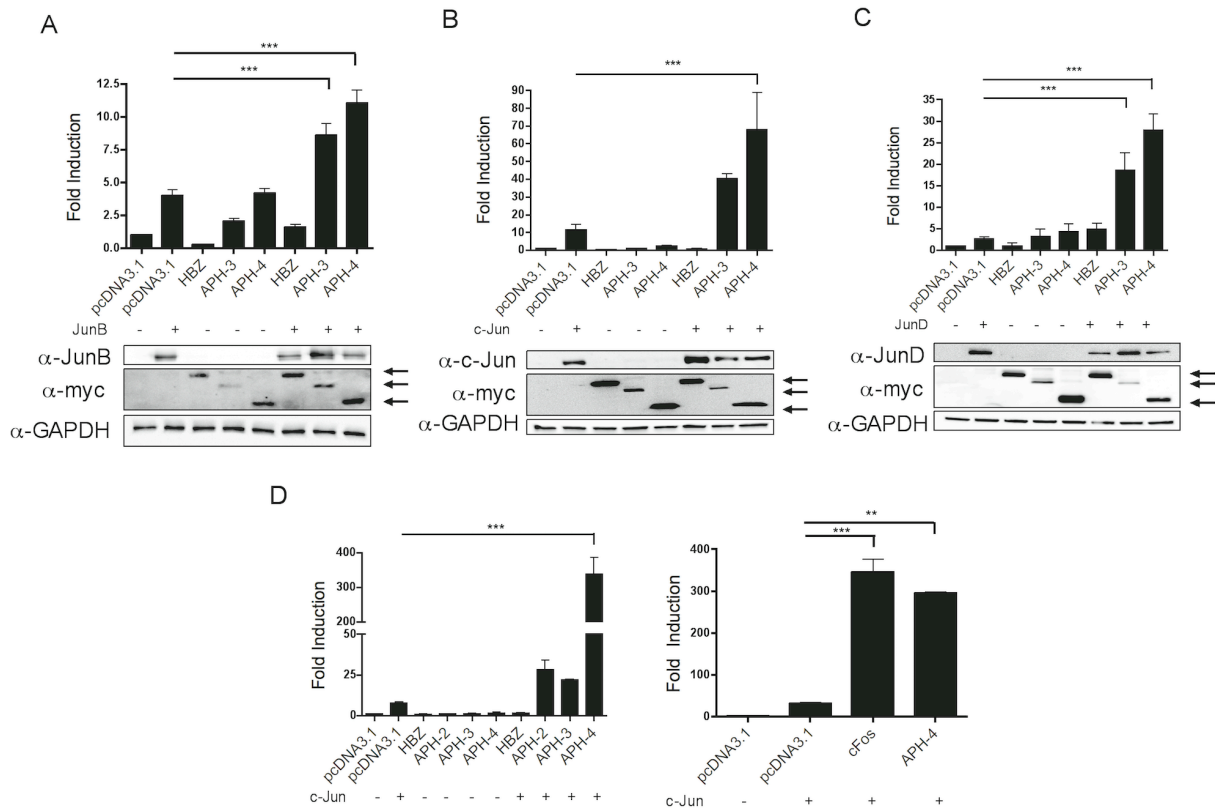


Figure 3.1. APH-3 and APH-4 activate Jun-dependent transcription of the collagenase promoter. (A to C) pHBZ-SP1-Myc, pMycAPH-3, pMycAPH-4, or the empty vector, pcDNA3.1, was cotransfected in 293T cells along with the expression vector for JunB (A), c-Jun (B), or JunD (C), the collagenase-luciferase construct, and pRcActin-lacZ. Forty-eight h posttransfection, cells were lysed and luciferase activity was measured. Luciferase activity is presented as fold induction \pm standard errors of the means (SEM) from six transfected samples, in which the value for cells transfected with the luciferase reporter construct and empty expression vectors was set at 1. These results are representative of four independent experiments. In lower panels, cell lysates analyzed by Western blotting with anti-myc and anti-GAPDH antibodies as well as anti-JunB, anti-c-Jun, or anti-JunD antibody are presented. Arrows on the right side of the images point to specific signals. (D) CEM cells were transiently cotransfected with collagenase-luc, pcDNAc-Jun, pHBZ-SP1-Myc, pMycAPH-2, pMycAPH-3, pMycAPH-4, or the empty vector, pcDNA3.1, along with pRcActin-lacZ (left). On the right, CEM cells were similarly cotransfected with pRcActin-lacZ, collagenase-luc, c-

Jun, c-Fos, and/or APH-4 expression vectors. Luciferase activity was measured at 48 h posttransfection. Results were normalized for β -galactosidase activity, and fold induction was calculated by dividing each luciferase activity value by values of cells transfected in the absence of expression vectors. Data represent the mean fold induction from triplicates \pm SEM. These results are a representation of three independent experiments (*, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$).

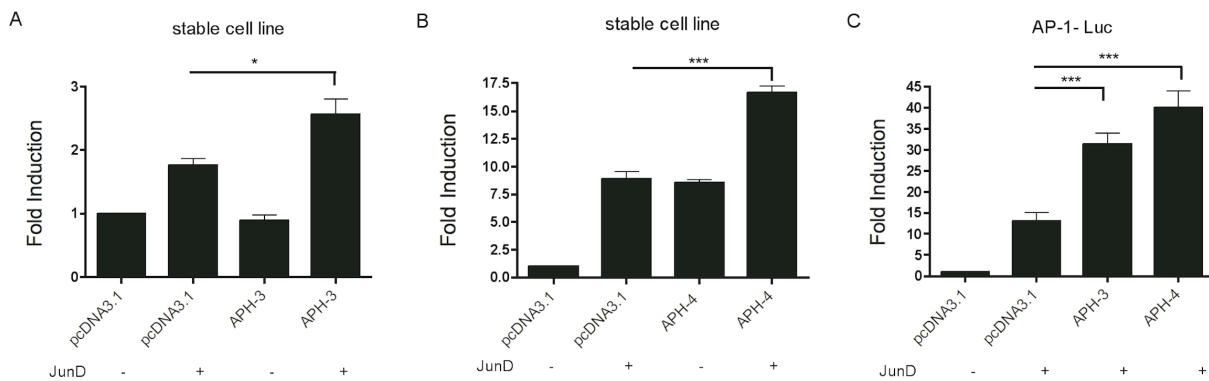


Figure 3.2. APH-3 and APH-4 activate Jun-dependent transcription in a heterologous promoter and in the environment of chromatin. (A and B) 293T cells stably transfected with the collagenase-luc construct were cotransfected with pCMVJunDFlag (or the empty vector) along with either pMycAPH-3 (A) or pMycAPH-4 (B). Forty-eight h posttransfection, cells were lysed and luciferase activity was measured. (C) pMycAPH-3, pMycAPH-4, or the empty vector (pcDNA3.1) was cotransfected in 293T cells along with pAP-1-luc, pCMVJunDFlag, and pRcActin-lacZ. Forty-eight h posttransfection, cells were lysed and luciferase activity was measured. Luciferase activity is presented as the calculated fold induction from the normalized luciferase activity of cell samples transfected with the empty expression vector (cotransfected with pAP-1-luc for panel C). These results are a representation of three independent experiments (*, $P \leq 0.05$; ***, $P \leq 0.001$).

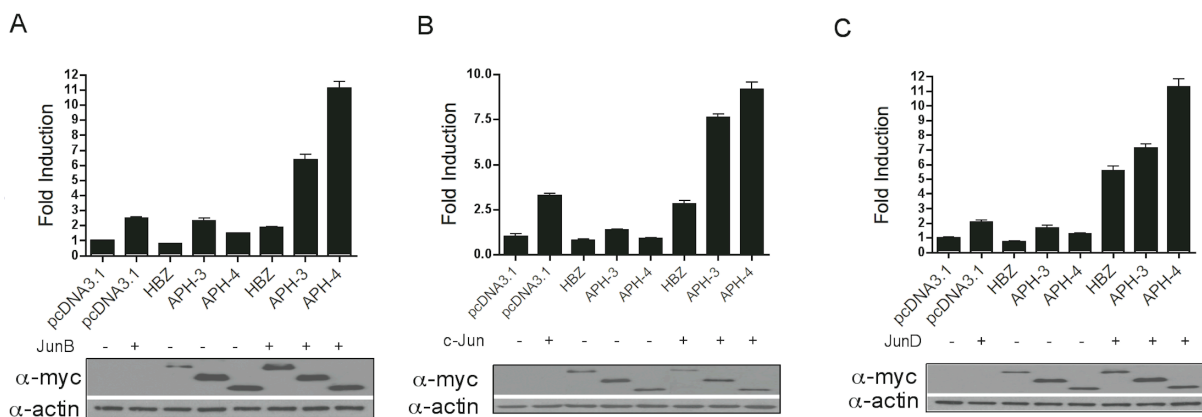


Figure 3.3. APH-3 and APH-4 augment hTERT promoter activation by Jun factors. HeLa cells were transiently cotransfected with the pGL3-378 reporter plasmid (containing the hTERT promoter) along with pHBZ-SP1-Myc, pMycAPH-3, pMycAPH-4, or pcDNA3.1 and JunB (A), c-Jun (B), or JunD (C) expression vector. The pRL-TK vector also was cotransfected for normalization of transfection efficiency. Cells were lysed 48 h posttransfection, and luciferase activity was measured and normalized for renilla luciferase activity (pRL-TK). Results are presented as the calculated fold induction from the normalized luciferase activity of cell samples transfected with the reporter construct and the empty expression vector. These results are representative of three independent experiments. In the lower panels, lysates of transfected cells were analyzed by Western blotting with anti-myc or anti- α -actin antibodies.

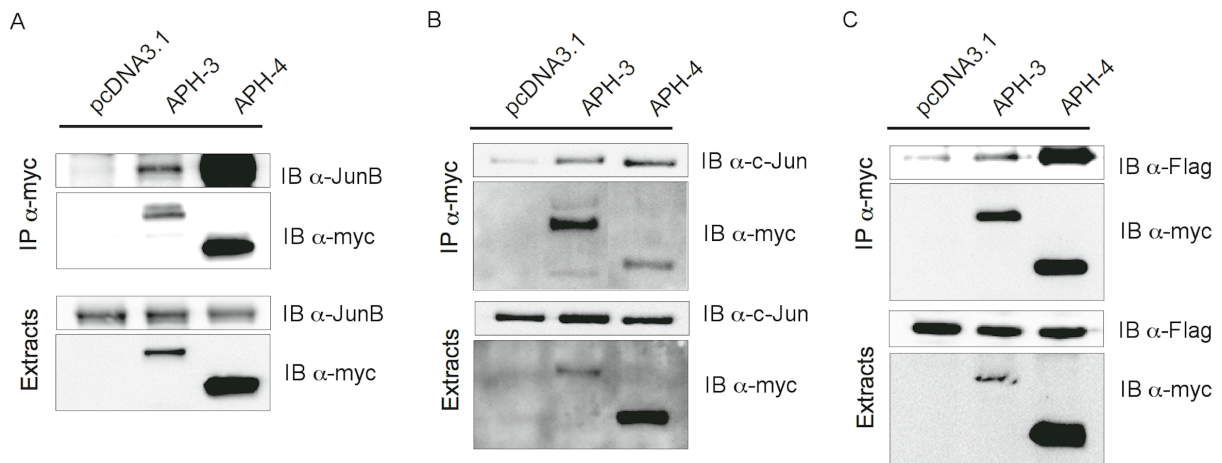


Figure 3.4. APH-3 and APH-4 interact with each Jun family member. 293T cells were cotransfected with pMycAPH-3, pMycAPH-4, or pcDNA3.1 along with expression vectors for either JunB (A), c-Jun (B), or Flag-tagged JunD (C). Forty hours posttransfection, cells were lysed and lysates were used for immunoprecipitation (IP) with an anti-myc antibody. Immunoprecipitates and cell extracts were analyzed in parallel by Western blotting using an anti-JunB, anti-c-Jun, anti-Flag, or anti-myc antibody. IB, immunoblot.

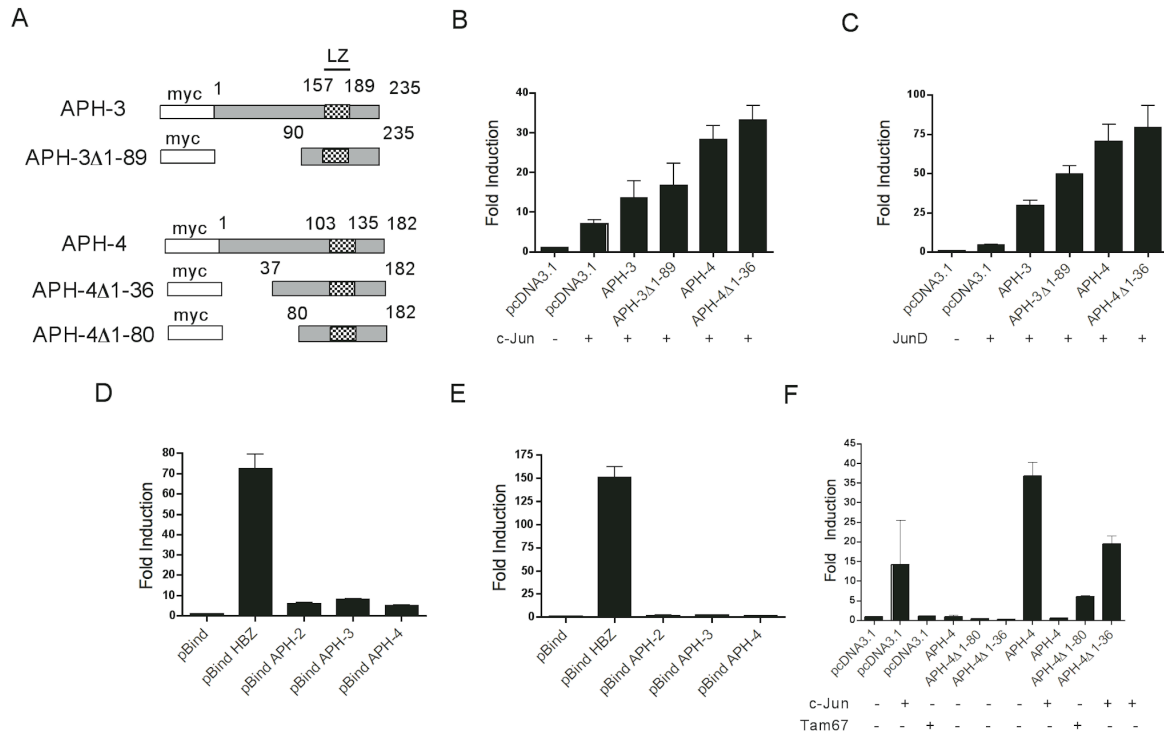


Figure 3.5. Absence of an activation domain in the N-terminal region of APH-3 and APH-4. (A to C) Expression vectors for APH-3 and APH-4 mutants deleted at their amino-terminal end (pMycAPH-3Δ1-89 and pMycAPH-4Δ1-36) were generated (A) and cotransfected in 293T cells with collagenase-luc, pcDNAc-Jun (B), or pCMVJunDFlag (C), along with pRcActin-lacZ. As a control, cotransfections also were conducted in parallel with wild-type APH-3 or APH-4 expression vector or the empty vector. At 48 h posttransfection, cells were lysed and luciferase activity was measured. Luciferase activity is presented as fold induction \pm SEM, in which the value for cells transfected with the luciferase reporter construct and empty expression vectors was set at 1. LZ, leucine zipper. (D and E) 293T (D) and CEM (E) cells were transfected with pG5-luc, pBind HBZ, pBind APH-2, pBind APH-3, pBind APH-4, or the pBind empty vector, along with pRcActin-lacZ. Cell lysates were evaluated for luciferase activity and normalized for β -galactosidase activity. Results are presented as fold induction over pBind-transfected cells and are presented as means \pm SEM. (F) CEM cells were cotransfected with collagenase-luc, pcDNAc-Jun, or pcDNAc-JunTAM67, along with pRcActin-lacZ and pMycAPH-4, pMycAPH-4Δ1-36, pMycAPH-4Δ1-80, or the empty vector, pcDNA3.1. Cell lysates were evaluated for luciferase activity and normalized for β -galactosidase activity. Results are presented as fold induction over cells transfected with the

reporter construct and empty expression vectors and are presented as the means from triplicates \pm SEM.

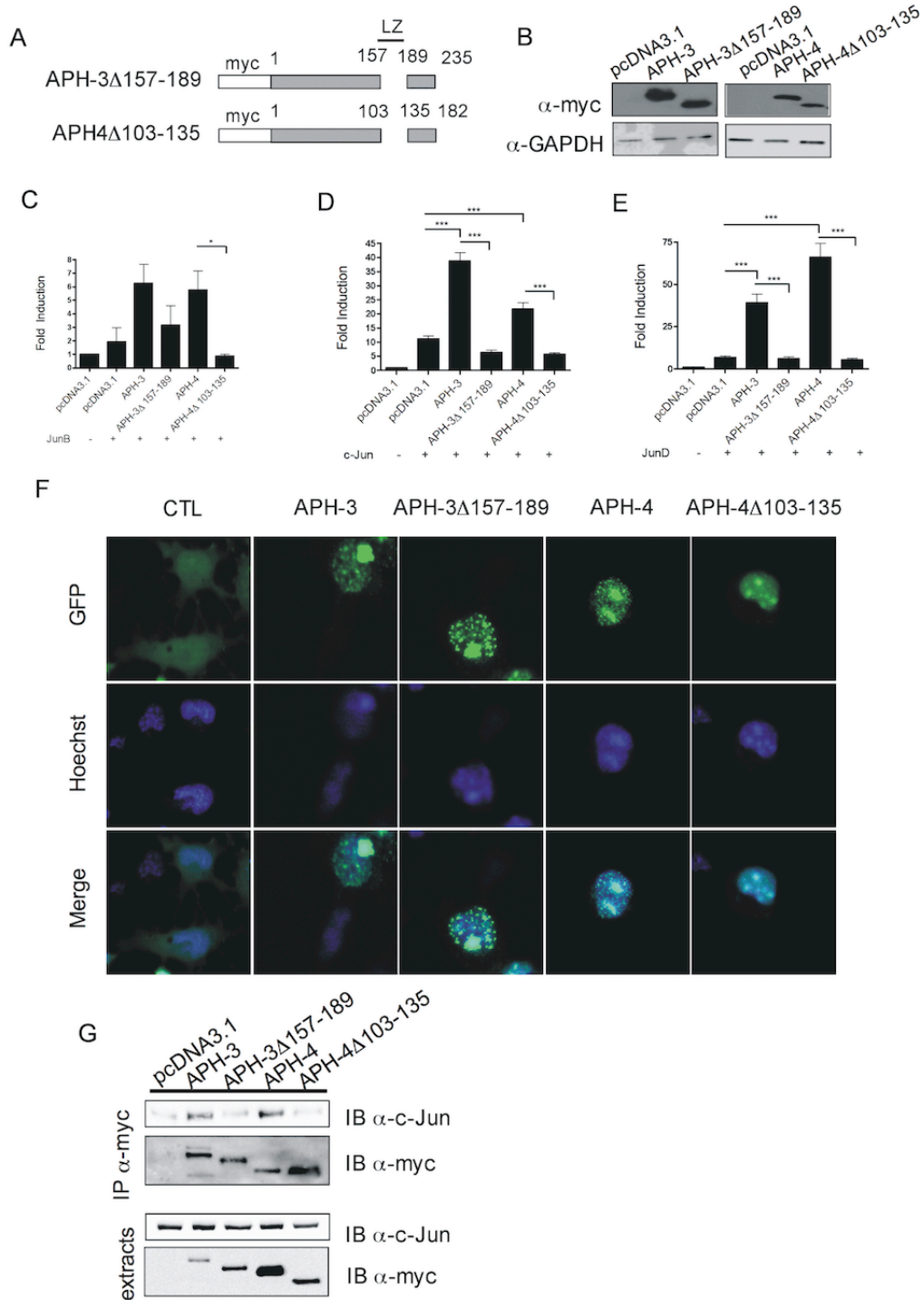


Figure 3.6. Deletion of the APH-3 and APH-4 atypical leucine zipper (LZ) region abolishes the increased transactivation potential of JunB, c-Jun, and Jun-D. (A) Expression vectors for APH-3 and APH-4 mutants deleted in their LZ domain (pMycAPH-3 Δ 157-189 and pMycAPH-4 Δ 103-135) were generated and cotransfected in 293T cells. (B) Cell lysates were prepared 48 h posttransfection from 293T cells transfected with pMycAPH-3, MycAPH-3 Δ 157-189, pMycAPH-4, pMycAPH-4 Δ 103-135, and pcDNA3.1. Western blot analysis was performed using anti-myc and anti-GAPDH antibodies. (C to E) 293T cells were cotransfected with wild-type (WT) APH-3 and APH-4 or LZ deletion mutants (pMycAPH-3 Δ 157-189 and pMycAPH-4 Δ 103-135) together with the collagenase-luc construct, pcDNAJunB (C), pcDNAc-Jun (D), or pCMVJunDFlag (E), along with pRcActin-lacZ. For controls, cotransfections were also conducted in parallel with WT APH-3 or APH-4 expression vector or the empty vector. Cells were lysed and luciferase activity was measured at 48 h posttransfection. Results were normalized by β -galactosidase activity, and luciferase activity is presented as the fold induction \pm SEM from six transfected samples, in which the value for cells transfected with the luciferase reporter construct and empty expression vectors was set at 1. (F) COS-7 cells were transfected with pAPH-3-GFP, pAPH-3 Δ 157-189-GFP, pAPH-4-GFP, pAPH-4 Δ 103-135-GFP, or peGFP-N1 (control [CTL]). Cell nuclei were labeled with Hoechst (blue) and visualized by confocal microscopy at 48 h posttransfection. GFP signals (green) are presented at the top, and merge signals are shown at the bottom. (G) Cell lysates were prepared 48 h posttransfection from 293T cells cotransfected with pMycAPH-3, MycAPH-3 Δ 157-189, pMycAPH-4, pMycAPH-4 Δ 103-135, or pcDNA3.1, along with pcDNAc-Jun. Cell lysates were immunoprecipitated using the anti-myc antibody and further analyzed in comparison to total cellular extracts by Western blotting with anti-c-Jun and anti-myc antibodies (*, $P \leq 0.05$; ***, $P \leq 0.001$).

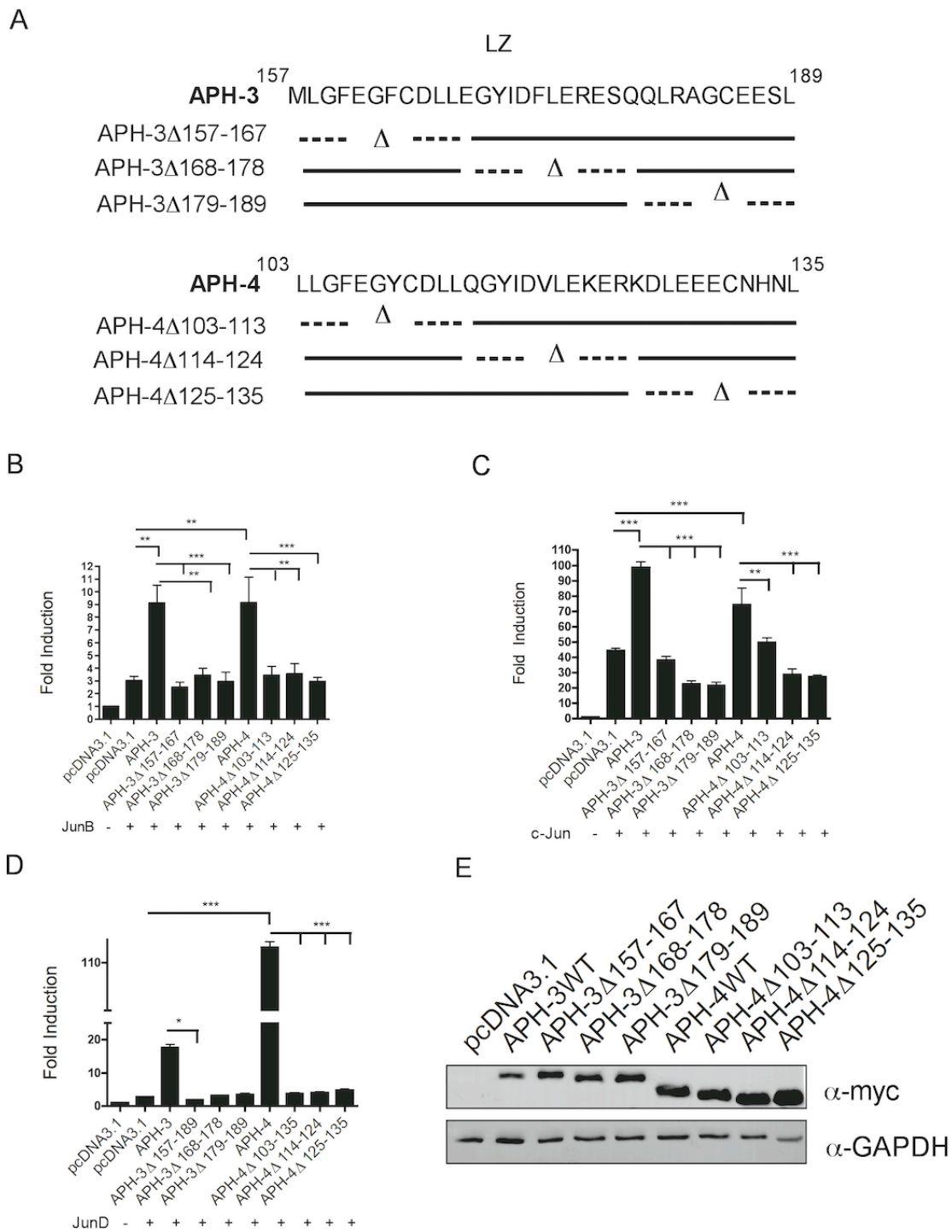


Figure 3.7. Partial deletion of the atypical LZ region of APH-3 and APH-4 inhibits the increased transactivation potential of JunB, c-Jun, and Jun-D. (A to D) Expression vectors for APH-3 and APH-4 mutants partially deleted in their LZ domain (pMycAPH-

3 Δ 157-167, pMycAPH-3 Δ 168-178, pMycAPH-3 Δ 179-189, pMycAPH-4 Δ 103-113, pMycAPH-4 Δ 114-124, and pMycAPH-4 Δ 125-135) were generated (A) and cotransfected in 293T cells with the collagenase-luc construct, pcDNAJunB (B), pcDNAc-Jun (C), or pCMVJunDFlag (D), along with pRcActin-lacZ. For controls, cotransfections were also conducted in parallel with wild-type APH-3 or APH-4 expression vector or the empty vector. Cells were lysed and luciferase activity was measured at 48 h posttransfection. Luciferase activity is presented as fold induction \pm SEM from six transfected samples, in which the value for cells transfected with the luciferase reporter construct and empty expression vectors was at 1. (E) Cell lysates were prepared 48 h posttransfection from 293T cells transfected with pMycAPH-3, pMycAPH-4, pMycAPH-3 Δ 157-167, pMycAPH-3 Δ 168-178, pMycAPH-3 Δ 179-189, pMycAPH-4 Δ 103-113, pMycAPH-4 Δ 114-124, pMycAPH-4 Δ 125-135, and pcDNA3.1. Western blot analysis was performed using anti-myc and anti-GAPDH antibodies (*, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$).

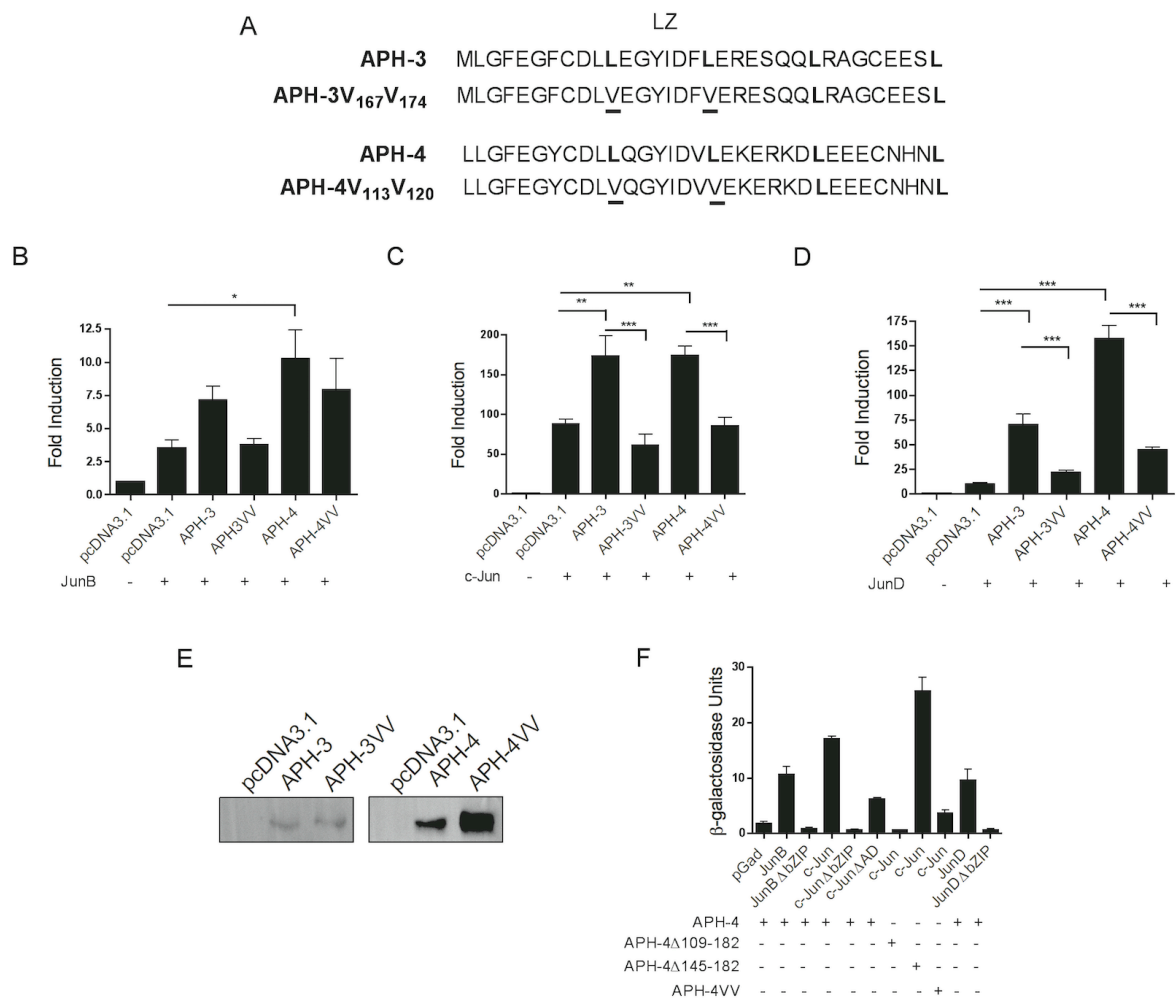


Figure 3.8. Leucine residues in the APH-3 and APH-4 atypical LZ region are important for the upregulation of Jun transactivation potential. (A to D) Expression vectors for APH-3 and APH-4 mutated at two leucine residues (pMycAPH-3_{L167L174}-VV and pMycAPH-4_{L113L120}-VV) were generated (A) and cotransfected in 293T cells with the collagenase-luc construct, pcDNAJunB (B), pcDNAC-Jun (C), or pCMVJunDFlag (D), along with pRcActin-lacZ. As a control, cotransfections were also conducted in parallel with wild-type (WT) APH-3 or APH-4 expression vector or the empty vector. Cells were lysed and luciferase activity was measured at 48 h posttransfection. Luciferase activity is presented as fold induction ± SEM from six transfected samples in which the value for cells transfected with the luciferase reporter construct and empty expression vectors was set at 1. (E) Cell lysates were prepared 48

h posttransfection from 293T cells transfected with pMycAPH-3, pMycAPH-4, pMycAPH-3L₁₆₇L₁₇₄-VV, pMycAPH-4L₁₁₃L₁₂₀-VV, or pcDNA3.1. Western blot analysis was performed using anti-myc antibodies. (F) pGAD10-based vectors expressing chimeric proteins harboring the Gal4 activation domain fused to wild-type Jun or Jun mutants were cotransformed in the *Saccharomyces cerevisiae* HF7c reporter strain along with expression vectors for WT or mutant APH-4 (APH-4 Δ 109-182, APH-4 Δ 145-182, and APH-4L₁₁₃L₁₂₀-VV) fused to the Gal4 DNA-binding domain. Pools of three independent colonies were tested for β -galactosidase activity, and results are presented as mean values \pm SEM. These results are representative of three independent experiments (*, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$).

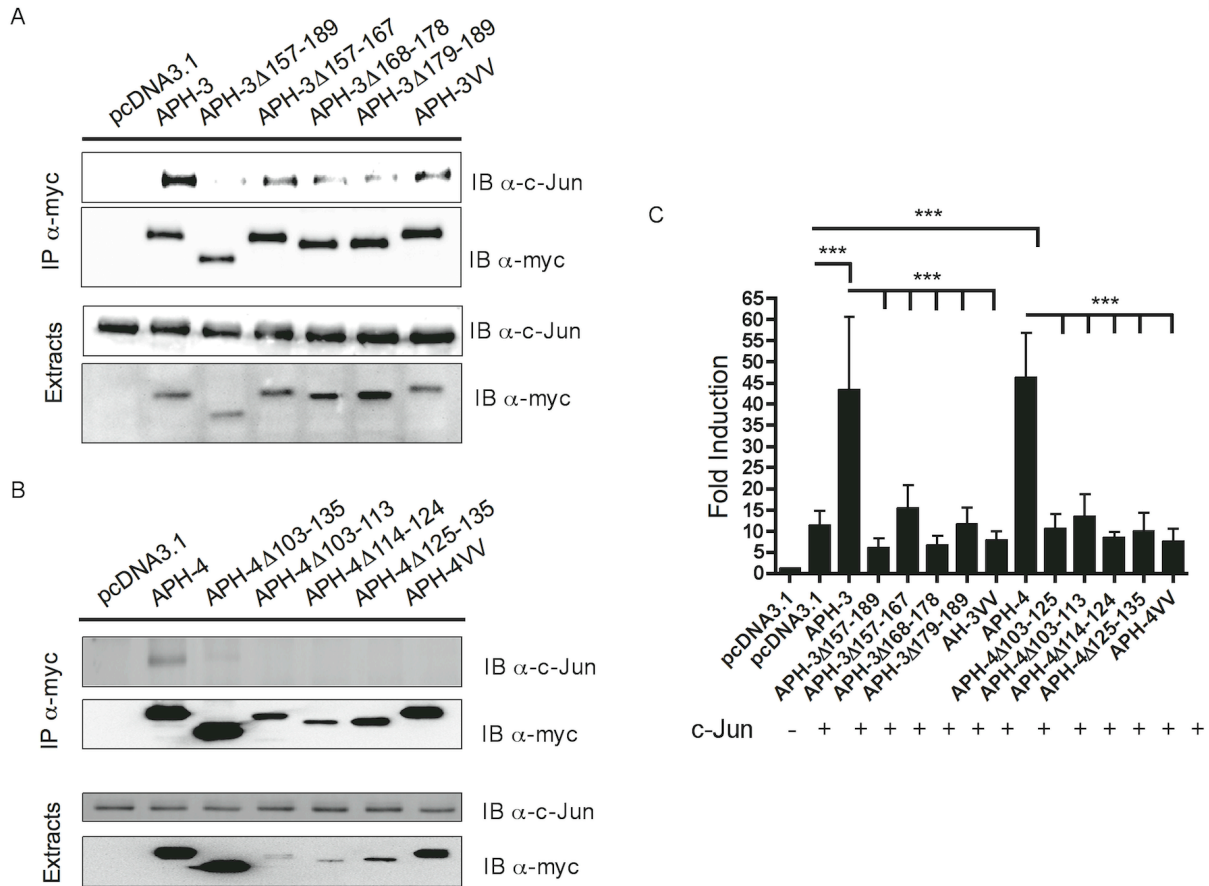


Figure 3.9. Atypical leucine zipper region in APH-3 and APH-4 is necessary for increased Jun transactivation potential and its interaction. (A and B) Cell lysates were prepared 48 h posttransfection from 293T cells cotransfected with pMycAPH-3, pMycAPH-3Δ157-189, pMycAPH-3Δ157-167, pMycAPH-3Δ168-178, pMycAPH-3Δ179-189, and pMycAPH-3L₁₆₇L₁₇₄-VV (A) or pMycAPH-4, pMycAPH-4Δ103-135, pMycAPH-4Δ103-113, pMycAPH-4Δ114-124, pMycAPH-4Δ125-135, pMycAPH-4L₁₁₃L₁₂₀-VV (or the control pcDNA3.1), and pcDNAc-Jun (B). Cell lysates were immunoprecipitated using the anti-myc antibody and further compared to total cellular extracts by Western blotting with anti-c-Jun and anti-myc antibodies. (C) pMycAPH-3, pMycAPH-3Δ157-189, pMycAPH-3Δ157-167, pMycAPH-3Δ168-178, pMycAPH-3Δ179-189, pMycAPH-3L₁₆₇L₁₇₄-VV, pMycAPH-4, pMycAPH-4Δ103-135, pMycAPH-4Δ103-113, pMycAPH-4Δ114-124, pMycAPH-4Δ125-

135, pMycAPH-4L₁₁₃L₁₂₀-VV, or pcDNA3.1 was cotransfected in 293T cells along with the expression vector for c-Jun, the collagenase-luciferase construct, and pRcActin-lacZ. Forty-eight h posttransfection, cells were lysed and luciferase activity was measured. Luciferase activity is presented as fold induction \pm SEM from six transfected samples in cells transfected with the luciferase reporter construct, and the value for empty expression vectors was set at 1. (***, $P \leq 0.001$).

Chapitre IV

HTLV-1 basic leucine zipper factor, HBZ interacts with B23 in the nucleolus

**Émilie Larocque^{a,b,c}, Célia Alecki^{a,b}, Guy Lemay^c, Jean-Michel Mesnard^d and Benoit
Barbeau^{a,b#}**

^aDépartement des Sciences Biologiques and ^bCentre de recherche BioMed, Université du Québec à Montréal, 2080 Saint-Urbain, Montréal, Québec, Canada H2X 3X8, ^cDépartement de microbiologie et immunologie, Université de Montréal, case postale 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7, ^dUniversité Montpellier 1, CNRS, UM5236, CPBS, F-34965 Montpellier, France

Contributions :

Ce troisième article a été rédigé par moi-même Émilie Larocque avec l'aide du Dr Barbeau. Les expériences ont été effectuées par moi-même. Célia Alecki a contribué aux expériences ainsi qu'au niveau scientifique. Dr Mesnard nous a aussi fourni plusieurs constructions plasmidiques. Dr Guy Lemay et Dr Mesnard nous ont fait part de leurs commentaires constructifs sur le manuscrit. Cette étude a été menée entièrement dans le laboratoire de Dr Barbeau. L'article est en préparation pour être soumis dans la revue *Journal of Molecular Biology* (facteur d'impact 3,9). Vous trouverez la bibliographie associée à cet article à la fin de la thèse dans le but de réduire la quantité de papier.

4.1. Abstract

HTLV-1 is the etiological agent of Adult T-cell leukemia (ATL) for which no curative treatment exists. HBZ is the only gene expressed in all leukemic cells and the major encoded protein, known as sHBZ (from the spliced transcript) is now being recognized as a maintenance factor. sHBZ is mainly present in the nucleus and presents a nucleolar distribution, unlike its unspliced isoform (uHBZ) or Antisense Protein of HTLV-2 (APH-2), its equivalent in the non-leukemogenic HTLV-2 virus. In the last decade, much attention has been given to the plurifunctional nature of the nucleolus and the role of nucleolar proteins in cancer. Moreover, viral proteins have been demonstrated to target the nucleoli in order to enhance their replication. We hypothesised that sHBZ nucleolar subcellular localization is important for its function. Herein we report that sHBZ interacts with nucleolar shuttling proteins B23 and C23. This interaction may govern and retain sHBZ in this nuclear subdomain. The interaction between sHBZ and B23 is mediated by the basic region found in sHBZ overlapping its three NLS. More importantly, HBZ is the only protein encoded from an antisense transcript of the HTLV family able to interact with B23. Further studies are needed to evaluate the functional significance of this nucleolar specific interaction.

4.2. Introduction

Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) is a very aggressive CD4⁺ T cell leukemia caused by the oncogenic retrovirus Human T-cell Leukemia Virus type 1 (HTLV-1). Around 2-5% of infected individuals will develop this disease or a myelopathy termed HTLV-1-associated myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP) after a latent period from 20 to 40 years (Beilke et al. 2005; Murphy et al. 1989). Current treatments have limited efficacy on patients suffering from the acute form of ATL, who have a mean survival of six months (Tamura 1996). Since the worldwide prevalence for HTLV-1 has recently been estimated to 5 to 10 million, further investigations are needed as this virus remains of public health significance (Gessain and Cassar 2012).

Tax is a transactivating protein essential for viral replication and more importantly has been demonstrated to be an important player in early cellular transformation (Cheng et al. 2012). However, as Tax is a immunodominant protein inducing a strong CTL response, the virus has evolved mechanisms to control Tax expression in order to escape immunosurveillance: hypermethylation of the 5'LTR, deletion of the 5'LTR or mutations in the Tax coding sequence are all examples of mechanism permitting to reduce Tax expression in infected cells (Matsuoka 2005). In fact, Tax is not expressed in 65% of cell samples from ATL patients (Cook et al. 2014).

The HTLV-I basic leucine zipper factor (HBZ), encoded from the minus strand of the HTLV-1 virus is always expressed in ATL cells even in situation in which the provirus is deleted, except at its 3' end (Miyazaki et al. 2007). We and others have previously demonstrated that two HBZ isoforms can be produced from this gene with one of them being most abundant and dependent on a spliced transcript (Cavanagh et al. 2006; Usui et al. 2008). Indeed, it has been estimated that sHBZ mRNA is expressed up to 4 times more than uHBZ in HTLV-1-infected cells (Usui et al. 2008). Localization studies have demonstrated that both HBZ isoforms target the nucleus, which is mediated by three nuclear localization signals (NLS), only two of which are necessary for translocation (Hivin et al. 2005). Interestingly, only sHBZ localizes to the nucleolus while uHBZ has only been seen in the perinucleolar

region associated to heterochromatin (Hivin et al. 2005; Murata et al. 2006). Thus, the two HBZ isoforms demonstrate distinct subcellular patterns.

Evidence is accumulating and strongly suggests that sHBZ is playing an important role in ATL at later stages of this multistep leukemogenesis. In fact, sHBZ transcripts are up-regulated 6-fold in ATL patients versus asymptomatic carriers and sHBZ expression correlates with proviral load, which is associated with disease development (Usui et al. 2008; Li et al. 2009; Saito et al. 2009). This hypothesis is further supported by proliferation studies showing that sHBZ silencing in HTLV-1-positive cells and ATL cell lines reduced T-cell proliferation (Arnold et al. 2008; Satou et al. 2006). Interestingly, the unspliced HBZ isoform is incapable of inducing IL-2-independent proliferation in T cells normally dependent on IL-2 for growth while sHBZ induces IL-2-independent growth (Satou et al. 2006; Yoshida et al. 2008). Recent reports have underscored that sHBZ has an oncogenic potential *in vivo* as sHBZ CD4+ T-cell transgenic mice develop T-cell lymphomas and many other symptoms related to ATL while mice injected with a sHBZ deficient virus demonstrated reduced tumor formation and organ infiltration (Satou et al. 2011; Arnold et al. 2008). Double transgenic mice for sHBZ and Tax CD4+ T-cell further supported the oncogenic potential of sHBZ (Zhao et al. 2014).

