

Carte interactomique entre l'oncoprotéine Tax du virus HTLV-1 et les protéines à domaines PDZ

Thèse présentée par **Karim BLIBEK**
en vue de l'obtention du grade de
Docteur en Sciences

Supervisé par

Pr. Jean-Claude Twizere

et **Pr. Jacques Piette**

Laboratoire de
signalisation et
d'interactions protéiques

Unité de biologie
moléculaire des maladies

Centre de recherches
GIGA



Faculté des sciences

Année académique 2017-2018

Photo de couverture : Paysages et vues panoramiques du Djurdjura. Œuvres collectives des amoureux, amis et enfants du Djurdjura. Album vues du Djurdjura. <http://amis-du-djurdjura.over-blog.com>

RÉSUMÉ

Le virus HTLV-1 (Human T-cell Leukemia Virus) est l'agent étiologique de la leucémie humaine des lymphocytes T de l'adulte (ATL) et de la paraparésie spastique tropicale (TSP). Plus de 20 millions de personnes dans le monde sont infectées par le virus HTLV-1, mais seulement environ 2 à 4 % développent les pathologies associées. A l'heure actuelle, beaucoup d'efforts sont investis dans la recherche de traitements susceptibles d'améliorer l'espérance de vie des patients infectés par le virus HTLV-1, mais la latence du génome viral (jusqu'à 40 ans) rend le dépistage précoce et le traitement des patients encore plus difficile. Afin de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de l'hôte déstabilisés par le virus HTLV-1.

Le génome du virus HTLV-1 code, entre autres, pour la protéine Tax-1 qui confère au virus son pouvoir transformant. La protéine Tax-1 est définie comme le transactivateur de l'expression du génome du virus HTLV-1 (TransActivator of pX region). Elle est aussi impliquée dans la déstabilisation de plusieurs mécanismes moléculaires conduisant à la transformation des cellules hôtes. Grâce aux nombreux domaines fonctionnels Tax établit des interactions avec un large panel de protéines cellulaires. En particulier, l'oncoprotéine Tax-1 est caractérisée par la présence à son extrémité carboxy-terminale d'un motif de quatre acides aminés reconnu par les domaines protéiques PDZ (PSD95-DLG1-ZO1). Il a été démontré que l'élimination du motif C terminal de la protéine Tax-1, conduisait à la diminution de son pouvoir oncogène *in vitro*. Les protéines contenant des domaines PDZ interviennent dans la formation des jonctions cellulaires, des synapses et dans l'assemblage de récepteurs cellulaires. Certaines d'entre elles sont capables de relayer des signaux extracellulaires et de participer au contrôle de la prolifération cellulaire. Le génome humain code pour au moins 150 protéines à domaines PDZ, mais la spécificité de l'oncoprotéine Tax-1 à cibler ces protéines reste inconnue.

Dans cette étude nous avons utilisé plusieurs méthodes d'interactions protéine - protéines pour générer une carte, la plus complète possible, de l'interactome de Tax-1 avec les protéines à domaines PDZ. Nous avons ensuite validé notre approche en nous focalisant sur le rôle de deux protéines PDZ (SDCBP et LNX2) dans la biologie du virus HTLV-1. Notre étude permet de proposer l'interaction entre Tax-1 et certaines protéines à domaine PDZ comme cible potentielle pour inhiber la transformation cellulaire due à Tax-1 et la transmission cellule-à-cellule du virus HTLV-1.

MOTS-CLES : HTLV-1, Leucémie, Tax-1, interactions, PDZ.

ABSTRACT

HTLV-1 (Human T-cell Leukemia Virus) is the etiologic agent of human adult T-cell leukemia (ATL) and tropical spastic paraparesis (TSP). More than 20 million people worldwide are infected with the HTLV-1 virus, but only about 5 % develop the associated pathologies. At present, efforts are invested in the search for treatments that may improve the survival expectancy of patients infected by the HTLV-1 virus. The diagnosis of HTLV-1 infection is hampered by the viral genome latency (up to 40 years) and treatment options are limited. To propose novel therapeutic opportunities, it thus is necessary to better understand the host molecular mechanisms perturbed by the HTLV-1 infection.

The HTLV-1 genome encodes for the Tax-1 protein, which confers the transforming ability of the virus. The Tax-1 protein is known as the transactivator factor of the HTLV-1 virus genome expression (TransActivator of pX region). It is also involved in the destabilization of several molecular mechanisms within the host, leading to cellular transformation. Tax-1 protein displays several functional domains and interacts with a wide range of cellular proteins. In particular, the Tax-1 protein sequence contains, at its carboxy-terminal end, a motif of four amino acids able to interact with PDZ domain (PSD95-DLG1-ZO1) containing proteins. It has been demonstrated that deletion of the PDZ binding motif (PBM) of the Tax-1 protein leads to a decrease of its oncogenic capacity *in vitro*. Cellular proteins containing PDZ domains are involved in the formation of cellular junctions, synapses and in cellular receptors assembly. Some of PDZ proteins are capable of relaying extracellular signals and participate in the control of proliferation. The human genome codes for at least 150 proteins with PDZ domains. However, the specificity of the oncoprotein Tax-1 to target these proteins remains unknown.

In this study, we have mapped The Tax-1 - PDZ interactome using a combination of several methods. We reveal that Tax-1 selectively target a number of PDZ domains-containing proteins potentially involved in HTLV-1 pathogenesis. We validated our approach by focusing on the role of SDCBP and LNX2 proteins in HTLV-1 biology. Our work also demonstrated that the Tax-1-PDZ interactome might represent an attractive therapeutic target for HTLV-1-induced diseases.

KEYWORDS: HTLV-1, Leukemia, Tax-1, interactions, PDZ.

Remerciements

Un grand merci à ma magnifique épouse Warda et à notre cher (ère) « Boutchou » (maintenant je le sais c'est Sirine ☺), je vous aime à l'infini ! ∞

Je remercie chaleureusement les membres du jury M. Jacob, Mme Chainiaux et Mme Sadzot qui m'ont fait honneur d'examiner mon travail.

Je te remercie Jean-Claude de m'avoir accueilli au sein de ton équipe et de m'avoir soutenu et orienté tout au long de ma thèse. Je te prie de croire à ma profonde gratitude. De plus, je remercie mes trois autres encadreurs Franck, Laurence et Jacques qui m'ont accompagné par leurs précieux conseils. Je vous témoigne ici toute ma reconnaissance.

Je ne manquerai pas de remercier aussi les organismes qui ont soutenu mes recherches de doctorat : CURAGx, FNRS-FRIA et PACODEL.

Je souhaite aussi remercier tous ceux qui m'ont accompagné durant cette « odyssee » de sept ans, mais aussi ceux qui m'ont encouragé à me lancer dans l'aventure :

Les membres du laboratoire d'interactions protéiques et de signalisation sont à l'honneur: Pascal, Katia, Rebecca, Catherine, Majid, Sarah S, Sarah D, Sarah H, Hélène, Michel, Marco, Martin, Despoina, Anouk, John, Cécile, Julia, Cône, Quentin, Tanguy, Alex, Charlotte, Tina, Maud, Elodie, Denis, JF, Xavier, Géraldine, Marie-Ange, Sophie, Thomas. Je vous remercie pour tous les bons moments, les sorties, les activités et même les réunions passées ensemble !

Les fameux viros : Marielle, Aurore, Marco, Laura, Laurent, Céline, Adeline, Yvette, Sylvie, Greg, Mégane, Cédric, Charlotte, Erik, Nicolas, Giorgia, Alessia, Claude. Vous avez su conquérir mon cœur et je n'oublierais jamais la paillasse que vous m'aviez offerte dans votre moitié du laboratoire.

La coordination, les plateformes et les membres du GIGA : Caroline, Isa, Sandra, Aurélie, Christophe, Sandra, Raafat, Abdelmounaïm, Gustavo, Manu, Donia, Jean-Jacques, Fabienne, Tony, Claire, Sonia, Meriem, Catherine, Alex, Céline, Stéphane, Fabienne, Monique, Marie, Lucia, Tiberio, Kateryna, Quentin. Vous m'avez apporté une aide précieuse et vous m'avez orienté à chaque fois vers la bonne solution.

Les membres du CBMN et du laboratoire d'épigénétique cellulaire et moléculaire: Sven, Colette, Arnaud, Jérôme, Christèle, Aishea, Jean-Marc, Bernard, Richard, Luc, Daniel, Mathieu, Hélène, Nicolas, Alix, Pierre-Yves, Malik, Sathya, Bernard, Fanny, Jean-Rock, Nathalie, Roland, Amel, Sabrina et Fabian. Heureusement que vous étiez là pour mes premiers jours à Gembloux, car le choc Marseille – Gembloux était dur à encaisser :p . Vous avez illuminé cette petite ville par votre chaleur humaine.

Le centre de recherche en cancérologie de Marseille et le laboratoire de biologie moléculaire et cellulaire de l'USTHB Alger : Jean-Paul Borg, Daniel Olive, Françoise Birg, Frédérique, Nicolas, Marie-José, Wilfried, Nadine, Kahina, Rima, Chanez, Mike Mitchel, Raphaëlle Bernard, Khadidja, Luc, Chafia Touil, Dalila Mezioug et Samia. Merci de m'avoir mis sur les rails de la recherche scientifique et de m'avoir soutenu dans mes choix.

Les membres du VentureLab : Pascal, Sophie D., Sophie J., Anaïs, Bernard, Vanessa, Sandrine, Gabrielle, Julien, Luc, Hubert, Johann, Olivier M., Olivier D., Laura, Bernard, Chloé, Caro, Antoine,

Jonas, Loïc, Thomas, Elmaze, Mathias, Lippe, Frans, Camille, Pierre, Geoffrey, Momo, Louis, Islam, Julien, Gilles, Antonia, Boris, tous les incubés et toutes les promos HEC entrepreneurs de 2005 à 2017. J'ai passé des moments inoubliables à vos côtés, vous m'avez permis de dynamiser ma vision de la recherche scientifique et sa valorisation. Merci de m'avoir donné autant d'inspiration !

Mes amis: Jean, Logan, Abdellatif, Abdessamad, Sébastien, Florian, Jean-Manuel, Dimitri, Geoffrey, John, Lamine, Abdelkrim, Abdelhafid, Omar, Maamar, Mustapha, Christophe, Youcef, Nassim M., Azeddine, Aymen, Issam, Abdellah, Oubaidallah, Fahim, Nassim B., Boualem, Brahim, Khaled, Khalid, Abdelkadir, Abdelmounaïm, Nassim E., Amine, Djallal, Nabil, Faïçal, Mahmoud, Karim, Omar, Amine, Reda, Idir, Malek, Toufik, Aghiles, Lyes, Boualem, Abderrahim, Amar D., Hamid, Ahmed, Malik, Malik, Hocine, Sofiane, Amar, Makki, Farid, Lotfi, Hacène, Fateh, Brahim I, Brahim, Smaïl, Belkacem, Abdellah, Bachir, Islam, Madani, Moussa, Mustapha, Samir, Massi, Hacène, Samir, Hamid, Hakim, Akli, Arezki, Nordine, Samir et Rachid. Je sais que je peux compter sur vous et vous pouvez compter sur moi !

Aaah ma famille: Vava, Yemma, Nora, Mohammed, Samir, Lynda, Lyla, Hocine, Sarah, mes tantes, mes oncles, mes cousines, mes cousins, mes belles sœurs, mes beaux frères, mes neveux. zzi Moh Rabia, Papi, Mami et leur familles. Sans vous, rien n'aurait pu se concrétiser ! J'espère pouvoir un jour vous rendre une partie de ce que vous m'avez offert.

Aaaaaah ma belle-famille : Zzi Moh, Ourida, Lyes, Hocine, Celia et toute ma grande belle famille. Vous avez été d'un grand apport et d'un immense soutien je vous remercie du fond du cœur.

Je rends un immense hommage à mes grands parents maternels et paternels qui ont vécu dans des conditions difficiles et qui n'ont pas vu le fruit de leur travail. Plus particulièrement à Jeddi Ahcene, qui s'est sacrifié en venant travailler ici en Belgique au dépend de sa santé et qui est retourné malade en Algérie. Le destin m'a peut être chargé de rattraper le coup et de continuer à construire le bel avenir que Jeddi aurait pu avoir ici en Belgique.

Un remerciement spécial à toi, dont je n'ai pas mentionné le nom. Tu me pardonnera certainement après avoir lu ce paragraphe :p .

Enfin, je vais remercier tous ceux qui liront ma thèse et qui feront vivre ce travail à travers leurs recherches.

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE I: INTRODUCTION	1
1 Le virus HTLV	1
1.1 Histoire de la découverte.....	1
1.2 Classification et phylogénie du virus HTLV-1.....	2
1.3 Épidémiologie du virus HTLV-1.....	3
1.4 Maladies associées au virus HTLV-1.....	5
1.4.1 ATL : Leucémie des cellules T de l'adulte (Adult T-cell leukemia).....	5
1.4.2 Diagnostic de l'ATL.....	7
1.4.3 Traitement de l'ATL.....	8
1.4.4 Autres maladies associées au HTLV-1.....	11
1.5 Structure du virion.....	12
1.6 Le génome du virus HTLV-1.....	13
1.7 Transmission humaine du virus HTLV-1.....	15
1.8 La transmission cellule-cellule du virus HTLV-1.....	15
1.9 Entrée du virus dans les cellules hôtes.....	18
1.10 Cycle de réplication.....	20
2 L'oncoprotéine Tax-1	21
2.1 Rôle de Tax-1 dans la transactivation virale.....	22
2.2 Potentiel de transformation cellulaire de la protéine Tax-1.....	24
2.3 Activation de la voie NF- κ B par Tax-1.....	25
2.4 Localisation cellulaire et extracellulaire de Tax-1.....	27
2.4.1 Localisation nucléaire de Tax-1 et activation transcriptionnelle.....	28
2.4.2 Localisation cytoplasmique de Tax-1 et manipulation des voies cellulaires.....	31
2.4.3 Localisation extracellulaire de Tax-1.....	32
2.4.4 Localisation de Tax-1 lors de la transmission par contact cellule-cellule.....	32
2.5 Interactome de Tax-1.....	32
2.5.1 Interactions de Tax-1 avec les facteurs de transcription et les régulateurs post-transcriptionnels.....	33
2.5.2 Interactions de Tax-1 avec les protéines impliquées dans la signalisation cellulaire.....	35
2.5.3 Interactions de Tax-1 avec des protéines associées au cycle cellulaire.....	37
2.5.4 Interactions de Tax-1 avec les pores nucléaires et les protéines de la voie sécrétoire.....	38
2.6 Interaction de Tax-1 avec des protéines contenant un ou plusieurs domaines PDZ.....	38
2.6.1 Ciblage des domaines PDZ par d'autres PBM viraux.....	39
2.6.2 La famille des protéines à domaines PDZ.....	42

2.6.3	Caractéristiques structurales des domaines PDZ.....	42
2.6.4	Le site de liaison des domaines PDZ à leur ligand.....	46
2.6.5	Classification des domaines PDZ.....	48
2.6.6	Importance des protéines à domaine PDZ pour l'homéostasie cellulaire.....	48
2.6.7	Domaines PDZ et remodelage du cytosquelette.....	49
2.6.8	Ciblage des interactions impliquant des protéines à domaines PDZ.....	50
3	Techniques utilisées pour l'étude des interactions protéine-protéine.....	51
4	Exploitation des données issues des interactomes protéiques.....	55
	CHAPITRE II : OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	57
	CHAPITRE III : RÉSULTATS	63
1	Les protéines à domaines PDZ issues de la littérature.....	63
2	Identification des interactions entre Tax-1 et les protéines à domaines PDZ codées par l'ORFeome	
5.1.	66
3	Identification des interactions entre Tax-1 et les domaines PDZ clonés séparément.....	67
4	Expression des gènes codant pour les protéines à domaines PDZ dans des les lymphocytes T	70
5	Mécanismes cellulaires ciblés préférentiellement par Tax-1 via les protéines à domaines PDZ.....	75
5.1	Analyse des fonctions enrichies	75
5.2	L'organisation cellulaire et le cytosquelette comme cibles préférentielles de Tax-1 via les protéines à domaines PDZ.....	76
5.3	La Syntenine (SDCBP) comme partenaire important de Tax-1	77
5.3.1	Validation de l'interaction Tax-1/SDCBP.....	77
5.3.2	Localisations de Tax-1 et de SDCBP	78
5.3.3	La localisation de Tax-1 est affectée par la modulation de l'expression de SDCBP et <i>vice versa</i>	80
6	Analyse globale de l'interactome Tax-1/PDZ	84
6.1	Comparaison des données obtenues par les différentes méthodes utilisées.	84
6.2	Caractérisation de l'interaction entre Tax-1 et LNX2.....	86
6.3	Détermination du domaine de LNX2 responsable de l'interaction avec Tax-1	86
6.4	Détermination des acides aminés impliqués dans l'interaction LNX2/Tax-1 par « docking ».	88
6.5	Détermination du rôle de LNX2 dans les mécanismes moléculaires de transformation des lymphocytes T par le virus de la leucémie humaine HTLV1.	90
6.6	LNX2 est impliqué dans l'activation de la voie NF-κB par Tax-1.....	90
6.7	LNX2 ne serait pas directement impliquée dans l'ubiquitination de Tax-1	91
7	Tax-1 inhibe la voie Notch	92
8	La molécule chimique FJ9 pourrait inhiber la transformation induite par Tax-1 <i>ex vivo</i>	94
9	La molécule chimique FJ9 pourrait inhiber la transmission de cellule à cellule du virus HTLV-1	97
10	Fj9 inhibe l'interaction entre Tax-1 et SDCBP.....	99

CHAPITRE IV : DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES	100
CHAPITRE V : CONCLUSIONS	106
CHAPITRE VI : MATÉRIEL ET MÉTHODES	107
1 Culture cellulaire.....	107
2 Transfections transitoires	107
3 Interférence par ARN	107
4 Immunoblots	108
5 Immunofluorescence et microscopie confocale.....	108
6 La méthode GPCA	109
7 Mesure de l'activité Luciférase	109
8 Ni-NTA pulldown	110
9 Clonage.....	110
10 Double hybride en levure de Tax-1 avec les domaines PDZ séparés	111
11 GST-pulldown.....	112
12 qRT-PCR.....	112
13 Immunoprécipitation Tax-1/SDCBP	113
14 Localisation cellulaire de Tax-1 et SDCBP	113
15 Effet mutuel de la surexpression de Tax-1 et de SDCBP	113
16 Test d'inhibition par FJ9 de la transformation induite par Tax-1	113
17 Test d'inhibition par FJ9 de la transmission de cellule à cellule de Tax-1.....	114
18 Test d'ubiquitination de Tax-1.....	114
19 Test d'inhibition de l'interaction de Tax-1 avec SDCBP par FJ9.....	114
20 Purification des exosomes	115
21 Analyse statistique.....	115
22 Docking.....	116
23 Analyse des enrichissements de GO.....	117
24 Représentation graphique des cartes interactomiques et création de réseaux protéiques complexes	117
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	118
ANNEXES.....	142
PUBLICATIONS.....	152

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Arbre phylogénétique du virus HTLV-1 et des virus apparentés.

Figure 2 : Répartition géographique des principaux foyers de l'infection par HTLV-1.

Figure 3: Représentation de la structure d'une particule virale de HTLV-1

Figure 4 : Le génome du virus HTLV-1 et les protéines qu'il code.

Figure 5 : Transmission cellule-cellule du HTLV-1.

Figure 6 : Modèle multi-récepteurs pour l'entrée du HTLV-1.

Figure 7 : Cycle de réplication du virus HTLV-1.

Figure 8 : Mise en évidence des éléments de réponse transcriptionnelle (TRE) dans le génome du virus HTLV-1.

Figure 9 : Activation des voies NF- κ B canonique et non canonique par Tax-1.

Figure 10 : Localisation cellulaire de Tax-1.

Figure 11 : Représentation 3D des différentes structures des domaines PDZ issues de la base de données des structures 3D protéiques PDB.

Figure 12: Représentation 3D des différentes positions de résidus important pour l'interaction du domaine PDZ avec son ligand

Figure 13 : Représentation schématique de certaines interactions PDZ/PBM-dépendantes des GEFs et de leurs conséquences.

Figure 14 : Illustration de la mise en place du système GST pulldown haut débit.

Figure 15 : Illustration de la procédure d'utilisation du PDZome humain.

Figure 16 : Procédure de détection d'interactions entre Tax-1 et les domaines PDZ par GPCA.

Figure 17: Comparaison des gènes codés par chacun des génomes des virus HTLV-1 et HTLV-2.

Figure 18: Comparaison de la structure et des domaines fonctionnels des protéines Tax-1 et Tax-2. A.

Figure 19 : Procédure de la construction d'une carte interactomique entre Tax-1 et les protéines à domaines PDZ.

Figure 20 : Protéines à domaines PDZ décrites comme partenaires de Tax-1.

Figure 21 : Classement des protéines partenaires de Tax-1.

Figure 22 : Identification de nouvelles protéines partenaires de Tax-1.

Figure 23 : Protéines à domaines PDZ partenaires de Tax-1 issues du criblage double hybride en levures.

Figure 24: Carte interactomique de Tax-1 avec les protéines à domaines PDZ.

Figure 25 : Expression des protéines à domaines PDZ dans les lymphocytes T.

Figure 26 : Expression des protéines à domaines PDZ dans les lymphocytes T infectées par HTLV-1.

Figure 27 : Interactome de Tax-1 avec les PDZ protéines dont les gènes sont exprimés dans des lymphocytes T.

Figure 28 : Carte représentant les interactions entre les protéines à domaines PDZ du cluster « Cytoskeleton », leurs interactions avec Tax-1 ainsi que leurs interactions avec leurs partenaires directs communs retrouvés dans la littérature.

Figure 29 : Interaction de SDCBP avec Tax-1.

Figure 30 : La localisation de Tax-1 dans les exosomes est dépendante de SDCBP.

Figure 31 : La localisation cellulaire de Tax-1 est dépendante de SDCBP.

Figure 32 : Interdépendance de la localisation cellulaire de Tax-1 et de SDCBP.

Figure 33: Comparaison des résultats des différentes méthodes utilisées.

Figure 34 : Détermination de la région de LNX2 qui interagit avec Tax-1.

Figure 35 : Détection du PDZ1 de LNX2 comme responsable de l'interaction avec Tax-1.

Figure 36 : Identification des acides aminés potentiellement impliqués dans l'interaction entre LNX2 et Tax-1.

Figure 37 : LNX2 est impliqué dans l'activation de la voie NF- κ B par Tax-1.

Figure 38: LNX2 ne serait pas directement impliquée dans l'ubiquitination de Tax-1.

Figure 39 : LNX2 est essentiel à l'activation de la voie Notch.

Figure 40 : Effet combiné de Tax-1 et LNX2 dans l'activation de la voie Notch.

Figure 41: Effet de la molécule FJ9 sur la transformation cellulaire induite par Tax-1.

Figure 42 : Effet de la molécule FJ9 sur la transmission de cellule à cellule de l'oncoprotéine Tax-1.

Figure 43 : Effet de la molécule FJ9 sur l'interaction Tax-1/SDCBP.

Figure 44 : Hypothèse de l'implication de SDCBP dans la transmission des particules de HTLV-1 de cellule à cellule.

Annexe 1 : Révélation western blot des GST pulldown de quelques protéines à domaines PDZ-Flag avec GST-Tax-1

Annexe 2 : Résultats du double hybride en levure. Les interactions positives sont indiquées par les colonies en croissance

Annexe 4 : Diagramme des protéines à domaines PDZ partenaires de Tax retrouvées par les différentes méthodes.

Annexe 6 : Carte représentant les interactions entre les protéines à domaines PDZ du cluster « Cytoskeleton »

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Méthodes de détection des interactions protéine-protéine.

Tableau 2 : Liste des protéines à domaines PDZ connues dans la littérature pour interagir avec Tax-1.

Tableau 3 : Criblage de l'ORFeome 5.1 par pulldown.

Tableau 4: Ensemble des domaines PDZ testés avec Tax-1.

Tableau 5 : Enrichissement de GO pour les 32 protéines à domaines PDZ ciblées par Tax-1.

Annexe 3 : Protéines à domaines PDZ partenaires de Tax-1 retrouvés par notre étude.

Annexe 5 : Protéines à domaines PDZ exprimées en cellules T ou différenciellement exprimées en cellules HTLV+/-.

Annexe 7 : Liste des lignées cellulaires utilisées pour les tests d'expression des gènes codant les protéines à domaines PDZ.

Annexe 8 : Liste des protéines à domaines PDZ prédites pour leur interaction avec Tax-1.

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

Ad9	Adénovirus de type 9
ADN	Acide Désoxyribonucléique
alloHSCT	Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation
APC/C	Anaphase-promoting complex/cyclosome
ARN	Acide Ribonucléique
ARNi	ARN interférant
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATF	Activating Transcription Factor
ATL	Adult T-cell leukemia/lymphoma
AZT/IFN-α	Zidovudin /interferon- α (IFN- α)
BAFF	B cell activating factor belonging to the TNF family
Bcl-3	B-cell lymphoma 3-encoded protein
BiFC	Bimolecular Fluorescence Complementation
bZIP	basic leucine zipper
CAMKII	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase II
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CBP	CREB-binding protein
CCR4	C-C chemokine receptor type 4
CD2	Cluster of differentiation 2
Cdc42	Cell-division cycle protein 42
CDK	Cyclin-dependent kinase
CHOP	Cyclophosphamide Hydroxyadriamycine Oncovin Prednisone
CREB	C-AMP Response Element-binding protein
CRM1	Chromosomal maintenance 1
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
DLG1	Disks large homolog 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DVL3	Dishevelled homolog 3
EGFR	Epidermal growth factor receptor
Egr1	Early growth response protein 1
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
Elk1	ETS domain-containing protein Elk-1
Env	Protéine d'enveloppe virale
ERBB2IP	ErbB2-interacting protein
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
Ets1	Protein C-ets-1
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FRZ7	Frizzled-7
Gag	Group-specific antigen
GDP	Guanosine diphosphate
GEFs	Guanine nucleotide exchange factors
GFP	Green fluorescent protein

GLUT1	Glucose transporter 1
GO	Gene Ontology
GPCA	Gaussia princeps protein complementation assay
GPCR	G protein-coupled receptor
GPS2	G protein pathway suppressor 2
GST	Glutathione s-transferase
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
HAM	HTLV-I-associated myelopathy
HBV	Hepatitis B virus
HBZ	HTLV-1 basic leucine zipper
HCV	Hepatitis C virus
HDAC	Histone Deacetylase
HDM	Histone demethylase
HLA	Human leukocyte antigen
HMT	Histone Methyl-Transferase
HPV	Human papillomavirus
HSP	Heparan sulfate proteoglycans
HTLV-1	Human T-cell Leukemia Virus 1
ICAM1	Intercellular adhesion molecule
ICN	Intracellular Notch
IKK	I κ B kinase
IL-2	Interleukine-2
JAK1/2	Janus kinase 1 & 2
JNK	c-Jun N-terminal kinases
KSHV	Kaposi sarcoma herpesvirus
LAP	LRR and PDZ
LCI	Literature curated interactions
LFA1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LN2	Ligand of numb-protein X 2
LTR	Long terminal repeats
MAGUK	Membrane-associated guanylate kinase
MAP3K	MAP kinase kinase kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEKK1	MAPK / ERK kinase kinase 1
MPTs	Modifications post-traductionnelles
MTOC	Microtubule organizing center
NBs	Nuclear Bodies
NEMO	NF-kappa-B essential modulator
NES	Nuclear export sequence
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NF-YB	Nuclear transcription factor Y subunit beta
NI-NTA	Nickel-Nitrilotriacetic acid
NLD	Nuclear localization determinant
NLS	Nuclear localization signal
NRP	Neuropiline
ORF	Open reading frame

PBM	PDZ binding motif
PCAF	P300/CBP-associated factor
PDLIM2	PDZ and LIM Domain 2
PDZ	PSD95-DLG1-ZO1
PLC	Phospholipase
PP2A	Protein phosphatase 2A
PSD95	Postsynaptic density protein 95
P-TEFb	The positive transcription elongation factor beta
qRT-PCR	Real time quantitative reverse transcription -polymerase chain reaction
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RANKL	Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand
RBD	Receptor binding domains
RelA	REL-associated protein A
RelB	REL-associated protein B
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SDCBP	Syndecan binding protein
SRE	Serum Response Element
SRF	Serum Response Factor
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
SUMO	Small ubiquitin-like modifier
TAB2	TAK1-binding protein 2
TAK1	TGF- β -activated kinase 1
Tax	Transactivator of pX region
TAX1BP1	Tax-1 binding protein 1
TGFβ	Transforming growth factor beta
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	TNF receptor
TORCs	Transducers of regulated CREB activity
TRE	Tax responsive element
TSA	Trichostatine A
TSLs	TSS localization signal
TSP	Tropical spastic paraparesis
TSS	Tax speckled structures
Y2H	Yeast two hybrid

CHAPITRE I:

INTRODUCTION

CHAPITRE I: INTRODUCTION

1 Le virus HTLV

1.1 Histoire de la découverte

La découverte des rétrovirus oncogènes dans le règne animal a été suivie par des recherches de rétrovirus humains dans les cellules cancéreuses. En 1980, le premier rétrovirus humain a été détecté dans des lignées de lymphocytes T établies à partir de patient atteint d'une maladie du sang et de la peau appelée mycosis fongoïde. Ce rétrovirus a été nommé virus de la leucémie humaine à lymphocytes T de l'adulte HTLV-1 (Humain T-cell leukemia virus) ^{1,2}. Avant cette découverte, la maladie de Leucémie à lymphocytes T de l'adulte (Adult T-Cell Leukemia « ATL ») avait été décrite au Japon. L'ATL est caractérisée par plusieurs symptômes cliniques, tels que des lésions dermiques, l'hypercalcémie, la présence de cellules leucémiques avec des noyaux multilobés et une évolution clinique agressive ^{3,4}. Les patients atteints d'ATL se recensaient dans des zones limitées, dont les îles de Kyushu et Okinawa, ce qui suggérait qu'un pathogène était l'agent responsable de la maladie. En 1981, Il a été rapporté que les patients atteints d'ATL avaient des anticorps qui ciblaient des lignées d'ATL ⁵ laissant penser que l'ATL est causée par un virus inconnu. Par la suite, on a évidemment remarqué que la séquence du provirus dans les cellules d'ATL et celle d'HTLV étaient globalement identiques. De plus, les symptômes cliniques de l'ATL ressemblent à ceux du mycosis fongoïde.

En 1984, HTLV-1 a été rapporté comme associé à la Paraparésie Spastique Tropicale dite TSP (Tropical Spastic Paraparesis) ⁶, et la même maladie a été rapportée au Japon comme Myelopathie associée au virus HTLV-1 dite HAM (HTLV-1-Associated Myelopathy) ⁷. Les deux maladies ont été classées sous la même appellation de TSP/HAM. Par ailleurs, d'autres maladies inflammatoires ont été liées à ce virus, telles que les uvéites associées au HTLV-1, les myosites, les alvéolites et les dermatites infectieuses ⁸⁻¹².

HTLV-2 a été découvert dans des lignées cellulaires établies à partir de patients atteints de leucémie tricholeucocyte variante ¹³. De plus, une infection avec ce virus a été découverte dans la population amérindienne native de l'Amérique du Nord, du Sud et Centrale ; mais aussi chez des populations d'Afrique Centrale et de l'Ouest, ainsi que chez les toxicomanes aux États-Unis et en Europe ¹⁴. HTLV-2 a été décrit pour être associé à une maladie

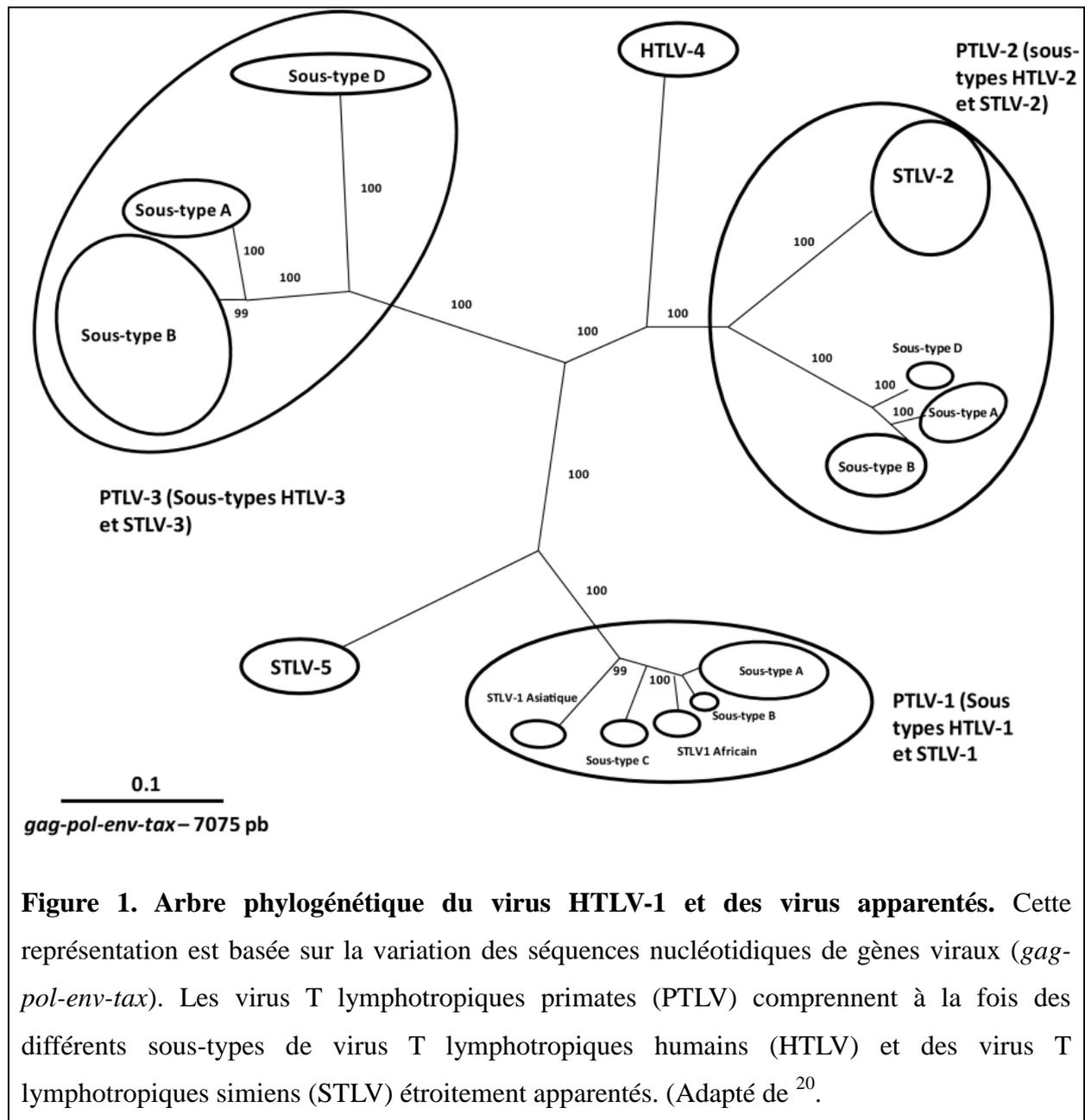
neurodégénérative ressemblant à la TSP/HAM ¹⁵. Cependant, aucune relation définitive n'a été faite entre HTLV-2 et les maladies Lymphoprolifératives.

En plus d'HTLV-1 et -2, les virus HTLV-3 et -4 ont été isolés à partir d'un chasseur « San » au Cameroun ¹⁶. Il existe très peu de cas de patients atteints de ces deux derniers virus, et de ce fait, leurs rôles pathologiques restent peu définis.

1.2 Classification et phylogénie du virus HTLV-1

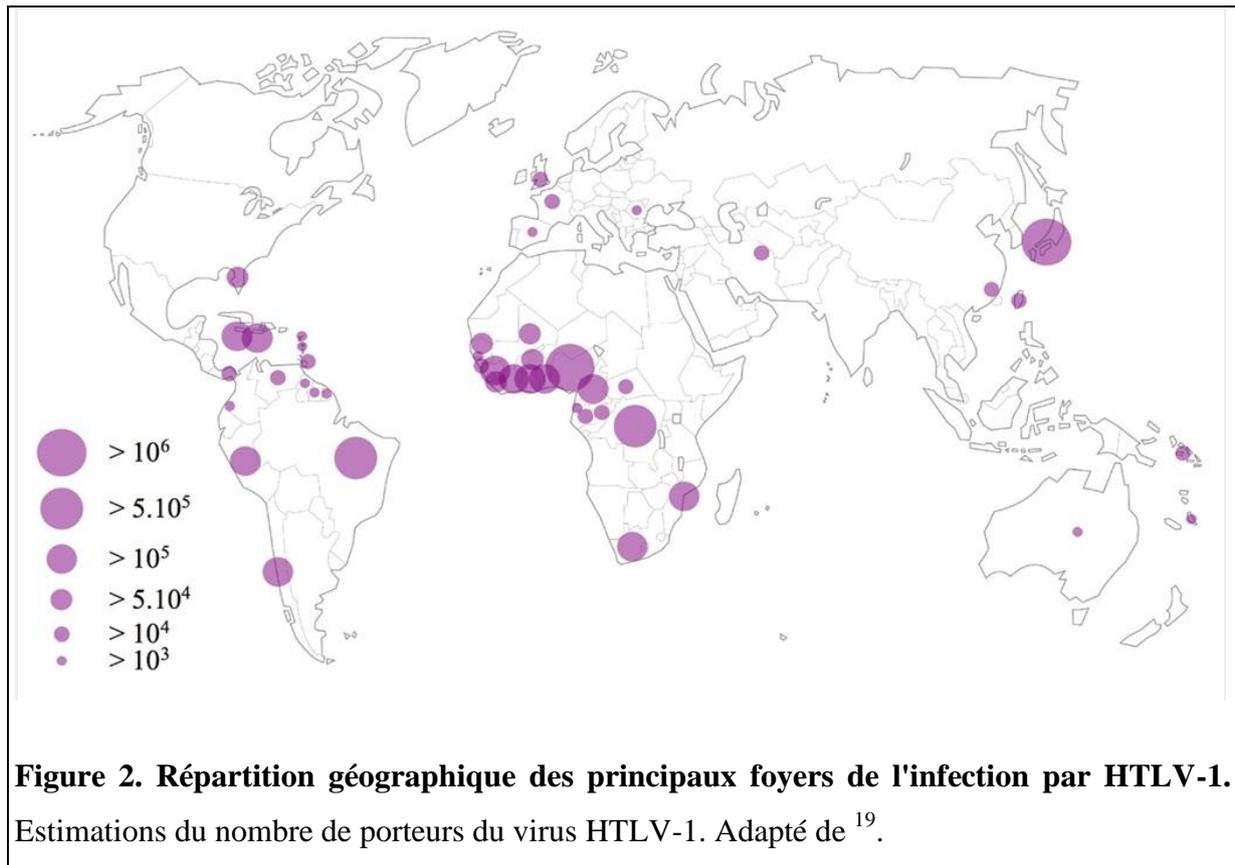
HTLV-1 appartient à la famille des deltarétrovirus, groupe des virus T-lymphotropiques des primates PTLVs (Primate T-Lymphotropic viruses) (**Figure 1**). Jusqu'à présent, dans ce groupe, 4 génotypes de rétrovirus humains ont été identifiés et nommés HTLVs ^{13,16,17}, en plus de 4 génotypes infectant exclusivement des primates non humains nommés STLVs pour Simian T-lymphotropic viruses (virus T-lymphotropiques simiens) ¹⁸.

Par ailleurs, plusieurs sous-types du virus HTLV-1 ont été identifiés. Ils se différencient par des substitutions de nucléotides dans les régions de Env et des longues répétitions terminales LTR (long terminal repeats) ^{18,19}. Les différents sous-types sont souvent associés à des régions géographiques particulières, excepté le sous-type A (appelé souche cosmopolite), qui se retrouve dans différentes zones ¹⁹.



1.3 Épidémiologie du virus HTLV-1

La prévalence d'HTLV-1 varie considérablement dans le monde et semble se concentrer principalement sur les zones endémiques. Il s'agit notamment du Japon, de l'Afrique, des Caraïbes et de l'Amérique du Sud (**Figure 2**) ²¹. Dans certaines régions endémiques, comme Kyushu au Japon, la séroprévalence peut atteindre 8% des donneurs de sang ²².



Les taux de séroprévalence mondiale de l'infection par le HTLV-1 sont difficiles à estimer. L'estimation la plus récente indique plus de 10 millions d'individus infectés dans des zones endémiques. On pense cependant que ces chiffres sont sous-estimés dans certaines régions très peuplées comme la Chine, l'Inde et l'Afrique de l'Est ¹⁹.

En Europe, plusieurs études épidémiologiques ont été réalisées sur la prévalence du HTLV-1, principalement chez les donneurs de sang et chez les femmes enceintes ²³⁻⁴⁰. En outre, plusieurs grandes séries d'ATL et TSP/HAM ont été rapportées ⁴¹⁻⁴⁵. Les pays les plus étudiés sont le Royaume-Uni, la France et l'Espagne (**Figure 2**). Sur la base de tous ces travaux, il est maintenant clair que la plupart (au moins plus de 80%) des personnes infectées par le HTLV-1 vivant actuellement en Europe proviennent directement d'une zone d'endémie élevée, principalement des Antilles et d'Afrique, ou sont des enfants ou des descendants d'immigrants. Ainsi, au Royaume-Uni, la plupart des transporteurs HTLV-1 proviennent des anciennes Antilles britanniques, en particulier de la Jamaïque et, dans une moindre mesure, de la Barbade, de la Trinité-et-Tobago ^{46,47}. Plus rarement, ils proviennent de l'Afrique de l'Ouest comme le Ghana ou la Sierra Leone. En ce qui concerne la France métropolitaine, la plupart des personnes proviennent des Antilles françaises comme la Martinique ou la Guadeloupe ^{41-43,48}. Ils peuvent aussi provenir d'Afrique de l'Ouest ou d'Afrique centrale comme le Sénégal,

le Mali, la Guinée, la Côte d'Ivoire ou le Cameroun ^{42,48-51}. Il est important de noter que dans les donneurs de sang et, donc, très probablement dans la population générale, une certaine proportion de personnes infectées sont des femmes qui ont acquis le HTLV-1 par des contacts sexuels avec un partenaire provenant d'une région endémique du HTLV-1. Cette situation peut représenter environ 5-10% dans différents pays européens, dont la France ou le Royaume-Uni ⁴⁷. En Espagne, la situation est légèrement différente, car pour des raisons historiques, la plupart des personnes infectées par le HTLV-1 sont originaires d'Amérique du Sud ^{52,53}. Cependant, la prévalence semble beaucoup plus faible qu'au Royaume-Uni ou en France métropolitaine.

Le taux d'infection par le HTLV-1 dans la plupart des autres pays européens, dont la Belgique est très faible, comme le démontre une prévalence du HTLV-1 de moins de 0,4 / 10 000 chez les nouveaux donneurs de sang et une grande rareté de diagnostics d'ATL ou de TSP / HAM ³⁹. La seule exception semble être la Roumanie, qui semble être la seule zone endémique du HTLV-1 en Europe ^{54,55}. En effet, une prévalence de 5,3 / 10 000 dons a été rapportée parmi les donneurs de sang dans ce pays d'Europe de l'Est (population de 22 millions d'habitants) ³⁹.

1.4 Maladies associées au virus HTLV-1

Après l'infection par HTLV-1, la charge provirale reste relativement constante chez un individu, mais diffère d'une personne à l'autre. La plupart des individus restent asymptomatiques pendant toute leur vie, alors qu'une petite fraction des porteurs développe des maladies associées au HTLV-1. Le virus HTLV-1 provoque d'un côté une maladie néoplasique grave qui est l'ATL (Adult T-cell leukemia) et de l'autre côté, des maladies inflammatoires comme la paraparésie spastique tropicale TSP/HAM, des uvéites, des alvéolites et des dermatites infectieuses. De plus, l'infection par HTLV-1 conduit à la suppression de l'immunité à médiation cellulaire ⁵⁶. La charge provirale est un facteur déterminant pour le développement de l'une ou l'autre de ces manifestations pathologiques.

1.4.1 ATL : Leucémie des cellules T de l'adulte (Adult T-cell leukemia)

L'ATL est une leucémie agressive des cellules T périphériques non Hodgkinienne causée par le virus HTLV-1^{2,4,57}. Cette pathologie est développée par environ 5% des individus infectés après une longue période de latence clinique ². Diverses manifestations cliniques caractérisent l'ATL, telles que la lymphadénopathie, les lésions cutanées, la prolifération de

lymphocytes anormaux, les atteintes du sang et de la moelle osseuse, l'hypercalcémie et les lésions osseuses lytiques. Bien que l'ATL soit, le plus souvent, une leucémie à lymphocytes T CD4 + , des exemples occasionnels de lymphomes CD8 + ont été décrits ⁵⁸. De par son caractère de maladie hétérogène, l'ATL a été divisée en quatre sous-types cliniques. Ces sous-types sont basés sur l'analyse de 854 patients souffrant d'ATL dans les années 1980, c'est la classification de Shimoyama: le type aigu, le type lymphome, le type latent et le type chronique ⁵⁹.

En bref, les sous-types latent et chronique, également connus sous le nom d'ATL indolente, se caractérisent par une éruption cutanée et une atteinte minimale. Les sous-types "aigu" et de type "lymphome", également connus sous le nom de ATL agressive, sont caractérisés par une hypercalcémie, ainsi qu'une masse des ganglions lymphatiques et tumorale importante.

L'identification du sous-type de l'ATL influence grandement le schéma thérapeutique et le pronostic des patients. Les patients avec une ATL agressive ont un mauvais pronostic avec des taux de survie de 4 à 6 mois pour le sous-type aigu et de 9 à 10 mois pour le sous-type lymphome. Les patients atteints d'ATL indolente ont un pronostic plus encourageant avec des taux de survie de 17 à 24 mois pour le sous-type chronique et de 34 mois à plus de 5 ans pour le sous-type latent.

L'ATL agressive a généralement un pronostic plus médiocre en raison de la résistance à plusieurs médicaments, d'une masse tumorale plus importante (par rapport aux formes indolentes), d'une défaillance multiorganique, d'une hypercalcémie et / ou d'infections opportunistes fréquentes dues à l'immunodéficience intrinsèque des lymphocytes T ^{59,60}. De plus, Les patients atteints d'ATL peuvent retourner spontanément à un état asymptomatique ou progresser vers la malignité ATL. Par ailleurs, les porteurs sains du virus HTLV-1, avec des lymphocytes du sang périphérique anormaux ressemblants aux cellules de l'ATL, sont classés à la limite de la maladie dans un état dit « pré-ATL »⁶¹.

Il a été décrit dans la littérature qu'un grand nombre de ces maladies associées au HTLV-1 sont liées à une charge virale élevée et/ou à une surstimulation des cellules dendritiques, ce qui entraîne une production chronique de taux élevés d'interférons de type 1 et d'expression des gènes stimulés par l'interféron ⁶²⁻⁶⁴. Bien que ces troubles cliniques soient associés à l'infection par le HTLV-1, nous allons nous focaliser sur l'ATL, qui est la seule maladie maligne causée clairement par le rétrovirus HTLV-1.

1.4.2 Diagnostic de l'ATL

L'infection par HTLV-1 est confirmée par des analyses sanguines qui détectent des anticorps contre l'infection par HTLV-1, par ELISA ou western blot.

Des tests diagnostiques supplémentaires, tels que la PCR, permettent de confirmer la présence de séquences provirales et quantifier la charge provirale. Les individus infectés par HTLV-1 et qui ne présentent pas de symptômes connus sont considérés comme porteurs asymptomatiques.

Il n'existe actuellement aucune méthode établie pour prédire ou surveiller le risque de développement d'ATL chez les porteurs asymptomatiques de HTLV-1. Cependant, une étude prospective menée dans le cadre de l'étude conjointe sur les facteurs prédisposants du développement de l'ATL a révélé que les patients présentant une charge provirale plus élevée (> 4 copies / 100 cellules mononucléaires du sang périphérique) faisaient partie d'une catégorie à haut risque pour le développement de l'ATL ⁶⁵. Cette étude a également conclu que le premier test de détection du virus HTLV-1 pendant le traitement d'autres maladies, les antécédents familiaux d'ATL et l'âge avancé étaient des facteurs de risque indépendants dans le développement de l'ATL. Cette étude confirme encore que l'ATL se produit presque exclusivement chez des individus qui ont acquis HTLV-1 à la suite de l'allaitement, car il faut généralement quatre à cinq décennies avant le développement de la maladie.

Souvent, le diagnostic de l'ATL est réalisé par détection de cellules ATL dans le sang périphérique ⁶⁶. Les patients avec une ATL agressive affichent typiquement plus de 5% de cellules T anormales, appelées cellules ATL ou cellules «fleuries» (*flower cells*). Les cellules fleuries ont des noyaux multilobulaires avec une chromatine homogène et condensée, des petits nucléoles ou absents et un cytoplasme agranulaire basophile.

Le diagnostic ATL peut également être réalisé à partir d'une biopsie. Cela est préconisé chez les patients asymptomatiques qui développent des lésions après une approche d'attente vigilante (confirmation et caractérisation de la maladie sans médication). L'intégration provirale du virus HTLV-1 doit être évaluée à partir d'une biopsie du sang ou d'une lésion. L'intégration provirale monoclonale se retrouve dans tous les cas ATL ^{66,67}. Les provirus intégrés défectueux peuvent également être un indicateur du sous-type clinique et du pronostic ⁶⁸. La mesure du niveau sérique de la LDH (lactate déshydrogénase) et l'analyse

immunophénotypique des cellules fleuries sont également effectuées dans les cas présumés d'ATL ⁶⁶.

D'autres critères de diagnostic clinique de l'ATL qui aident à classer le sous-type de la maladie et les approches thérapeutiques directes incluent l'examen de la moelle osseuse, l'imagerie radiologique et l'endoscopie pour détecter des atteintes gastro-intestinales, la cytogénétique pour observer les anomalies caryotypiques et l'analyse des gènes suppresseurs de tumeur hôte tels que p53 qui pourrait orienter vers un traitement AZT/IFN- α ⁶⁸⁻⁷⁶.

1.4.3 Traitement de l'ATL

Les stratégies de traitements de l'ATL dépendent grandement du sous-type clinique de l'ATL et des symptômes / critères de diagnostics associés. Les options actuelles de traitement incluent l'attente vigilante, la chimiothérapie, la thérapie antivirale, la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (alloHSCT) et les thérapies ciblées.

1.4.3.1 Attente vigilante

Les patients avec des formes indolentes d'ATL, présentant peu ou pas de symptômes, sont souvent dirigés vers une approche d'attente vigilante ^{76,77}. Par ailleurs, ceux qui sont atteints de l'ATL indolente avec des symptômes apparents sont plutôt dirigés vers un traitement par AZT / IFN- α . Récemment, une étude a permis d'analyser 90 patients atteints d'ATL indolente auxquels on a prescrit principalement une attente vigilante et/ou chimiothérapie ⁷⁸. Les résultats ont révélé un pronostic plus médiocre que prévu, avec une durée médiane de survie de 4,1 ans, ce qui suggère que l'ATL indolente devrait être étroitement surveillée dans le cadre clinique, avec des pratiques autres que l'attente vigilante.

1.4.3.2 Chimiothérapie

Plusieurs régimes de chimiothérapie ont été utilisés pour traiter les patients atteints d'ATL, mais avec des degrés variables de succès.

Une étude clinique de phase III de 2007 a suggéré que le traitement polychimiothérapique à fortes doses de VCAP-AMP-VECP (Vincristine, Cyclophosphamide, Adriamycin et Prednisone - Adriamycin, MCNU et Prednisone - Vindesine, Etoposide, Carboplatine et Prednisone) était un traitement plus efficace que l'administration d'une polychimiothérapie

CHOP (Cyclophosphamide, Hydroxyadriamycine, Oncovin et Prednisone) toutes les deux semaines chez des patients nouvellement diagnostiqués avec des sous-types d'ATL agressifs⁷⁹. Le taux de réponse complète était de 40% alors que le taux de survie globale à 3 ans de CHOP était de 13%, celui de VCAP-AMP-VECP était de 24%. Malheureusement, la durée moyenne de survie d'environ 13 mois était faible par rapport à d'autres tumeurs hématologiques. Parmi les autres problèmes avec ce schéma de chimiothérapie combinée, on peut citer sa complexité et le manque de disponibilité de plusieurs de ces médicaments dans de nombreux pays. Par ailleurs, on peut retrouver une efficacité similaire avec un autre traitement combiné appelé DA-EPOCH (étoposide à dose-ajustée, prednisone, vincristine, cyclophosphamide et doxorubicine)^{80,81}.

1.4.3.3 Traitement antiviral

Depuis le milieu des années 1990, la combinaison de la zidovudine (AZT) et de l'interféron alpha (IFN- α) a été testée dans plusieurs études cliniques avec divers degrés de succès. Deux rapports ont décrit des taux de réponse majeurs au traitement assez élevés de 58% (11/19 patients)⁸² et de 100% (5/5 patients)⁸³ chez les patients atteints de la forme aiguë de l'ATL lorsqu'ils étaient traités par une combinaison d'AZT et d'IFN- α .

Cependant, d'autres chercheurs ont signalé des taux de réponse inférieurs en utilisant cette approche, probablement en raison de la quantité et du type de traitement antérieur que les patients ATL avaient reçu⁸⁴. Néanmoins, des résultats encourageants d'une méta-analyse mondiale de 254 patients ATL traités par AZT / IFN- α ont été rapportés⁸⁵. Les patients traités par le traitement AZT / IFN- α en premier lieu avaient un taux de survie globale de 46% à 5 ans, comparativement à un taux de survie globale de 20% à 5 ans pour la chimiothérapie comme premier traitement. Les patients atteints de l'ATL de sous-type lymphome n'ont pas autant bénéficié de la thérapie AZT / IFN- α en premier lieu comparé à ceux traités par la chimiothérapie en premier lieu. Inversement, les patients atteints d'ATL aiguë avaient un taux de survie de 82% à 5 ans, tandis que les formes indolentes d'ATL présentaient un taux de survie de 100% à 5 ans lorsqu'ils étaient traités par une thérapie AZT / IFN- α en premier lieu.

Ensemble, ces rapports appuient l'utilisation et le développement des traitements AZT / IFN- α pour les sous-types aigus et indolents de l'ATL.

1.4.3.4 *alloHSCT*

L'utilisation de l'alloHSCT (la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques) est apparue comme une option de traitement prometteuse, mais encore peu étudiée pour l'ATL agressive. Les premières études ont rapporté une mortalité élevée liée au traitement. Cependant, le taux de survie global estimé à 3 ans était de 45% ⁸⁶. Dans une étude rétrospective, des chercheurs japonais ont trouvé un taux de survie globale de 3 ans de 33% pour une cohorte de 386 patients ATL qui ont reçu l'alloHSCT de différentes sources de greffon ⁸⁷. Cette étude a révélé plusieurs facteurs qui ont considérablement abaissé les taux de survie: l'âge du patient (> 50), le sexe, le statut en dehors de la rémission complète et l'utilisation du sang du cordon HLA incompatible au lieu de greffes compatibles.

Une autre étude rétrospective a récemment rapporté un taux de survie globale à 3 ans de 39,9% chez les patients traités par alloHSCT ⁸⁸. Malheureusement, dans cette étude, l'utilisation d'alloHSCT a eu un effet limité chez les patients ATL résistants à la chimiothérapie.

Globalement, l'alloHSCT demeure une option de traitement encourageante pour les jeunes patients avec des sous-types agressifs de l'ATL.

1.4.3.5 *Thérapies ciblées*

À travers des essais cliniques récents, en cours et envisagés, plusieurs thérapies ciblées prometteuses contre l'ATL sont testées.

Ces thérapies incluent l'inhibiteur du protéasome Bortezomib, les inhibiteurs des HDACs (Histones désacétylases) tels que le Vorinostat, la Romidepsine et le Panobinostat, l'inhibiteur des JAK1/2 Ruxolitinib, le trioxyde d'arsenic et l'IFN- α , des anticorps monoclonaux dirigés contre des molécules de surface des cellules ATL (anti-PD-1, anti-CD25, anti-CD2, anti-CD52 et anti-CCR4), de nouveaux antifolates, l'inhibiteur de la phosphorylase du nucléotide purine Forodesine, thérapie antiangiogénique et, enfin, le médicament immunomodulateur Lenalidomide ⁸⁹.

Initialement considérées comme un candidat intéressant pour un vaccin anti-HTLV-1, les glycoprotéines de l'enveloppe du virus HTLV-1 initient l'infection et provoquent à la fois une réponse immunitaire humorale et cellulaire. Malheureusement, les premières études utilisant

le vaccin du virus recombinant ou les adénovirus et les peptides chimériques de l'enveloppe virale n'ont fourni qu'une protection partielle aux animaux infectés par les cellules porteuses du virus HTLV-1^{90,91}.

Récemment, des études ont suggéré l'utilisation thérapeutique potentielle des peptides Tax-1 ou HBZ pour fournir une immunité protectrice contre l'infection par HTLV-1 et/ou le développement d'ATLs^{92,93}.

1.4.4 Autres maladies associées au HTLV-1

En plus de l'ATL, l'infection avec HTLV-1 est associée à plusieurs autres maladies et affections, y compris la myélopathie associée au HTLV-1 / paraparésie spastique tropicale (TSP/HAM), l'uvéite associée au HTLV-1 (HU) et diverses affections dermatologiques.

1.4.4.1 La TSP / HAM

La TSP/HAM se développe chez environ 3 à 5% des individus infectés par le HTLV-1, généralement des femmes, avec un âge moyen d'apparition de la maladie de 40 ans⁹⁴. Elle se caractérise par une spasticité des membres inférieurs, des troubles de l'intestin et de la vessie et une progression lente sur plusieurs années, mais régulière et sans rémission⁹⁵. En tant que maladie neurologique, la TSP/HAM est aggravée par des lésions du système nerveux central associées à des infiltrats de lymphocytes T CD8 +⁹⁶.

1.4.4.2 L'uvéite associée au HTLV-1

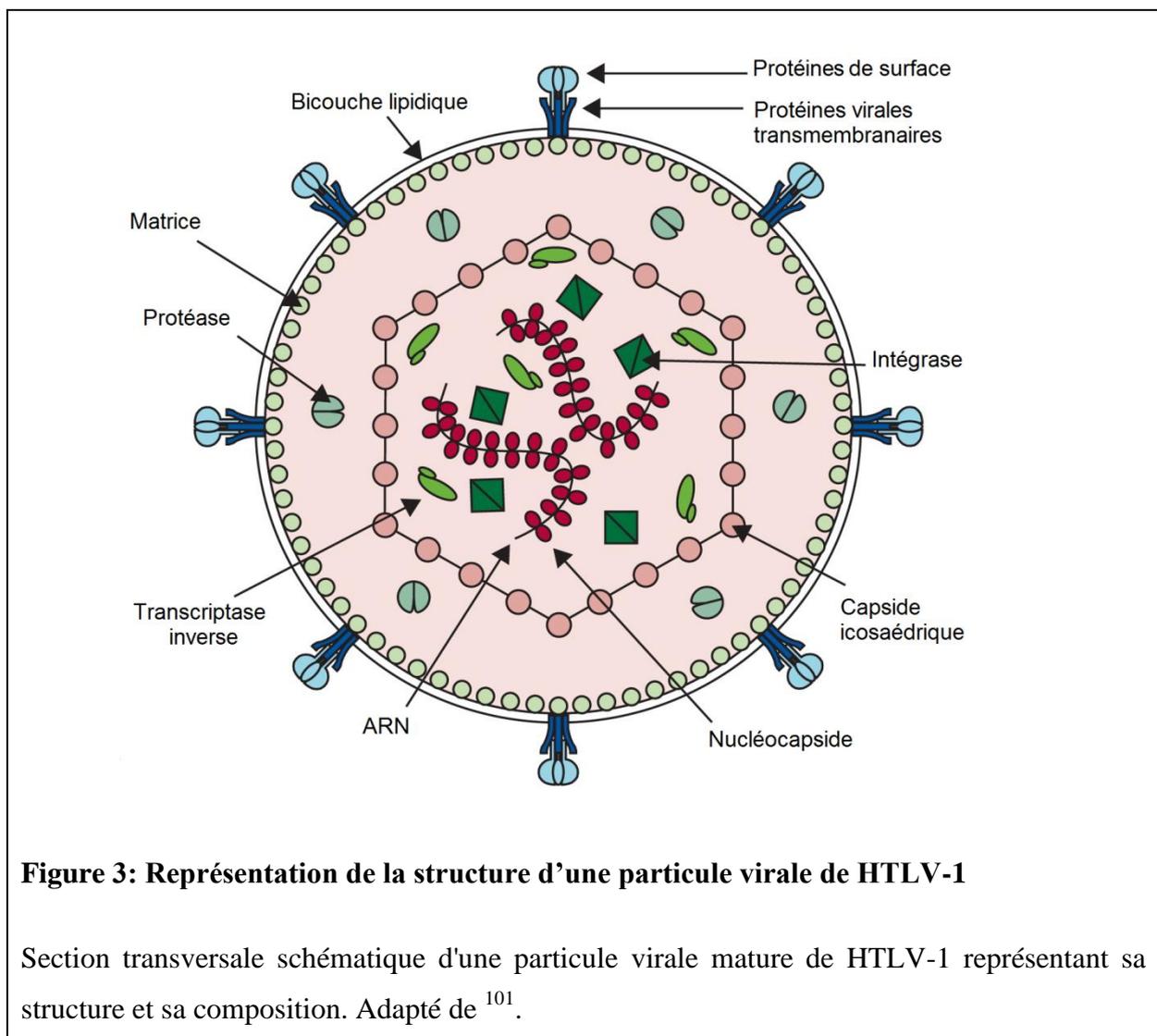
L'uvéite associée au HTLV-1 est le plus couramment trouvé chez les hommes et les femmes de 45 à 65 ans, notamment, dans les régions endémiques du Japon. Caractérisée par des floteurs et une vision brumeuse dans l'œil, cette affection est classée comme une uvéite intermédiaire et peut être associée à la TSP/HAM ou constituer le seul symptôme de l'infection au virus HTLV-1⁹⁷.

1.4.4.3 La dermatite infectieuse

La dermatite infectieuse associée au HTLV-1 (IDH) est une forme pédiatrique d'eczéma récurrent sévère couramment associée à l'infection par le virus HTLV-1⁹⁸. Il est important de noter que l'IDH est considéré comme un facteur pronostique du développement de l'ATL ou de la TSP/HAM /⁹⁹.

1.5 Structure du virion

HTLV-1 est un deltarétrovirus appartenant à la sous-famille des orthoretrovirinae, elle-même englobée dans la grande famille des retroviridae (rétrovirus). Il s'agit d'un virus enveloppé de forme arrondie et d'environ 100 nm de diamètre (**Figure 3**). Le virion est entouré d'une enveloppe formée d'une double couche de protéolipides provenant de la membrane de la cellule hôte. Cette enveloppe est équipée de protéines virales de surface et transmembranaires. L'enveloppe interne contient la couche matrice, ce qui aide à intégrer les composants viraux à la membrane cellulaire interne. L'ARN viral, la protéase fonctionnelle, la transcriptase inverse et l'intégrase, qui sont organisées avec la nucléocapside dans un complexe ribonucléoprotéique sont protégés par la capsidie icosaédrique¹⁰⁰.



1.6 Le génome du virus HTLV-1

HTLV-1 est un virus à double ARN monocaténaire de polarité positive. Comme tous les rétrovirus, l'ARN du virus est transcrit de manière inverse par sa transcriptase inverse puis, il intègre l'ADN génomique de la cellule hôte et subsiste comme provirus. La taille du génome proviral est d'environ 9000 paires de bases (pb) ¹⁰².

Comme c'est le cas pour d'autres rétrovirus, le génome de HTLV-1 contient aux deux extrémités du provirus des séquences identiques, de longues répétitions terminales (LTR). Le 5'-LTR est le promoteur des transcrits dans l'orientation sens, alors que le 3'-LTR est le promoteur pour la transcription antisens ^{103,104}. Entre les deux extrémités LTR, on retrouve plusieurs cadres de lecture ouverts (open reading frames, ORFs viraux). La plupart des gènes structurels viraux, tels que *gag*, *pol* et *env* sont codés dans le côté 5' du provirus dans l'orientation sens, comme cela est observé pour d'autres rétrovirus (**Figure 4**) ¹⁰⁵.

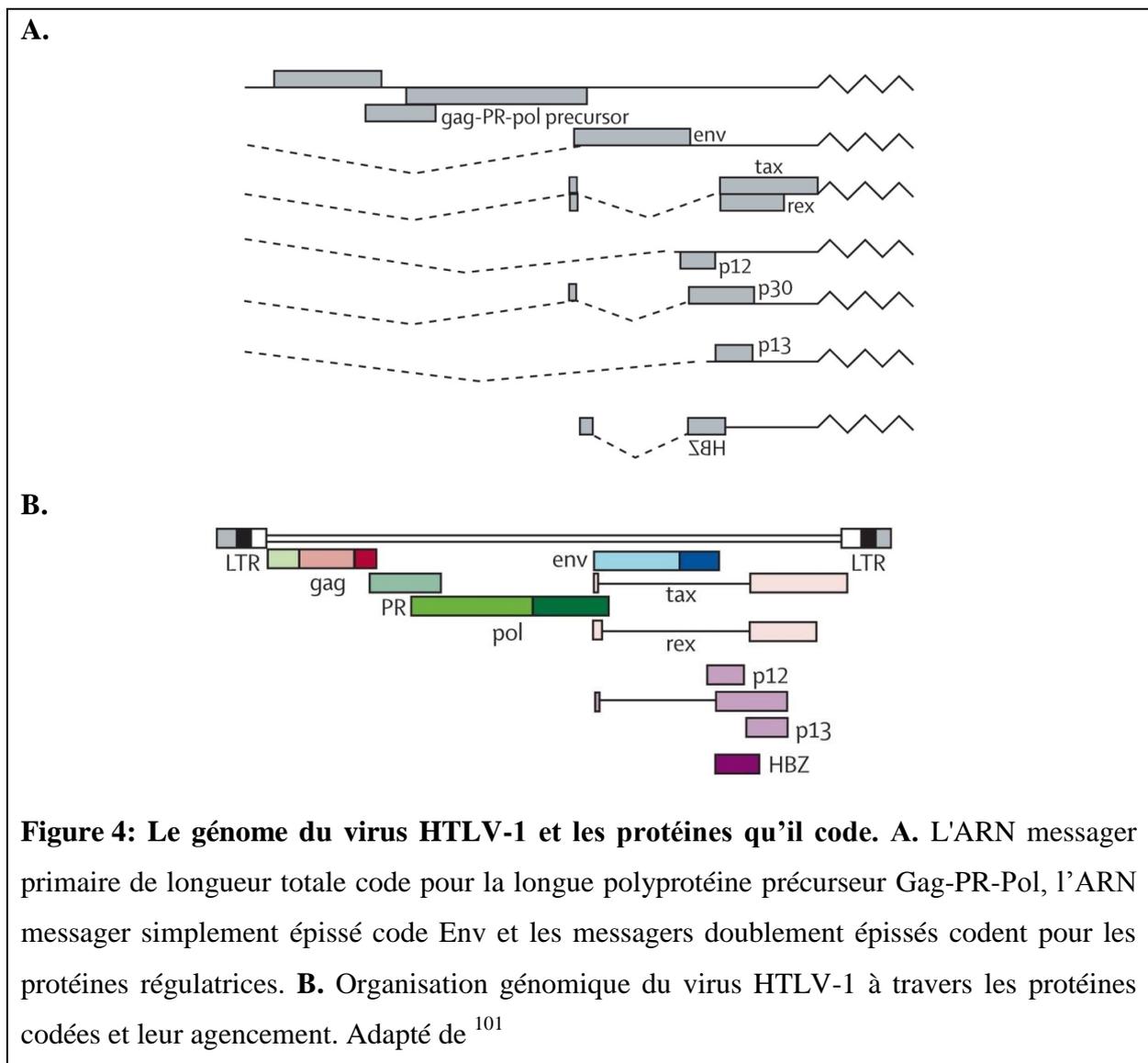
Le gène *gag* est transcrit et traduit en tant que précurseur des protéines structurales internes. La protéine Gag est scindée par protéolyse pour donner la capsid de protéines structurales matures (CA), la matrice (MA) et la nucléocapsid (NC). Le gène *pol* code les enzymes de la transcriptase inverse (RT), qui possède des activités ADN polymérase et RNase H, ainsi que l'intégrase (IN), qui intervient dans l'intégration du génome. Le gène *pro* code la protéase virale (PR), qui agit tardivement dans l'assemblage et traite protéolytiquement les protéines codées par *gag*, *pro* et *pol*. Le gène *env* est un précurseur des glycoprotéines d'enveloppe. Il code les glycoprotéines de surface (SU) et transmembranaires (TM) ¹⁰¹.

L'autre aspect caractéristique du génome HTLV-1 est représenté par la présence de la région pX, située entre le gène *env* et LTR 3'. Elle se compose de quatre ORFs alternativement épissés (I à IV) sur le brin sens, et deux ORFs alternativement épissés sur le brin antisens, qui codent pour des protéines régulatrices et accessoires. Les ORFs III et IV sont traduits à partir du même transcrit doublement épissé et codent respectivement pour les protéines Rex et Tax-1 ¹⁰⁶. Rex est impliqué dans l'exportation nucléaire d'ARN viraux non épissés ou simplement épissés ^{107,108}, tandis que Tax-1 transactive le promoteur situé dans le LTR 5' pour l'expression sens des gènes viraux et augmente la transcription de nombreux gènes cellulaires impliqués dans la prolifération des cellules hôtes ¹⁰⁹⁻¹¹¹. L'ORF III code également pour une forme tronquée isolée de Rex, p21Rex, qui est moins bien caractérisée. Les ORF I et II

produisent des ARNm épissés alternativement, qui encodent quatre gènes accessoires - p12I, p27I, p13II et p30II ¹¹²⁻¹¹⁵.

Les protéines accessoires p8I, p12I, p27I, p13II, p30II sont codées également dans l'orientation sens dans la région pX à partir des ORFs I et II ^{116,117}. Par ailleurs, on retrouve aussi le facteur HTLV-1 bZIP (HBZ) qui est codé dans la région pX dans l'orientation antisens à partir du LTR 3' ¹⁰³.

Ainsi, HTLV-1 utilise très efficacement son petit génome via l'épissage alternatif et la transcription bidirectionnelle (**Figure 4**). De plus, l'utilisation harmonieuse des protéines virales régulatrices et accessoires permet un contrôle de l'expression des antigènes viraux et le maintien d'une infection persistante du virus HTLV-1 ¹⁰⁶.



1.7 Transmission humaine du virus HTLV-1

Le virus libre étant peu infectieux, la transmission du virus HTLV-1 est souvent liée au contact cellule-cellule. Celle-ci est possible lors du contact de cellules infectées par HTLV-1 avec des cellules non infectées. Ainsi, les produits sanguins exempts de cellules ne transmettent pas le HTLV-1¹¹⁸. HTLV-1 est principalement transmis d'une mère infectée par le virus à son enfant par l'allaitement maternel. En outre, le contact sexuel et la transfusion sanguine sont des voies de transmission supplémentaires. La transmission sexuelle est principalement d'origine masculine, sachant que la transmission de la femme vers l'homme est beaucoup moins efficace¹¹⁹.

Les symptômes de la maladie prennent généralement quatre à cinq décennies pour se manifester. Par conséquent, l'ATL est contractée presque exclusivement par les individus infectés pendant l'enfance¹²⁰.

1.8 La transmission cellule-cellule du virus HTLV-1

La transmission humaine du HTLV-1 nécessite le transfert de cellules infectées par l'allaitement maternel, les rapports sexuels, la transfusion de composants sanguins contenant des cellules et le partage d'aiguilles. Ce qui suggère un mécanisme qui dépend du transfert cellule-cellule du virus HTLV-1.

In vitro, HTLV-1 infecte une grande variété de cellules, y compris les lymphocytes T, les lymphocytes B, les monocytes, les cellules endothéliales et les fibroblastes. Comme le virus de l'immunodéficience humaine HIV (human immunodeficiency virus), HTLV-1 peut également infecter les cellules dendritiques, qui peuvent ensuite transmettre le virus aux cellules T CD4 +¹²¹. Cette capacité à infecter plusieurs types cellulaires est due en partie à l'utilisation du récepteur cellulaire ubiquitaire GLUT-1¹²².

La transmission cellule-cellule du HTLV-1 se produit par le biais de la «synapse virologique» formée en partie par la fonction lymphocytaire associée à l'antigène 1 (LFA1) et ICAM1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) (**Figure 5**)^{123,124}. L'expression de la protéine de transactivation virale dénommée Tax-1 et l'engagement de ICAM1 provoquent la polarisation des microtubules associés à la synapse virologique. Tax-1 est également localisée dans la région de contact cellule-cellule formée entre une cellule infectée par HTLV-1 et sa cellule

cible, mais aussi au voisinage du centre organisateur de microtubules associé au cis-Golgi^{124,125}. Les particules virales du virus HTLV-1 sont également stockées sous la forme d'assemblages extracellulaires de type biofilms riches en glucides, qui s'attachent rapidement aux cellules cibles pour la transmission du virus¹²⁶.

Enfin, la présence de protéines virales dans les exosomes suggère un rôle pour les microvésicules cellulaires dans la transmission du virus HTLV-1¹²⁷. En effet, il est envisageable que des microvésicules participent au transfert de particules virales vers des cellules non infectées. Ceci faciliterait la délivrance de protéines virales bioactives ou la séquestration de protéines virales immunoréactives¹²⁸.

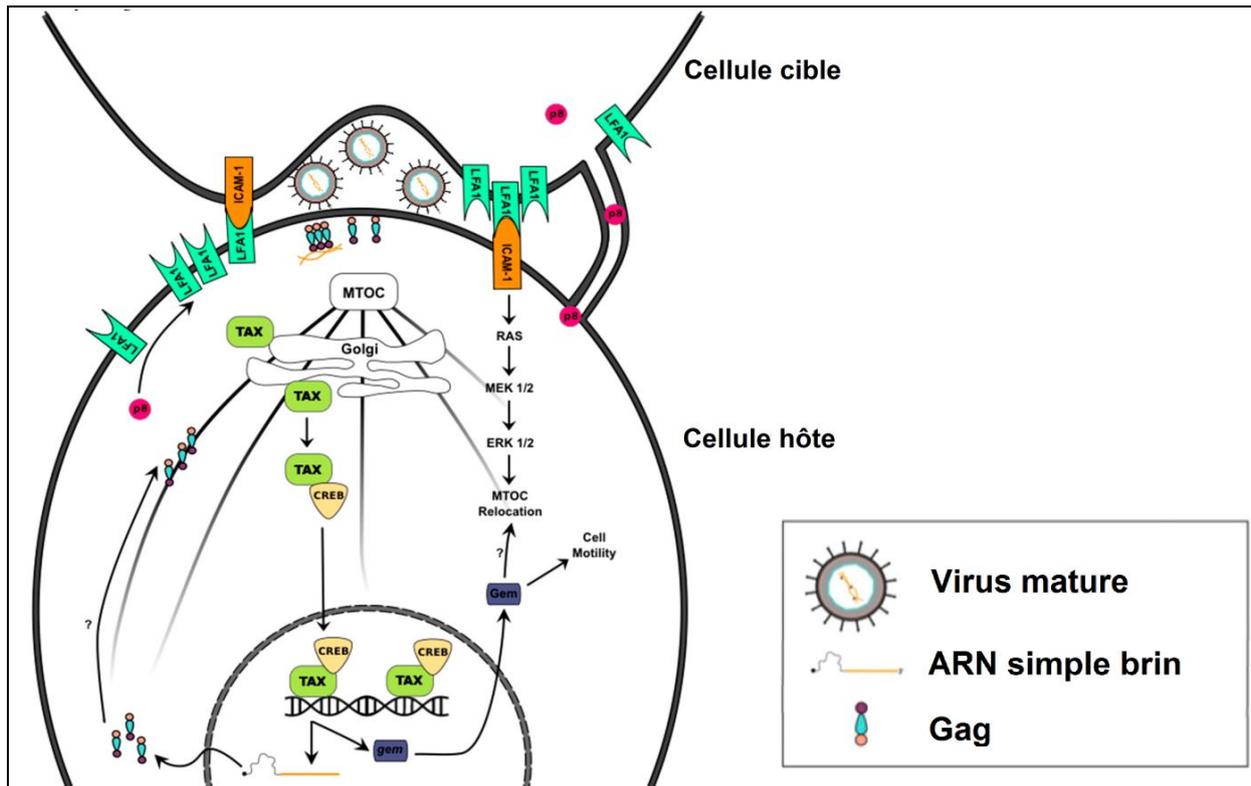


Figure 5: Transmission cellule-cellule du HTLV-1. Les deux formes du diagramme représente une cellule hôte (en bas) qui s'est ancrée à une cellule cible permissive (en haut) en utilisant ICAM-1 et LFA1. La protéine accessoire p8 du HTLV-1 a été décrite pour augmenter l'expression des récepteurs LFA1 ainsi que l'augmentation du nombre de synapses cellule-cellule; lesquelles sont ensuite traversées par p8 pour surrxprimer LFA1 dans la cellule cible. Une fois que l'ICAM-1 est lié, il déclenche une cascade de signalisation qui conduit à la relocalisation du MTOC. De plus, Tax-1 est décrit pour sa liaison aux corps de Golgi qui sont attachés au MTOC. Ceci déclenche une variété de cascades de signalisations cellulaires. Par exemple, une voie établie augmente l'expression de Gem, une protéine qui augmente la motilité cellulaire et éventuellement la localisation du MTOC. Quand Gag est produite, on la trouve concentrée au MTOC. Par la suite, Gag se localise au niveau des contacts cellule-cellule où des particules virales bourgeonnent dans la synapse virologique formée par les points d'adhérence cellulaire. Les particules virales produites peuvent se lier aux récepteurs pour l'entrée dans la cellule cible permissive. Les points d'interrogation le long des lignes avec des flèches indiquent des mécanismes de transport ou d'activation qui ne sont pas bien compris. Adapté de ¹²⁹.

1.9 Entrée du virus dans les cellules hôtes

L'entrée du HTLV-1 dans les cellules hôtes débute par la liaison des protéines d'enveloppe du virus au récepteur contenu naturellement à la surface de la membrane de la cellule hôte GLUT-1 (Glucose transporter 1). Ceci est suivi par la fusion des membranes virales et cellulaires^{122,130}. Par ailleurs, d'autres molécules de surface, comme la neuropiline-1 (NRP-1) et les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPGs), contribuent également à l'infection virale (**Figure 6**)^{131,132}.

La protéine d'enveloppe du HTLV-1 (Env) est synthétisée sous la forme d'un précurseur de polyprotéine de 68 kD, qui est clivé pour produire deux sous-unités: la glycoprotéine de surface (SU) de 46 kD (gp46) et la glycoprotéine transmembranaire (TM) de 21 kD (gp21). Les protéines d'enveloppes matures des virions forment des trimères constituées de trois SUs et de trois TMs liées par des liaisons disulfures. Le domaine cytoplasmique de gp21 est responsable de la formation de syncytiums dépendant de l'enveloppe et l'entrée par contact cellule-cellule^{133,134}. L'extrémité C-terminale de gp21 contient un motif de liaison aux protéines à domaines PDZ et la délétion de ce motif réduit la stabilité d'Env¹³⁵. Par ailleurs, un autre motif Y-S-L-I dans le domaine cytoplasmique de la gp21 est crucial pour la transmission cellule-cellule HTLV-1¹³⁶.

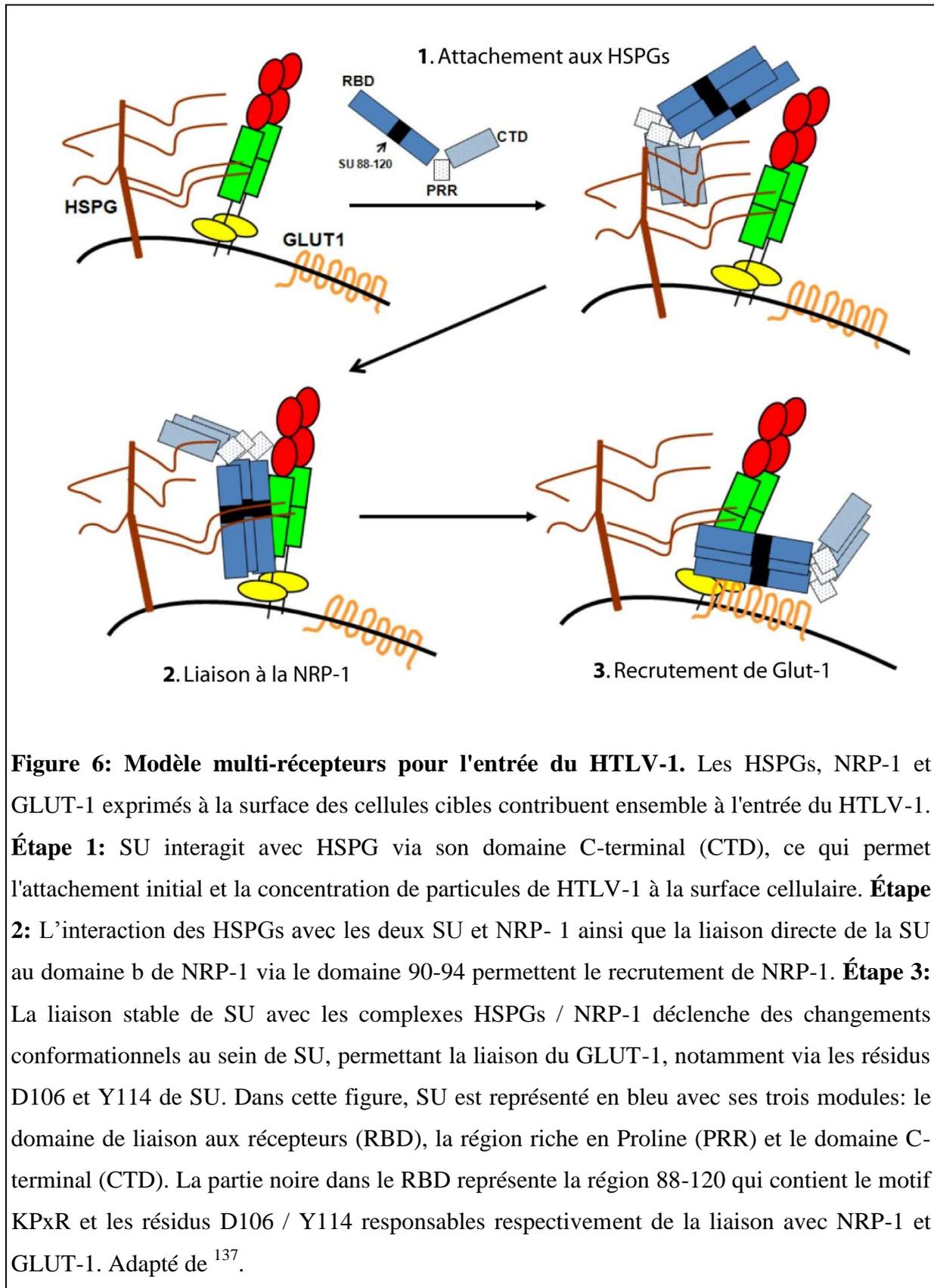
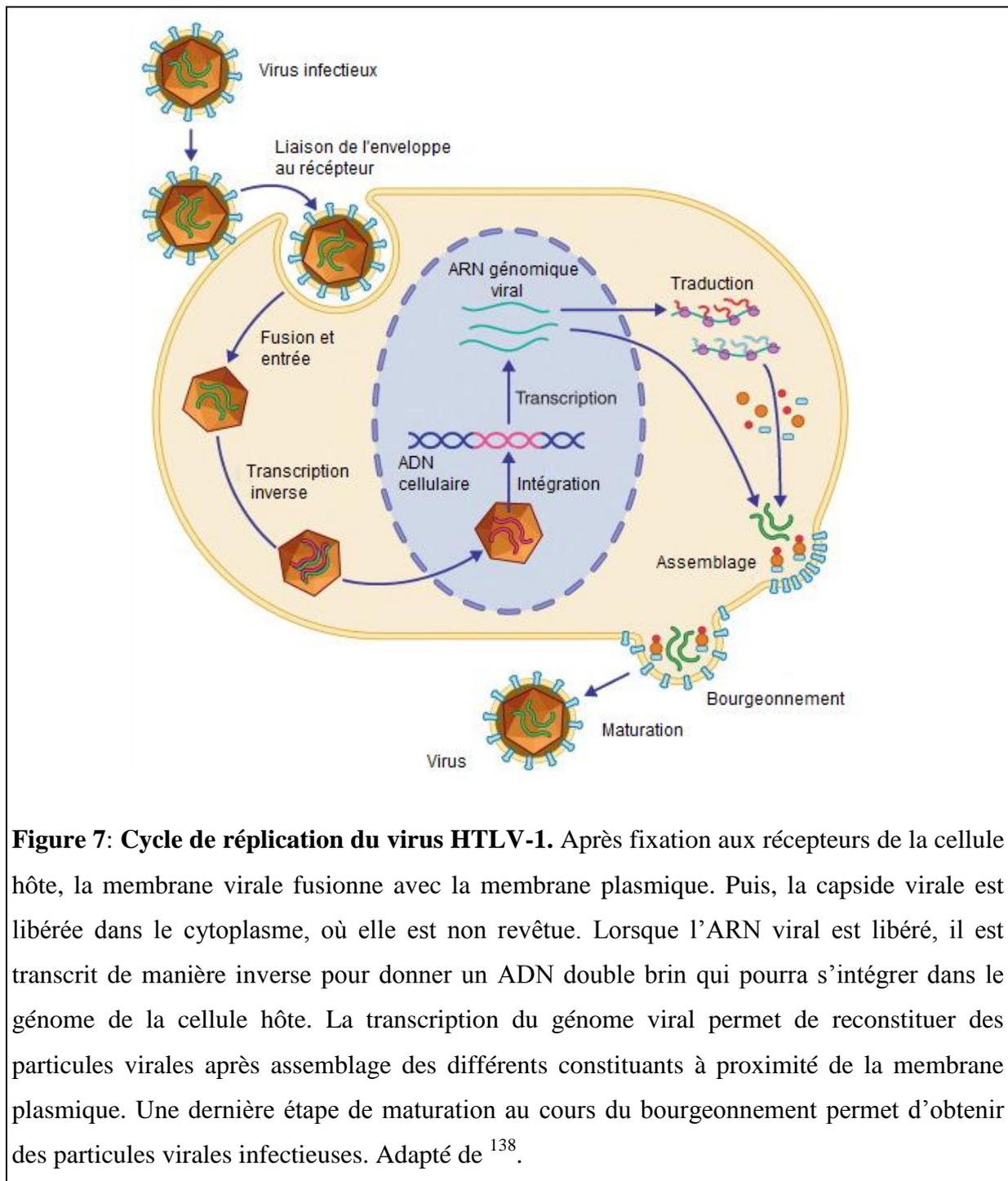


Figure 6: Modèle multi-récepteurs pour l'entrée du HTLV-1. Les HSPGs, NRP-1 et GLUT-1 exprimés à la surface des cellules cibles contribuent ensemble à l'entrée du HTLV-1. **Étape 1:** SU interagit avec HSPG via son domaine C-terminal (CTD), ce qui permet l'attachement initial et la concentration de particules de HTLV-1 à la surface cellulaire. **Étape 2:** L'interaction des HSPGs avec les deux SU et NRP-1 ainsi que la liaison directe de la SU au domaine b de NRP-1 via le domaine 90-94 permettent le recrutement de NRP-1. **Étape 3:** La liaison stable de SU avec les complexes HSPGs / NRP-1 déclenche des changements conformationnels au sein de SU, permettant la liaison du GLUT-1, notamment via les résidus D106 et Y114 de SU. Dans cette figure, SU est représenté en bleu avec ses trois modules: le domaine de liaison aux récepteurs (RBD), la région riche en Proline (PRR) et le domaine C-terminal (CTD). La partie noire dans le RBD représente la région 88-120 qui contient le motif KPxR et les résidus D106 / Y114 responsables respectivement de la liaison avec NRP-1 et GLUT-1. Adapté de ¹³⁷.

1.10 Cycle de réplication

Le cycle de réplication commence par la liaison de l'enveloppe virale (Env) aux récepteurs/facteurs de fixation de la cellule hôte. Cette interaction déclenche un changement conformationnel dans Env qui permet sa fusion avec la membrane plasmique de la cellule hôte. Cette fusion conduit à la libération de la capside virale dans le cytoplasme. Une fois libéré, l'ARN viral est inversement transcrit par la transcriptase inverse virale pour donner un ADN double brin. La copie d'ADN du génome viral est alors intégrée dans l'ADN hôte par l'intégrase virale, formant le provirus, qui représente la matrice de la transcription du génome viral. En s'intégrant dans le génome de la cellule hôte, le virus est capable de profiter de la machinerie de la cellule hôte pour reproduire son génome. Un certain nombre de transcrits différents sont générés à partir du provirus, y compris une copie de pleine longueur non épissée du génome viral qui sert, soit à coder les précurseurs viraux de Gag, Gag-Pro et Gag-Pro-Pol ; soit à être encapsidée comme génome viral dans les particules de la progéniture. Des transcrits simplement épissés, codant le précurseur Env et des transcrits doublement épissés, codant les protéines régulatrices et accessoires, sont également générés. Les transcrits doublement épissés sont facilement exportés hors du noyau, alors que les transcrits non épissés et épissés individuellement nécessitent Rex pour se lier à leurs éléments de réponse Rex (RxRE), pour promouvoir leur exportation. Une fois dans le cytoplasme, ces transcrits sont traduits sous formes de précurseurs, ou protéines régulatrices / accessoires. Les protéines Gag, Gag-Pro, Gag-Pro-Pol et Env se rassemblent alors sur un site commun à la membrane cellulaire et bourgeonnent sous forme de particules virales. Lors du bourgeonnement de la membrane plasmique, ces particules sont considérées comme immatures, car elles n'ont pas encore été traitées. La maturation du virion se produit par l'activation de la protéase virale et le clivage des précurseurs Gag, Gag-Pro et Gag-Pro-Pol (**Figure 7**)¹²⁹.



2 L'oncoprotéine Tax-1

Tax-1 est une protéine de 353 acides aminés, localisée à la fois dans le noyau et le cytoplasme. Tax-1 est généralement définie comme une protéine multifonctionnelle, car elle permet d'activer la transcription de gènes viraux et cellulaires et d'agir comme médiateur de plusieurs voies cellulaires. Tax-1 agit comme une protéine pléiotrope conférant des propriétés prolifératives et de survie aux cellules infectées par HTLV-1 en modulant les facteurs

régulateurs qui induisent la prolifération cellulaire, la progression du cycle cellulaire, l'inhibition de l'apoptose et l'interférence avec la réparation de l'ADN. De plus, il est bien établi que Tax-1 joue un rôle important dans l'oncogenèse induite par l'infection liée au virus HTLV-1. Ceci est confirmé suite à la mise en évidence de la capacité de Tax-1 à immortaliser et à transformer les lymphocytes T CD4 + primaires humains ¹³⁹ et la découverte que les souris transgéniques exprimant la protéine Tax-1 dans des thymocytes développent une maladie ressemblant à l'ATL ^{140,141}.

2.1 Rôle de Tax-1 dans la transactivation virale

La protéine Tax-1 active la transcription du génome viral à partir des LTR (**Figure 8**) ¹⁴². Le LTR est divisé en trois régions: U3, R et U5. Trois séquences répétitives de 21 pb dans la région U3 jouent le rôle d'amplificateurs sensibles à Tax (Tax responsive element, TRE). Chaque TRE de 21 pb est composé de trois éléments (l'élément fonctionnel et les éléments 5' et 3' de l'élément fonctionnel) indispensables pour la transactivation virale par Tax-1 ¹⁴³.

La séquence de base d'un TRE est très similaire à un élément de réponse à l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et agit en effet comme un site de liaison pour la famille des facteurs de transcription CREB (cAMP responsive element binding protein)/ATF (activating transcription factor) ^{144,145}. Ainsi, un TRE est également appelé un élément de réponse à l'AMPC viral (vCRE) et répond à l'AMPC. Les éléments 5' et 3' dans un TRE sont riches en GC. Bien que Tax-1 n'interagisse pas avec l'ADN TRE par elle-même, elle peut le faire lorsqu'elle interagit avec les protéines CREB/ATF capables de lier l'ADN ^{145,146}. Lorsque cela se produit, Tax-1 liée à l'ADN interagit avec la poche mineure des séquences adjacentes riches en GC pour stabiliser le complexe protéine-ADN ¹⁴⁷.

La protéine CREB est exprimée de façon ubiquitaire et régule plusieurs gènes cellulaires, en particulier des gènes induits par l'AMPC. Un signal initié par AMPC phosphoryle CREB au niveau de la Sérine 133, en recrutant deux co-activateurs de transcription, la protéine de liaison à CREB (CBP) et p300. Une étude transcriptomique *in vitro* basée sur la chromatine a indiqué que la phosphorylation de CREB est essentielle pour l'activité de Tax-1, en stabilisant le complexe Tax-1 / CREB / CBP / ADN. Par ailleurs, Tax-1 induit en soi la phosphorylation de CREB ¹⁴⁸. Conformément à cette observation, une substance qui augmenterait le niveau d'AMPC intracellulaire, et donc la phosphorylation de CREB, augmenterait l'activation de la transactivation virale par Tax-1.