Numerous transcription factors, such as c-Jun, JunB and JunD interact with HBZ and it has been postulated that these transcription factor partners upon modulation of their transactivation potential are likely at the basis of the proliferation-inducing capacity of HBZ. Indeed, recent studies have shown that, through its activation domain, HBZ, when complexed to Sp1, can importantly induce the expression of the hTERT telomerase (Kuhlmann et al. 2007; Borowiak et al. 2013). Nonetheless, though current evidence suggests that HBZ is involved in ATL cell proliferation, a clear mechanism of action of HBZ on T cell proliferation is still severely lacking and the exact mechanism by which HTLV-1 induces ATL remains an open question.

A comparison with the related HTLV-2 virus has been an important research avenue to better understand the pathogenic characteristic of HTLV-1. HTLV-2 is clinically distinct from HTLV-1 as it has not been linked to any lymphoproliferative disorders but only to neurological diseases similar to HAM/TSP (Douceron et al. 2012; Araujo and Hall 2004; Yin

et al. 2012). We have previously demonstrated that the HBZ homologue in HTLV-2, the Antisense Protein of HTLV-2 (APH-2) is also frequently expressed in primary cells from HTLV-2-infected individuals (Halin et al. 2009). However, as opposed to HBZ, APH-2 does not induce IL-2-independent growth in IL-2-dependent T cell lines (Douceron et al. 2012). We have recently identified and characterized antisense transcripts encoding proteins termed *APH-3* and *APH-4* in the newly discovered HTLV-3 and HTLV-4 retroviruses respectively. These proteins whose *in vivo* expression remains unknown, share some similarities with sHBZ and APH-2 in the ability to inhibit 5' LTR transactivation but most importantly share great differences in AP-1 gene regulation compared to sHBZ. The pathogenic status of these two retroviruses remains unknown, as only a few infected individuals have been identified in a rural region of Cameroon (Calattini et al. 2005; Calattini et al. 2009; Wolfe et al. 2005; Zheng et al. 2010).

A striking correlation exists between nucleolar localization and the proliferative inducing capacity of various HTLV antisense proteins. Indeed, while sHBZ localizes to the nucleolus and induces proliferation in IL-2-dependent T-cell lines, APH-2 (and the usHBZ isoform) are excluded from the nucleolus and do not favor proliferation of this T-cell line. The nucleolus is a very dynamic cellular structure and in addition to its essential role in ribosome biogenesis has recently been presented as a multifunctional nuclear entity involved in many biological processes such as transcription, cell cycle control, genomic stability, cellular aging and viral infection (Pederson 1998; Pederson and Tsai 2009). Indeed, many viral proteins target cell nucleoli in order to enhance viral replication such as capsids and nucleocapsids, HIV Tat and Rev, and HTLV-1 Rex (Perkins et al. 1989; Ruben et al. 1989; Greco 2009). These targeted cellular processes usually implicate the two most abundant nucleolar phosphoproteins, B23 (also known as nucleophosmin) and C23 (also termed nucleolin) (Kang et al. 1975; Kang et al. 1974). B23 loss of function is observed in haematological diseases such as Anaplastic large-cell lymphoma (ALCL), Acute promyelocytic leukemia (APL), and Acute myeloid leukemia (AML) (Morris et al. 1994; Pandolfi 1996; Yoneda-Kato et al. 1996). Interestingly, gene microarray analysis of fresh ATL cells has identified B23 and C23 as genes associated to progression from chronic to acute ATL (Tsukasaki et al. 2004). It is therefore reasonable to suggest that these proteins could be involved in the late stages of the multistep

HTLV-1-associated leukemogenesis. We herein hypothesized that these nucleolar proteins could be implicated in HBZ-associated IL-2 independent proliferation of T cells. We have thereby investigated the nucleolar interactions of sHBZ with B23 and C23 in order to assess the potential functional significance of its nucleolar localization. We report that B23 and C23 are two new sHBZ-binding partners. The basic regions in HBZ were found to mediate this interaction and more importantly, this interaction occurred in the nucleolus. The interaction of sHBZ with B23 did not alter the strength of the interaction between B23 and C23. Importantly, no similar interactions were shown with APH-2, APH-3 and APH-4 encoded from HTLV-2, HTLV-3 and HTLV-4, respectively, however uHBZ did show the capability to form a similar interaction. B23 binding could in fact mediate the localization of sHBZ to the nucleoli and could potentially account for the capacity of sHBZ to modulate IL-2-independent T-cell proliferation.

4.3. Materials and methods

4.3.1. Cell lines

293T, COS-7 and HeLa cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (PAA Laboratories Inc., Toronto, Canada). All cell lines were cultured in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C.

4.3.2. Plasmid constructs

sHBZ-SP, uHBZ, APH-2- APH-3- and APH-4-expressing vectors have been previously described and express chimeric GFP or Myc-tagged proteins (pmyc/his-sHBZ, pmyc/his-uHBZ, pmycAPH-3, pmycAPH-4, pAPH-3-GFP and pAPH-4-GFP) (Larocque et al. 2011). The pmyc/his-HBZ Δ AD and pmyc/his-HBZ Δ AD Δ bZIP plasmids have also been previously described. The pRed-nucleolin and pRed-B23 plasmids were a generous gift from D. Archambault. Deletion mutants were generated from pRed-B23 using the PhusionTM Site-

Directed Mutagenesis Kit according to manufacturer's instructions using primers shown in Table 4.1.

4.3.3. Cell transfection

Cells were plated one day before transfection in 24-well plates or 10cm dishes. Approximately 5×10^4 COS-7 and 10×10^6 293T cells were co-transfected using the poly(ethylenimine) (P.E.I) reagent with 0.25ug and 6ug of DNA, respectively, in a 1:9 DNA:P.E.I ratio (Polysciences Inc). After 6 to 12 hours, the media was replenished. Cells were lysed either 24hr or 48hr post-transfection according to the following experiments.

4.3.4. Immunofluorescence microscopy analysis

Twenty four or forty-eight hours post-transfection, cells were washed three times with PBS and fixed with PFA 4% followed by permeabilization with 0.5% Triton. Cells were incubated with anti-myc 9E10 (Santa Cruz) and/or mouse anti-fibrillarin 17C12 antibody (Yang et al. 2001) followed by a goat anti-rabbit IgG coupled to Alexa Fluor 488, a goat anti-mouse IgG coupled to Alexa Fluor 488 or goat anti-mouse IgG coupled to Alexa Fluor 594 (Life technologies). Cells were incubated with DAPI for 5 min and coverslips were then mounted in ProLong Antifade reagent. Samples were observed at room temperature with a 60x objective under oil immersion and with a numerical aperture (NA) of 1.4 with a Nikon A1 laser scanning confocal microscope (Nikon Canada, Mississauga, Canada).

4.3.5. Co-immunoprecipitation experiments

Forty-eight hours post-transfection, cells were lysed with 50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA and 1% Triton. Immunoprecipitation was performed using Dynabeads Protein G (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Briefly, 40 ml of Dynabeads Protein G (Invitrogen) was incubated 30 min at room temperature with 5 mg of

anti-myc antibody or 4 mg of anti-B23 antibody. Total cell extracts were then incubated overnight at 4°C with the antibody-bead complex. Bound fractions were eluted with 20 ml of loading buffer and then separated using a 12% SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane (Millipore, Mississauga, Canada). Membranes were blocked in PBS/5% milk or PBS/0.3% BSA and incubated with anti-B23 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz CA) (1:500), anti-C23 (Santa Cruz Biotechnology Inc) (1:500), anti-Red (Santa Cruz Biotechnology Inc.) (1/1000) or anti-myc (dilution 1:250) antibodies. After several washes, membranes were incubated with HRP-conjugated sheep anti-rabbit IgG antibodies (1:5000) or anti-mouse IgG antibodies (1:5000), washed again several times and incubated with the BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD). Membranes were analyzed using the Fusion FX7 device.

4.4. Results

4.4.1. sHBZ and uHBZ interact *in vivo* with the nucleolar protein B23.

Previous localization studies have demonstrated that sHBZ localises in the nucleus as speckles in addition to a clear nucleolar localization. uHBZ demonstrates a similar nuclear pattern, although it does not localise predominantly to the nucleoli, but rather shows a strict perinucleolar localization. While sHBZ has been demonstrated to interact with many cellular partners, most of them containing bZIP motif, protein interactions with nucleolar proteins have never been reported previously. Herein, we first tested if HBZ could interact with the multifunctional and major nucleolar phosphoprotein B23. 293T cells were hence co-transfected with a sHBZ or uHBZ expression vector along with a vector expressing a RedB23 fusion protein. Forty eight hours post transfection, cell lysates were subjected to immunoprecipitation using an anti-myc antibody. As seen in Figure 4.1A, immunoprecipitation of sHBZ or uHBZ lead to detection of endogenous B23 and RedB23 indicating that both isoforms were capable of interacting with nucleolar protein B23 *in vivo*. To further support this result, immunoprecipitation was also performed using an anti-B23 antibody. Again, sHBZ was detected along with the immunoprecipitated B23 (Figure 4.1B).

This result most importantly demonstrated that this interaction is specific and is not attributed to non-specific co-immunoprecipitation along with DNA since the DNA binding domain found in HBZ is not functional. The interaction between sHBZ and endogenous B23 was also confirmed in HeLa cells (data not shown). We then verified if sHBZ and uHBZ could co-localize with B23 by confocal microscopy. When sHBZ and uHBZ were expressed in COS-7 cells, a typical subcellular pattern was observed; although both HBZ isoforms were distributed in nuclear speckles, as expected, only sHBZ localized to the nucleolus, while uHBZ was rather perinucleolar (Figure 4.1C, upper panels). When sHBZ and uHBZ were co-expressed together with RedB23, a partial colocalization was visualized between sHBZ/uHBZ and B23 in the nucleoli (Figure 4.1C, lower panels). We also found that sHBZ was more prominent in the nucleoli when B23 was overexpressed while, in a small proportion of cells, uHBZ seemed to be relocalized from the perinucleolar region to the nucleolar region in which B23 was present, although the majority showed no co-localization. These results were both observed with GFP fusion proteins or myc-tagged proteins implying that the tag was not implicated in the observed results (Figure 4.1D-E).

These results hence first demonstrate that the two different isoforms of HBZ were interacting (directly or indirectly) with B23 and that their nuclear/nucleolar distribution seemed consequently partially affected.

4.4.2. Antisense-transcript encoded protein from HTLV-2, HTLV-3 and HTLV-4 are not capable of interacting with B23.

We next sought out to determine if B23 could interact with antisense-transcript-encoded proteins of HTLV-2, HTLV-3 and HTLV-4 since we and others have demonstrated that they shared similar cellular partners, albeit with different outcomes (Marban et al. 2012; Larocque et al. 2014). 293T cells were thus transfected with expression vectors for myc-tagged sHBZ, APH-3 and APH-4. Interestingly, B23 only co-immunoprecipitated sHBZ (Figure 4.2A). Co-immunoprecipitation of B23 was also tested with GFP-fused HTLV antisense proteins including APH-2. Again, B23 was only able to be co-immunoprecipitated with sHBZ and uHBZ (data not shown). However, these results were unexpected as they did

not agree with our confocal microscopy results for APH-3 and APH-4 since, in transfected COS-7 cells both APH-3 and APH-4 co-localized with B23 in the same subcellular compartment of the nucleoli (Figure 4.2C), as opposed to APH-2 which is excluded from nucleoli (Halin et al. 2009).

4.4.3. sHBZ interacts with another major nucleolar protein, C23.

To identify specific interactions between sHBZ and other nucleolar proteins, we tested if sHBZ could also interact with C23 (also known as nucleolin). Extracts from 293T cells transiently expressing sHBZ were immunoprecipitated with an anti-myc antibody and signals specific to C23 and B23 were detected along with sHBZ (Figure 4.3A). We were also able to co-immunoprecipitate C23 with uHBZ (data not shown). Using confocal microscopy, these proteins were observed to be present in the same compartment. Interestingly, sHBZ and RedC23 both localized in the nucleoli; however, and surprisingly, their signals did not merge indicating no co-localisation (Figure 4.3B). When transfected cells were analysed at a later time point (48 h), however, both sHBZ and uHBZ colocalized in nucleoli with C23 (Figure 4.3C). For comparison, we next compared the nucleolar localisation of sHBZ and uHBZ with endogenous fibrillarin. As expected, sHBZ poorly co-localized with endogenous fibrillarin in the nucleoli, while the signal for uHBZ was excluded from the fibrillarin signal (Figure 4.3D).

These results hence demonstrated that C23 also co-immunoprecipitated with both HBZ isoforms, although co-localization with C23 was not evident at early time point, as assessed by confocal microscopy.

4.4.4. sHBZ does not affect the interaction between B23 and C23.

Previous studies have demonstrated that B23 can interact with C23 and shuttle C23 to the nucleolus (Li et al. 1996; Liu and Yung 1999). We were hence interested in evaluating if sHBZ could impact the interaction between B23 and C23. 293T cells were transfected with increasing amounts of the sHBZ expression vector and extracts were subjected to immunoprecipitation using an anti-B23 antibody. As shown in figure 4.4, we found that the

amount of C23 co-immunoprecipitated along with B23 was not altered in the presence of sHBZ, regardless of the expression level.

4.4.5. sHBZ does not interact with B23 through its HoD or HeD domains.

B23 possesses many functional domains. The homo-oligomerization domain termed HoD spans amino acid 1 to 120, while the heterodimerization domain (HeD) and the RNA binding domain are present from residues 187 to 259 and residues 257 to 294, respectively (Okuwaki 2008). In order to better characterize the interaction between B23 and sHBZ, deletion mutants of B23 were generated and the co-localization with sHBZ was assessed by confocal microscopy. As seen in Figure 4.5, sHBZ localized to nucleoli when co-expressed with B23 mutants either deleted of its HoD or HeD domain. Interestingly, B23 deleted of its RBD could still localize in the nucleoli which was unexpected, and approximately half the cells showed co-localization of sHBZ to the nucleoli while the other half was excluded from the nucleolus (Figure 4.5B). Figure 4.5A shows that these three deletion mutants were also able to be co-immunoprecipitated along with sHBZ although the RBD deletion mutant demonstrated a weaker interaction. The HoD and HeD domains are thus not necessary for the nucleolar localisation of sHBZ while further studies need to better determine the role of the RBD in the sHBZ/B23 interaction.

4.4.6. The interaction between sHBZ and B23 or C23 is dependent on its nucleolar localization.

sHBZ contains an activation domain (AD) located in its amino terminal region and a bZIP motif in its carboxyl end. Both domains have been found to be implicated in many of its protein interactions (Gaudray et al. 2002; Reinke et al. 2010b; Clerc et al. 2008; Zhao et al. 2011). For this reason, we tested the interaction between sHBZ, B23 and C23 using a sHBZ version deficient for the AD and bZIP domains (without deleting basic regions BR2 and BR1) encoding for the HBZ protein from residues 77 to 206 and 77 to 132 respectively.

Immunoprecipitation was performed in 293T cells transfected with expression vectors for sHBZ, sHBZ Δ AD or sHBZ Δ AD Δ bZIP and as seen in Figure 4.6A, both B23 and C23 were still able to co-immunoprecipitate with sHBZ Δ AD or sHBZ Δ AD Δ bZIP. More importantly, the mutant deleted of its AD and leucine zipper domains seemed to significantly enhance the abundance of immunoprecipitated B23 and C23, which is consistent with our previous studies showing a major nucleolar localization of HBZ mutants deleted of their leucine zipper motif and activation domain (Hivin et al. 2005). To further address this, we evaluated the co-localisation of sHBZ WT or a version deleted of its AD and bZIP motif with B23 and C23. Interestingly, not only was the signal for sHBZ more prominent in the nucleoli when deleted of its AD and bZIP, but we also observed that the signal for sHBZ merged to much greater levels with the signal for B23 and C23.

These results hence suggested that typical interaction domain of sHBZ are involved in B23-HBZ interaction.

4.5. Discussion

DNA and RNA viruses have been found to either traffic to the nucleolus, relocalize nuclear cellular components into the cytoplasm, or import cytoplasmic cellular components into the nucleus or nucleolus in order to enhance viral fitness (Hiscox 2002; Greco 2009). The sHBZ isoform is an HTLV-1 protein involved in inhibiting viral replication and inducing ATL in infected patients (Matsuoka and Yasunaga 2013). Although sHBZ predominantly localizes to the nucleolus in ATL cells (Murata et al. 2006), the association between its function and its nucleolar localisation has never been studied. In this report, we have identified B23 (NPM) as a new interacting partner for HBZ. This interaction is not mediated by HoD or HeD of B23. However, the basic regions of sHBZ which encompasses two of its NLS motifs were found to be important for this interaction. Moreover, B23 expression leads to sHBZ and uHBZ partial relocalization to the nucleolus.

B23 has been shown to be a tumour suppressor and B23 loss of function caused by chromosome translocation, frameshifts or deletions is observed in haematological diseases such as Anaplastic large-cell lymphoma (ALCL), Acute promyelocytic leukemia (APL), and Acute myeloid leukemia (AML) (Morris et al. 1994; Pandolfi 1996; Yoneda-Kato et al. 1996; Kurki et al. 2004). On the other hand, B23 is also considered to be oncogenic (Yung 2007). B23 was originally demonstrated to regulate cell proliferation as its expression is induced in stimulated T and B lymphocytes while it is induced to even greater levels in malignant cells (Feuerstein and Mond 1987; Feuerstein et al. 1988). Furthermore, increased B23 expression was observed in various types of cancer (ovarian, prostate, colon, bladder, etc.) (Shields et al. 1997; Subong et al. 1999; Tsui et al. 2004). Hence, B23 is a multifunctional nucleolar protein, which contributes to tumorigenesis by various mechanisms (Grisendi et al. 2006).

Retroviral proteins, such as HTLV-1 Rex and HIV-1 Rev and Tat have all been associated with B23 (Adachi et al. 1993; Fankhauser et al. 1991; Li 1997). Our first goal was hence to verify if sHBZ could interact with B23. By co-immunoprecipitation experiments, we detected the formation of a complex between sHBZ and B23 *in vivo*. As sHBZ and uHBZ present different subcellular distributions, we did not expect uHBZ to interact with B23. Although this interaction seemed weaker, we are unable to confirm that this interaction is indeed weaker due to its lower expression level, when compared to sHBZ. To better understand these interactions, we further analysed the subcellular distribution of sHBZ and uHBZ in the presence of B23 by confocal microscopy. When expressed alone, sHBZ and uHBZ demonstrated a typical subcellular pattern previously described as nuclear speckles and a nucleolar localization strictly for sHBZ; however, when B23 was over-expressed along with sHBZ and uHBZ, sHBZ seemed to localize to nucleoli to a greater extent in conjunction with a partial co-localisation with B23, while we were able to observe a nucleolar localization for uHBZ in a small amount of cells. These results suggest that B23, being a shuttling protein, may traffic HBZ to nucleoli and/or cause its retention in a similar manner to other cellular and viral proteins, such as HIV-1 Tat (Li 1997; Greco 2009). sHBZ might have therefore evolved different mechanisms to transit from one cellular compartment to the other in order to perform compartment-specific functions: it can localize to the nuclei via its NLS and inhibit HTLV-1 transcription, it can transit to the nucleoli by interacting with B23 where its function remains

unknown and it can be exported to the cytoplasm using its NES to activate mTOR signalling pathway (Mukai and Ohshima 2014). As the two HBZ isoforms only differ in their first four amino acids, it is logical that both have the potential to interact with B23. Moreover, our results support that sHBZ might more easily transit to the nucleoli in comparison to uHBZ consistent with the proposed hypothesis that uHBZ might be retained in the nucleoplasm due to a protein interaction mediated by a more reactive N-termini (Murata et al. 2006). However, our results suggest that overexpression of B23, leads to a weak nucleolar localization of uHBZ suggesting that this interaction might be able to counteract this nucleoplasmic binding partner due to B23 increased shuttling and consequent retention in this nuclear region (Emmott et al. 2008).

Moreover, we also demonstrated that sHBZ and uHBZ are the only HTLV antisense proteins capable of interacting with B23 as APH-2, APH-3 and APH-4 were unable to coimmunoprecipitate B23 regardless of the fact that APH-3 and APH-4 shared the same nucleolar compartment as B23. Thus, APH-3 and APH-4 are using an alternate mechanisms in order to shuttle to the nucleolus which stills needs to be determined. In this case, various nucleolar interacting partners need to be assessed such as nucleolin. It is currently unknown if APH-3 and APH-4 induce IL-2-independent T-cell proliferation and it is therefore difficult to determine the physiological significance of their localization. A recent study did suggest an oncogenic potential for APH-3 as its expression in a Rat fibroblast cell line was able to induce, although very weakly, foci formation in soft agar (Turpin et al. 2014). However, if we strictly analyse sHBZ, uHBZ and APH-2, these results suggest that a nucleolar distribution and a strong interaction with B23 might be essential characteristics for HBZ to induce T-cell proliferation.

Nucleolar protein C23 plays a crucial role in cell proliferation and survival (Ugrinova et al. 2007). We report herein that sHBZ can also interact with C23 while observing colocalization in a very limited window of time. Interestingly, at 48 h post-transfection, sHBZ colocalized partially with endogenous fibrillarin while uHBZ did not colocalize, which is found in the same nucleolar compartment as C23 (de Carcer and Medina 1999; Spector et al. 1984). However, when C23 was overexpressed, both proteins could colocalize in the nucleoli.

Another study has previously reported that sHBZ partially colocalized with endogenous C23, while uHBZ did not (Murata et al. 2006). These results further support that overexpression of C23 or B23 is able to partially re-localize and or retain sHBZ and uHBZ to the nucleoli. Moreover, we hypothesize that the interaction between sHBZ and C23 could be cell-cycle dependent as it has been reported for B23 and C23 whereby their interaction could only be shown during interphase and cytokinesis when the nucleoli is still intact (Liu and Yung 1999). Performing CoIP and confocal microscopy experiments in synchronized cells at different time points of the cell cycle would enable us to determine if this is indeed the case.

As stated above, B23 interacts with C23 although these two nucleolar proteins are not usually found in the same nucleolar compartment: C23 is mainly located in the dense fibrillar component (DFC) while B23 is concentrated in the granular component (GC) (Spector et al. 1984; Biggiogera et al. 1989). One of the mechanisms associating B23 to cell proliferation is its capacity to regulate ribosome biogenesis (Grisendi et al. 2006). B23 has an endoribonuclease activity, it is involved in ribosome assembly and also can export maturing pre-ribosomal particles to the cytoplasm (Olson et al. 1986; Prestayko et al. 1974; Dumbar et al. 1989; Savkur and Olson 1998; Herrera et al. 1995). C23 is also involved in ribosome biogenesis by cleaving pre-rRNA, folding of pre-rRNA, shuttling ribosomal components to the cytoplasm and more importantly regulating RNA pol I transcription (Ginisty et al. 1998; Allain et al. 2000; Borer et al. 1989; Rickards et al. 2007; Storck et al. 2009). It is postulated that due to their close proximity in nucleoli, together they regulate ribosome biogenesis (Liu and Yung 1999). As we demonstrated that sHBZ could interact with B23 and C23, we have evaluated if sHBZ could interfere with their interaction. We were unable to detect any differences in the amount of C23 co-immunoprecipitated along with B23 in the context of increasing levels of sHBZ. Although the precise functional role of the interaction between B23 and C23 is still undetermined, the possibility of a ternary complex between sHBZ, B23 and C23 still needs to be evaluated and the possible involvement of this interaction in ribosome biogenesis still needs to be assessed.

To better understand the interaction between B23 and sHBZ, we sought to determine which regions of B23 were responsible for sHBZ binding. B23 has an oligomerisation domain

in its N-termini which leads to formation of stable hexamers *in vivo* (Hingorani et al. 2000; Yung and Chan 1987). B23 also has a heterodimerization domain (HeD), which is often the binding site of other cellular proteins such as C23 (Li et al. 1996). The presence of a RNA binding domain (RBD) with two critical tryptophan residues is associated with its nucleolar localisation (Nishimura et al. 2002). Many protein such as C23, will bind to the HeD domain in order to be targeted to the nucleolus (Li et al. 1996). We therefore tested B23 mutants deleted of their HoD or HeD domain and demonstrated that sHBZ could still co-localize and interact with these B23 mutants. These results further confirm that sHBZ does not compete for C23 binding to B23 and supports the possibility of a ternary complex (Li et al. 1996). On the other hand, B23 deleted of its HoD can also colocalize and interact with sHBZ. This result is unexpected as B23 oligomerization has been shown to correlate with its nucleolar accumulation (Enomoto et al. 2006). The mutant deleted of the RBD domain was also able to interact with sHBZ although at a weaker level. Unexpectedly, this deletion mutant demonstrated a nucleolar localization, despite a previous report having shown that the RBD domain is closely associated to its nucleolar localization (Okuwaki 2008). However, endogeneous expression of B23.1 might form oligomers directed through the HoD and redirect this mutant to the nucleolus. The HBZ domain needed for B23 interaction was equally examined. Interestingly, the HBZ mutant deleted of its AD domain and bZIP interacted in a stronger manner with B23, suggesting that interactions with other cellular proteins through these domains may compete for the HBZ-B23 interaction (Hivin et al. 2005). In addition, this mutant colocalized entirely with B23. Indeed, a previous report has demonstrated that uHBZ deleted of its AD or ZIP motif more intensely localize to the nucleolus and that HBZ-NB (nuclear body) formation in the nucleoplasm is dependent on LZ and bZIP binding partners (Hivin et al. 2005; Hivin et al. 2007). Hence, the binding region most likely consists of the basic regions BR2 and BR1 found in HBZ consistent with the previous hypothesis that the NoLS found in HBZ might overlap with its NLS motifs (Hivin et al. 2007). We verified the interaction between B23 and a series of mutants containing the three basic regions alone or in different combinations fused to GFP protein. These results were unfortunately inconclusive, most likely due to improper folding of these GFP-fusion proteins and although expressed, might not be functional proteins (data not shown). We were therefore not able to further

characterize the binding region. More importantly, our results suggest that this interaction is specific to the nucleoli identifying a nucleolar binding partner for the first time.

In conclusion, targeting the nucleolus could represent another strategy by HBZ to inhibit viral replication as viruses often target B23 and C23, and/or could play an important role in T-cell proliferation, as B23 is frequently deregulated in multiple hematological malignancies. Herein, we propose the sHBZ is targeted to the nucleoli by interacting with a nucleolar protein such as B23 and/or C23, and once in the nucleoli, sHBZ modulates B23 and/or C23 downstream effectors such as ribosome assembly or tumor suppressors, thereby modulating normal cell cycle functions. Spatial proteomic analyses measuring subcellular distribution of the proteome in sHBZ-expressing cells would lead to a better understanding of its compartment specific function by identifying these modulated downstream effectors as the nucleolus is a very dynamic substructure where proteins such as cell cycle proteins constantly shuttle in and out and can be tightly regulated (Boisvert et al. 2010).

Table 4.1. Primers used to generate the pRed-B23 deletion mutants

Name	Primers
Δ HoD	Forward 5'- GCTGTGGAGGAAGATGCAGA -3' Reverse 5'- GTA CCG TCG ACT GCA GAA TTC -3'
Δ HeD	Forward 5'- TCT CTT CCC AAA GTG GAA GCC -3' Reverse 5'- AGCTTCCTCATCATCAAAATCATCA -3'
Δ NoLS	Forward 5'- TAATCTAGAGGATCCACCGGATCT -3' Reverse 5'- ACCACCTTTTTCTATACTTGCTTGC -3'

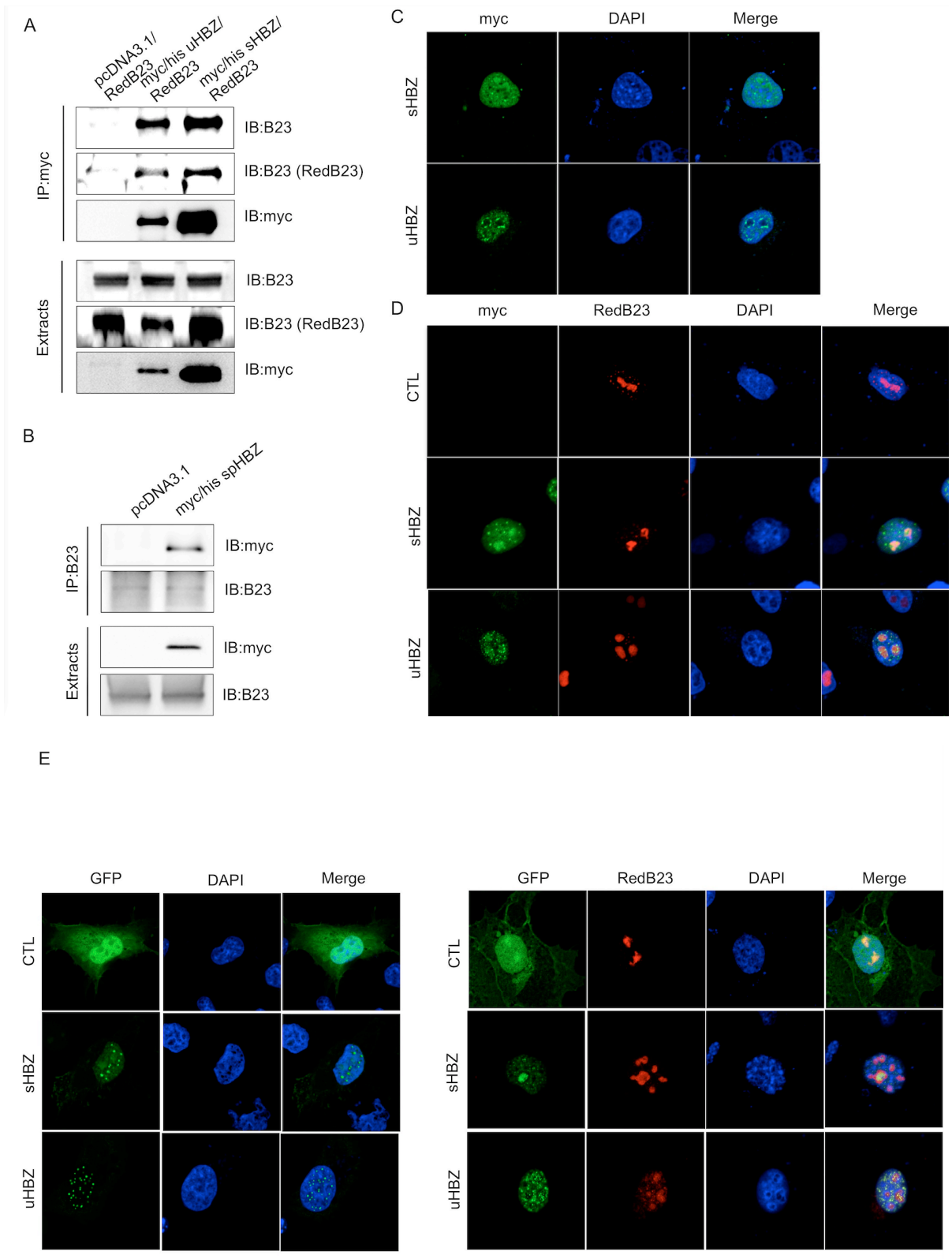


Figure 4.1. sHBZ and uHBZ interact *in vivo* with the nucleolar protein B23. (A) 293T cells were co-transfected with pRedB23 and with pmyc/his-sHBZ, pmyc/his-uHBZ or pcDNA3.1. Forty-eight hours post-transfection, cells were lysed and lysates were used for immunoprecipitation with an anti-myc 9E10 antibody. Immunoprecipitates and cell extracts were analyzed in parallel by Western blot using an anti-B23 or anti-myc antibody. (B) Forty-eight hours following transfection with pmyc/his-sHBZ or pcDNA3.1, transfected 293T cells were lysed and lysates were used for immunoprecipitation with an anti-B23 antibody. Immunoprecipitates and cell extracts were analyzed in parallel by Western blot using an anti-B23 or anti-myc antibody. (C-D) COS-7 cells were grown on coverslips and transfected with pmyc/his-sHBZ, pmyc/his-uHBZ or pcDNA3.1 alone or with pRedB23. At 48 h post-transfection, cells were fixed with PFA 4% and permeabilized with 0,5% triton. Cells were incubated with an anti-myc 9E10 antibody followed by goat anti-mouse IgG coupled to Alexa Fluor 488 and DAPI staining. Samples were observed with a x60 objective under oil immersion and with a numerical aperture of 1.4 with a Nikon A1 laser scanning confocal microscope. Merge signals are presented in right panels. (E) COS-7 cells were grown on coverslips and transfected with pEGFP-C1-sHBZ, pEGFP-C1-uHBZ or pEGFP-C1 alone or along with pRed-B23. After 24 h, cells were fixed with PFA 4% and permeabilized with 0,5% triton followed by DAPI staining. Coverslips were then mounted in ProLong Antifade reagent. Samples were observed with a x60 objective under oil immersion and with a numerical aperture of 1.4 with a Nikon A1 laser scanning confocal microscope.

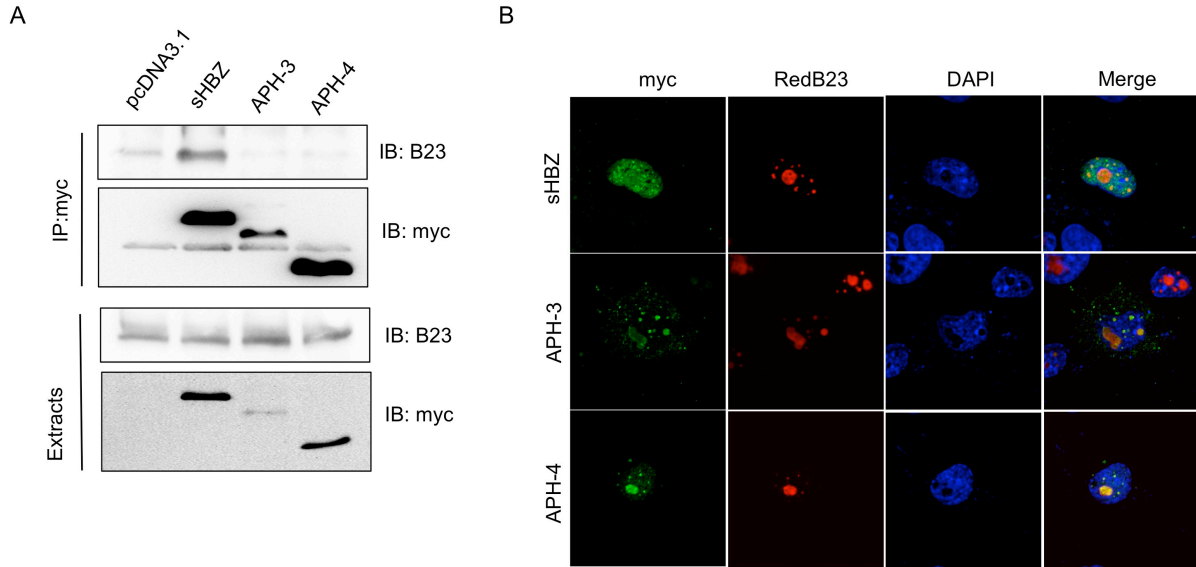


Figure 4.2. Antisense protein of HTLV-3 or -4 colocalize with B23 but do not interact with B23. (A) 293T cells were co-transfected with pmyc/his-sHBZ, pmyc-APH-3, pmyc-APH-4 or pcDNA3.1. Forty-eight hours post-transfection, cells were lysed and lysates were used for immunoprecipitation with an anti-myc E910 antibody. Immunoprecipitates and cell extracts were analyzed in parallel by Western blot using an anti-B23 or anti-myc antibody. (B) COS-7 cells were grown on coverslips and transfected with pmyc/his-sHBZ, pmycAPH-3, or pmycAPH-4 and pRed-B23. After forty-eight hours, cells were fixed with PFA 4% and permeabilized with 0.5% Triton. Cells were incubated with an anti-myc 9E10 antibody followed by a goat anti-mouse IgG coupled to Alexa Fluor 488. Cells were incubated with DAPI and coverslips were then mounted in ProLong Antifade reagent. Samples were observed with a 60x objective under oil immersion and with a numerical aperture of 1.4 with a Nikon A1 laser scanning confocal microscope. Merge signals are presented in right panels.

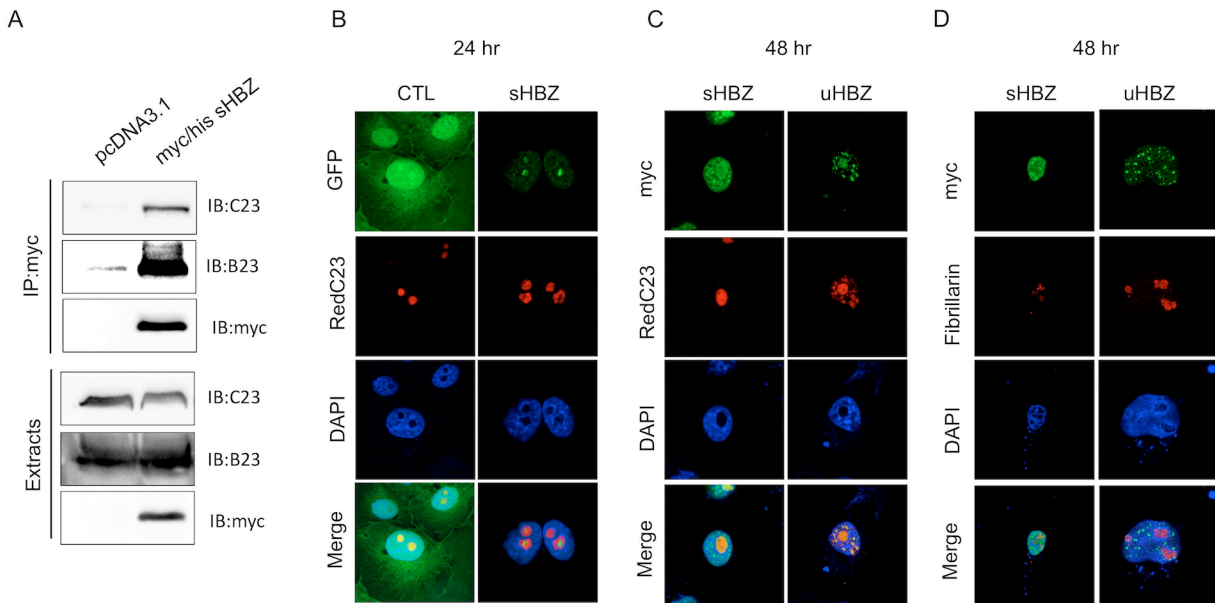


Figure 4.3. sHBZ interacts with another major nucleolar protein, C23. (A) 293T cells were co-transfected with pcDNA3.1 or pmyc/his-sHBZ. Forty-eight hours post-transfection, cells were lysed and lysates were used for immunoprecipitation with an anti-myc 9E10 antibody. Immunoprecipitates and cell extracts were analyzed in parallel by Western blot using an anti-C23, anti-B23 or anti-myc antibody. (B-D) COS-7 cells were grown on coverslips and transfected with pEGFP-C1-sHBZ or pEGFP-C1 and pRed-C23 (B), pmyc/his-sHBZ, pmyc/his-uHBZ or pcDNA3.1 together with pRed-C23 (C), pmyc/his-sHBZ, pmyc/his-uHBZ or pcDNA3.1 (D). After twenty-four hours, cells were fixed with PFA 4% and permeabilized with 0.5% Triton followed by DAPI staining. Cells were incubated with an anti-myc 9E10 antibody followed by goat anti-mouse IgG coupled to Alexa Fluor 488 (C) or anti-myc 9E10 (rabbit) antibody and an anti-fibrillarin antibody (mouse) followed by goat anti-rabbit IgG coupled to Alexa Fluor 488 and goat anti-mouse IgG coupled to Alexa Fluor 594 (D). Coverslips were then mounted in ProLong Antifade reagent. Samples were observed with a 60x objective under oil immersion and with a numerical aperture of 1.4 with a Nikon A1 laser scanning confocal microscope.

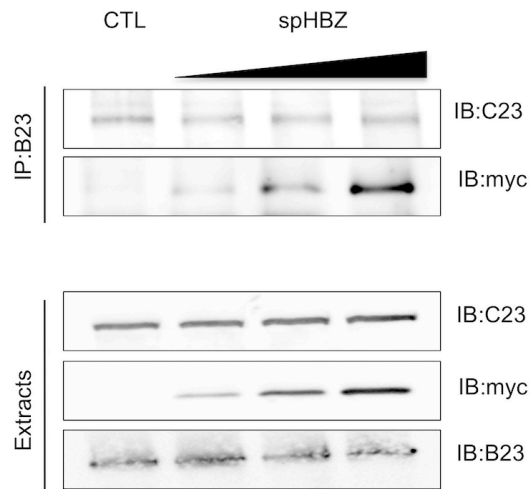
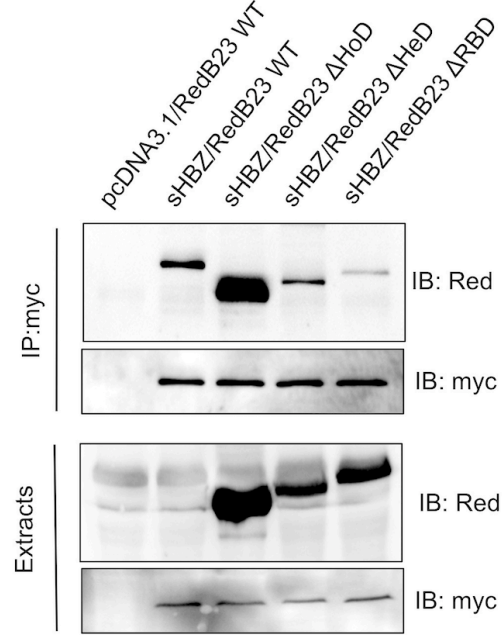


Figure 4.4. sHBZ does not alter the interaction between B23 and C23. 293T cells were co-transfected with pcDNA3.1 or increasing amounts of pmyc/his-sHBZ. Forty-eight hours post-transfection, cells were lysed and lysates were used for immunoprecipitation with an anti-B23 antibody. Immunoprecipitates and cell extracts were analyzed in parallel by Western blot using an anti-C23, anti-myc or anti-B23 antibody.