CBP/p300 est une histone acétyltransférase qui acétyle les queues d'histone, changeant ainsi les structures de la chromatine pour activer la transcription. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que p300 est cruciale pour l'activation transcriptionnelle dépendant de Tax-1, où p300, en interaction avec Tax-1 et CREB, induit l'acétylation des histones nucléosomiques sur l'ADN TRE^{147,149}. De manière intéressante, le recrutement de p300 par Tax-1 à un promoteur HTLV-1 intégré réduit la quantité d'histone H1 et H3 sur l'ADN du promoteur, et stimule le recrutement de l'ARN polymérase II¹⁵⁰. Ce qui suggère que le recrutement de CBP / p300 au niveau du promoteur intégré acétyle des queues histones, en éliminant ainsi les histones du promoteur HTLV-1.

Le facteur associé au CBP/p300 (PCAF) est un co-activateur pour divers facteurs de transcription cellulaire, et il augmente également l'activation transcriptionnelle induite par Tax-1 par le promoteur HTLV-1. Comme le complexe CBP / p300, la protéine PCAF est aussi une histone acétyltransférase; cependant, son activité est accessoire pour la co-activation de Tax-1. Le mutant bien connu de Tax-1 M47 (L319R, L320S), qui est inactif pour l'activation transcriptionnelle du promoteur HTLV-1 mais actif pour celui de la voie NF-κB, est défectueux pour l'interaction avec la protéine PCAF.

Les lignées de cellules T infectées par HTLV-1 traitées avec un inhibiteur de l'histone désacétylase (HDAC), Trichostatine A (TSA), augmentent l'expression de l'ARNm Tax-1 / Rex ainsi que de la protéine Tax-1, suggérant que les HDAC peuvent inhiber la transcription du virus HTLV-1 dans les cellules infectées¹⁵¹. Conformément à cette hypothèse, HDAC1 et HDAC3 inhibent l'activation transcriptionnelle induite par Tax-1, et cette inhibition peut être restituée par le traitement à la TSA, un inhibiteur catalytique des HDACs ou l'expression de l'acétyltransférase CBP¹⁴⁸. HDAC1 et HDAC3 ont été montrés pour interagir avec Tax-1, et l'analyse par immunoprécipitation de la chromatine a montré que HDAC1 était associé à l'ADN proviral intégré du HTLV-1. La quantité de HDAC1 associé au promoteur est réduite par l'expression de Tax-1, indiquant que Tax-1, par interaction avec HDAC1, dissocie HDAC1 de l'ADN du promoteur intégré du virus HTLV-1.

Les TORC (Transducer of regulated CREB-binding proteins) et le P-TEFb (The positive transcription elongation factor) sont des régulateurs positifs supplémentaires pour l'activation du promoteur HTLV-1^{152,153}. Les deux protéines interagissent avec Tax-1; et l'inhibition de l'expression de l'une ou l'autre par petits ARN interférants (ARNi) réduit l'activation

transcriptionnelle dépendante de Tax-1. D'autre part, Bcl-3, en interagissant avec TORC3, agit comme un régulateur transcriptionnel négatif du promoteur LTR ¹⁵⁴.

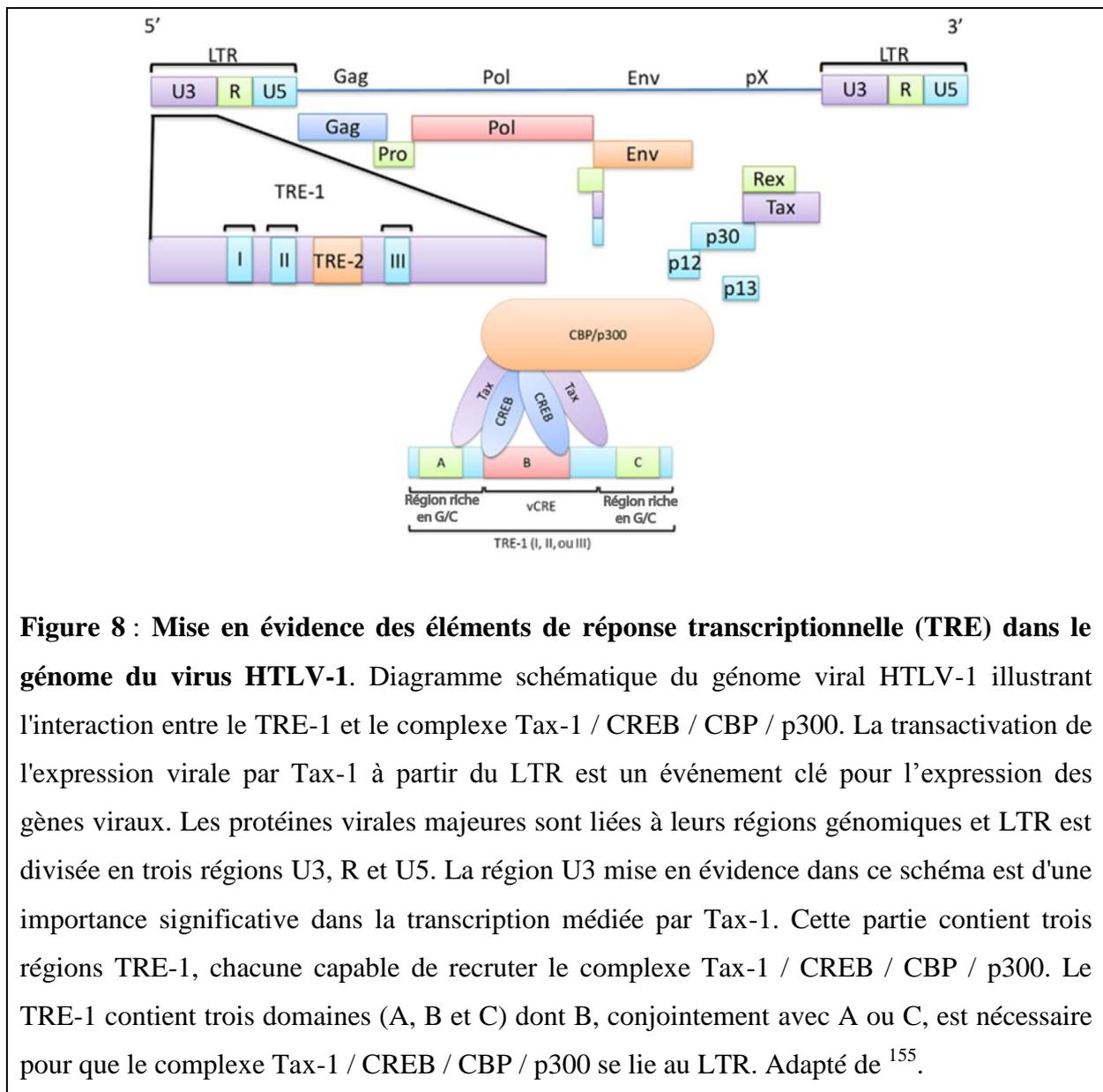


Figure 8 : Mise en évidence des éléments de réponse transcriptionnelle (TRE) dans le génome du virus HTLV-1. Diagramme schématisant du génome viral HTLV-1 illustrant l'interaction entre le TRE-1 et le complexe Tax-1 / CREB / CBP / p300. La transactivation de l'expression virale par Tax-1 à partir du LTR est un événement clé pour l'expression des gènes viraux. Les protéines virales majeures sont liées à leurs régions génomiques et LTR est divisée en trois régions U3, R et U5. La région U3 mise en évidence dans ce schéma est d'une importance significative dans la transcription médiée par Tax-1. Cette partie contient trois régions TRE-1, chacune capable de recruter le complexe Tax-1 / CREB / CBP / p300. Le TRE-1 contient trois domaines (A, B et C) dont B, conjointement avec A ou C, est nécessaire pour que le complexe Tax-1 / CREB / CBP / p300 se lie au LTR. Adapté de ¹⁵⁵.

2.2 Potentiel de transformation cellulaire de la protéine Tax-1

Tax-1 est capable de transformer des lymphocytes T et des fibroblastes et d'induire des tumeurs chez les souris transgéniques ^{141,156-158}. La capacité de Tax-1 à transformer les cellules T humaines primaires a également été démontrée pour la protéine Tax du virus HTLV-2 (Tax-2) ^{14,159}. Les deux protéines sont capables d'inhiber la fonction du suppresseur de tumeur p53. Une étude comparative entre les sous-types Tax-1 et Tax-2 a démontré que Tax-2A inhibe la fonction p53 moins efficacement que Tax-1 ou Tax-2B ¹⁶⁰. Bien que

plusieurs études *in vitro* aient étudié la capacité de Tax-1 à inactiver p53¹⁶¹ en agissant sur la voie CREB ou NF-κB, le mécanisme de cette inhibition n'a pas encore été complètement clarifié. Des recherches récentes ont permis d'identifier un rôle coopératif pour le facteur cellulaire Wip1 (phosphatase 1 induite par le p53 sauvage) dans l'inactivation de p53 par Tax-1; des recherches ultérieures ont démontré des interactions entre Tax-1 et Wip1¹⁶².

Dans des recherches utilisant des souris transgéniques exprimant Tax-1, qui développent une maladie comparable à l'ATL, il a été démontré que Tax-1 altère la fonction de p53 et que cet effet précède l'activation de NF-κB¹⁶³.

2.3 Activation de la voie NF-κB par Tax-1

La stimulation de l'activation de la voie NF-κB est l'une des principales conséquences de l'expression de Tax-1 dans les cellules infectées. La famille des facteurs de transcription inductibles NF-κB régule divers processus biologiques, y compris la croissance et la survie des cellules T et des cellules non lymphoïdes. L'activation des facteurs de transcription NF-κB se fait par deux processus de signalisation étroitement contrôlés connus sous le nom de voie canonique et non canonique NF-κB (**Figure 9**).

La voie canonique est activée par différents signaux récepteurs tels que les cytokines inflammatoires, le stress génotoxique, les antigènes et les récepteurs Toll-like (TLR). Alors que l'activation de la voie non canonique implique des molécules de signalisation qui ne sont reconnues que par un sous-ensemble spécifique de facteur de nécrose tumorale (TNFR), tels que la lymphotoxine-β, le BAFF (B-cell activating factor), le RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) et le TWEAK (TNF-related weak inducer of apoptosis)¹⁶⁴.

La famille des facteurs de transcription NF-κB comprend cinq membres: RelA/p65, c-Rel, RelB, p50 et p52. Les protéines p50 et p52 sont exprimées comme protéines précurseurs nommées p105 et p100, respectivement. Le traitement de ces précurseurs à des formes matures nécessite une activité protéasomique. Les cinq membres forment des dimères les uns avec les autres et peuvent se lier à une variété de séquences d'ADN cibles appelées sites κB pour moduler l'expression génique. P50 et p52 peuvent activer la transcription en formant des hétérodimères avec RelA / p65, c-Rel ou RelB. Dans le cytoplasme, les complexes NF-κB sont inactifs puisqu'ils sont liés à des protéines IκB inhibitrices (IκBα, IκBβ, IκBε, etc.). L'activation de la voie nécessite la dégradation de la protéine IκB et la translocation des

dimères NF- κ B vers le noyau. L'étape commune d'activation est médiée par le complexe IKK, qui phosphoryle I κ B et le dirige vers la dégradation protéasomique. Le complexe IKK est constitué de deux kinases actives, IKK α et IKK β , et de la protéine NEMO (IKK γ) régulatrice de l'échafaudage ¹⁶⁵.

Tax-1 interagit directement avec ces facteurs, conduisant à une activation persistante de la transcription médiée par NF- κ B. Tax-1 stimule l'activation de la voie canonique et non-canonique NF- κ B à travers l'interaction avec les facteurs IKK; L'interaction Tax-1 / IKK γ est requise pour le recrutement de Tax-1 sur les sous-unités catalytiques IKK et pour l'activation IKK par Tax-1 ¹⁶⁶.

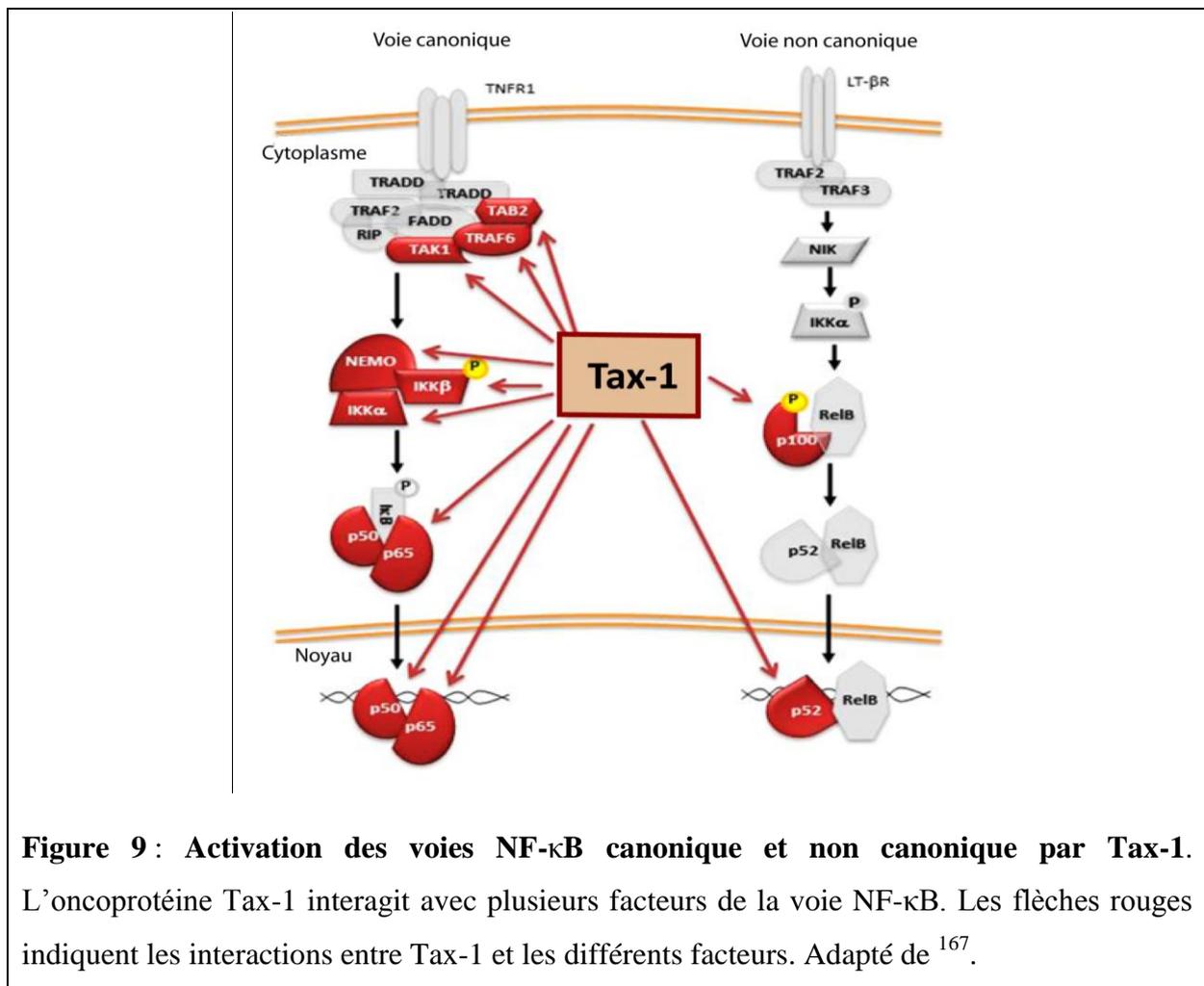


Figure 9 : Activation des voies NF- κ B canonique et non canonique par Tax-1. L'oncoprotéine Tax-1 interagit avec plusieurs facteurs de la voie NF- κ B. Les flèches rouges indiquent les interactions entre Tax-1 et les différents facteurs. Adapté de ¹⁶⁷.

D'autres protéines cellulaires sont importantes pour l'activation NF- κ B par Tax-1. Tax-1 interagit avec NRP / Optineurin et TAX1BP1 ^{168,169} et avec la peptidase spécifique de l'ubiquitine USP20 ¹⁷⁰. Des recherches ont démontré, d'une part, que Tax-1 favorisait l'expression de Bcl-3 et la translocation nucléaire de RelA / p65 ¹⁷¹. D'autre part, il a été

prouvé que Tax-1 induisait l'expression de Bcl-3 principalement par l'activation de la voie de NF- κ B¹⁷². De plus, il a été rapporté que Tax-1 transactivait CD69, un marqueur de l'activation précoce des lymphocytes, à travers les voies de signalisation NF- κ B et CREB¹⁷³.

L'activation de la voie non-canonique NF- κ B par médiation de Tax-1 est également importante dans la tumorigénèse induite par le virus HTLV-1. Une région de Tax-1 couvrant les acides aminés 225-232 est essentielle pour l'activation de la voie non canonique.

Contrairement à Tax-1, Tax-2 n'est pas capable d'activer la voie non canonique et n'interagit pas avec ou n'induit pas de protéolyse de p100 en p52^{174,175}. De plus, il a été démontré que Tax-2 ne pouvait pas interagir avec TRAF6, une protéine avec une activité de ligase E3 qui, en présence de Tax-1, régule positivement l'activation de la voie NF- κ B¹⁷⁶.

L'ubiquitination et la SUMOylation de Tax-1 sont aussi impliquées dans l'activation de la voie NF- κ B¹⁷⁷. La protéine Tax-1 co-immunoprécipite et co-localise avec IKK γ / NEMO, TAB2 et RelA / p65 dans des cellules transfectées^{166,178,179}. De plus, l'expression des protéines de Tax-1 induit la translocation nucléaire de IKK α et RelA / p65^{174,180}. Une suractivation de la voie NF- κ B par Tax-1 induit la sénescence cellulaire¹⁸¹. Il a été démontré récemment que l'activation chronique de la voie NF- κ B par Tax-1 entraîne une sénescence rapide (sénescence rapide induite par la Tax-1, Tax-1-IRS) qui dépend de l'activation de IKK α et p65 / RelA¹⁸⁰. Le phénomène Tax-1-IRS constitue une réponse de contrôle de l'hôte à la suractivation de la voie NF- κ B qui empêche la transformation cellulaire^{180,181} et représente un mécanisme de défense intéressant pour les cellules hôtes contre les activités de dérégulation de protéines virales.

2.4 Localisation cellulaire et extracellulaire de Tax-1

Tax-1 est connue pour son activité à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme des lymphocytes T transformés par HTLV-1. Ainsi, le trafic intracellulaire de Tax-1 est essentiel pour les effets pléiotropes de l'oncoprotéine, ce qui offre au virus HTLV-1 la capacité de moduler avec succès la transcription et la transformation cellulaire. Bien que les mécanismes de régulation précis de la distribution intracellulaire de Tax-1 nécessitent des recherches supplémentaires, des progrès majeurs ont été réalisés dans l'élucidation de la navette nucléocytoplasmique de Tax-1 et de ses fonctions associées^{182,183}.

2.4.1 Localisation nucléaire de Tax-1 et activation transcriptionnelle

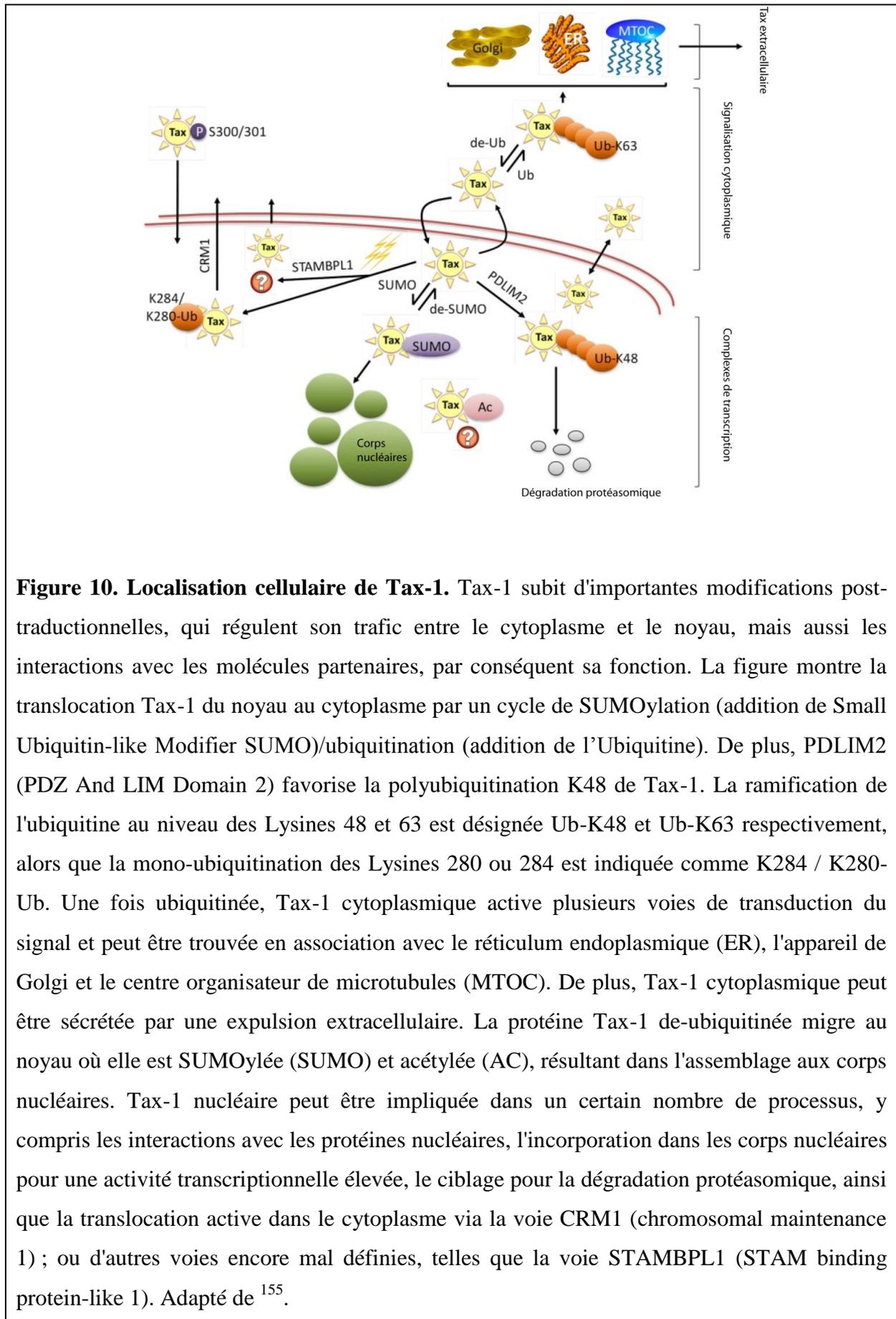
Disposant d'un signal de localisation nucléaire NLS (nuclear localization signal) au niveau des acides aminés 18-52 de son extrémité N-terminale, Tax-1 est principalement une protéine nucléaire ¹⁸⁴. Tax-1 nucléaire a été initialement identifiée comme étant des structures tachetées de Tax-1 TSS (Tax-1 speckled structures) dans des lymphocytes T transformés par HTLV-1 ou des cellules transfectées avec des vecteurs d'expression de Tax-1 ¹⁸⁵. Ces foyers distincts ont été définis par la suite comme des corps nucléaires NBs (nuclear bodies) de Tax-1 ¹⁸⁶. Dans la partie centrale de Tax-1, on trouve une séquence d'exportation nucléaire NES (nuclear export sequence) aux acides aminés 188-202, qui s'étend sur une région riche en résidus leucine. Lorsqu'elle est fusionnée à la protéine GFP, la NES recombinante oriente l'exportation nucléaire via la voie CRM1, mais cet effet n'était pas observé dans les cellules infectées par HTLV-1. Cela suggère que la protéine complète Tax-1 utilise une voie d'exportation nucléaire alternative ; et que la présence de NES et de NLS doit potentiellement être combinée avec des modifications post-traductionnelles, conduisant à des changements de conformation ou à des interactions macromoléculaires ¹⁸⁷.

Par ailleurs, la formation d'homodimères de Tax-1 joue un rôle dans le transport nucléaire. De fait, les protéines Tax-1 mutantes sont incapables de dimériser et ne peuvent pas se localiser dans le noyau. Cette localisation peut être retrouvée une fois l'activité de dimérisation de Tax-1 restaurée ^{188,189}. La dimérisation de Tax-1 dépend de la région centrale englobant les acides aminés 127-228 qui peut être, en outre, divisée en trois domaines de sous-dimérisation (DD) : DD1 (acides aminés 127-146), DD2 (acides aminés 181 à 194) et DD3 (acides aminés 213-228) ¹⁹⁰. Ceci révèle une interaction complexe de la structure primaire et secondaire avec les facteurs contrôlant la localisation cellulaire. De plus, un domaine supplémentaire de Tax-1 a été identifié pour jouer un rôle dans le ciblage spécifique sous-nucléaire de l'oncoprotéine ¹⁸⁹. La région du signal de localisation dans les TSSs (TSLs) s'étend sur les acides aminés 50-75, est nécessaire et suffisante pour diriger Tax-1 vers les TSSs. De manière intéressante, le TSLs est un domaine de régulation distinct et indépendant du domaine adjacent NLS. Les modifications post-traductionnelles (MPTs) de la protéine Tax-1 fournissent une couche supplémentaire de complexité dans la régulation de la distribution cellulaire de la protéine et le modèle correct de ces MPTs spécifiques est connu pour influencer la localisation nucléaire de Tax-1. En conséquence, il a été suggéré que Tax-1 non modifiée a la capacité d'emprunter librement la navette nucléo-cytoplasmique ¹⁷⁷. Dans ce sens, l'équilibre entre l'ubiquitination

et la SUMOylation joue un rôle majeur dans l'activation de la voie NF- κ B par Tax-1 et participe à la localisation subcellulaire de l'oncoprotéine ¹⁹¹. Cet équilibre entre l'ubiquitination et la SUMOylation sur les résidus de lysines C-terminales détermine la répartition de Tax-1 dans les compartiments nucléaire et cytoplasmique. En effet, Tax-1 SUMOylée prédomine dans le noyau alors que Tax-1 ubiquitinée se localise principalement dans le cytoplasme ¹⁹². Parmi les autres fonctions induites par l'ubiquitination Tax-1, nous pouvons citer l'interaction avec la E3 ubiquitine ligase PDLIM2, qui est responsable de la polyubiquitination liée à K48 de Tax-1 ¹⁹³. En réponse à divers stress génotoxiques ou cellulaires, la monoubiquitination des lysines 280 et 284 de Tax-1 conduit à son exportation nucléaire dépendant de CRM1 ¹⁹². De même, l'attachement de SUMO-1 à Tax-1 régule sa localisation dans les NBs et, par conséquent, Tax-1 polySUMOylée est localisée seulement dans ces structures. On estime que la somoylation régule la rétention de Tax-1 dans le noyau ¹⁷⁷ (**Figure 10**).

De plus, il a été démontré que la forme acétylée de Tax-1 peut être détectée dans les cellules exprimant Tax-1 ainsi que dans les lymphocytes T transformés par HTLV-1, un événement qui a des répercussions d'activation transcriptionnelle. Cette forme de Tax-1 modifiée et l'agent d'acétylation p300, sont détectés comme étant co-localisés dans le noyau ^{194,195}. Par ailleurs, la phosphorylation des résidus Ser 300 et 301 est critique pour la migration nucléaire de Tax-1 phosphorylée ¹⁹⁵.

Une étude utilisant les ARNs interférants a identifié la métalloprotéase STAM-binding protein-like 1 (STAMBPL1) comme régulateur du transport nucléo-cytoplasmique de Tax-1. STAMBPL1 est une enzyme de de-ubiquitination qui stabilise Tax-1 en empêchant sa dégradation protéasomal dans le noyau ¹⁹⁶. En outre, l'enzyme est un facteur nécessaire pour l'exportation nucléaire de Tax-1 liée au dommage à l'ADN, ce qui illustre bien la dynamique de localisation de Tax-1 après les dommages à l'ADN ^{192,196}. Une étape supplémentaire pour la relocalisation de Tax-1 dans le noyau implique des interactions avec les protéines appelées nucléoporines dans les structures du complexe de pores nucléaires (NPC) ¹⁹⁷. Plus exactement, on a observé l'interaction du domaine N-terminal en doigt de zinc de Tax-1 avec la nucléoporine p62, qui est un événement d'importation indépendant des transporteurs de protéines et ne consommant pas d'énergie.



2.4.2 Localisation cytoplasmique de Tax-1 et manipulation des voies cellulaires

Comme décrit précédemment, la présence de Tax-1 dans le cytoplasme et dans le noyau peut être nécessaire pour l'activation de l'expression génétique médiée par Tax-1¹⁹⁸. La surexpression de Tax entraîne une répartition intracellulaire hétérogène qui peut être diffuse, ponctuelle ou localisée dans des structures lipidiques associées à l'appareil de Golgi^{177,179,195,199}. En plus de sa localisation dans les granules de stress, Tax-1 peut inhiber la formation de ceux-ci. Cette inhibition dépend de la localisation cellulaire de Tax-1. En effet, l'inhibition de la formation de granules de stress est observée lorsque Tax-1 est localisé dans le cytoplasme²⁰⁰.

Le centre d'organisation des microtubules (MTOC), en association avec le cis-Golgi, a été décrit comme un site extranucléaire exclusif pour la localisation de Tax-1, conjointement avec la région de contact cellule-cellule de la synapse virologique¹²⁴. En outre, Tax-1 a été détecté en association avec des foyers cytoplasmiques contenant TAB2 (TAK1-binding protein 2)^{177,179,201} et avec la structure du centrosome²⁰². Comme indiqué précédemment, l'état post traductionnel de Tax-1 a un effet significatif sur sa fonctionnalité et sa localisation. Pour illustrer davantage ce point, la SUMOylation et l'ubiquitination concourent pour les mêmes résidus Lysine qui chevauchent et qui se traduit par des effets de régulation opposés. Par exemple, les molécules de Tax-1 et d'ubiquitine colocalisées ont été détectées exclusivement dans le cytoplasme, tandis que cette co-localisation a été faiblement détectée dans le noyau. Ce qui est éventuellement dû à une dégradation protéasomique rapide ou à une navette d'exportation vers le cytoplasme¹⁹². On pense que l'ubiquitination contrôle la rétention de Tax-1 dans le cytoplasme¹⁷⁷. D'autres modifications post-traductionnelles de Tax-1 dans le cytoplasme comme la phosphorylation représentent un prérequis pour l'ubiquitination cytoplasmique de la protéine, en plus de l'acétylation et de la SUMOylation^{194,195}. Similaire aux conditions d'importation nucléaire de Tax-1, l'exportation de Tax-1 dans le cytoplasme s'est avérée être indépendante des transporteurs¹⁹⁷. Une étude a décrit l'interaction entre Tax-1 et l'histone méthyltransférase SMYD3, où SMYD3 contribue à la présence préférentielle de Tax-1 dans le cytoplasme²⁰³. De même, une nouvelle étude a identifié un enrichissement du cytoplasme à partir du noyau dépendant de RNF4, ce qui a pour résultat une suractivation de la voie NF-κB et une diminution de l'activité de Tax-1 médiée par CREB. De plus, il a été décrit que la délétion sélective de RNF4 inhibait le transfert nucléo-cytoplasmique de Tax-1, habituellement induit par les dommages à l'ADN²⁰⁴.

2.4.3 Localisation extracellulaire de Tax-1

Peu de choses sont connues au sujet de la sécrétion de l'oncoprotéine Tax-1 par les cellules infectées par HTLV-1. Toutefois, Tax-1 extracellulaire contribuerait à l'apparition des symptômes de l'ATL et de la TSP/HAM. Chez les patients atteints d'une TSP/HAM, Tax-1 a été montré pour hyperstimuler le système immunitaire²⁰⁵⁻²⁰⁷. De plus, des études sur Tax-1 extracellulaire ont estimé la capacité du virus HTLV-1 à provoquer une démyélinisation et une inflammation des cellules du système nerveux central (CNS)²⁰⁸. En effet, les cellules T infectées sont une source de Tax-1 extracellulaire, car elles infiltrerent le SNC pendant une maladie neurologique²⁰⁹⁻²¹¹.

Tax-1 a été démontré pour co-localiser avec des organites cytoplasmiques qui sont impliqués dans la voie exocytotique comme le complexe de Golgi et le réticulum endoplasmique (ER). De plus, ces études ont montré un mouvement de Tax-1 cytoplasmique couplé à une migration de protéines associées aux microtubules ou à celle des vésicules sécrétoires²⁰⁸. Par ailleurs, la présence de la protéine Tax-1 a été confirmée dans le milieu de culture de cellules exprimant Tax-1 et dans les exosomes¹²⁷.

2.4.4 Localisation de Tax-1 lors de la transmission par contact cellule-cellule

Les virions HTLV-1 libres, qui ne sont pas détectés dans le sérum de sujets infectés avec les techniques actuellement disponibles, sont peu infectieux²¹². La transmission efficace dépendrait donc plutôt du contact direct cellule-cellule, de la polarisation du centre organisateur de microtubules (MTOC) qui est déclenchée par Tax-1 et la formation d'une synapse virologique permettant l'entrée de protéines virales ainsi que l'ARN génomique dans un nouveau lymphocyte T cible²¹³.

2.5 Interactome de Tax-1

L'étude des interactions protéine-protéine est une stratégie efficace pour déchiffrer les fonctions de la protéine Tax-1 et de sa capacité à perturber la régulation des voies cellulaires. Nous résumons ci-dessous la littérature à propos des interactions entre Tax-1 et des protéines impliquées dans régulation de l'expression des gènes, la signalisation cellulaire, le cycle cellulaire et le transport des protéines cellulaires. Nous décrivons plus en détail l'interaction entre la protéine Tax-1 et les protéines cellulaires possédant un ou plusieurs domaines PDZ (

PSD95 (postsynaptic density 95), DLG1 (discs large homolog-1) et ZO1 (zonula occludens protéine-1)). .

2.5.1 Interactions de Tax-1 avec les facteurs de transcription et les régulateurs post-transcriptionnels

Tax-1 dérègle l'expression de plus d'une centaine de gènes grâce à des interactions avec des activateurs transcriptionnels, des facteurs de transcription basale et des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine. De plus, Tax-1 s'associe à des protéines impliquées dans le contrôle post-transcriptionnel des ARNm et module en outre l'expression génique ²¹⁴.

Tax-1 interagit avec des activateurs et des répresseurs de la transcription. En effet, Tax-1 présente une faible affinité pour l'ADN et ne se lie pas directement à l'élément TxRE ²¹⁵, mais interagit avec les facteurs de transcription de CREB/ATF ²¹⁶. De plus, Tax-1 se lie également aux protéines co-activatrices de CREB appelées transducteurs de l'activité régulée de CREB (TORCs) ^{152,217}. Tax-1 active une variété de gènes cellulaires par ses interactions avec les protéines CREB / ATF, par exemple celles codant pour l'interleukine 17 ou c-fos ^{218,219}. Inversement, Tax-1 réprime également l'expression de gènes comme la cycline A, p53 et c-myc en ciblant les facteurs CREB / ATF ²²⁰⁻²²².

Tax-1 active la transcription des promoteurs sous le contrôle de motifs SRE (serum response element) ^{219,223,224} sans liaison directe à l'ADN mais par des interactions avec des facteurs de transcription associés à la voie SRF (serum response factor). Il a été démontré que Tax-1 se liait directement à SRF [59-61] et à divers membres du complexe TCF (ternary complex factor) tel que Sap1 (SRF accessory protein 1), Elk1 (ETS domain-containing protein Elk-1), Spi1 (SFFV proviral integration oncogene 1) et Ets1 (protein C-ets-1) ²²⁵⁻²²⁷. L'interaction de Tax-1 avec le SRF entraîne une augmentation de la liaison du SRF au SRE et une sélection du site modifiée ²²⁸. Ainsi, cette augmentation de la liaison à l'ADN permet le recrutement des co-activateurs ²²⁹. Par ailleurs, le répresseur transcriptionnel MSX2 (msh homeobox homolog 2) se lie à Tax-1 et réprime sa transactivation ²³⁰.

Parmi les facteurs nucléaires ciblés par Tax-1, nous pouvons citer les facteurs nucléaires κ B (NF- κ B). De manière générale l'activation NF- κ B, implique la phosphorylation des inhibiteurs I κ B par la kinase I κ B (IKK), ce qui déclenche leur ubiquitination et la dégradation protéasomique subséquente, entraînant la translocation nucléaire des dimères NF- κ B ^{231,232}.

Tax-1 s'associe à RelA, c-Rel, p50 et p52 après leur translocation dans le noyau²³³⁻²³⁵, mais recrute directement aussi RelA à partir du cytoplasme^{177,236}. Après l'interaction avec ces facteurs NF-κB, Tax-1 augmente leur dimérisation qui est essentielle pour la liaison à des promoteurs cibles^{233,235,237}. Lorsque le complexe est lié au promoteur, Tax-1 recrute les co-activateurs de CBP/p300 et PCAF^{198,238}, conduisant à l'activation transcriptionnelle.

Outre les facteurs NF-κB, Tax-1 cible aussi d'autres facteurs de transcription. En s'associant à des protéines de liaison CCAAT telles que NF-YB (sous-unité YB de facteur nucléaire) et C/EBPβ (CCAAT / protéine de liaison à l'amplificateur β)^{239,240}, Tax-1 active le promoteur du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II²⁴¹. De plus, Tax-1 forme des complexes ternaires *in vitro* avec Sp1 (protéine de spécificité 1)/Egr1 (réponse de croissance précoce 1)²⁴² et Sp1/Ets1 (Protein C-ets-1)²²⁶, participant ainsi directement à l'activation transcriptionnelle du proto-oncogène c-sis/PDGF-B (- facteur de croissance B dérivé des plaquettes) et des promoteurs P2 PTHrP (protéine apparentée à l'hormone parathyroïdienne), respectivement^{243,244}. Par ailleurs, Tax-1 s'associe au facteur respiratoire nucléaire 1 (NRF1) et active le promoteur du récepteur de chimiokine CXCR4²⁴⁵. Tax-1 interagit également avec les facteurs de la transcription basale. Ainsi, Tax-1 interagit avec TFIIA (facteur de transcription II A) et avec deux sous-unités de TFIID: TBP (TATAA-binding protein) et TAFII28 (TBP-associated factor II 28)^{246,247}. Grâce à cette interaction, Tax-1 augmente la liaison du TBP au site TATAA et stimule davantage l'initiation de la transcription à partir du LTR²⁴⁸. De plus, Tax-1 interagit directement et recrute plusieurs protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine pour moduler la transcription génique. En effet, Tax-1 interagit avec plusieurs HATs (histone acetyltransferases): p300, son homologue CBP (protéine de liaison à CREB) et le facteur associé à p300/CBP (P / CAF)^{109,249}. Parmi les trois histone-désacetylases HDAC (-1, -2 et -3) interagissant avec le LTR virale dans les lignées cellulaires infectées, Tax-1 se lie directement à HDAC1²⁵⁰. HDAC6 a été décrit pour son activité nécessaire à l'assemblage des granules de stress²⁵¹. Grâce à son interaction avec HDAC6, la protéine Tax-1 peut ainsi inhiber l'assemblage des granules de stress²⁰⁰. L'oncoprotéine est capable d'interagir avec les deux enzymes impliquées dans la régulation de la méthylation de H3K9: SUV39H1 (suppresseur de la variété 3-9 homologue 1), qui est une HMT (histone méthyltransferase) et JMJD2A (Jumonji contenant le domaine 2A), qui est une HDM (histone déméthylase)^{252,253}. Tax-1 lie aussi les différentes composantes du complexe SWI/SNF: BRG1, BAF 53, 57 et 155²⁵⁴.

Afin de contrôler la transcription virale, Tax-1 agit sur les facteurs d'élongation de la transcription tels que P-TEFb (Facteur d'élongation b de la transcription positive). Tax-1 recrute P-TEFb au promoteur viral et induit l'activation transcriptionnelle^{153,255}. De plus, l'oncoprotéine virale fonctionne comme un répresseur transcriptionnel général des récepteurs nucléaires tels que les récepteurs des glucocorticoïdes (GR)²⁵⁶. Tax-1 réprime la signalisation GR en dissociant Tax1BP1 du complexe contenant la protéine récepteur²⁵⁷.

Enfin, l'expression des gènes dirigés par Tax-1 est régulée au niveau post-transcriptionnel et traductionnel par des interactions protéine-protéine. Parmi ceux-ci, Tax-1 s'associe à TTP, Int6 et TRBP²⁵⁸⁻²⁶⁰.

2.5.2 Interactions de Tax-1 avec les protéines impliquées dans la signalisation cellulaire

La voie NF- κ B peut être activée par une série de stimuli tels que des antigènes ou des cytokines qui déclenchent deux voies alternatives (dites canoniques et non canoniques). Tax-1 stimule les voies canoniques et non canoniques, et active constitutivement NF- κ B dans les cellules infectées par le HTLV-1^{166,174,261}. Dans la voie canonique, Tax-1 s'associe à la sous-unité IKK γ / NEMO^{262,263} ainsi qu'aux kinases en amont telles que la MAPK / ERK kinase kinase 1 (MEKK1) et la kinase 1 activant le TGF- β (TAK1)^{264,265}. Tax-1 relie ainsi les kinases activées au complexe IKK et force la phosphorylation de IKK α et IKK β menant à la dégradation de I κ B α et I κ B β ^{262,263}. De plus, Tax-1 se lie directement aux sous-unités IKK α et IKK β et active leur activité kinase indépendamment des kinases amont²⁶⁶. Tax-1 interfère avec la voie canonique NF- κ B par sa liaison directe aux I κ Bs et leur dégradation indépendamment de la phosphorylation d'IKK^{267,268}. De plus, Tax-1 interagit avec deux sous-unités du protéasome 20S (HsN3 et HC9), favorise l'ancrage de p105 et accélère sa protéolyse²⁶⁹. Tax-1 conduit à la dégradation de I κ B, permettant ainsi la translocation nucléaire de NF- κ B indépendamment des stimuli externes. Par ailleurs, l'activation de la voie non canonique par Tax-1 nécessite son interaction avec IKK γ et p100^{174,261}. Tax-1 se lie aux protéines PP2A et IKK γ et maintient le complexe IKK dans un état actif qui est nécessaire pour l'activation NF- κ B^{270,271}. De son côté, l'ubiquitination est visée par Tax-1 via l'interaction avec Ubc13 et Tax1BP1^{272,273}. Par perturbation du complexe A20-Tax1BP1, Tax-1 inactive la fonction DUB (deubiquitinase) de A20 et empêche la régulation négative de l'ubiquitination IKK γ ^{273,274}.

Les MAPKs (kinases activées par des mitogènes) sont des protéines kinases spécifiques de sérine / thréonine qui répondent à des stimuli externes de mitogènes tels que des facteurs de croissance, des cytokines ou un stress physique. Tax-1 interagit avec les deux MAP3K, MEKK1 et TAK1 ^{264,265}. Tax-1 se lie à l'extrémité amino-terminale de MEKK1 et stimule l'activité de la kinase MEKK1 ²⁶⁴. De ce fait, l'expression de Tax-1 augmente l'activité IKK β , conduisant à la phosphorylation et la dégradation de I κ B α . Par ailleurs, Tax-1 stimule l'activité IKK en reliant TAK1 sur le complexe IKK ^{275,276}; et grâce à son interaction avec le suppresseur de la voie de la protéine G2 (GPS2), Tax-1 inhibe potentiellement l'inactivation de la signalisation JNK par le GPS2 ²⁷⁷.

Les protéines de liaison aux nucléotides guanines (GTPases) sont des commutateurs moléculaires qui se déplacent entre des états actifs (liés à GTP) et inactifs (liés à GDP). D'un côté, Tax-1 se lie avec la sous-unité β des protéines G hétérotrimériques ²⁷⁸ et avec plusieurs membres de la petite famille des Rho GTPases tels que RhoA, Rac, Gap1m et Cdc42 ²⁵⁴. De l'autre côté, Tax-1 se lie aux protéines impliquées dans la structure et la dynamique du cytosquelette: α -internexine, cytokératine, actine, gelsoline, annexine et γ -tubuline ^{202,254,279,280}. Grâce à ces interactions, Tax-1 pourrait ainsi relier Rho GTPases à leurs cibles et affecter l'organisation du cytosquelette. De ce fait, Tax-1 fournit un signal intracellulaire qui se synergise avec l'action d'ICAM1 pour provoquer la polarisation des microtubules des cellules T et la formation de la synapse virologique ¹²⁴.

La phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et son effecteur en aval Akt jouent un rôle central dans la régulation du métabolisme des nutriments, de la survie cellulaire, de la motilité, de la prolifération et de l'apoptose ²⁸¹. Tax-1 cible p85 α et perturbe le complexe p85 α /p110 α conduisant à une activité accrue de PI3K ²⁸², une phosphorylation d'Akt Ser473, une activation d'AP1 et finalement une prolifération cellulaire ²⁸³.

Tax-1 inhibe la signalisation Smad-dépendante, favorisant ainsi la résistance des cellules infectées par HTLV-1 au TGF β ²⁸⁴⁻²⁸⁶. Cette inhibition est médiée par l'interaction de Tax1 avec l'extrémité C terminale de Smad2, Smad3 et Smad4 ²⁸⁶. Grâce à ces interactions, Tax-1 inhibe la complexation et la liaison à l'ADN des Smad3-Smad4 ^{284,286}.

Les protéines appartenant à la famille des substrats associés à Crk (Cas) sont des molécules adaptatrices et d'échafaudage. Elles contrôlent spatialement et temporellement la transduction des signaux en aval des intégrines, des récepteurs de la protéine tyrosine kinase, des

récepteurs des oestrogènes et des GPCR. Parmi les protéines Cas, Tax-1 s'associe à p130Cas et CasL. Les interactions Tax-1 et CasL se traduisent par une motilité accrue des lymphocytes exprimant Tax-1 en réponse à la fibronectine et au CD3²⁸⁷.

2.5.3 Interactions de Tax-1 avec des protéines associées au cycle cellulaire

La progression du cycle cellulaire est un processus étroitement régulé et contrôlé par des cyclines associées aux kinases cycline-dépendantes (CDK)²⁸⁸. Tax-1 reprogramme la progression du cycle cellulaire, en particulier la transition G1/S, par différents mécanismes liés à l'activation ou à la répression transcriptionnelle, aux modifications post-traductionnelles et aux interactions protéine-protéine^{289,290}. Tax-1 est capable d'interagir avec les cyclines-D1, -D2 et -D3 ainsi qu'avec CDK4 et CDK6^{291,292}. De plus, Tax-1 s'associe également à p15INK4b et p16INK4a et neutralise leur activité inhibitrice de CDK4^{293,294}. Grâce à ces interactions, Tax-1 stabilise le complexe cycline D2/CDK4 et améliore son activité kinase, conduisant à l'hyperphosphorylation de la protéine rétinoblastome (Rb). Par ailleurs, Tax-1 peut se lier et cibler Rb pour la dégradation protéasomique²⁹⁵.

Les agressions de l'ADN et le stress de réplication activent la voie de réponse aux dommages à l'ADN (DDR) dans les phases S et G2/M du cycle cellulaire²⁹⁶. Tax-1 lie Rad51²⁵⁴ et l'ADN topoisomérase 1²⁹⁷ qui sont tous deux directement impliqués dans les processus de réparation de l'ADN^{296,298}. De plus, Tax-1 s'associe et co-localise avec les protéines Chk1 (point de contrôle kinase 1) et Chk2 (point de contrôle kinase 2)^{299,300}. Tax-1 cible donc plusieurs composants de la voie de réparation des dommages à l'ADN et favorise les anomalies de l'ADN.

L'une des caractéristiques des cellules exprimant Tax-1 en particulier dans l'ATL est l'instabilité chromosomique et l'aneuploïdie sévère³⁰¹, ce qui suggère que les mécanismes de surveillance de la ségrégation chromosomique pendant la mitose sont subvertis par Tax-1. De fait, Tax-1 interagit avec 4 protéines impliquées dans l'amplification du centrosome ou dans le point de contrôle d'assemblage de broches mitotiques (SAC). Tax-1 co-localise avec le centrosome pendant la mitose et provoque l'amplification des centrosomes par interaction physique avec la protéine de liaison Ran/Ran 1 (RanBP1) et Tax1BP2^{302,303}. La segmentation du centrosome nécessite l'interaction directe Tax-1/RanBP1 et la capacité de Tax-1 à transactiver NF-κB. On pense que Tax1BP2 prévient la sur-réplication anormale des centrosomes et donc l'aneuploïdie^{304,305}. Grâce à des interactions physiques avec Mad1 et

Cdc20, Tax-1 subvertit l'activation de SAC et APC/C (complexe promoteur d'anaphase/cyclosome) [256]. L'activation prématurée de l'APC/C par Tax-1 induit un arrêt et une sénescence G1 permanente^{306,307}.

2.5.4 Interactions de Tax-1 avec les pores nucléaires et les protéines de la voie sécrétoire

La navette de Tax-1 entre le cytoplasme et le noyau est régie par une séquence de localisation nucléaire (NLS) et par un signal d'exportation nucléaire (NES)^{184,187}. Cette navette est médiée par l'interaction avec des protéines impliquées dans l'importation nucléaire, l'exportation cytoplasmique et les voies sécrétoires^{201,308}.

En conclusion, plus de 200 protéines cellulaires ont été décrites comme partenaires de Tax³⁰⁹⁻³¹¹. Tax-1 est en effet une protéine de structure désordonnée. Contrairement à la plupart des protéines cellulaires qui adoptent une structure fixe et stable, les protéines de structure désordonnée possèdent de petits motifs qui leur confèrent une flexibilité permettant d'établir un nombre élevé d'interactions avec divers partenaires. Ces motifs linéaires courts (SLiM) sont retrouvés dans des protéines eucaryotes et sont répartis dans ~ 150 différentes classes, dont plus d'un tiers sont également retrouvés dans de protéines codées par divers virus³¹². Les SLiM participent donc aux stratégies utilisées par des virus pour détourner la machinerie cellulaire de l'hôte à leur avantage. En effet, les SLiMs sont utilisés par des virus comme motifs d'entrée, de propagation et de perturbations des voies de signalisation de la cellule hôte. Nous intéressons particulièrement à un SLiM de séquence ETEV qu'on retrouve à l'extrémité carboxyl terminal de Tax-1 et qui lui permet d'interagir avec des protéines cellulaires possédant un domaine PDZ. Ce motif est donc dénommé PBM pour *PDZ binding motif*.

2.6 Interaction de Tax-1 avec des protéines contenant un ou plusieurs domaines PDZ

Différentes protéines à domaines PDZ sont connues pour former un complexe avec Tax-1 en raison de son motif (ETEV) de liaison aux PDZ appelé PBM (PDZ Binding Motif) situé dans l'extrémité C terminale³¹³. L'interaction de Tax-1 avec ces protéines PDZ conduit fréquemment à leur délocalisation³¹⁴⁻³¹⁶. Une protéine liant Tax-1, DLG1 (disc Large homolog 1), a été particulièrement étudiée en raison de sa capacité à agir comme un suppresseur de tumeur. DLG1 agit en aval de la voie Wnt / frizzled et se lie au complexe de

polypose adénomateuse (APC) qui régule la progression du cycle cellulaire ^{317,318}. La formation de complexe APC-DLG1 régule négativement la transition G1 à S et joue un rôle important dans la transduction du signal de blocage du cycle cellulaire APC ³¹⁷. Grâce à l'interaction PBM/domaine PDZ, Tax-1 induit l'hyperphosphorylation de DLG1, affecte sa localisation ³¹⁶ et empêche sa liaison à APC ³¹⁹.

2.6.1 Ciblage des domaines PDZ par d'autres PBM viraux

Les motifs PBM sont sélectivement présents dans d'autres virus pathogènes, mais pas leurs parents non pathogéniques. Par exemple, les papillomavirus humains (HPV) ont des sous-types à risque élevé tels que HPV16 et 18 qui sont associés à des tumeurs malignes telles que le carcinome cervical, et des sous-types à faible risque tels que HPV6 et 11 qui sont associés uniquement aux maladies hyperplasiques bénignes. Les oncoprotéines E6 des HPV à haut risque, mais pas celles à faible risque, possèdent des motifs PBM. Une association similaire d'un PBM avec une oncogénèse spécifique d'un sous-type viral est également observée pour l'adénovirus humain de type 9, qui provoque des tumeurs mammaires chez le rat. Il est à noter que les PBM provenant de E6 du HPV et de E4-ORF1 de l'adénovirus peuvent remplacer le PBM de Tax-1 en permettant à Tax-1 de transformer les cellules CTLL-2. Cette observation suggère que les fonctions de ces PBM viraux et les protéines à domaines PDZ avec lesquelles elles interagissent sont identiques, et que ces trois virus oncogènes utilisent un mécanisme commun pour induire des tumeurs malignes ^{320,321}. Les mêmes conclusions peuvent être déduites en analysant des séquences PBM d'autres virus pathogènes humains.

Le virus de l'hépatite C (HCV) est le facteur de risque commun pour le carcinome hépatocellulaire. Pour l'entrée du virus et la transmission cellule-cellule, le virus utilise principalement la dépolarisation de l'épithélium hautement polarisé du foie ³²². L'expression de la protéine nucléocapsidique du HCV perturbe la polarité apico-basale des épithéliums polarisés et conduit à la dérégulation des composants du complexe de polarité contenant la protéine PDZ SCRIB. Elle influence également l'expression et la localisation des deux protéines à domaines PDZ, DLG1 et SCRIB ³²³. En outre, il a été rapporté que la séquence de la protéine non structurale NS4B, mal caractérisée, contient un motif PBM de classe I (X-T/S-X-C); cependant, il n'existe pas encore de preuve expérimentale qui soutienne l'interaction entre les protéines PDZ et NS4B ³²⁴.

Le virus de l'hépatite B (HBV) est un autre virus dont l'infection du foie provoque une hépatite aiguë et chronique avec un risque accru de développer un carcinome hépatocellulaire. Comme la protéine nucléocapsidique du HCV, les activités de la protéine nucléocapsidique du HBV (HBVc) sont liées à la pathogénicité virale. Des protéines à domaines PDZ telles que GIPC1 (ou TIP-2) ont été révélées comme partenaires de HBVc. L'interaction de HBVc avec GIPC1 est médiée par son PBM, qui présente des similitudes de séquence avec d'autres ligands de GIPC1³²⁵. Le HBVc peut également se lier via son PBM à la protéine tyrosine phosphatase non-récepteur PTPN3. Cependant, le rôle précis de cette association dans la pathogénèse du HBV n'est pas connu.

L'herpèsvirus du sarcome de Kaposi KSHV (herpèsvirus humain 8) est l'agent étiologique du sarcome de Kaposi, du lymphome d'épanchement primaire et de la maladie de Castleman multicentrique. De plus, les cancers induits par le KSHV sont particulièrement fréquents chez les patients atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Le virus KSHV agit sur l'expression de la protéine à domaine PDZ PDLIM2, afin de déréguler les voies cellulaires dépendantes de NF- κ B et de STAT3³²⁶.

Le HIV-1 est un lentivirus qui infecte plusieurs types de cellules immunitaires, mais principalement des lymphocytes T CD4 + positifs. Le HIV-1 provoque le SIDA, une affection caractérisée par l'immunosuppression et les patients atteints du SIDA courent un risque élevé d'infections microbiennes opportunistes. Plusieurs interactions de protéines du HIV-1 avec les protéines à domaines PDZ de l'hôte ont été décrites. Entre autres, la protéine Gag du HIV-1 interagit avec différentes protéines à domaines PDZ, telles que PDZD8 et DLG1³²⁷⁻³²⁹.

L'Adénovirus de type 9 (Ad9) est un virus humain couramment associé à des infections oculaires bénignes, mais causant des tumeurs mammaires chez les rats en présence de niveaux élevés de l'hormone œstrogène³³⁰. L'oncogénicité d'Ad9 est déterminée par la seule fonction de la région E4 du gène ORF1 (E4ORF1)³³¹. Trois régions de E4ORF1 sont importantes dans la transformation cellulaire, y compris une région C-terminale contenant un PBM. Il a été démontré que E4ORF1 pouvait se lier à un certain nombre de protéines contenant un domaine PDZ, telles que DLG1, MAGI1, MUPP1, PATJ et ZO2³³²⁻³³⁵.

Le virus de la rage est un rhabdovirus neurotrope qui cause une encéphalite mortelle chez les mammifères. La glycoprotéine de l'enveloppe virale est dotée d'un motif PBM de classe I à son extrémité C terminale (QTRL). Il a été rapporté que la survie ou la mort des neurones

infectés par le virus de la rage dépend de quelles protéines PDZ cellulaires sont capables de lier le PBM de la protéine virale. Le PBM de la glycoprotéine du type sauvage virus (virulent) interagit avec le domaine PDZ de deux serine-thréonine kinases MAST1 et MAST2 pour médier à la fois l'activation de la voie AKT antiapoptotique et la survie neuronale. *A contrario*, la glycoprotéine G du virus de la rage atténué avec un PBM muté (ETRL) possède un répertoire d'interactions PDZ plus étendu qui inclue DLG2, MUPP1 et la tyrosine phosphatase PTPN4 favorisant la mort des cellules neuronales³³⁶.

Le virus de l'encéphalite à base de tiques (TBEV) est un flavivirus de type arbovirus (ayant pour vecteur un arthropode suceur de sang). Le TBEV provoque une maladie fébrile chez les humains qui progresse souvent vers une encéphalite, avec des taux de mortalité assez élevés (20 à 30%). La protéine virale NS5 est une méthyltransférase et une ARN polymérase impliquée dans la réplication du génome viral du TBEV³³⁷. NS5 interagit avec SCRIB et cette interaction est essentielle au virus dans la perturbation de la voie JAK-STAT³³⁸.

Le virus de la dengue (DV) est un autre flavivirus de type arbovirus. Celui-ci cause la fièvre de la dengue et la plus sévère fièvre hémorragique de la dengue dans les régions tropicales et subtropicales. Des essais d'interaction *in vitro* ont montré que la protéine NS5 du DV utilise un PBM interne pour se lier à ZO1, régulant ainsi la synapse virologique³³⁹.

Le coronavirus du syndrome respiratoire aigu sévère (SARS-CoV) La protéine d'enveloppe E du SARS-CoV contient un PBM de classe II (DLLV) qui permet la liaison au domaine PDZ de MPP5. Cette dernière protéine est un composant clé du complexe de polarité Crumbs. Dans les cellules épithéliales infectées par le SARS-CoV, la protéine virale d'enveloppe E délocalise PALS1 vers l'appareil de Golgi. Cette délocalisation de PALS1 affecte la polarité cellulaire et la formation des jonctions entre cellules.³⁴⁰.

En conclusion, la perturbation des fonctions cellulaires via l'interaction PBM/PDZ semble être un mécanisme conservé à travers divers types de virus pathogènes humains y compris des virus oncogéniques et non-oncogéniques. Dans la plupart des situations, les protéines virales utilisent des motifs PBM localisés à leurs extrémités C-terminal. Actuellement, les virus pathogènes humains sont classés en fonction de leur proximité de séquences génétiques. Cependant, cette classification est rigide et ne prend pas en considération les informations liées aux interactions protéine-protéine que des virus établissent avec les cellules hôtes. Ce

genre d'observations est très intéressant dans la conception des stratégies thérapeutiques ciblant un large spectre d'infections virales.

2.6.2 La famille des protéines à domaines PDZ

La famille de protéines contenant des domaines PDZ a été décrite pour la première fois au début des années 1990 et a été classée en tant que telle après l'identification des tronçons d'acides aminés communs aux trois premiers membres identifiés, PSD95 (postsynaptique density 95), DLG1 (discs large homolog-1) et ZO1 (zonula occludens protéine-1), d'où l'origine du nom PDZ ³⁴¹. On peut les retrouver à travers les différentes espèces, des bactéries jusqu'aux vertébrés ³⁴². Elles sont impliquées dans un très grand nombre d'activités cellulaires, y compris le contrôle de la migration et de l'invasion cellulaires, la prolifération cellulaire, la polarité cellulaire, la fixation cellulaire, le contact cellule-cellule, l'apoptose et l'établissement des synapses immunologiques.

Les domaines PDZ sont des sites d'interaction protéine-protéine et, comme bon nombre de ces protéines possèdent de multiples domaines PDZ capables de multiples interactions protéiques, on les considère généralement comme des molécules d'échafaudage autour desquelles des complexes multi-protéines sont assemblés.

Il est souvent impossible de séparer les fonctions des protéines à domaines PDZ de celles de leurs ligands possédant des motifs de liaison aux PDZ (PBM). Par conséquent, on doit toujours se rappeler qu'il s'agit d'une interaction bidirectionnelle où, par exemple, la protéine contenant le domaine PDZ peut exercer une activité suppresseur de tumeur en régulant l'activité d'un ligand contenant un PBM, tel que SCRIB avec β -Pix ³⁴³. Inversement, un ligand PBM peut agir directement sur, et inactiver ou séquestrer, un partenaire contenant un domaine PDZ, par exemple, l'interaction entre l'onoprotéine E6 de HPV (papillomavirus humain) et DLG1 ³⁴⁴.

2.6.3 Caractéristiques structurales des domaines PDZ

Plus de 200 structures de domaines PDZ (soit les domaines PDZ seuls, leurs complexes avec des partenaires de liaison ou des dimères PDZ-PDZ) ont été déterminées par RMN et par cristallographie aux rayons X ³⁴⁵. La diffusion de rayons X à petits angles (SAXS) en combinaison avec la RMN a également été utilisée pour déterminer la structure des protéines

contenant des PDZ³⁴⁶. Ces études structurales fournissent des informations détaillées sur la reconnaissance du ligand et la sélectivité des protéines contenant PDZ au niveau moléculaire.

2.6.3.1 Les domaines PDZ canoniques

Les domaines PDZ sont composés généralement de 80 à 100 acides aminés et adoptent une topologie similaire. Le domaine PDZ canonique est globulaire avec un diamètre approximatif de 35 Å. Les études structurales ont révélé que les domaines canoniques PDZ sont généralement composés de 6 brins β (β A - β F), une courte hélice α (α A) et une longue hélice α (α B)³⁴⁷⁻³⁵⁰ (**Figure 11A**).

2.6.3.2 Les domaines de type PDZ : « PDZ-like »

Les domaines de type « PDZ-like » adoptent un repliement formé de 5 brins β (β 1- β 5) coiffés par 2 hélices α (α 2 et α 3), ainsi que 2 brins β courts aux extrémités N et C terminales (β N et β C). L' α -hélice bien définie (α 1) est formée dans la région entre la boucle β 1 et β 2 du domaine de type PDZ (Figure 2B). Cette structure se retrouve par exemple au sein des domaines PDZ la famille HTRA (HTRA ou DEGP, DEGS et DEGQ)^{351,352} (**Figure 11B**).

2.6.3.3 Dimérisation du domaine PDZ

Bien que la plupart des domaines PDZ isolés soient des monomères, certains d'entre eux forment des dimères³⁵³⁻³⁵⁵. Le PDZ de SHANK1 et le PDZ6 de GRIP1, par exemple, forment un homodimère via la boucle β B/ β C et les brins β A N-terminaux, qui présentent une orientation antiparallèle entre les brins β A des protéines. La formation du dimère PDZ n'affecterait pas la liaison avec des partenaires, car les sites de liaison aux peptides des deux domaines PDZ restent accessibles. Cependant, le rôle de ces deux dimérisations de PDZ *in vivo* reste incertain, car il n'y a aucune preuve que les protéines complètes forment des dimères fonctionnels *in vivo*³⁵⁶⁻³⁵⁸. Un autre mode de dimérisation des domaines PDZ a été rapporté dans des études cristallographiques par RMN et rayons X. Il a été démontré que le second domaine PDZ (PDZ2) de la protéine ZO forme un dimère, par un échange de domaines symétriques étendu de brins β . Cette dimérisation du domaine ZO1-PDZ2 conserve le repliement canonique des domaines. De plus, le site de liaison s'ouvre parfaitement pour permettre l'interaction avec le ligand cible. *In vivo*, la présence du dimère ZO1 ou des oligomères d'ordre supérieur a été confirmée par la co-immunoprécipitation de ZO1 marquée par la protéine fluorescente GFP (ZO1-GFP) avec ZO1 endogène³⁵⁹⁻³⁶¹ (**Figure 11C**),

suggérant ainsi que la dimérisation de certains domaines PDZ pourrait avoir un rôle fonctionnel *in vivo*. .

2.6.3.4 Les domaines PDZ en tandem

Les domaines PDZ isolés se replient généralement dans une structure native bien définie. Cependant, certains domaines PDZ ont besoin d'autres domaines PDZ complémentaires pour s'y connecter en tandem et se replier correctement. Par exemple, les premier et second domaines PDZ (PDZ1+PDZ2) de la protéine GRIP1 sont connectés de cette manière. Les études structurales ont révélé que le PDZ1 isolé de GRIP1 n'est pas bien replié, mais que le tandem PDZ1+PDZ2 adopte un repliement correcte. Ce qui indique que le repliement du PDZ1 dépend strictement de la fixation covalente avec le PDZ2. Dans la même protéine GRIP1, un autre exemple de domaines PDZ en tandem concerne le quatrième et le cinquième domaine PDZ (PDZ4+PDZ5). Ceux-ci, sont nécessaires pour interagir avec GLUR2/3. La structure en solution du tandem PDZ4+PDZ5 montre que le PDZ4 contient une cavité de liaison déformée, mais que cette cavité déformée stabilise la structure du PDZ5^{362,363}.

En plus de ces exemples, d'autres études ont révélé des structures de domaines PDZ en tandem présents dans PSD-95, SDCBP et X11A. Ce qui prouve que les domaines PDZ en tandem jouent un rôle crucial dans la formation de structures et de supramodules fonctionnelles³⁶⁴⁻³⁶⁹ (**Figure 11D**).

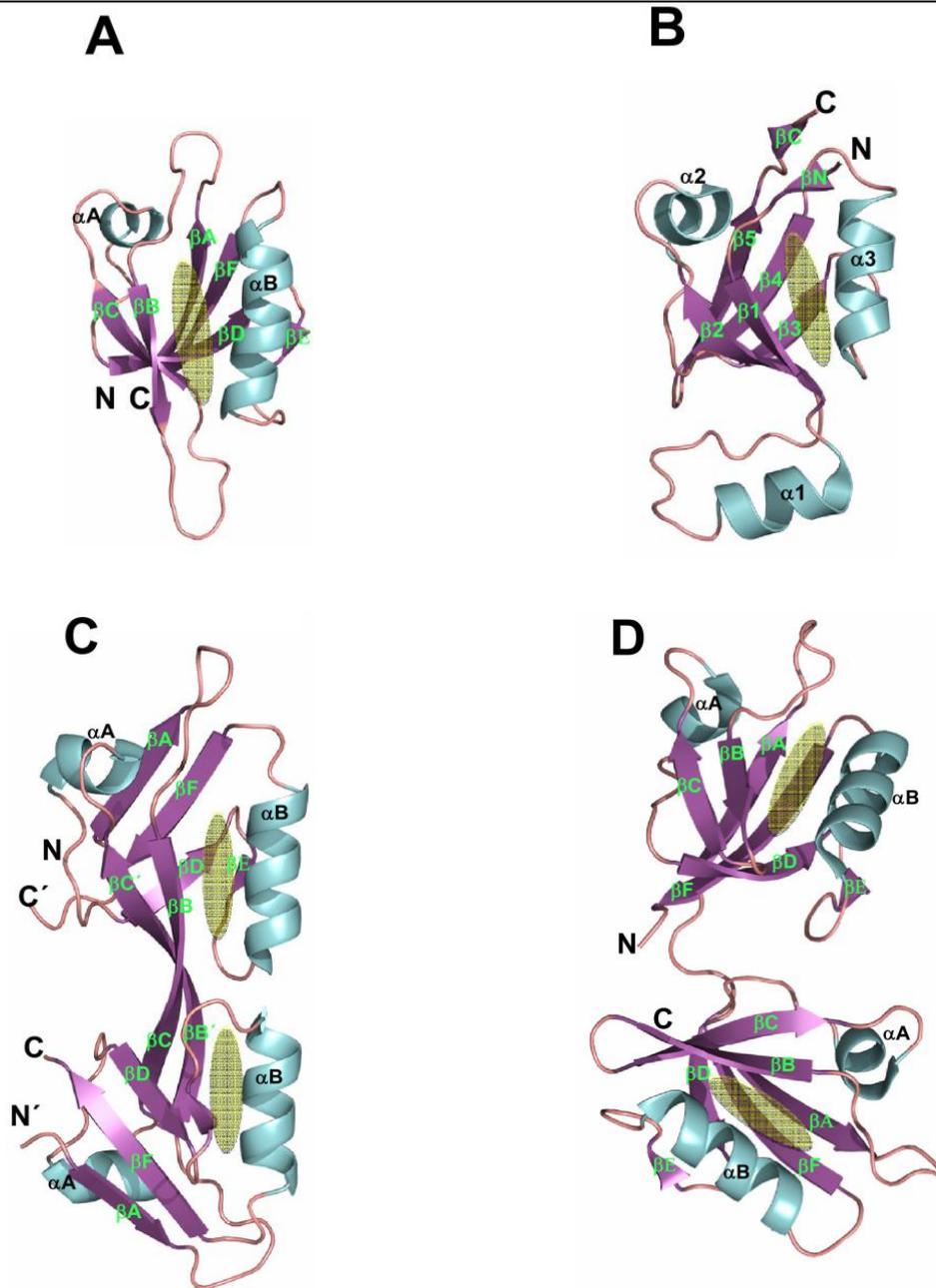


Figure 11 : Représentation 3D des différentes structures des domaines PDZ issues de la base de données des structures 3D protéiques PDB. A) Représentation de la structure du domaine PDZ canonique de DVL-1 (code PDB: 2KAW). B) Représentation de la structure du domaine « PDZ-like » de HTRA2 (code PDB: 1LCY). C) Représentation de la structure en dimère du domaine PDZ2 de ZO1 (code PDB: 2RCZ). D) Représentation de la structure en tandem des domaines PDZ1 et PDZ2 de GRIP1 (code PDB: 2QT5). Le site de liaison de chaque domaine PDZ est représenté par la surface hachurée ovale. Ces structures ont été générées à l'aide du logiciel Pymol. Adapté de ³⁷⁰.

2.6.4 Le site de liaison des domaines PDZ à leur ligand

La fonction clé du domaine PDZ est la capacité à lier des motifs C-terminaux spécifiques (PBM) et est médiée par une boucle de liaison exposée à la surface. Les domaines PDZ ont un seul site de liaison dans une poche, entre les éléments structuraux α B et β B contenant la boucle de liaison au carboxylate qui est hautement conservée (motif R / K-XXX-G- Φ -G- Φ , où X représente un résidu d'acide aminé et Φ un résidu hydrophobe) situé avant le brin β B^{344,371}. Le premier résidu de Gly dans ce motif est variable parmi les domaines canoniques de PDZ et peut être remplacé par un résidu de Ser, Thr ou Phe³⁷². Le deuxième et le quatrième résidu sont hydrophobes, tels que Val, Ile, Leu ou Phe. Les chaînes latérales de ces deux résidus créent la poche de liaison hydrophobe des domaines canoniques PDZ. Le ligand est fortement lié à la boucle de liaison, de manière anti-parallèle au brin β B, ce qui permet des interactions importantes³⁷³ (**Figure 12A**).

Lors de la liaison canonique, la chaîne latérale du résidu P0 du ligand (premier résidu en C-terminal) est dirigée vers la cavité hydrophobe constituée par les résidus de β B et α B du domaine PDZ (S0) et, par conséquent, la grande majorité des ligands de domaine PDZ ont un résidu hydrophobe à cette position P0. La taille et la forme de S0 varient entre les différents domaines PDZ, contrôlant ainsi la préférence de S0 par rapport à différents résidus hydrophobes à P0. Toutefois, la plupart des domaines PDZ préfèrent des résidus hydrophobes non aromatiques à P0, tels que valine, isoleucine ou leucine³⁷⁴⁻³⁷⁶ (**Figure 12B**).

En conséquence de l'insertion prolongée du ligand au niveau du brin β anti-parallèle, les chaînes latérales des résidus à P-1 et P-3 seront exposées au solvant. De ce fait, ces résidus sont rarement directement impliqués dans la liaison canonique du domaine PDZ. Cependant, certaines études ont suggéré que les résidus amphipathiques tels que le tryptophane ou la tyrosine pourraient être légèrement favorisés à ces positions³⁴⁸. En revanche, la chaîne latérale du résidu P-2 pointe vers la surface du domaine PDZ, comme la chaîne latérale du résidu P0. De plus, cette chaîne latérale du résidu P-2 entre en contact direct avec la chaîne latérale du premier résidu de α B (α B1); Ainsi qu'avec plusieurs autres résidus (principalement hydrophobes) d' α B et β B, qui constituent une poche de liaison secondaire (S-2). La préférence de S-2 vis-à-vis des résidus spécifiques à P-2 est beaucoup plus stricte que la préférence résiduelle de S0 et, par conséquent, la classification des ligands de domaine PDZ repose principalement sur le résidu P-2. De fait, les domaines PDZ ont été classés par rapport au premier résidu de l' α -hélice B (α B1)³⁷⁷⁻³⁷⁹ (**Figure 12B**).

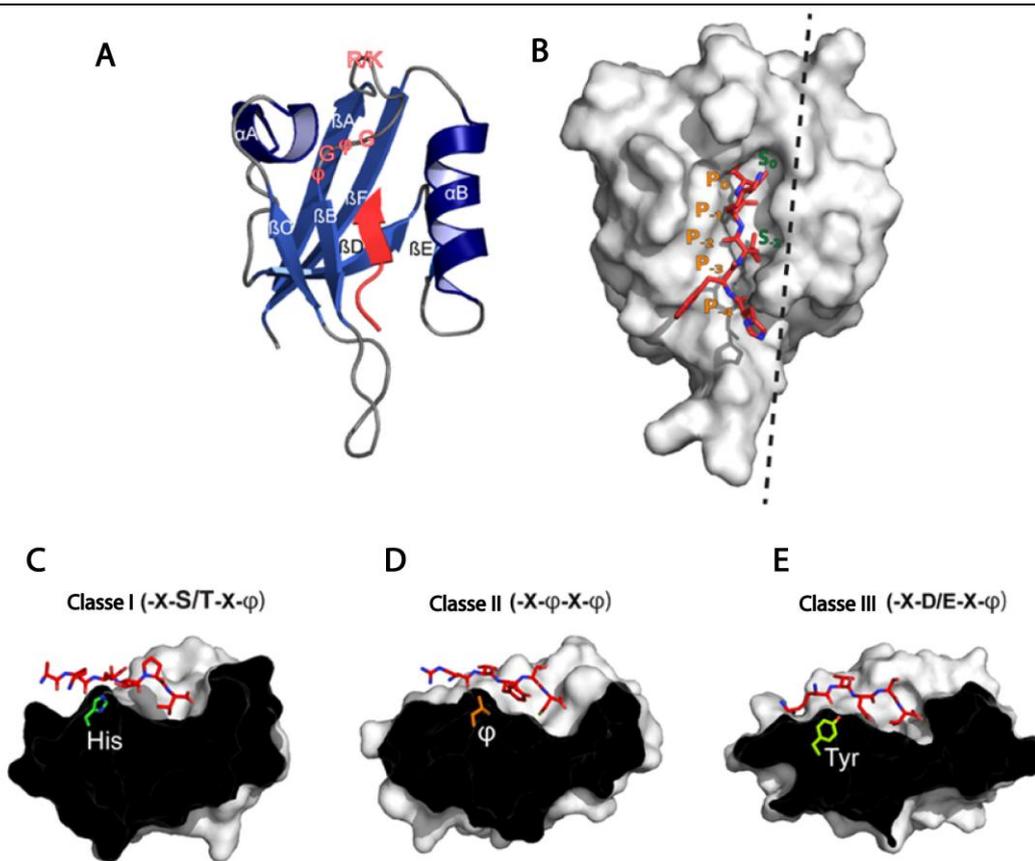


Figure 12: Représentation 3D des différentes positions de résidus important pour l'interaction du domaine PDZ avec son ligand. A) Repliement d'un domaine PDZ canonique qui comprend deux hélices α (αA et αB) et six brins β (βA - βF) (code PDB: 2LUI). Le ligand est montré en rouge et est étroitement lié dans la boucle de liaison située entre l'hélice αB et le brin βB . La boucle de liaison au ligand est composée par le motif R/K-X-X-X-G- ϕ -G- ϕ (X-tout résidu; ϕ -résidu hydrophobe) dont les caractères sont indiqués en rouge. B) Représentation de la surface d'un domaine PDZ canonique complexé à son ligand. Les poches hydrophobes S0 et S-2 (pour les domaines de classe II) sont indiquées en vert. De même, les cinq résidus C-terminaux du ligand sont indiqués de P0 à P-4 en orange. La ligne en pointillés noires indique le plan de coupe utilisé dans les parties C, D et E de la figure. C) Les domaines de liaison de classe I reconnaissent habituellement des ligands avec Ser ou Thr à P-2. Le résidu $\alpha B1$ est habituellement His (code PDB: 1TP3). D) Les domaines PDZ de classe II reconnaissent des ligands avec des résidus hydrophobes à P-2. Le résidu $\alpha B1$ est souvent hydrophobe et permet la formation d'une seconde poche de liaison hydrophobe (désignée S-2 dans la partie B de la figure) (code PDB: 1N7F). E) Les ligands qui lient les domaines de classe III ont typiquement Asp ou Glu au niveau de P-2 et Tyr à la position $\alpha B1$ (code PDB: 1B8Q). Adapté de ³⁴⁷.

En plus des séquences de liaison C terminale, des positions internes de liaisons aux domaines PDZ ont été décrites pour quelques ligands. Ainsi, les domaines PDZ de PSD95³⁸⁰, SNTB³⁸¹ et de DLG2³⁸² interagissent avec la protéine nNOS *via* une structure en épingle à cheveux (β -finger) mimant une queue carboxy-terminale^{376,383}. Avec une présence faible dans la littérature, ce mode d'interaction semble montrer une occurrence biologique peu fréquente³⁸⁴.

2.6.5 Classification des domaines PDZ

Basée sur la nature du premier résidu de l' α -hélice B (α B1), les domaines PDZ ont été divisés en trois classes différentes. Les domaines PDZ de classe I, qui forment de loin la plus grande classe. Ils reconnaissent généralement un motif -XS/TX- ϕ en utilisant une histidine en position α B1 pour former une liaison hydrogène avec la Sérine/Thréonine P-2³⁷⁵. Le PSD-95 (PDZ2 et 3) et la Syntrophine sont des exemples classiques des domaines PDZ de classe I^{373,385}. Les domaines de classe II reconnaissent les motifs -X- ϕ -X- ϕ en utilisant un résidu hydrophobe à la position α B1. Pour cette raison, les domaines PDZ de classe II tels que CASK, GRIP1 (PDZ 5 et 6) et SDCBP sont décrits pour avoir une seconde poche hydrophobe formée par des résidus aux positions α B1, α B4, α B5 et β B3^{357,386-388}. Les domaines PDZ de classe III reconnaissent un motif -X-D/E-X- ϕ et ont généralement une Tyrosine à la position α B1, permettant au groupe hydroxyle d'interagir avec la chaîne latérale carboxyle de l'Aspartate ou du Glutamate. Le domaine PDZ des nNOS lie typiquement les ligands de classe III³⁷⁶ (**Figure 12C, D et E**).

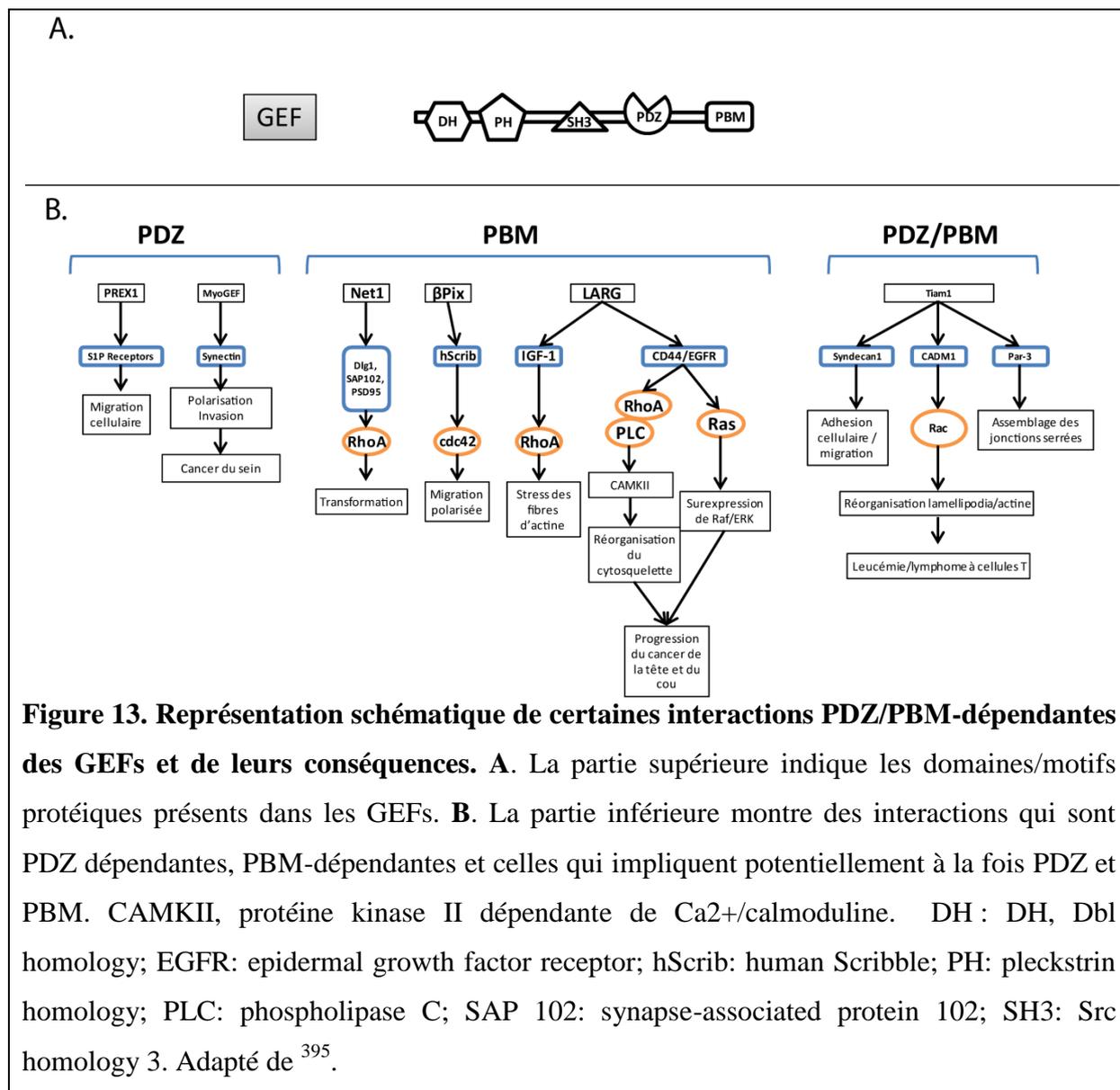
2.6.6 Importance des protéines à domaine PDZ pour l'homéostasie cellulaire

Les interactions protéiques médiées par les domaines PDZ sont impliquées dans un large éventail de processus cellulaires, y compris y compris le contrôle de la migration et de l'invasion cellulaires, la prolifération cellulaire, la polarité cellulaire, la fixation cellulaire, le contact cellule-cellule, l'apoptose et l'établissement des synapses immunologiques. .

Outre leur conservation à travers l'évolution, l'importance des protéines à domaines PDZ dans l'homéostasie cellulaire est également mise en évidence par les défauts dramatiques observés lorsque leur fonction est perturbée ; Notamment, dans des situations pathologiques telles que le cancer. Par exemple, la dérégulation des fonctions des protéines à domaines PDZ, par surexpression ou par régulation négative, est bien établie dans divers cancers d'origine épithéliale³⁸⁹⁻³⁹¹ ..

2.6.7 Domaines PDZ et remodelage du cytosquelette

La motilité cellulaire est une caractéristique fondamentale des cellules eucaryotes au cours de l'embryogenèse, et lors du développement. Ainsi, les défauts de motilité cellulaire sont caractéristiques de diverses maladies telle que la progression des métastases cancéreuses³⁹². La migration est étroitement contrôlée par l'organisation du cytosquelette d'actine dont la famille des Rho GTPases constitue des régulateurs importants³⁹³. Une protéine Rho est en état conformationnel inactif lorsqu'elle est liée au GDP et en état conformationnel actif quand elle est liée au GTP. Cet interrupteur est contrôlé par différentes protéines régulatrices: les régulateurs positifs (Guanine exchange factors, GEFs) qui stimulent le remplacement d'une GDP par une GTP, ce qui conduit à une GTPase active. Plus de 70 Rho-GEFs différents ont été décrits et 37% d'entre eux possèdent des motifs PBM à leurs extrémités C-terminal³⁹⁴, d'autres ont des domaines PDZ et certaines ont les deux (PBM et PDZ). Ce qui suggère l'importance des interactions PDZ-PBM comme régulateurs critiques de la fonction Rho-GEF et du remodelage du cytosquelette (**Figure 13**).



2.6.8 Ciblage des interactions impliquant des protéines à domaines PDZ

Le concept de perturbation des interactions protéine-protéine n'est pas souvent exploité par l'industrie pharmaceutique. Cependant, il apparaît qu'au moins certaines de ces interactions peuvent être ciblées par des petites molécules de faible poids moléculaire. En effet, les interactions dynamiques peuvent être ciblées par des petites molécules. Ceci en se liant à une protéine avec une affinité très élevée, afin d'empêcher une interaction ultérieure avec une protéine partenaire ³⁹⁶.

Diverses études appuient fortement l'idée que les interactions impliquant des domaines PDZ sont « ciblables » et peuvent fournir une nouvelle génération de nouveaux médicaments

ciblant des états pathologiques importants³⁹⁷. Dans ce sens, un certain nombre de molécules ont été identifiées comme de potentiels inhibiteurs des interactions PDZ/ligand³⁹⁸.

De plus, le ciblage des interactions protéine-protéine est une approche pratique pour manipuler plus précisément des fonctions cellulaires spécifiques. Ceci, en évitant les effets indésirables associés aux larges panoplies de réponses qui peuvent émaner de médicaments visant les cibles de manière plus large^{399,400}.

3 Techniques utilisées pour l'étude des interactions protéine-protéine

Le développement du domaine de l'interactomique est l'une des voies importantes pour la compréhension des systèmes biologiques compliqués et l'orientation vers des approches cliniques ciblées.

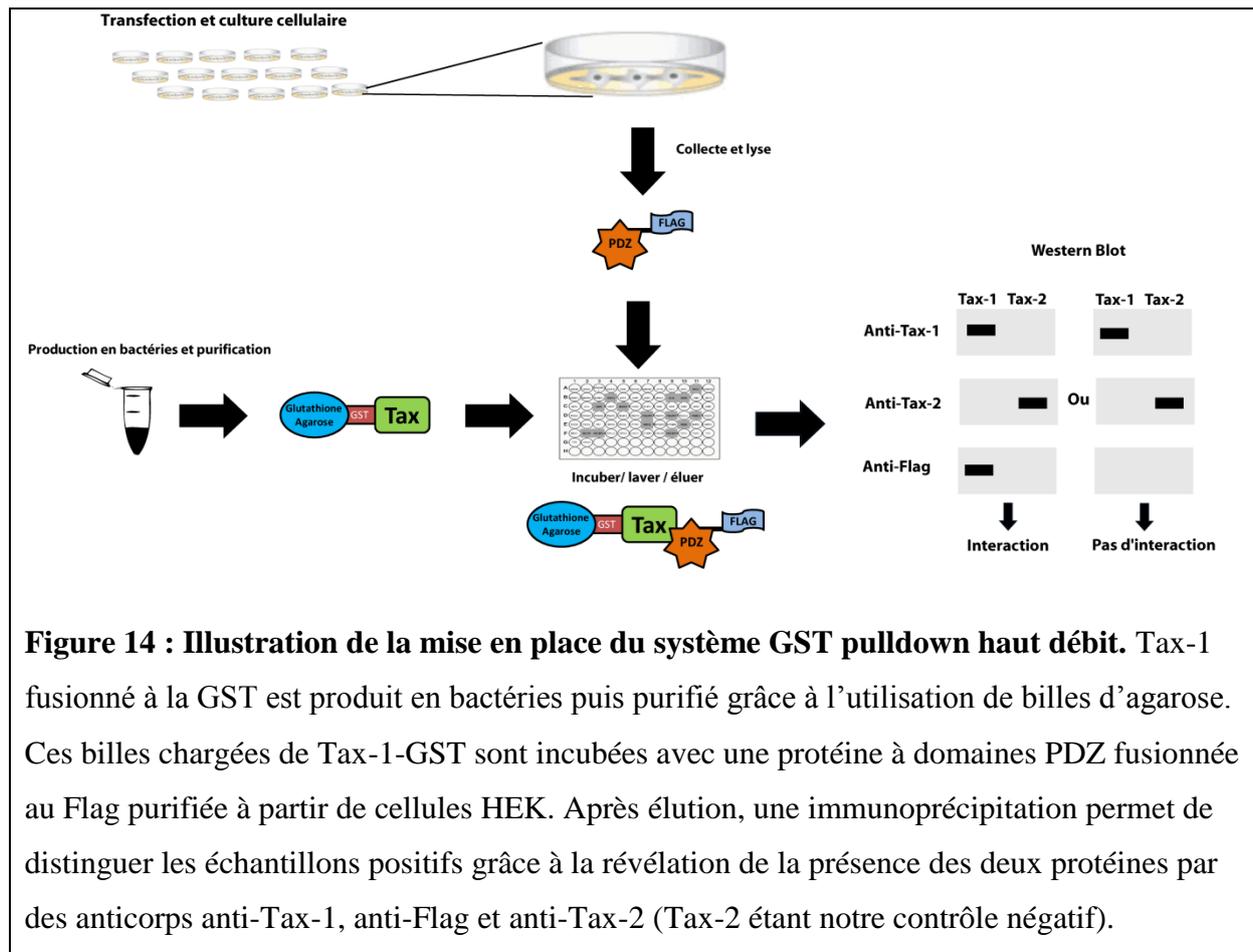
Les méthodes utilisées pour identifier et analyser les diverses interactions impliquant des protéines cellulaires ou d'origine pathogène sont généralement reproductibles facilement. Ces techniques peuvent être limitées à la détection de complexes protéiques ou assez sensibles pour la détection d'interactions binaires⁴⁰¹.

Malgré leur diversité, les méthodes de détection des interactions protéine-protéine peuvent être regroupées en quelques grandes catégories (**Tableau 1**). Les essais de reconstitution de fragments, tels que le système du double hybride en levure (Y2H) et le *Gaussia princeps* protein complementation assay (GPCA) sont basés sur des protéines scindées qui sont reconstituées fonctionnellement par des fusions de protéines interactantes. Les méthodes biophysiques incluent la détermination de la structure et l'identification par spectrométrie de masse (MS) des protéines dans les complexes. Les méthodes biochimiques comprennent des procédés tels que l'immunoprécipitation suivie du western blot. En raison du manque de données, il est encore difficile de comparer ces méthodes en fonction de leur efficacité et de leurs taux d'efficacité. Les données actuelles ne favorisent aucune méthode particulière et, par conséquent, de multiples approches expérimentales sont nécessaires pour couvrir au maximum l'interactivité d'une catégorie de protéines cibles⁴⁰².