A



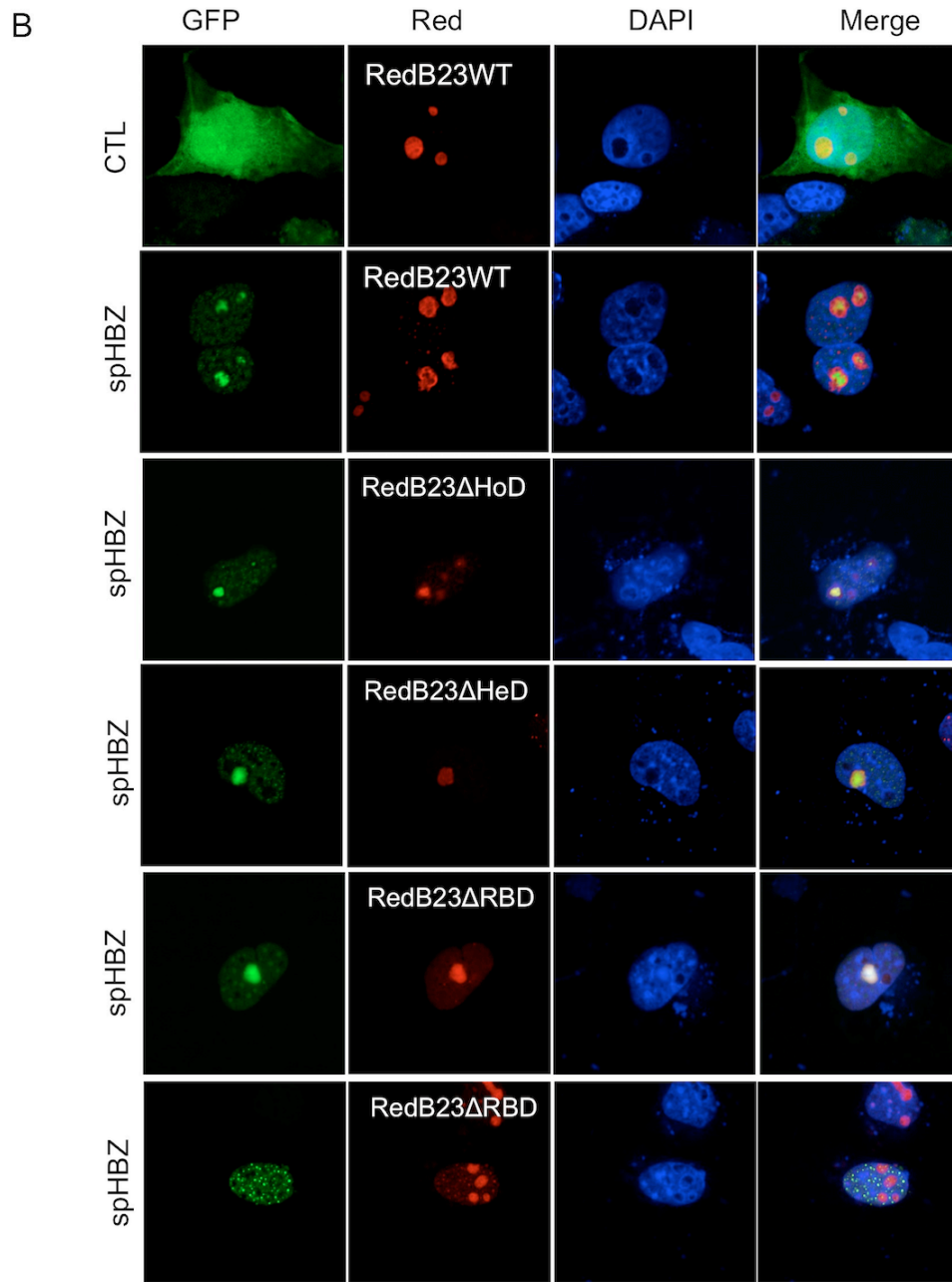


Figure 4.5. sHBZ does not interact with B23 through its HeD or HoD domain. (A) 293T cells were co-transfected with pmyc/his-sHBZ together with pRed-B23 WT, pRed-B23 Δ HoD, pRed-B23 Δ HeD or pRed-B23 Δ RBD. Forty-eight hours post-transfection, cells were lysed and lysates were used for immunoprecipitation with an anti-myc 9E10 antibody. Immunoprecipitates and cell extracts were analyzed in parallel by Western blot using an anti-

Red, anti-B23 or anti-myc antibody. (B) COS-7 cells were grown on coverslips and transfected with pEGFP-C1-sHBZ or pEGFP-C1 along with pRed-B23 WT, pRed-B23 Δ HoD, pRed-B23 Δ HeD or pRed-B23 Δ RBD. At 24 h post-transfection, cells were fixed with PFA 4% and permeabilized with 0.5% Triton. Cells were incubated with DAPI to stain nuclei and coverslips were then mounted in ProLong Antifade reagent. Samples were observed with a 60x objective under oil immersion and with a numerical aperture of 1.4 with a Nikon A1 laser scanning confocal microscope.

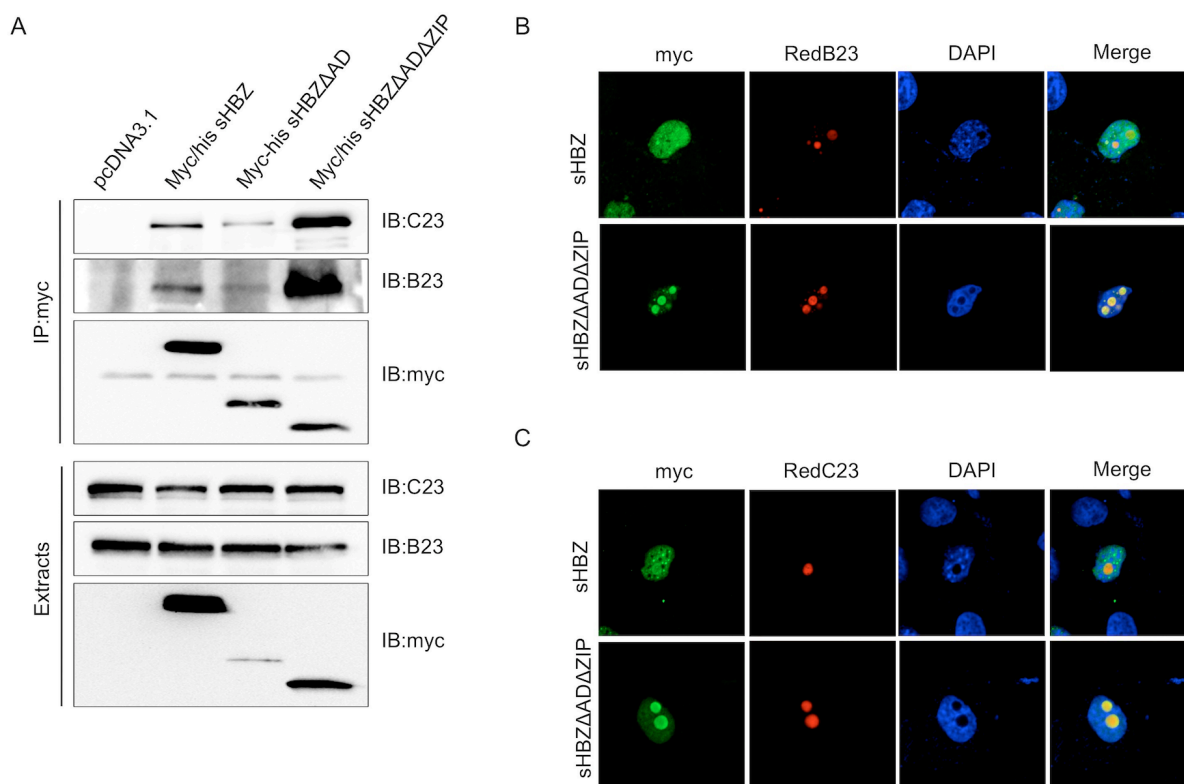


Figure 4.6. The interaction between sHBZ and B23 or C23 is dependent on its nucleolar localization. (A) 293T cells were co-transfected with pmc/his-sHBZ, pmc/his-sHBZΔAD, pmc/his-sHBZΔADΔbZIP or pcDNA3.1. Forty-eight hours post-transfection, cells were lysed and lysates were used for immunoprecipitation with an anti-myc 9E10 antibody. Immunoprecipitates and cell extracts were analyzed in parallel by Western blot using an anti-B23, anti-C23 or anti-myc antibody. (B-C) COS-7 cells were grown on coverslips and transfected with pmc/his-sHBZ, pmc/his-sHBZΔADΔbZIP or pcDNA3.1 and pRed-B23 (B) or pRed-C23 (C). After 48 hours, cells were fixed with PFA 4% and permeabilized with 0.5% Triton. Cells were incubated with an anti-myc 9E10 antibody followed by goat anti-mouse IgG coupled to Alexa Fluor 488. Nuclei were stained with DAPI and coverslips were then mounted in ProLong Antifade reagent. Samples were observed with a 60x objective under oil immersion and with a numerical aperture of 1.4 with a Nikon A1 laser scanning confocal microscope.

Discussion

5.1 Discussion complémentaire au Chapitre II

5.1.1. Détection et caractérisation des nouveaux transcrits antisens produits par HTLV-3 et HTLV-4.

Dans notre première étude (Chapitre II), nous avons mis en évidence des transcrits antisens produits à partir d'un ORF sur le brin complémentaire des rétrovirus HTLV-3 et HTLV-4 nommés *APH* (*Antisense Protein of HTLV*)-3 et -4 respectivement, situés entre les gènes *Env* et *Tax/Rex*. Les quatre membres HTLV et l'homologue simien STLV-1 peuvent ainsi produire un transcrit à partir de leur brin négatif ce qui suggère que la transcription antisens est un mécanisme conservé chez la famille HTLV/STLV (Cavanagh et al. 2006; Halin et al. 2009; Miura et al. 2013). De plus, les transcrits de *APH-3* et *APH-4* initiés à de multiples sites dans le LTR 3' sont épissés et polyadénylés remplissant ainsi les conditions afin de servir de matrice pour la traduction. La position des sites d'épissage et la taille de l'intron de ces transcrits ont plusieurs similitudes avec les transcrits antisens de HTLV-1 et HTLV-2, codant pour *HBZ* et *APH-2* respectivement (Cavanagh et al. 2006; Halin et al. 2009). L'intron contient les dinucléotides hautement conservés GU et AG aux sites donneur (SD) et accepteur (SA) d'épissage pour *APH-3* et *APH-4*. Notons que notre méthode de détection était plutôt conçue pour mettre en évidence un transcrit épissé : la position de notre amorce dans le LTR 3' basée sur les sites d'épissage de *sHBZ* a nécessairement favorisé la détection d'un transcrit épissé. Une amorce sens située dans la région de l'intron du transcrit antisens de *APH-3* et *APH-4* nous aurait possiblement permis de détecter plus facilement un isoforme non épissé si produit car cette méthode n'aurait pu détecter le transcrit épissé. Il est aussi important de mentionner que lors de la détection de ces transcrits, nous avons opté pour un clone moléculaire de HTLV-3 et HTLV-4 où nous avons supprimé le LTR 5'. Cette approche était basée sur deux observations : la transcription sens à partir du LTR 5' contribue à un amorçage

par la RT artéfactuel; et l'inhibition de la transcription sens entraîne une augmentation de la transcription antisens (Cavanagh et al. 2006; Landry et al. 2007).

Nous avons aussi montré que l'activité promotrice de *APH-3* et *APH-4* est régulée par plusieurs activateurs de cellules T et particulièrement par bpV[pic], un inhibiteur des protéines tyrosine phosphatase. Nous avons aussi remarqué que le promoteur de *APH-4* démontrait une activité plus forte que celui de *APH-3*. Cependant, nous n'avons pas caractérisé la régulation de l'activité transcriptionnelle de ces gènes. Cette régulation doit être considérée afin d'évaluer l'importance de l'expression de ces gènes antisens dans la réplication virale. Nos résultats nous permettent cependant d'émettre certaines conclusions : l'activateur bpV[pic] active plusieurs voies, dont NF- κ B, NFAT, STAT, AP-1 et CREB (Vargas et al. 2008; Fortin et al. 2001; Barat and Tremblay 2003; Blanchette et al. 2007). Ceci suggère qu'un de ces facteurs (ou un autre facteur inconnu répondant à une stimulation bpV[pic]) est nécessairement impliqué dans la régulation de l'expression des gènes *APH-3* et *APH-4*. L'expression de *sHBZ* et *uHBZ* est aussi régulée par la protéine transactivatrice Tax (Landry et al. 2009). Il serait ainsi important d'évaluer l'impact de Tax sur l'expression de *APH-3* et *APH-4*. Pour ce faire, des mutants de délétion dans la région promotrice de *APH-3* et *APH-4* permettraient de cibler la région activatrice mais aussi de déceler un facteur de transcription potentiel. Des expériences de retard sur gel pourraient confirmer la présence de ce facteur sur le promoteur de *APH-3* et *APH-4* et être appuyées *in vivo* par une analyse ChIP. Il serait aussi bien important de détecter et caractériser *in vivo* les transcrits *APH-3* et *APH-4* ainsi que leur niveau d'expression à partir d'échantillons de cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) de patients infectés et de les comparer à *HBZ* et *APH-2*. Cependant, l'accessibilité aux échantillons est plutôt difficile dû au très faible nombre de gens infectés (Douceron et al. 2012; Saito et al. 2009). Finalement, une analyse de cinétique de l'expression de ces transcrits (vs les autres transcrits viraux) dans les cellules primaires de patients infectés permettrait d'évaluer à quel moment de l'infection ceux-ci sont exprimés. Une étude de la compartimentalisation de ces ARNm exprimés à partir du clone moléculaire transfecté dans une lignée de LT permettrait aussi d'évaluer l'efficacité de la traduction de ces transcrits par la machinerie cellulaire.

5.1.3. Localisation des protéines APH-3 et APH-4

5.1.3.1 Localisation nucléaire de APH-3 et APH-4

Dans le but d'étudier la localisation cellulaire de ces nouvelles protéines virales, nous avons généré des constructions plasmidiques contenant l'ADN complémentaire (ADNc) de APH-3 et APH-4 possédant une étiquette myc à l'extrémité N-terminale ainsi que des plasmides où l'ADNc de APH-3 et APH-4 est placé dans le même cadre de lecture que la EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) en C-terminal. Nous avons par la suite analysé leur localisation cellulaire par microscopie confocale. Ainsi, nos résultats ont mis en évidence que APH-3 et APH-4 sont des protéines nucléaires plus spécifiquement avec un signal ponctué et que APH-3 démontre en plus une localisation cytoplasmique. Ces observations ont pu être observées dans les lignées 293T, COS-7 et Jurkat ainsi qu'avec l'étiquette myc placée à l'extrémité C-terminal et la EGFP en N-terminal (résultats non montrés) suggérant que le signal observé est spécifique. Considérant la forme ponctué de leur signal dans le noyau, nous avons vérifié si ces protéines pouvaient possiblement se retrouver dans le même compartiment que les « *HBZ-speckles* », ce qui est effectivement le cas (Hivin et al. 2005). Cependant, il est apparu que plusieurs des structures ponctuées ne colocalisaient pas ensemble. Notons que HBZ démontre différents types de patrons de localisation nucléaire (Hivin et al. 2005). Il est donc fort possible que la variabilité des signaux soit attribuée à ce phénomène ou encore par le fait que APH-3 et APH-4 ont des rôles pouvant être différents de ceux de HBZ, comme la régulation de la transcription Jun dépendante telle qu'observé dans le chapitre 3.

De nombreux domaines nucléaires sont présents dans le noyau et ceux-ci démontrent des fonctions biologiques spécialisées (Lamond and Earnshaw 1998). APH-3 et APH-4 se trouvent entre autres dans le nucléole, mais le domaine auquel elles sont associées dans le nucléoplasme reste à être identifié. Ainsi, dans le but de mieux comprendre les fonctions de ces nouvelles protéines virales, l'identification du compartiment nucléaire dans lequel celles-ci sont retrouvées serait une avenue prometteuse. Des études de colocalisation par microscopie confocale avec des marqueurs de compartiments sous-nucléaires, par exemple, les PML, les corps de Cajal ou les *nuclear speckles*, pourraient être réalisées afin d'identifier ce

compartiment. Notons que APH-2 est ciblée aux PML où elle exerce son activité inhibitrice sur la transcription virale, mais cette localisation est aussi associée à une diminution de sa stabilité (Barbeau et al. 2014).

Dans un autre ordre d'idée, l'observation que APH-3 et APH-4 fusionnés à la EGFP se localisent au noyau et aux nucléoles suggère fortement la présence d'un signal de localisation nucléaire (NLS) dans leur séquence. En effet, seules les macromolécules d'un poids moléculaire plus petit que 40kDa peuvent passer librement à travers le complexe du nucléopore (NPC) composant la membrane nucléaire, les autres nécessitent un signal spécifique reconnu par le système de transport de la cellule nommé NLS ou NES (signal d'exportation nucléaire) (Wente and Rout 2010; Cook et al. 2007; Stewart 2007). Les protéines entre 20-40 kDa requièrent parfois aussi la présence d'un NLS pour permettre leur importation (Gorlich and Mattaj 1996). Ce transport actif vers le noyau est principalement dirigé par la grande famille des récepteurs karyophérine β , composés d'importines et d'exportines, qui lient le NLS du cargo (ou NES) et le transportent vers le noyau (ou le cytoplasme pour le NES) (Cook et al. 2007).

Plusieurs types de NLS ont été décrits jusqu'à présent et sont divisés en deux grandes classes: les NLS classiques et les NLS non classiques. Les NLS classiques sont soit monopartites ou bipartites en fonction de la position des acides aminés basiques. Les NLS monopartites, tels que celui retrouvé chez l'antigène grand T de SV40 (¹²⁶PKKKRKV¹³²), sont constitués d'une séquence de quatre acides aminés basiques consécutifs ou soit trois acides aminés basiques séparés par un autre acide aminé ayant la séquence consensus K(K/R)X(K/R) comme le NLS retrouvé dans la séquence de la protéine c-Myc (PAAKRVKLD) (Jans et al. 2000; Lange et al. 2007). Le NLS de la nucléoplasmine est l'exemple classique d'un NLS bipartite de type court qui lui est caractérisé par deux groupes d'acides aminés basiques séparés par un linker de huit à seize acides aminés (¹⁵⁵KRPAATKKAGQAKKKK¹⁷⁰) (Lange et al. 2007; Jans et al. 2000). Il y a également les NLS bipartites de type long chez lesquels le linker est d'environ 30-32 acides aminés (Lange et al. 2007; Jans et al. 2000). Les NLS classiques sont généralement reconnus par l'importine α qui sert ensuite de site d'ancrage pour l'importine β 1 (Lange et al. 2007). Enfin, il existe des

NLS non classiques qui ne partagent pas les séquences habituelles mentionnées ci-dessus et qui peuvent être directement liées par l'importine β . Ce type de NLS non-consensus est retrouvé dans la séquence de la protéine Rex de HTLV-1 et est caractérisé par une séquence riche en arginine relativement longue (¹MPKTRRRPRRSQRKRPT¹⁸) (Palmeri and Malim 1999). Les PY-NLS sont aussi des NLS non classiques, mais reconnus par l'importine β 2 (ou transportine-1) et sont généralement retrouvés chez les protéines liant l'ARN comme chez la ribonucléoprotéine hétérogène A1 humaine (hnRNP A1) (Twyffels et al. 2014). Les PY-NLS sont composés d'un motif C-terminal (R/K/H-X₂₋₅-P-Y) et d'un motif N-terminal soit hydrophobe ayant comme séquence Φ -G/A/S- Φ - Φ (où Φ est un acide aminé hydrophobe) ou soit basique, où le motif N-terminal et le motif PY C-terminal sont séparés par un linker de huit à treize acides aminés (Lee. BJ. 2007).

De façon intéressante, une région riche en arginine a été identifiée par analyse *in silico* pour APH-3 et APH-4 (aa 122 à 149 pour APH-3 et 31 à 98 pour APH-4). Aussi, à l'aide de l'application cNLS mapper, un NLS bipartite a été prédit dans la séquence de APH-3 aux acides aminés 99-130 et un NLS monopartite pour APH-4 aux acides aminés 83-93. Cependant, cette analyse indique un faible niveau de fiabilité dans les deux cas. Notons que cette application web n'a pu évaluer que la présence de NLS dépendants de l'importine α . Dans le cas de HBZ, il a été montré que trois NLS localisés dans les régions BR2, BR1 et DBD sont responsables de sa localisation nucléaire (Hivin et al. 2005). Cependant, des mutants de délétions ont montré que seulement deux de ces NLS sont nécessaires, peu importe leur combinaison, afin d'induire une localisation nucléaire et nucléolaire à HBZ (Hivin et al. 2005). La cartographie exacte des NLS de HBZ n'a pas été plus approfondie. Il est donc difficile pour nous de comparer les NLS de HBZ avec les régions identifiées *in silico* dans APH-3. Notons qu'à partir d'un alignement entre HBZ, APH-3 et APH-4, la région contenant un NLS putatif est en fait homologue aux régions basiques de HBZ.

Ainsi dans le but d'identifier le (ou les) NLS responsable(s) de la localisation nucléaire de APH-3 et APH-4, nous avons généré des constructions plasmidiques où des fragments de la séquence codante de APH-3 et APH-4 ont été clonés dans le même cadre de lecture que la EGFP. Ces constructions ont été nommées pEGFP-APH-3M1 à M5 et pEGFP-APH-4M1 à

M4 contenant chacune une séquence différente de 47aa de ces protéines virales. Ces mutants ont été transfectés dans des cellules COS-7 et observés par microscopie confocale 24 heures post-transfection (Annexe Figure 1 et 3). Cependant, aucun de ces mutants n'a pu induire une relocalisation nucléaire de la EGFP. Suite à ces résultats et en se basant sur les prédictions *in silico*, nous avons généré un double mutant pEGFP-APH-3M3-M4 exprimant la région des acides aminés 95 à 188 fusionné à la EGFP. Ce double mutant a montré une localisation strictement nucléaire en microscopie confocale (Annexe Figure 2). Afin de rétrécir la région responsable de cette localisation nucléaire, nous avons supprimé la partie N-terminale de ce mutant que nous avons nommé EGFP-APH-3-121à188 (Annexe Figure 2). Ce mutant a gardé sa capacité à se rendre au noyau. Rappelons que le mutant de délétion EGFP-APH-3Δ157-189 publié dans l'article 2 (Chapitre III) démontrait aussi une localisation nucléaire indiquant que la région LZ atypique de APH-3 n'est pas nécessaire pour sa localisation nucléaire. L'ensemble de ces résultats suggère fortement qu'un NLS se trouve entre les aa 121 et 156. Lorsque nous analysons cette séquence de plus près (¹²¹WRERKKKEERRRRCREELEERKRQKKERRQLDCID¹⁵⁶), plusieurs acides aminés basiques sont présents dont des arginines et des lysines. Des mutations ponctuelles individuelles et en combinaison où ces arginines et lysines seront mutées pour des alanines seront éventuellement nécessaires pour permettre de cartographier de façon précise le NLS et possiblement le NoLS (signal de localisation nucléolaire) de APH-3. Lorsque le NLS sera identifié, la voie d'importation de APH-3 au noyau pourra ensuite être caractérisée. Il est important de noter qu'il y a une possibilité que la localisation nucléaire soit due à une interaction avec une protéine contenant un NLS. Des analyses permettant d'évaluer cette possibilité devraient aussi être envisagées. Notons que d'autres mutants seront nécessaires pour délimiter la région permettant à APH-4 de se rendre au noyau, mais une construction exprimant les régions d'aa 36 à 57 et 86 à 102 (³⁶GRPLGSSSKDLGYWKSRLDDLAQEQLLSYW⁵⁷⁻⁸⁶ERKRQKKERRQLDCID¹⁰²) fusionnées à la GFP a pu mettre en évidence que la présence simultanée de ces séquences est nécessaire pour induire une translocation au noyau (résultats non montrés). Ceci explique pourquoi aucun des mutants APH-4M1 à M4 n'a pu induire une localisation nucléaire.

5.1.3.2. Localisation cytoplasmique de APH-3

Nos résultats dans l'article 1 (Chapitre II) ont aussi mis en évidence que la protéine APH-3 tout comme sHBZ, peut se retrouver non seulement au noyau, mais également au cytoplasme (Mukai and Ohshima 2014). Les protéines bordées d'un NLS sont souvent accompagnées d'un signal d'exportation nucléaire (NES) leur permettant de réguler leur activité trafiquante de manière coordonnée entre le noyau et le cytoplasme (Tsukahara and Maru 2004; Ryabov et al. 2004; Ladd and Cooper 2004). Généralement, l'exportation se fait par la voie de l'exportine CRM1 (*Chromosome Maintenance Region 1*) de la famille importine β pour les NES classiques riches en leucine (Fornerod et al. 1997).

Nos analyses *in silico* n'ont pu prédire un motif NES consensus dans la séquence de APH-3 (la Cour et al. 2004). Cependant, la région des acides aminés 138 à 157 s'est trouvée très près du seuil de prédiction. Récemment, une nouvelle classification des NES a été proposée dans laquelle nous retrouvons 6 classes de séquences consensus séparées selon l'espacement de quatre résidus hydrophobes, des leucines et isoleucines de préférence, nommé P1 à P4 (Kosugi et al. 2008). Or, la région des acides aminés 138 à 157 de APH-3 comporte quatre résidus hydrophobes, mais dont leur espacement ne suit aucunement une des six classes consensus.

La leptomycine B est un antibiotique et antifongique pouvant lier et inhiber l'exportine CRM1 et conséquemment, l'exportation nucléaire des protéines ayant un NES (Kudo et al. 1999). Afin d'évaluer si la localisation cytoplasmique de APH-3 est dirigée par la présence d'un NES non-consensus dépendant du complexe CRM1, un traitement à la leptomycine B pourrait être réalisé dans les cellules exprimant la protéine APH-3. La perte du signal dans le cytoplasme suite au traitement indiquerait la présence d'un NES CRM1-dépendant dans sa séquence. Notons qu'il est possible que la localisation cytoplasmique de APH-3 soit causée par un NES CRM1-indépendant tel qu'est le cas avec la nucléocapside du virus de la bronchite infectieuse (*Infectious Bronchitis Virus* ; IBV) ou encore par un NLS imparfait, c'est-à-dire que son activité d'importation est faible (Reed et al. 2007). Il a notamment été montré que les résidus flanquant le NLS, le patron des résidus du NLS, les résidus du linker dans le cas des NLS bipartites ainsi que la force de liaison entre le NLS et l'importine affectent grandement

l'activité d'importation de NLS (Sugata. 2009). Ainsi, il est important d'évaluer si la localisation cytoplasmique de APH-3 est médiée par un NES ou si cette localisation est aberrante due à la faible activité d'un NLS ou encore due à sa surexpression. La spécificité d'une localisation cytoplasmique pourrait de fait être associée à un rôle unique attribué à APH-3.

5.1.4. Détection des protéines APH-3 et APH-4 par Western blot

Dans le premier article, nous avons pu détecter par Western blot APH-3 et APH-4 suite à leur surexpression et grâce à un anticorps dirigé contre l'étiquette myc. Nous avons détecté APH-3 à la taille attendue de 28 kDa et APH-4 à environ 18 kDa. Ces analyses ont aussi révélé un second signal bien que plus faible, migrant à un poids moléculaire légèrement plus haut pour APH-3 et ce dans les fractions cytoplasmique et nucléaire. De plus, nous avons pu détecter cette bande suite à une immunoprécipitation de APH-3 avec un anticorps anti-myc dans l'article 2 (Chapitre III) suggérant que cette bande est spécifique. La présence de cette seconde bande pourrait s'expliquer par une modification post-traductionnelle (*Post Translational Modification*; PTM) de la protéine APH-3.

La majorité des protéines eucaryotiques subissent une PTM réversible ou irréversible qui consiste en l'ajout covalent d'un groupe fonctionnel tel que l'acétylation, la phosphorylation et la glycosylation; d'un groupe peptidique/protéique comme l'ubiquitination et la sumoylation; ou d'un processus protéolytique comme le clivage protéique par exemple. Ces PTM sont catalysés par des enzymes suite à la traduction de la protéine et permettent une régulation pointue et rapide des facteurs de transcription en réponse à un stimulus. Ainsi elles contrôlent la fonction, le *turnover*, la localisation et les partenaires d'interaction de la protéine. Il n'est donc pas surprenant que les modifications post-traductionnelles puissent être impliquées dans le développement de diverses maladies suite à la fonction aberrante d'une protéine (Karve and Cheema 2011).

Considérant la différence de taille entre les deux signaux de APH-3 (moins de 10 kDa), une mono-sumoylation ou une mono-ubiquitination sont des PTM envisageables. Il est aussi

possible que APH-3 soit phosphorylé. De façon intéressante, une étude récente a montré que HBZ pouvait subir trois types de modifications post-traductionnelles (phosphorylation, acétylation, et méthylation). Cependant, aucune de ces modifications ne semblait importante pour les activités connues de HBZ, leur rôle demeurant donc à être évalué (Dissinger et al. 2014). Ceci dit, la présence de modifications sur APH-3 pourrait être détectée par spectrométrie de masse suite à sa purification par immunoprécipitation. Celles-ci pourraient ensuite être confirmées en utilisant la technique d'immunoprécipitation à l'aide d'anticorps reconnaissant la modification (par exemple un anticorps anti-SUMO ou anti-ubiquitine). Des mutations inhibitrices et mimétiques (comme contrôle) des résidus où a lieu la modification post-traductionnelle pourraient ensuite confirmer l'importance de cette PTM pour sa fonction et/ou sa localisation cellulaire.

Dans un autre ordre d'idée, nous nous sommes limités, dans l'article 1 et 2 (Chapitre II et III), à utiliser des systèmes *in vitro* dans lesquels nous avons transfecté les plasmides permettant l'expression des protéines APH-3 et APH-4. En effet, le manque de lignées cellulaires transformées par HTLV-3 et HTLV-4 et d'anticorps dirigés contre APH-3 et APH-4 ont entraîné certaines limitations à cette étude. Il serait cependant crucial de démontrer que les protéines APH-3 et APH-4 sont produites à partir de leur propre promoteur. Pour ce faire, nous avons entrepris un clonage dans le but de générer un plasmide contenant l'ADN proviral où une étiquette tétracystéine serait en C-terminal de la partie codante de l'exon 2 de APH-3 et APH-4. Leur détection par microscopie confocale en présence du substrat de la tétracystéine confirmerait leur expression à partir d'un clone moléculaire et, plus important, que ces transcrits antisens sont en effet produits par la machinerie cellulaire. Lors des derniers mois de mon doctorat, des anticorps dirigés contre APH-3 et APH-4 ont été produits et ceux-ci pourront dorénavant, être utilisés afin de détecter par western blot les protéines exprimées à partir du clone moléculaire sans étiquette.

5.1.5. Inhibition de la trans-activation tax-dépendante

Un résultat important qui est ressorti de notre première étude est la capacité de APH-3 et APH-4 d'inhiber la transactivation du LTR 5' de HTLV-1 et HTLV-3 médiée par les protéines Tax 1 et Tax 3. Ce résultat est crucial puisqu'il démontre que les quatre protéines

traduites à partir du brin complémentaire des rétrovirus HTLV peuvent inhiber la transcription virale (Basbous et al. 2003; Halin et al. 2009). Dans le cas de HBZ et APH-2, cette inhibition de la transcription sens se traduit par une baisse de la production virale (Halin et al. 2009; Lemasson et al. 2007). Il est cependant important de mentionner que ces études incluant la nôtre, ont été réalisées dans un contexte où les protéines antisens ont été surexprimées. *In vivo*, seulement HBZ et non APH-2 contribue à la réplication virale et à la persistance virale tel que montré chez le modèle de lapin (Arnold et al. 2008; Yin et al. 2012).

Lorsque nous comparons leur régulation au niveau moléculaire, sHBZ est plus puissante que APH-2 dans l'inhibition de la transactivation de leur LTR respectif et bien que ces deux protéines interagissent avec CREB, seulement HBZ peut aussi lier p300 et inhiber la transactivation par un second mécanisme. De plus, l'interaction de CREB avec HBZ et APH-2 n'est pas médiée par le même domaine (Yin et al. 2012; Halin et al. 2009; Clerc et al. 2008). Or, ces différences ainsi que le niveau d'expression des protéines antisens *in vivo* pourraient contribuer aux différences observées chez le modèle de lapin. De façon intéressante, APH-3 et APH-4 semblent tout aussi puissants que sHBZ pour inhiber le LTR 5' de HTLV-1 tel que montré dans l'article 1 (Chapitre II). Il est donc important d'élucider le mécanisme régulant l'inhibition de la transactivation Tax-dépendante engendrée par APH-3 et APH-4. La génération d'un mutant de délétion de la région leucine zipper atypique de APH-3 et APH-4 nous a permis de mettre en évidence que cette inhibition, comme avec APH-2, n'était pas médiée par ce domaine (résultats non montrés). Il serait donc important de générer d'autres mutants de délétion tels que des mutants des deux domaines « LXXLL-like » putatifs afin de déterminer si ces domaines sont impliqués de façon similaire à APH-2 et aussi d'évaluer le (ou les) partenaire d'interaction lors de cette inhibition (possiblement CREB ou CBP/P300).

La transcription basale de HTLV-1 se fait en partie par le facteur de transcription c-Jun *via* un site CRE imparfait (Lemasson et al. 2002). Une des premières études portant sur HBZ a mis en évidence que celle-ci pouvait inhiber l'expression basale du LTR 5' et ce en séquestrant c-Jun dans des corps nucléaires et/ou en induisant sa dégradation par le protéasome (Basbous et al. 2003; Matsumoto et al. 2005; Clerc et al. 2009). Considérant nos résultats dans l'article 2 (Chapitre III) sur l'interaction et l'activation Jun-dépendante, il serait

crucial d'évaluer l'effet de APH-3 et APH-4 sur la transcription basale de ces rétrovirus. De plus, bien que HTLV-3 et HTLV-4 aient une organisation génomique similaire à HTLV-1 et HTLV-2 (environ 62% et 62-71% d'identité de séquences nucléotidiques avec les autres PTLV respectivement), la plus grande divergence peut être observée dans les LTR (Switzer et al. 2006b; Switzer et al. 2009). Malgré la conservation de la majorité des éléments régulateurs, le LTR de HTLV-3 et HTLV-4 est plus court (697 pb et 696 pb) que celui de HTLV-1 (756 pb) et HTLV-2 (764 pb) dû à la délétion d'une des trois répétitions d'éléments de 21 pb (TRE) dans la région U3 (Switzer et al. 2006b). Nous retrouvons cependant un site unique et consensus AP-1 à la place de ce TRE distal dans le LTR de HTLV-3 et les sites c-Myb et Pbx-1 (*Pre-B-cell transcription factor*) dans celui de HTLV-4 (Switzer et al. 2006b; Switzer et al. 2009). La régulation de l'expression du LTR par ces facteurs de transcription a déjà été mise en évidence chez d'autres rétrovirus (HTLV-1, FLV et MuLV) (Bosselut et al. 1992; Finstad et al. 2004; Chao et al. 2003). Il devient alors important de déterminer si la présence de ces sites affecte le niveau de transcription basal de HTLV-3 et HTLV-4 et si APH-3 et APH-4 pourrait moduler cette régulation transcriptionnelle.

Enfin, il sera important d'étudier l'effet de APH-3 et APH-4 sur la régulation de l'expression virale lorsque nous y retrouverions les multitudes composantes d'une infection à HTLV-3 et HTLV-4. Ceci nécessiterait des études *in vivo* similaires à celles réalisées avec HBZ et APH-2 chez le lapin considérant que ce modèle permet d'étudier la persistance virale (Arnold et al. 2006; Yin et al. 2012)

5.2 Discussion complémentaire au Chapitre III

5.2.1 Le motif bZIP atypique de APH-3 et APH-4

Retrouvé chez les facteurs de transcription eucaryotes, le motif bZIP consiste en un domaine basique d'environ 30 aa suivi d'un motif LZ qui ensemble permettent à la protéine de lier l'ADN sous forme d'un complexe dimérisé. La partie LZ est caractérisée typiquement par quatre à cinq heptades de leucine dirigeant la formation de ces dimères (O'Shea et al. 1991).

Les premières analyses bioinformatiques n'ont pas montré de motifs bZIP dans la séquence de APH-3 et de APH-4 suggérant que ce motif est unique à HBZ chez les HTLV. Cependant, Wolfe et al ont découvert suite à des alignements avec diverses protéines de la famille bZIP, la présence d'un LZ non conventionnel putatif dans une région où nous retrouvons quatre heptades et 1 octet dont le premier heptade serait formé d'un acide aminé hydrophobe autre qu'une leucine, la phénylalanine (Switzer et al. 2009; Switzer et al. 2006b).

Dans l'article 2 (Chapitre III), nous avons clairement mis en évidence suite à des mutants de délétion que l'entièreté de la région LZ atypique soupçonnée permet à APH-3 et APH-4 (aa 157 à 189 et aa 103 à 135 respectivement) d'interagir avec le LZ des membres de la famille de facteurs de transcription Jun. Des mutations ponctuelles de deux leucines stratégiquement positionnées en un heptade (L₁₆₇L₁₇₄ et L₁₁₃L₁₂₀ pour APH-3 et APH-4 respectivement) pour des valines nous ont permis de mettre en évidence par les techniques de CoIP et double hybride que ces résidus participent directement à l'interaction avec Jun *in vivo* suggérant que cette région puisse former un coiled coil.

Les domaines bZIP ont une structure coiled coil orientée vers la gauche qui ne requiert que la présence d'un résidu hydrophobe aux positions « a » et « d » de l'heptade (abcdefg)_n ainsi qu'un résidu chargé aux positions « e » et « g » (Figure 5.1) (O'Shea et al. 1991). Or, un résidu hydrophobe autre qu'une leucine permettrait la formation d'une telle structure favorisant la dimérisation, phénomène observé avec plusieurs protéines d'origines virales dont Zta (virus Epstein-Barr (EBV)), pUL71 (cytomégalovirus humain) et les protéines du VIH gp41 et Vpr (Delwart et al. 1990; Wang et al. 1996). En effet, Zta (aussi connue sous les noms BZLF1, ZEBRA, EB1 et Z), responsable de l'induction d'une infection productive, a été classé parmi les facteurs de transcription de la famille bZIP malgré un domaine de dimérisation dépourvu de quatre heptades de leucine (Hardwick et al. 1988; Chang et al. 1990). Son domaine de dimérisation peut cependant former un coiled coil analogue au LZ (Chang et al. 1990; Kouzarides et al. 1991; Flemington and Speck 1990). Les résidus contribuant à l'interaction hydrophobe en position « d » sont : Tyr, Lys, Leu et Met et leur implication dans la dimérisation a été montrée par mutations ponctuelles (Kouzarides et al. 1991; Flemington and Speck 1990). Le motif bZIP-like de pUL71 quant à lui ne contient

qu'une leucine en position « d » et les autres consistent en des acides aminés hydrophobes (Meissner et al. 2012).

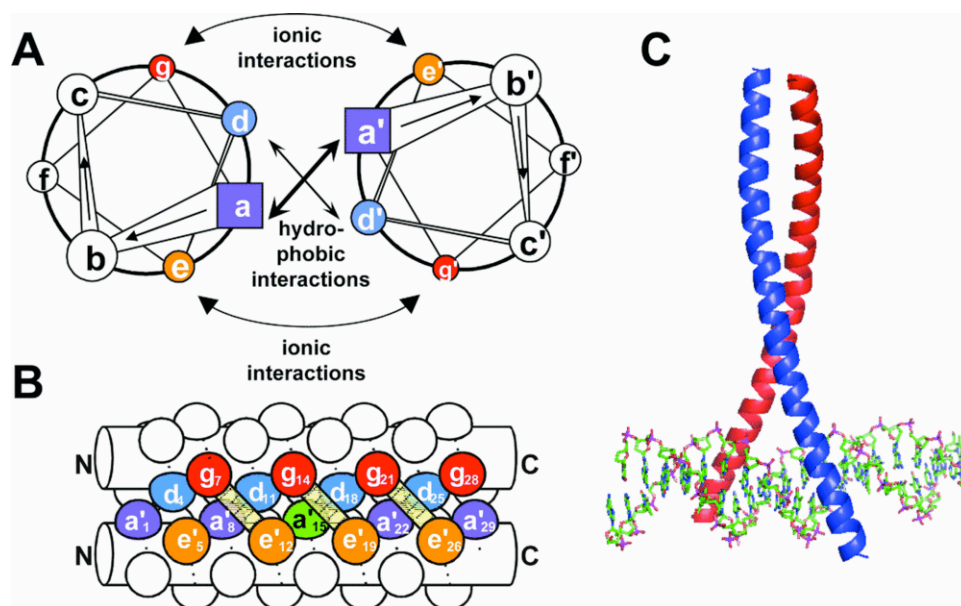


Figure 5.1 : Représentation schématique et structurale d'un motif coiled coil dimérisé. A) Vu du haut de la roue hélicale démontrant la position de chaque résidu de l'heptade (abcdefg)_n. La deuxième hélice est dénotée par prime (a'b'c'd'e'f'g')_n. B) Représentation de côté d'un coiled coil. Nous observons les positions « a' » et « d' » formant l'interface hydrophobe ainsi que les résidus « g' » et « e' » participant à une interaction électrostatique avec l'autre hélice représentée par la barre diagonale jaune. C) Structure d'un coiled coil lié au sillon majeur de l'ADN à une séquence spécifique. Image tiré de (Mason et al. 2008).

Notons que selon les analyses *in silico*, les régions 166 à 191 et 110 à 145 dans la séquence de APH-3 et APH-4 respectivement, pourraient former un coiled coil, quoique cette prédiction soit de probabilité très faible pour APH-3 (Delorenzi and Speed 2002). De façon intéressante, malgré un décalage d'un heptade entre nos analyses, les leucines que nous avons

mises en évidence dans notre étude sont placées en position « d » selon cet algorithme. Ainsi, l'interface hydrophobe, c'est-à-dire les résidus retrouvés en position « d » de chaque heptade ($d_4d_{11}d_{18}d_{25}d_{32}$), suivrait la séquence $^{167}LLLSL^{189}$ pour APH-3 et $^{113}LLNL^{141}$ pour APH-4. Bien que nous ayons cartographié la position de deux leucines impliquées dans la dimérisation avec les facteurs Jun, nos mutants de délétion à l'intérieur du LZ ne nous permettent pas de déterminer le résidu en position « d » du premier heptade (d_4). La position « d_4 » pourrait être la Phe prédite par Switzer ou la Leu en amont de cette Phe qui alors impliquerait un heptade imparfait. Il se pourrait également que le LZ commence plus loin à la Leu en position 167 et 113 pour APH-3 et APH-4 respectivement.

Ainsi, l'identification de la totalité des résidus formant la surface hydrophobe (core) (position « a » et « d ») reste à être élucidée. Ceci est un facteur important parce que ces résidus sont essentiels afin de comprendre la structure de ces protéines et de déterminer la stabilité des dimères dépendant de leurs interactions hydrophobes et van der Waal (Mason and Arndt 2004). De plus, l'interaction électrostatique entre les résidus aux positions « e » et « g » inter-hélicale contribue majoritairement à la spécificité de la dimérisation, mais aussi à l'interaction entre ces résidus et ceux aux positions « a » et « d » (Mason and Arndt 2004). Bien que les séquences de motifs bZIP soient très similaires, les complexes formés par ces motifs sont hautement spécifiques et dépendent de la complémentarité au niveau de la distribution des résidus hydrophobes et hydrophiles intra-hélice et inter-hélice (Newman and Keating 2003; Vinson et al. 2006). Par exemple, la formation préférentielle de l'hétérodimère Jun/Fos versus l'homodimère Jun est due aux interactions répulsives inter-hélicale entre les résidus aux positions « e » et « g » (Glover and Harrison 1995; Junius et al. 1996). Éviter ces interactions répulsives semble être plus important que d'augmenter les interactions entre résidus de charges d'attraction lors de la sélection de la formation de dimère (Miller 2009). Ainsi, la sélectivité de la dimérisation a permis de développer des algorithmes afin de prédire les interactions et même de générer des peptides inhibiteurs dirigés contre les domaines bZIP comme méthode thérapeutique (Fong et al. 2004; Chen et al. 2011; Reinke et al. 2010a; Kaplan et al. 2014). Des analyses futures de mutagenèse et la construction de chimères sont donc nécessaires afin de mieux caractériser le motif LZ atypique de APH-3 et APH-4. Il serait d'autant plus intéressant d'étudier les différents partenaires d'interaction médiée par le LZ

atypique de APH-3 et APH-4 en comparaison avec celui de HBZ. Ceci pourrait se faire par des microanalyses de peptides n'utilisant que leur région bZIP, bien que ce système ne soit pas des plus naturels et ne prendrait en compte que cette région de la protéine.