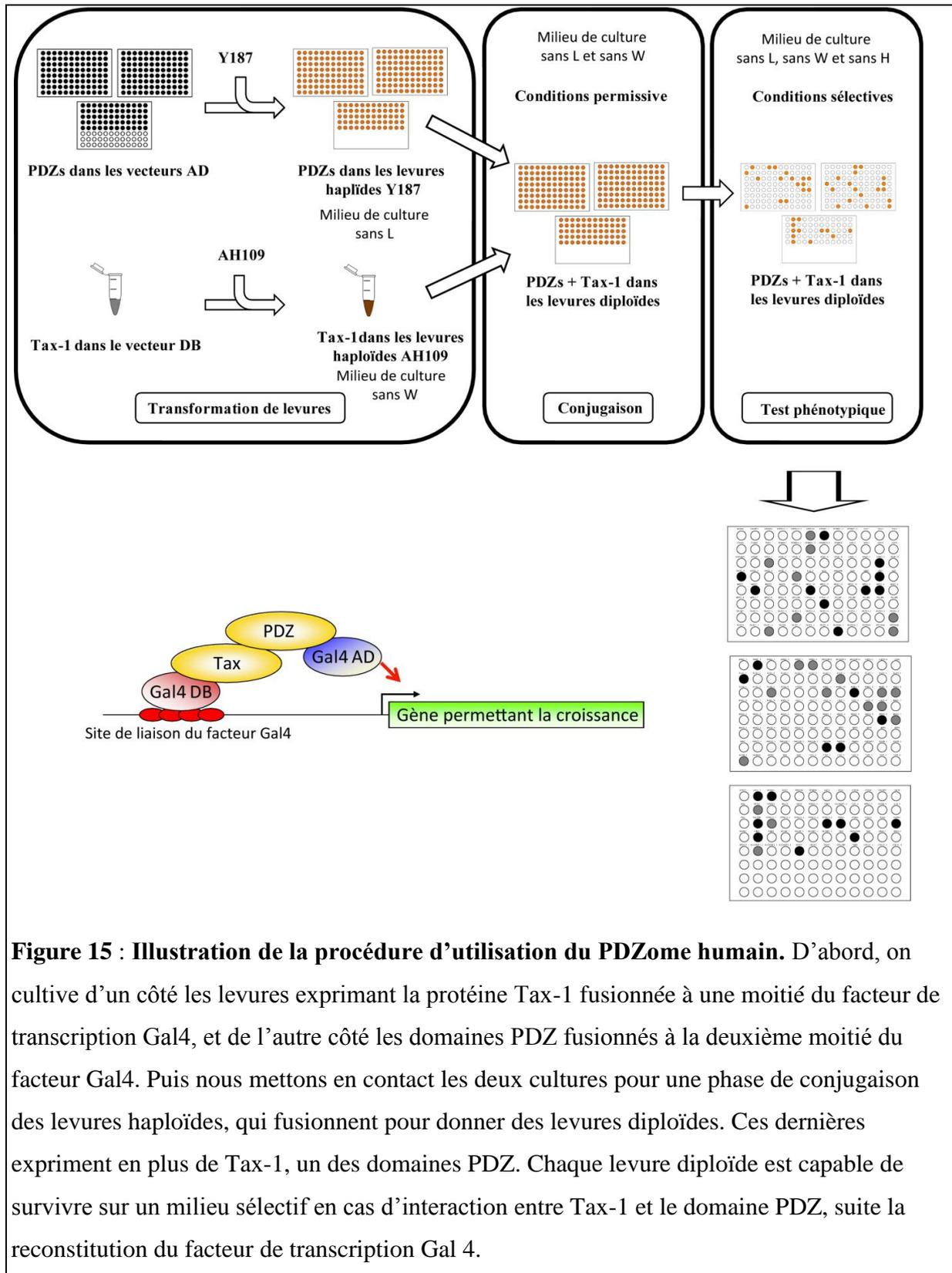
Tableau 1 : Méthodes de détection des interactions protéine-protéine (adapté de ⁴⁰²).

Principe	Type	Sous-type	Technique dérivée
Dosage de la complémentation des protéines	Dosage de la complémentation cytoplasmique	Reconstruction de l'ubiquitine	
		Reconstruction de la luciférase	GPCA
	Dosage de la complémentation liée à la membrane	Piège d'interaction de protéines mammifères	
	Dosage de la complémentation transcriptionnelle	Double hybride	Double hybride en levure
	Fluorescence de la complémentation bimoléculaire		
	Méthode 3 hybrides	Triple hybride	
Biophysique	Résonance magnétique nucléaire		
	Résonance de plasmon de surface		
	Études de spectrométrie de masse des complexes		
	Cristallographie par rayons X		
	Calorimétrie à titrage isotherme		
	Technologie de fluorescence	Le transfert d'énergie par résonance fluorescente (FRET)	
Biochimique	Étude de réticulation		
	Technologie d'affinité	Technologie d'affichage	
		Western blot	
		Technologie de chromatographie d'affinité	Pulldown
			Purification d'affinité en tandem
			Co-immunoprécipitation
	Technologie de matrice	Matrices peptidiques Matrice de protéines	
Étude enzymatique	Dosage de phosphotransfert		
Techniques d'imagerie	Microscopie à fluorescence		

Après le criblage des bases de données de la littérature pour retrouver les interactions déjà connues, nous avons combiné plusieurs méthodes de détection d'interactions protéine-protéine dans notre étude. En effet, nous avons choisis des techniques complémentaires qui utilisent des concepts différents pour détecter des interactions nécessitant des conditions particulières. Ainsi, la technique du GST pull down permet d'identifier des interactions peu exigeantes mais qui nécessitent la présence des protéines complètes. Une technique que nous avons adaptée pour une utilisation à grande échelle avec l'ORFeome 5.1 (**Figure 14**).



De son côté, la technique du double hybride en levure (Y2H) permet de détecter des interactions nécessitant des modifications post-traductionnelles sur les protéines à tester. Cette technique a été adaptée pour le haut débit en utilisant des plaques 96 puits (**Figure 15**).



Enfin, la technique de GPCA permet la détection d'interactions détectables dans des cellules mammifères sans nécessiter la présence de protéines complètes (**Figure 16**).

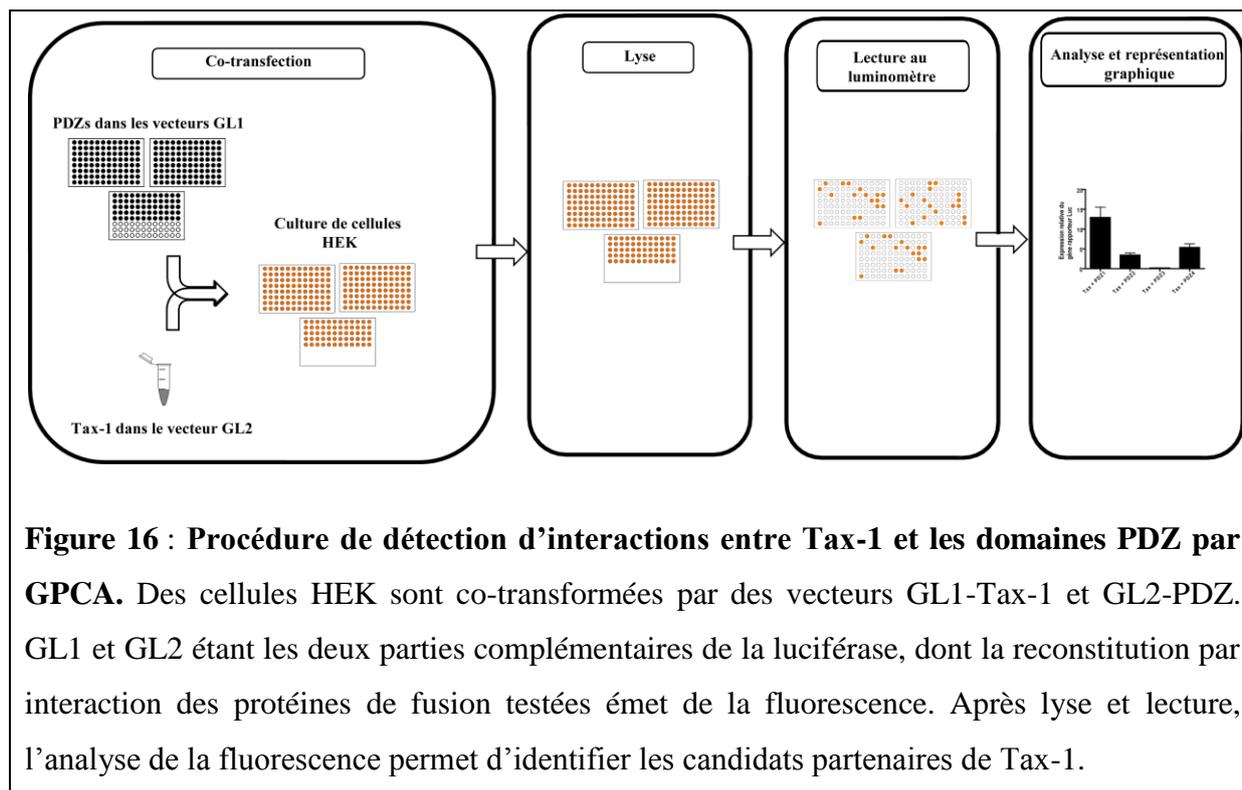


Figure 16 : Procédure de détection d’interactions entre Tax-1 et les domaines PDZ par GPCA. Des cellules HEK sont co-transformées par des vecteurs GL1-Tax-1 et GL2-PDZ. GL1 et GL2 étant les deux parties complémentaires de la luciférase, dont la reconstitution par interaction des protéines de fusion testées émet de la fluorescence. Après lyse et lecture, l’analyse de la fluorescence permet d’identifier les candidats partenaires de Tax-1.

De manière générale, les méthodes utilisées en interactomique reflètent chacune la puissance et le potentiel de ce domaine de la biologie moléculaire ; notamment dans le décryptage des mécanismes moléculaires et la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques.

4 Exploitation des données issues des interactomes protéiques

Les études interactomiques génèrent des quantités d’informations importantes. En effet, la plupart des études interactomiques cherchent à détecter un maximum de partenaires. De ce fait, il est impératif d’adapter les outils d’analyses afin d’optimiser l’exploitation des données. Parmi les premières applications de l’interactomique, on peut citer l’identification des fonctions protéiques liées aux partenaires détectés. Cette étape nécessite la représentation des protéines par leur gène codant, afin d’éviter les complications liées aux isoformes.

L’interprétation biologique de grandes listes de gènes dérivées d’études interactomiques nécessitent des méthodes bio-informatiques. De ce fait, plusieurs outils ont été développés afin d’aider les scientifiques à traiter les masses importantes de données. Parmi ceux-ci, nous nous sommes intéressés aux outils d’attributions d’annotations et de fonctions pour chaque

gène d'une liste de candidats d'intérêt (GoMiner, DAVID, EASE, Gostat, Onto-express, GoToolBox, FatiGO, GOSSIP, GFINDER, GOBar) ⁴⁰³.

Ces outils mettent systématiquement en évidence les termes biologiques GO (Gene Ontology) les plus surreprésentés, sur une liste de centaines ou de milliers de termes, pour augmenter la probabilité d'identifier les processus biologiques les plus pertinents aux phénomènes biologiques étudiés ⁴⁰⁴.

En utilisant des outils bio-informatiques bien développés tels que la plate-forme DAVID ⁴⁰³, on peut éviter un bon nombre de difficultés liées à la recherche des fonctions des gènes. En effet, chaque gène peut avoir une grande quantité d'annotations fonctionnelles, plusieurs sources d'informations non homogènes et plusieurs répétitions de fonctions redondantes.

Dans le cas de l'étude de l'interactome d'une protéine d'intérêt dont les fonctions ne sont pas toutes établies, les résultats issus des outils d'enrichissement de GOs peuvent être exploités directement en identifiant les protéines partenaires codées par les gènes les plus enrichis. En effet, les protéines partenaires participent souvent au même processus biologique et sont donc susceptibles de partager certaines fonctions ⁴⁰⁵. Ainsi, il est possible d'assigner de nouvelles fonctions à la protéine d'intérêt.

CHAPITRE II:

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

CHAPITRE II : OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Le groupe des deltarétrovirus humains est composé de quatre membres (HTLV-1 à 4). Comme expliqué dans l'introduction, HTLV-1 est l'agent étiologique de la leucémie à lymphocytes T de l'adulte (ATL) et de la paraparésie spastique tropicale (TSP). HTLV-2 a la même organisation génomique et infecte les mêmes cellules cibles *in vivo* (les lymphocytes T) mais avec un tropisme différent (CD8 au lieu de CD4 pour HTLV-1). Au niveau clinique, HTLV-2 n'est pas associée à la leucémie des lymphocytes T¹⁵. HTLV-3 et -4 ont été découvert en 2005^{16,17} et aucune pathologie n'est encore associée à ces deux virus.

L'objectif ultime de notre étude est de proposer des interactions pathogène - hôte pouvant être exploitées comme nouvelles cibles thérapeutiques. Notre stratégie consiste à réaliser une analyse la plus exhaustive possible des interactions entre certaines protéines humaines et un motif spécifique au virus HTLV-1 que l'on ne retrouve pas chez son homologue HTLV-2.

Afin d'établir nos hypothèses, nous avons commencé par comparer les structures génomiques des virus HTLV-1 et HTLV-2. En effet, ces deux virus montrent une grande homologie de structure du génome (**Figure 17**). Les deux génomes viraux contiennent des gènes qui codent pour les protéines de structure (Gag, Pol et Env) communs à tous les rétrovirus. De plus, ils contiennent une région "pX" caractéristique des deltarétrovirus et codant pour des protéines régulatrices P30, Tax-1, Rex, P12, P13 et HBZ (codé par un ARN antisens) pour HTLV-1 ; ainsi que P28, Tax-2, Rex, P10, P11 et APH-2 (codé par un ARN antisens) pour HTLV-2.

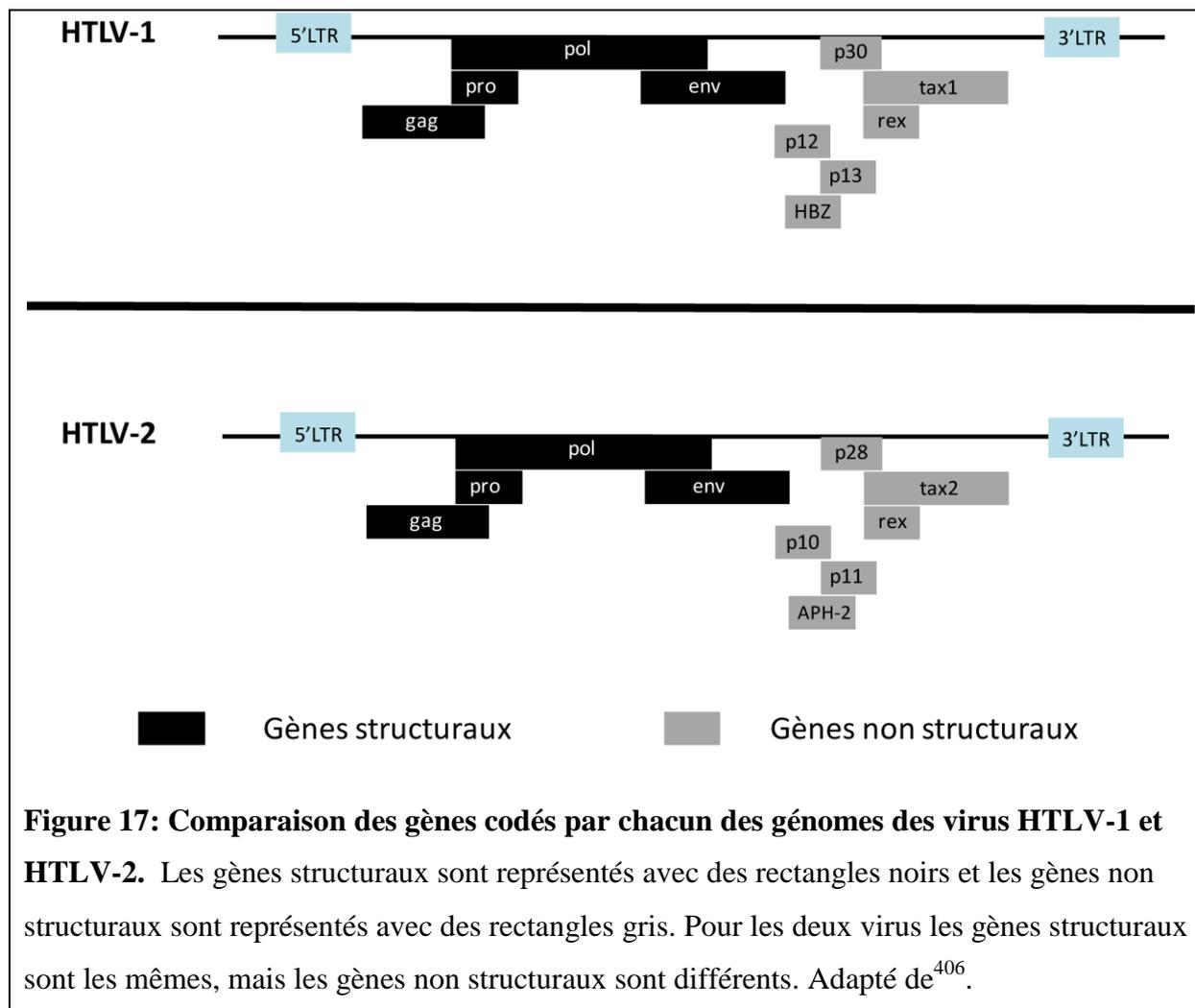


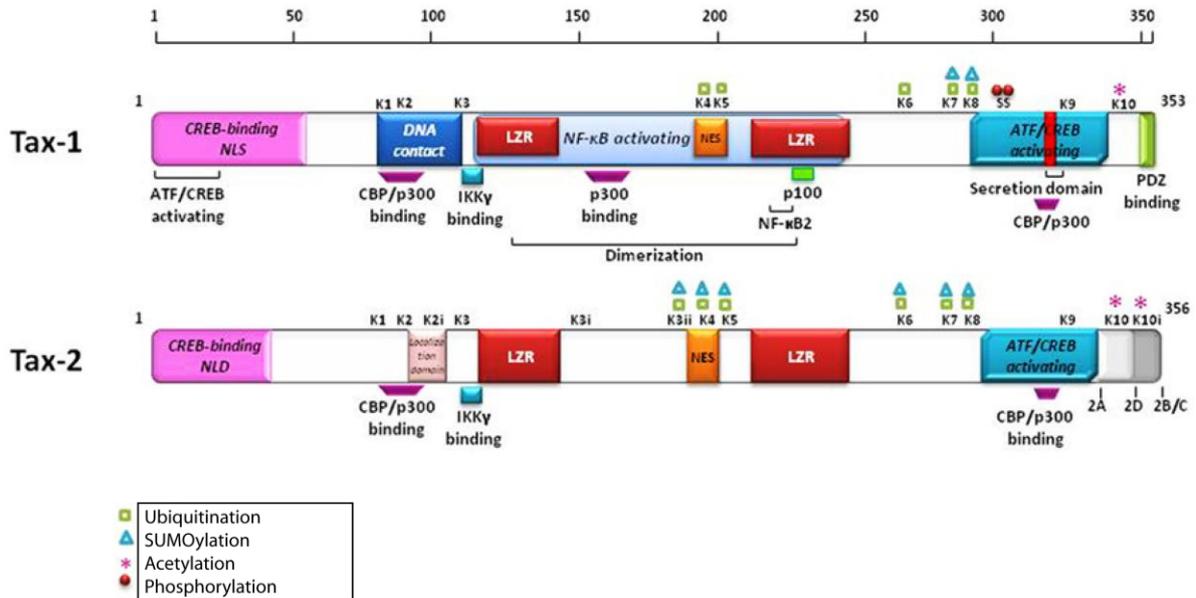
Figure 17: Comparaison des gènes codés par chacun des génomes des virus HTLV-1 et HTLV-2. Les gènes structuraux sont représentés avec des rectangles noirs et les gènes non structuraux sont représentés avec des rectangles gris. Pour les deux virus les gènes structuraux sont les mêmes, mais les gènes non structuraux sont différents. Adapté de⁴⁰⁶.

Nous nous sommes intéressés de plus près aux protéines Tax-1 et Tax-2 qui contrôlent la réplication virale des deux virus HTLV-1 et HTLV-2, respectivement, et qui établissent un grand nombre d'interactions avec les protéines cellulaires de l'hôte^{14,407,408}. Notre hypothèse est que les différences de pathogénèse observées pour les deux virus pourraient être en partie dues aux différences d'interactomie entre les protéines codées par ces deux virus³¹⁰.

Les deux protéines Tax-1 et Tax-2 présentent une structure protéique similaire. De fait, dans la région N-terminale des deux protéines Tax se trouvent une région de liaison à CREB, un domaine de doigt de zinc et des domaines de liaison nécessaires pour l'interaction avec des sous-unités protéasomales, des coactivateurs de transcription et des protéines impliquées dans la transcription (**Figure 18**). Un domaine de localisation nucléaire (NLS) est situé dans les 60 premiers acides aminés de Tax-1 tandis qu'il se retrouve dans les 42 premiers acides aminés de Tax-2^{409,410}. Tax-2 est dotée d'un domaine de localisation supplémentaire d'environ 10 acides aminés en position 90-100, qui a été décrit comme étant impliqué dans la localisation

cytoplasmique¹⁷⁸. Dans la région centrale de Tax-1 se trouvent deux motifs de type glissière à leucine, comprenant les acides aminés 116-145 et 213-248. Cette région est nécessaire pour la dimérisation et l'interaction avec les domaines de liaison à l'ADN^{183,309,411}. Cette région est absente chez Tax-2. Il existe une région conservée entre Tax-1 et Tax-2, qui représente un domaine putatif de type KID (acides aminés 81 à 95). Celui-ci est nécessaire à la liaison avec CBP / p300⁴⁰⁷. De plus, la région de liaison CR2 (acides aminés 312-319) qui est cruciale pour lier CBP / p300⁴¹² est semblable pour Tax-1 et Tax-2.

A.



B.

Identities = 263/358 (73%), Similarities = 303/358 (85%), Gaps = 5/358 (1%)

Tax-1	1	MAHFPGFGQSLLFGYPVYVFGDCVQGDWCPI	SGGLCSARLHRHALLATCPEHQITWDPID	60	
Tax-2B	1	MAHFPGFGQSLL+GYPVYVFGDCVQ	DWCP+SGGLCS RLHRHALLATCPEHQ+TWDPID	60	
Tax-1	61	GRVIGSALQFLI	1 2 PRLPSFPTQRTSKTLKVLTPPIHTTTPNI	3 PPSFLQAMRKYS	120
Tax-2B	61	GRVSSPLQYLI	1 2 PRLPSFPTQRTAKTLKVLTPPTPVSPKVP	3 PAFFQSMRKHTPYRNGCL	120
Tax-1	121	EPTLGQHLPTLS	1 2 FPDGRLPQNLYTLWGGSVVCMYQLSPPITWPL	3 LPHVIFCHPGQLG	180
Tax-2B	121	EPTLG	1 2 LP+L+FP+PGLRPQN+YT WG +VVC+YL+QLSPP+TWPL+PHVIFCHP	3 QLGLG	180
Tax-1	181	AFLTNPVYKRIEELLYKI	4 5 SLTTGALMILPEDCLPTTLFQPVRAH	6 7 8 VTLTAWQNGLIPFHST	240
Tax-2B	181	AFLT	4 5 KVPLKRLEELLYKMFLHTGAVIVLPEDDLPTTMFQPVRA	6 7 8 PCIQTAWCTGLLPYHSI	240
Tax-1	241	LTTPLGIWTF	6 7 8 TDGTPMISGPCPKDQGQPSLVLQSSSFI	9 10 FHKFQTKAYHPSFLLSHGLIQYS	300
Tax-2B	241	LTTPLGIWTF	6 7 8 FNDGSPMISGPCPKAGQPSLVVQSSLLIFEK	9 10 FQTKAFHPSYLLSHGLIQYS	300
Tax-1	301	SFHNHLHLLFEEYTNIPISLLFNEK	9 EADDNDHEPQISPGGLEPPSE	10 KHFRETETV	353
Tax-2B	301	SFHNHLHLLFDEYTNIPVSILFN	9 KGEADDNGDQPP-EPAAQGESSTQKV	10 RPSHTNNPK	356

Figure 18: Comparaison de la structure et des domaines fonctionnels des protéines Tax-1 et Tax-2. A. Les domaines spécifiques et les régions impliquées dans des voies d'activation transcriptionnelles sont indiqués. Le signal de localisation nucléaire (NLS), le signal

d'exportation nucléaire (NES), la région en glissière à leucine (LZR), la séquence de liaison CBP / p300, le domaine de liaison de NF- κ B ainsi que le motif de liaison de PDZ sont représentés. La position des lysines et leur ubiquitination, SUMOylation et acétylation sont indiquées. Les points rouges identifient les sérines phosphorylées. Adapté de ¹⁶⁷. **B.** Alignement des séquences d'acides aminés de Tax-1 et de Tax-2 (Tax-2B). Les 10 résidus de lysine de Tax-1 et les 10 résidus de lysine équivalents de Tax-2 sont désignés K1 à K10. Les quatre résidus de lysine supplémentaires de Tax-2 sont désignés K2i, K3i, K3ii et K10i. Le domaine fonctionnel impliqué dans le clivage de p100 par Tax-1 et le motif de liaison aux protéines à domaines PDZ (PBM), absents chez Tax-2, sont mis en évidence par un cadre. Adapté de ⁴¹³.

Les modifications post-traductionnelles de Tax-1 et Tax-2 telles que la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitination et la SUMOylation ont été largement décrites ^{183,191,195}. Des analyses comparatives des modifications post-traductionnelles de Tax-1 et Tax-2 ont été centrées sur la contribution de l'ubiquitination et de la SUMOylation à la localisation intracellulaire de Tax et à sa capacité à activer la voie NF- κ B ^{176,177,413-419}. Ces études ont mis en évidence le rôle des lysines spécifiques comme cibles pour la SUMOylation et l'ubiquitination des protéines Tax-1 et Tax-2. Les lysines K6 et K8 sont critiques pour l'activation de NF- κ B et sont hautement conservées dans les deux protéines Tax ¹⁷⁶.

Parmi les activités de transformation cellulaire observées pour Tax-1 et pas pour Tax-2, on pourrait citer l'activation de la voie non-canonique NF- κ B2 et l'interaction avec des protéines à domaines PDZ ^{174,420}. Le motif PBM (PDZ binding motif) en C terminal, inexistant chez Tax-2, permet à Tax-1 d'interagir avec les protéines à domaines PDZ comme expliqué plus haut dans le chapitre consacré à l'interactome de Tax-1.

Par ailleurs, la transformation induite par Tax-1 et Tax-2 a été testée en lymphocytes T cytotoxiques de souris, dont la croissance est strictement dépendante de l'interleukine-2 (IL-2) (CTLL-2). La transduction par un lentivirus exprimant Tax-1 dans les CTLL-2 transforme ces cellules, les convertissant d'une croissance dépendante d'IL-2 en croissance indépendante de l'IL-2. Dans ce modèle cellulaire, l'activité transformatrice de Tax-2 est beaucoup moins importante que celle de Tax-1. De plus, le motif PBM de Tax-1 a été décrit pour son implication dans cette activité de la protéine Tax-1 ^{174,420}.

Dans un modèle d'infection de lapins par des virus HTLV-1 et -2, la contribution du PBM de Tax-1 dans la prolifération, l'immortalisation des lymphocytes T primaires et la stabilité des virus ont été démontrés. La comparaison de différents mutants viraux dans les séquences de Tax-1 et de Tax-2 a révélée que le motif PBM joue un rôle clé dans la prolifération cellulaire et dans la persistance virale *in vivo*⁴²¹. Ces observations permettraient d'expliquer une plus grande prolifération clonale de cellules infectées *in vivo*, ce qui est une condition préalable pour le développement de l'ATL.

Il est donc bien établi que la différence de pathogénéicité entre HTLV-1 et HTLV-2 résulterait du pouvoir transformant différent des deux protéines Tax-1 et Tax-2 et que le PBM de Tax-1 est l'élément déterminant de cette différence. Par conséquent, les interactions de Tax-1 avec les protéines à domaines PDZ sont importantes pour son pouvoir transformant.

Au début de notre étude, 14 protéines possédant au moins un domaine PDZ étaient connues pour interagir avec Tax-1 (**Tableau 2**). Le génome humain code pour au moins 256 domaines PDZ répartis sur au moins 145 protéines différentes⁴²². Notre premier objectif est de générer une cartographie plus complète des protéines à domaines PDZ partenaires de Tax-1, permettant de mieux connaître les fonctions biologiques ciblées par Tax-1 via ces interactions. Par la suite, déterminer la spécificité possible de Tax-1 pour certaines classes de protéines à domaines PDZ. Nous avons souhaités également dans cette étude mettre en évidence les protéines PDZ interagissant avec Tax-1 et dont les gènes sont exprimés dans des lymphocytes T infectés ou non par HTLV-1. Ces dernières constitueraient des cibles potentielles du virus HTLV-1 *in vivo*. Nous avons voulu caractériser plus en détail certaines interactions nouvelles pour conforter notre stratégie et, enfin, démontrer que des interactions Tax-1/PDZ peuvent être inhibées par de petites molécules chimiques.

CHAPITRE III:

RÉSULTATS

CHAPITRE III : RÉSULTATS

Le premier objectif de notre étude étant de cartographier de façon la plus complète possible des interactions entre l'oncoprotéine Tax-1 et les protéines à domaines PDZ, nous avons complété les interactions déjà connues dans la littérature par des interactions nouvelles obtenues par des criblages à moyen débit. Notre stratégie expérimentale est schématisée ci-dessous (**Figure 19**).

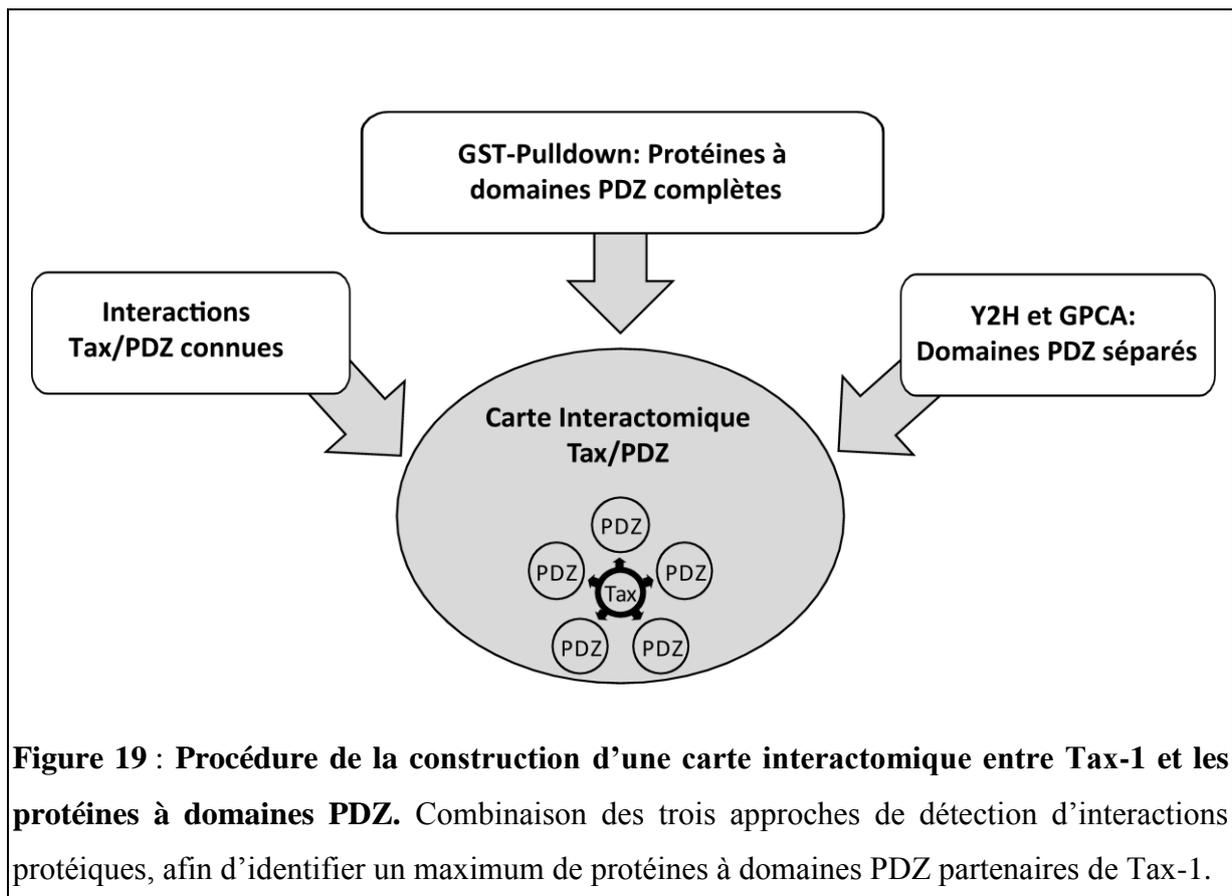


Figure 19 : Procédure de la construction d'une carte interactomique entre Tax-1 et les protéines à domaines PDZ. Combinaison des trois approches de détection d'interactions protéiques, afin d'identifier un maximum de protéines à domaines PDZ partenaires de Tax-1.

1 Les protéines à domaines PDZ issues de la littérature

Nous avons effectué une recherche bibliographique manuelle pour retrouver des articles de recherche mentionnant une interaction entre Tax-1 avec une ou plusieurs protéines à domaines PDZ. Nous avons recensé 14 protéines à domaines PDZ partenaires de Tax-1 (**Tableau 2 et Figure 20**). Ces interactions permettent à Tax-1 de perturber le cycle cellulaire, la prolifération et la réponse immunitaire.

Tableau 2 : Liste des protéines à domaines PDZ connues dans la littérature pour interagir avec Tax-1.

Nom	Id Gène	Nom Uniprot	Id Uniprot	Id article Pubmed	Biologie d'HTLV-1
DLG1	1739	DLG1_HUMAN	Q12959	9192623	Accélération du cycle cellulaire
DLG4	1742	DLG4_HUMAN	P78352	9482110	-
ERBB2IP	55914	LAP2_HUMAN	Q96RT1	17100642	-
IL16	3603	IL16_HUMAN	Q14005	12620798	Accélération du cycle cellulaire
LIN7A	8825	LIN7A_HUMAN	O14910	9482110	-
LNx2	222484	LNx2_HUMAN	Q8N448	22458338	-
MAGI1	9223	MAGI1_HUMAN	Q96QZ7	23279616	Croissance indépendante de IL2
MAGI3	260425	MAGI3_HUMA	Q5TCQ9	15003862	-
PAR6A	50855	PAR6A_HUMAN	Q9NPB6	9482110	-
PDLIM2	64236	PDLI2_HUMAN	Q96JY6	19131544	Suppression de la tumorigénèse induite par Tax
SCRIB	23513	SCRIB_HUMAN	Q14160	17855372	Suppression de la réponse immunitaire
SNTB1	6641	SNTB1_HUMAN	Q13884	9482110	-
SNTB2	6645	SNTB2_HUMAN	Q13425	9482110	-
TAX1BP3	30851	TX1B3_HUMAN	O14907	9482110	-

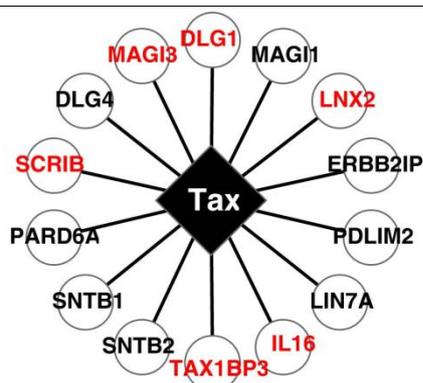
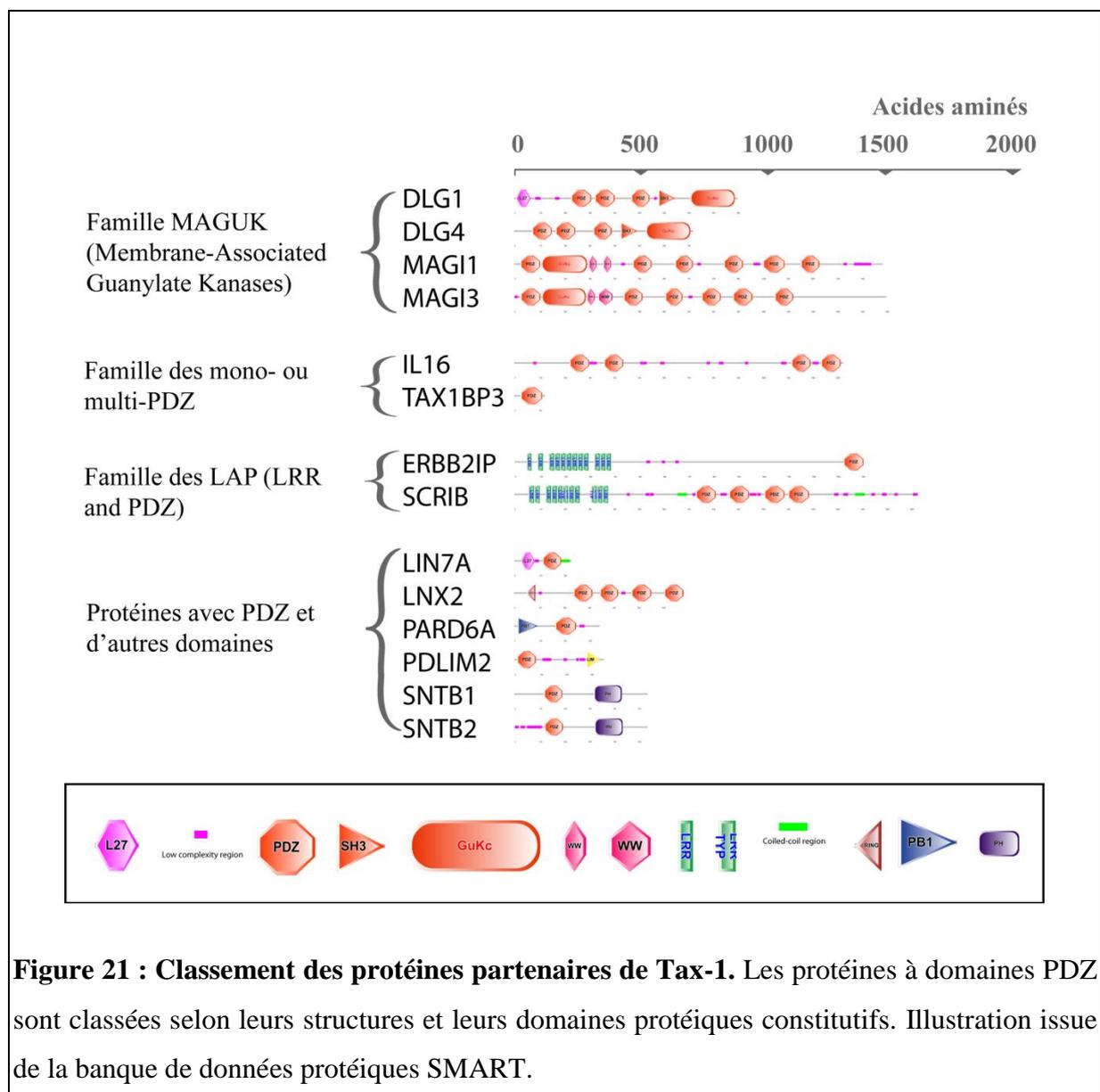


Figure 20 : Protéines à domaines PDZ décrites comme partenaires de Tax-1. 14 protéines à domaines PDZ sont décrites pour leur interaction avec Tax-1. La couleur rouge correspond aux protéines ayant été validées expérimentalement au cours de notre étude.

Afin d'estimer la spécificité de Tax-1 à cibler une classe particulière de protéines à domaines PDZ données, un classement basé sur la structure protéique et les domaines constitutifs des protéines PDZ partenaires de Tax-1 a été réalisé.

Ce classement a révélé que la protéine Tax-1 cible des protéines à domaines PDZ de la famille MAGUK (Membrane-Associated Guanylate Kinase) telles que DLG1, DLG2, MAGI1 et MAGI3 ; de la famille Multi-PDZ, telles que IL16 et de la famille LAP (LRR And PDZ domain), telles que ERBB2IP et SCRIB. Ce classement nous indique que Tax-1 cible aussi des protéines non classées dans ces grandes familles, telles que LIN7A, LNX2, PARD6A, PDLIM2, SNTB1, SNTB2 et TAX1BP3 (**Figure 21**). Aucune préférence de l'oncoprotéine Tax-1 à interagir avec une catégorie de protéines PDZ données ne peut être déduite de cette analyse, qui ne prend pas en compte la totalité des protéines à domaines PDZ susceptibles d'interagir avec Tax-1.



2 Identification des interactions entre Tax-1 et les protéines à domaines PDZ codées par l'ORFeome 5.1

L'ORFeome 5.1 est une collection de 15483 ORFs (Open Reading Frames) représentant 12794 gènes, dont 74 codent pour des protéines à domaines PDZ ⁴²³. Nous avons testé l'interaction de ces 74 protéines à domaines PDZ avec la protéine Tax-1, en utilisant la technique du GST pulldown. Pour ce faire, la protéine de fusion GST-Tax-1 a été produite en bactérie BL21, purifiée à l'aide des billes d'agarose couplées à la glutathione, incubées avec des lysats de cellules HEK293T contenant les différentes protéines à domaine PDZ flanquées d'une étiquette "Flag" en position N-terminale. Les complexes ont été précipités, lavés plusieurs fois et analysés par SDS-PAGE suivie de western blot à l'aide d'un anticorps anti-Flag. Le tableau 3 résume le résultat obtenu pour l'ensemble des ORFs testés.

Tableau 3 : Criblage de l'ORFeome 5.1 par pulldown. 74 ORFs codant pour des protéines à domaines PDZ ont été testés par la méthode du GST Pull down. Oui (en Gris): Il y a interaction. Non (sans couleur) : Il n'y a pas d'interaction.

Protéine	Interaction	Protéine	Interaction	Protéine	Interaction	Protéine	Interaction
AHNAK	Non	INTU	Oui	PDLIM3	Non	SDCBP	Oui
APBA3	Non	LDB3	Non	PDLIM4	Oui	SDCBP2	Oui
ARHGAP21	Non	LIMK2	Non	PDLIM5	Non	SIPA1L2	Non
CARD11	Non	LIN7A	Non	PDLIM7	Oui	SNTG2	Non
CASK	Non	LNK1	Non	PDZD11	Non	SNX27	Non
CNKS2	Non	LNK2	Oui	PDZD3	Oui	STXBP4	Non
CYTIP	Non	LRRC7	Non	PDZD4	Non	SYNJ2BP	Non
DVL1	Non	MAGI3	Oui	PDZD8	Non	TAX1BP3	Oui
DVL2	Non	MAGIX	Non	PDZK1	Non	TIAF1	Non
DVL3	Oui	MAST1	Non	PRX	Non	TIAM1	Non
ERBB2IP	Non	MPP1	Non	PSMD9	Non	TJP1	Non
FRMPD1	Non	MPP2	Non	PTPN3	Non	TJP3	Non
FRMPD2	Non	MPP3	Non	PTPN4	Non	USH1C	Non
FRMPD4	Non	MPP4	Non	RADIL	Oui		
GIPC2	Oui	MPP5	Non	RAPGEF2	Non		
GIPC3	Non	PARD3	Non	RAPGEF6	Non		
GOPC	Non	PARD6A	Non	RGS3	Oui		
GRIP1	Non	PARD6B	Non	RHPN1	Non		
HTRA2	Non	PDLIM1	Non	RHPN2	Non		
IL16	Oui	PDLIM2	Non	RIMS2	Non		

Sur les 74 protéines à domaines PDZ testées par GST pulldown, 14 interagissent spécifiquement avec Tax-1 : DVL3, GIPC2, IL16, INTU, LNX2, MAGI3, PDLIM4, PDZLIM7, PDZD3, RADIL, RGS3, SDCBP, SDCBP2 et TAX1BP3. Parmi ces 14 protéines, quatre protéines MAGI3, LNX2, IL16 et TAX1BP3 sont déjà connues pour interagir avec Tax-1. Les dix autres protéines restantes sont de nouvelles partenaires de Tax-1 (**Figure 22 et Annexe 1**).

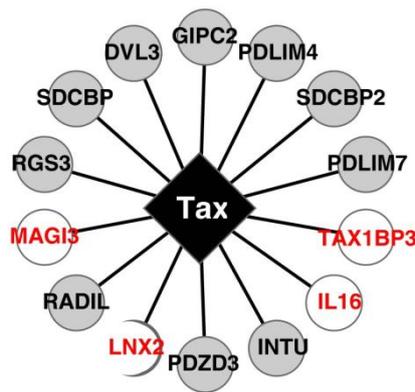


Figure 22 : Identification de nouvelles protéines partenaires de Tax-1. 14 protéines à domaines PDZ ont été identifiées comme partenaires de Tax-1 par GST pulldown. Parmi celles-ci, seules les protéines en caractère rouge représentées (dans un cercle blanc) sont connues dans la littérature.

3 Identification des interactions entre Tax-1 et les domaines PDZ clonés séparément

Afin de couvrir un ensemble plus large de protéines PDZ codées par le génome humain, nous avons testé par la technologie du double hybride en levure (Y2H), les interactions de Tax-1 avec le PDZome humain, une ressource de domaines PDZ regroupant 96% des domaines PDZ humains connus⁴²².