Suite à la dimérisation de deux protéines via leur LZ, un rapprochement de leur région basique est engendré dirigeant la liaison avec l'ADN sous forme d'une structure bi-partite. En effet, le coiled coil de la région LZ et de la région basique forment ensemble une α -hélice continue qui, lorsque sous forme de dimère, lie directement le sillon majeur par une interaction séquence spécifique (Miller 2009; Fujii et al. 2000; Lupas 1996). La région basique des facteurs bZIP suit la séquence consensus (R/K)XX(R/K)N(R/K)XAAXX(S/C)RX(R/K)(R/K) où la conservation de l'asparagine et de l'arginine espacées de 7 résidus est importante pour la liaison (Adya et al. 1994). Nos résultats obtenus dans l'article 2 (Chapitre III) laissent croire que l'hétérodimère APH/Jun lie directement l'ADN à un site AP-1 (ou TRE, *TPA Response Element*), ce qui suggère fortement la présence d'une région basique agissant comme DBD. Bien que nous retrouvions des acides aminés basiques dans la région adjacente au LZ atypique, ceux-ci ne suivent aucunement la séquence consensus. La région basique de HBZ qui est aussi atypique, semble être plutôt faible en terme de liaison à l'ADN et HBZ reconnaîtrait plutôt des complexes transcriptionnels déjà existants dont Jun/SP1 sans se lier directement à l'ADN (Kuhlmann et al. 2007). En effet, la liaison de HBZ à l'ADN via son DBD n'a pu être montrée que récemment *in vitro* avec MafB sur un site MARE (Reinke et al. 2010b). Il a alors été suggéré que la séquence en acide aminé de la région basique de HBZ a une préférence bien distincte pour certains sites uniques et que cette spécificité serait réalisée au détriment de son niveau d'affinité pour l'ADN (Barbeau and Mesnard 2011; Miller 2009). Ceci ne semble pas être le cas pour APH-3 et APH-4 par rapport au site AP-1.

Lorsque des dimères de la famille de facteurs de transcription différents interagissent ensembles, ceci engendre une augmentation de la diversification de la spécificité de reconnaissance des sites de liaison à l'ADN et conséquemment des propriétés fonctionnelles bien distinctes dont le potentiel de transactivation (Miller 2009; Lamb and McKnight 1991). Il devient donc important d'évaluer l'efficacité de la région basique dans la séquence de APH-3 et APH-4 dans sa capacité de lier l'ADN et aussi d'élucider les amplificateurs pouvant être

reconnus par des hétérodimères constitués de APH-3, APH-4 et Jun. Ceci pourrait être accompli par des analyses de retard sur gel ou encore à plus grande échelle, à l'aide de CHIP-seq.

Enfin selon nos analyses, le bZIP de HBZ aurait évolué différemment de celui présent dans APH-3 et APH-4 et même certainement de celui dans APH-2. Les interactions *via* le motif bZIP de sHBZ semblent être un aspect important pour ses différentes propriétés (Arnold et al. 2006). Ainsi, nous ne pouvons nous empêcher de nous demander si l'évolution différente du motif bZIP de HBZ lui aurait permis d'échapper à la réponse immunitaire plus facilement que les autres protéines antisens HTLV entre autres par l'induction d'une latence virale efficace permettant au virus de ne pas être reconnu par la réponse CTL ou encore par la modulation de l'immunogénicité des cellules infectées par l'entremise d'interaction protéique.

5.2.3. Activation de la transcription AP-1 dépendante

5.2.3.1. Mécanisme d'activation de la transcription

Nos analyses de gène rapporteur sous le contrôle du promoteur de la *collagénase* (contenant un site AP-1 reconnu par les facteurs de transcription de la famille Jun), nous ont permis de mettre en évidence que APH-3 et APH-4 potentialisent l'activation de la transcription JunB-, c-Jun- et JunD-dépendante dans les 293T et la lignée lymphocytaire CEM. Cette augmentation de l'activation a été observée tant au niveau épisomal qu'au niveau chromosomal à l'aide de clones stablement transfectés par le plasmide collagenase-Luc quoiqu'à une moins forte intensité. Nous avons de plus observé que cette activation nécessitait le motif LZ atypique de APH-3 et APH-4 permettant une interaction avec les facteurs de transcription de la famille Jun. Ceci suggère que APH-3 et APH-4 agissent de façon similaire aux facteurs de transcription de la famille bZIP. Or, les protéines bZIP contiennent en plus de leur motif basique et LZ discuté ci-haut, d'autres domaines fonctionnels physiquement indépendants dont des domaines activateurs (AD) et des domaines répresseurs (RD) (Miller 2009).

Considérant l'augmentation significative induite par APH-3 et APH-4 sur l'activation de la transcription Jun-dépendante, nous avons évalué si, comme HBZ, ces protéines contenaient un domaine activateur (Gaudray et al. 2002). Pour se faire, nous nous sommes tournés vers le système classique où le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal-4 de la levure fusionné dans le même cadre de lecture que le cDNA de APH-3 et APH-4 a été co-exprimé avec un plasmide rapporteur luciférase sous le contrôle d'une boîte TATA minimale et cinq sites de liaison reconnus par Gal-4. Ces expériences réalisées dans les 293T et les CEM n'ont pu mettre en évidence un domaine d'activation dans APH-3 et APH-4. Nos mutants de délétion de la région N-terminale ont cependant montré que, contrairement à HBZ, un tel domaine était absent dans cette région (Gaudray et al. 2002). Les analyses de gène rapporteur dans les CEM à l'aide du dominant négatif c-Jun délété de son AD co-exprimé avec APH-4 ont quant à elles montré que le AD de c-Jun est crucial. Sans lui, aucune activité transcriptionnelle n'est mesurée. Ceci dit, APH-3 et APH-4 semblent dépourvus d'un domaine activateur autonome et semblent plutôt agir comme co-activateurs. Ainsi, ceci implique nécessairement un mécanisme alternatif pouvant potentialiser l'activation de Jun qui demeure inconnu.

Bien qu'un AD ne soit pas présent dans la séquence de APH-3 et APH-4, nous trouvons deux « LXXLL-like » putatifs dans chacune de leur séquence, positionnés dans la région centrale et à l'extrémité C-terminale comme dans la séquence de APH-2. Ces séquences sont typiquement retrouvées dans les domaines activateurs et sont ainsi nommées éléments transactivateurs (TE). Ceux-ci sont reconnus pour être impliqués dans le recrutement de coactivateurs (Gwack et al. 2001; McInerney et al. 1998; Heery et al. 1997). HBZ contient deux TE dans son AD dont un motif ²⁴LXXLL²⁸-like et un ⁴⁴LXXLL⁴⁸ classique et ceux-ci dirigent une interaction avec les coactivateurs CBP/p300 (Clerc et al. 2009; Thébault et al. 2004). La contribution des motifs « LXXLL-like » putatifs dans l'activation de la transcription reste donc à être évaluée, mais s'il s'agissait de TE, nous aurions certainement pu voir un effet lors de notre test d'activation utilisant le DBD de Gal-4.

Il serait également intéressant d'analyser si l'induction de l'activation est due à un changement dans l'activité de liaison à l'ADN, possiblement plus stable lors de la formation

du complexe Jun/APH. En effet, nous avons pu observer que l'hétérodimère c-Jun/APH-4 a une activité transactivatrice aussi forte que c-Jun/c-Fos, un hétérodimère avec une très haute stabilité (Glover and Harrison 1995). Il est tout aussi envisageable que APH-3 et APH-4 jouent un rôle plutôt structural dans l'augmentation de l'activité transcriptionnelle en facilitant l'interaction entre Jun et d'autres facteurs de transcription liés sur le promoteur en proximité des sites AP-1 formant ainsi un *enhanceosome* (Miller 2009). En effet, d'autres sites de liaison sont souvent retrouvés sur les promoteurs en proximité des sites AP-1 et les facteurs AP-1 peuvent former des complexes fonctionnels sur l'ADN avec une multitude de familles de facteurs de transcription, dont NFAT (Peterson et al. 1996). Cette formation d'un *enhanceosome* peut réguler l'activité ainsi que la spécificité de la transcription des gènes (Miller 2009; Merika and Thanos 2001). Cette hypothèse pourrait expliquer l'activation plus faible induite par APH-3 et APH-4 avec la construction du plasmide rapporteur AP-1-Luc contrairement à celui avec le promoteur de la *collagenase*. Il est aussi connu que l'activité AP-1 peut être régulée négativement par des facteurs répresseurs (par exemple IP-1) (Auwerx and Sassone-Corsi 1991; Baichwal and Tjian 1990; Bengal et al. 1992). Ainsi, il est possible que APH-3 et APH-4 inhibent l'interaction entre Jun et un de ces répresseurs sur le promoteur.

D'autre part, nous avons observé que le mutant APH-4 ayant subi une délétion des aa 1 à 80 a entièrement perdu sa capacité d'activer la transcription lorsque co-exprimé avec c-Jun contrairement au mutant délétion aa 1 à 36 qui lui, n'a subi qu'une réduction importante dans sa capacité d'activation. Un domaine modulateur (MD) consistant d'un groupe de six résidus très chargés (EQEERE) adjacent au DBD de la séquence de HBZ a été montré pour être en partie responsable, avec son AD, de l'activation de la transcription JunD-dépendante (Hivin et al. 2006; Thébault et al. 2004). En fait, ce domaine modulateur n'entraîne pas de changement dans l'activité de liaison à l'ADN de JunD et n'est pas impliqué dans la formation de l'hétérodimère HBZ/JunD. Cependant, ce domaine augmente l'activité transcriptionnelle de JunD et ce possiblement en influençant l'architecture (orientation du dimère et/ou flexion de l'ADN) du complexe formé de JunD lié au promoteur (Hivin et al. 2006). Nous retrouvons aussi des résidus chargés dans la séquence de APH-3 et APH-4 en proximité de la région basique et ceux-ci représentent un mécanisme potentiel de régulation de la transcription. Des mutations ponctuelles permettraient d'évaluer le rôle possible de ces résidus chargés.

En analysant les résultats obtenus dans les chapitres 2 et 3, nous pouvons établir un parallèle entre la localisation cellulaire des protéines antisens et leur pouvoir régulateur de la transcription dépendante de Jun. Les études de colocalisation ont montré que plusieurs structures ponctuées des APH et de HBZ ne colocalisaient pas. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que APH-3 et APH-4 pourraient avoir une fonction pouvant être différente de celle de HBZ. HBZ séquestre JunB et c-Jun dans des corps nucléaires, ce qui réduit leur stabilité et du coup, entraîne une inhibition de la transcription JunB et c-Jun-dépendante (Clerc et al. 2009; Hivin et al. 2007). Ces résultats peuvent laisser croire que APH-3 et APH-4 sont localisés dans un domaine nucléaire favorable à la transcription.

Enfin, l'ensemble de ces résultats démontre que non seulement les protéines APH-3 et APH-4 régulent la transcription Jun-dépendante différemment de HBZ, mais semblent aussi moduler la transcription à l'aide d'un mécanisme distinct.

5.2.3.2. Régulation de processus biologiques

La modulation de l'expression génique Jun-dépendante induite par APH-3 et APH-4 suite à leur interaction avec ces facteurs entraîne nécessairement une réponse cellulaire physiologique et risque d'être importante lors d'une infection par HTLV-3 et HTLV-4 considérant les nombreux gènes régulés par ces facteurs. Les facteurs de transcription AP-1, essentiellement formés d'homodimères et d'hétérodimères des familles de protéines Jun et Fos, mais aussi ATF et Maf, sont impliqués dans la régulation d'une panoplie de processus biologiques, dont la prolifération cellulaire, la différenciation, la croissance, l'apoptose, la migration cellulaire, l'activation des cellules T, l'inflammation, la transformation cellulaire, l'ontogenèse, l'angiogenèse, et autres (Ransone et al. 1989a; Shaulian and Karin 2001). La composition du dimère dirigera la préférence pour certains sites d'ADN, soit TRE, CRE ou autres, ainsi que l'activité transcriptionnelle. La régulation de l'expression génique est d'autant plus complexifiée lorsque le dimère AP-1 interagit avec d'autres facteurs de transcription de manière ADN dépendant sur le promoteur (Chinenov and Kerppola 2001). Notons que la sélection du dimère dans la cellule dépendra du niveau d'expression des protéines (incluant les protéines répressives) et de leur état de phosphorylation pouvant varier

en fonction du type cellulaire et du contexte (réponse au stimulus extérieur) (Miller 2009). La dimérisation est aussi un processus réversible. Un changement de partenaire dans le dimère peut donc survenir de manière précoce versus tardive, ce qui entraîne une différente régulation de gènes spécifiques en fonction du temps (Miller 2009). De plus, l'activité de ces facteurs est finement régulée et une légère modulation induite par exemple par des protéines virales comme APH-3 et APH-4 pourrait avoir de grandes répercussions sur la cellule (Eferl and Wagner 2003). Il est cependant difficile de transposer nos résultats d'analyse de gène rapporteur où nous avons surexprimé les APH avec un facteur Jun à un processus biologique puisque l'environnement de la cellule (ou le pool de protéines virales et de facteurs AP-1) ne se trouve plus dans son état physiologique naturel. Notons que le fait que APH-3 et APH-4 (et APH-2) ne modulent pas la voie AP-1 comme HBZ pourrait aussi entraîner une régulation différente des processus biologiques (et possiblement la pathogenèse associée à HTLV-1?). Ainsi, il serait intéressant d'analyser les gènes modulés par séquençage d'ARN lorsque APH-3 et APH-4 sont exprimés dans une lignée lymphocytaire ou à l'inverse, inhiber leur expression dans des lignées transformées par HTLV-3 et HTLV-4 (si disponibles).

Dans le but de comprendre l'effet de la régulation induite par ces protéines, nous avons d'abord évalué leur possible rôle dans l'apoptose. Pour ce faire, nous avons surexprimé APH-3 et APH-4 fusionné à la GFP dans la lignée cellulaire COS-7 et analysé le niveau d'apoptose par cytométrie en flux à l'aide d'un marquage à l'annexine V combiné au 7AAD. Nos résultats préliminaires ont montré qu'il n'existait aucune corrélation entre le niveau d'apoptose et l'expression de ces protéines antisens comparativement au contrôle suggérant que la modulation de la voie AP-1 entraînée par ces protéines n'influence pas la régulation de ce processus (résultats non montrés). Considérant le rôle important de HBZ dans la prolifération cellulaire (versus APH-2) et sa corrélation avec le nombre de cellules en phase S, une évaluation de la capacité proliférative, et même voir transformante, de APH-3 et APH-4 doit absolument être réalisée. Notons qu'une étude récente a montré que la protéine APH-3 peut, bien que faiblement, induire la formation de colonies dans l'agar de cellules fibroblastiques de rats suggérant un rôle oncogénique pour cette protéine (Turpin et al. 2014). L'analyse de sa capacité à induire la prolifération d'une lignée lymphocytaire IL-2-dépendante (Kit 225) en absence de cette interleukine serait aussi nécessaire afin d'évaluer si APH-3 exprimée à partir

de l'ADN proviral délété du LTR 5' a réellement un pouvoir prolifératif. Il serait d'autant plus pertinent d'étudier l'effet de APH-3 et APH-4 sur l'activation des lymphocytes T étant donné que la voie de signalisation AP-1 est activée suite à une stimulation du récepteur de cellules T (*T Cell Receptor*; TCR).

5.2.4. Activation du promoteur de *hTERT*

Dans l'article 2, nous avons évalué la régulation d'un second promoteur cellulaire, la télomérase humaine (*human telomerase reverse transcriptase*; hTERT) dont l'expression de la protéine codée par ce gène est souvent dérégulée et associée à plusieurs cancers incluant l'ATL (Uchida et al. 1999; Grassmann et al. 2005; Matsuoka 2005). D'ailleurs, une forte activité de la télomérase est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de l'ATL (Kubuki et al. 2005). Lors de nos analyses, nous avons pu déterminer que APH-3 et APH-4 augmentent l'activité transcriptionnelle de ce gène en présence de tous les membres de la famille Jun contrairement à HBZ qui ne peut l'activer que lorsque JunD est présent (Kuhlmann et al. 2007; Borowiak et al. 2013). Notons que lors de ces analyses, nous avons opté pour un promoteur délété où les sites AP-1 sont absents et n'ayant que les sites de liaison pour les facteurs SP1 et c-Myc. Ceci laisse croire que APH-3 et APH-4 sont impliquées dans la régulation d'autres sites présents sur les promoteurs et pourrait expliquer l'activation plus faible observée avec le plasmide rapporteur AP-1-Luc comparativement au promoteur de la collagenase. De plus, ces résultats suggèrent que APH-3 et APH-4 peuvent réguler le promoteur de hTERT indirectement. Plusieurs transactivateurs viraux régulent l'expression génique sans jamais lier directement l'ADN mais plutôt en modifiant l'activité des facteurs cellulaires ayant un DBD, ce qui est le cas pour la protéine EA1 de l'adénovirus, pX de EBV, Tax chez HTLV-1 et même dans la majorité des cas HBZ (Natoli et al. 1994; Sassone-Corsi 1988). Enfin, APH-3 et APH-4 semblent aussi capables de reconnaître dans ce contexte des complexes transcriptionnels déjà existants, dont possiblement Jun/SP1 liant l'ADN de manière SP1-dépendante plutôt que *via* un site AP-1, afin de réguler la transcription. Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions entreprendre des expériences de double IP et ou double CHIP dans le but d'évaluer la possibilité d'un complexe ternaire entre APH, Jun et SP1 sur le promoteur.

Enfin, il est difficile d'interpréter ce qu'implique cette régulation au niveau physiologique considérant qu'il y a jusqu'à présent très peu d'information sur HTLV-3 et HTLV-4 et aussi du fait que nous avons utilisé un système de surexpression. Cependant, sachant que l'activité de la télomérase dépend d'une régulation transcriptionnelle du gène *hTERT* et que cette stratégie est un mécanisme couramment utilisé lors du processus de carcinogenèse par plusieurs virus oncogènes, nous pouvons spéculer que l'expression de APH-3 et APH-4 chez les patients infectés par HTLV-3 et HTLV-4 pourrait mener à la maladie (Bellon and Nicot 2008).

5.3. Discussion complémentaire au Chapitre IV

5.3.1. Interaction entre HBZ et les protéines majeures du nucléole

Dans l'article 3 (Chapitre IV), nous avons mis en évidence de nouvelles interactions *in vivo* entre la protéine virale HBZ et deux des trois protéines majeures du nucléole, B23 et C23 (Hiscox 2002). Ces interactions suggèrent pour la première fois un rôle spécifique de HBZ dans ce domaine nucléaire. Notons que puisque ces expériences ont été réalisées par la méthode de CoIP, nous ne pouvons être certains de leur interaction directe. La méthode de GST pull down nous permettrait d'évaluer si ces protéines font partie d'un complexe protéique ou si elles forment une interaction directe.

Aussi, puisque B23 et C23 contiennent un domaine pouvant lier l'ADN et l'ARN, une co-immunoprécipitation artéfactuelle aurait pu survenir lors de nos analyses. Nous pouvons contrôler cette possibilité à l'aide d'un traitement des échantillons protéiques à la DNase avant d'effectuer l'IP, ce qui éviterait une possible co-immunoprécipitation de B23 et C23 avec l'ADN. D'autre part, cette situation est peu probable étant donné que nous avons confirmé leur interaction en réalisant l'immunoprécipitation à l'inverse, c'est-à-dire en immunoprécipitant B23 plutôt que HBZ, et que le DBD de HBZ est non-fonctionnel (*in vivo* jusqu'à présent). De plus, B23 n'a pu être co-immunoprécipité avec APH-2, APH-3, et APH-4 suggérant que B23 n'est pas co-immunoprécipité de façon non spécifique.

Notons aussi que ces expériences ont été réalisées dans les lignées 293T, Hela et COS-7 en surexprimant HBZ et en détectant son interaction avec B23 endogène et exogène. Bien que cette interaction soit spécifique, il serait crucial de la confirmer dans des lignées ATL (TL-Om1) et transformées par HTLV-1 (MT-2 et C8166-45), où HBZ est exprimée à partir de son propre promoteur et à des niveaux plus naturels, ce qui permettrait d'évaluer l'importance de cette interaction lors d'une infection.

5.3.1.1. Région de liaison dans HBZ

Le nucléole est un domaine nucléaire non entouré par une membrane. Une localisation nucléolaire nécessite donc une interaction avec un composant de cette structure, soit l'ADN ribosomal (ADNr), l'ARN ou une des protéines majeures dont B23, C23 et Fibrillarine (Carmo-Fonseca et al. 2000; Hiscox 2007). La région interagissant avec le composant contient ainsi leur signal de localisation nucléolaire (NoLS ou *nucleolar retention signal*), et entraîne l'accumulation de la protéine dans le nucléole. Contrairement au NLS et NES, aucune structure ou séquence consensus n'a pu être identifiée pour les NoLS jusqu'à présent, bien qu'ils soient généralement riches en résidus basiques (arginine et lysine) et peuvent chevaucher un NLS (Scott et al. 2010). Par exemple, le NoLS de Rev chez BIV et celui de la nucléocapside du virus du syndrome reproductif et respiratoire porcin chevauche leur NLS (Gomez Corredor and Archambault 2009; Rowland et al. 2003). La longueur du NoLS peut varier entre 3 à 50 aa et plus il y a de résidus basiques dans cette séquence, plus la localisation nucléolaire sera importante (Musinova et al. 2015). Il a été suggéré qu'une interaction de charges positives-dépendantes (ou électrostatiques) médiées par les résidus basiques permet la rétention des protéines au nucléole plutôt qu'une séquence spécifique (Musinova et al. 2015). Une étude a suggéré RRR-RKR-R comme possible séquence consensus mais celle-ci ne semble être attribuable qu'à une certaine classe de NoLS (Musinova et al. 2015; Reed et al. 2006).

Selon nos résultats, une délétion des domaines AD et du bZIP permet à HBZ d'interagir et de co-localiser au nucléole plus fortement avec B23 et C23. Ceci suggère ainsi

qu'une, ou les deux, régions basiques centrales agissant en tant que NLS, participent à cette interaction et sont suffisantes pour induire une localisation nucléolaire. Ces résultats concordent avec les nombreuses observations démontrant que B23 lie généralement le NoLS de protéines cellulaires et virales caractérisé par une région basique comme les protéines cellulaires p120 et C23; la capsid (ou nucléocapsid) de plusieurs virus ARN simple brin positif; Tat et Rev du VIH-1; et Rex de HTLV-1 (Valdez et al. 1994; Li et al. 1996; Greco 2009; Li 1997; Fankhauser et al. 1991; Siomi et al. 1990; Adachi et al. 1993). Il a même été montré que B23 préfère lier de longues séquences riches en résidus basiques plutôt que de courtes séquences basiques, confirmant nos résultats (Szebeni et al. 1995).

De façon intéressante, la présence des domaines AD et bZIP dans la séquence de HBZ entraîne une localisation au nucléole non exclusive et masque en partie le NoLS de HBZ. Il semble y avoir une compétition entre des interactions spécifiques dans les autres compartiments cellulaires, tels qu'observé avec la protéine de la capsid du virus SRAS-CoV suite à la génération de mutants de délétion (Timani et al. 2005; You et al. 2005).

D'autre part, selon nos analyses, l'expression exogène de B23 semble partiellement accroître la localisation nucléolaire de sHBZ et même possiblement de uHBZ. Nous suggérons B23 comme possible mécanisme d'importation/rétention au nucléole comme tel est le cas pour de nombreuses protéines (Emmott et al. 2010a). Afin de vérifier si le transport de B23 au nucléole représente le mécanisme d'importation ou de rétention de HBZ, nous pourrions générer une protéine fusion contenant le domaine de liaison en question de B23 et le co-exprimer, afin qu'il agisse comme dominant négatif, avec HBZ afin d'étudier sa localisation. Nous pourrions aussi comparer la mobilité de sHBZ par la méthode de FRAP (*Fluorescent After Photobleaching*) lorsque co-exprimé avec B23 ou lorsque l'expression de cette dernière est inhibée par ARN interférant. Nous pourrions aussi induire une localisation aberrante dans le cytoplasme de B23 en lui rajoutant un NES en C-terminal à sa région codante (Federici and Falini 2013). Notons que l'activité nucléolaire d'une protéine est difficilement évaluable puisque son accumulation dans ce domaine nucléaire peut être régulée par plusieurs sites d'interaction (Musinova et al. 2015). La nucléoline interagit aussi avec HBZ, et il est donc possible que celle-ci puisse tout de même se rendre au nucléole malgré nos tentatives. Dans ce

cas, une meilleure compréhension de l'interaction entre HBZ/B23 et HBZ/C23 sera nécessaire avant d'entreprendre ces expériences.

Mentionnons aussi que HBZ (sHBZ et uHBZ) est la seule protéine antisens chez les HTLV pouvant interagir avec B23. La localisation nucléolaire de APH-3 et APH-4 implique nécessairement un autre composant du nucléole qui demeure inconnu. Une évaluation de leur interaction avec d'autres composants du nucléole serait ainsi pertinente, par exemple la nucléoline.

5.3.1.1 Région de liaison dans B23

Afin de mettre en évidence la région de B23 liant sHBZ, nous avons généré des mutants de délétion des régions HoD (*Homo-Oligomerization Domain*), HeD (*Hetero-Oligomerization Domain*) et RBD (*RNA binding Domain*) de B23.1. Selon nos résultats de CoIP, sHBZ n'interagit pas avec B23.1 par l'entremise de ses domaines HoD ou HeD. Considérant que l'homo-oligomérisation de B23 est surtout importante pour son activité en tant que chaperone, il n'est pas surprenant que ce mutant puisse toujours interagir avec HBZ (Hingorani et al. 2000; Frehlick et al. 2007). L'interaction de HBZ avec B23.1 n'interfère donc pas avec la formation d'oligomère comme tel est le cas lors de l'interaction entre B23 et la protéine suppressive de tumeur ARF (Enomoto et al. 2006; Itahana et al. 2003).

Nous retrouvons aussi deux NES CRM-1-dépendant dans le domaine HoD (Dingwall et al. 1987). Le mutant de délétion devrait donc avoir une prépondérance au noyau/nucléole et interagir plus fortement avec HBZ si l'interaction se fait dans ce compartiment. Bien que le mutant de délétion du HoD semble interagir très fortement avec HBZ, nous observons que ce mutant est mieux exprimé comparativement à la protéine de fusion sauvage et les autres mutants de délétion. Nous ne pouvons ainsi conclure sur le niveau de leur interaction dans cette étude.

Le domaine HeD est souvent impliqué dans les interactions avec d'autres protéines dont la nucléoline et la protéine virale Tat (Li 1997; Li et al. 1996). La mise en évidence que

sHBZ n'interagit pas avec cette région et qu'elle n'a pas besoin de ce domaine pour être localisée au nucléole laisse la possibilité de la formation d'un complexe ternaire et d'une modulation de la régulation de ce complexe au nucléole.

Une interaction entre sHBZ et le mutant ayant subi une délétion du domaine RBD a aussi pu être détectée, mais en contrôlant la quantité de protéine de fusion Red-B23 Δ RBD produite, cette interaction semble plus faible qu'avec les autres mutants. L'activité de liaison à l'ARN de B23 est étroitement liée à sa localisation nucléolaire et ce domaine retrouvé en C-terminal de la protéine est possiblement important pour sa fonction dans la biogenèse des ribosomes (Okuwaki 2008). D'ailleurs, deux résidus ont été identifiés comme important pour sa localisation nucléolaire, les tryptophanes 286 et 288 (Nishimura et al. 2002). Le variant B23.2 qui contient exactement la même séquence que le variant B23.1 à l'exception d'une délétion de l'extrémité C-terminale, ne se retrouve pas dans le nucléole et est donc incapable de lier l'ARN. Ceci dit, l'interaction entre sHBZ et B23 pourrait engendrer une modulation de son activité dans la synthèse des ribosomes. Suite à nos analyses de microscopie confocale, nous avons observé que ce mutant se localisait au nucléole malgré la délétion du RBD ce qui ne concorde pas avec la littérature. Aussi, nous avons observé un marquage exclus du nucléole dans environ la moitié des cellules exprimant HBZ tandis qu'il y avait une co-localisation entre HBZ et Red-B23 Δ RBD au nucléole dans l'autre moitié des cellules. Notons que notre étude a été réalisée dans les cellules 293T et COS-7 exprimant aussi de façon endogène B23.1. La localisation aberrante de notre mutant Red-B23.1 Δ RBD peut possiblement s'expliquer par cette expression de B23.1 endogène oligomérisant avec notre mutant de délétion via leur HoD et l'entraînant dans le nucléole. Nous ne pouvons exclure pour l'instant l'implication de ce domaine dans l'interaction entre HBZ et B23.

D'autre part, deux domaines acides adjacents à l'extrémité N-terminale, que nous n'avons pas pu étudier lors de cette étude, sont impliqués dans la liaison aux histones et à l'assemblage du nucléosome (Okuwaki et al. 2001). Les protéines Ad basiques histone-like du virus adénovirus interagissent avec ces deux régions acides de B23 (Samad et al. 2007). Ces domaines acides semblent permettre de tamponner la charge positive des résidus basiques lors de l'interaction (Okuwaki 2008). Ainsi, l'implication de ce domaine acide dans l'interaction

avec la région basique sHBZ est fortement possible par un mécanisme électrostatique et reste à être évalué.

5.3.2. Est-ce que l'interaction avec B23 et C23 est indépendante?

Dans l'article 3, nous avons montré que sHBZ peut interagir avec B23 et C23. Ces deux protéines peuvent former un complexe de façon dépendante au préARNr (Pinol-Roma 1999; Chen and Huang 2001). En effet, B23 et C23 sont impliquées dans l'assemblage des ribosomes (Ginisty et al. 1999; Szebeni and Olson 1999; Philpott et al. 2000). Il serait d'abord important de vérifier si l'interaction entre HBZ et les protéines nucléolaires est dépendante de la transcription des préARNr. Pour se faire, une inhibition de la transcription par l'ARN polymérase I pourrait être induite par un traitement à l'actinomycine D puis la localisation de HBZ et son interaction avec B23 (et C23) pourraient être analysées.

Aussi, l'interaction entre sHBZ et B23 ne semble pas affecter le niveau d'interaction entre B23 et C23 suite à une expression de HBZ de manière dose-dépendante. Les protéines B23 et C23 sont structurellement désorganisées (47% et 55%) et leur classification en tant que protéine *Hub* a été suggérée (Emmott and Hiscox 2009). Les protéines *Hub* peuvent lier plusieurs protéines en même temps de manière position dépendante et temps-dépendant permettant de structurer le nucléole autour des NOR (*Nucleolar Organizer Region*) (Emmott and Hiscox 2009). De plus, selon nos résultats HBZ et C23 ne semblent pas lier le même domaine de B23 (Li et al. 1996). Ceci dit, il serait important de vérifier par des expériences de double immunoprécipitation ou encore en inhibant l'expression de B23 ou C23 par siRNA, si sHBZ, B23 et C23 forment un complexe ternaire. Il serait d'autant plus intéressant d'évaluer si l'assemblage des ribosomes a été modifié suite à l'expression de HBZ. Des analyses de production d'ARNr matures et précurseurs sur gel d'agarose à ARN ou des analyses de profil de polysomes permettraient d'évaluer la possibilité que l'expression de HBZ module la biogenèse des ribosomes.

5.3.3. Quand a lieu l'interaction entre sHBZ et B23 ou C23?

Chez les cellules de mammifères, le nucléole n'est présent que lors de l'interphase du cycle cellulaire. Pendant la mitose, plusieurs protéines nucléolaires quittent le nucléole et celui-ci se désassemble. Le nucléole peut ensuite se réassembler à la fin de la mitose en commençant par former des corps prénucléolaires (*Pre-Nucleolar Bodies*; PNB). Ce n'est que lors de la synthèse des ARNr par l'ARN polymérase I que les PNB sont recrutés aux NOR formant ainsi un nucléole intègre (Scheer and Weisenberger 1994). Ainsi, le nucléole est intimement lié au cycle cellulaire de manière dépendante et indépendante à la synthèse des ribosomes (Tsai and Pederson 2014).

Lors de notre analyse de colocalisation par microscopie confocale, nous n'avons pas pu détecter de façon systématique une colocalisation dans les nucléoles entre sHBZ et C23, et ce surtout à 24 heures. En fait, la colocalisation entre HBZ et B23 ne s'est pas avérée toujours évidente. Rappelons que HBZ démontre différents types de patrons de localisation nucléaire, c'est-à-dire que sHBZ peut parfois être nucléaire sans être nucléolaire et cette divergence n'a jamais été étudiée (Hivin et al. 2005). Étant donné que le nucléole est une structure très dynamique, plusieurs protéines se localisent dans ce domaine de manière dépendante au cycle cellulaire, telles que la nucléocapside N du coronavirus (Cawood et al. 2007). La localisation nucléolaire de B23 est aussi dépendante du cycle cellulaire, plus spécifiquement d'une phosphorylation de sa sérine en position 125 par CK2 n'ayant lieu qu'à l'interphase (Sirri et al. 2000; Negi and Olson 2006). Afin de mieux caractériser la colocalisation entre sHBZ et les protéines nucléolaires B23 et C23, un traitement à l'actinomycine D ou sinon un traitement à la ARNase permettrait de mettre en évidence si celle-ci dépend de l'intégrité structurale du nucléole, c'est-à-dire ARNr-dépendant (tel que dans la section précédente) considérant que B23 et C23 forment des complexes ribonucléoprotéiques (Ginisty et al. 1998; Borer et al. 1989). Il serait aussi intéressant d'enrichir les cellules à différentes étapes du cycle cellulaire à l'aide de privation de sérum (G_0), d'un double traitement à la thymidine (G_1/S) et d'un traitement au nocodazole (G_2/M) et analyser la colocalisation et l'interaction entre sHBZ et B23 ou C23 dans ces différents enrichissements par entre autres la technique FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Des analyses de FRAP (*Fluorescence Recovery*

After Photobleaching) sur ces enrichissements permettraient également de comparer le taux de récupération de sHBZ en temps réel au nucléole et ainsi regarder sa dynamique à différentes étapes du cycle cellulaire.

5.3.4. Interaction entre sHBZ et les composants du nucléole

Lors des dernières années, l'optimisation de l'isolation des nucléoles par centrifugation de gradient de densité suivie d'analyse par spectrométrie de masse quantitative couplée à la technique de marquage isotopique stable par des aa dans une culture cellulaire (*Stable Isotope Labeling by amino acids in cell culture*; SILAC) a permis de mettre en évidence que le protéome nucléolaire chez les cellules humaines renferme plus de 4500 protéines (Andersen et al. 2005; Ahmad et al. 2009). Bien que les protéines B23, C23 et Fibrillarine soient les protéines nucléolaires les plus abondantes du nucléole et que nous ayons identifié deux d'entre elles comme nouveaux partenaires d'interaction de HBZ, il serait important de faire une étude de l'interactome où les complexes protéiques formés de HBZ dans la fraction nucléolaire seraient isolés par immunoprécipitation et ensuite analysés par spectrométrie de masse combinée au SILAC (Andersen et al. 2005; Trinkle-Mulcahy et al. 2008). Cette analyse permettrait entre autres de confirmer que l'interaction entre sHBZ et B23 (et C23) a lieu dans le nucléole, bien que nous ayons observé que le mutant HBZ délété de son AD et de son bZIP soit strictement nucléolaire, et qu'ils interagissent très fortement avec B23. Elle nous permettrait aussi d'identifier de nouveaux partenaires d'interaction nucléole-dépendant. Ces interactions spécifiques aux nucléoles nous donneront ainsi des informations précieuses sur un processus biologique ciblé comme la prolifération cellulaire ou encore la réplication virale.

D'autre part, le nucléole est un domaine nucléaire très dynamique dont le protéome subit des échanges continus avec le nucléoplasme et le cytoplasme en fonction de l'état de la cellule (temps, conditions, etc.) (Andersen et al. 2005). Il serait important de faire une étude protéomique spatiale où nous pourrions comparer la distribution de chaque protéine dans les différents compartiments cellulaires (nucléole, nucléoplasme et cytoplasme) dans différentes conditions. Dans notre cas, nous pourrions comparer des cellules ATL ou transformées par HTLV-1 avec des cellules où l'expression de HBZ est réprimée (Boisvert et al. 2010). Bien

que cette dernière technique ne déterminerait pas s'il y a des interactions, elle permettrait de mettre en évidence des changements au niveau du protéome nucléolaire (présence et abondance) spécifiquement associé à HBZ et à une infection par HTLV-1, ouvrant la porte quant à son rôle dans ce domaine nucléaire (Boisvert et al. 2010). Notons que l'utilisation de cellules primaires plutôt que des lignées cellulaires serait préférable pour ce type d'étude puisque l'immortalisation d'une lignée pourrait directement agir sur le protéome nucléolaire.

5.3.5. Rôle de HBZ dans le nucléole

5.3.5.1 Effets sur le cycle viral

Le nucléole est aujourd'hui décrit comme une organelle plurifonctionnelle comptant une variété de protéines impliquées dans plusieurs processus biologiques dont la biogénèse des ribosomes, la mitose, la régulation du cycle cellulaire, le vieillissement cellulaire, les modifications des ARNt et ARNm, et la biogénèse des complexes ribonucléoprotéiques (RNP) (Pederson 1998; Pederson and Tsai 2009; Carmo-Fonseca et al. 2000; Olson et al. 2000; Boisvert et al. 2010). Lors de la majorité des infections virales (virus ARN et ADN), le nucléole subit des perturbations suite à des modifications structurales, la composition protéique et des interactions protéiques (Hiscox et al. 2010; Hiscox 2007). Ces perturbations entraînent une augmentation de la réplication virale de manière directe ou en modulant le cycle cellulaire et les voies apoptotiques. Cependant, ces perturbations demeurent encore mal comprises aujourd'hui (Greco 2009). Des études de protéomique quantitative combinée au SILAC sur des extraits préparés à partir de cellules infectées ont montré que ces modulations ne touchaient qu'un faible pourcentage de protéines nucléolaires suggérant ainsi que l'infection cible des protéines cellulaires spécifiques et leurs fonctions spécifiques (Lam et al. 2010; Emmott et al. 2010a; Emmott et al. 2010b; Emmott et al. 2010c; Munday et al. 2010). Ainsi, différents virus moduleraient le protéome de manière similaire afin d'optimiser leur réplication virale et d'induire la pathogenèse (Hiscox et al. 2010). Ceci est observé par exemple suite à une infection par les adénovirus et HSV-1. Une relocalisation des protéines nucléolaires B23, nucléoline et UBF (facteur de transcription de l'ARN polymérase I) dans les centres de réplication virale est induite lors de ces infections et cette redistribution s'avère

importante pour une réplication efficace de leur ADN viral (Rodrigues et al. 1996; Matthews 2001; Okuwaki et al. 2001; Lawrence et al. 2006; Calle et al. 2008; Lymberopoulos and Pearson 2010). La nucléoline est aussi ciblée et relocalisée par l'ARN polymérase virale, NS5B lors de la réplication de l'ARN viral du virus HCV dans le cytoplasme (Hirano et al. 2003; Kusakawa et al. 2007; Shimakami et al. 2006). Il a aussi été montré que la nucléoline transporte les protéines antigène delta (HDAg) du virus de l'hépatite D au nucléole où elles interagissent avec B23 pour réguler la réplication de l'ARN de ce virus (Tan et al. 2004; Huang et al. 2001; Lee et al. 1998). Les protéines nucléolaires peuvent aussi contribuer à la réplication virale à d'autres niveaux du cycle répliatif viral tels que l'entrée du virus dans les cellules. Une re-localisation de la nucléoline à la surface de la cellule est induite par plusieurs virus dont le virus parainfluenza humain de type 3 (*Human ParaInfluenza Virus-type 3*; HPIV-3), le virus respiratoire syncytial (VRS), le virus de l'encéphalite japonaise (*Japanese Encephalitis Virus*; JEV) et le virus de la fièvre du Congo-Crimée, et permet, en tant que co-récepteur, à ceux-ci d'entrer dans la cellule (Xiao et al. 2011; Thongtan et al. 2012; Tayyari et al. 2011; Bose et al. 2004). Il a aussi été montré qu'une redistribution des protéines nucléolaires pouvait augmenter la traduction des ARNm viraux lors d'infections par le poliovirus et le HCV. Suite à sa relocalisation dans le cytoplasme, la nucléoline peut se lier au IRES présent dans la région 5' non codante de ces ARNm viraux et favoriser leur traduction et ainsi la réplication virale (Waggoner and Sarnow 1998; Izumi et al. 2001; Lu et al. 2004). Un rôle pour B23 dans la sortie du virus a aussi été proposé puisqu'elle est impliquée dans l'assemblage de la capsid de l'AAV ayant lieu dans le nucléole ainsi que de l'exportation du génome viral (Bevington et al. 2007).

Plusieurs autres virus ADN et ARN non cités ci-haut ciblent le nucléole et/ou les protéines nucléolaires pour favoriser leur réplication virale et ceci inclut les rétrovirus (Greco 2009). Chez les patients infectés par le VIH-1, nous retrouvons une structure anormale du nucléole et une augmentation de la nucléoline à la membrane cellulaire (Galati et al. 2003). Cette relocalisation permet aussi au VIH-1 d'utiliser la nucléoline comme co-récepteur, facilitant son attachement lors de son entrée dans la cellule (Galati and Bocchino 2007). Tat et Rev sont deux protéines du VIH-1 retrouvées dans le nucléole de la cellule infectée (Perkins et al. 1989; Ruben et al. 1989). Ces protéines virales interagissent et sont même transportées

dans le nucléole par la protéine nucléolaire B23 (Li 1997; Fankhauser et al. 1991; Szebeni et al. 1997). Cette interaction est dirigée par un NoLS caractérisé par une région basique présente dans la séquence de Tat et de B23 (Szebeni et al. 1997; Siomi et al. 1990). La localisation nucléolaire de Tat est extrêmement importante pour son activité dans la transcription virale puisqu'elle forme plusieurs de ses complexes protéiques à cet endroit dont celui avec le facteur d'élongation de la transcription b (P-TEFb), essentiel à son activité (Greco 2009). La localisation nucléolaire de Rev est quant à elle essentielle pour la régulation de l'expression génique du VIH-1 puisque les complexes Rev :CRM1 se forment dans le nucléole avant d'exporter les ARNm viraux dans le cytoplasme (Daelemans et al. 2005; Cochrane et al. 1990; Venkatesh et al. 1990). Notons qu'il a aussi été mis en évidence que, lors de son cycle réplcatif, l'ARNm du VIH-1 passe par le nucléole avant d'arriver au cytoplasme et que ceci est essentiel pour la réplication virale ((Michienzi et al. 2000; Canto-Nogues et al. 2001; Michienzi et al. 2006). La protéine Rev de BIV contient aussi un NoLS mais le rôle de sa localisation nucléolaire reste à être déterminé (Gomez Corredor and Archambault 2009).