Tableau 4: Ensemble des domaines PDZ testés avec Tax-1. Chaque domaine est nommé selon la protéine qui le contient en plus d'un chiffre indiquant sa position dans le sens N-terminal et C-terminal quand la protéine contient plus d'un domaine PDZ. Les domaines qui interagissent avec la protéine Tax-1 sont indiqués en couleur grise. NEG est un contrôle

APBA1_1	APBA1_2	APBA2_1	APBA2_2	APBA3_1	APBA3_2	ARHGAP21	ARHGEF11	ARHGEF12	CARD11	CARD14	CASK
DLG1_1	DLG1_2	DLG1_3	DLG2_1	DLG2_2	DLG2_3	DLG3_1	DLG3_2	DLG3_3	DLG4_1	DLG4_2	DLG4_3
DLG5_1	DLG5_2	DLG5_3	DLG5_4	HTRA2	HTRA4	INADL_1	INADL_10	INADL_2	INADL_3	INADL_4	INADL_5
INADL_6	INADL_7	INADL_8	INADL_9	LNX1_1	LNX1_3	LNX1_4	LNX2_1	LNX2_2	LNX2_3	LNX2_4	MAGI1_1
MAGI1_2	MAGI1_3	MAGI1_4	MAGI1_5	MAGI1_6	MAGI2_1	MAGI2_2	MAGI2_3	MAGI2_4	MAGI2_5	MAGI2_6	MAGI3_1
MAGI3_2	MAGI3_3	MAGI3_4	MAGI3_5	MAGI3_6	MAGIX	MPP1	MPP2	MPP3	MPP4	MPP5	MPP6
MPP7	PARD3_1	PARD3_3	PARD3B_1	PARD3B_2	PARD3B_3	PARD6B	PARD6G	PSMD9	RAPGEF2	SCRIB_1	SCRIB_2
SCRIB_3	SHANK2	SNTB1	NEG	NEG	TJP1_2	TJP2_1	TJP2_2	TJP2_3	TJP3_1	TJP3_2	TJP3_3
AHNAK	CNKS2	CNKS3	DEPDC2_1	DEPDC2_2	DEPTOR	DFNB31_1	DFNB31_2	DFNB31_3	DVL1	DVL2	DVL3
215045	215860	FNIP1	FRMPD1	FRMPD2_1	FRMPD2_2	FRMPD2L2	FRMPD4	GIPC1	GIPC2	GIPC3	GOPC
GORASP2	GRASP	GRIP1_1	GRIP1_2	GRIP1_3	GRIP1_4	GRIP1_5	GRIP1_6	GRIP1_7	GRIP2_1	GRIP2_2	GRIP2_3
GRIP2_4	GRIP2_5	GRIP2_6	GRIP2_7	IL16_1	IL16_2	INTU	KIAA1849	LDB3	LIMK2	LMO7	NEG
MAST1	MAST2	MAST3	MAST4	MPDZ_1	MPDZ_10	MPDZ_11	MPDZ_12	MPDZ_13	MPDZ_3	MPDZ_4	MPDZ_5
MPDZ_6	MPDZ_7	MPDZ_8	MPDZ_9	MYO18A	PREX1_1	PREX1_2	PDLIM1	PDLIM2	PDLIM3	PDLIM4	PDLIM5
PDLIM7	PDZD11	PDZD2_1	PDZD2_2	PDZD2_3	PDZD2_4	PDZD2_5	PDZD2_6	PDZD3_1	PDZD3_2	PDZD3_3	PDZD3_4
PDZD4	PDZD7_1	PDZD7_2	PDZD8	PDZK1_1	PDZK1_2	PDZK1_3	PDZRN3_1	PDZRN3_2	PDZRN4	PPP1R9A	PPP1R9B
LRRC7	LNX1_2	SHANK1	NOS1	PARD6A	ERBB2IP	LIN7C	PICK1	HTRA3	HTRA1	TAX1BP3	LIN7B
NEG	SNTA1	SYNPO2	MLLT4	LIN7A	PARD3_2	TIAM1	SLC9A3R1_2	TJPI_3	MPDZ_2	SCRIB_4	IL16_3
PRX	CYTIP	PTPN13_1	PTPN13_2	PTPN13_3	PTPN13_4	PTPN13_5	PTPN3	PTPN4	RGS12	RGS3	RHPN1
RHPN2	RIMS1	RIMS2	SDCBP_1	SDCBP_2	SDCBP2_1	SDCBP2_2	NEG	SHROOM4	NEG	SIPA1L1	SIPA1L2
SIPA1L3	SLC9A3R1_1	SLC9A3R2_1	SLC9A3R2_2	SNTG1	SNTG2	SNX27	SYNJ2BP	TIAM2	USH1C_1	USH1C_2	USH1C_3

Pour ce faire, l'ADNc de Tax-1 a été cloné et exprimé en levure haploïde AH109 (MAT α) sous forme de fusion avec le domaine de liaison à l'ADN (DB) du transactivateur Gal4 de la levure (transactive le gène de sélection HIS3). Le PDZome (246 domaines) a été cloné et exprimé en levure haploïde Y187 (MAT α) sous forme de fusion avec le domaine d'activation de la transcription (AD) de Gal4. La conjugaison des deux types de levure et l'utilisation d'un gène rapporteur HIS3 codant pour l'histidine permet d'identifier des levures diploïdes contenant des partenaires d'interaction. Parmi les 246 domaines PDZ appartenant à 138 protéines différentes testés, 47 domaines appartenant à 38 protéines interagissent avec Tax-1 (**Figure 22**). Les ADNc correspondant aux 47 domaines positifs en Y2H ont été clonés dans le vecteur GLucN1 exprimant le premier fragment (GL1) de la luciférase de *Gaussia princeps* (GLuc), tandis que l'ADNc de Tax-1 a été cloné dans le vecteur GLucN2 exprimant le second

fragment (GL2) de la GLuc. La co-transfection de ces deux vecteurs en cellules HEK293T permet de détecter des interactions entre un domaine PDZ et Tax-1 via la complémentarité des fragments GL1 et GL2 de la Gluc. En utilisant cette méthode, nous avons confirmé l'interaction de 33 domaines PDZ avec Tax-1, soit 70% des interactions obtenues par Y2H. (Figure 23 et Annexe 2).

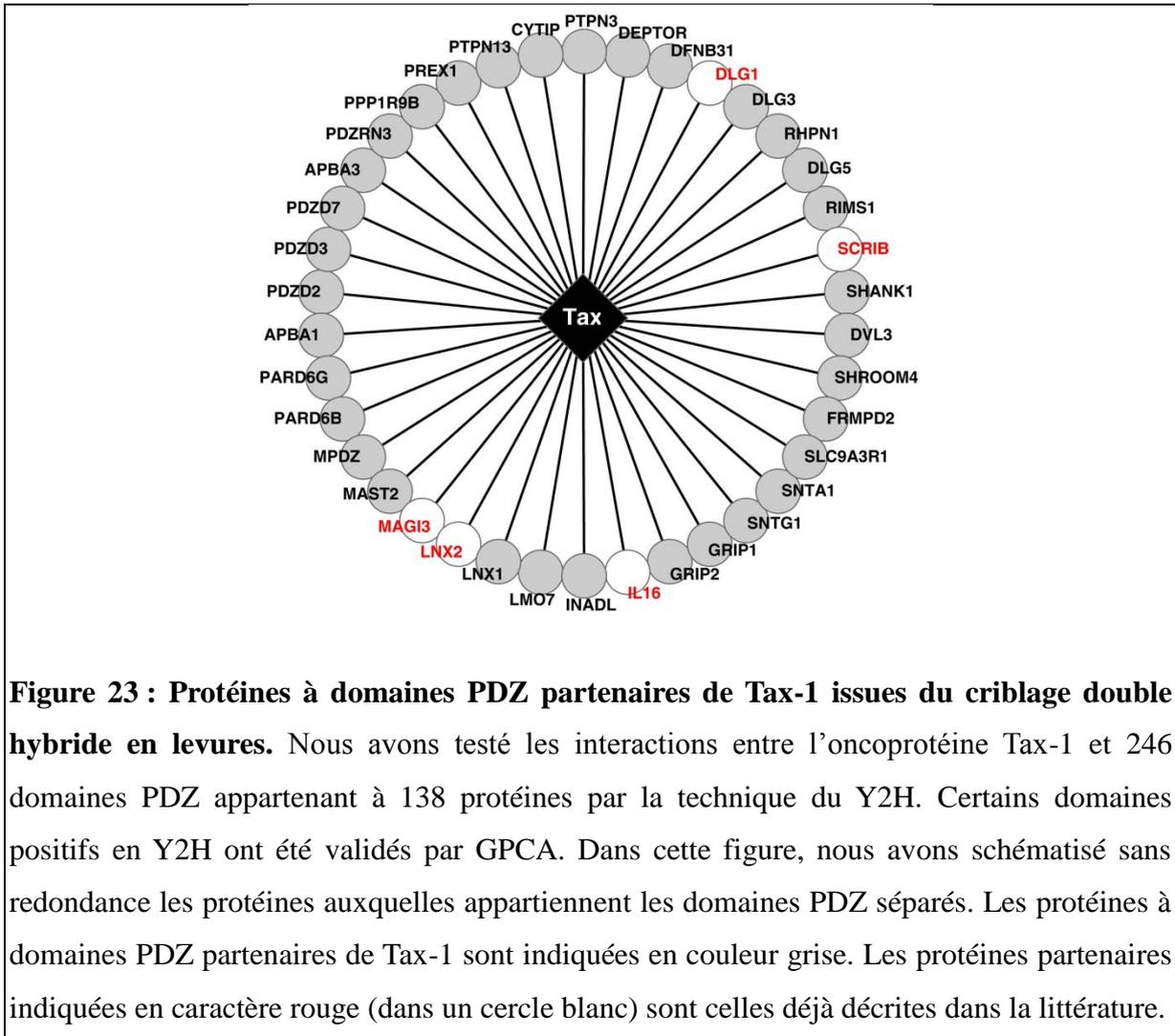
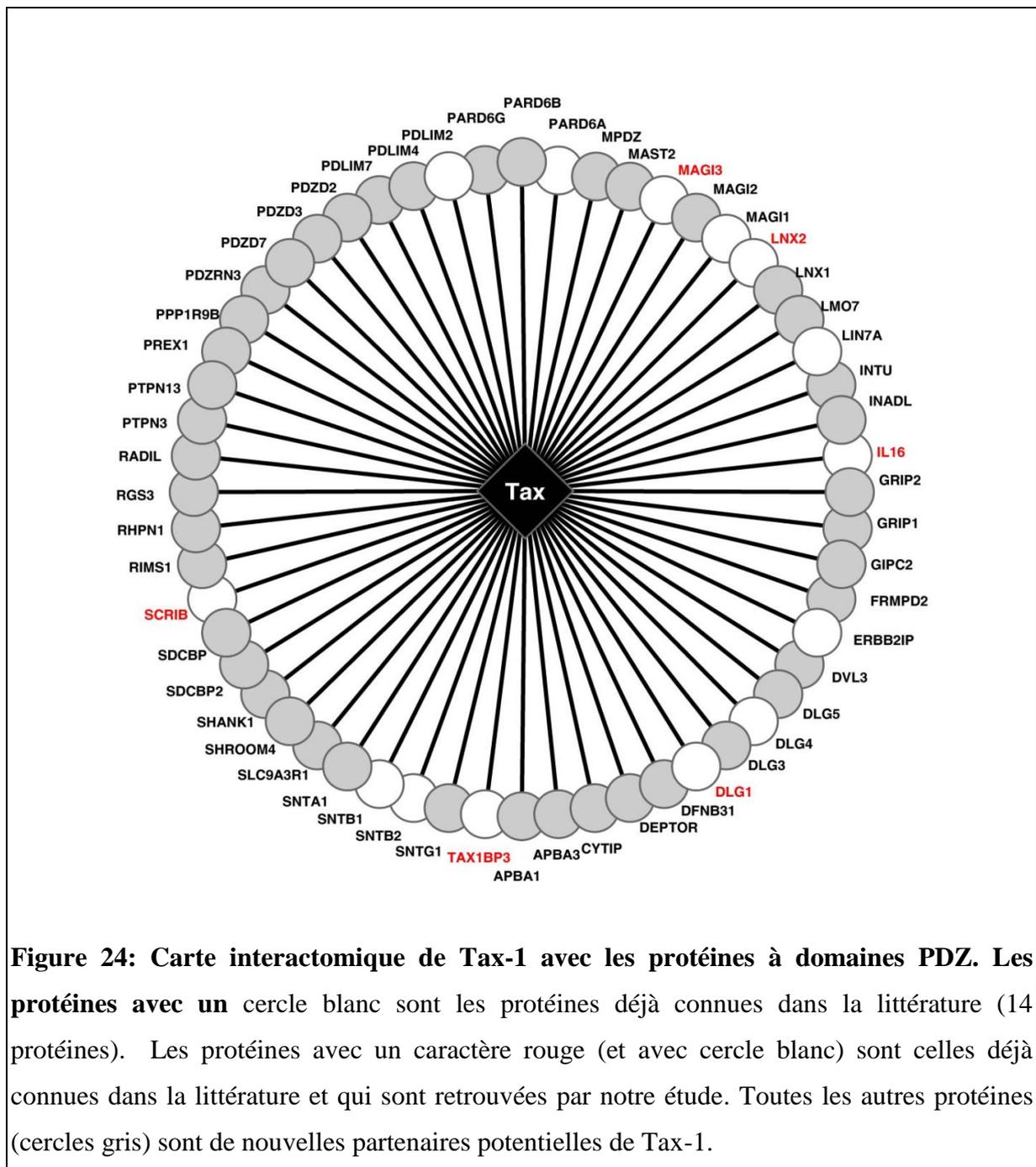


Figure 23 : Protéines à domaines PDZ partenaires de Tax-1 issues du criblage double hybride en levures. Nous avons testé les interactions entre l'oncoprotéine Tax-1 et 246 domaines PDZ appartenant à 138 protéines par la technique du Y2H. Certains domaines positifs en Y2H ont été validés par GPCA. Dans cette figure, nous avons schématisé sans redondance les protéines auxquelles appartiennent les domaines PDZ séparés. Les protéines à domaines PDZ partenaires de Tax-1 sont indiquées en couleur grise. Les protéines partenaires indiquées en caractère rouge (dans un cercle blanc) sont celles déjà décrites dans la littérature.

A l'issue de ce criblage des domaines PDZ, nous avons donc identifié 38 interactions dont 5 déjà décrites dans la littérature pour interagir avec Tax-1, tandis que 33 interactions sont nouvelles.

La compilation des résultats obtenus en analysant les 74 clones PDZ de l'ORFeome 5.1 et les 246 domaines du PDZome humain permet d'enrichir le nombre total de partenaires de Tax-1 possédant au moins un domaine PDZ de 14 à 56 protéines. Ceci illustre l'avantage d'une analyse systématique d'interactions pour avoir un aperçu global de l'interactome de Tax-1

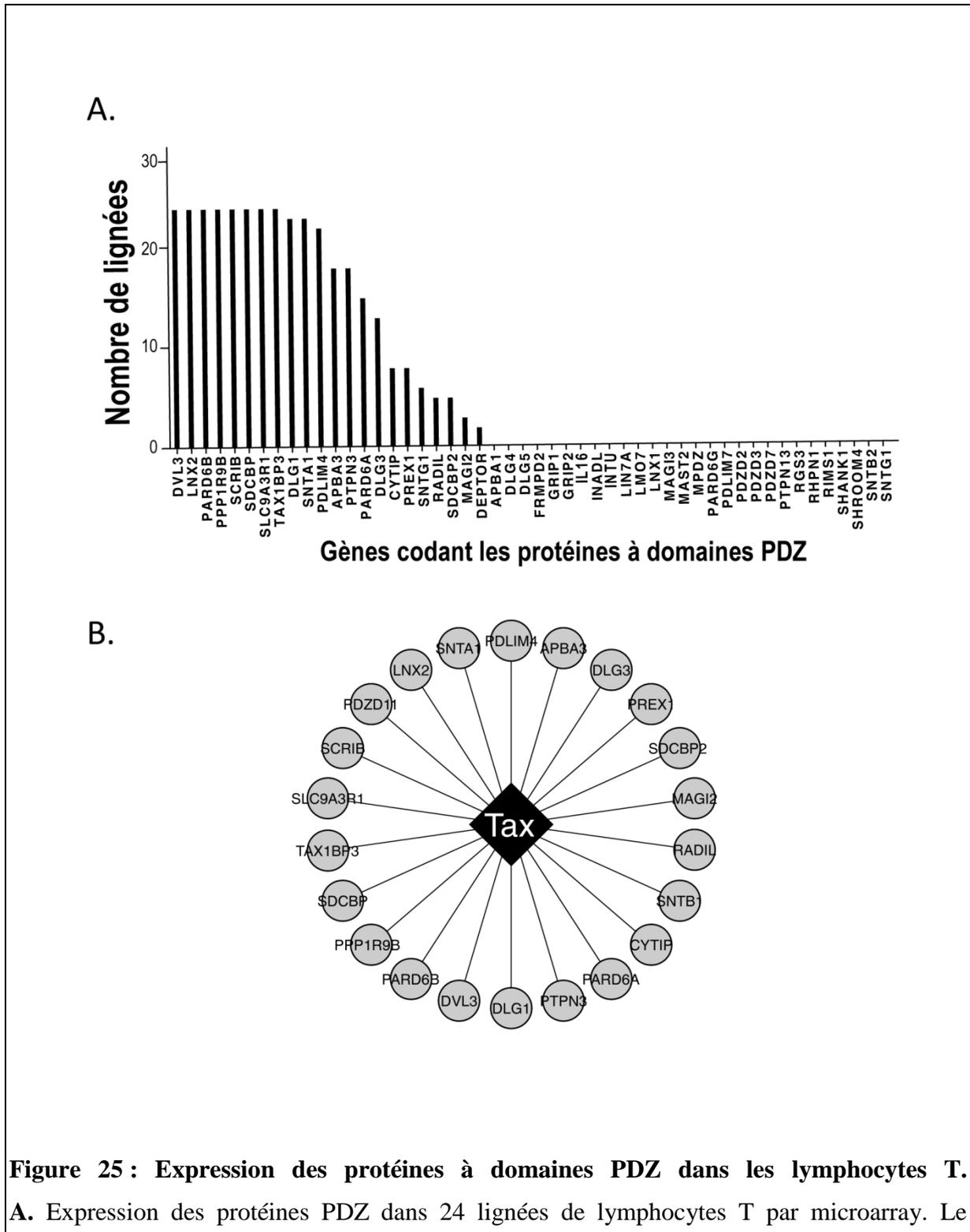
avec des protéines à domaines PDZ (**Figure 24, Annexe 3 et Annexe 4**). Tax-1 pourrait donc cibler un tiers du PDZome humain.



4 Expression des gènes codant pour les protéines à domaines PDZ dans des les lymphocytes T

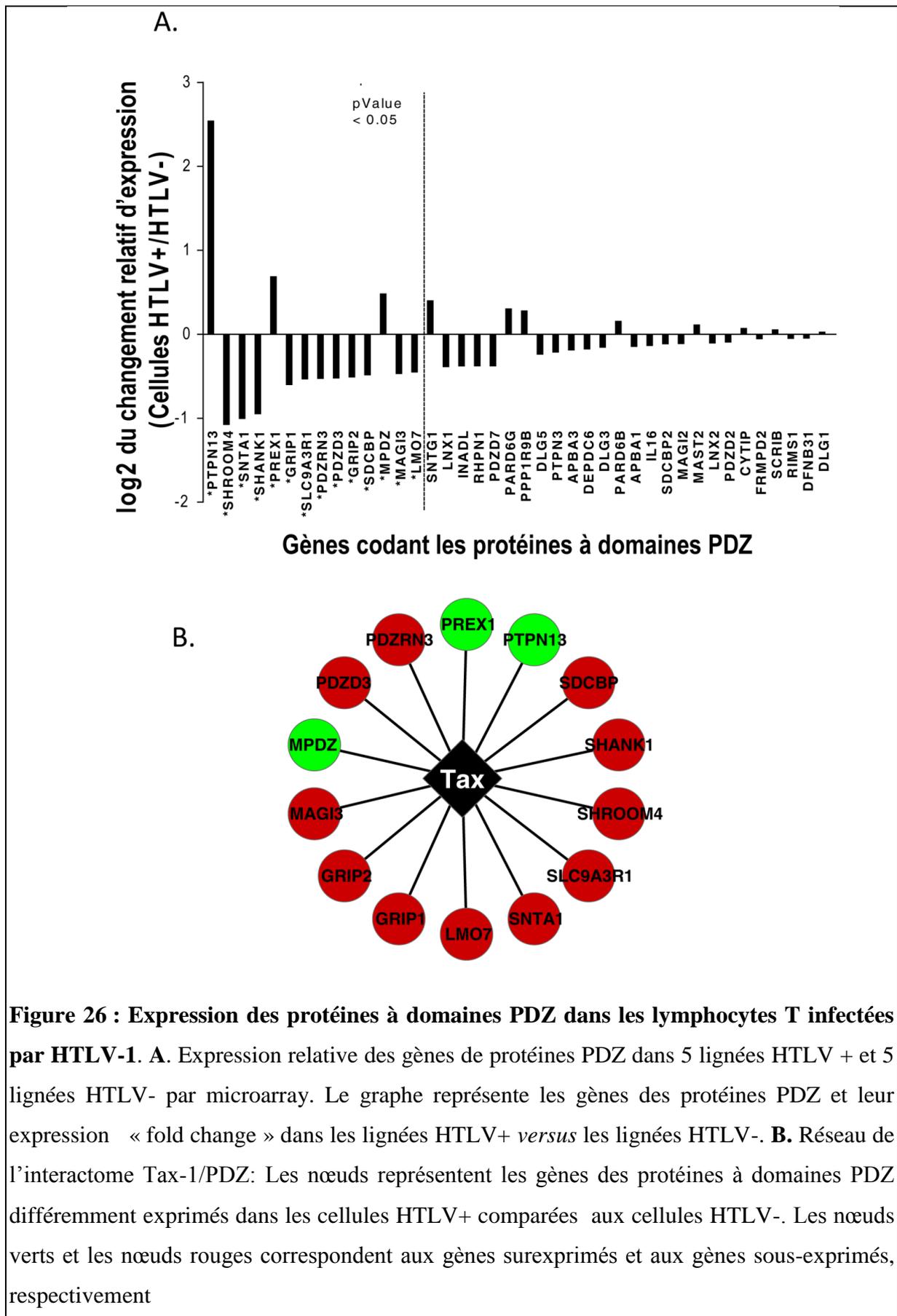
Afin de proposer une liste de protéines à domaines PDZ susceptibles de jouer un rôle dans la biologie du virus HTLV-1, nous avons vérifié les valeurs d'expression des 56 gènes codant

pour des protéines à domaines PDZ partenaires de Tax-1 dans des données de puces d'hybridation (microarray) de 24 lignées lymphocytaires non-infectées par le virus HTLV-1 (**Annexe 7**). Cette analyse a permis de constater que 22 gènes sur 56 sont significativement exprimés dans au moins 3 lignées différentes de lymphocytes T (**Figure 25 et Annexe 5**).

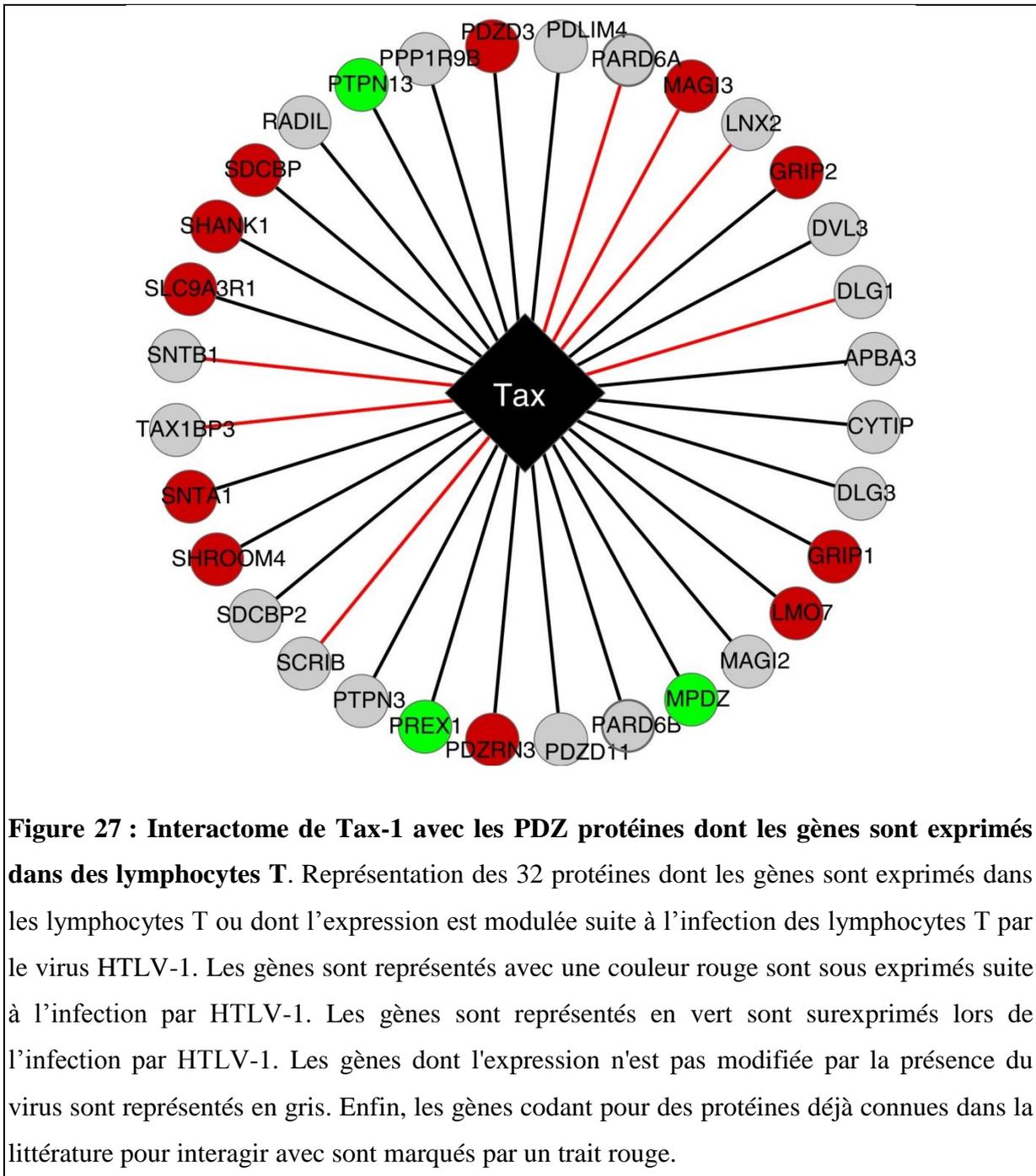


graphe représente les gènes PDZ et le nombre de lignées dans lesquelles ils sont significativement exprimés. **B.** Réseau des interactions Tax-1/PDZ : Les nœuds gris représentent les gènes des protéines PDZ significativement exprimés dans les lymphocytes T testés.

Une analyse comparative de l'expression des 56 gènes dans des lignées lymphocytaires infectées (HUT102, C91PL, MT4, MT2, C8145) ou non (CTV1, HUT78, CEM, MOLT16 et JURKAT) par le virus HTLV-1 permet d'identifier 14 gènes dont les valeurs d'expression sont significativement différentes ($p < 0,05$) dans des lymphocytes infectés par rapport aux non-infectés (**Figure 26 et Annexe 5**). 3 gènes (MPDZ, PREX1 et PTPN13) sont surexprimés en présence du virus tandis que l'expression de 11 gènes est réprimée par HTLV-1 (SDCBP, SHANK1, SHROOM4, SLC9A3R1, SNTA1, LMO7, GRIP1, GRIP2, MAGI3, PDZD3 et PDZRN3).



En somme (fusion de la **figure 25+figure 26**), il apparait donc que 32 gènes sur 56 codant pour des protéines PDZ partenaires de Tax-1 sont exprimés dans les lymphocytes T. L'expression d'un certain nombre d'entre eux (14 protéines) étant modulée par la présence du virus HTLV-1 (**Figure 27 et Annexe 5**).



5 Mécanismes cellulaires ciblés préférentiellement par Tax-1 via les protéines à domaines PDZ

5.1 Analyse des fonctions enrichies

Comme expliqué dans la partie "Introduction", les protéines à domaine PDZ ont été impliquées dans une diversité de fonctions biologiques. Dans le but de caractériser parmi ces fonctions, celles qui sont enrichies au sein du groupe des 32 partenaires de Tax-1, nous avons utilisé la base de Données d'Annotation, Visualisation et Intégration des Découvertes (DAVID, <https://david.ncifcrf.gov>)⁴²⁴. Les fonctions biologiques les plus significatives sont répertoriées dans le tableau 5 ci-dessous. Cette analyse suggère que Tax-1, via ses partenaires PDZ, pourrait préférentiellement cibler l'organisation du cytosquelette, la régulation du cycle cellulaire, la régulation des flux métaboliques, et la prolifération cellulaire (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Enrichissement de GO pour les 32 protéines à domaines PDZ ciblées par Tax-1. Enrichissement des GOs révélés par l'interface DAVID⁴²⁴.

Numéro du cluster	Score d'enrichment	"Gene Ontology" associé (GO)	Nombre de gènes	Gènes codant les protéines à domaines PDZ
1	0,66	cytoskeleton, cellular process organization	19	APBA3, DLG1, LMO7, LNX2, MAGI3, PARD6A, PARD6B, PPP1R9B, PREX1, PTPN13, PTPN3, RADIL, SCRIB, SDCBP, SDCBP2, SHANK1, SHROOM4, SLC9A3R1, SNTA1
2	0,63	interspecies interaction between organisms, multi-organism process	3	DLG1, MAGI3, MPDZ
3	0,61	regulation of cell cycle, cellular developmental process	6	DLG1, PARD6B, PPP1R9B, SCRIB, SHROOM4, SNTA1
4	0,52	negative regulation of cellular process, regulation of metabolic process, response to stimulus	11	APBA3, DEPDC6, DLG1, DLG3, DVL3, GRIP1, PDZD3, PPP1R9B, PTPN3, SCRIB, TAX1BP3
5	0,46	regulation of cell proliferation	3	DLG3, PPP1R9B, TAX1BP3

5.2 L'organisation cellulaire et le cytosquelette comme cibles préférentielles de Tax-1 via les protéines à domaines PDZ.

Parmi les fonctions enrichies, l'organisation du cytosquelette concerne un nombre plus élevé de partenaires (19) et n'a pas été suffisamment étudiée dans le cadre du virus HTLV-1 ou plus spécifiquement lors des nombreuses études focalisées sur l'oncoprotéine Tax-1. Nous avons répertorié les interactions provenant de trois bases de données: BioGRID⁴²⁵, HPRD⁴²⁶ et InterAct⁴²⁷ entre les 19 partenaires impliqués dans l'organisation du cytosquelette, mais également des interactions dites secondaires entre chacune des 19 protéines avec une autre protéine humaine connectant au moins deux protéines PDZ du réseau cytosquelette. La visualisation de ces données par le logiciel Cytoscape⁴²⁸ permet de mettre en évidence les protéines partenaires de Tax-1, PARD6A et PARD6B ainsi que SDCBP et SDCBP2, les plus connectées dans le réseau du cytosquelette (**Figure 28**).

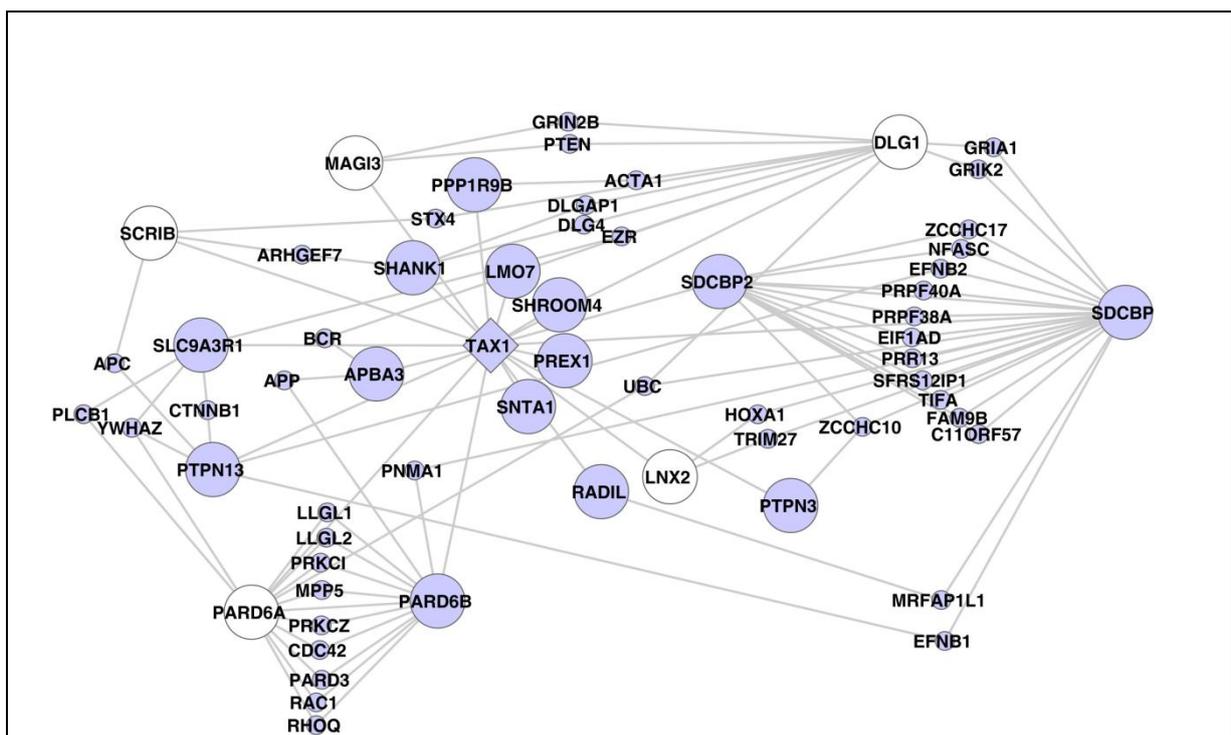


Figure 28 : Carte représentant les interactions entre les protéines à domaines PDZ du cluster « Cytoskeleton », leurs interactions avec Tax-1 ainsi que leurs interactions avec leurs partenaires directs communs retrouvés dans la littérature. Tax-1 est représenté par un nœud en losange. Les nœuds de grande taille et de forme ronde représentent les protéines à domaines PDZ partenaires de Tax-1. Les nœuds de petite taille et de forme ronde représentent les partenaires communs (n+1 communs) des protéines à domaines PDZ partenaires de Tax-1.

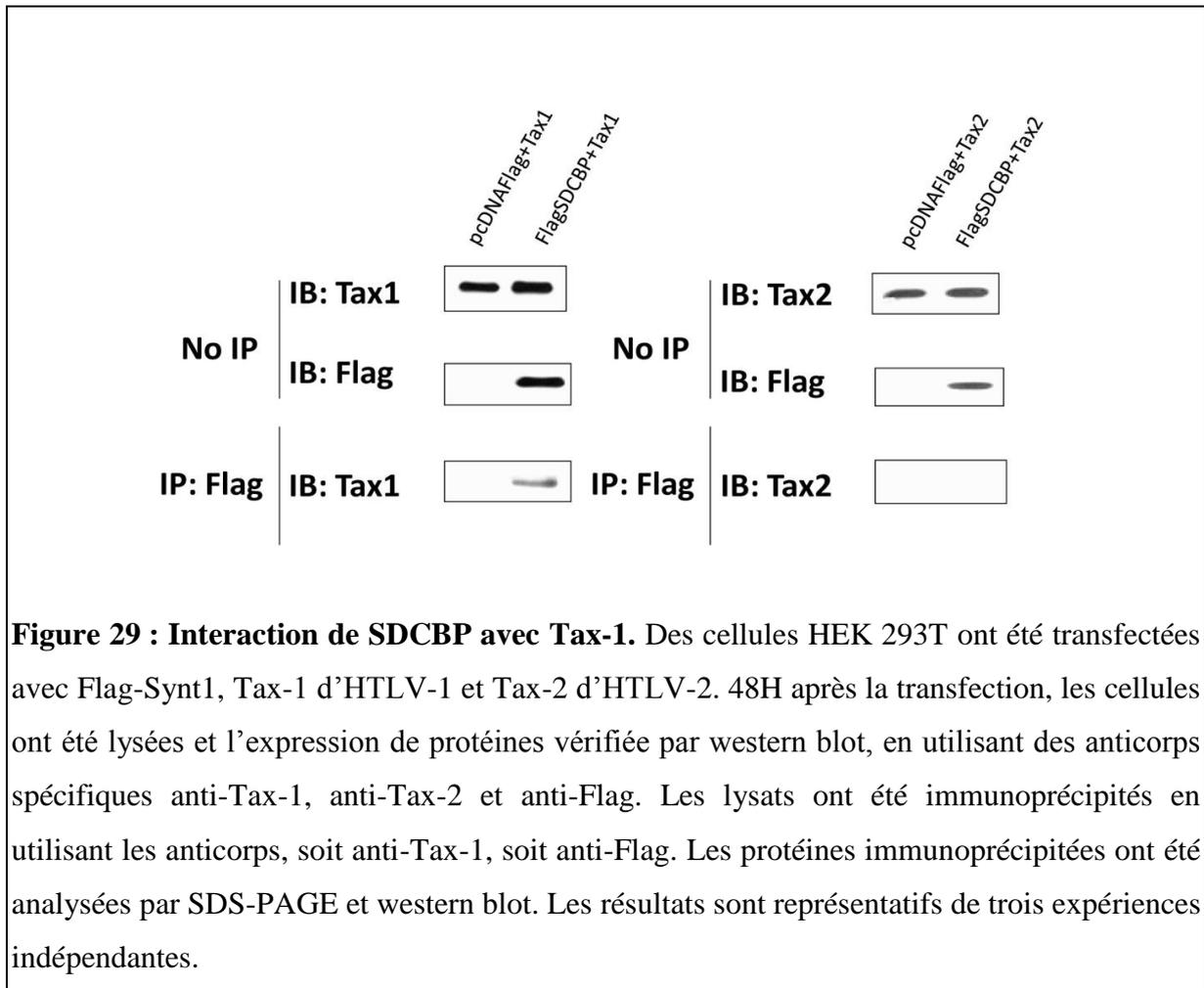
Les nœuds blancs représentent les protéines déjà connues comme partenaires de Tax-1 dans la littérature.

5.3 La Syntenine (SDCBP) comme partenaire important de Tax-1

Parmi les nouveaux partenaires de Tax impliqués dans l'organisation du cytosquelette, les syntenines (Syndecan Binding Protein SDCBP 1 et 2) sont parmi les plus connectées (**Figure 28**). De plus, le gène codant pour la protéine SDCBP est régulé négativement en présence du virus HTLV-1 (**Figure 27**). SDCBP est connue pour exercer un rôle d'échafaudage, en agissant comme une plateforme moléculaire sur laquelle viennent s'agencer d'autres protéines du cytosquelette⁴²⁹. De plus, SDCBP peut réguler l'expression des héparanes sulfates à la surface des cellules⁴²⁹, ce qui pourrait influencer l'infectivité des cellules par le virus HTLV-1.

5.3.1 Validation de l'interaction Tax-1/SDCBP

L'interaction de Tax-1 avec SDCBP a été confirmée par co-immunoprécipitation. Pour ce faire, Flag-SDCBP et Tax-1 ont été co-exprimées de façon transitoire dans des cellules HEK293T, le complexe Flag-SDCBP/Tax-1 a été immunoprécipité à l'aide d'un anticorps anti-Flag couplé aux billes d'agarose et analysé par western blot avec un anticorps anti-Tax-1. Comme contrôle négatif, la protéine Tax-2 ne disposant pas de PBM a été utilisée. Comme montré sur la figure 28, la protéine Tax-1 et non Tax-2, co-précipite avec la protéine Flag-SDCBP, confirmant l'interaction spécifique entre Tax-1 et SDCBP (**Figure 29**).

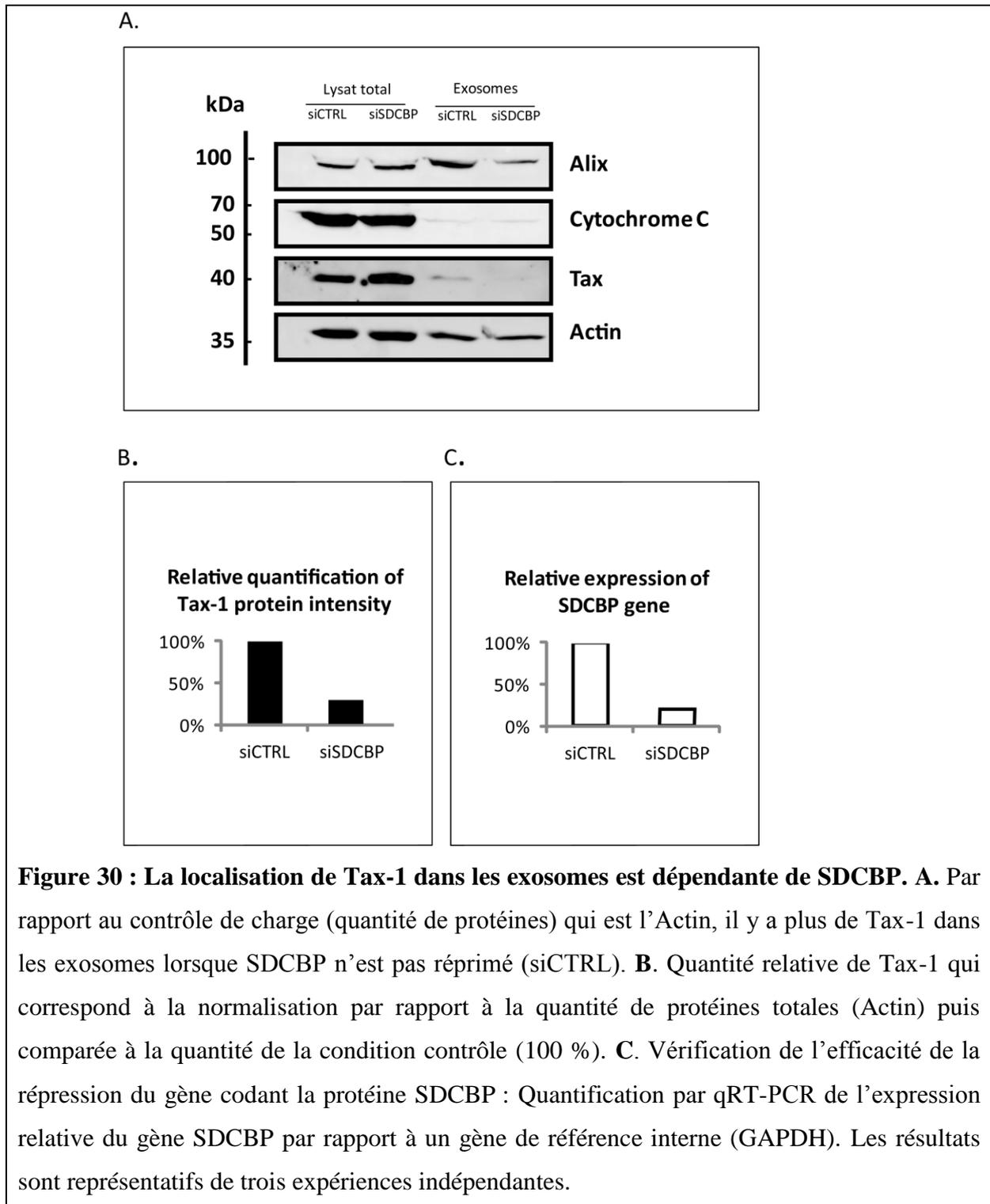


5.3.2 Localisations de Tax-1 et de SDCBP

Depuis quelques années, la protéine SDCBP a été décrite pour jouer un rôle dans la biogenèse des exosomes⁴³⁰. Ces derniers pourraient contribuer à la transmission du virus d'HTLV-1 d'une cellule à une autre¹²⁷, comme cela a été décrit pour le virus de l'Hépatite C⁴³¹. Par ailleurs, les HSPGs partenaires de SDCBP ont été décrits pour jouer un rôle au niveau de l'entrée du virus HTLV-1 dans la cellule¹³². Ce qui suggère qu'il pourrait y avoir un lien entre les modifications du cytosquelette contrôlées par SDCBP, son rôle dans la biogenèse des exosomes et la transmission du virus HTLV-1.

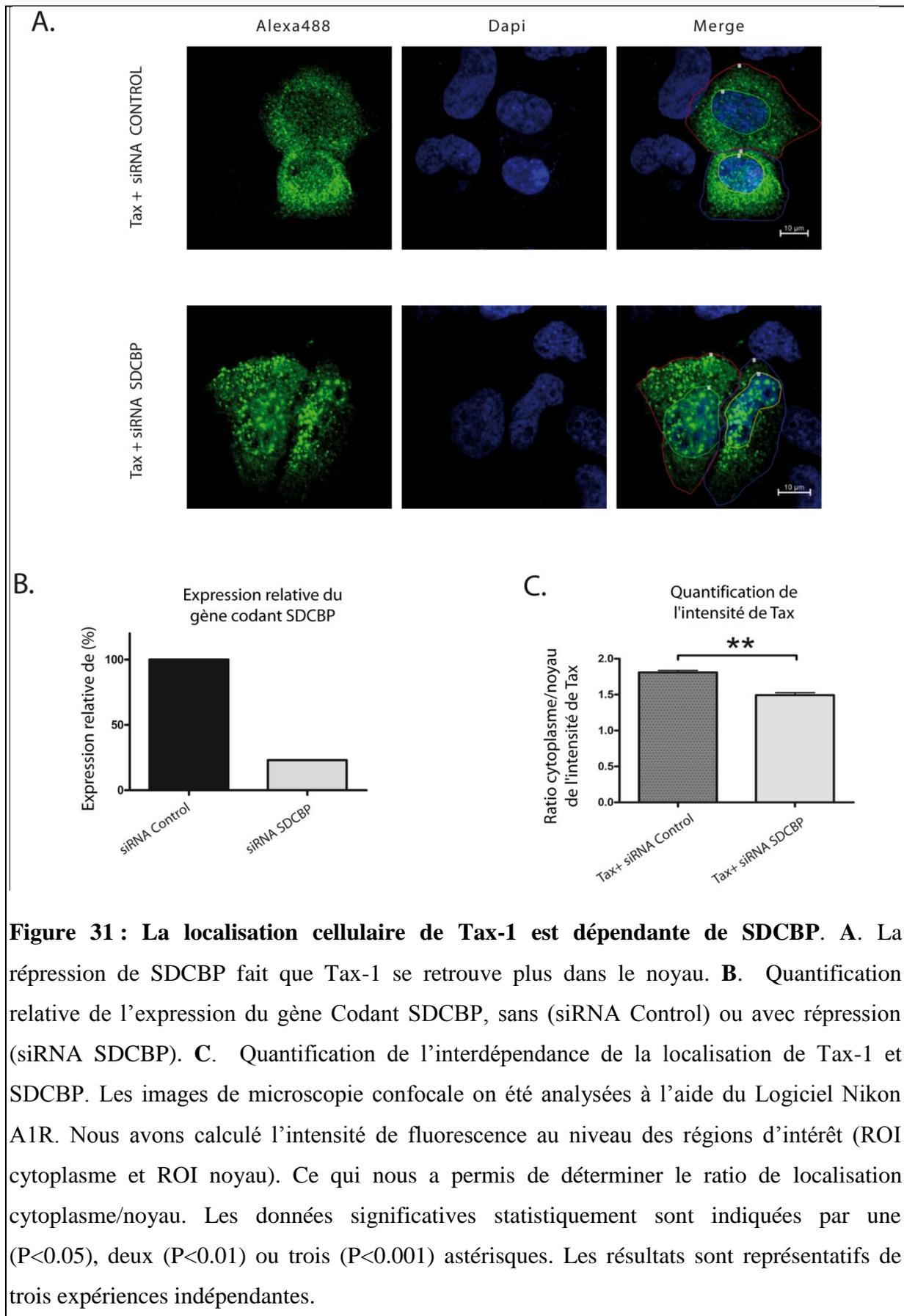
Pour déterminer un rôle potentiel de SDCBP dans la présence de Tax-1 dans les exosomes, nous avons isolé des exosomes à partir de cellules transfectés à l'aide d'un ARN interférant (siCTRL) contrôle, ainsi qu'à partir de cellules dont l'expression de SDCBP a été réprimée par un ARN interférant spécifique (siSDCBP). L'analyse comparative de la quantité de Tax-1 par western blot a permis de révéler une différence entre les exosomes des deux conditions

testées. Effectivement, les résultats montrent que l'inhibition de SDCBP par la présence d'un siSDCBP, les quantités de Tax-1 dans les exosomes sont minimales en comparaison avec la condition contrôle (**Figure 30**). Comme attendu, SDCBP contrôle également la présence de la protéine Alix dans les exosomes. Cette expérience suggère que SDCBP est indispensable à la localisation de Tax-1 dans les exosomes.



5.3.3 La localisation de Tax-1 est affectée par la modulation de l'expression de SDCBP et vice versa

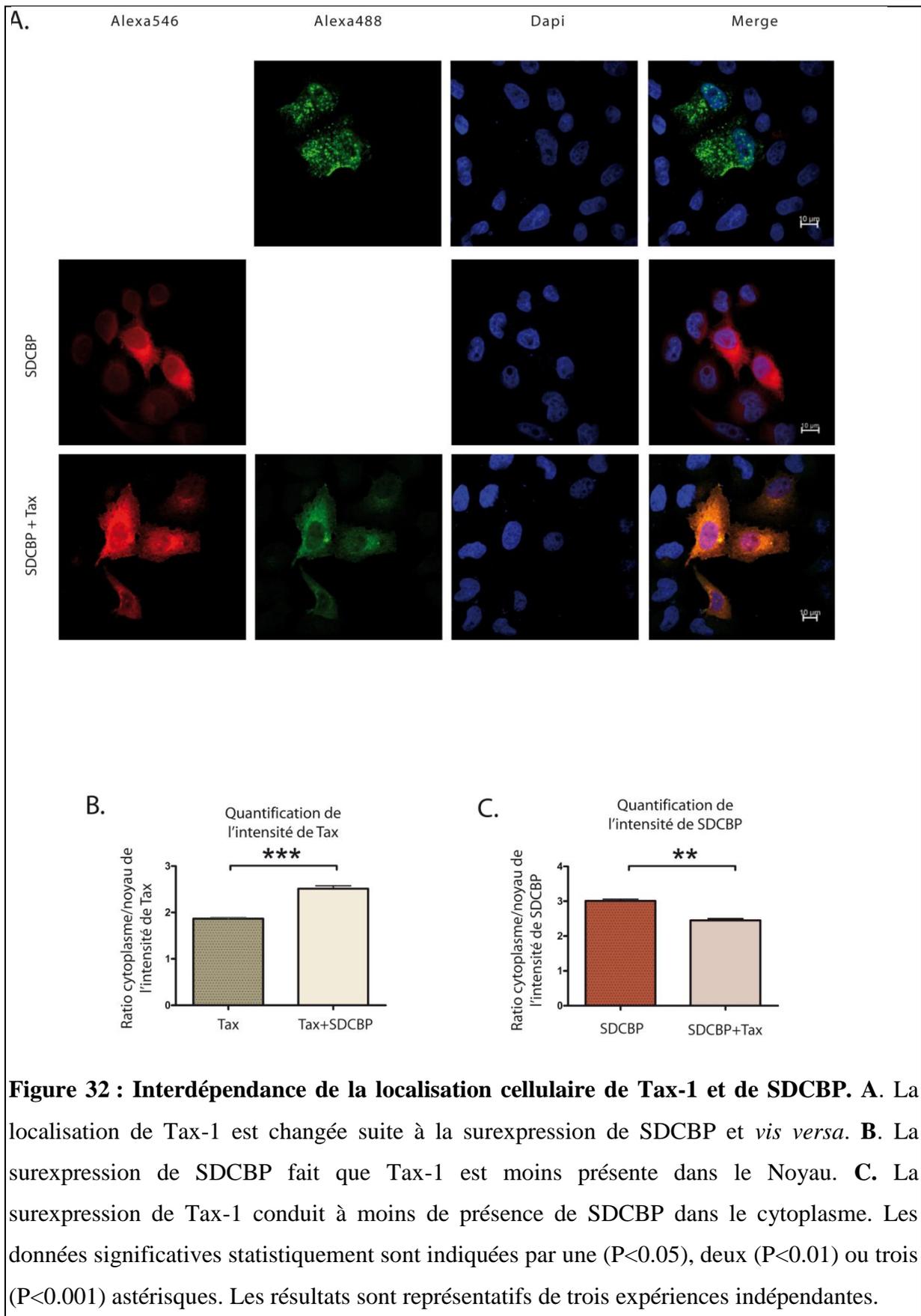
Il est bien établi que la protéine Tax-1 circule entre le noyau et le cytoplasme. Afin de vérifier si la SDCBP influence la localisation cellulaire de Tax, nous avons transfecté des cellules HeLa avec le plasmide exprimant Tax-1, en plus d'un ARN interférant dirigé contre SDCBP ou un ARN interférant contrôle (négatif). Les cellules ont été ensuite fixées, perméabilisées et marquées à l'aide d'un anticorps anti-Tax suivi d'un anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa 488. Les cellules ont été enfin visualisées à l'aide d'un microscope confocal Nikon A1R. Après analyse quantitative des images (logiciel NIS A1 Nikon), il apparaît qu'en présence du siSDCBP, l'équilibre de localisation nucléo-cytoplasmique de Tax-1 est modifiée avec une présence moindre de Tax-1 dans le cytoplasme par rapport aux cellules contrôles (**Figure 31**).



Cette observation a été confirmée par les expériences de surexpression de Tax-1 avec SDCBP. En effet, lorsque SDCBP et Tax-1 sont co-exprimées, la localisation de l'oncoprotéine est plus marquée dans le cytoplasme comparé à la condition où Tax-1 est exprimé seule (**Figure 32A, B**).

De plus, la quantification de l'expression de la protéine SDCBP en absence ou en présence de Tax-1 nous a révélé que la localisation de SDCBP ne reste pas inchangée. De fait, lorsque Tax-1 est surexprimé avec SDCBP, cette dernière se retrouve moins dans le cytoplasme comparé à la condition contrôle (**Figure 32C**).

Ensemble, ces résultats suggèrent que SDCBP influence la présence de Tax-1 dans le cytoplasme et confortent les résultats précédents, concernant le rôle de SDCBP dans la localisation de Tax-1 dans les exosomes. SDCBP pourrait donc être impliquée dans la transmission du virus HTLV-1 de cellule à cellule, via les exosomes.

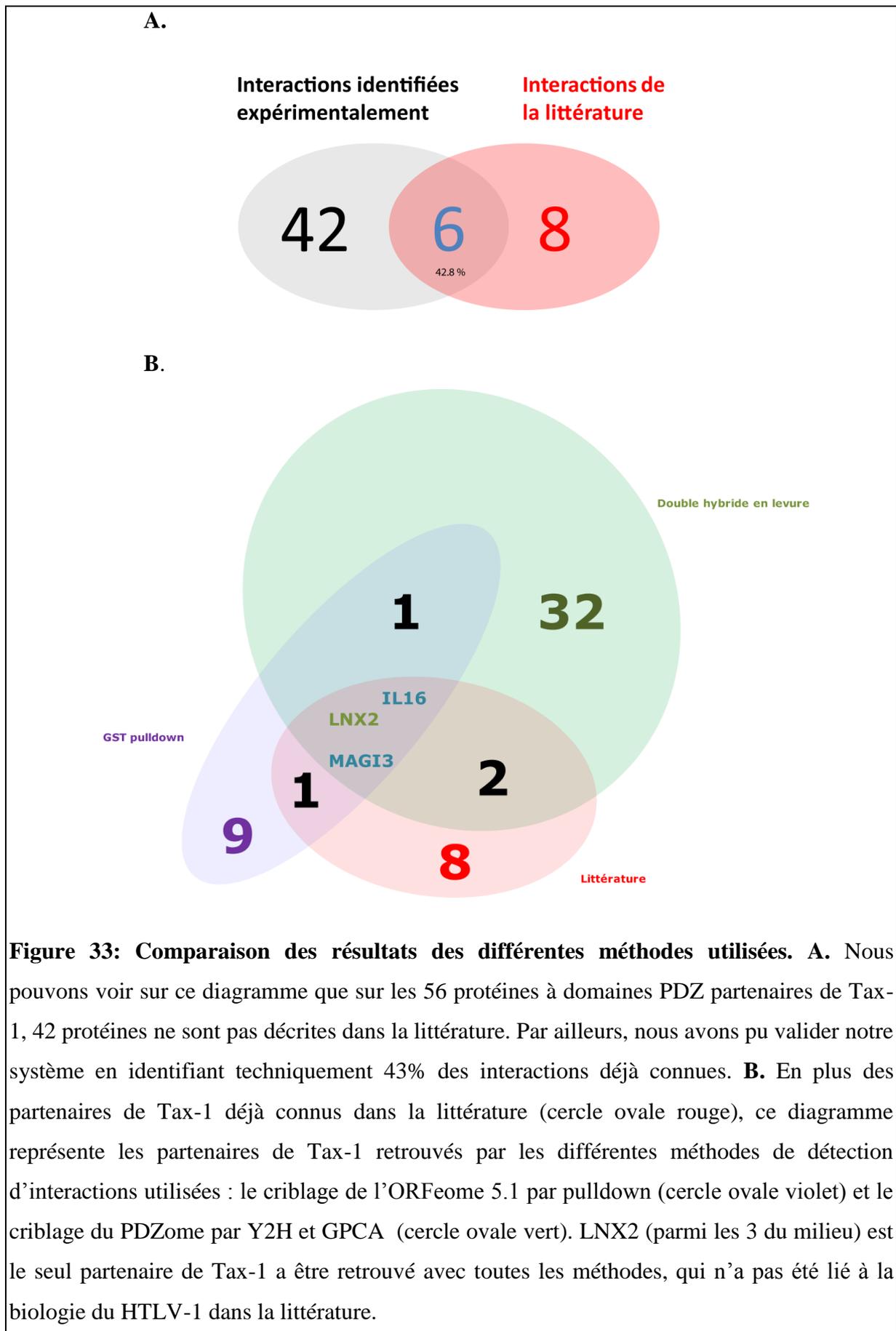


6 Analyse globale de l'interactome Tax-1/PDZ

6.1 Comparaison des données obtenues par les différentes méthodes utilisées.

Une autre manière de démontrer le potentiel de notre approche de cartographie d'interactions Tax-1/PDZ consiste à comparer les données obtenues, et à se focaliser sur certaines interactions qui sont retrouvées par au moins deux méthodes différentes.

Sur les 56 protéines PDZ interagissant avec Tax-1, 42 sont rapportées pour la première fois. Parmi les 14 partenaires connues au début de cette étude, 6 ont été retrouvés par au moins un criblage soit de l'ORFeome ou du PDZome, et 3 partenaires de Tax-1, à savoir IL16, MAGI3 et LNX2 ont été retrouvés par les deux criblages effectués. Les rôles de l'IL16 et MAGI3 dans les fonctions biologiques de Tax-1 ont fait l'objet d'études ciblées^{314,432}. L'interaction de Tax-1 avec LNX2 avait quant à elle été rapportée dans une étude de criblage haut débit effectué dans notre laboratoire³¹⁰ mais son rôle dans la biologie du virus HTLV-1 n'est pas caractérisé (**Figure 33 et Annexe 4**).



6.2 Caractérisation de l'interaction entre Tax-1 et LNX2.

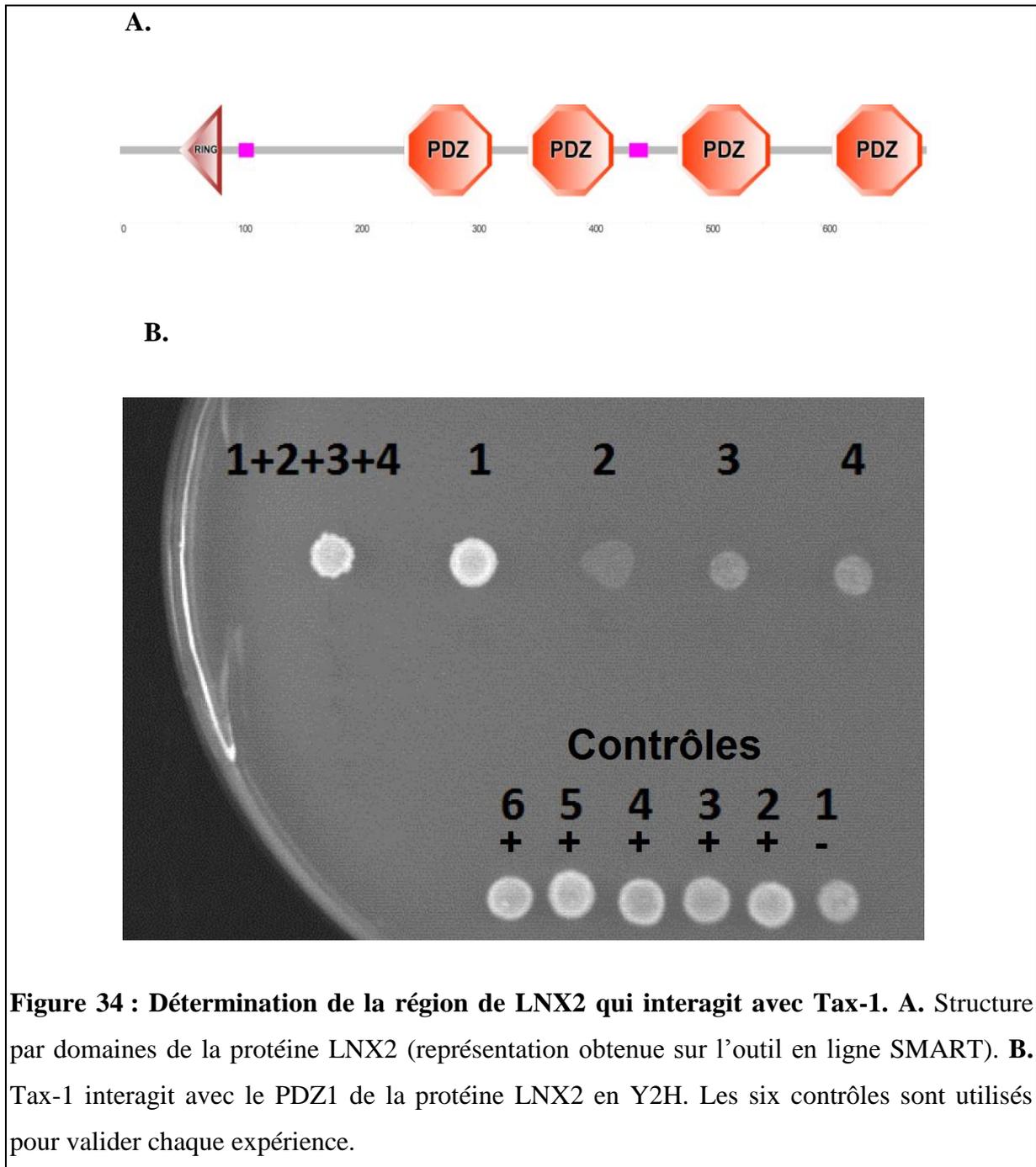
LNX2 (Ligand of Numb x protein 2) est une protéine à domaines PDZ impliquée dans l'échafaudage moléculaire et permettant la localisation subcellulaire de la protéine Numb, elle-même impliquée dans la voie de signalisation Notch⁴³³. La voie Notch a été rapportée pour son rôle positif dans la transformation des lymphocytes T par HTLV-1⁴³⁴. Par ailleurs, des données au sein du laboratoire montrent que l'inhibition de la voie Notch dans des cellules infectées par HTLV-1 provoque une réduction drastique de la réplication virale³¹⁰. De plus, LNX2 interagit également avec certaines protéines du virus HIV-1³¹⁰, ce qui suggère un rôle général dans la biologie des rétrovirus.

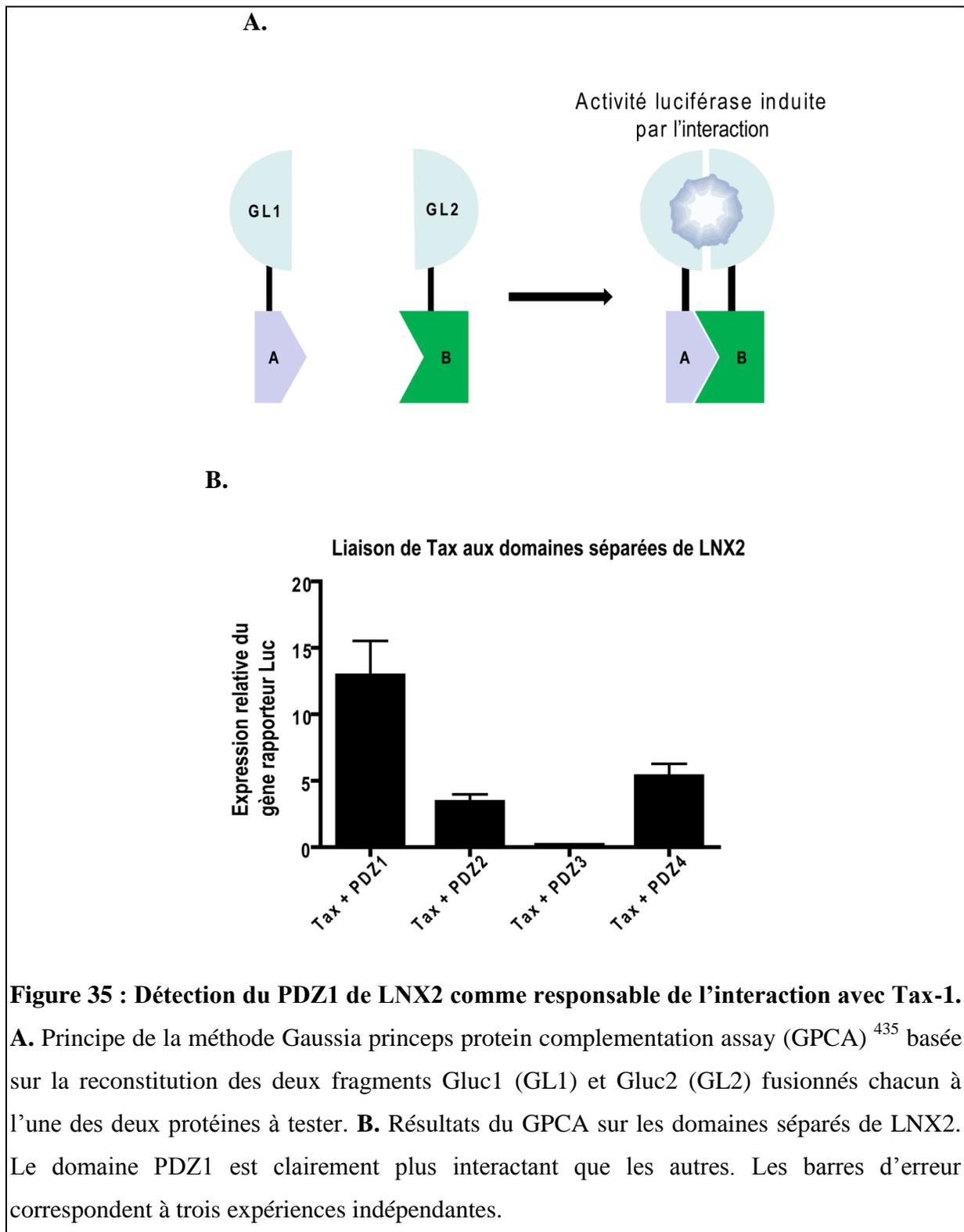
6.3 Détermination du domaine de LNX2 responsable de l'interaction avec Tax-1

La protéine LNX2 comprend un domaine RING et quatre domaines PDZ. Différentes constructions de mutants de LNX2 ont été générées. Plus particulièrement, quatre constructions contiennent chacune un seul des quatre domaines PDZ de LNX2. La détermination de chaque domaine a nécessité des études poussées sur la séquence de la protéine ; ceci en utilisant des outils de prédiction de domaines en ligne tels que PFAM et SMART.

Les séquences nucléotidiques codant les domaines séparés de LNX2 ou la protéine complète ont été clonées dans les vecteurs adéquats, afin de tester leur interaction avec Tax-1 par Y2H (vecteurs AD) et par GPCA (vecteurs GL1). De même Tax-1 a été cloné, comme décrit précédemment, dans les vecteurs utilisés pour le Y2H (vecteurs DB) et le GPCA (GL2).

Après avoir testé les différents domaines PDZ pour leur interaction avec Tax-1, nous avons observé que le PDZ1 est le domaine responsable de l'interaction entre LNX2 et Tax-1 (**Figures 34 et 35**).





6.4 Détermination des acides aminés impliqués dans l'interaction LNX2/Tax-1 par « docking ».

Outre les méthodes de biologie moléculaire, les prédictions par analyses bio-informatiques sont d'un grand apport dans la détermination des sites d'interaction de deux molécules. Entre

6.5 Détermination du rôle de LNX2 dans les mécanismes moléculaires de transformation des lymphocytes T par le virus de la leucémie humaine HTLV1.

Après avoir caractérisé l'interaction entre LNX2 et Tax-1, nous avons réalisé des tests fonctionnels préliminaires, visant à déterminer le rôle de LNX2 dans les mécanismes moléculaires de transformation des lymphocytes T par Tax-1. Ces expériences concernent notamment, des tests de type rapporteur (avec l'utilisation de promoteurs impliqués dans la biologie du virus HTLV-1 tels que LTR et NF- κ B).

6.6 LNX2 est impliqué dans l'activation de la voie NF- κ B par Tax-1

Afin de mesurer l'implication de la protéine LNX2 dans la transformation des cellules cibles par l'oncoprotéine Tax-1, nous avons réalisé des tests rapporteurs de l'activation de la voie NF- κ B. En effet, nos résultats montrent que l'inhibition de l'expression de LNX2 par siRNA induit une diminution significative de l'activation de la voie NF κ B par Tax-1 (**Figure 37**). Ce qui suggère un rôle de la protéine LNX2 dans la transformation des cellules induite par Tax-1.

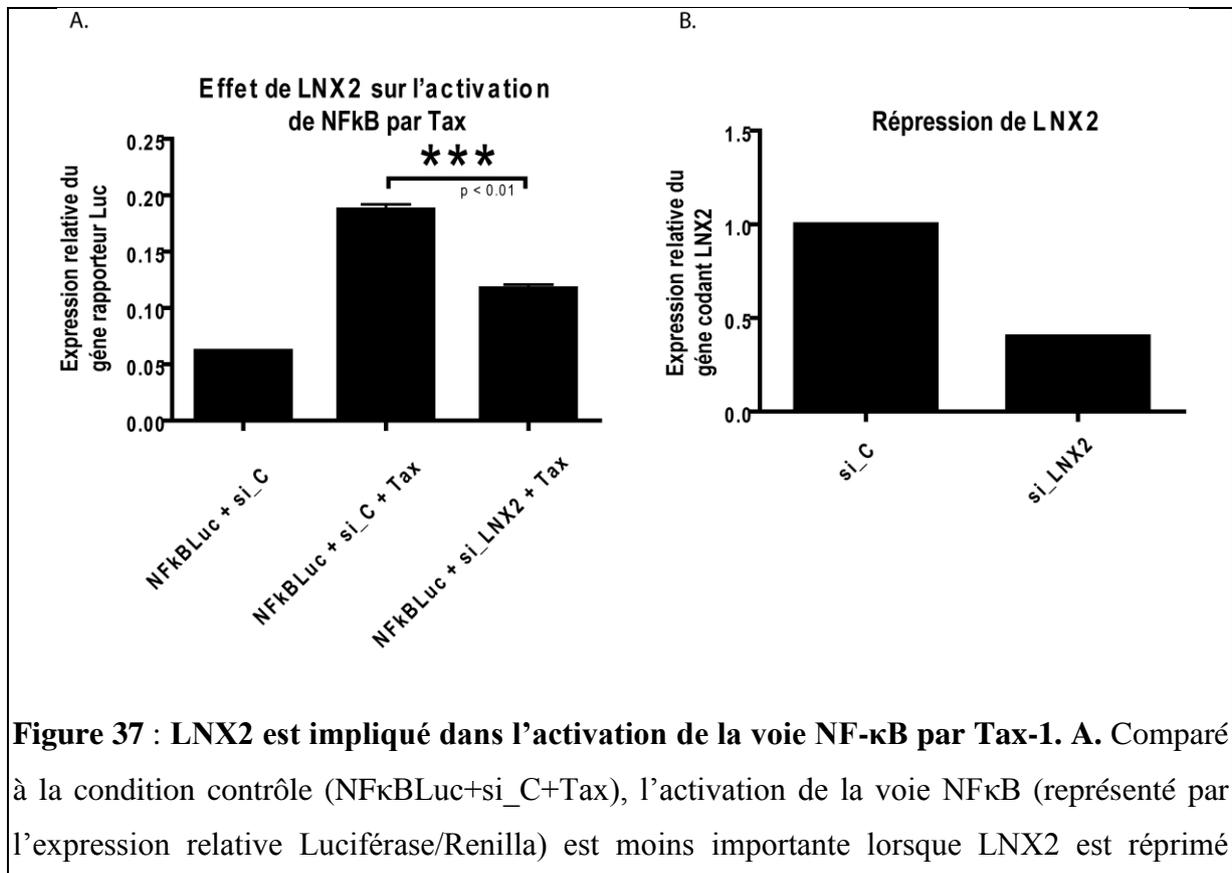


Figure 37 : LNX2 est impliqué dans l'activation de la voie NF- κ B par Tax-1. A. Comparé à la condition contrôle (NF κ BLuc+si_C+Tax), l'activation de la voie NF κ B (représenté par l'expression relative Luciférase/Renilla) est moins importante lorsque LNX2 est réprimé

(NFκBLuc+si_LNX2+Tax). **B.** Répression de l'expression du gène codant la protéine LNX2. Les barres d'erreur correspondent à trois expériences indépendantes.

6.7 LNX2 ne serait pas directement impliquée dans l'ubiquitination de Tax-1

L'un des éléments clé de l'activation de la voie NF-κB par Tax-1 est son état d'ubiquitination¹⁷⁷. De par son activité d'ubiquitine ligase, LNX2 pourrait constituer un candidat dans la modulation de l'état d'ubiquitination de Tax-1. Par conséquent, nous nous sommes intéressés au rôle de LNX2 dans l'ubiquitination de Tax-1.

Dans le but de vérifier l'implication de LNX2 dans le processus d'ubiquitination de Tax-1, nous avons procédé à des tests d'immunoprécipitation avec des billes de Nickel (Ni²⁺). Nous avons co-transfecté des cellules HEK293 avec un plasmide d'expression de Tax-1 marquée par une étiquette Histidine (HisTag-Tax-1) et avec un plasmide d'expression de LNX2 marquée par une étiquette Flag (Flag-LNX2). Nous avons aussi utilisé un siRNA pour réprimer l'expression de LNX2 et un siRNA contrôle. Ainsi, nous avons pu purifier Tax-1 avec les billes de Ni²⁺ et révéler son état d'ubiquitination par western blot.

Nos résultats montrent que l'état d'ubiquitination de Tax-1 n'est pas différent lorsqu'on réprime l'expression de LNX2, comparé à la condition contrôle (**Figure 38**). Ce qui nous laisse croire que LNX2 n'est pas impliquée dans le processus d'ubiquitination de Tax-1.

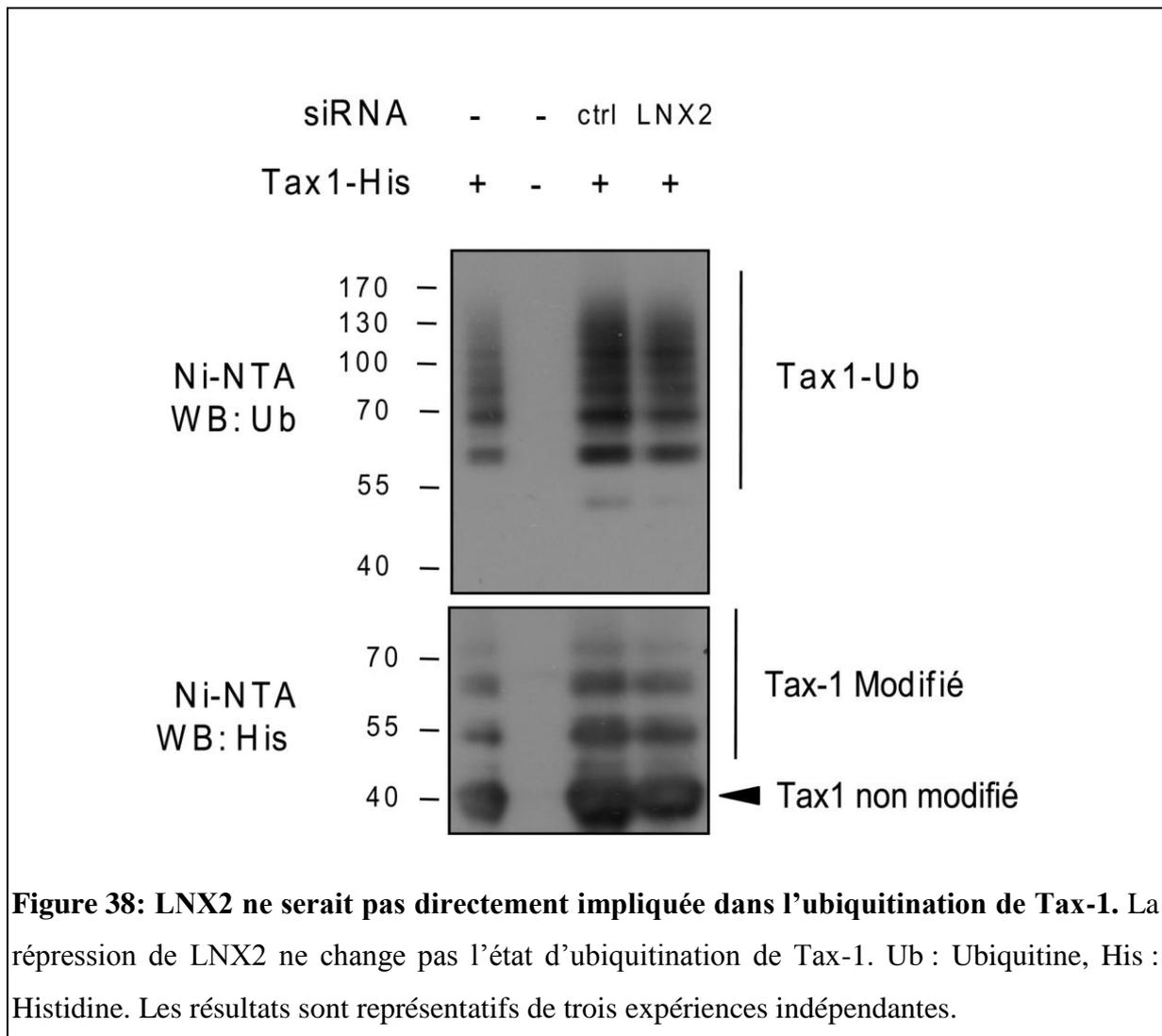


Figure 38: LNX2 ne serait pas directement impliquée dans l'ubiquitination de Tax-1. La répression de LNX2 ne change pas l'état d'ubiquitination de Tax-1. Ub : Ubiquitine, His : Histidine. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

7 Tax-1 inhibe la voie Notch

Comme citée précédemment, la voie Notch est impliquée dans la transformation des lymphocytes T par HTLV-1. De son côté, LNX2 a été décrit pour la modulation positive de la voie Notch. De ce fait, nous avons réalisé des tests d'activation de la voie Notch par des essais rapporteurs. Ceci nous a révélé qu'en réprimant la protéine LNX2, la voie Notch est moins activée (**Figure 39**). Ce qui va dans le sens de ce qui est déjà décrit dans la littérature.

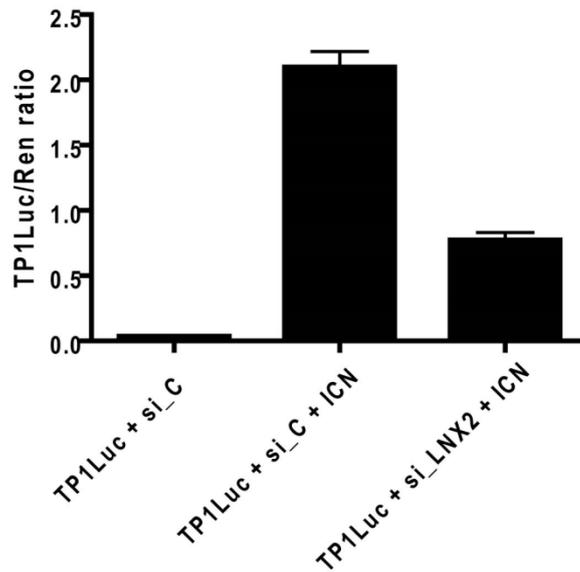


Figure 39 : LNX2 est essentiel à l'activation de la voie Notch. Quand on réprime l'expression de la protéine LNX2 l'activation de la voie Notch est fortement diminuée. Les barres d'erreur correspondent à trois expériences indépendantes.

De plus, nous avons voulu savoir si la protéine Tax-1 pouvait elle aussi avoir un effet positif sur l'activation de la voie Notch. Pour ce faire, nous avons réalisé des tests rapporteurs en présence ou en absence de Tax-1, en plus de tests complémentaires en réprimant ou non LNX2. Nos résultats montrent que l'oncoprotéine Tax-1 inhibe fortement la voie Notch. De plus, la combinaison de la présence de Tax-1 avec la répression de LNX2 montre une plus forte inhibition de voie Notch (**Figure 40**).

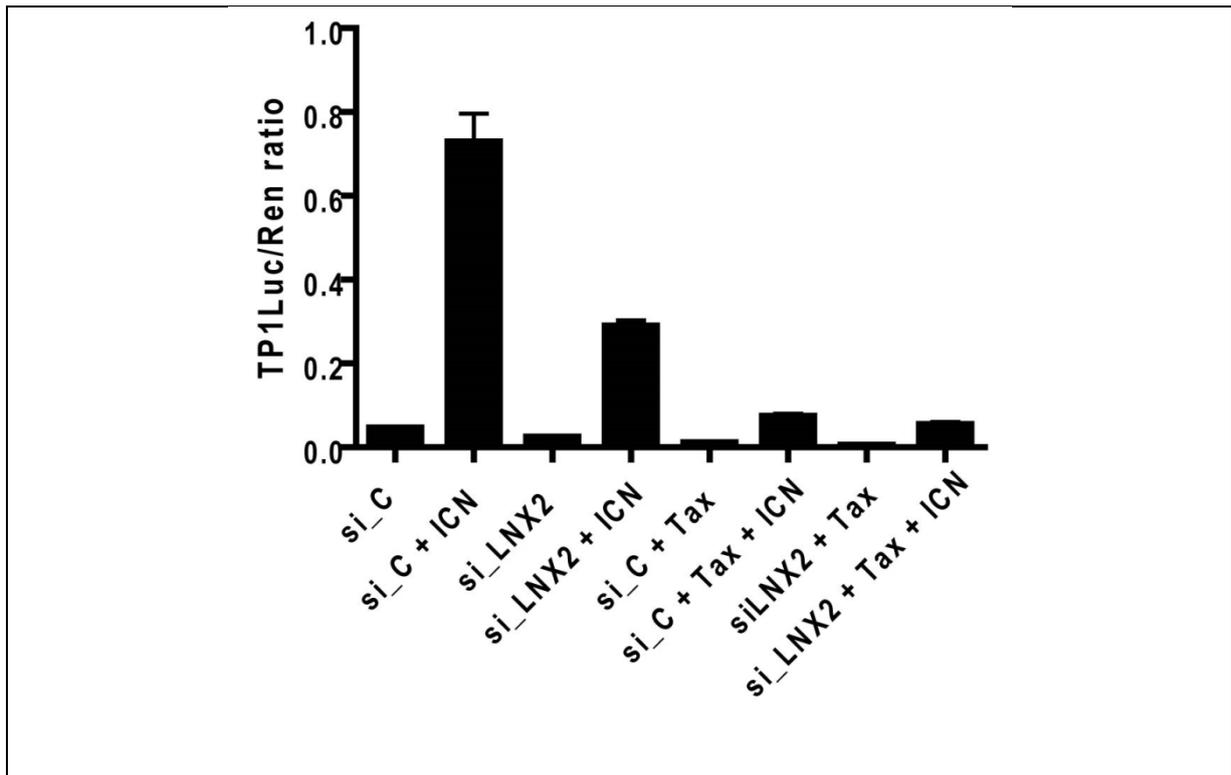


Figure 40 : Effet combiné de Tax-1 et LNX2 dans l'activation de la voie Notch. Comme le montre le graphique, l'activation de la voie Notch (par le facteur Intra Cellular Notch via le promoteur TP1) est affectée par la répression de LNX2. En présence de Tax-1, l'activation de la voie Notch est sensiblement diminuée. En combinaison de la répression de LNX2 et de la présence de Tax-1, on observe logiquement une inhibition de la voie Notch. Les barres d'erreur correspondent à trois expériences indépendantes.

En résumé, nos résultats montrent que l'interaction entre Tax-1 et LNX2 pourrait jouer un rôle dans la transformation cellulaire par le virus HTLV-1 via la voie Notch.

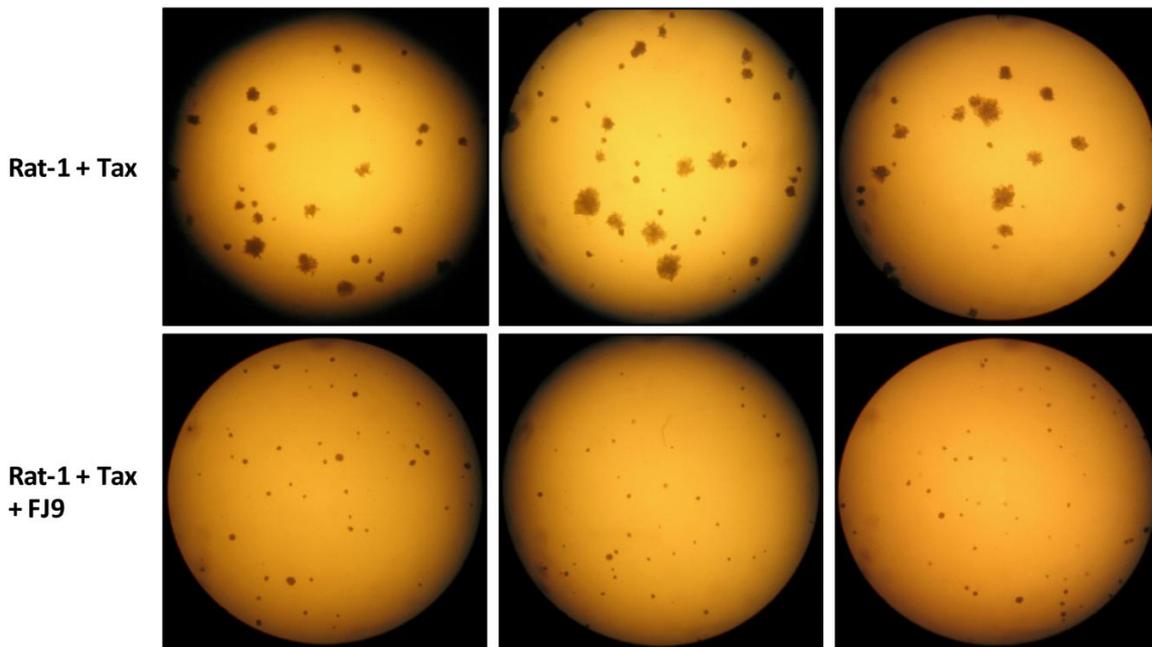
8 La molécule chimique FJ9 pourrait inhiber la transformation induite par Tax-1 *ex vivo*

L'un de nos objectifs dans ce travail, est de démontrer que des interactions PDZ-Tax-1 PBM peuvent être ciblées par de petites molécules chimiques. Ces molécules permettraient ensuite de tester si l'inhibition des interactions Tax-1/PDZ affecte les fonctions majeures de Tax-1, et par conséquent la pathogenèse du virus HTLV-1. La molécule FJ9 a été décrite pour inhiber l'interaction entre la protéine à domaine PDZ DVL3 (dishevelled segment polarity protein 3) importante dans la voie WNT (Wingless-related integration site) canonique et son ligand

FRZ7 (Frizzled class receptor 7) ⁴³⁶. Par ailleurs, il a été décrit que l'inhibition de la voie WNT canonique induit la mort cellulaire dans les cellules issues d'ATL et dans des lignées cellulaires transformées par le virus HTLV-1 ^{437,438}. Ces observations nous indiquent que l'inhibition des interactions Tax-1/PDZ pourrait affecter les propriétés oncogéniques de Tax-1. Par conséquent, nous avons testé l'effet de cette molécule sur la transformation de Tax-1 ainsi que la transmission de cellule à cellule du virus HTLV-1.

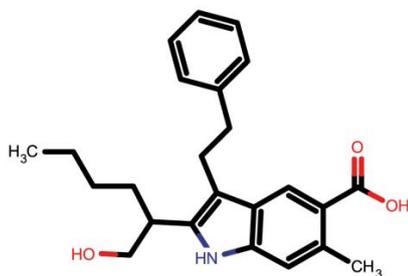
Pour analyser l'effet de la molécule FJ9 sur la capacité transformatrice de Tax-1, nous avons utilisé des cellules Rat-1 exprimant la protéine Tax-1 de façon stable, via transduction par un lentivirus (Lenti-Tax-1-Blastidin). L'effet de la transformation des cellules Rat-1 par Tax-1 se traduit habituellement par l'apparition de colonies cellulaires formant des amas de cellules qualifiés de « foci », lorsqu'elles sont mises en culture (en immersion) dans un milieu contenant de l'agar (SoftAgar). En présence de la molécule FJ9, la capacité des cellules à former ce type de colonies est diminuée de plus de 70% comparées aux cellules contrôles (**Figure 41**).

A.



B.

FJ9



C.

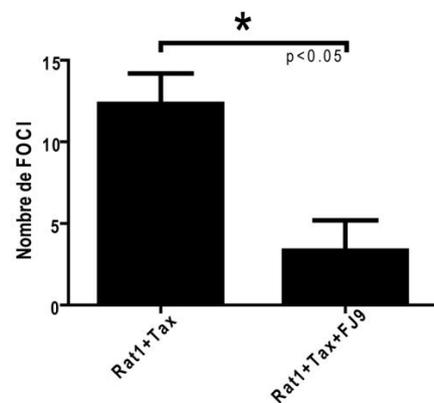


Figure 41: Effet de la molécule FJ9 sur la transformation cellulaire induite par Tax-1. A. Afin de tester l'effet de FJ9 sur la transmission de cellule à cellule du virus HTLV-1, nous avons réalisé un test en SoftAgar. Après trois semaines de culture, les colonies de cellules Rat-1 exprimant Tax-1 sont examinées sous microscope optique. L'effet de la transformation des cellules par Tax-1 se traduit habituellement par une prolifération sous forme d'amas de cellules ou « foci ». En présence de la molécule FJ9 la capacité des cellules à former ce type de colonies est considérablement diminuée, comparé aux cellules témoins. B. Structure chimique de la molécule FJ9. C. Quantification du nombre de « foci » formé en absence et en présence de la molécule FJ9. Les barres d'erreur correspondent à trois expériences indépendantes.

9 La molécule chimique FJ9 pourrait inhiber la transmission de cellule à cellule du virus HTLV-1

Pour estimer l'effet de la molécule FJ9 sur la transmission du virus HTLV-1, nous avons co-cultivé des cellules MT2 produisant le virus avec des cellules contenant le gène codant pour la luciférase sous le contrôle du promoteur viral LTR (Jurkat-LTR). Les cellules sont co-cultivées vingt-quatre heures en présence ou pas de 100 μ M de la molécule FJ9. L'analyse de l'activation de la luciférase combinée à la viabilité cellulaire montre qu'en présence de la molécule FJ9 l'expression de la luciférase est significativement diminuée. Ce qui suggère que FJ9 pourrait empêcher la transmission du virus HTLV-1 de cellule à cellule, sans affecter significativement la viabilité cellulaire (**Figure 42**).

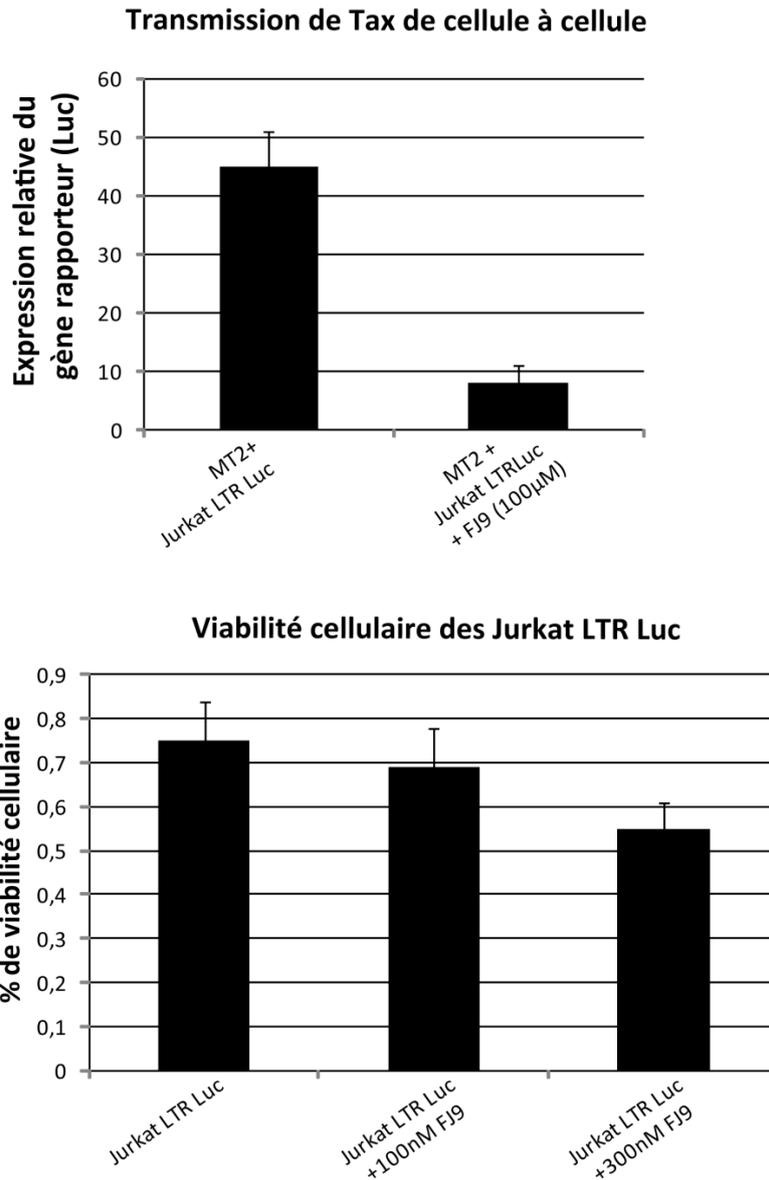


Figure 42 : Effet de la molécule FJ9 sur la transmission de cellule à cellule de l'oncoprotéine Tax-1. A. Pour montrer l'effet de la molécule FJ9 sur la transmission de cellule à cellule des particules du virus HTLV-1, nous avons réalisé un test de co-culture de cellules produisant le virus (MT2) avec des cellules contenant le gène codant pour la luciférase sous le contrôle du promoteur viral LTR (Jurkat-LTR-Luc). En présence FJ9, l'expression de la luciférase est significativement diminuée, ce qui indique une transmission plus faible de Tax-1. B. Contrôle de la viabilité cellulaire des cellules Jurkat LTR Luc en présence de la petite molécule FJ9. Les barres d'erreur sont représentatives de trois expériences indépendantes.