L'interaction de sHBZ avec les protéines nucléolaires B23 et C23 implique une fonction inconnue de sHBZ, possiblement dans la réplication virale et/ou l'oncogenèse associées à une infection par HTLV-1. Il serait intéressant de générer des mutants modulant strictement la localisation nucléolaire de sHBZ et évaluer sa capacité à inhiber la réplication virale. sHBZ régule l'expression des gènes viraux et les gènes cellulaires au niveau transcriptionnel mais ceci pourrait potentiellement être accompli par un second mécanisme ayant lieu dans le nucléole. La protéine p30 de HTLV-1 est localisée au noyau ainsi qu'au nucléole (dans la région du *Granular Ccomponent*; GC) et contient deux NoLS dans sa séquence (Ghorbel et al. 2006; Koralnik et al. 1993; Sinha-Datta et al. 2007). Cette protéine virale inhibe de façon similaire à HBZ la transactivation du LTR par Tax et séquestre l'ARNm *Tax/Rex* dans le noyau inhibant en conséquence l'exportation des ARNm viraux Rex/CRM1 dépendant (Zhang et al. 2001; Nicot et al. 2004; Baydoun et al. 2007). Il a cependant été montré à l'aide de mutations que la localisation nucléolaire de p30 n'était pas impliquée dans cette régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle de HTLV-1 (Ghorbel et al. 2006). D'autre part, une interaction entre p30 et L18a, une sous unité ribosomale du 60S, a été découverte et son implication dans la réplication reste à être élucidé (Ghorbel et al. 2006). Il

risque d'être plus difficile dans le cas de sHBZ d'élucider son rôle spécifique au nucléole puisque son NoLS semble chevaucher son NLS. Des mutations ponctuelles seraient nécessaires dans le but de délimiter le NoLS et le NLS.

Notons que la protéine Rex orchestre la formation de son complexe ribonucléoprotéique dans le nucléole avant d'exporter les ARNm viraux (non et mono épissés) dans le cytoplasme (Hakata et al. 1998). Une étude a récemment montré que HBZ avait la capacité d'inhiber la fonction de Rex, ce qui en conséquence peut inhiber la réplication virale et induire une latence, phénomène important pour que HTLV-1 persiste chez son hôte (Philip et al. 2014). Le mécanisme par lequel ceci est accompli demeure cependant inconnu. De façon intéressante, ces deux protéines peuvent interagir avec B23 dans le nucléole (Adachi et al. 1993). À la lumière de ces résultats, il serait important d'évaluer si sHBZ régule le cycle viral à partir du nucléole, et surtout si cette régulation se fait par l'entremise de B23. Pour ce faire, nous pourrions inhiber l'expression de B23 par ARN interférant dans des cellules transformées par HTLV-1 et quantifier l'expression génique et la production de virions. Il serait ainsi nécessaire de vérifier si sHBZ compétitionne avec Rex pour B23.

5.3.5.2. Effets sur la cellule-Analyse sur la prolifération de cellules T

Il est estimé que 12% des cancers sont causés par des virus oncogéniques dont le virus de l'hépatite B (HBV), le virus de l'hépatite C (HCV), le virus d'Epstein-Barr (EBV), les virus du papillome humain (HPV), le virus herpès humain type 8 (ou virus herpès du sarcome de Kaposi, KSHV) et le HTLV (Mesri et al. 2014). Afin d'induire une infection persistante, ces virus oncogéniques ont développé des stratégies de réplication virale et d'évasion du système immunitaire en modulant les voies antiapoptotiques et prolifératives. Ceci entraîne des changements dans la cellule pouvant mener au cancer suite à une accumulation d'événements oncogéniques (*cellular cancer hallmarks*) (Mesri et al. 2014). Depuis le début des années 2000, le nucléole a été l'objet de nombreuses études suite à son statut de domaine plurifonctionnel et suite à l'association entre des perturbations de son environnement et le développement d'une multitude de cancers (Boisvert et al. 2007; Hiscox 2002; Pederson 1998).

Dans le but d'élucider si la localisation nucléolaire de sHBZ est impliquée dans sa capacité d'induire la prolifération de cellules T, nous pourrions générer un mutant de sHBZ déficient dans sa localisation nucléolaire et évaluer sa capacité d'induire la prolifération de la lignée lymphocytaire dépendante à l'IL-2 (Kit 225) en absence de cette interleukine. D'autre part, nous avons aussi mis en évidence une interaction entre sHBZ et la protéine nucléolaire B23. B23 est impliquée dans la croissance et l'homoéostasie cellulaire, plus spécifiquement dans la biogenèse des ribosomes, la duplication des centrosomes, la progression du cycle cellulaire, la différenciation cellulaire, l'apoptose et la régulation de la transcription. Ainsi, une perte de la fonction de B23 est observée dans plusieurs maladies hématologiques, par exemple dans les lymphomes anaplasiques à grandes cellules (ALCL), les leucémies promyélocytaires aiguës (APL) et les leucémies myéloïdes aiguës (AML) suite à une translocation de chromosomes, un changement de cadre de lecture ou encore à une délétion (Morris et al. 1994; Pandolfi 1996; Yoneda-Kato et al. 1996). De plus, B23 a aussi des propriétés oncogéniques (Yung 2007). D'ailleurs, elle est plus abondante dans les cellules qui prolifèrent rapidement et les cellules cancéreuses (Feuerstein and Mond 1987; Feuerstein et al. 1988; Shields et al. 1997; Subong et al. 1999; Tsui et al. 2004). B23 peut alors inhiber les étapes précoces de l'oncogenèse, tout comme elle peut aussi jouer un rôle dans la maintenance de la croissance des cellules cancéreuses (Kurki et al. 2004; Korgaonkar et al. 2005; Bertwistle et al. 2004; Colombo et al. 2002; Kondo et al. 1997). Aussi, une analyse du transcriptome de cellules primaires ATL a révélé que les gènes de B23 et C23 sont surexprimés dans les cellules ATL de types aiguës comparativement à des cellules ATL de types chroniques (Tsukasaki et al. 2004). B23 représente ainsi un bon candidat comme partenaire régulateur de HBZ dans les étapes tardives de la leucémogenèse de l'ATL. Ainsi, nous émettons l'hypothèse qu'une corrélation existe entre la distribution nucléolaire de sHBZ, sa forte interaction avec B23 et son effet prolifératif dans les cellules T. Dans le but d'évaluer si l'interaction entre sHBZ et B23 est impliquée dans la prolifération cellulaire, nous pourrions à nouveau avoir recours à la lignée de LT IL-2 dépendante exprimant stablement sHBZ et inhiber B23 par ARN d'interférence. Nous pourrions aussi inhiber l'interaction entre sHBZ et B23 en transfectant de façon transitoire, dans cette même lignée, une construction n'exprimant que la région d'interaction de B23 afin que celle-ci agisse comme dominant négatif et empêche l'import de HBZ au nucléole. Nous pourrions également ajouter un NES en C-terminal de la

région codante de B23 afin que celle-ci se localise de façon aberrante au cytoplasme (Federici and Falini 2013). Ces outils nous permettraient de faire un lien entre l'interaction de sHBZ et B23 au nucléole et le potentiel proliférateur de cette interaction.

D'un point de vue mécanistique, nous pourrions comparer la biogenèse des ribosomes par analyse de productions d'ARNr matures et précurseurs sur gel d'agarose à ARN ou par des analyses de profil de polysomes dans ces différentes conditions (et même comparer avec APH-2) étant donné que les altérations du nucléole chez les cellules cancéreuses sont souvent causées par une hyperactivation de la transcription des ADNr (pour revue (Drygin et al. 2010)). En fait, l'accélération de la biogenèse des ribosomes dans les cellules cancéreuses peut être une conséquence de la modulation des voies impliquant les protéines suppressives de tumeurs ou des oncogènes (Quin et al. 2014). Aussi, l'analyse de protéomique spatiale discutée dans la section ci-haut permettrait d'identifier les effecteurs en aval de B23. Par exemple, un mécanisme par lequel B23 induit le cancer est par une dérégulation de la voie de réponse au stress oncogénique (activation oncogénique et dommage à l'ADN) p14ARF-MDM2-p53 menant à la dégradation de p53 et inhibant l'arrêt du cycle cellulaire (Gjerset 2006). Dans les cellules ATL, nous trouvons peu de mutations inactivant *p53*, mais la fonction de p53 est altérée. Il a cependant été montré que ce mécanisme peut être régulé de manière p14ARF-MDM2-p53-indépendante (Takemoto et al. 2000). Finalement, cette interaction entre sHBZ et B23 pourrait impliquer d'autres effecteurs en aval de B23 et l'analyse protéomique spatiale nous permettrait de les identifier (Boisvert et al. 2010).

Selon nos résultats obtenus dans l'article 3, uHBZ peut se retrouver au nucléole lorsque B23 est surexprimée. Sachant ceci, il serait intéressant d'étudier si uHBZ démontre une capacité d'induire la prolifération cellulaire IL-2-indépendante dans la lignée Kit 225 lorsque B23 est surexprimée. Il serait aussi intéressant d'évaluer le rôle proliférateur de APH-3 et APH-4 considérant que ces protéines se localisent au nucléole mais n'interagissent pas avec B23. Cette analyse est d'autant plus pertinente du fait qu'une étude récente a montré que l'expression de la protéine APH-3 dans des cellules fibroblastiques de rats pouvait induire (légèrement) la formation de colonies dans l'agar, suggérant que APH-3 a possiblement un rôle oncogénique (Turpin et al. 2014).

Bien que cette section se soit surtout attardée à l'interaction entre sHBZ et B23, mentionnons que des études similaires seraient tout autant nécessaires afin d'approfondir le rôle de l'interaction entre sHBZ et la nucléoline. En effet, la nucléoline est aussi impliquée dans plusieurs processus dont la biogenèse des ribosomes, le remodelage de la chromatine, la recombinaison de l'ADN, la réplication de l'ADN, la transcription (pol I et pol II), la modification des rRNA, le métabolisme de ARNm, la prolifération cellulaire, la cytokinèse et l'apoptose (Tajrishi et al. 2011).

Conclusion

Malgré l'accroissement des connaissances sur la biologie du rétrovirus HTLV-1 et aux efforts continus dans la lutte contre l'ATL, un traitement efficace est toujours manquant. Une fine orchestration des protéines virales Tax et HBZ serait en grande partie responsable de l'apparition de la maladie. Désormais, il est cru que HBZ intervienne dans les étapes tardives du processus d'oncogenèse virale. Lors de ces travaux de doctorat, les nouvelles protéines virales, APH-3 et APH-4, traduites à partir d'un transcrit antisens ont été mis en évidence chez les rétrovirus HTLV-3 et HTLV-4 respectivement, indiquant que la transcription antisens est un mécanisme conservé chez la famille des rétrovirus. Considérant l'importance de sHBZ dans l'ATL, nous avons évalué leur implication dans la réplication rétrovirale. Similairement à HBZ et APH-2, APH-3 et APH-4 ont la capacité d'inhiber l'expression des gènes sens à partir du LTR 5' médié par Tax, mais ce par un mécanisme alternatif à celui de HBZ. Nous avons aussi mis en évidence que la famille de facteurs de transcription Jun peut former des interactions *in vivo* avec APH-3 et APH-4 comme tel est le cas pour HBZ et APH-2 (excluant JunD), mais *via* un motif bZIP atypique. De plus, la régulation qu'entraînent ces interactions est différente de ce qui est observé avec HBZ, et s'apparente à APH-2. L'activation de la transcription fait aussi appel à un nouveau mécanisme ne faisant pas usage d'un domaine d'activation autonome. D'autre part, nous avons découvert de nouvelles interactions entre B23, C23 et sHBZ ainsi qu'une possible nouvelle fonction unique à sHBZ dans le nucléole, domaine nucléaire important pour le bon fonctionnement de la cellule. Enfin, les différences au niveau de la régulation transcriptionnelle engendrées par ces protéines nous permettent de mieux cibler les mécanismes moléculaires impliqués dans la dérégulation de l'environnement cellulaire engendrée par sHBZ, sachant que HTLV-2 est non leucémogénique et que ce potentiel chez HTLV-3 et HTLV-4 est inconnu jusqu'à présent. Ces protéines virales pourraient nous servir d'outil à titre comparatif afin d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes associés à HBZ menant à la survie et à la prolifération des cellules leucémiques. Finalement, de nouvelles stratégies thérapeutiques sont désespérément attendues et un traitement ciblant HBZ nous donnerait beaucoup d'espoir.

Bibliographie

- Adachi, Y., T. D. Copeland, M. Hatanaka, and S. Oroszlan. 1993. Nucleolar targeting signal of Rex protein of human T-cell leukemia virus type I specifically binds to nucleolar shuttle protein B-23. *J Biol Chem* 268 (19):13930-13934.
- Adya, N., L. J. Zhao, W. Huang, I. Boros, and C. Z. Giam. 1994. Expansion of CREB's DNA recognition specificity by Tax results from interaction with Ala-Ala-Arg at positions 282-284 near the conserved DNA-binding domain of CREB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (12):5642-5646.
- Ahmad, Y., F. M. Boisvert, P. Gregor, A. Cogley, and A. I. Lamond. 2009. NOPdb: Nucleolar Proteome Database--2008 update. *Nucleic Acids Res* 37 (Database issue):D181-184.
- Ahmed, Y. F., S. M. Hanly, M. H. Malim, B. R. Cullen, and W. C. Greene. 1990. Structure-function analyses of the HTLV-I Rex and HIV-1 Rev RNA response elements: insights into the mechanism of Rex and Rev action. *Genes Dev* 4 (6):1014-1022.
- Alber, T. 1992. Structure of the leucine zipper. *Curr Opin Genet Dev* 2 (2):205-210.
- Allain, F. H., D. E. Gilbert, P. Bouvet, and J. Feigon. 2000. Solution structure of the two N-terminal RNA-binding domains of nucleolin and NMR study of the interaction with its RNA target. *J Mol Biol* 303 (2):227-241.
- Andersen, J. S., Y. W. Lam, A. K. Leung, S. E. Ong, C. E. Lyon, A. I. Lamond, and M. Mann. 2005. Nucleolar proteome dynamics. *Nature* 433 (7021):77-83.
- Andonov, A., M. B. Coulthart, M. Perez-Losada, K. A. Crandall, D. Posada, R. Padmore, A. Giulivi, J. J. Oger, A. A. Peters, and G. A. Dekaban. 2012. Insights into origins of Human T-cell Lymphotropic Virus Type 1 based on new strains from aboriginal people of Canada. *Infect Genet Evol* 12 (8):1822-1830.
- Angel, P., M. Imagawa, R. Chiu, B. Stein, R. J. Imbra, H. J. Rahmsdorf, C. Jonat, P. Herrlich, and M. Karin. 1987. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell* 49 (6):729-739.
- Aoyagi, T., M. Takahashi, M. Higuchi, M. Oie, Y. Tanaka, T. Kiyono, Y. Aoyagi, and M. Fujii. 2010. The PDZ domain binding motif (PBM) of human T-cell leukemia virus type 1 Tax can be substituted by heterologous PBMs from viral oncoproteins during T-cell transformation. *Virus Genes* 40 (2):193-199.
- Araujo, A., and W. W. Hall. 2004. Human T-lymphotropic virus type II and neurological disease. *Ann Neurol* 56 (1):10-19.
- Armstrong, B. C., and G. W. Krystal. 1992. Isolation and characterization of complementary DNA for N-cym, a gene encoded by the DNA strand opposite to N-myc. *Cell Growth Differ* 3 (6):385-390.
- Arnold, J., B. Yamamoto, M. Li, A. J. Phipps, I. Younis, M. D. Lairmore, and P. L. Green. 2006. Enhancement of infectivity and persistence in vivo by HBZ, a natural antisense coded protein of HTLV-1. *Blood* 107 (10):3976-3982.
- Arnold, J., B. Zimmerman, M. Li, M. D. Lairmore, and P. L. Green. 2008. Human T-cell leukemia virus type-1 antisense-encoded gene, Hbz, promotes T-lymphocyte proliferation. *Blood* 112 (9):3788-3797.

- Auwerx, J., and P. Sassone-Corsi. 1991. IP-1: a dominant inhibitor of Fos/Jun whose activity is modulated by phosphorylation. *Cell* 64 (5):983-993.
- Azran, I., Y. Schavinsky-Khrapunsky, and M. Aboud. 2004. Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. *Retrovirology* 1:20.
- Baichwal, V. R., and R. Tjian. 1990. Control of c-Jun activity by interaction of a cell-specific inhibitor with regulatory domain delta: differences between v- and c-Jun. *Cell* 63 (4):815-825.
- Ballaun, C., G. K. Farrington, M. Dobrovnik, J. Rusche, J. Hauber, and E. Bohnlein. 1991. Functional analysis of human T-cell leukemia virus type I rex-response element: direct RNA binding of Rex protein correlates with in vivo activity. *J Virol* 65 (8):4408-4413.
- Banerjee, P., G. Feuer, and E. Barker. 2007. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) p12I down-modulates ICAM-1 and -2 and reduces adherence of natural killer cells, thereby protecting HTLV-1-infected primary CD4+ T cells from autologous natural killer cell-mediated cytotoxicity despite the reduction of major histocompatibility complex class I molecules on infected cells. *J Virol* 81 (18):9707-9717.
- Bangham, C. R. 2000. The immune response to HTLV-I. *Curr Opin Immunol* 12 (4):397-402.
- Bangham, C. R. 2003. The immune control and cell-to-cell spread of human T-lymphotropic virus type 1. *J Gen Virol* 84 (Pt 12):3177-3189.
- Bangham, C. R. 2009. CTL quality and the control of human retroviral infections. *Eur J Immunol* 39 (7):1700-1712.
- Bar-Shira, A., A. Panet, and A. Honigman. 1991. An RNA secondary structure juxtaposes two remote genetic signals for human T-cell leukemia virus type I RNA 3'-end processing. *J Virol* 65 (10):5165-5173.
- Barat, C., and M. J. Tremblay. 2003. Treatment of human T cells with bisperoxovanadium phosphotyrosyl phosphatase inhibitors leads to activation of cyclooxygenase-2 gene. *J Biol Chem* 278 (9):6992-7000.
- Barbeau, B., J. Hiscott, A. Bazarbachi, E. Carvalho, K. Jones, F. Martin, M. Matsuoka, E. L. Murphy, L. Ratner, W. M. Switzer, and T. Watanabe. 2014. Conference highlights of the 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and related retroviruses, 26-30 June 2013, Montreal, Canada. *Retrovirology* 11:19.
- Barbeau, B., and J. M. Mesnard. 2007. Does the HBZ gene represent a new potential target for the treatment of adult T-cell leukemia? *Int Rev Immunol* 26 (5-6):283-304.
- Barbeau, B., and J. M. Mesnard. 2011. Making sense out of antisense transcription in human T-cell lymphotropic viruses (HTLVs). *Viruses* 3 (5):456-468.
- Barbeau, B., J. M. Peloponese, and J. M. Mesnard. 2013. Functional comparison of antisense proteins of HTLV-1 and HTLV-2 in viral pathogenesis. *Front Microbiol* 4:226.
- Barbeau, B., G. A. Robichaud, J.-F. Fortin, and M. J. Tremblay. 2001. Negative regulation of the NFAT1 factor by CD45: implication in HIV-1 LTR activation. *J. Immunol.* 167:2700-2713.
- Barnard, A. L., T. Igakura, Y. Tanaka, G. P. Taylor, and C. R. Bangham. 2005. Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes. *Blood* 106 (3):988-995.
- Barnhart, M. K., L. M. Connor, and S. J. Marriott. 1997. Function of the Human T-cell Leukemia Virus type 1 21-base-pair repeats in basal transcription. *J. Virol.* 71:337-344.

- Bartman, M. T., Z. Kaidarova, D. Hirschhorn, R. A. Sacher, J. Frider, G. Garratty, J. Gible, J. W. Smith, B. Newman, A. E. Yeo, and E. L. Murphy. 2008. Long-term increases in lymphocytes and platelets in human T-lymphotropic virus type II infection. *Blood* 112 (10):3995-4002.
- Basbous, J., C. Arpin, G. Gaudray, M. Piechaczyk, C. Devaux, and J. M. Mesnard. 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 (44):43620-43627.
- Bastian, I., J. Gardner, D. Webb, and I. Gardner. 1993. Isolation of a human T-lymphotropic virus type I strain from Australian aborigines. *J Virol* 67 (2):843-851.
- Baydoun, H., M. Duc-Dodon, S. Lebrun, L. Gazzolo, and F. Bex. 2007. Regulation of the human T-cell leukemia virus gene expression depends on the localization of regulatory proteins Tax, Rex and p30II in specific nuclear subdomains. *Gene* 386 (1-2):191-201.
- Beck, C. F., and R. A. Warren. 1988. Divergent promoters, a common form of gene organization. *Microbiol Rev* 52 (3):318-326.
- Beck, Z., A. Bacsi, X. Liu, P. Ebbesen, I. Andirko, E. Csoma, J. Konya, E. Nagy, and F. D. Toth. 2003. Differential patterns of human cytomegalovirus gene expression in various T-cell lines carrying human T-cell leukemia-lymphoma virus type I: role of Tax-activated cellular transcription factors. *J Med Virol* 71 (1):94-104.
- Bedford, M., E. Arman, A. Orr-Urtreger, and P. Lonai. 1995. Analysis of the Hoxd-3 gene: structure and localization of its sense and natural antisense transcripts. *DNA Cell Biol* 14 (4):295-304.
- Beilhartz, G. L., and M. Gotte. 2010. HIV-1 Ribonuclease H: Structure, Catalytic Mechanism and Inhibitors. *Viruses* 2 (4):900-926.
- Beilke, M. A., S. Japa, C. Moeller-Hadi, and S. Martin-Schild. 2005. Tropical spastic paraparesis/human T leukemia virus type 1-associated myelopathy in HIV type 1-coinfected patients. *Clin Infect Dis* 41 (6):e57-63.
- Bellon, M., and C. Nicot. 2008. Regulation of telomerase and telomeres: human tumor viruses take control. *J Natl Cancer Inst* 100 (2):98-108.
- Benbrook, D. M., and N. C. Jones. 1990. Heterodimer formation between CREB and JUN proteins. *Oncogene* 5 (3):295-302.
- Bender, C., F. Rende, A. Cotena, P. Righi, P. Ronzi, I. Cavallari, C. Casoli, V. Ciminale, and U. Bertazzoni. 2012. Temporal regulation of HTLV-2 expression in infected cell lines and patients: evidence for distinct expression kinetics with nuclear accumulation of APH-2 mRNA. *Retrovirology* 9:74.
- Bengal, E., L. Ransone, R. Scharfmann, V. J. Dwarki, S. J. Tapscott, H. Weintraub, and I. M. Verma. 1992. Functional antagonism between c-Jun and MyoD proteins: a direct physical association. *Cell* 68 (3):507-519.
- Benvenisty, N., D. M. Ornitz, G. L. Bennett, B. G. Sahagan, A. Kuo, R. D. Cardiff, and P. Leder. 1992. Brain tumors and lymphomas in transgenic mice that carry HTLV-I LTR/c-myc and Ig/tax genes. *Oncogene* 8:2399-2405.
- Berger, J. R., C. Tornatore, E. O. Major, J. Bruce, P. Shapshak, M. Yoshioka, S. Houff, W. Sheremata, G. F. Horton, and H. Landy. 1992. Relapsing and remitting human immunodeficiency virus-associated leukoencephalomyelopathy. *Ann Neurol* 31 (1):34-38.

- Bertwistle, D., M. Sugimoto, and C. J. Sherr. 2004. Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Mol Cell Biol* 24 (3):985-996.
- Bevington, J. M., P. G. Needham, K. C. Verrill, R. F. Collaco, V. Basrur, and J. P. Trempe. 2007. Adeno-associated virus interactions with B23/Nucleophosmin: identification of sub-nucleolar virion regions. *Virology* 357 (1):102-113.
- Biggiogera, M., S. Fakan, S. H. Kaufmann, A. Black, J. H. Shaper, and H. Busch. 1989. Simultaneous immunoelectron microscopic visualization of protein B23 and C23 distribution in the HeLa cell nucleolus. *J Histochem Cytochem* 37 (9):1371-1374.
- Bindhu, M., A. Nair, and M. D. Lairmore. 2004. Role of accessory proteins of HTLV-1 in viral replication, T cell activation, and cellular gene expression. *Front Biosci* 9:2556-2576.
- Black, A. C., I. S. Chen, S. Arrigo, C. T. Ruland, T. Allogiamento, E. Chin, and J. D. Rosenblatt. 1991a. Regulation of HTLV-II gene expression by Rex involves positive and negative cis-acting elements in the 5' long terminal repeat. *Virology* 181 (2):433-444.
- Black, A. C., C. T. Ruland, M. T. Yip, J. Luo, B. Tran, A. Kalsi, E. Quan, M. Aboud, I. S. Chen, and J. D. Rosenblatt. 1991b. Human T-cell leukemia virus type II Rex binding and activity require an intact splice donor site and a specific RNA secondary structure. *J Virol* 65 (12):6645-6653.
- Blanchette, J., P. Pouliot, and M. Olivier. 2007. Role of protein tyrosine phosphatases in the regulation of interferon- γ -induced macrophage nitric oxide generation: implication of ERK pathway and AP-1 activation. *J Leukoc Biol* 81 (3):835-844.
- Boisvert, F. M., Y. W. Lam, D. Lamont, and A. I. Lamond. 2010. A quantitative proteomics analysis of subcellular proteome localization and changes induced by DNA damage. *Mol Cell Proteomics* 9 (3):457-470.
- Boisvert, F. M., S. van Koningsbruggen, J. Navascues, and A. I. Lamond. 2007. The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (7):574-585.
- Borer, R. A., C. F. Lehner, H. M. Eppenberger, and E. A. Nigg. 1989. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell* 56 (3):379-390.
- Borowiak, M., A. S. Kuhlmann, S. Girard, L. Gazzolo, J. M. Mesnard, P. Jalinet, and M. D. Dodon. 2013. HTLV-1 bZIP factor impedes the menin tumor suppressor and upregulates JunD-mediated transcription of the hTERT gene. *Carcinogenesis* 34 (11):2664-2672.
- Bose, S., M. Basu, and A. K. Banerjee. 2004. Role of nucleolin in human parainfluenza virus type 3 infection of human lung epithelial cells. *J Virol* 78 (15):8146-8158.
- Bosselut, R., J. F. Duvall, A. Gégonne, M. Bailly, A. Hemar, J. Brady, and J. Ghysdael. 1990. The product of c-Ets-1 proto-oncogene and the related Ets2 protein act as transcriptional activators of the long terminal repeat of Human T cell Leukemia Virus HTLV-1. *EMBO J.* 9:3137-3144.
- Bosselut, R., F. Lim, P. C. Romond, J. Frampton, J. Brady, and J. Ghysdael. 1992. Myb protein binds to multiple sites in the human T cell lymphotropic virus type 1 long terminal repeat and transactivates LTR-mediated expression. *Virology* 186 (2):764-769.
- Bovre, K. a. S., W. 1969. Patterns of convergent and overlapping transcription within the b2 region of coliphage lambda. *Virology* 38:614-626.

- Boxus, M., J. C. Twizere, S. Legros, J. F. Dewulf, R. Kettmann, and L. Willems. 2008. The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology* 5:76.
- Briggs, N. C., R. J. Battjes, K. P. Cantor, W. A. Blattner, F. M. Yellin, S. Wilson, A. L. Ritz, S. H. Weiss, and J. J. Goedert. 1995. Seroprevalence of human T cell lymphotropic virus type II infection, with or without human immunodeficiency virus type 1 coinfection, among US intravenous drug users. *J Infect Dis* 172 (1):51-58.
- Briquet, S., J. Richardson, C. Vanhee-Brossollet, and C. Vaquero. 2001. Natural antisense transcripts are detected in different cell lines and tissues of cats infected with feline immunodeficiency virus. *Gene* 267 (2):157-164.
- Briquet, S., and C. Vaquero. 2002. Immunolocalization studies of an antisense protein in HIV-1-infected cells and viral particles. *Virology* 292 (2):177-184.
- Burmeister, T. 2001. Oncogenic retroviruses in animals and humans. *Rev Med Virol* 11 (6):369-380.
- Busch, S. J., and P. Sassone-Corsi. 1990. Dimers, leucine zippers and DNA-binding domains. *Trends Genet* 6 (2):36-40.
- Calattini, S., E. Betssem, S. Bassot, S. A. Chevalier, R. Mahieux, A. Froment, and A. Gessain. 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 (4):561-564.
- Calattini, S., S. A. Chevalier, R. Duprez, P. Afonso, A. Froment, A. Gessain, and R. Mahieux. 2006. Human T-cell lymphotropic virus type 3: complete nucleotide sequence and characterization of the human tax3 protein. *J Virol* 80 (19):9876-9888.
- Calattini, S., S. A. Chevalier, R. Duprez, S. Bassot, A. Froment, R. Mahieux, and A. Gessain. 2005. Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology* 2:30.
- Calle, A., I. Ugrinova, A. L. Epstein, P. Bouvet, J. J. Diaz, and A. Greco. 2008. Nucleolin is required for an efficient herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* 82 (10):4762-4773.
- Campbell, G. R., and S. A. Spector. 2013. Inhibition of human immunodeficiency virus type-1 through autophagy. *Curr Opin Microbiol* 16 (3):349-354.
- Cann, A. J. 2012. *Principles of Molecular Virology*. Fifth edition ed: Academic Press.
- Canto-Nogues, C., D. Hockley, C. Grief, S. Ranjbar, J. Bootman, N. Almond, and I. Herrera. 2001. Ultrastructural localization of the RNA of immunodeficiency viruses using electron microscopy in situ hybridization and in vitroinfected lymphocytes. *Micron* 32 (6):579-589.
- Carmo-Fonseca, M., L. Mendes-Soares, and I. Campos. 2000. To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol* 2 (6):E107-112.
- Carneiro-Proietti, A. B., M. S. Amaranto-Damasio, C. F. Leal-Horiguchi, R. H. Bastos, G. Seabra-Freitas, D. R. Borowiak, M. A. Ribeiro, F. A. Proietti, A. S. Ferreira, and M. L. Martins. 2014. Mother-to-Child Transmission of Human T-Cell Lymphotropic Viruses-1/2: What We Know, and What Are the Gaps in Understanding and Preventing This Route of Infection. *J Pediatric Infect Dis Soc* 3 (Suppl 1):S24-S29.
- Carninci, P., T. Kasukawa, S. Katayama, J. Gough, M. C. Frith, N. Maeda, R. Oyama, T. Ravasi, B. Lenhard, C. Wells, R. Kodzius, K. Shimokawa, V. B. Bajic, S. E. Brenner, S. Batalov, A. R. Forrest, M. Zavolan, M. J. Davis, L. G. Wilming, V. Aidinis, J. E. Allen, A. Ambesi-Impiombato, R. Apweiler, R. N. Aturaliya, T. L. Bailey, M. Bansal, L. Baxter, K. W. Beisel, T. Bersano, H. Bono, A. M. Chalk, K. P. Chiu, V. Choudhary,

- A. Christoffels, D. R. Clutterbuck, M. L. Crowe, E. Dalla, B. P. Dalrymple, B. de Bono, G. Della Gatta, D. di Bernardo, T. Down, P. Engstrom, M. Fagiolini, G. Faulkner, C. F. Fletcher, T. Fukushima, M. Furuno, S. Futaki, M. Gariboldi, P. Georgii-Hemming, T. R. Gingeras, T. Gojobori, R. E. Green, S. Gustincich, M. Harbers, Y. Hayashi, T. K. Hensch, N. Hirokawa, D. Hill, L. Huminiecki, M. Iacono, K. Ikeo, A. Iwama, T. Ishikawa, M. Jakt, A. Kanapin, M. Katoh, Y. Kawasaki, J. Kelso, H. Kitamura, H. Kitano, G. Kollias, S. P. Krishnan, A. Kruger, S. K. Kummerfeld, I. V. Kurochkin, L. F. Lareau, D. Lazarevic, L. Lipovich, J. Liu, S. Liuni, S. McWilliam, M. Madan Babu, M. Madera, L. Marchionni, H. Matsuda, S. Matsuzawa, H. Miki, F. Mignone, S. Miyake, K. Morris, S. Mottagui-Tabar, N. Mulder, N. Nakano, H. Nakauchi, P. Ng, R. Nilsson, S. Nishiguchi, S. Nishikawa, F. Nori, O. Ohara, Y. Okazaki, V. Orlando, K. C. Pang, W. J. Pavan, G. Pavesi, G. Pesole, N. Petrovsky, S. Piazza, J. Reed, J. F. Reid, B. Z. Ring, M. Ringwald, B. Rost, Y. Ruan, S. L. Salzberg, A. Sandelin, C. Schneider, C. Schonbach, K. Sekiguchi, C. A. Semple, S. Seno, L. Sessa, Y. Sheng, Y. Shibata, H. Shimada, K. Shimada, D. Silva, B. Sinclair, S. Sperling, E. Stupka, K. Sugiura, R. Sultana, Y. Takenaka, K. Taki, K. Tammoja, S. L. Tan, S. Tang, M. S. Taylor, J. Tegner, S. A. Teichmann, H. R. Ueda, E. van Nimwegen, R. Verardo, C. L. Wei, K. Yagi, H. Yamanishi, E. Zabarovsky, S. Zhu, A. Zimmer, W. Hide, C. Bult, S. M. Grimmond, R. D. Teasdale, E. T. Liu, V. Brusic, J. Quackenbush, C. Wahlestedt, J. S. Mattick, D. A. Hume, C. Kai, D. Sasaki, Y. Tomaru, S. Fukuda, M. Kanamori-Katayama, M. Suzuki, J. Aoki, T. Arakawa, J. Iida, K. Imamura, M. Itoh, T. Kato, H. Kawaji, N. Kawagashira, T. Kawashima, M. Kojima, S. Kondo, H. Konno, K. Nakano, N. Ninomiya, T. Nishio, M. Okada, C. Plessy, K. Shibata, T. Shiraki, S. Suzuki, M. Tagami, K. Waki, A. Watahiki, Y. Okamura-Oho, H. Suzuki, J. Kawai, Y. Hayashizaki, F. Consortium, R. G. E. R. Group, and G. Genome Science. 2005. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309 (5740):1559-1563.
- Cassar, O., L. Einsiedel, P. V. Afonso, and A. Gessain. 2013. Human T-cell lymphotropic virus type 1 subtype C molecular variants among indigenous australians: new insights into the molecular epidemiology of HTLV-1 in Australo-Melanesia. *PLoS Negl Trop Dis* 7 (9):e2418.
- Cavanagh, M. H., S. Landry, B. Audet, C. Arpin-Andre, P. Hivin, M. E. Pare, J. Thete, E. Wattel, S. J. Marriott, J. M. Mesnard, and B. Barbeau. 2006. HTLV-I antisense transcripts initiating in the 3'LTR are alternatively spliced and polyadenylated. *Retrovirology* 3:15.
- Cavrois, M., S. Wain-Hobson, A. Gessain, Y. Plumelle, and E. Wattel. 1996. Adult T-cell leukemia/lymphoma on a background of clonally expanding human T-cell leukemia virus type-1-positive cells. *Blood* 88 (12):4646-4650.
- Cawood, R., S. M. Harrison, B. K. Dove, M. L. Reed, and J. A. Hiscox. 2007. Cell cycle dependent nucleolar localization of the coronavirus nucleocapsid protein. *Cell Cycle* 6 (7):863-867.
- Chang, Y. B., Z. Kaidarova, D. Hindes, M. Bravo, N. Kiely, H. Kamel, D. Dubay, B. Hoose, and E. L. Murphy. 2014. Seroprevalence and demographic determinants of human T-lymphotropic virus type 1 and 2 infections among first-time blood donors--United States, 2000-2009. *J Infect Dis* 209 (4):523-531.

- Chang, Y. N., D. L. Dong, G. S. Hayward, and S. D. Hayward. 1990. The Epstein-Barr virus Zta transactivator: a member of the bZIP family with unique DNA-binding specificity and a dimerization domain that lacks the characteristic heptad leucine zipper motif. *J Virol* 64 (7):3358-3369.
- Chao, S. H., J. R. Walker, S. K. Chanda, N. S. Gray, and J. S. Caldwell. 2003. Identification of homeodomain proteins, PBX1 and PREP1, involved in the transcription of murine leukemia virus. *Mol Cell Biol* 23 (3):831-841.
- Chen, D., and S. Huang. 2001. Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells. *J Cell Biol* 153 (1):169-176.
- Chen, T. S., A. W. Reinke, and A. E. Keating. 2011. Design of peptide inhibitors that bind the bZIP domain of Epstein-Barr virus protein BZLF1. *J Mol Biol* 408 (2):304-320.
- Chen, Y. M., S. H. Chen, C. Y. Fu, J. Y. Chen, and M. Osame. 1997. Antibody reactivities to tumor-suppressor protein p53 and HTLV-I Tof, Rex and Tax in HTLV-I-infected people with differing clinical status. *Int J Cancer* 71 (2):196-202.
- Cheng, H., T. Ren, and S. C. Sun. 2012. New insight into the oncogenic mechanism of the retroviral oncoprotein Tax. *Protein Cell* 3 (8):581-589.
- Chevalier, S. A., S. Durand, A. Dasgupta, M. Radonovich, A. Cimarelli, J. N. Brady, R. Mahieux, and C. A. Pise-Masison. 2012. The transcription profile of Tax-3 is more similar to Tax-1 than Tax-2: insights into HTLV-3 potential leukemogenic properties. *PLoS One* 7 (7):e41003.
- Chevalier, S. A., N. L. Ko, S. Calattini, A. Mallet, M. C. Prevost, K. Kehn, J. N. Brady, F. Kashanchi, A. Gessain, and R. Mahieux. 2008. Construction and characterization of a human T-cell lymphotropic virus type 3 infectious molecular clone. *J Virol* 82 (13):6747-6752.
- Chevalier, S. A., L. Meertens, C. Pise-Masison, S. Calattini, H. Park, A. A. Alhaj, M. Zhou, A. Gessain, F. Kashanchi, J. N. Brady, and R. Mahieux. 2006. The tax protein from the primate T-cell lymphotropic virus type 3 is expressed in vivo and is functionally related to HTLV-1 Tax rather than HTLV-2 Tax. *Oncogene* 25 (32):4470-4482.
- Chin, K. T., A. C. Chun, Y. P. Ching, K. T. Jeang, and D. Y. Jin. 2007. Human T-cell leukemia virus oncoprotein tax represses nuclear receptor-dependent transcription by targeting coactivator TAX1BP1. *Cancer Res* 67 (3):1072-1081.
- Chinenov, Y., and T. K. Kerppola. 2001. Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene* 20 (19):2438-2452.
- Chu, Z. L., Y. A. Shin, J. M. Yang, J. A. DiDonato, and D. W. Ballard. 1999. IKKgamma mediates the interaction of cellular IkappaB kinases with the tax transforming protein of human T cell leukemia virus type 1. *J Biol Chem* 274 (22):15297-15300.
- Cimarelli, A., C. A. Duclos, A. Gessain, E. Cattaneo, C. Casoli, M. Biglione, P. Mauclore, and U. Bertazzoni. 1995. Quantification of HTLV-II proviral copies by competitive polymerase chain reaction in peripheral blood mononuclear cells of Italian injecting drug users, central Africans, and Amerindians. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 10 (2):198-204.
- Ciminale, V., G. N. Pavlakis, D. Derse, C. P. Cunningham, and B. K. Felber. 1992. Complex splicing in the human T-cell leukemia virus (HTLV) family of retroviruses: novel mRNAs and proteins produced by HTLV type I. *J Virol* 66 (3):1737-1745.

- Ciminale, V., L. Zotti, D. M. D'Agostino, and L. Chieco-Bianchi. 1997. Inhibition of human T-cell leukemia virus type 2 Rex function by truncated forms of Rex encoded in alternatively spliced mRNAs. *J Virol* 71 (4):2810-2818.
- Clerc, I., P. Hivin, P. A. Rubbo, I. Lemasson, B. Barbeau, and J. M. Mesnard. 2009. Propensity for HBZ-SP1 isoform of HTLV-I to inhibit c-Jun activity correlates with sequestration of c-Jun into nuclear bodies rather than inhibition of its DNA-binding activity. *Virology* 391 (2):195-202.
- Clerc, I., S. Laverdure, C. Torresilla, S. Landry, S. Borel, A. Vargas, C. Arpin-Andre, B. Gay, L. Briant, A. Gross, B. Barbeau, and J. M. Mesnard. 2011. Polarized expression of the membrane ASP protein derived from HIV-1 antisense transcription in T cells. *Retrovirology* 8:74.
- Clerc, I., N. Polakowski, C. Andre-Arpin, P. Cook, B. Barbeau, J. M. Mesnard, and I. Lemasson. 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 (35):23903-23913.
- Cochrane, A. W., A. Perkins, and C. A. Rosen. 1990. Identification of sequences important in the nucleolar localization of human immunodeficiency virus Rev: relevance of nucleolar localization to function. *J Virol* 64 (2):881-885.
- Coffin, J., Hughes, SH. and Varmus, HE. 1997. *Retroviruses*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Colombo, E., J. C. Marine, D. Danovi, B. Falini, and P. G. Pelicci. 2002. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol* 4 (7):529-533.
- Cook, A., F. Bono, M. Jinek, and E. Conti. 2007. Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Annu Rev Biochem* 76:647-671.
- Cook, L. B., A. Melamed, H. Niederer, M. Valganon, D. Laydon, L. Foroni, G. P. Taylor, M. Matsuoka, and C. R. Bangham. 2014. The role of HTLV-1 clonality, proviral structure, and genomic integration site in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 123 (25):3925-3931.
- Cook, L. B., A. G. Rowan, A. Melamed, G. P. Taylor, and C. R. Bangham. 2012. HTLV-1-infected T cells contain a single integrated provirus in natural infection. *Blood* 120 (17):3488-3490.
- Cook, P. R., N. Polakowski, and I. Lemasson. 2011. HTLV-1 HBZ protein deregulates interactions between cellular factors and the KIX domain of p300/CBP. *J Mol Biol* 409 (3):384-398.
- Core, L. J., J. J. Waterfall, and J. T. Lis. 2008. Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science* 322 (5909):1845-1848.
- Coscoy, L., D. Gonzalez-Dunia, F. Tangy, S. Syan, M. Brahic, and S. Ozden. 1998. Molecular mechanism of tumorigenesis in mice transgenic for the Human T Cell Leukemia Virus tax gene. *Virology* 248:332-341.
- Coskun, A. K., and R. E. Sutton. 2005. Expression of glucose transporter 1 confers susceptibility to human T-cell leukemia virus envelope-mediated fusion. *J Virol* 79 (7):4150-4158.
- Courgnaud, V., S. Van Dooren, F. Liegeois, X. Pourrut, B. Abela, S. Loul, E. Mpoudi-Ngole, A. Vandamme, E. Delaporte, and M. Peeters. 2004. Simian T-cell leukemia virus (STLV) infection in wild primate populations in Cameroon: evidence for dual STLV

- type 1 and type 3 infection in agile mangabeys (*Cercocebus agilis*). *J Virol* 78 (9):4700-4709.
- Croen, K. D., J. M. Ostrove, L. J. Dragovic, J. E. Smialek, and S. E. Straus. 1987. Latent Herpes Simplex virus in human trigeminal ganglia. *New Engl J Med* 317 (23):1427-1432.
- Daelemans, D., S. V. Costes, S. Lockett, and G. N. Pavlakis. 2005. Kinetic and molecular analysis of nuclear export factor CRM1 association with its cargo in vivo. *Mol Cell Biol* 25 (2):728-739.
- Datta, A., L. Silverman, A. J. Phipps, H. Hiraragi, L. Ratner, and M. D. Lairmore. 2007. Human T-lymphotropic virus type-1 p30 alters cell cycle G2 regulation of T lymphocytes to enhance cell survival. *Retrovirology* 4:49.
- Datta, S., N. H. Kothari, and H. Fan. 2000. In vivo genomic footprinting of the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) long terminal repeat enhancer sequences in HTLV-1-infected human T-cell lines with different levels of Tax I activity. *J Virol* 74 (18):8277-8285.
- de Carcer, G., and F. J. Medina. 1999. Simultaneous localization of transcription and early processing markers allows dissection of functional domains in the plant cell nucleolus. *J Struct Biol* 128 (2):139-151.
- Dekaban, G. A., J. J. Oger, D. Foti, E. E. King, D. J. Waters, F. J. Picard, J. Arp, D. Werker, and G. P. Rice. 1994. HTLV-I infection associated with disease in aboriginal Indians from British Columbia: a serological and PCR analysis. *Clin Diagn Virol* 2 (2):67-78.
- Dekaban, G. A., A. A. Peters, J. C. Mulloy, J. M. Johnson, R. Trovato, E. Rivadeneira, and G. Franchini. 2000. The HTLV-I orfl protein is recognized by serum antibodies from naturally infected humans and experimentally infected rabbits. *Virology* 274 (1):86-93.
- Delamarre, L., A. R. Rosenberg, C. Pique, D. Pham, and M. C. Dokhelar. 1997. A novel human T-leukemia virus type 1 cell-to-cell transmission assay permits definition of SU glycoprotein amino acids important for infectivity. *J Virol* 71 (1):259-266.
- Delaporte, E., M. Peeters, J. P. Durand, A. Dupont, D. Schrijvers, L. Bedjabaga, C. Honore, S. Ossari, A. Trebucq, R. Josse, and et al. 1989a. Seroepidemiological survey of HTLV-I infection among randomized populations of western central African countries. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2 (4):410-413.
- Delaporte, E., M. Peeters, M. Simoni, and P. Piot. 1989b. HTLV-I infection in western equatorial Africa. *Lancet* 2 (8673):1226.
- Delorenzi, M., and T. Speed. 2002. An HMM model for coiled-coil domains and a comparison with PSSM-based predictions. *Bioinformatics* 18 (4):617-625.
- Delwart, E. L., G. Mosialos, and T. Gilmore. 1990. Retroviral envelope glycoproteins contain a "leucine zipper"-like repeat. *AIDS Res Hum Retroviruses* 6 (6):703-706.
- Demontis, M. A., S. Hilburn, and G. P. Taylor. 2013. Human T cell lymphotropic virus type 1 viral load variability and long-term trends in asymptomatic carriers and in patients with human T cell lymphotropic virus type 1-related diseases. *AIDS Res Hum Retroviruses* 29 (2):359-364.
- Derse, D., B. Crise, Y. Li, G. Princler, N. Lum, C. Stewart, C. F. McGrath, S. H. Hughes, D. J. Munroe, and X. Wu. 2007. Human T-cell leukemia virus type 1 integration target sites in the human genome: comparison with those of other retroviruses. *J Virol* 81 (12):6731-6741.

- Derse, D., S. A. Hill, P. A. Lloyd, H. Chung, and B. A. Morse. 2001. Examining human T-lymphotropic virus type 1 infection and replication by cell-free infection with recombinant virus vectors. *J Virol* 75 (18):8461-8468.
- Dingwall, C., S. M. Dilworth, S. J. Black, S. E. Kearsley, L. S. Cox, and R. A. Laskey. 1987. Nucleoplasmin cDNA sequence reveals polyglutamic acid tracts and a cluster of sequences homologous to putative nuclear localization signals. *EMBO J* 6 (1):69-74.
- Dissinger, N., N. Shkriabai, S. Hess, J. Al-Saleem, M. Kvaratskhelia, and P. L. Green. 2014. Identification and Characterization of HTLV-1 HBZ Post-Translational Modifications. *PLoS One* 9 (11):e112762.
- Doerig, C., L. I. Pizer, and C. L. Wilcox. 1991. An antigen encoded by the latency-associated transcript in neuronal cell cultures latently infected with herpes simplex virus type 1. *J Virol* 65 (5):2724-2727.
- Doi, K., X. Wu, Y. Taniguchi, J. Yasunaga, Y. Satou, A. Okayama, K. Nosaka, and M. Matsuoka. 2005. Preferential selection of human T-cell leukemia virus type I provirus integration sites in leukemic versus carrier states. *Blood* 106 (3):1048-1053.
- Dolnick, B. J. 1993. Cloning and characterization of a naturally occurring antisense RNA to human thymidylate synthase mRNA. *Nucleic Acids Res* 21 (8):1747-1752.
- Douceron, E., Z. Kaidarova, P. Miyazato, M. Matsuoka, E. L. Murphy, and R. Mahieux. 2012. HTLV-2 APH-2 expression is correlated with proviral load but APH-2 does not promote lymphocytosis. *J Infect Dis* 205 (1):82-86.
- Drygin, D., W. G. Rice, and I. Grummt. 2010. The RNA polymerase I transcription machinery: an emerging target for the treatment of cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:131-156.
- Dumbar, T. S., G. A. Gentry, and M. O. Olson. 1989. Interaction of nucleolar phosphoprotein B23 with nucleic acids. *Biochemistry* 28 (24):9495-9501.
- Duong, Y. T., H. Jia, J. A. Lust, A. D. Garcia, A. J. Tiffany, W. Heneine, and W. M. Switzer. 2008. Short communication: Absence of evidence of HTLV-3 and HTLV-4 in patients with large granular lymphocyte (LGL) leukemia. *AIDS Res Hum Retroviruses* 24 (12):1503-1505.
- Edwards, D., C. Fenizia, H. Gold, M. F. de Castro-Amarante, C. Buchmann, C. A. Pise-Masison, and G. Franchini. 2011. Orf-I and orf-II-encoded proteins in HTLV-1 infection and persistence. *Viruses* 3 (6):861-885.
- Eferl, R., and E. F. Wagner. 2003. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 3 (11):859-868.
- Egan, J. F., B. O'Leary, M. J. Lewis, F. Mulcahy, N. Sheehy, H. Hasegawa, F. Fitzpatrick, J. J. O'Connor, J. O'Riordan, and W. W. Hall. 1999. High rate of human T lymphotropic virus type IIa infection in HIV type 1-infected intravenous drug abusers in Ireland. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15 (8):699-705.
- Eguchi, K., H. Fujii, K. Oshima, M. Otani, T. Matsuo, and T. Yamamoto. 2009. Human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) genetic typing in Kakeroma Island, an island at the crossroads of the ryukyans and Wajin in Japan, providing further insights into the origin of the virus in Japan. *J Med Virol* 81 (8):1450-1456.
- Emmott, E., B. K. Dove, G. Howell, L. A. Chappell, M. L. Reed, J. R. Boyne, J. H. You, G. Brooks, A. Whitehouse, and J. A. Hiscox. 2008. Viral nucleolar localisation signals determine dynamic trafficking within the nucleolus. *Virology* 380 (2):191-202.

- Emmott, E., and J. A. Hiscox. 2009. Nucleolar targeting: the hub of the matter. *EMBO Rep* 10 (3):231-238.
- Emmott, E., M. A. Rodgers, A. Macdonald, S. McCrory, P. Ajuh, and J. A. Hiscox. 2010a. Quantitative proteomics using stable isotope labeling with amino acids in cell culture reveals changes in the cytoplasmic, nuclear, and nucleolar proteomes in Vero cells infected with the coronavirus infectious bronchitis virus. *Mol Cell Proteomics* 9 (9):1920-1936.
- Emmott, E., C. Smith, S. R. Emmett, B. K. Dove, and J. A. Hiscox. 2010b. Elucidation of the avian nucleolar proteome by quantitative proteomics using SILAC and changes in cells infected with the coronavirus infectious bronchitis virus. *Proteomics* 10 (19):3558-3562.
- Emmott, E., H. Wise, E. M. Loucaides, D. A. Matthews, P. Digard, and J. A. Hiscox. 2010c. Quantitative proteomics using SILAC coupled to LC-MS/MS reveals changes in the nucleolar proteome in influenza A virus-infected cells. *J Proteome Res* 9 (10):5335-5345.
- Enomoto, T., M. S. Lindstrom, A. Jin, H. Ke, and Y. Zhang. 2006. Essential role of the B23/NPM core domain in regulating ARF binding and B23 stability. *J Biol Chem* 281 (27):18463-18472.
- Enose-Akahata, Y., A. Abrams, K. R. Johnson, E. M. Maloney, and S. Jacobson. 2012. Quantitative differences in HTLV-I antibody responses: classification and relative risk assessment for asymptomatic carriers and ATL and HAM/TSP patients from Jamaica. *Blood* 119 (12):2829-2836.
- Etzel, A., G. Y. Shibata, M. Rozman, M. L. Jorge, C. D. Damas, and A. A. Segurado. 2001. HTLV-1 and HTLV-2 infections in HIV-infected individuals from Santos, Brazil: seroprevalence and risk factors. *J Acquir Immune Defic Syndr* 26 (2):185-190.
- Fan, J., G. Ma, K. Nosaka, J. Tanabe, Y. Satou, A. Koito, S. Wain-Hobson, J. P. Vartanian, and M. Matsuoka. 2010. APOBEC3G generates nonsense mutations in human T-cell leukemia virus type 1 proviral genomes in vivo. *J Virol* 84 (14):7278-7287.
- Fankhauser, C., E. Izaurralde, Y. Adachi, P. Wingfield, and U. K. Laemmli. 1991. Specific complex of human immunodeficiency virus type 1 rev and nucleolar B23 proteins: dissociation by the Rev response element. *Mol Cell Biol* 11 (5):2567-2575.
- Federici, L., and B. Falini. 2013. Nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia: a tale of protein unfolding and mislocalization. *Protein Sci* 22 (5):545-556.
- Feuer, G., and P. L. Green. 2005. Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. *Oncogene* 24 (39):5996-6004.
- Feuerstein, N., P. K. Chan, and J. J. Mond. 1988. Identification of numatrin, the nuclear matrix protein associated with induction of mitogenesis, as the nucleolar protein B23. Implication for the role of the nucleolus in early transduction of mitogenic signals. *J Biol Chem* 263 (22):10608-10612.
- Feuerstein, N., and J. J. Mond. 1987. Identification of a prominent nuclear protein associated with proliferation of normal and malignant B cells. *J Immunol* 139 (6):1818-1822.
- Finstad, S. L., S. Prabhu, K. R. Rulli, and L. S. Levy. 2004. Regulation of FeLV-945 by c-Myb binding and CBP recruitment to the LTR. *Virol J* 1:3.
- Fitzgerald, M., and T. Shenk. 1981. The sequence 5'-AAUAAA-3' forms parts of the recognition site for polyadenylation of late SV40 mRNAs. *Cell* 24 (1):251-260.

- Flemington, E., and S. H. Speck. 1990. Evidence for coiled-coil dimer formation by an Epstein-Barr virus transactivator that lacks a heptad repeat of leucine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (23):9459-9463.
- Flint, S., Enquist, L.W., Racaniello, V.R. and Skalka, A.M. . 2004. *Principles of Virology*. edited by S. Edition: American Society of Microbiology.
- Fong, J. H., A. E. Keating, and M. Singh. 2004. Predicting specificity in bZIP coiled-coil protein interactions. *Genome Biol* 5 (2):R11.
- Fornerod, M., M. Ohno, M. Yoshida, and I. W. Mattaj. 1997. CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* 90 (6):1051-1060.
- Fortin, J. F., B. Barbeau, G. A. Robichaud, M.-È. Pare, A. M. Lemieux, and M. J. Tremblay. 2001. Regulation of nuclear factor of activated T cells by phosphotyrosyl- specific phosphatase activity: a positive effect on HIV-1 long terminal repeat-driven transcription and a possible implication of SHP-1. *Blood* 97 (8):2390-2400.
- Fortin, J. F., R. Cantin, G. Lamontagne, and M. Tremblay. 1997. Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *J. Virol.* 71:3588-3596.
- Franchini, G. 1995. Molecular mechanisms of Human T-Cell Leukemia/lymphotropic Virus type I infection. *Blood* 86:3619-3639.
- Frehlick, L. J., J. M. Eirin-Lopez, and J. Ausio. 2007. New insights into the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *Bioessays* 29 (1):49-59.
- Froment, A., E. Delaporte, M. C. Dazza, and B. Larouze. 1993. HTLV-II among pygmies from Cameroon. *AIDS Res Hum Retroviruses* 9 (8):707.
- Fujii, Y., T. Shimizu, T. Toda, M. Yanagida, and T. Hakoshima. 2000. Structural basis for the diversity of DNA recognition by bZIP transcription factors. *Nat Struct Biol* 7 (10):889-893.
- Fujino, T., and Y. Nagata. 2000. HTLV-I transmission from mother to child. *J Reprod Immunol* 47 (2):197-206.
- Fujisawa, J., M. Seiki, M. Sato, and M. Yoshida. 1986. A transcriptional enhancer sequence of HTLV-I is responsible for trans-activation mediated by p40 chi HTLV-I. *EMBO J* 5 (4):713-718.
- Fukasawa, M., H. Tsujimoto, K. Ishikawa, T. Miura, B. Ivanoff, R. W. Cooper, E. Frost, E. Delaporte, J. A. Mingle, F. C. Grant, and et al. 1987. Human T-cell leukemia virus type I isolates from Gabon and Ghana: comparative analysis of proviral genomes. *Virology* 161 (2):315-320.
- Fukushima, Y., H. Takahashi, W. W. Hall, T. Nakasone, S. Nakata, P. Song, D. Dinh Duc, B. Hien, X. Q. Nguyen, T. Ngoc Trinh, and et al. 1995. Extraordinary high rate of HTLV type II seropositivity in intravenous drug abusers in south Vietnam. *AIDS Res Hum Retroviruses* 11 (5):637-645.
- Galati, D., and M. Bocchino. 2007. New insights on the perturbations of T cell cycle during HIV infection. *Curr Med Chem* 14 (18):1920-1924.
- Galati, D., M. Paiardini, B. Cervasi, H. Albrecht, M. Bocchino, A. Costantini, M. Montroni, M. Magnani, G. Piedimonte, and G. Silvestri. 2003. Specific changes in the posttranslational regulation of nucleolin in lymphocytes from patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 188 (10):1483-1491.
- Gallo, R. C. 2005. History of the discoveries of the first human retroviruses: HTLV-1 and HTLV-2. *Oncogene* 24 (39):5926-5930.

- Gaudray, G., F. Gachon, J. Basbous, M. Biard-Piechaczyk, C. Devaux, and J. M. Mesnard. 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 (24):12813-12822.
- Gazon, H., I. Lemasson, N. Polakowski, R. Cesaire, M. Matsuoka, B. Barbeau, J. M. Mesnard, and J. M. Peloponese, Jr. 2012. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) bZIP factor requires cellular transcription factor JunD to upregulate HTLV-1 antisense transcription from the 3' long terminal repeat. *J Virol* 86 (17):9070-9078.
- Geleziunas, R., S. Ferrell, X. Lin, Y. Mu, E. T. Cunningham, Jr., M. Grant, M. A. Connelly, J. E. Hambor, K. B. Marcu, and W. C. Greene. 1998. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax induction of NF-kappaB involves activation of the IkappaB kinase alpha (IKKalpha) and IKKbeta cellular kinases. *Mol Cell Biol* 18 (9):5157-5165.
- Georges, S. A., H. A. Giebler, P. A. Cole, K. Luger, P. J. Laybourn, and J. K. Nyborg. 2003. 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* 23 (10):3392-3404.
- Gessain, A., F. Barin, J. C. Vernant, O. Gout, L. Maurs, A. Calender, and G. de The. 1985. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* 2 (8452):407-410.
- Gessain, A., and O. Cassar. 2012. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front Microbiol* 3:388.
- Gessain, A., R. C. Gallo, and G. Franchini. 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 (4):2288-2295.
- Gessain, A., A. Louie, O. Gout, R. C. Gallo, and G. Franchini. 1991. Human T-cell leukemia-lymphoma virus type I (HTLV-I) expression in fresh peripheral blood mononuclear cells from patients with tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy. *J Virol* 65 (3):1628-1633.
- Gessain, A., R. Rua, E. Betssem, J. Turpin, and R. Mahieux. 2013. HTLV-3/4 and simian foamy retroviruses in humans: discovery, epidemiology, cross-species transmission and molecular virology. *Virology* 435 (1):187-199.
- Gessain, A., F. Saal, O. Gout, M.-T. Daniel, G. Faldrin, G. De Thé, and F. Sigaux. 1990. High human T-cell lymphotropic virus type I proviral DNA load with polyclonal integration in peripheral blood mononuclear cells of French West Indian, Guianese, and African patients with tropical spastic paraparesis. *Blood* 75:428-433.
- Ghez, D., Y. Lepelletier, S. Lambert, J. M. Fourneau, V. Blot, S. Janvier, B. Arnulf, P. M. van Endert, N. Heveker, C. Pique, and O. Hermine. 2006. Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *J Virol* 80 (14):6844-6854.
- Ghorbel, S., U. Sinha-Datta, M. Dunder, M. Brown, G. Franchini, and C. Nicot. 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 (48):37150-37158.
- Gill, P. S., W. Harrington, Jr., M. H. Kaplan, R. C. Ribeiro, J. M. Bennett, H. A. Liebman, M. Bernstein-Singer, B. M. Espina, L. Cabral, S. Allen, and et al. 1995. Treatment of adult T-cell leukemia-lymphoma with a combination of interferon alfa and zidovudine. *N Engl J Med* 332 (26):1744-1748.

- Gillet, N. A., N. Malani, A. Melamed, N. Gormley, R. Carter, D. Bentley, C. Berry, F. D. Bushman, G. P. Taylor, and C. R. Bangham. 2011. The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1-infected T-cell clones. *Blood* 117 (11):3113-3122.
- Ginisty, H., F. Amalric, and P. Bouvet. 1998. Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing. *EMBO J* 17 (5):1476-1486.
- Ginisty, H., H. Sicard, B. Roger, and P. Bouvet. 1999. Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci* 112 (Pt 6):761-772.
- Gitlin, S. D., R. Bosselut, A. Gegonne, J. Ghysdael, and J. N. Brady. 1991. Sequence-specific interaction of the Ets1 protein with the long terminal repeat of the human T-lymphotropic virus type I. *J Virol* 65 (10):5513-5523.
- Gjerset, R. A. 2006. DNA damage, p14ARF, nucleophosmin (NPM/B23), and cancer. *J Mol Histol* 37 (5-7):239-251.
- Glover, J. N., and S. C. Harrison. 1995. Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature* 373 (6511):257-261.
- Gomez Corredor, A., and D. Archambault. 2009. The bovine immunodeficiency virus rev protein: identification of a novel lentiviral bipartite nuclear localization signal harboring an atypical spacer sequence. *J Virol* 83 (24):12842-12853.
- Goon, P. K., A. Biancardi, N. Fast, T. Igakura, E. Hanon, A. J. Mosley, B. Asquith, K. G. Gould, S. Marshall, G. P. Taylor, and C. R. Bangham. 2004. Human T cell lymphotropic virus (HTLV) type-1-specific CD8+ T cells: frequency and immunodominance hierarchy. *J Infect Dis* 189 (12):2294-2298.
- Gordon, Y. J., B. Johnson, E. Romanowski, and T. Araullo-Cruz. 1988. RNA complementary to herpes simplex virus type 1 ICP0 gene demonstrated in neurons of human trigeminal ganglia. *J Virol* 62 (5):1832-1835.
- Gorlich, D., and I. W. Mattaj. 1996. Nucleocytoplasmic transport. *Science* 271 (5255):1513-1518.
- Goubau, P., H. F. Liu, G. G. De Lange, A. M. Vandamme, and J. Desmyter. 1993. HTLV-II seroprevalence in pygmies across Africa since 1970. *AIDS Res Hum Retroviruses* 9 (8):709-713.
- Goubau, P., M. Van Brussel, A. M. Vandamme, H. F. Liu, and J. Desmyter. 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 (7):2848-2852.
- Grassmann, R., M. Aboud, and K. T. Jeang. 2005. Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax. *Oncogene* 24 (39):5976-5985.
- Greco, A. 2009. Involvement of the nucleolus in replication of human viruses. *Rev Med Virol* 19 (4):201-214.
- Grisendi, S., C. Mecucci, B. Falini, and P. P. Pandolfi. 2006. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer* 6 (7):493-505.
- Grossman, W. J., J. T. Kimata, F. H. Wong, M. Zutter, T. J. Ley, and L. Ratner. 1995. Development of leukemia in mice transgenic for the tax gene of HTLV-I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1057-1061.
- Gwack, Y., H. Byun, S. Hwang, C. Lim, and J. Choe. 2001. CREB-binding protein and histone deacetylase regulate the transcriptional activity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 50. *J Virol* 75 (4):1909-1917.

- Hagiya, K., J. Yasunaga, Y. Satou, K. Ohshima, and M. Matsuoka. 2011. ATF3, an HTLV-1 bZip factor binding protein, promotes proliferation of adult T-cell leukemia cells. *Retrovirology* 8:19.
- Hakata, Y., T. Umemoto, S. Matsushita, and H. Shida. 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 (8):6602-6607.
- Halazonetis, T. D., K. Georgopoulos, M. E. Greenberg, and P. Leder. 1988. c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* 55 (5):917-924.
- Halin, M., E. Douceron, I. Clerc, C. Journo, N. L. Ko, S. Landry, E. L. Murphy, A. Gessain, I. Lemasson, J. M. Mesnard, B. Barbeau, and R. Mahieux. 2009. Human T-cell leukemia virus type 2 produces a spliced antisense transcript encoding a protein that lacks a classic bZIP domain but still inhibits Tax2-mediated transcription. *Blood* 114 (12):2427-2438.
- Hanon, E., S. Hall, G. P. Taylor, M. Saito, R. Davis, Y. Tanaka, K. Usuku, M. Osame, J. N. Weber, and C. R. Bangham. 2000. Abundant tax protein expression in CD4+ T cells infected with human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is prevented by cytotoxic T lymphocytes. *Blood* 95 (4):1386-1392.
- Hardwick, J. M., P. M. Lieberman, and S. D. Hayward. 1988. A new Epstein-Barr virus transactivator, R, induces expression of a cytoplasmic early antigen. *J Virol* 62 (7):2274-2284.
- Harhaj, E. W., and S. C. Sun. 1999. IKKgamm serves as a docking subunit of the IkappaB kinase (IKK) and mediates interaction of IKK with the human T-cell leukemia virus Tax protein. *J Biol Chem* 274 (33):22911-22914.
- Harrington, W. J., Jr., W. Sheremata, B. Hjelle, D. K. Dube, P. Bradshaw, S. K. Fong, S. Snodgrass, G. Toedter, L. Cabral, and B. Poiesz. 1993. Spastic ataxia associated with human T-cell lymphotropic virus type II infection. *Ann Neurol* 33 (4):411-414.
- Harrod, R., Y. Tang, C. Nicot, H. S. Lu, A. Vassilev, Y. Nakatani, and C.-Z. Giam. 1998. An exposed KID-like domain in Human T-cell Lymphotropic Virus type 1 tax is responsible for the recruitment of coactivators CBP/p300. *Mol. Cell. Biol.* 18:5052-5061.
- Heery, D. M., E. Kalkhoven, S. Hoare, and M. G. Parker. 1997. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature* 387 (6634):733-736.
- Herrera, J. E., R. Savkur, and M. O. Olson. 1995. The ribonuclease activity of nucleolar protein B23. *Nucleic Acids Res* 23 (19):3974-3979.
- Higuchi, M., C. Tsubata, R. Kondo, S. Yoshida, M. Takahashi, M. Oie, Y. Tanaka, R. Mahieux, M. Matsuoka, and M. Fujii. 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 (21):11900-11907.
- Hilburn, S., A. Rowan, M. A. Demontis, A. MacNamara, B. Asquith, C. R. Bangham, and G. P. Taylor. 2011. In vivo expression of human T-lymphotropic virus type 1 basic leucine-zipper protein generates specific CD8+ and CD4+ T-lymphocyte responses that correlate with clinical outcome. *J Infect Dis* 203 (4):529-536.

- Hingorani, K., A. Szebeni, and M. O. Olson. 2000. Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *J Biol Chem* 275 (32):24451-24457.
- 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 (4):152-166.
- Hirano, M., S. Kaneko, T. Yamashita, H. Luo, W. Qin, Y. Shirota, T. Nomura, K. Kobayashi, and S. Murakami. 2003. Direct interaction between nucleolin and hepatitis C virus NS5B. *J Biol Chem* 278 (7):5109-5115.
- Hiscox, J. A. 2002. The nucleolus--a gateway to viral infection? *Arch Virol* 147 (6):1077-1089.
- Hiscox, J. A. 2007. RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nat Rev Microbiol* 5 (2):119-127.
- Hiscox, J. A., A. Whitehouse, and D. A. Matthews. 2010. Nucleolar proteomics and viral infection. *Proteomics* 10 (22):4077-4086.
- Hivin, P., C. Arpin-Andre, I. Clerc, B. Barbeau, and J. M. Mesnard. 2006. A modified version of a Fos-associated cluster in HBZ affects Jun transcriptional potency. *Nucleic Acids Res* 34 (9):2761-2772.
- Hivin, P., J. Basbous, F. Raymond, D. Henaff, C. Arpin-Andre, V. Robert-Hebmann, B. Barbeau, and J. M. Mesnard. 2007. The HBZ-SP1 isoform of human T-cell leukemia virus type I represses JunB activity by sequestration into nuclear bodies. *Retrovirology* 4:14.
- Hivin, P., M. Frederic, C. Arpin-Andre, J. Basbous, B. Gay, S. Thebault, and J. M. Mesnard. 2005. Nuclear localization of HTLV-I bZIP factor (HBZ) is mediated by three distinct motifs. *J Cell Sci* 118 (Pt 7):1355-1362.
- Ho, D. D., A. U. Neumann, A. S. Perelson, W. Chen, J. M. Leonard, and M. Markowitz. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 373:123-126.
- Hongay, C. F., P. L. Grisafi, T. Galitski, and G. R. Fink. 2006. Antisense transcription controls cell fate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 127 (4):735-745.
- Hoopes, B. C., and W. R. McClure. 1985. A cII-dependent promoter is located within the Q gene of bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (10):3134-3138.
- Huang, W. H., B. Y. Yung, W. J. Syu, and Y. H. Lee. 2001. The nucleolar phosphoprotein B23 interacts with hepatitis delta antigens and modulates the hepatitis delta virus RNA replication. *J Biol Chem* 276 (27):25166-25175.
- Ibrahim, F., G. de The, and A. Gessain. 1995. Isolation and characterization of a new simian T-cell leukemia virus type 1 from naturally infected cebeles macaques (*Macaca tonkeana*): complete nucleotide sequence and phylogenetic relationship with the Australo-Melanesian human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol* 69 (11):6980-6993.
- Igakura, T., J. C. Stinchcombe, P. K. Goon, G. P. Taylor, J. N. Weber, G. M. Griffiths, Y. Tanaka, M. Osame, and C. R. Bangham. 2003. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* 299 (5613):1713-1716.
- Ina, Y., and T. Gojobori. 1990. Molecular evolution of human T-cell leukemia virus. *J Mol Evol* 31 (6):493-499.
- Ishida, T., and Y. Hinuma. 1986. The origin of Japanese HTLV-I. *Nature* 322 (6079):504.

- Ishii, T., T. Ishida, A. Utsunomiya, A. Inagaki, H. Yano, H. Komatsu, S. Iida, K. Imada, T. Uchiyama, S. Akinaga, K. Shitara, and R. Ueda. 2010. Defucosylated humanized anti-CCR4 monoclonal antibody KW-0761 as a novel immunotherapeutic agent for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Clin Cancer Res* 16 (5):1520-1531.
- Isono, O., T. Ohshima, Y. Saeki, J. Matsumoto, M. Hijikata, K. Tanaka, and K. Shimotohno. 2008. Human T-cell leukemia virus type 1 HBZ protein bypasses the targeting function of ubiquitination. *J Biol Chem* 283 (49):34273-34282.
- Itahana, K., K. P. Bhat, A. Jin, Y. Itahana, D. Hawke, R. Kobayashi, and Y. Zhang. 2003. Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol Cell* 12 (5):1151-1164.
- Iwanaga, R., K. Ohtani, T. Hayashi, and M. Nakamura. 2001. Molecular mechanism of cell cycle progression induced by the oncogene product Tax of human T-cell leukemia virus type I. *Oncogene* 20 (17):2055-2067.
- Iwasaki, Y. 1990. Pathology of chronic myelopathy associated with HTLV-I infection (HAM/TSP). *J Neurol Sci* 96 (1):103-123.
- Izant, J. G., and H. Weintraub. 1984. Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis. *Cell* 36 (4):1007-1015.
- Izumi, R. E., B. Valdez, R. Banerjee, M. Srivastava, and A. Dasgupta. 2001. Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation. *Virus Res* 76 (1):17-29.
- Jacobson, S., T. Lehky, M. Nishimura, S. Robinson, D. E. McFarlin, and S. Dhib-Jalbut. 1993. Isolation of HTLV-II from a patient with chronic, progressive neurological disease clinically indistinguishable from HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Ann Neurol* 33 (4):392-396.
- Jans, D. A., C. Y. Xiao, and M. H. Lam. 2000. Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? *Bioessays* 22 (6):532-544.
- Jeang, K.-T., I. Boros, J. Brady, M. Radonovich, and G. Khoury. 1988. Characterization of cellular factors that interact with the human T-cell leukemia virus type 1 p40x-responsive 21-base-pair sequence. *J Virol* 62 (12):4499-4509.
- Jeang, K.-T., S. G. Widen, O. J. Semmes IV, and S. H. Wilson. 1990. HTLV-I trans-activator protein, tax, is a trans-repressor of the human β -polymerase gene. *Science* 247:1082-1084.
- Jeang, K. T., R. Chiu, E. Santos, and S. J. Kim. 1991. Induction of the HTLV-I LTR by Jun occurs through the Tax-responsive 21-bp elements. *Virology* 181 (1):218-227.
- Jiang, H., H. Lu, R. L. Schiltz, C. A. Pise-Masison, V. V. Ogrzyzko, Y. Nakatani, and J. N. Brady. 1999. PCAF interacts with tax and stimulates tax transactivation in a histone acetyltransferase-independent manner. *Mol Cell Biol* 19 (12):8136-8145.
- Jin, D. Y., and K. T. Jeang. 1997. HTLV-I Tax self-association in optimal trans-activation function. *Nucleic Acids Res* 25 (2):379-387.
- Jin, Q., L. Agrawal, Z. VanHorn-Ali, and G. Alkhatib. 2006. Infection of CD4+ T lymphocytes by the human T cell leukemia virus type 1 is mediated by the glucose transporter GLUT-1: evidence using antibodies specific to the receptor's large extracellular domain. *Virology* 349 (1):184-196.
- Jones, K. S., K. Fugo, C. Petrow-Sadowski, Y. Huang, D. C. Bertolette, I. Lisinski, S. W. Cushman, S. Jacobson, and F. W. Ruscetti. 2006. Human T-cell leukemia virus type 1

- (HTLV-1) and HTLV-2 use different receptor complexes to enter T cells. *J Virol* 80 (17):8291-8302.
- Jones, K. S., Y. K. Huang, S. A. Chevalier, P. V. Afonso, C. Petrow-Sadowski, D. C. Bertolette, A. Gessain, F. W. Ruscetti, and R. Mahieux. 2009. The receptor complex associated with human T-cell lymphotropic virus type 3 (HTLV-3) Env-mediated binding and entry is distinct from, but overlaps with, the receptor complexes of HTLV-1 and HTLV-2. *J Virol* 83 (10):5244-5255.
- Jones, K. S., S. Lambert, M. Bouttier, L. Benit, F. W. Ruscetti, O. Hermine, and C. Pique. 2011. Molecular aspects of HTLV-1 entry: functional domains of the HTLV-1 surface subunit (SU) and their relationships to the entry receptors. *Viruses* 3 (6):794-810.
- Jones, K. S., C. Petrow-Sadowski, Y. K. Huang, D. C. Bertolette, and F. W. Ruscetti. 2008. Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nat Med* 14 (4):429-436.
- Junius, F. K., S. I. O'Donoghue, M. Nilges, A. S. Weiss, and G. F. King. 1996. High resolution NMR solution structure of the leucine zipper domain of the c-Jun homodimer. *J Biol Chem* 271 (23):13663-13667.
- Kalyanaraman, V. S., M. G. Sarngadharan, M. Robert-Guroff, I. Miyoshi, D. Golde, and R. C. Gallo. 1982. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* 218 (4572):571-573.
- Kamoi, K., and M. Mochizuki. 2012. HTLV-1 uveitis. *Front Microbiol* 3:270.
- Kang, Y. J., M. O. Olson, and H. Busch. 1974. Phosphorylation of acid-soluble proteins in isolated nucleoli of Novikoff hepatoma ascites cells. Effects of divalent cations. *J Biol Chem* 249 (17):5580-5585.
- Kang, Y. J., M. O. Olson, C. Jones, and H. Busch. 1975. Nucleolar phosphoproteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells. *Cancer Res* 35 (6):1470-1475.
- Kannagi, M., S. Harada, I. Maruyama, H. Inoko, H. Igarashi, G. Kuwashima, S. Sato, M. Morita, M. Kidokoro, M. Sugimoto, and et al. 1991. Predominant recognition of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) pX gene products by human CD8+ cytotoxic T cells directed against HTLV-I-infected cells. *Int Immunol* 3 (8):761-767.
- Kannian, P., and P. L. Green. 2010. Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular Biology and Oncogenesis. *Viruses* 2 (9):2037-2077.
- Kannian, P., H. Yin, R. Doueiri, M. D. Lairmore, S. Fernandez, and P. L. Green. 2012. Distinct transformation tropism exhibited by human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 is the result of postinfection T cell clonal expansion. *J Virol* 86 (7):3757-3766.
- Kao, S. Y., and S. J. Marriott. 1999. Disruption of nucleotide excision repair by the human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *J Virol* 73 (5):4299-4304.
- Kaplan, J. B., A. W. Reinke, and A. E. Keating. 2014. Increasing the affinity of selective bZIP-binding peptides through surface residue redesign. *Protein Sci* 23 (7):940-953.
- Karve, T. M., and A. K. Cheema. 2011. Small changes huge impact: the role of protein posttranslational modifications in cellular homeostasis and disease. *J Amino Acids* 2011:207691.
- Kashanchi, F., and J. N. Brady. 2005. Transcriptional and post-transcriptional gene regulation of HTLV-1. *Oncogene* 24 (39):5938-5951.
- Katayama, S., Y. Tomaru, T. Kasukawa, K. Waki, M. Nakanishi, M. Nakamura, H. Nishida, C. C. Yap, M. Suzuki, J. Kawai, H. Suzuki, P. Carninci, Y. Hayashizaki, C. Wells, M.

- Frith, T. Ravasi, K. C. Pang, J. Hallinan, J. Mattick, D. A. Hume, L. Lipovich, S. Batalov, P. G. Engstrom, Y. Mizuno, M. A. Faghihi, A. Sandelin, A. M. Chalk, S. Mottagui-Tabar, Z. Liang, B. Lenhard, C. Wahlestedt, R. G. E. R. Group, G. Genome Science, and F. Consortium. 2005. Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science* 309 (5740):1564-1566.
- Kazanji, M., A. Mouinga-Ondeme, S. Lekana-Douki-Etenna, M. Caron, M. Makuwa, R. Mahieux, and A. Gessain. 2014. Origin of HTLV-1 in Hunters of Nonhuman Primates in Central Africa. *J Infect Dis*.
- Kchour, G., N. J. Makhoul, M. Mahmoudi, M. M. Kooshyar, A. Shirdel, M. Rastin, H. Rafatpanah, M. Tarhini, P. A. Zalloua, O. Hermine, R. Farid, and A. Bazarbachi. 2007. Zidovudine and interferon-alpha treatment induces a high response rate and reduces HTLV-1 proviral load and VEGF plasma levels in patients with adult T-cell leukemia from North East Iran. *Leuk Lymphoma* 48 (2):330-336.
- Khabbaz, R. F., D. Hartel, M. Lairmore, C. R. Horsburgh, E. E. Schoenbaum, B. Roberts, T. M. Hartley, and G. Friedland. 1991. Human T lymphotropic virus type II (HTLV-II) infection in a cohort of New York intravenous drug users: an old infection? *J Infect Dis* 163 (2):252-256.
- Kimelman, D., and M. W. Kirschner. 1989. An antisense mRNA directs the covalent modification of the transcript encoding fibroblast growth factor in *Xenopus* oocytes. *Cell* 59 (4):687-696.
- Kimzey, A. L., and W. S. Dynan. 1998. Specific regions of contact between human T-cell leukemia virus type I Tax protein and DNA identified by photocross-linking. *J Biol Chem* 273 (22):13768-13775.
- Kinjo, T., J. Ham-Terhune, J. M. Peloponese, Jr., and K. T. Jeang. 2010. Induction of reactive oxygen species by human T-cell leukemia virus type 1 tax correlates with DNA damage and expression of cellular senescence marker. *J Virol* 84 (10):5431-5437.
- Kiyokawa, T., K. Yamaguchi, M. Takeya, K. Takahashi, T. Watanabe, T. Matsumoto, S. Y. Lee, and K. Takatsuki. 1987. Hypercalcemia and osteoclast proliferation in adult T-cell leukemia. *Cancer* 59 (6):1187-1191.
- Kobayashi-Ishihara, M., M. Yamagishi, T. Hara, Y. Matsuda, R. Takahashi, A. Miyake, K. Nakano, T. Yamochi, T. Ishida, and T. Watanabe. 2012. HIV-1-encoded antisense RNA suppresses viral replication for a prolonged period. *Retrovirology* 9:38.
- Koiwa, T., A. Hamano-Usami, T. Ishida, A. Okayama, K. Yamaguchi, S. Kamihira, and T. Watanabe. 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 (18):9389-9397.
- Kondo, R., M. Higuchi, M. Takahashi, M. Oie, Y. Tanaka, F. Gejyo, and M. Fujii. 2006. Human T-cell leukemia virus type 2 Tax protein induces interleukin 2-independent growth in a T-cell line. *Retrovirology* 3:88.
- Kondo, T., N. Minamino, T. Nagamura-Inoue, M. Matsumoto, T. Taniguchi, and N. Tanaka. 1997. Identification and characterization of nucleophosmin/B23/numatrin which binds the anti-oncogenic transcription factor IRF-1 and manifests oncogenic activity. *Oncogene* 15 (11):1275-1281.
- Koralnik, I. J., E. Boeri, W. C. Saxinger, A. L. Monico, J. Fullen, A. Gessain, H. G. Guo, R. C. Gallo, P. Markham, V. Kalyanaraman, and et al. 1994. Phylogenetic associations of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic virus type I strains: evidence for interspecies transmission. *J Virol* 68 (4):2693-2707.

- Koralnik, I. J., J. Fullen, and G. Franchini. 1993. The p12I, p13II, and p30II proteins encoded by human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I open reading frames I and II are localized in three different cellular compartments. *J Virol* 67 (4):2360-2366.
- Korgaonkar, C., J. Hagen, V. Tompkins, A. A. Frazier, C. Allamargot, F. W. Quelle, and D. E. Quelle. 2005. Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function. *Mol Cell Biol* 25 (4):1258-1271.
- Kosugi, S., M. Hasebe, M. Tomita, and H. Yanagawa. 2008. Nuclear export signal consensus sequences defined using a localization-based yeast selection system. *Traffic* 9 (12):2053-2062.
- Kouzarides, T., G. Packham, A. Cook, and P. J. Farrell. 1991. The BZLF1 protein of EBV has a coiled coil dimerisation domain without a heptad leucine repeat but with homology to the C/EBP leucine zipper. *Oncogene* 6 (2):195-204.
- Kouzarides, T., and E. Ziff. 1988. The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature* 336:646-651.
- Koyanagi, Y., Y. Itoyama, N. Nakamura, K. Takamatsu, J. Kira, T. Iwamasa, I. Goto, and N. Yamamoto. 1993. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology* 196 (1):25-33.
- Ku, S. C., J. Lee, J. Lau, M. Gurumurthy, R. Ng, S. H. Lwa, J. Lee, Z. Klase, F. Kashanchi, and S. H. Chao. 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 (9):4343-4353.
- Kubota, S., M. Hatanaka, and R. J. Pomerantz. 1996. Nucleo-cytoplasmic redistribution of the HTLV-I Rex protein: alterations by coexpression of the HTLV-I p21x protein. *Virology* 220 (2):502-507.
- Kubuki, Y., M. Suzuki, H. Sasaki, T. Toyama, K. Yamashita, K. Maeda, A. Ido, H. Matsuoka, A. Okayama, T. Nakanishi, and H. Tsubouchi. 2005. Telomerase activity and telomere length as prognostic factors of adult T-cell leukemia. *Leuk Lymphoma* 46 (3):393-399.
- Kudo, N., N. Matsumori, H. Taoka, D. Fujiwara, E. P. Schreiner, B. Wolff, M. Yoshida, and S. Horinouchi. 1999. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (16):9112-9117.
- Kuhlmann, A. S., J. Villaudy, L. Gazzolo, M. Castellazzi, J. M. Mesnard, and M. Duc Dodon. 2007. HTLV-1 HBZ cooperates with JunD to enhance transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Retrovirology* 4 (1):92.
- Kurki, S., K. Peltonen, L. Latonen, T. M. Kiviharju, P. M. Ojala, D. Meek, and M. Laiho. 2004. Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell* 5 (5):465-475.
- Kusakawa, T., T. Shimakami, S. Kaneko, K. Yoshioka, and S. Murakami. 2007. Functional interaction of hepatitis C Virus NS5B with Nucleolin GAR domain. *J Biochem* 141 (6):917-927.
- Kwaan, N., T. H. Lee, D. M. Chafets, C. Nass, B. Newman, J. Smith, G. Garratty, E. L. Murphy, and H. O. S. Investigators. 2006. Long-term variations in human T lymphotropic virus (HTLV)-I and HTLV-II proviral loads and association with clinical data. *J Infect Dis* 194 (11):1557-1564.

- Kwok, R. P., M. E. Laurance, J. R. Lundblad, P. S. Goldman, H. Shih, L. M. Connor, S. J. Marriott, and R. H. Goodman. 1996. Control of cAMP-regulated enhancers by the viral transactivator tax through CREB and the co-activator CBP. *Nature* 380:642-646.
- la Cour, T., L. Kierner, A. Molgaard, R. Gupta, K. Skriver, and S. Brunak. 2004. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* 17 (6):527-536.
- Ladd, A. N., and T. A. Cooper. 2004. Multiple domains control the subcellular localization and activity of ETR-3, a regulator of nuclear and cytoplasmic RNA processing events. *J Cell Sci* 117 (Pt 16):3519-3529.
- LaGrenade, L., B. Hanchard, V. Fletcher, B. Cranston, and W. Blattner. 1990. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. *Lancet* 336 (8727):1345-1347.
- Lagunoff, M., and B. Roizman. 1994. Expression of a herpes simplex virus 1 open reading frame antisense to the gamma(1)34.5 gene and transcribed by an RNA 3' coterminal with the unspliced latency-associated transcript. *J Virol* 68 (9):6021-6028.
- Lai, M. M. 1995. The molecular biology of hepatitis delta virus. *Annu Rev Biochem* 64:259-286.
- Lairmore, M. D., R. Haines, and R. Anupam. 2012. Mechanisms of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and disease. *Curr Opin Virol* 2 (4):474-481.
- Lam, Y. W., V. C. Evans, K. J. Heesom, A. I. Lamond, and D. A. Matthews. 2010. Proteomics analysis of the nucleolus in adenovirus-infected cells. *Mol Cell Proteomics* 9 (1):117-130.
- Lamb, P., and S. L. McKnight. 1991. Diversity and specificity in transcriptional regulation: the benefits of heterotypic dimerization. *Trends Biochem Sci* 16 (11):417-422.
- Lamond, A. I., and W. C. Earnshaw. 1998. Structure and function in the nucleus. *Science* 280 (5363):547-553.
- Lamsoul, I., J. Lodewick, S. Lebrun, R. Brasseur, A. Burny, R. B. Gaynor, and F. Bex. 2005. Exclusive ubiquitination and sumoylation on overlapping lysine residues mediate NF-kappaB activation by the human T-cell leukemia virus tax oncoprotein. *Mol Cell Biol* 25 (23):10391-10406.
- Landry, S., M. Halin, S. Lefort, B. Audet, C. Vaquero, J. M. Mesnard, and B. Barbeau. 2007. Detection, characterization and regulation of antisense transcripts in HIV-1. *Retrovirology* 4:71.
- Landry, S., M. Halin, A. Vargas, I. Lemasson, J. M. Mesnard, and B. Barbeau. 2009. Upregulation of human T-cell leukemia virus type 1 antisense transcription by the viral tax protein. *J Virol* 83 (4):2048-2054.
- Landschulz, W. H., P. F. Johnson, and S. L. McKnight. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240 (4860):1759-1764.
- Lange, A., R. E. Mills, C. J. Lange, M. Stewart, S. E. Devine, and A. H. Corbett. 2007. Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J Biol Chem* 282 (8):5101-5105.
- Lankenau, S., V. G. Corces, and D. H. Lankenau. 1994. The *Drosophila* micropia retrotransposon encodes a testis-specific antisense RNA complementary to reverse transcriptase. *Mol Cell Biol* 14 (3):1764-1775.

- Larocca, D., L. A. Chao, M. H. Seto, and T. K. Brunck. 1989. Human T-cell leukemia virus minus strand transcription in infected T-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 163 (2):1006-1013.
- Larocque, E., C. Andre-Arpin, M. Borowiak, G. Lemay, W. M. Switzer, M. Duc Dodon, J. M. Mesnard, and B. Barbeau. 2014. Human T-cell leukemia virus type 3 (HTLV-3) and HTLV-4 antisense-transcript-encoded proteins interact and transactivate Jun family-dependent transcription via their atypical bZIP motif. *J Virol* 88 (16):8956-8970.
- Larocque, É., M. Halin, S. Landry, S. J. Marriott, W. M. Switzer, and B. Barbeau. 2011. Human T-cell lymphotropic virus type 3 (HTLV-3)- and HTLV-4-derived antisense transcripts encode proteins with similar Tax-inhibiting functions but distinct subcellular localization. *J Virol* 85 (23):12673-12685.
- Laverdure, S., A. Gross, C. Arpin-Andre, I. Clerc, B. Beaumelle, B. Barbeau, and J. M. Mesnard. 2012. HIV-1 antisense transcription is preferentially activated in primary monocyte-derived cells. *J Virol* 86 (24):13785-13789.
- Lawrence, F. J., B. McStay, and D. A. Matthews. 2006. Nucleolar protein upstream binding factor is sequestered into adenovirus DNA replication centres during infection without affecting RNA polymerase I location or ablating rRNA synthesis. *J Cell Sci* 119 (Pt 12):2621-2631.
- Laydon, D. J., A. Melamed, A. Sim, N. A. Gillet, K. Sim, S. Darko, J. S. Kroll, D. C. Douek, D. A. Price, C. R. Bangham, and B. Asquith. 2014. Quantification of HTLV-1 clonality and TCR diversity. *PLoS Comput Biol* 10 (6):e1003646.
- Le Hesran, J. Y., E. Delaporte, C. Gaudebout, A. Trebuck, D. Schrijvers, R. Josse, M. Peeters, H. Cheringou, A. Dupont, and B. Larouze. 1994. Demographic factors associated with HTLV-1 infection in a Gabonese community. *Int J Epidemiol* 23 (4):812-817.
- Lee, C. H., S. C. Chang, C. J. Chen, and M. F. Chang. 1998. The nucleolin binding activity of hepatitis delta antigen is associated with nucleolus targeting. *J Biol Chem* 273 (13):7650-7656.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, and V. Ambros. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75 (5):843-854.
- Lemasson, I., M. R. Lewis, N. Polakowski, P. Hivin, M. H. Cavanagh, S. Thebault, B. Barbeau, J. K. Nyborg, and J. M. Mesnard. 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 (4):1543-1553.
- Lemasson, I., N. J. Polakowski, P. J. Laybourn, and J. K. Nyborg. 2002. Transcription factor binding and histone modifications on the integrated proviral promoter in human T-cell leukemia virus-I-infected T-cells. *J Biol Chem* 277 (51):49459-49465.
- Lemasson, I., N. J. Polakowski, P. J. Laybourn, and J. K. Nyborg. 2004. Transcription regulatory complexes bind the human T-cell leukemia virus 5' and 3' long terminal repeats to control gene expression. *Mol Cell Biol* 24 (14):6117-6126.
- Lemasson, I., S. Thebault, C. Sardet, C. Devaux, and J. M. Mesnard. 1998. Activation of E2F-mediated transcription by human T-cell leukemia virus type I Tax protein in a p16(INK4A)-negative T-cell line. *J Biol Chem* 273 (36):23598-23604.
- Li, M., M. Kesic, H. Yin, L. Yu, and P. L. Green. 2009. Kinetic analysis of human T-cell leukemia virus type 1 gene expression in cell culture and infected animals. *J Virol* 83 (8):3788-3797.

- Li, Y. P. 1997. Protein B23 is an important human factor for the nucleolar localization of the human immunodeficiency virus protein Tat. *J Virol* 71 (5):4098-4102.
- Li, Y. P., R. K. Busch, B. C. Valdez, and H. Busch. 1996. C23 interacts with B23, a putative nucleolar-localization-signal-binding protein. *Eur J Biochem* 237 (1):153-158.
- Lin, H. C., M. Hickey, L. Hsu, D. Medina, and A. B. Rabson. 2005. Activation of human T cell leukemia virus type 1 LTR promoter and cellular promoter elements by T cell receptor signaling and HTLV-1 Tax expression. *Virology* 339 (1):1-11.
- Liu, H. F., P. Goubau, M. Van Brussel, K. Van Laethem, Y. C. Chen, J. Desmyter, and A. M. Vandamme. 1996. The three human T-lymphotropic virus type I subtypes arose from three geographically distinct simian reservoirs. *J Gen Virol* 77 (Pt 2):359-368.
- Liu, H. T., and B. Y. Yung. 1999. In vivo interaction of nucleophosmin/B23 and protein C23 during cell cycle progression in HeLa cells. *Cancer Lett* 144 (1):45-54.
- Livengood, J. A., and J. K. Nyborg. 2004. The high-affinity Sp1 binding site in the HTLV-1 promoter contributes to Tax-independent basal expression. *Nucleic Acids Res* 32 (9):2829-2837.
- Lu, H., W. Li, W. S. Noble, D. Payan, and D. C. Anderson. 2004. Riboproteomics of the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *J Proteome Res* 3 (5):949-957.
- Ludwig, L. B., J. L. Ambrus, Jr., K. A. Krawczyk, S. Sharma, S. Brooks, C. B. Hsiao, and S. A. Schwartz. 2006. Human Immunodeficiency Virus-Type 1 LTR DNA contains an intrinsic gene producing antisense RNA and protein products. *Retrovirology* 3:80.
- Lundblad, J. R., R. P. Kwok, M. E. Lurance, M. S. Huang, J. P. Richards, R. G. Brennan, and R. H. Goodman. 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 (30):19251-19259.
- Lupas, A. 1996. Prediction and analysis of coiled-coil structures. *Methods Enzymol* 266:513-525.
- Lwoff, A. 1957. The concept of virus. *J Gen Microbiol* 17 (2):239-253.
- Lymberopoulos, M. H., and A. Pearson. 2010. Relocalization of upstream binding factor to viral replication compartments is UL24 independent and follows the onset of herpes simplex virus 1 DNA synthesis. *J Virol* 84 (9):4810-4815.
- Ma, G., J. Yasunaga, J. Fan, S. Yanagawa, and M. Matsuoka. 2013. HTLV-1 bZIP factor dysregulates the Wnt pathways to support proliferation and migration of adult T-cell leukemia cells. *Oncogene* 32 (36):4222-4230.
- Macnamara, A., A. Rowan, S. Hilburn, U. Kadolsky, H. Fujiwara, K. Suemori, M. Yasukawa, G. Taylor, C. R. Bangham, and B. Asquith. 2010. HLA class I binding of HBZ determines outcome in HTLV-1 infection. *PLoS Pathog* 6 (9):e1001117.
- Mahieux, R., F. Ibrahim, P. Mauclore, V. Herve, P. Michel, F. Tekaiia, C. Chappey, B. Garin, E. Van Der Ryst, B. Guillemain, E. Ledru, E. Delaporte, G. de The, and A. Gessain. 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 (2):1317-1333.
- Majorovits, E., M. Nejmeddine, Y. Tanaka, G. P. Taylor, S. D. Fuller, and C. R. Bangham. 2008. Human T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography. *PLoS One* 3 (5):e2251.
- Manel, N., F. J. Kim, S. Kinet, N. Taylor, M. Sitbon, and J. L. Battini. 2003. The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell* 115 (4):449-459.

- Manns, A., M. Hisada, and L. LaGrenade. 1999. Human T-Lymphotropic Virus type I infection. *The Lancet* 353:1951-1958.
- Manns, A., R. J. Wilks, E. L. Murphy, G. Haynes, J. P. Figueroa, M. Barnett, B. Hanchard, and W. A. Blattner. 1992. A prospective study of transmission by transfusion of HTLV-I and risk factors associated with seroconversion. *Int J Cancer* 51 (6):886-891.
- Mansky, L. M., and L. C. Gajary. 2002. The primary nucleotide sequence of the bovine leukemia virus RNA packaging signal can influence efficient RNA packaging and virus replication. *Virology* 301 (2):272-280.
- Marban, C., A. McCabe, T. N. Bukong, W. W. Hall, and N. Sheehy. 2012. Interplay between the HTLV-2 Tax and APH-2 proteins in the regulation of the AP-1 pathway. *Retrovirology* 9:98.
- Marriott, S. J., I. Boros, J. Duvall, and J. Brady. 1989. Indirect binding of human T-cell leukemia virus type I tax_I to a responsive element in the viral long terminal repeat. *Mol. Cell. Biol.* 9:4152-4160.
- Martin, J. D., R. G. Mathias, C. Sarin, and S. E. Byrne. 2002. Human T-lymphotropic virus type I and II infections in First Nations alcohol and drug treatment centres in British Columbia, Canada, 1992-2000. *Int J Circumpolar Health* 61 (2):98-103.
- Mason, J. M., and K. M. Arndt. 2004. Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *ChemBiochem* 5 (2):170-176.
- Mason, J. M., M. M. K., and K. M. Arndt. 2008. iPEP: peptides designed and selected for interfering with protein interaction and function. *Biochem Soc Trans* 36 (Pt 6):1442-1447.
- Matsumoto, J., T. Ohshima, O. Isono, and K. Shimotohno. 2005. HTLV-1 HBZ suppresses AP-1 activity by impairing both the DNA-binding ability and the stability of c-Jun protein. *Oncogene* 24 (6):1001-1010.
- Matsumoto, K., H. Shibata, J.-I. Fujisawa, H. Inoue, A. Hakura, T. Tsukahara, and M. Fujii. 1997. Human T-cell Leukemia Virus type 1 Tax protein transforms rat fibroblasts via two distinct pathways. *J. Virol.* 71:4445-4451.
- 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 K. T. Jeang. 2007. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat Rev Cancer* 7 (4):270-280.
- Matsuoka, M., and K. T. Jeang. 2011. Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation: viral infectivity, Tax, HBZ and therapy. *Oncogene* 30 (12):1379-1389.
- Matsuoka, M., and J. Yasunaga. 2013. Human T-cell leukemia virus type 1: replication, proliferation and propagation by Tax and HTLV-1 bZIP factor. *Curr Opin Virol* 3 (6):684-691.
- Matthews, D. A. 2001. Adenovirus protein V induces redistribution of nucleolin and B23 from nucleolus to cytoplasm. *J Virol* 75 (2):1031-1038.
- McDevitt, M. A., R. P. Hart, W. W. Wong, and J. R. Nevins. 1986. Sequences capable of restoring poly(A) site function define two distinct downstream elements. *EMBO J* 5 (11):2907-2913.
- McDonald, S. L., and A. Silver. 2009. The opposing roles of Wnt-5a in cancer. *Br J Cancer* 101 (2):209-214.

- McGill, N. K., J. Vyas, T. Shimauchi, Y. Tokura, and V. Piguet. 2012. HTLV-1-associated infective dermatitis: updates on the pathogenesis. *Exp Dermatol* 21 (11):815-821.
- McInerney, E. M., D. W. Rose, S. E. Flynn, S. Westin, T. M. Mullen, A. Krones, J. Inostroza, J. Torchia, R. T. Nolte, N. Assa-Munt, M. V. Milburn, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld. 1998. Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev* 12 (21):3357-3368.
- Meekings, K. N., J. Leipzig, F. D. Bushman, G. P. Taylor, and C. R. Bangham. 2008. HTLV-1 integration into transcriptionally active genomic regions is associated with proviral expression and with HAM/TSP. *PLoS Pathog* 4 (3):e1000027.
- Meertens, L., and A. Gessain. 2003. Divergent simian T-cell lymphotropic virus type 3 (STLV-3) in wild-caught *Papio hamadryas papio* from Senegal: widespread distribution of STLV-3 in Africa. *J Virol* 77 (1):782-789.
- Meissner, C. S., S. Suffner, M. Schauflinger, J. von Einem, and E. Bogner. 2012. A leucine zipper motif of a tegument protein triggers final envelopment of human cytomegalovirus. *J Virol* 86 (6):3370-3382.
- Melamed, A., D. J. Laydon, N. A. Gillet, Y. Tanaka, G. P. Taylor, and C. R. Bangham. 2013. Genome-wide determinants of proviral targeting, clonal abundance and expression in natural HTLV-1 infection. *PLoS Pathog* 9 (3):e1003271.
- Merika, M., and D. Thanos. 2001. Enhanceosomes. *Curr Opin Genet Dev* 11 (2):205-208.
- Mesnard, J. M., B. Barbeau, and C. Devaux. 2006. HBZ, a new important player in the mystery of adult T-cell leukemia. *Blood* 108 (13):3979-3982.
- Mesri, E. A., M. A. Feitelson, and K. Munger. 2014. Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe* 15 (3):266-282.
- Michael, N. L., L. D'Arcy, P. K. Ehrenberg, and R. R. Redfield. 1994a. Naturally occurring genotypes of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat display a wide range of basal and tat-induced transcriptional activities. *J Virol* 68 (5):3163-3174.
- Michael, N. L., M. T. Vahey, L. d'Arcy, P. K. Ehrenberg, J. D. Mosca, J. Rappaport, and R. R. Redfield. 1994b. Negative-strand RNA transcripts are produced in human immunodeficiency virus type 1-infected cells and patients by a novel promoter downregulated by Tat. *J Virol* 68 (2):979-987.
- Michienzi, A., L. Cagnon, I. Bahner, and J. J. Rossi. 2000. Ribozyme-mediated inhibition of HIV 1 suggests nucleolar trafficking of HIV-1 RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (16):8955-8960.
- Michienzi, A., F. G. De Angelis, I. Bozzoni, and J. J. Rossi. 2006. A nucleolar localizing Rev binding element inhibits HIV replication. *AIDS Res Ther* 3:13.
- Miller, J. H. 1972. Assay of Beta-Galactosidase. In *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 352-355.
- Miller, M. 2009. The importance of being flexible: the case of basic region leucine zipper transcriptional regulators. *Curr Protein Pept Sci* 10 (3):244-269.
- Miller, R. H. 1988. Human immunodeficiency virus may encode a novel protein on the genomic DNA plus strand. *Science* 239:1420-1422.
- Miura, M., J. Yasunaga, J. Tanabe, K. Sugata, T. Zhao, G. Ma, P. Miyazato, K. Ohshima, A. Kaneko, A. Watanabe, A. Saito, H. Akari, and M. Matsuoka. 2013. Characterization of simian T-cell leukemia virus type 1 in naturally infected Japanese macaques as a model of HTLV-1 infection. *Retrovirology* 10:118.

- Miura, T., T. Fukunaga, T. Igarashi, M. Yamashita, E. Ido, S. Funahashi, T. Ishida, K. Washio, S. Ueda, K. Hashimoto, and et al. 1994. Phylogenetic subtypes of human T-lymphotropic virus type I and their relations to the anthropological background. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (3):1124-1127.
- Miyajima, N., R. Horiuchi, Y. Shibuya, S. Fukushige, K. Matsubara, K. Toyoshima, and T. Yamamoto. 1989. Two erbA homologs encoding proteins with different T3 binding capacities are transcribed from opposite DNA strands of the same genetic locus. *Cell* 57 (1):31-39.
- Miyazaki, M., J. Yasunaga, Y. Taniguchi, S. Tamiya, T. Nakahata, and M. Matsuoka. 2007. Preferential selection of human T-cell leukemia virus type 1 provirus lacking the 5' long terminal repeat during oncogenesis. *J Virol* 81 (11):5714-5723.
- Miyazato, P., and M. Matsuoka. 2014. Human T-cell leukemia virus type 1 and Foxp3 expression: viral strategy in vivo. *Int Immunol* 26 (8):419-425.
- Miyoshi, I., M. Fujishita, H. Taguchi, K. Matsubayashi, N. Miwa, and Y. Tanioka. 1983. Natural infection in non-human primates with adult T-cell leukemia virus or a closely related agent. *Int J Cancer* 32 (3):333-336.
- Miyoshi, I., I. Kubonishi, S. Yoshimoto, T. Akagi, Y. Ohtsuki, Y. Shiraishi, K. Nagata, and Y. Hinuma. 1981. Type C virus particles in a cord T cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature* 294:770.
- Miyoshi, I., S. Yoshimoto, M. Fujishita, H. Taguchi, I. Kubonishi, K. Niiya, and M. Minezawa. 1982. Natural adult T-cell leukemia virus infection in Japanese monkeys. *Lancet* 2 (8299):658.
- Mizuno, T., M. Y. Chou, and M. Inouye. 1984. A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (7):1966-1970.
- Mochizuki, M., T. Watanabe, K. Yamaguchi, K. Yoshimura, S. Nakashima, M. Shirao, S. Araki, K. Takatsuki, S. Mori, and N. Miyata. 1992. Uveitis associated with human T-cell lymphotropic virus type I. *Am J Ophthalmol* 114 (2):123-129.
- Morgan, O. S., P. Rodgers-Johnson, C. Mora, and G. Char. 1989. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. *Lancet* 2 (8673):1184-1187.
- Morimoto, H., J. Tsukada, Y. Kominato, and Y. Tanaka. 2005. Reduced expression of human mismatch repair genes in adult T-cell leukemia. *Am J Hematol* 78 (2):100-107.
- Moriuchi, M., H. Moriuchi, and A. S. Fauci. 1999. HTLV type I Tax activation of the CXCR4 promoter by association with nuclear respiratory factor 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 15 (9):821-827.
- Moriyama, K., K. Hayashida, M. Shimada, S. Nakano, Y. Nakashima, and Y. Fukumaki. 2003. Antisense RNAs transcribed from the upstream region of the precore/core promoter of hepatitis B virus. *J Gen Virol* 84 (Pt 7):1907-1913.
- Morris, S. W., M. N. Kirstein, M. B. Valentine, K. G. Dittmer, D. N. Shapiro, D. L. Saltman, and A. T. Look. 1994. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science* 263 (5151):1281-1284.
- Mortreux, F., A. S. Gabet, and E. Wattel. 2003. Molecular and cellular aspects of HTLV-1 associated leukemogenesis in vivo. *Leukemia* 17 (1):26-38.
- Mukai, R., and T. Ohshima. 2014. HTLV-1 HBZ positively regulates the mTOR signaling pathway via inhibition of GADD34 activity in the cytoplasm. *Oncogene* 33 (18):2317-2328.

- Munday, D. C., E. Emmott, R. Surtees, C. H. Lardeau, W. Wu, W. P. Duprex, B. K. Dove, J. N. Barr, and J. A. Hiscox. 2010. Quantitative proteomic analysis of A549 cells infected with human respiratory syncytial virus. *Mol Cell Proteomics* 9 (11):2438-2459.
- Murata, K., T. Hayashibara, K. Sugahara, A. Uemura, T. Yamaguchi, H. Harasawa, H. Hasegawa, K. Tsuruda, T. Okazaki, T. Koji, T. Miyanishi, Y. Yamada, and S. Kamihira. 2006. A novel alternative splicing isoform of human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ-SI) targets distinct subnuclear localization. *J Virol* 80 (5):2495-2505.
- Murphy, E. L., B. Hanchard, J. P. Figueroa, W. N. Gibbs, W. S. Lofters, M. Campbell, J. J. Goedert, and W. A. Blattner. 1989. Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I. *Int J Cancer* 43 (2):250-253.
- Murphy, P. R., and R. S. Knee. 1994. Identification and characterization of an antisense RNA transcript (gfg) from the human basic fibroblast growth factor gene. *Mol Endocrinol* 8 (7):852-859.
- Musinova, Y. R., E. Y. Kananykhina, D. M. Potashnikova, O. M. Lisitsyna, and E. V. Sheval. 2015. A charge-dependent mechanism is responsible for the dynamic accumulation of proteins inside nucleoli. *Biochim Biophys Acta* 1853 (1):101-110.
- Nagai, M., K. Usuku, W. Matsumoto, D. Kodama, N. Takenouchi, T. Moritoyo, S. Hashiguchi, M. Ichinose, C. R. Bangham, S. Izumo, and M. Osame. 1998. Analysis of HTLV-I proviral load in 202 HAM/TSP patients and 243 asymptomatic HTLV-I carriers: high proviral load strongly predisposes to HAM/TSP. *J Neurovirol* 4 (6):586-593.
- Nagai, M., S. Yashiki, T. Fujiyoshi, C. Fujiyama, B. Kitze, S. Izumo, M. Osame, and S. Sonoda. 1996. Characterization of a unique T-cell clone established from a patient with HAM/TSP which recognized HTLV-I-infected T-cell antigens as well as spinal cord tissue antigens. *J Neuroimmunol* 65 (2):97-105.
- Nakagawa, M., K. Nakahara, Y. Maruyama, M. Kawabata, I. Higuchi, H. Kubota, S. Izumo, K. Arimura, and M. Osame. 1996. Therapeutic trials in 200 patients with HTLV-I-associated myelopathy/ tropical spastic paraparesis. *J Neurovirol* 2 (5):345-355.
- Nakano, K., and T. Watanabe. 2012. HTLV-1 Rex: the courier of viral messages making use of the host vehicle. *Front Microbiol* 3:330.
- Natoli, G., M. L. Avantiaggiati, P. Chirillo, A. Costanzo, M. Artini, C. Balsano, and M. Levvero. 1994. Induction of the DNA-binding activity of c-jun/c-fos heterodimers by the hepatitis B virus transactivator pX. *Mol Cell Biol* 14 (2):989-998.
- Negi, S. S., and M. O. Olson. 2006. Effects of interphase and mitotic phosphorylation on the mobility and location of nucleolar protein B23. *J Cell Sci* 119 (Pt 17):3676-3685.
- Nejmeddine, M., A. L. Barnard, Y. Tanaka, G. P. Taylor, and C. R. Bangham. 2005. Human T-lymphotropic virus, type 1, tax protein triggers microtubule reorientation in the virological synapse. *J Biol Chem* 280 (33):29653-29660.
- Neuveut, C., K. G. Low, F. Maldarelli, I. Schmitt, F. Majone, R. Grassmann, and K. T. Jeang. 1998. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax and cell cycle progression: role of cyclin D-cdk and p110Rb. *Mol Cell Biol* 18 (6):3620-3632.
- Newman, J. R., and A. E. Keating. 2003. Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays. *Science* 300 (5628):2097-2101.

- Nicot, C. 2005. Current views in HTLV-I-associated adult T-cell leukemia/lymphoma. *Am J Hematol* 78 (3):232-239.
- Nicot, C., M. Dunder, J. M. Johnson, J. R. Fullen, N. Alonzo, R. Fukumoto, G. L. Princler, D. Derse, T. Misteli, and G. Franchini. 2004. HTLV-1-encoded p30II is a post-transcriptional negative regulator of viral replication. *Nat Med* 10 (2):197-201.
- Niederer, H. A., D. J. Laydon, A. Melamed, M. Elemans, B. Asquith, M. Matsuoka, and C. R. Bangham. 2014. HTLV-1 proviral integration sites differ between asymptomatic carriers and patients with HAM/TSP. *Viol J* 11:172.
- Nishimura, Y., T. Ohkubo, Y. Furuichi, and H. Umekawa. 2002. Tryptophans 286 and 288 in the C-terminal region of protein B23.1 are important for its nucleolar localization. *Biosci Biotechnol Biochem* 66 (10):2239-2242.
- Nishioka, K., I. Maruyama, K. Sato, I. Kitajima, Y. Nakajima, and M. Osame. 1989. Chronic inflammatory arthropathy associated with HTLV-I. *Lancet* I:441.
- Nyborg, J. K., and W. S. Dynan. 1990. Interaction of cellular proteins with the human T-cell leukemia virus type I transcriptional control region. Purification of cellular proteins that bind the 21-base pair repeat elements. *J Biol Chem* 265 (14):8230-8236.
- Nyborg, J. K., D. Egan, and N. Sharma. 2010. The HTLV-1 Tax protein: revealing mechanisms of transcriptional activation through histone acetylation and nucleosome disassembly. *Biochim Biophys Acta* 1799 (3-4):266-274.
- O'Shea, E. K., J. D. Klemm, P. S. Kim, and T. Alber. 1991. X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science* 254 (5031):539-544.
- O'Shea, E. K., R. Rutkowski, and P. S. Kim. 1989. Evidence that the leucine zipper is a coiled coil. *Science* 243 (4890):538-542.
- Ohshima, T., R. Mukai, N. Nakahara, J. Matsumoto, O. Isono, Y. Kobayashi, S. Takahashi, and K. Shimotohno. 2010. HTLV-1 basic leucine-zipper factor, HBZ, interacts with MafB and suppresses transcription through a Maf recognition element. *J Cell Biochem* 111 (1):187-194.
- Okajima, M., M. Takahashi, M. Higuchi, T. Ohsawa, S. Yoshida, Y. Yoshida, M. Oie, Y. Tanaka, F. Gejyo, and M. Fujii. 2008. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax induces an aberrant clustering of the tumor suppressor Scribble through the PDZ domain-binding motif dependent and independent interaction. *Virus Genes* 37 (2):231-240.
- Okochi, K., H. Sato, and Y. Hinuma. 1984. A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. *Vox Sang* 46 (5):245-253.
- Okuwaki, M. 2008. The structure and functions of NPM1/Nucleophosmin/B23, a multifunctional nucleolar acidic protein. *J Biochem* 143 (4):441-448.
- Okuwaki, M., K. Matsumoto, M. Tsujimoto, and K. Nagata. 2001. Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett* 506 (3):272-276.
- Olson, M. O., M. Dunder, and A. Szebeni. 2000. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol* 10 (5):189-196.
- Olson, M. O., M. O. Wallace, A. H. Herrera, L. Marshall-Carlson, and R. C. Hunt. 1986. Preribosomal ribonucleoprotein particles are a major component of a nucleolar matrix fraction. *Biochemistry* 25 (2):484-491.

- Osame, M., R. Janssen, H. Kubota, H. Nishitani, A. Igata, S. Nagataki, M. Mori, I. Goto, H. Shimabukuro, R. Khabbaz, and et al. 1990. Nationwide survey of HTLV-I-associated myelopathy in Japan: association with blood transfusion. *Ann Neurol* 28 (1):50-56.
- Osame, M., K. Usuku, S. Izumo, N. Ijichi, H. Amitani, A. Igata, M. Matsumoto, and M. Tara. 1986. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* 1 (8488):1031-1032.
- Pais-Correia, A. M., M. Sachse, S. Guadagnini, V. Robbiati, R. Lasserre, A. Gessain, O. Gout, A. Alcover, and M. I. Thoulouze. 2010. Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nat Med* 16 (1):83-89.
- Paiva, A., and J. Casseb. 2015. Origin and prevalence of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and type 2 (HTLV-2) among indigenous populations in the Americas. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 57 (1):1-13.
- Palmeri, D., and M. H. Malim. 1999. Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha. *Mol Cell Biol* 19 (2):1218-1225.
- Pandolfi, P. P. 1996. PML, PLZF and NPM genes in the molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Haematologica* 81 (5):472-482.
- Pederson, T. 1998. The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res* 26 (17):3871-3876.
- Pederson, T., and R. Y. Tsai. 2009. In search of nonribosomal nucleolar protein function and regulation. *J Cell Biol* 184 (6):771-776.
- Peeters, A., P. F. Lambert, and N. J. Deacon. 1996. A fourth Sp1 site in the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat is essential for negative-sense transcription. *J Virol* 70 (10):6665-6672.
- Pelechano, V., and L. M. Steinmetz. 2013. Gene regulation by antisense transcription. *Nat Rev Genet* 14 (12):880-893.
- Peloponese, J. M., Jr., and K. T. Jeang. 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 (13):8927-8938.
- Perini, G., S. Wagner, and M. R. Green. 1995. Recognition of bZIP proteins by the human T-cell leukaemia virus transactivator Tax. *Nature* 376 (6541):602-605.
- Perkins, A., A. W. Cochrane, S. M. Ruben, and C. A. Rosen. 1989. Structural and functional characterization of the human immunodeficiency virus rev protein. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2 (3):256-263.
- Pestka, S., B. L. Daugherty, V. Jung, K. Hotta, and R. K. Pestka. 1984. Anti-mRNA: specific inhibition of translation of single mRNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (23):7525-7528.
- Peters, A. A., M. B. Coulthart, J. J. Oger, D. J. Waters, K. A. Crandall, A. A. Baumgartner, R. H. Ward, and G. A. Dekaban. 2000. HTLV type I/II in British Columbia Amerindians: a seroprevalence study and sequence characterization of an HTLV type IIa isolate. *AIDS Res Hum Retroviruses* 16 (9):883-892.
- Peterson, B. R., L. J. Sun, and G. L. Verdine. 1996. A critical arginine residue mediates cooperativity in the contact interface between transcription factors NFAT and AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (24):13671-13676.

- Philip, S., M. A. Zahoor, H. Zhi, Y. K. Ho, and C. Z. Giam. 2014. Regulation of human T-lymphotropic virus type I latency and reactivation by HBZ and Rex. *PLoS Pathog* 10 (4):e1004040.
- Philpott, A., T. Krude, and R. A. Laskey. 2000. Nuclear chaperones. *Semin Cell Dev Biol* 11 (1):7-14.
- Picard, F. J., M. B. Coulthart, J. Oger, E. E. King, S. Kim, J. Arp, G. P. Rice, and G. A. Dekaban. 1995. Human T-lymphotropic virus type 1 in coastal natives of British Columbia: phylogenetic affinities and possible origins. *J Virol* 69 (11):7248-7256.
- Pinol-Roma, S. 1999. Association of nonribosomal nucleolar proteins in ribonucleoprotein complexes during interphase and mitosis. *Mol Biol Cell* 10 (1):77-90.
- Pique, C., and K. S. Jones. 2012. Pathways of cell-cell transmission of HTLV-1. *Front Microbiol* 3:378.
- Poiesz, B., F. W. Ruscetti, A. F. Gazdar, P. A. Bunn, J. D. Minna, and R. C. Gallo. 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. USA* 77:7415-7419.
- Poiesz, B., F. W. Ruscetti, M. S. Reitz, V. S. Kalyanaraman, and R. C. Gallo. 1981. Isolation of a new type C retrovirus (HTLV) in primary uncultured cells of a patient with Sézary T-cell leukemia. *Nature* 294:268-271.
- Prang, N., H. Wolf, and F. Schwarzmann. 1995. Epstein-Barr virus lytic replication is controlled by posttranscriptional negative regulation of BZLF1. *J Virol* 69 (4):2644-2648.
- Prestayko, A. W., G. R. Klomp, D. J. Schmoll, and H. Busch. 1974. Comparison of proteins of ribosomal subunits and nucleolar preribosomal particles from Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochemistry* 13 (9):1945-1951.
- Proietti, F. A., A. B. Carneiro-Proietti, B. C. Catalan-Soares, and E. L. Murphy. 2005. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 24 (39):6058-6068.
- Quin, J. E., J. R. Devlin, D. Cameron, K. M. Hannan, R. B. Pearson, and R. D. Hannan. 2014. Targeting the nucleolus for cancer intervention. *Biochim Biophys Acta* 1842 (6):802-816.
- Ransone, L. J., J. Visvader, W. W. Lamph, P. Sassone-Corsi, and I. M. Verma. 1989a. fos and jun interaction: the role of the leucine zipper. *Int J Cancer Suppl* 4:10-21.
- Ransone, L. J., J. Visvader, P. Sassone-Corsi, and I. M. Verma. 1989b. Fos-Jun interaction: mutational analysis of the leucine zipper domain of both proteins. *Genes Dev* 3 (6):770-781.
- Rasmussen, M. H., B. Ballarin-Gonzalez, J. Liu, L. B. Lassen, A. Fuchtbauer, E. M. Fuchtbauer, A. L. Nielsen, and F. S. Pedersen. 2010. Antisense transcription in gammaretroviruses as a mechanism of insertional activation of host genes. *J Virol* 84 (8):3780-3788.
- Reed, M. L., B. K. Dove, R. M. Jackson, R. Collins, G. Brooks, and J. A. Hiscox. 2006. Delineation and modelling of a nucleolar retention signal in the coronavirus nucleocapsid protein. *Traffic* 7 (7):833-848.

- Reed, M. L., G. Howell, S. M. Harrison, K. A. Spencer, and J. A. Hiscox. 2007. Characterization of the nuclear export signal in the coronavirus infectious bronchitis virus nucleocapsid protein. *J Virol* 81 (8):4298-4304.
- Reinke, A. W., R. A. Grant, and A. E. Keating. 2010a. A synthetic coiled-coil interactome provides heterospecific modules for molecular engineering. *J Am Chem Soc* 132 (17):6025-6031.
- Reinke, A. W., G. Grigoryan, and A. E. Keating. 2010b. Identification of bZIP interaction partners of viral proteins HBZ, MEQ, BZLF1, and K-bZIP using coiled-coil arrays. *Biochemistry* 49 (9):1985-1997.
- Rende, F., I. Cavallari, A. Corradin, M. Silic-Benussi, F. Toulza, G. M. Toffolo, Y. Tanaka, S. Jacobson, G. P. Taylor, D. M. D'Agostino, C. R. Bangham, and V. Ciminale. 2011. Kinetics and intracellular compartmentalization of HTLV-1 gene expression: nuclear retention of HBZ mRNAs. *Blood* 117 (18):4855-4859.
- Rende, F., I. Cavallari, M. G. Romanelli, E. Diani, U. Bertazzoni, and V. Ciminale. 2012. Comparison of the Genetic Organization, Expression Strategies and Oncogenic Potential of HTLV-1 and HTLV-2. *Leuk Res Treatment* 2012:876153.
- Richardson, J. H., A. J. Edwards, J. K. Cruickshank, P. Rudge, and A. G. Dalgleish. 1990. *In vivo* cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *J Virol* 64 (11):5682-5687.
- Rickards, B., S. J. Flint, M. D. Cole, and G. LeRoy. 2007. Nucleolin is required for RNA polymerase I transcription in vivo. *Mol Cell Biol* 27 (3):937-948.
- Rodrigues, S. H., N. P. Silva, L. R. Delicio, C. Granato, and L. E. Andrade. 1996. The behavior of the coiled body in cells infected with adenovirus in vitro. *Mol Biol Rep* 23 (3-4):183-189.
- Romanelli, M. G., E. Diani, E. Bergamo, C. Casoli, V. Ciminale, F. Bex, and U. Bertazzoni. 2013. Highlights on distinctive structural and functional properties of HTLV Tax proteins. *Front Microbiol* 4:271.
- Rosen, C. A., R. Park, J. G. Sodroski, and W. A. Haseltine. 1987. Multiple sequence elements are required for regulation of human T-cell leukemia virus gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:4919-4923.
- Rosenblatt, J. D., P. Tomkins, M. Rosenthal, A. Kacena, G. Chan, R. Valderama, W. Harrington, Jr., E. Saxton, A. Diagne, J. Q. Zhao, and et al. 1992. Progressive spastic myelopathy in a patient co-infected with HIV-1 and HTLV-II: autoantibodies to the human homologue of rig in blood and cerebrospinal fluid. *AIDS* 6 (10):1151-1158.
- Rosin, O., C. Koch, I. Schmitt, O. J. Semmes, K. T. Jeang, and R. Grassmann. 1998. A human T-cell leukemia virus Tax variant incapable of activating NF-kappaB retains its immortalizing potential for primary T-lymphocytes. *J Biol Chem* 273 (12):6698-6703.
- Roucoux, D. F., and E. L. Murphy. 2004. The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. *AIDS Rev* 6 (3):144-154.
- Roucoux, D. F., B. Wang, D. Smith, C. C. Nass, J. Smith, S. T. Hutching, B. Newman, T. H. Lee, D. M. Chafets, E. L. Murphy, and H. O. S. Investigators. 2005. A prospective study of sexual transmission of human T lymphotropic virus (HTLV)-I and HTLV-II. *J Infect Dis* 191 (9):1490-1497.
- Rowan, A. G., and C. R. Bangham. 2012. Is There a Role for HTLV-1-Specific CTL in Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma? *Leuk Res Treatment* 2012:391953.

- Rowland, R. R., P. Schneider, Y. Fang, S. Wootton, D. Yoo, and D. A. Benfield. 2003. Peptide domains involved in the localization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus nucleocapsid protein to the nucleolus. *Virology* 316 (1):135-145.
- Ruben, S., A. Perkins, R. Purcell, K. Joung, R. Sia, R. Burghoff, W. A. Haseltine, and C. A. Rosen. 1989. Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol* 63 (1):1-8.
- Rubenstein, J. L., J. F. Nicolas, and F. Jacob. 1984. [Nonsense RNA: a tool for specifically inhibiting the expression of a gene in vivo]. *C R Acad Sci III* 299 (8):271-274.
- Ryabov, E. V., S. H. Kim, and M. Taliansky. 2004. Identification of a nuclear localization signal and nuclear export signal of the umbraviral long-distance RNA movement protein. *J Gen Virol* 85 (Pt 5):1329-1333.
- Saayman, S., A. Ackley, A. M. Turner, M. Famiglietti, A. Bosque, M. Clemson, V. Planelles, and K. V. Morris. 2014. An HIV-encoded antisense long noncoding RNA epigenetically regulates viral transcription. *Mol Ther* 22 (6):1164-1175.
- Saito, M., T. Matsuzaki, Y. Satou, J. Yasunaga, K. Saito, K. Arimura, M. Matsuoka, and Y. Ohara. 2009. In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *Retrovirology* 6:19.
- Saksena, N. K., M. P. Sherman, R. Yanagihara, D. K. Dube, and B. J. Poiesz. 1992. LTR sequence and phylogenetic analyses of a newly discovered variant of HTLV-I isolated from the Hagahai of Papua New Guinea. *Virology* 189 (1):1-9.
- Samad, M. A., M. Okuwaki, H. Haruki, and K. Nagata. 2007. Physical and functional interaction between a nucleolar protein nucleophosmin/B23 and adenovirus basic core proteins. *FEBS Lett* 581 (17):3283-3288.
- Sassone-Corsi, P. 1988. Cyclic AMP induction of early adenovirus promoters involves sequences required for E1A trans-activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (19):7192-7196.
- Sassone-Corsi, P., L. J. Ransome, W. W. Lamph, and I. M. Verma. 1988. Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the 'leucine zipper' domain. *Nature* 336:692-695.
- Satou, Y., A. Utsunomiya, J. Tanabe, M. Nakagawa, K. Nosaka, and M. Matsuoka. 2012. HTLV-1 modulates the frequency and phenotype of FoxP3+CD4+ T cells in virus-infected individuals. *Retrovirology* 9:46.
- Satou, Y., J. Yasunaga, M. Yoshida, and M. Matsuoka. 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 (3):720-725.
- Satou, Y., J. Yasunaga, T. Zhao, M. Yoshida, P. Miyazato, K. Takai, K. Shimizu, K. Ohshima, P. L. Green, N. Ohkura, T. Yamaguchi, M. Ono, S. Sakaguchi, and M. Matsuoka. 2011. HTLV-1 bZIP factor induces T-cell lymphoma and systemic inflammation in vivo. *PLoS Pathog* 7 (2):e1001274.
- Savkur, R. S., and M. O. Olson. 1998. Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res* 26 (19):4508-4515.
- Scheer, U., and D. Weisenberger. 1994. The nucleolus. *Curr Opin Cell Biol* 6 (3):354-359.
- Schelcher, C., S. Al Mehairi, E. Verrall, Q. Hope, K. Flower, B. Bromley, D. N. Woolfson, M. J. West, and A. J. Sinclair. 2007. Atypical bZIP domain of viral transcription factor

- contributes to stability of dimer formation and transcriptional function. *J Virol* 81 (13):7149-7155.
- Schmitt, I., O. Rosin, P. Rohwer, M. Gossen, and R. Grassmann. 1998. Stimulation of cyclin-dependent kinase activity and G1- to S-phase transition in human lymphocytes by the human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 Tax protein. *J Virol* 72 (1):633-640.
- Scott, M. S., F. M. Boisvert, M. D. McDowall, A. I. Lamond, and G. J. Barton. 2010. Characterization and prediction of protein nucleolar localization sequences. *Nucleic Acids Res* 38 (21):7388-7399.
- Seiki, M., S. Hattori, Y. Hirayama, and M. Yoshida. 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 (12):3618-3622.
- Seiki, M., S. Hattori, and M. Yoshida. 1982. Human adult T-cell leukemia virus: molecular cloning of the provirus DNA and the unique terminal structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79 (22):6899-6902.
- Seiki, M., A. Hikikoshi, and M. Yoshida. 1990. The U5 sequence is a cis-acting repressive element for genomic RNA expression of human T cell leukemia virus type I. *Virology* 176 (1):81-86.
- Sharp, P. M., and B. H. Hahn. 2011. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1 (1):a006841.
- Shaulian, E., and M. Karin. 2001. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20 (19):2390-2400.
- Sherman, M. P., N. K. Saksena, D. K. Dube, R. Yanagihara, and B. J. Poiesz. 1992. Evolutionary insights on the origin of human T-cell lymphoma/leukemia virus type I (HTLV-I) derived from sequence analysis of a new HTLV-I variant from Papua New Guinea. *J Virol* 66 (4):2556-2563.
- Shields, L. B., C. Gercel-Taylor, C. M. Yashar, T. C. Wan, W. A. Katsanis, J. A. Spinnato, and D. D. Taylor. 1997. Induction of immune responses to ovarian tumor antigens by multiparity. *J Soc Gynecol Investig* 4 (6):298-304.
- Shimakami, T., M. Honda, T. Kusakawa, T. Murata, K. Shimotohno, S. Kaneko, and S. Murakami. 2006. Effect of hepatitis C virus (HCV) NS5B-nucleolin interaction on HCV replication with HCV subgenomic replicon. *J Virol* 80 (7):3332-3340.
- Shimoda, A., F. Sugata, H. S. Chen, R. H. Miller, and R. H. Purcell. 1998. Evidence for a bidirectional promoter complex within the X gene of woodchuck hepatitis virus. *Virus Res* 56 (1):25-39.
- Shimotohno, K., M. Takano, T. Teruuchi, and M. Miwa. 1986. Requirement of multiple copies of a 21-nucleotide sequence in the U3 regions of human T-cell leukemia virus type I and type II long terminal repeats for trans-acting activation of transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (21):8112-8116.
- Shoji, T., M. Higuchi, R. Kondo, M. Takahashi, M. Oie, Y. Tanaka, Y. Aoyagi, and M. Fujii. 2009. Identification of a novel motif responsible for the distinctive transforming activity of human T-cell leukemia virus (HTLV) type 1 Tax1 protein from HTLV-2 Tax2. *Retrovirology* 6:83.
- Sinha-Datta, U., A. Datta, S. Ghorbel, M. D. Dodon, and C. Nicot. 2007. Human T-cell lymphotropic virus type I rex and p30 interactions govern the switch between virus latency and replication. *J Biol Chem* 282 (19):14608-14615.

- Sintasath, D. M., N. D. Wolfe, M. Lebreton, H. Jia, A. D. Garcia, J. Le Doux-Diffo, U. Tamoufe, J. K. Carr, T. M. Folks, E. Mpoudi-Ngole, D. S. Burke, W. Heneine, and W. M. Switzer. 2009a. Simian T-lymphotropic virus diversity among nonhuman primates, Cameroon. *Emerg Infect Dis* 15 (2):175-184.
- Sintasath, D. M., N. D. Wolfe, H. Q. Zheng, M. LeBreton, M. Peeters, U. Tamoufe, C. F. Djoko, J. L. Diffo, E. Mpoudi-Ngole, W. Heneine, and W. M. Switzer. 2009b. Genetic characterization of the complete genome of a highly divergent simian T-lymphotropic virus (STLV) type 3 from a wild Cercopithecus mona monkey. *Retrovirology* 6:97.
- Siomi, H., H. Shida, M. Maki, and M. Hatanaka. 1990. Effects of a highly basic region of human immunodeficiency virus Tat protein on nucleolar localization. *J Virol* 64 (4):1803-1807.
- Sirri, V., P. Roussel, and D. Hernandez-Verdun. 2000. The AgNOR proteins: qualitative and quantitative changes during the cell cycle. *Micron* 31 (2):121-126.
- Slattery, J. P., G. Franchini, and A. Gessain. 1999. Genomic evolution, patterns of global dissemination, and interspecies transmission of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic viruses. *Genome Res* 9 (6):525-540.
- Spector, D. L., R. L. Ochs, and H. Busch. 1984. Silver staining, immunofluorescence, and immunoelectron microscopic localization of nucleolar phosphoproteins B23 and C23. *Chromosoma* 90 (2):139-148.
- Staal, F. J., and H. C. Clevers. 2005. WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation. *Nat Rev Immunol* 5 (1):21-30.
- Stevens, J. G., E. K. Wagner, G. B. Devi-Rao, M. L. Cook, and L. T. Feldman. 1987. RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *Science* 235 (4792):1056-1059.
- Stewart, M. 2007. Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8 (3):195-208.
- Storck, S., M. Thiry, and P. Bouvet. 2009. Conditional knockout of nucleolin in DT40 cells reveals the functional redundancy of its RNA-binding domains. *Biol Cell* 101 (3):153-167.
- Subong, E. N., M. J. Shue, J. I. Epstein, J. V. Briggman, P. K. Chan, and A. W. Partin. 1999. Monoclonal antibody to prostate cancer nuclear matrix protein (PRO:4-216) recognizes nucleophosmin/B23. *Prostate* 39 (4):298-304.
- Suemori, K., H. Fujiwara, T. Ochi, T. Ogawa, M. Matsuoka, T. Matsumoto, J. M. Mesnard, and M. Yasukawa. 2009. HBZ is an immunogenic protein, but not a target antigen for human T-cell leukemia virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Gen Virol* 90 (Pt 8):1806-1811.
- Sugata, K., Y. Satou, J. Yasunaga, H. Hara, K. Ohshima, A. Utsunomiya, M. Mitsuyama, and M. Matsuoka. 2012. HTLV-1 bZIP factor impairs cell-mediated immunity by suppressing production of Th1 cytokines. *Blood* 119 (2):434-444.
- Suzuki, T., H. Hirai, J. Fujisawa, T. Fujita, and M. Yoshida. 1993. A trans-activator Tax of human T-cell leukemia virus type 1 binds to NF-kappa B p50 and serum response factor (SRF) and associates with enhancer DNAs of the NF-kappa B site and CARG box. *Oncogene* 8 (9):2391-2397.
- Suzuki, T., Y. Ohsugi, M. Uchida-Toita, T. Akiyama, and M. Yoshida. 1999. Tax oncoprotein of HTLV-1 binds to the human homologue of Drosophila discs large tumor suppressor

- protein, hDLG, and perturbs its function in cell growth control. *Oncogene* 18 (44):5967-5972.
- Switzer, W. M., I. Hewlett, L. Aaron, N. D. Wolfe, D. S. Burke, and W. Heneine. 2006a. Serologic testing for human T-lymphotropic virus-3 and -4. *Transfusion* 46 (9):1647-1648.
- Switzer, W. M., S. H. Qari, N. D. Wolfe, D. S. Burke, T. M. Folks, and W. Heneine. 2006b. Ancient origin and molecular features of the novel human T-lymphotropic virus type 3 revealed by complete genome analysis. *J Virol* 80 (15):7427-7438.
- Switzer, W. M., M. Salemi, S. H. Qari, H. Jia, R. R. Gray, A. Katzourakis, S. J. Marriott, K. N. Pryor, N. D. Wolfe, D. S. Burke, T. M. Folks, and W. Heneine. 2009. Ancient, independent evolution and distinct molecular features of the novel human T-lymphotropic virus type 4. *Retrovirology* 6:9.
- Sze, A., S. M. Belgnaoui, D. Olganier, R. Lin, J. Hiscott, and J. van Grevenynghe. 2013. Host restriction factor SAMHD1 limits human T cell leukemia virus type 1 infection of monocytes via STING-mediated apoptosis. *Cell Host Microbe* 14 (4):422-434.
- Szebeni, A., J. E. Herrera, and M. O. Olson. 1995. Interaction of nucleolar protein B23 with peptides related to nuclear localization signals. *Biochemistry* 34 (25):8037-8042.
- Szebeni, A., B. Mehrotra, A. Baumann, S. A. Adam, P. T. Wingfield, and M. O. Olson. 1997. Nucleolar protein B23 stimulates nuclear import of the HIV-1 Rev protein and NLS-conjugated albumin. *Biochemistry* 36 (13):3941-3949.
- Szebeni, A., and M. O. Olson. 1999. Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci* 8 (4):905-912.
- Tabakin-Fix, Y., I. Azran, Y. Schavinsky-Khrapunsky, O. Levy, and M. Aboud. 2006. Functional inactivation of p53 by human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein: mechanisms and clinical implications. *Carcinogenesis* 27 (4):673-681.
- Tagieva, N. E., and C. Vaquero. 1997. Expression of naturally occurring antisense RNA inhibits human immunodeficiency virus type 1 heterologous strain replication. *J Gen Virol* 78 (Pt 10):2503-2511.
- Tajrish, M. M., R. Tuteja, and N. Tuteja. 2011. Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Commun Integr Biol* 4 (3):267-275.
- Takakura, M., S. Kyo, M. Inoue, W. E. Wright, and J. W. Shay. 2005. Function of AP-1 in transcription of the telomerase reverse transcriptase gene (TERT) in human and mouse cells. *Mol Cell Biol* 25 (18):8037-8043.
- Takeda, S., M. Maeda, S. Morikawa, Y. Taniguchi, J. Yasunaga, K. Nosaka, Y. Tanaka, and M. Matsuoka. 2004. Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int J Cancer* 109 (4):559-567.
- Takemoto, S., R. Trovato, A. Cereseto, C. Nicot, T. Kislyakova, L. Casareto, T. Waldmann, G. Torelli, and G. Franchini. 2000. p53 stabilization and functional impairment in the absence of genetic mutation or the alteration of the p14(ARF)-MDM2 loop in ex vivo and cultured adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *Blood* 95 (12):3939-3944.
- Tamiya, S., M. Matsuoka, K. Etoh, T. Watanabe, S. Kamihira, K. Yamaguchi, and K. Takatsuki. 1996. Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia. *Blood* 88 (8):3065-3073.
- Tamura, K. 1996. [Clinical classification of adult T-cell leukemia and its complications]. *Rinsho Byori* 44 (1):19-23.

- Tan, K. P., K. N. Shih, and S. J. Lo. 2004. Ser-123 of the large antigen of hepatitis delta virus modulates its cellular localization to the nucleolus, SC-35 speckles or the cytoplasm. *J Gen Virol* 85 (Pt 6):1685-1694.
- Tayyari, F., D. Marchant, T. J. Moraes, W. Duan, P. Mastrangelo, and R. G. Hegele. 2011. Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nat Med* 17 (9):1132-1135.
- Temin, H. M. 1991. Sex and recombination in retroviruses. *Trends Genet* 7 (3):71-74.
- Thébault, S., J. Basbous, P. Hivin, C. Devaux, and J. M. Mesnard. 2004. HBZ interacts with JunD and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett* 562 (1-3):165-170.
- Thomas, A., R. Perzova, L. Abbott, P. Benz, M. J. Poiesz, S. Dube, T. Loughran, J. Ferrer, W. Sheremata, J. Glaser, M. Leon-Ponte, and B. J. Poiesz. 2010. LGL Leukemia and HTLV. *AIDS Res Hum Retroviruses* 26 (1):33-40.
- Thongtan, T., N. Wikan, P. Wintachai, C. Rattanasungsan, C. Srisomsap, P. Cheepsunthorn, and D. R. Smith. 2012. Characterization of putative Japanese encephalitis virus receptor molecules on microglial cells. *J Med Virol* 84 (4):615-623.
- Thornton, A. M., P. E. Korty, D. Q. Tran, E. A. Wohlfert, P. E. Murray, Y. Belkaid, and E. M. Shevach. 2010. Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 184 (7):3433-3441.
- Tillmann, M., and B. Wigdahl. 1994. Identification of HTLV-I 21 bp repeat-specific DNA-protein complexes. *Leukemia* 8 Suppl 1:S83-87.
- Timani, K. A., Q. Liao, L. Ye, Y. Zeng, J. Liu, Y. Zheng, L. Ye, X. Yang, K. Lingbao, J. Gao, and Y. Zhu. 2005. Nuclear/nucleolar localization properties of C-terminal nucleocapsid protein of SARS coronavirus. *Virus Res* 114 (1-2):23-34.
- Torresilla, C., E. Larocque, S. Landry, M. Halin, Y. Coulombe, J. Y. Masson, J. M. Mesnard, and B. Barbeau. 2013. Detection of the HIV-1 minus-strand-encoded antisense protein and its association with autophagy. *J Virol* 87 (9):5089-5105.
- Tosswill, J. H., G. P. Taylor, J. P. Clewley, and J. N. Weber. 1998. Quantification of proviral DNA load in human T-cell leukaemia virus type I infections. *J Virol Methods* 75 (1):21-26.
- Toulza, F., A. Heaps, Y. Tanaka, G. P. Taylor, and C. R. Bangham. 2008. High frequency of CD4+FoxP3+ cells in HTLV-1 infection: inverse correlation with HTLV-1-specific CTL response. *Blood* 111 (10):5047-5053.
- Toyoshima, H., M. Itoh, J. Inoue, M. Seiki, F. Takaku, and M. Yoshida. 1990. Secondary structure of the human T-cell leukemia virus type 1 rex-responsive element is essential for rex regulation of RNA processing and transport of unspliced RNAs. *J Virol* 64 (6):2825-2832.
- Trinkle-Mulcahy, L., S. Boulon, Y. W. Lam, R. Urcia, F. M. Boisvert, F. Vandermoere, N. A. Morrice, S. Swift, U. Rothbauer, H. Leonhardt, and A. Lamond. 2008. Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *J Cell Biol* 183 (2):223-239.
- Trinklein, N. D., S. F. Aldred, S. J. Hartman, D. I. Schroeder, R. P. O'tillar, and R. M. Myers. 2004. An abundance of bidirectional promoters in the human genome. *Genome Res* 14 (1):62-66.
- Tsai, R. Y., and T. Pederson. 2014. Connecting the nucleolus to the cell cycle and human disease. *FASEB J* 28 (8):3290-3296.

- Tsubata, C., M. Higuchi, M. Takahashi, M. Oie, Y. Tanaka, F. Gejyo, and M. Fujii. 2005. PDZ domain-binding motif of human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein is essential for the interleukin 2 independent growth induction of a T-cell line. *Retrovirology* 2:46.
- Tsui, K. H., A. J. Cheng, P. Chang, T. L. Pan, and B. Y. Yung. 2004. Association of nucleophosmin/B23 mRNA expression with clinical outcome in patients with bladder carcinoma. *Urology* 64 (4):839-844.
- Tsukahara, F., and Y. Maru. 2004. Identification of novel nuclear export and nuclear localization-related signals in human heat shock cognate protein 70. *J Biol Chem* 279 (10):8867-8872.
- Tsukasaki, K., O. Hermine, A. Bazarbachi, L. Ratner, J. C. Ramos, W. Harrington, Jr., D. O'Mahony, J. E. Janik, A. L. Bittencourt, G. P. Taylor, K. Yamaguchi, A. Utsunomiya, K. Tobinai, and T. Watanabe. 2009. Definition, prognostic factors, treatment, and response criteria of adult T-cell leukemia-lymphoma: a proposal from an international consensus meeting. *J Clin Oncol* 27 (3):453-459.
- Tsukasaki, K., S. Tanosaki, S. DeVos, W. K. Hofmann, W. Wachsmann, A. F. Gombart, J. Krebs, A. Jauch, C. R. Bartram, K. Nagai, M. Tomonaga, J. W. Said, and H. P. Koefler. 2004. Identifying progression-associated genes in adult T-cell leukemia/lymphoma by using oligonucleotide microarrays. *Int J Cancer* 109 (6):875-881.
- Tsukasaki, K., and K. Tobinai. 2013. Biology and treatment of HTLV-1 associated T-cell lymphomas. *Best Pract Res Clin Haematol* 26 (1):3-14.
- Tsukasaki, K., H. Tsushima, M. Yamamura, T. Hata, K. Murata, T. Maeda, S. Atogami, H. Sohda, S. Momita, S. Ideda, S. Katamine, Y. Yamada, S. Kamihira, and M. Tomonaga. 1997. Integration patterns of HTLV-I provirus in relation to the clinical course of ATL: frequent clonal change at crisis from indolent disease. *Blood* 89 (3):948-956.
- Tsukasaki, K., A. Utsunomiya, H. Fukuda, T. Shibata, T. Fukushima, Y. Takatsuka, S. Ikeda, M. Masuda, H. Nagoshi, R. Ueda, K. Tamura, M. Sano, S. Momita, K. Yamaguchi, F. Kawano, S. Hanada, K. Tobinai, M. Shimoyama, T. Hotta, M. Tomonaga, and J. Japan Clinical Oncology Group Study. 2007. VCAP-AMP-VECP compared with biweekly CHOP for adult T-cell leukemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG9801. *J Clin Oncol* 25 (34):5458-5464.
- Turpin, J., C. Journo, N. L. Ko, F. Sinet, A. Carpentier, A. Galioot, D. Edwards, A. M. Vandamme, L. Gazzolo, M. D. Dodon, A. Gessain, F. Kashanchi, I. Balansard, R. Lacoste, and R. Mahieux. 2014. Discovery and characterization of auxiliary proteins encoded by Simian T-cell Lymphotropic Viruses type 3. *J Virol*.
- Twyffels, L., C. Gueydan, and V. Kruys. 2014. Transportin-1 and Transportin-2: protein nuclear import and beyond. *FEBS Lett* 588 (10):1857-1868.
- Uchida, N., T. Otsuka, F. Arima, H. Shigematsu, T. Fukuyama, M. Maeda, Y. Sugio, Y. Itoh, and Y. Niho. 1999. Correlation of telomerase activity with development and progression of adult T-cell leukemia. *Leuk Res* 23 (3):311-316.
- Uchiyama, T. 1997. Human T cell Leukemia Virus type I (HTLV-I) and human diseases. *Annu. Rev. Immunol.* 15:15-37.
- Uesaka, M., O. Nishimura, Y. Go, K. Nakashima, K. Agata, and T. Imamura. 2014. Bidirectional promoters are the major source of gene activation-associated non-coding RNAs in mammals. *BMC Genomics* 15:35.

- Ugrinova, I., K. Monier, C. Ivaldi, M. Thiry, S. Storck, F. Mongelard, and P. Bouvet. 2007. Inactivation of nucleolin leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest and defects in centrosome duplication. *BMC Mol Biol* 8:66.
- Ureta-Vidal, A., C. Angelin-Duclos, P. Tortevoeye, E. Murphy, J. F. Lepere, R. P. Buigues, N. Jolly, M. Joubert, G. Carles, J. F. Pouliquen, G. de The, J. P. Moreau, and A. Gessain. 1999. Mother-to-child transmission of human T-cell-leukemia/lymphoma virus type I: implication of high antiviral antibody titer and high proviral load in carrier mothers. *Int J Cancer* 82 (6):832-836.
- Usui, T., K. Yanagihara, K. Tsukasaki, K. Murata, H. Hasegawa, Y. Yamada, and S. Kamihira. 2008. Characteristic expression of HTLV-1 basic zipper factor (HBZ) transcripts in HTLV-1 provirus-positive cells. *Retrovirology* 5:34.
- Utsunomiya, A., I. Choi, D. Chihara, and M. Seto. 2015. Recent advances in the treatment of adult T-cell leukemia-lymphomas. *Cancer Sci*.
- Valdez, B. C., L. Perlaky, D. Henning, Y. Saijo, P. K. Chan, and H. Busch. 1994. Identification of the nuclear and nucleolar localization signals of the protein p120. Interaction with translocation protein B23. *J Biol Chem* 269 (38):23776-23783.
- Van Dooren, S., M. Salemi, X. Pourrut, M. Peeters, E. Delaporte, M. Van Ranst, and A. M. Vandamme. 2001. Evidence for a second simian T-cell lymphotropic virus type 3 in *Cercopithecus nictitans* from Cameroon. *J Virol* 75 (23):11939-11941.
- Van Prooyen, N., V. Andresen, H. Gold, I. Bialuk, C. Pise-Masison, and G. Franchini. 2010a. Hijacking the T-cell communication network by the human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 (HTLV-1) p12 and p8 proteins. *Mol Aspects Med* 31 (5):333-343.
- Van Prooyen, N., H. Gold, V. Andresen, O. Schwartz, K. Jones, F. Ruscetti, S. Lockett, P. Gudla, D. Venzon, and G. Franchini. 2010b. Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (48):20738-20743.
- Vandamme, A. M., H. F. Liu, P. Goubau, and J. Desmyter. 1994. Primate T-lymphotropic virus type I LTR sequence variation and its phylogenetic analysis: compatibility with an African origin of PTLV-I. *Virology* 202 (1):212-223.
- Vanhee-Brossollet, C., H. Thoreau, N. Serpente, L. D'Auriol, J. P. Levy, and C. Vaquero. 1995. A natural antisense RNA derived from the HIV-1 env gene encodes a protein which is recognized by circulating antibodies of HIV+ individuals. *Virology* 206 (1):196-202.
- Vanhee-Brossollet, C., and C. Vaquero. 1998. Do natural antisense transcripts make sense in eukaryotes? *Gene* 211 (1):1-9.
- Vargas, A., J. Moreau, S. Landry, F. LeBellego, C. Toufaily, E. Rassart, J. Lafond, and B. Barbeau. 2009. Syncytin-2 plays an important role in the fusion of human trophoblast cells. *J Mol Biol* 392 (2):301-318.
- Vargas, A., J. Moreau, F. Le Bellego, J. Lafond, and B. Barbeau. 2008. Induction of trophoblast cell fusion by a protein tyrosine phosphatase inhibitor. *Placenta* 29 (2):170-174.
- Vendel, A. C., S. J. McBryant, and K. J. Lumb. 2003. KIX-mediated assembly of the CBP-CREB-HTLV-1 tax coactivator-activator complex. *Biochemistry* 42 (43):12481-12487.
- Venkatesh, L. K., S. Mohammed, and G. Chinnadurai. 1990. Functional domains of the HIV-1 rev gene required for trans-regulation and subcellular localization. *Virology* 176 (1):39-47.

- Vinson, C., A. Acharya, and E. J. Taparowsky. 2006. Deciphering B-ZIP transcription factor interactions in vitro and in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1759 (1-2):4-12.
- Waggoner, S., and P. Sarnow. 1998. Viral ribonucleoprotein complex formation and nucleolar-cytoplasmic relocalization of nucleolin in poliovirus-infected cells. *J Virol* 72 (8):6699-6709.
- Wagner, S., and M. R. Green. 1993. HTLV-1 Tax protein stimulation of DNA binding of bZIP proteins by enhancing dimerization. *Science* 262:395-399.
- Wang, L., S. Mukherjee, O. Narayan, and L. J. Zhao. 1996. Characterization of a leucine-zipper-like domain in Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1. *Gene* 178 (1-2):7-13.
- Watanabe, M., M. Muramatsu, H. Hirai, T. Suzuki, J. Fujisawa, M. Yoshida, K. Arai, and N. Arai. 1993. HTLV-I encoded Tax in association with NF-kappa B precursor p105 enhances nuclear localization of NF-kappa B p50 and p65 in transfected cells. *Oncogene* 8 (11):2949-2958.
- Watanabe, T., M. Seiki, Y. Hirayama, and M. Yoshida. 1986. Human T-cell leukemia virus type I is a member of the African subtype of simian viruses (STLV). *Virology* 148 (2):385-388.
- Wei, X., S. K. Ghosh, M. E. Taylor, V. A. Johnson, E. A. Emini, P. Deutsch, J. D. Lifson, S. Bonhoeffer, M. A. Nowak, B. H. Hahn, M. S. Saag, and G. M. Shaw. 1995. Viral dynamics in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Nature* 373:117-122.
- Wente, S. R., and M. P. Rout. 2010. The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2 (10):a000562.
- Wessner, R., M. Tillmann-Bogush, and B. Wigdahl. 1995. Characterization of a glial cell-specific DNA-protein complex formed with the human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) enhancer. *J Neurovirol* 1 (1):62-77.
- Wessner, R., and B. Wigdahl. 1997. AP-1 derived from mature monocytes and astrocytes preferentially interacts with the HTLV-I promoter central 21 bp repeat. *Leukemia* 11 Suppl 3:21-24.
- Wessner, R., J. Yao, and B. Wigdahl. 1997. Sp family members preferentially interact with the promoter proximal repeat within the HTLV-I enhancer. *Leukemia* 11 Suppl 3:10-13.
- Winter, H. Y., T. Dayaram, and S. J. Marriott. 2007. Activation of the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat by the ternary complex factor Elk-1. *J Virol* 81 (23):13075-13081.
- Winter, H. Y., and S. J. Marriott. 2007. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax enhances serum response factor DNA binding and alters site selection. *J Virol* 81 (11):6089-6098.
- Wolfe, N. D., W. Heneine, J. K. Carr, A. D. Garcia, V. Shanmugam, U. Tamoufe, J. N. Torimiro, A. T. Prosser, M. Lebreton, E. Mpoudi-Ngole, F. E. McCutchan, D. L. Birx, T. M. Folks, D. S. Burke, and W. M. Switzer. 2005. Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (22):7994-7999.
- Xiao, G., M. E. Cvijic, A. Fong, E. W. Harhaj, M. T. Uhlik, M. Waterfield, and S. C. Sun. 2001. Retroviral oncoprotein Tax induces processing of NF-kappaB2/p100 in T cells: evidence for the involvement of IKKalpha. *EMBO J* 20 (23):6805-6815.

- Xiao, X., Y. Feng, Z. Zhu, and D. S. Dimitrov. 2011. Identification of a putative Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry factor. *Biochem Biophys Res Commun* 411 (2):253-258.
- Xu, Y., and D. Ganem. Making sense of antisense: seemingly noncoding RNAs antisense to the master regulator of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic replication do not regulate that transcript but serve as mRNAs encoding small peptides. *J Virol* 84 (11):5465-5475.
- Yamamoto, K., A. Utsunomiya, K. Tobinai, K. Tsukasaki, N. Uike, K. Uozumi, K. Yamaguchi, Y. Yamada, S. Hanada, K. Tamura, S. Nakamura, H. Inagaki, K. Ohshima, H. Kiyoi, T. Ishida, K. Matsushima, S. Akinaga, M. Ogura, M. Tomonaga, and R. Ueda. 2010. Phase I study of KW-0761, a defucosylated humanized anti-CCR4 antibody, in relapsed patients with adult T-cell leukemia-lymphoma and peripheral T-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 28 (9):1591-1598.
- Yamamoto-Taguchi, N., Y. Satou, P. Miyazato, K. Ohshima, M. Nakagawa, K. Katagiri, T. Kinashi, and M. Matsuoka. 2013. HTLV-1 bZIP factor induces inflammation through labile Foxp3 expression. *PLoS Pathog* 9 (9):e1003630.
- Yamano, Y., N. Araya, T. Sato, A. Utsunomiya, K. Azakami, D. Hasegawa, T. Izumi, H. Fujita, S. Aratani, N. Yagishita, R. Fujii, K. Nishioka, S. Jacobson, and T. Nakajima. 2009. Abnormally high levels of virus-infected IFN-gamma+ CCR4+ CD4+ CD25+ T cells in a retrovirus-associated neuroinflammatory disorder. *PLoS One* 4 (8):e6517.
- Yamano, Y., C. J. Cohen, N. Takenouchi, K. Yao, U. Tomaru, H. C. Li, Y. Reiter, and S. Jacobson. 2004. Increased expression of human T lymphocyte virus type I (HTLV-I) Tax11-19 peptide-human histocompatibility leukocyte antigen A*201 complexes on CD4+ CD25+ T Cells detected by peptide-specific, major histocompatibility complex-restricted antibodies in patients with HTLV-I-associated neurologic disease. *J Exp Med* 199 (10):1367-1377.
- Yamaoka, S., H. Inoue, M. Sakurai, T. Sugiyama, M. Hazama, T. Yamada, and M. Hatanaka. 1996. Constitutive activation of NF-kB is essential for transformation of rat fibroblasts by the HTLV-I Tax protein. *EMBO J.* 15:873-887.
- Yang, J. M., S. J. Baserga, S. J. Turley, and K. M. Pollard. 2001. Fibrillarin and other snoRNP proteins are targets of autoantibodies in xenobiotic-induced autoimmunity. *Clin Immunol* 101 (1):38-50.
- Ye, J., L. Silverman, M. D. Lairmore, and P. L. Green. 2003. HTLV-1 Rex is required for viral spread and persistence in vivo but is dispensable for cellular immortalization in vitro. *Blood* 102 (12):3963-3969.
- Yin, H., P. Kannian, N. Dissinger, R. Haines, S. Niewiesk, and P. L. Green. 2012. Human T-cell leukemia virus type 2 antisense viral protein 2 is dispensable for in vitro immortalization but functions to repress early virus replication in vivo. *J Virol* 86 (16):8412-8421.
- Yin, M. J., L. B. Christerson, Y. Yamamoto, Y. T. Kwak, S. Xu, F. Mercurio, M. Barbosa, M. H. Cobb, and R. B. Gaynor. 1998. HTLV-I Tax protein binds to MEKK1 to stimulate IkkappaB kinase activity and NF-kappaB activation. *Cell* 93 (5):875-884.
- Yoneda-Kato, N., A. T. Look, M. N. Kirstein, M. B. Valentine, S. C. Raimondi, K. J. Cohen, A. J. Carroll, and S. W. Morris. 1996. The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1. *Oncogene* 12 (2):265-275.

- Yoshida, A., M. Miyaura, A. Sakurai, T. Fukumori, M. Fujita, H. Akari, and A. Adachi. 2000. MHC-I expression in HTLV-1-positive and -negative cells. *Int J Mol Med* 6 (1):83-86.
- Yoshida, M., I. Miyoshi, and Y. Hinuma. 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. USA* 79:2031-2035.
- Yoshida, M., Y. Satou, J. Yasunaga, J. Fujisawa, and M. Matsuoka. 2008. Transcriptional control of spliced and unspliced human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ) gene. *J Virol* 82 (19):9359-9368.
- Yoshida, M., M. Seiki, K. Yamaguchi, and K. Takatsuki. 1984. Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia virus in the disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 (8):2534-2537.
- Yoshie, O., R. Fujisawa, T. Nakayama, H. Harasawa, H. Tago, D. Izawa, K. Hieshima, Y. Tatsumi, K. Matsushima, H. Hasegawa, A. Kanamaru, S. Kamihira, and Y. Yamada. 2002. Frequent expression of CCR4 in adult T-cell leukemia and human T-cell leukemia virus type 1-transformed T cells. *Blood* 99 (5):1505-1511.
- You, J., B. K. Dove, L. Enjuanes, M. L. DeDiego, E. Alvarez, G. Howell, P. Heinen, M. Zambon, and J. A. Hiscox. 2005. Subcellular localization of the severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein. *J Gen Virol* 86 (Pt 12):3303-3310.
- Younis, I., and P. L. Green. 2005. The human T-cell leukemia virus Rex protein. *Front Biosci* 10:431-445.
- Yung, B. Y. 2007. Oncogenic role of nucleophosmin/B23. *Chang Gung Med J* 30 (4):285-293.
- Yung, B. Y., and P. K. Chan. 1987. Identification and characterization of a hexameric form of nucleolar phosphoprotein B23. *Biochim Biophys Acta* 925 (1):74-82.
- Zane, L., D. Sibon, F. Mortreux, and E. Wattel. 2009. Clonal expansion of HTLV-1 infected cells depends on the CD4 versus CD8 phenotype. *Front Biosci (Landmark Ed)* 14:3935-3941.
- Zhang, W., J. W. Nisbet, B. Albrecht, W. Ding, F. Kashanchi, J. T. Bartoe, and M. D. Lairmore. 2001. Human T-lymphotropic virus type 1 p30(II) regulates gene transcription by binding CREB binding protein/p300. *J Virol* 75 (20):9885-9895.
- Zhao, L. J., and C. Z. Giam. 1992. Human T-cell Lymphotropic Virus type I (HTLV-1) transcriptional activator, Tax, enhances binding to HTLV-I 21-base-pair repeats by protein-protein interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7070-7074.
- Zhao, T., Y. Satou, and M. Matsuoka. 2014. Development of T cell lymphoma in HTLV-1 bZIP factor and Tax double transgenic mice. *Arch Virol* 159 (7):1849-1856.
- Zhao, T., Y. Satou, K. Sugata, P. Miyazato, P. L. Green, T. Imamura, and M. Matsuoka. 2011. HTLV-1 bZIP factor enhances TGF-beta signaling through p300 coactivator. *Blood* 118 (7):1865-1876.
- Zhao, T., J. Yasunaga, Y. Satou, M. Nakao, M. Takahashi, M. Fujii, and M. Matsuoka. 2009. Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF-kappaB. *Blood* 113 (12):2755-2764.
- Zheng, H., N. D. Wolfe, D. M. Sintasath, U. Tamoufe, M. Lebreton, C. F. Djoko, D. Dikko, B. L. Pike, W. Heneine, and W. M. Switzer. 2010. Emergence of a novel and highly divergent HTLV-3 in a primate hunter in Cameroon. *Virology* 401 (2):137-145.

Zhi, H., L. Yang, Y. L. Kuo, Y. K. Ho, H. M. Shih, and C. Z. Giam. 2011. NF-kappaB hyperactivation by HTLV-1 tax induces cellular senescence, but can be alleviated by the viral anti-sense protein HBZ. *PLoS Pathog* 7 (4):e1002025.

Annexe

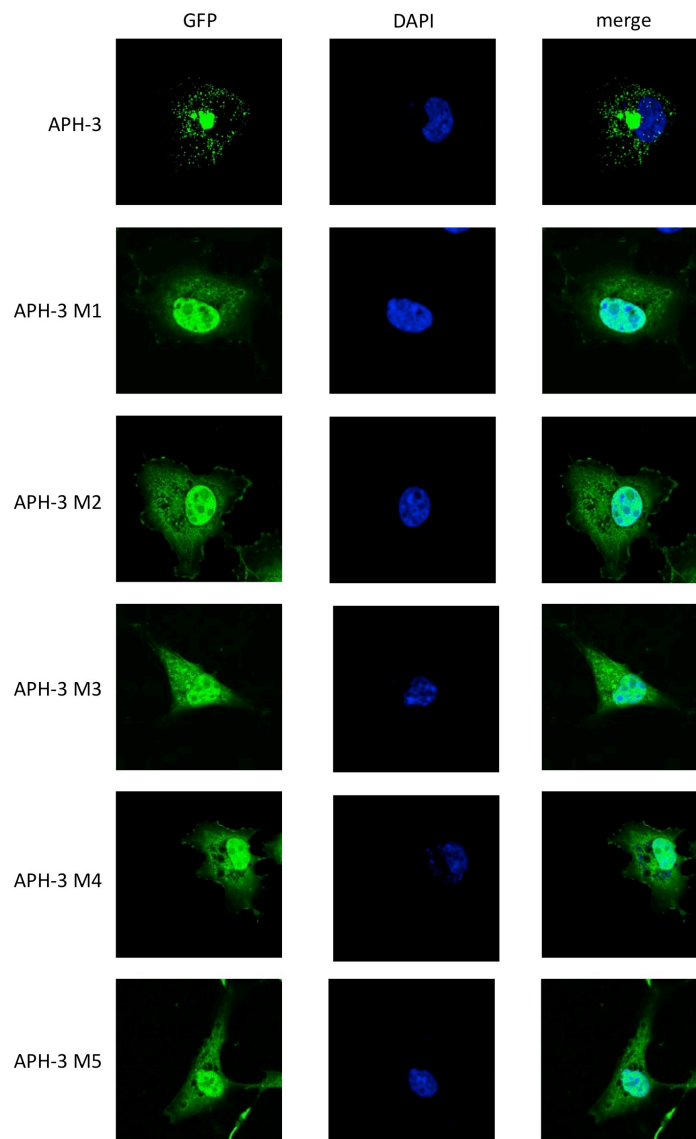


Figure 1. Localisation cellulaire des protéines GFP fusionnées avec un fragment de APH-3. Les cellules COS-7 ont été cultivées sur des lamelles et transfectées avec les plasmides pEGFP, pEGFP-APH-3 M1, pEGFP-APH-3 M2, pEGFP-APH-3 M3, pEGFP-APH-3 M4 ou pEGFP-APH-3 M5. Les cellules ont été fixées avec PFA 4% et perméabilisées avec du triton 0,5%. Les noyaux ont ensuite été colorés au DAPI. Les échantillons ont été observés avec un objectif 60x et avec une ouverture numérique de 1.4 avec un confocal laser Nikon A1. Les signaux fusionnés sont présentés dans les panneaux de droite.

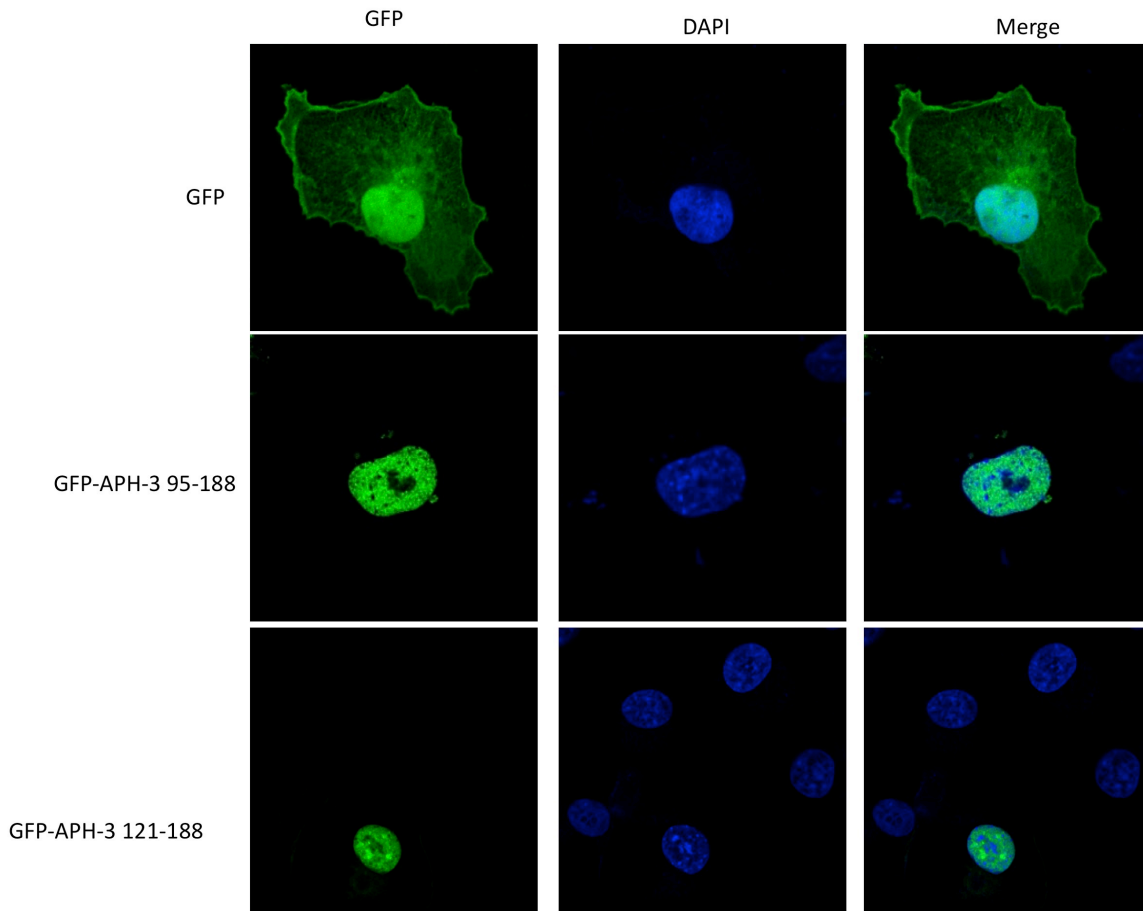


Figure 2. Localisation cellulaire des protéines GFP fusionnées avec un double fragment de APH-3. Les cellules COS-7 ont été cultivées sur des lamelles et transfectées avec les plasmides pEGFP, pEGFP-APH-3 95-188 ou pEGFP-APH-3 121-188. Les cellules ont été fixées avec PFA 4% et perméabilisées avec du triton 0,5%. Les noyaux ont ensuite été colorés au DAPI. Les échantillons ont été observés avec un objectif 60x et avec une ouverture numérique de 1.4 avec un confocal laser Nikon A1. Les signaux fusionnés sont présentés dans les panneaux de droite.

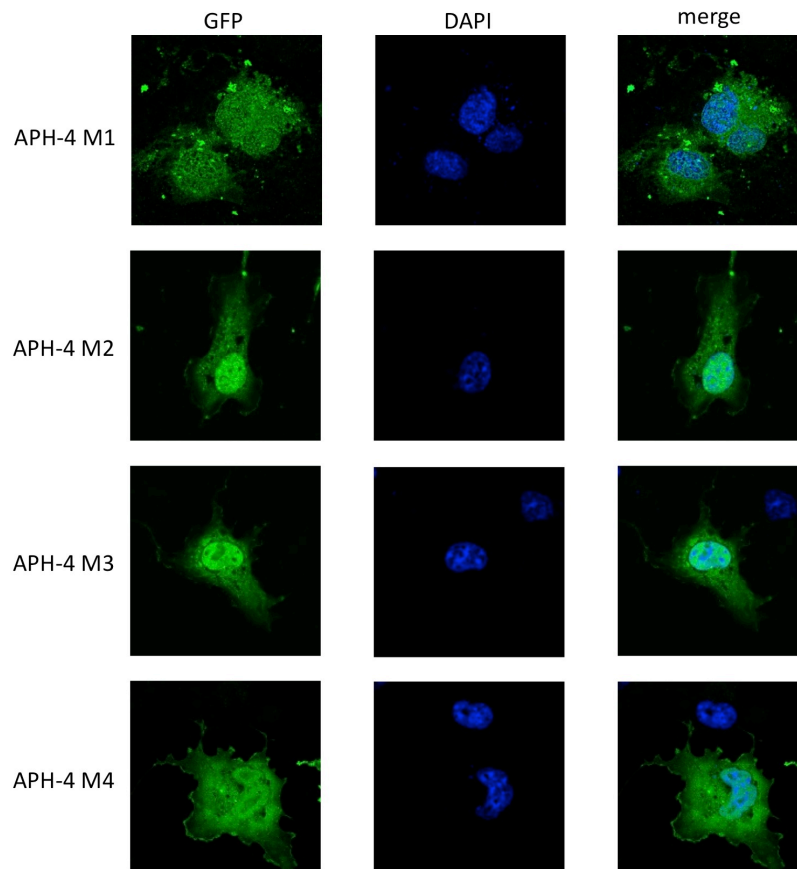


Figure 3. Localisation cellulaire des protéines GFP fusionnées avec un fragment de APH-4. Les cellules COS-7 ont été cultivées sur des lamelles et transfectées avec les plasmides pEGFP, pEGFP-APH-4 M1, pEGFP-APH-4 M2, pEGFP-APH-4 M3 ou pEGFP-APH-4 M4. Les cellules ont été fixées avec PFA 4% et perméabilisées avec du triton 0,5%. Les noyaux ont ensuite été colorés au DAPI. Les échantillons ont été observés avec un objectif 60x et avec une ouverture numérique de 1.4 avec un confocal laser Nikon A1. Les signaux fusionnés sont présentés dans les panneaux de droite.