10 Fj9 inhibe l'interaction entre Tax-1 et SDCBP

Étant donné que FJ9 peut inhiber l'interaction entre une protéine PDZ et son ligand, nous avons voulu savoir si cette molécule chimique pouvait empêcher l'interaction entre la protéine à domaines PDZ SDCBP et son ligand Tax-1.

Pour ce faire, nous avons réalisé un test de Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) basé sur la protéine YFP (yellow fluorescent protein). Pour ce faire, nous avons co-transfecté des cellules HEK293T avec un plasmide codant pour la protéine de fusion entre le fragment N1 de la YFP et la SDCBP (ST1) et un plasmide codant pour une fusion entre le fragment N2 de la YFP et la protéine Tax-1. Nous avons ensuite analysé par FACS le nombre de cellules YFP positives suite à l'interaction entre SDCBP/Tax-1 et rapprochement stérique des fragments N1 et N2 de la YFP. En présence de la molécule FJ9, le pourcentage de reconstitution de la molécule fluorescente est largement diminué. Ce qui signifie que l'interaction SDCBP/Tax-1 serait donc inhibée par FJ9 (**Figure 43**).

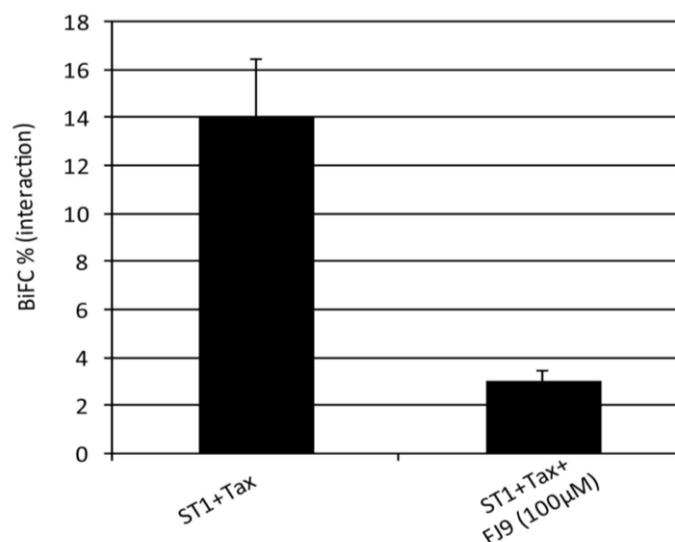


Figure 43 : Effet de la molécule FJ9 sur l'interaction Tax-1/SDCBP. Nous avons réalisé un test de Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC). En présence de la molécule FJ9, le pourcentage de reconstitution de la molécule fluorescente est largement diminué. La barre d'erreur correspond à trois expériences indépendantes.

CHAPITRE IV:

DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES

CHAPITRE IV : DISCUSSIONS ET PERSPECTIVES

Le virus HTLV-1, comme les autres pathogènes, est engagé dans une série d'interactions avec des cellules hôtes. Ces interactions, dans le cadre du virus HTLV-1 et autres virus pathogènes, vont conditionner l'infection et la réplication virale ainsi que la progression des maladies associées. HTLV-1 est essentiellement responsable de deux pathologies: la leucémie des lymphocytes T de l'adulte et la paraparésie spastique tropicale. Les thérapies actuelles contre ces maladies consistent au traitement avec des anti-rétroviraux classiques comme l'Azidothymidine (AZT) ou l'interféron-alpha (IFN- α); avec des agents moléculaires cytotoxiques non-spécifiques utilisées en chimiothérapie (Vincristine, Adriamycine, Cyclophosphamide, ...); avec des inhibiteurs du protéasome comme le Bortezomid ou d'histone deacétylases comme le Vorinosta; ou avec la greffe de cellules souches. A l'heure actuelle, très peu de molécules ciblées ont été proposées. Celles-ci incluent des inhibiteurs de la voie JAK-STAT et de la voie Notch. L'identification des protéines cellulaires responsables des interactions essentielles aux activités du virus HTLV-1 *in vivo*, devraient permettre d'élargir l'ensemble de thérapies ciblées contre les maladies associées à ce rétrovirus.

Le virus HTLV-1 est génomiquement apparenté au virus HTLV-2, pour lequel aucune pathologie leucémique n'est associée. Notre laboratoire et d'autres équipes ont démontré, par des études ciblées ou à large échelle (en utilisant des modèles cellulaires ou *in vivo*), que des interactions entre les protéines virales et les protéines de l'hôte pouvaient expliquer les différences de pathogénicité entre les deux types de rétrovirus^{310,439}. Dans ce travail, nous nous intéressons spécifiquement aux interactions entre les protéines cellulaires contenant un domaine PDZ et le motif PBM présent à l'extrémité C-terminal de la protéine Tax-1 codée par le virus HTLV-1, et absent chez l'homologue Tax-2 codée par le virus HTLV-2.

Dans ce travail, nous avons analysé 74 clones PDZ provenant de l'ORFeome humain version 5.1 et 246 domaines PDZ isolés pour faire évoluer le nombre de protéines cellulaires interagissant avec Tax-1 et contenant un domaine PDZ de 14 à 56 protéines. Les protéines à domaines PDZ représentent donc 23% de l'interactome de Tax-1 tel qu'il est connu actuellement, soit 240 protéines^{309,310,440}. La capacité de Tax-1 à interagir avec un nombre élevé de partenaires est due à sa structure désordonnée, permettant une conformation dépendante du partenaire d'interaction³⁰⁹. Le motif de Tax-1 permettant l'interaction avec des protéines à domaines PDZ est un motif PBM de 4 acides aminés ETEV. Nos collaborateurs de l'Université de Toronto (Laboratoire du Professeur Gary Bader <http://baderlab.org/Home>) ont

développé une méthode permettant de prédire des interactions entre un motif PBM et des peptides PDZ. Ces prédictions se basent soit sur la séquence du domaine PDZ, soit sur sa structure prédite (**Annexe 8**). Ces prédictions détectent 89 protéines potentiellement interagissant avec le PBM de Tax-1 dont 43 sont validées expérimentalement. Nous pouvons donc considérer que la prédiction *in silico* peut résulter à un certain nombre de faux positifs (46/82 non validés expérimentalement) et de faux négatifs (10/82 non prédits). Cependant, il faut noter que le nombre d'interactions obtenues lors de notre étude dépend fortement des deux librairies employées et pourraient être sous-estimée. L'ORFeome 5.1 humain comprend tout au plus la moitié du génome dont le nombre de gènes codés dépasserait 24000 sans compter les isoformes^{423,441,442}. La librairie du PDZome ne contient pas non plus tous les domaines PDZ prédits et son clonage (prédictions des séquences des domaines et leur longueur) peut influencer la conformation de certains domaines et leur capacité d'interactions avec Tax-1⁴²². Enfin, les méthodes utilisées (Y2H et GST-pulldown) ne permettent pas de détecter toutes les interactions possibles comme décrit précédemment⁴⁴³. Par rapports aux prédictions d'interactions, nos criblages expérimentaux ont utilisé la protéine Tax-1 entière, tandis que la méthode de prédiction ne prend en compte que les 5 derniers résidus du C-terminal de Tax (RETEV). La spécificité des PBMs pour les domaines PDZ implique en effet d'autres résidus en amont comme il a été démontré pour les sous-types oncogéniques de HPV E6 et E7 dont le répertoire des protéines PDZ en interaction change tout en maintenant la même structure du PBM de type 1 (X-S/T-X- Φ_{COOH})⁴⁴⁴. Dans le cas de Tax-1, l'interaction PBM/PDZ pourrait donc être influencée par la conformation générale de la protéine Tax-1, par le domaine de liaison à CBP/p300, ainsi que par les sites de phosphorylation de Tax-1 en amont du PBM. L'importance du contexte peptidique entourant le PBM de Tax-1 peut également être illustré en comparant les criblages du PDZome avec Tax-1 de HTLV-1 (notre étude) et la protéine E6 du virus HPV16⁴²², montrant des interactions communes et spécifiques à chaque oncoprotéine virale. Nous pensons cependant que ces prédictions d'interactions motifs/domaines vont évoluer rapidement et seront de plus en plus proches des données expérimentales au fur et à mesure qu'elles intégreront des données issues des criblages non biaisés comme celles présentées dans notre étude tenant compte de l'environnement peptidique des motifs PBM. Ces criblages *in silico*, à l'instar d'autres méthodes de prédictions d'interactions protéine-protéine, devraient intégrer d'autres données comme la co-expression des gènes et les profils phylogéniques⁴⁴⁵.

Les stratégies employées dans notre étude pour identifier les nouvelles interactions (Y2H, GST-pulldown) ne prennent pas en compte la biologie du virus HTLV-1 dans le contexte d'un lymphocyte infecté. Il est possible d'envisager une autre stratégie qui consisterait à infecter des lymphocytes CD4+ par co-culture avec des lignées établies produisant le virus HTLV-1, d'immunoprécipiter Tax-1 à l'aide d'anticorps spécifiques et de détecter par spectrométrie de masse les partenaires de Tax-1. Cette stratégie est limitée par les niveaux faibles d'expression de Tax-1 dans des lymphocytes primaires ou lignées de cellules T, et seulement quelques interactions entre Tax-1 et des protéines cellulaires ont pu être confirmées en cellules T^{193,315,432,446,447}. Il aurait été possible de co-exprimer Tax-1 avec chacun des cDNA codant pour les protéines à domaines PDZ dans une lignée cellulaire plus facile à transfecter comme HEK293 et de révéler les interactions par co-immunoprécipitation. Cette méthode a été appliquée avec succès pour identifier les interactions entre Tax-1 et les protéines impliquées dans les dommages de l'ADN⁴⁴⁸. Associée à la spectrométrie de masse, cette stratégie, même si elle utilise une lignée non lymphocytaire, aurait pu nous permettre d'inclure dans l'interactome Tax/PDZ, les protéines cellulaires en complexe avec les partenaires PDZ de Tax-1, comme démontré dans des études globales d'interactome par spectrométrie de masse^{449,450}. D'autres études montrent cependant que la stratégie du Y2H comme celle employée dans notre travail, permet d'obtenir des interactions biophysiques de bonnes qualités pour la cartographie des interactions binaires⁴⁵¹.

In vitro, le virus HTLV-1 est capable d'infecter différents types de cellules de mammifères grâce à son récepteur ubiquiste, le transporteur du glucose (GLUT-1)¹²². *In vivo*, HTLV-1 infecte préférentiellement les lymphocytes T CD4, probablement à l'aide des co-récepteurs, tels que la neuropiline-1 et les héparanes sulfates¹³¹. Dans le but de tenir compte du contexte biologique d'infection par le virus HTLV-1, nous avons analysé l'expression des 56 gènes codant pour des protéines PDZ en interaction binaire avec Tax dans des lignées de lymphocytes T infectées ou non par HTLV-1. Notre raisonnement se base sur des études, essentiellement en levures, montrant une co-régulation de la transcription des gènes et la formation des complexes protéiques⁴⁵². Ces observations ont été confirmées en organismes supérieurs et ont permis, par exemple, de construire un interactome du lymphocyte B humain⁴⁵³ et de prévoir des perturbations de cette interactome suite à la présence de fusions oncogéniques⁴⁵⁴. Dans notre étude, en absence d'infection par HTLV-1, l'expression de 22 gènes sur 56 est détectable dans au moins 3 des 24 lignées lymphocytaires analysées (**Figure 25**). Sachant que la présence du virus HTLV-1 influence via ses protéines régulatrices (Tax-1,

HBZ, p30, p12 et p13) l'expression d'une série de gènes cellulaires⁴⁵⁵, nous avons tenu compte de 14 gènes dont l'expression est régulée par la présence du virus HTLV-1. Nous proposons donc une liste de 32 gènes (fusion des deux listes) codant pour des protéines PDZ susceptibles de jouer un rôle dans la biologie du virus HTLV-1. Cette liste n'est pas exhaustive et pourrait contenir des gènes qui ne jouent aucun rôle dans le contexte d'une cellule infectée, car nous n'avons pas utilisé de lymphocytes CD4 primaires mais des lignées établies. De plus, nous n'avons pas eu accès aux cellules ATL directement issues de patients infectés pour pouvoir faire une analyse intégrée de l'expression de ces gènes et de leurs mutations éventuelles susceptibles d'affecter des interactions Tax/PDZ ou PDZome cellulaire.

L'analyse *Gene Ontology* des processus cellulaires dans lesquels les 32 gènes sont impliqués permet de souligner l'enrichissement en protéines impliquées dans l'organisation du cytosquelette, suggérant un rôle probable de Tax-1 dans la perturbation de cette fonction des protéines à domaine PDZ. Parmi celles-ci, Syntenin-1 (Syndecan binding protein, SDCBP), est une protéine "*hub*" ayant plusieurs partenaires dans le réseau interactomique humain (166 protéines partenaires). L'implication de la SDCBP dans la biologie du HTLV n'a pas été complètement démontrée, mais elle pourrait favoriser l'entrée du virus dans la cellule en favorisant l'expression des co-récepteurs, les héparanes sulfates^{131,132}; ou alors le transfert du matériel viral de cellule à cellule via la formation des exosomes⁴⁵⁶. L'étude de la formation des exosomes est relativement nouvelle en rétrovirologie^{457,458}. Elle permet de mieux expliquer la transformation des cellules avoisinantes de la cellule infectée sans transfert de particules virales. Ce phénomène est observé chez HTLV-1 et a été longtemps attribué à la production de cytokines (IL-15, IL-2, IL-7,...) induisant l'activation de lymphocytes^{459,460}. L'étude de Alefantis et al. 2005 avait déjà montré que la protéine Tax-1 pouvait être excrétée et se retrouver dans l'environnement intercellulaire. Plus récemment, Jaworski et al. ont démontré la présence de Tax-1 dans des exosomes isolés de cellules infectées par HTLV-1 mais aussi de cellules transfectées de façon transitoire à l'aide d'un vecteur codant uniquement pour Tax-1. Ces études suggéraient donc une capacité Tax-1, indépendante des autres molécules virales, de se transmettre d'une cellule à une autre via des exosomes (**Figure 44**). Dans cette perspective, l'identification de molécules comme la SDCBP contrôlant la présence de Tax-1 dans les exosomes est fondamentale. Dans ce contexte, l'inhibition de l'expression du gène codant pour la SDCBP en présence du virus HTLV-1 pourrait faire partie des mécanismes mis en place par le virus pour inhiber sa propre propagation afin d'échapper au contrôle immunitaire de l'hôte.

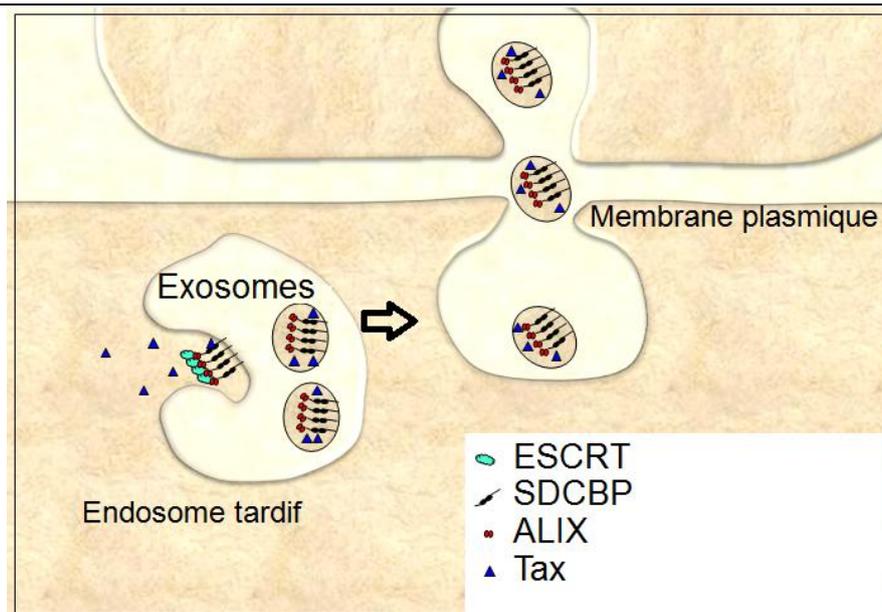


Figure 44 : Hypothèse de l'implication de SDCBP dans la transmission des particules de HTLV-1 de cellule à cellule. Sachant que Tax-1 a été rapporté pour sa présence dans les exosomes et que SDCBP est essentielle à la formation des exosomes, cette dernière pourrait être impliquée dans la transmission des particules virales de HTLV-1 de cellule à cellule. Le schéma représente une cellule infectée (en bas), dont les exosomes pourraient transporter l'oncoprotéine Tax-1 et la transmettre vers la cellule non infectée (en haut). ESCRT = endosomal sorting complexes required for transport, ALIX= ALG-2-interacting protein X. Adapté de ⁴⁶¹.

Une autre interaction validée au cours de ce travail est celle impliquant l'ubiquitine ligase LNX2. Il a été démontré que l'ubiquitination de Tax contrôle son implication dans l'activation de la voie NF- κ B. Nous montrons dans cette étude que Tax n'est pas ubiquitinée par LNX2 (**Figure 38**). Toutefois, LNX2 est connue pour réguler positivement la voie de signalisation dépendante du récepteur Notch1. Deux études précédentes ont montré que la voie Notch activée dans des cellules infectées par HTLV-1 et que des inhibiteurs de la voie Notch pourrait réduire la tumorigenèse des cellules ATL⁴³⁴ et inhiber l'expression virale³¹⁰. L'interaction entre LNX2 et Tax-1, en plus de l'inhibition de la voie Notch1 par Tax-1 sont, à notre connaissance, les premières évidences mécanistiques permettant de mieux expliquer la perturbation de la voie Notch par le virus HTLV-1. LNX2 fait également partie des facteurs conditionnant l'expression du virus HIV-1⁴⁶². Nous spéculons donc sur un rôle plus général de LNX2 dans le contrôle des infections rétrovirales. Dans ce contexte, la détermination précise des domaines PDZ impliqués (PDZ1 dans le cas de Tax-1, **Figures 34 et 35**) pourrait permettre des criblages

des inhibiteurs d'interaction spécifiques aux différentes protéines virales interagissant avec LNX2.

Dans le but d'apporter une preuve de principe que des interactions entre Tax-1 et les protéines a domaines PDZ peuvent être ciblées par de petites molécules, nous avons testé la molécule FJ9 qui avait été déjà décrite pour inhiber l'interaction entre la protéine à domaine PDZ DVL3 (dishevelled segment polarity protein 3) importante dans la voie WNT (Wingless-related integration site) canonique et son ligand FRZ7 (Frizzled class receptor 7) ⁴³⁶. Nous avons montré que cette molécule est également capable d'inhiber l'interaction entre Tax1 et SDCBP, d'affecter la transformation de cellules Rat-1 par Tax-1 et d'inhiber la transmission virale d'une cellule infectée (MT2) vers une cellule non infectée (Jurkat-LTR-Luc). Même si ces résultats sont encourageants dans la perspective de corrélérer l'inhibition des ces interactions Tax/PDZ avec la biologie du virus HTLV-1, ils suggèrent la difficulté d'identifier des inhibiteurs spécifiques d'interaction PBM/PDZ. Nous suggérons de continuer ce travail par un criblage de banques de petites molécules chimiques, en nous servant des résidus en amont du PBM de Tax-1 pour nous orienter vers des molécules spécifiques aux interactions Tax-1/PDZ.

En résumé, notre travail a permis de porter l'interactome de Tax-1 de 194 à 236 partenaires avec l'ajout de 42 nouveaux partenaires contenant un domaine PDZ. Nous avons caractérisé plus en détail les interactions Tax-1/SDCBP et Tax-1/LNX2, montrant le rôle potentiel de SDCBP dans l'infectivité du virus HTLV-1 et celui de LNX2 dans la modulation des voies NF- κ B et Notch par Tax-1. Enfin, nous proposons l'inhibition des interactions Tax-1/PDZ comme cible potentielle dans la recherche des thérapies ciblées contre les maladies induites par HTLV-1.

CHAPITRE V:
CONCLUSIONS

CHAPITRE V : CONCLUSIONS

Actuellement, les traitements disponibles contre l'infection par le virus HTLV-1 sont limités. De ce fait, il est plus qu'indispensable d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pouvant améliorer, voire révolutionner ces traitements. Pour ce faire, une compréhension plus approfondie du virus et de ses mécanismes de pathogenèse est nécessaire. Ainsi, identifier des éléments clés ayant une grande influence sur la biologie du virus HTLV-1.

L'oncoprotéine Tax-1 du virus HTLV-1 est responsable de la transactivation virale, ainsi que du déclenchement des mécanismes de transformation cellulaires. Par conséquent, il est tout à fait légitime de se concentrer sur les stratégies ingénieuses que cette protéine utilise, afin d'induire la transformation cellulaire. Tax-1 interagit avec une panoplie de protéines de la cellule hôte, notamment via ses nombreux domaines fonctionnels.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'un des motifs protéiques de Tax-1, qui se trouve en extrémité C terminale et qui cible des protéines contenant un domaine PDZ. Ce motif a été rapporté pour son importance dans la transformation cellulaire induite par Tax-1. Les protéines à domaines PDZ représentent des cibles privilégiées de plusieurs autres oncoprotéines virales telles que E6 du virus HPV-18 et E4ORF1 de l'adénovirus de type 9.

Nous avons démontré dans cette étude que sur au moins 150 protéines à domaines PDZ du protéome humain, Tax-1 ne ciblait qu'une partie de ces protéines. En effet, notre étude a permis de construire une carte interactomique dont laquelle le nombre de protéines à domaines PDZ partenaires de Tax-1 se limite à 56 protéines. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence une séquence consensus, dans le domaine PDZ, responsable de l'interaction avec Tax-1. Par ailleurs, nous avons pu valider biologiquement les interactions entre Tax-1 et SDCBP ou LNX2. D'autres interactions Tax-1/PDZ pourraient faire l'objet d'études complémentaires dans le cadre de l'infection par le virus HTLV-1.

À travers cette étude, nous avons mis à disposition de la communauté scientifique un catalogue, d'interactions sélectives de Tax-1 avec des protéines clés dans l'organisation cellulaire. De plus, nous avons démontré la possibilité de cibler ces interactions, afin d'inhiber la transformation et/ou la transmission de cellule à cellule du virus HTLV-1.

CHAPITRE VI:
MATÉRIEL ET MÉTHODES

CHAPITRE VI : MATÉRIEL ET MÉTHODES

1 Culture cellulaire

Les lignées cellulaires HEK et HeLa ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) contenant 10% de FBS (Sérum Foetal Bovin), 10% de glutamine et des antibiotiques (Pénicilline 100U/ml, Streptomycine 100 µg/ml). Les lignées lymphocytaires (JURKAT, JURKAT-LTR, JPX9, CEM, CTV1, MOLT16, HUT78) ont été maintenues en culture dans le milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) contenant 10% de FBS, 10% de glutamine et des antibiotiques (Pénicilline 100U/ml, Streptomycine 100 µg/ml). Les lignées lymphocytaires infectées par HTLV-1 (MT2, MT4, HUT102, C8145, C91PL) ont été cultivées dans les mêmes conditions que les lignées lymphocytaires non infectées par HTLV-1, en plus des conditions de confinement (biosécurité) de niveau L3. Toutes les cellules ont été incubées à 37°C avec 5 % de CO₂.

2 Transfections transitoires

La transfection avec PEI a été réalisée sur des cellules HEK cultivées dans du DMEM à 80% de confluence. Le milieu a été changé avant la transfection et les cellules ont été recueillies 24 heures après la transfection. Les cellules HeLa ont été transfectées par l'ADN en utilisant le réactif lipofectamine 2000 (Invitrogen) selon les instructions du fabricant et collectées 24 heures après la transfection. Les cellules transfectées avec des siRNA sont cultivées dans le milieu de culture DMEM à 40-50% de confluence. La transfection de siRNA a été réalisée avec du phosphate de calcium en utilisant le kit de transfection ProFection® Mammalian Transfection System (Promega) selon les instructions du fabricant. Le milieu de culture a été changé 24 heures plus tard et les cellules ont été recueillies 48 h après transfection.

3 Interférence par ARN

Les ARNs interférents double brins ont été conçus puis commandés auprès de la firme Eurogentec (Liège, Belgique). Les séquences sont listées ci-dessous :

SDCBP sense : GCAAGACCUUCCAGUAUAA

SDCBP anti-sense : UUAUACUGGAAGGUCUUGC

LNx2 sense : CAGCCACUUAGUUUACCAGAA

LNx2 antisense : UUCUGGUAACUAAGUGGCUG

ARN interférent contrôle : Contrôle négatif siRNA duplex (Eurogentec).

4 Immunoblots

Les cellules collectées à partir des différentes expériences sont lysées (Buffer+inhibiteurs de protéases). Les lysats sont centrifugés pour éliminer les débris cellulaires. Après dénaturation des protéines du lysat 5 min à 100°C en présence de bleu de charge (Laemmli buffer), on procède à l'électrophorèse sur gel de SDS-PAGE 10% suivie de l'immunoblot. Les anticorps suivants ont été utilisés : anti-Flag, anti-His, anti-Tax-1, anti-SDCBP, anti-LNx2, anti-ubiquitin.

5 Immunofluorescence et microscopie confocale

Pour les expériences d'immunofluorescence, les cellules HeLa ont étéensemencées sur des lamelles coverslips dans des plaques à 24 puits, pendant 48 heures. Elles ont été lavées dans du PBS (37°) trois fois et fixées avec PBS-paraformaldéhyde 4% pendant 15 min. Puis, lavées deux fois avec du PBS. Les cellules ont été perméabilisées dans du PBS-Triton X-100 à 0,5% pendant 20 min et bloquées dans la solution de blocage PBS-FBS 20% pendant 30 min. Ensuite, lavées deux fois avec du PBS. Les cellules ont été incubées avec l'anticorps primaire correspondant dilué dans le PBS-Triton X-100 à 0,5% pendant 2 heures, lavées 3 fois avec du PBS, incubées 1 heure avec les anticorps secondaires conjugués Alexa correspondants (Invitrogen) dilués 1/1000 dans PBS-Triton. Les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS et montées sur des lamelles en verre avec ProLonf Gold Antifade contenant DAPI (life technologies). Les lames ont été examinées par microscopie confocale avec Leica TCS SP2 ou microscope confocal Nikon A1R avec un objectif de 60X. Les images ont été prises avec une résolution de 1024x1024 pixels. Puis, traitées et assemblées avec le logiciel LEICA LAS AF Lite 5 ou A1R Software.

6 La méthode GPCA

La technique de GPCA (Gaussia Protein Complementary Assay) est utilisée généralement pour la validation d'interactions et de complexes protéiques. Grâce à sa simplicité de mise en œuvre et sa compatibilité avec la robotisation, cette technique peut être utilisée dans des études à grande échelle.⁴³⁵

Pour le test d'interactions binaires, deux vecteurs d'expression en cellules mammifères peuvent générer des protéines de fusion contenant les deux protéines à tester. Ces deux protéines d'intérêt sont marquées chacune de l'un des deux fragments de la Luciférase Gaussia : GL1 ou GL2. La reconstitution de la Luciférase et l'émission d'un signal de fluorescence indique la présence d'une interaction. Pour la calibration de la méthode, un autre vecteur exprimant la protéine fluorescente Renilla est simultanément utilisé. Ce qui permet d'obtenir un ratio de fluorescence normalisé (NLR).

Afin de valider les interactions de Tax-1 avec les domaines PDZ séparés, des cellules HEK293 ont étéensemencées dans des plaques de 24 puits. Après 24 heures (à une confluence de 70-80%), les cellules sont transfectées avec des plasmides GL1 et/ou GL2 exprimant les peptides de fusion à tester. L'activité luciférase a été mesurée sur les lysats transférés dans des plaques 96 puits, en utilisant la machine automatisée DLR. Les résultats sont normalisés par rapport à la valeur de la luciférase contrôle Renilla. Le rapport de luciférase normalisé a été calculé comme suit: $NLR = \text{valeur luciférase de co-transfection (GL1 + GL2)} / (\text{valeur luciférase GL1 seul} + \text{valeur luciférase GL2 seul})$. Une interaction est considérée positive ou validée lorsque $NLR \geq 3,5$. Les lyses cellulaires et les mesures de fluorescence ont été réalisées en triple pour chaque condition.

7 Mesure de l'activité Luciférase

Les cellules sont collectées et lysées avec le *passive lysis buffer* (Promega). Pour la lecture de la luciférase, 100 µl des lysats ont été utilisés, auxquels les substrats Firefly et Renilla stop & glo (Promega) ont été rajoutés. Les essais de lyse cellulaire et de luciférase ont été effectués en triple. Les mesures de luciférase ont été effectuées dans des plaques à 96 puits en utilisant une machine automatisée DLR. Les valeurs de luciférase de luciole ont été normalisées aux valeurs de R-luc et le rapport calculé représente l'activité luciférase.

8 Ni-NTA pulldown

Les cellules 293T ont étéensemencées dans des boîtes de 10 cm et transfectées (Polyfect, Qiagen) avec un plasmide pSG5M-Tax-1-His (2 pg), ainsi que des doses croissantes d'un plasmide Flag-LNX2 (2-6 pg). Quarante-huit heures plus tard, les cellules ont été récoltées et lysées dans des conditions hautement dénaturantes et réductrices dans le tampon A (Guanidium-HCl 6M, NaH₂P0₄ 0,1 M, imidazole 10 mM, pH 8) et incubées avec des billes Ni²⁺ + -NTA (acide 15 nitrilotriacétique), pendant 2 h à température ambiante. Les billes ont été lavées trois fois dans le tampon A, deux fois dans le tampon B (tampon A dilué 1: 4 dans le tampon C) et deux fois dans le tampon C (Tris-HCl 25 mM pH 6,8, imidazole 10 mM). Les protéines liées ont été éluées dans du tampon de Laemmli et révélées par l'immunoblots. Pour les lysats de cellules entières (input), on a lysé les cellules (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, NP40 à 1%, Na-DOC 0,25%) en présence d'inhibiteurs de protéase (Complete, Roche Diagnostics) avant l'élimination des débris cellulaires par centrifugation. L'immunoblot a été réalisé sur un gel Criterion XT 10% Bis-Tris (Biorad). Les anticorps suivants ont été utilisés: anti-Histidine6, anti-ubiquitin, anti-Flag.

9 Clonage

Le clonage des protéines a été réalisé en utilisant la technologie de recombinaison Gateway. Ce système est un procédé de clonage universel qui tire partie des propriétés de recombinaison spécifiques au site du bactériophage lambda pour fournir un moyen rapide et hautement efficace de déplacer des séquences d'ADN entre plusieurs systèmes vectoriels.

Afin de cloner les mutants de LNX2 ou d'autres domaines PDZ séparés nous avons déterminé les amorces qui délimitent les différentes séquences. Puis, nous avons effectué une PCR pour amplifier le mutant d'intérêt avec les amorces spécifiques flanquées par des séquences de recombinaison attB.

Les produits de PCR des fragments ou protéines d'intérêt sont ensuite clonés dans le vecteur donneur en réaction BP, en utilisant la clonase BP Gateway (Invitrogen). Cette réaction est effectuée en ajoutant 100 ng du produit de PCR à 150 ng du vecteur donneur avec 1 µl du mélange d'enzymes BP clonase II pour un volume total de 10 µl dans un eppendorf de 1,5 ml à 25°C, pendant une heure. Pour terminer la réaction, 1 µl de solution de proteinase K a été

ajouté au mélange et incubée pendant 10 minutes à 37°C. 2 µl de chaque réaction BP ont été transformés en 40µl de cellules bactériennes électrochimiques Hb101, puis transférés dans 1ml de milieu LB et incubés à 37 ° C pendant 1 heure sous agitation. 100 µl de chaque transformation ont été ensemencées sur des boites d'agar LB complétées par un antibiotique d'ampicilline (1 ug / ml) et incubées à 37 ° C pendant une nuit. Les colonies positives ont été sélectionnées et transférées dans 5 ml de milieu LB + ampicilline liquide pour l'extraction d'ADN en utilisant le kit NucleoSpin Plasmid (Marcherey-Nagel) selon les instructions du fabricant. L'ADN extrait a été vérifié par PCR, électrophorèse et séquençage en utilisant des amorces spécifiques dans les vecteurs donneurs.

Après avoir cloné puis amplifiés les gènes d'intérêt dans les vecteurs donneur pDNR223, nous les avons transférés dans différents vecteurs d'expression pour les levures (pAD et pDB), pour les bactéries (GST, His, NiNTA) et pour les cellules humaines (GFP, Flag, pNIGLuc et pN2GLuc).

Afin de cloner les gènes dans des vecteurs d'expression, la réaction LR a été réalisée en utilisant la clonase LR Gateway (Invitrogen). Cette réaction a été réalisée en ajoutant 150 ng du plasmide d'entrée (contenant le gène d'intérêt flanqué de sites attL) et 150 ng d'un vecteur de destination (contenant des sites attR) avec 1 µl du mélange d'enzymes LR clonase II pour un volume total de 10 µL dans un eppendorf de 1,5 ml à 25 ° C pendant une heure. Ensuite, nous avons suivi les mêmes étapes mentionnées ci-dessus pour la réaction de la clonase BP, mais l'antibiotique spectinomycine est utilisé à la place de l'antibiotique ampicilline dans la culture bactérienne. Les plasmides clonés ont été vérifiés par PCR, électrophorèse sur gel d'agarose et séquençage.

10 Double hybride en levure de Tax-1 avec les domaines PDZ séparés

Le double hybride en levure est une méthode de criblage d'interactions bien établie permettant la détection d'interactions binaires. Cette méthode a comme principe la reconstitution du facteur de transcription Gal4. Une première protéine est couplée au domaine de fixation de Gal4 et une deuxième protéine est fusionnée au domaine d'activation de Gal4. La reconstitution du facteur Gal4 par interaction des deux protéines de fusion indique la présence d'une interaction suite à l'expression d'un gène de sélection.

Les clones d'entrée PDZ ont été utilisés dans une réaction Gateway® LR pour transférer l'ADN codant le domaine PDZ dans le vecteur d'expression en levure AD pACT2. Tous les domaines PDZ ont été transformés dans la souche haploïde de levure Y187 (MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, leu2-3, 112, gal4Δ, met-, gal80Δ, MEL1, URA3 :: GAL1UAS - GAL1TATA-lacZ). De façon similaire, le fragment d'ADN codant Tax-1 a été cloné dans le vecteur d'expression en levures DB pGBT9, puis transformé dans la souche de levure haploïde AH109 (MATa, trp1-901, leu2-3, 112, Ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2: GAL1UAS-GAL1TATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3 :: MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ, MEL1). Les interactions entre chaque PDZ et Tax-1 ont été testées par conjugaison des deux souches de levure. En résumé, une culture nocturne des deux types de levures (du type d'accouplement opposé) a été réalisée. Ceci dans un milieu sélectif favorisant les levures diploïdes (extrait de levure liquide-Peptone-Dextrose YPAD –W Tryptophane –L Leucine) supplémenté avec 10% de PEG pendant 4 h à 30 ° C Sous agitation douce. Après un lavage avec de l'eau, on a placé les levures sur un milieu sélectif solide Tryptophane-Histidine-Leucine (-WHL) pour un dosage phénotypique. Les levures diploïdes qui prolifèrent sur le milieu -WHL indiquent une interaction entre les deux protéines de fusion⁴²².

11 GST-pulldown

Pour détecter les partenaires de Tax-1 par pulldown, nous avons exprimé les protéines à domaines PDZ « full length » en cellules HEK293. Ces cellules ont été ensuite lysées et incubées avec des billes contenant la protéine GST-Tax-1 ou GST-Tax-2 comme contrôle négatif. Les protéines Tax-1 et Tax-2 s'attachent aux billes de Sepharose grâce à leur tag GST, puis elles sont mises en contact avec le lysat cellulaire qui contient l'une des protéines PDZ-Flag. La révélation du flag par immunoblot, nous indique une interaction entre Tax-1 et la protéine à domaine PDZ.

12 qRT-PCR

L'ARN total a été extrait en utilisant le kit de purification GeneJET RNA (Thermo scientific) et traité par la DNaseI (Thermo Scientific) sur colonne. L'ARN total a été inverse ment transcrit avec des amorces aléatoires en utilisant le Kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo scientifique). Le qPCR a été réalisé en utilisant la détection SYBER Green de Roche dans l'appareil Lightcycler 480 (Roche). La quantification de l'ARNm a été réalisée

par normalisation relative au gène constitutif GAPDH. Les taux d'expression relatifs ont été calculés pour chaque gène en utilisant la méthode ΔCt ou $\Delta\Delta\text{Ct}$.

13 Immunoprécipitation Tax-1/SDCBP

L'interaction de Tax-1 avec SDCBP a été revalidée par immunoprécipitation. En effet, des cellules HEK 293T ont été transfectées avec Flag-Syntenin, Tax-1 et Tax-2. 48 heures après la transfection, les cellules ont été lysées et l'expression de protéines vérifiée par western blot, en utilisant des anticorps spécifiques anti-Tax-1 et anti-Flag.

14 Localisation cellulaire de Tax-1 et SDCBP

Les cellules HeLa ont été transfectées avec des constructions exprimant la Tax-1 et siRNA contrôle ou siRNA SDCBP. Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules ont été fixées, perméabilisées et marquées avec des anticorps primaires anti-Tax-1 et des anticorps secondaires conjugués à Alexa 488. Les cellules ont ensuite été analysées au microscope confocal. En utilisant le logiciel Nikon A1R, nous avons quantifié les intensités de ROI (régions d'intérêt) qui nous ont permis de déterminer le rapport cytoplasme / nucléus de la localisation des protéines. Les données statistiquement significatives sont indiquées avec un astérisque (P <0,05), deux (P <0,01) ou trois (P <0,001).

15 Effet mutuel de la surexpression de Tax-1 et de SDCBP

Des cellules HeLa ont été transfectées avec des constructions exprimant Tax-1 et/ou Flag-SDCBP. Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules ont été fixées, perméabilisées et marquées avec des anticorps anti-Tax-1 ou anti-Flag et des anticorps secondaires conjugués Alexa 488 ou Alexa 633. Les cellules ont ensuite été analysées au microscope confocal comme décrit pour la section précédente.

16 Test d'inhibition par FJ9 de la transformation induite par Tax-1

Afin de tester l'effet de FJ9 sur la transformation des cellules induite par le virus HTLV-1, nous avons transduit de manière stable des cellules Rat-1 (fibroblastes de rat) avec un vecteur

lentiviral pTax-1-IB. Un pool de cellules résistantes (5×10^3) a été ensemencé dans du DMEM/10 % FCS contenant de l'agarose à 0.33 %, superposé à une couche d'agarose 0.5% dans une plaque 24 puits avec 100 μ M de FJ9 ou de DMSO. Après trois semaines de culture, les colonies qui forment habituellement des « foci » ont été examinées au microscope optique et des photos ont été réalisées pour quantifier l'effet de FJ9. Le comptage des foci induits par Tax-1 a été réalisé à l'aide du logiciel ImageJ.

17 Test d'inhibition par FJ9 de la transmission de cellule à cellule de Tax-1

Nous avons co-cultivé des cellules produisant le virus (MT2) avec des cellules contenant le gène codant pour la luciférase sous le contrôle du promoteur viral LTR. Les cellules sont co-cultivées vingt-quatre heures en présence ou pas de 100 μ M de FJ9. L'analyse de l'activation de la luciférase a été réalisée comme décrit précédemment (voir section 6).

18 Test d'ubiquitination de Tax-1

Pour vérifier l'implication de LNX2 dans le processus d'ubiquitination de Tax-1, nous avons procédé à des co-transfections de HisTag-Tax-1 avec Flag-LNX2 mais aussi l'utilisation de siRNA pour réprimer l'expression de LNX2. De ce fait, nous pourrions purifier Tax-1 avec des billes de Ni²⁺ et révéler son état d'ubiquitination sur WB. Ainsi nous avons pu comparer le taux d'ubiquitination de Tax-1 dans les différents cas de modulation de l'expression de LNX2.

19 Test d'inhibition de l'interaction de Tax-1 avec SDCBP par FJ9

Le BiFC ou la complémentarité de fluorescence bimoléculaire est une méthode de détection d'interactions protéiques. Elle est basée sur la reconstitution de deux fragments d'une protéine fluorescente qui sont fusionnés chacun à une des deux protéines à tester. Techniquement, les deux fragments de la protéine fluorescente sont complémentaires et permettent l'expression de la protéine reconstituée dans des cellules vivantes. L'interaction des protéines testées

rapproche les fragments rapporteurs qui émettent le signal de fluorescence suite à la reconstitution de la forme native de la protéine fluorescente.

Le signal fluorescent des cellules peut être détecté et catégorisé à l'aide de la cytométrie en flux, qui nous permet de quantifier le taux de reconstitution de la protéine rapporteuse. L'interaction des deux protéines testées est manifestée par un taux de fluorescence supérieur au seuil déterminé par l'utilisation des contrôles. Ces derniers impliquent l'utilisation de la protéine rapporteuse seule ou l'une des deux protéines seules.

Afin d'estimer la capacité de la petite molécule FJ9 à inhiber l'interaction entre Tax-1 et SDCBP, nous avons utilisé la protéine fluorescente YFP. Les cellules HEK 293T ont été transfectées avec le fragment C terminal de la protéine YFP fusionné à SDCBP et avec le fragment N terminal de YFP fusionné à Tax-1. Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules ont été traitées avec 100 μ M de FJ9 ou de DMSO et cultivées pendant une période supplémentaire de 24 heures. Les cellules ont été analysées par cytométrie de flux. Les résultats représentent la moyenne et l'écart-type de trois expériences indépendantes.

20 Purification des exosomes

Les exosomes ont été isolés à partir de surnageants cellulaires. D'abord, 50-100 ml de surnageants ont été soumis à une centrifugation à faible vitesse de 2000 g pendant 20 minutes à température ambiante pour éliminer les cellules flottantes. Ensuite, le surnageant sans cellules a été centrifugé à 12 000 g pendant 45 minutes et filtré (0,22 μ m) pour éliminer les débris cellulaires supplémentaires. Le milieu recueilli a ensuite été ultracentrifugé pendant 2 h à 100 000 g. Le culot contenant les exosomes a été lavé une fois avec du PBS, centrifugé de nouveau pendant 2 h à 100 000 g et finalement suspendu dans du tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM, SDS à 1%, pH 7,5, supplémenté avec des inhibiteurs de protéase et de phosphatase). Le lysat a été stocké à 4°C jusqu'à utilisation en western blot. Toutes les étapes de centrifugation ont été réalisées à 4 ° C.

21 Analyse statistique

Les valeurs des graphes sont présentées sous la forme de moyenne \pm écart type, calculée sur au moins trois expériences indépendantes. La signification a été déterminée à l'aide d'un test t

de Student à deux variables (comparaison des moyennes). Les seuils de valeur P (p value) sont représentés comme suit; *= p <0,05; **= p <0,01 et ***= p <0,001.

22 Docking

Le docking est une méthode *in silico* qui permet d'analyser les interactions entre deux molécules par simulation 3D. Cette prédiction de liaisons moléculaires, est possible grâce à des algorithmes puissants qui exécutent des calculs de probabilité très précis. Ces calculs sont appliqués plusieurs fois pour chaque couple de deux endroits choisis sur les deux molécules. Les résultats sont présentés sous forme de probabilité de liaison pour chaque point d'interaction. En plus, des détails concernant les résidus impliqués sont aussi fournis.

Pour tester l'interaction de Tax-1 avec le domaine PDZ1 de LNX2, nous avons d'abord déterminé la séquence peptidique délimitant le domaine. Puis, nous avons construit sa structure 3D grâce à l'utilisation de l'outil en ligne SWISSMODEL. Cet outil nécessite une structure 3D matrice d'un peptide ayant une séquence primaire proche de celle de notre domaine PDZ Cette structure matrice a été trouvée sur la base de données PDB (PDB ID: 2DM8) grâce à l'utilisation de l'outil Blast de NCBI.

Après l'obtention de la structure 3D du domaine PDZ, nous avons sélectionné la séquence de Tax-1 à tester. En effet, nous avons sélectionné le PBM de Tax-1 qui est composé de cinq résidus d'acides aminés déstructurés (RETEV). Ce penta peptide a été structuré grâce à l'outil de prédiction adapté aux petits peptides PEPELOOK.

Afin d'atteindre une efficacité maximale, un étalonnage de la méthode a été réalisé. Ainsi, une interaction déjà résolue par cristallisation et connue dans la base de données PDB a été utilisée. De fait, l'interaction du PDZ2 de la protéine DLG1 avec le PBM de l'oncoprotéine E6 du virus HPV18 a été exploitée (PDB ID: 2OQS). Ceci, en séparant les deux éléments et en les soumettant aux analyses de prédiction. Une opération qui nous a permis de régler les paramètres de calculs pour prédire exactement la même position résolu expérimentalement.

Les analyses de docking ont été effectuées en utilisant le système d'exploitation Linux. Le logiciel Autodock a été utilisé comme interface pour réaliser les calculs de docking, en entrant parallèlement des lignes de commandes sur le terminal prévu à cet effet dans Linux. La visualisation et la présentation des résultats ont été réalisées à l'aide du logiciel Pymol.

23 Analyse des enrichissements de GO

Afin de réaliser les analyses de Gene Ontology (GO), nous avons préparé les listes de gènes codant les protéines partenaires de Tax-1 en vérifiant le nom de chaque protéine dans la base de données NCBI. Par la suite, nous avons utilisé l'interface DAVID, qui permet de mettre en évidence des fonctions pertinentes aux seins d'un groupe de gènes codant les protéines d'intérêt. Ceci en réalisant des analyses statistiques permettant de déterminer l'enrichissement de chaque fonction. Par ailleurs, la calibration de la méthode a été réalisée grâce à l'application de l'analyse sur tous les gènes codant les protéines à domaines PDZ, afin d'éviter les biais liés aux fonctions naturelles de ce type de protéines.

24 Représentation graphique des cartes interactomiques et création de réseaux protéiques complexes

La représentation graphique des cartes interactomiques et la création de réseaux protéiques complexes ont été réalisées avec le logiciel Cytoscape. Ce logiciel permet de transformer les données d'interactions ordonnées en formes géométriques diverses.

Pour représenter graphiquement les différentes cartes interactomiques, nous avons construit des listes d'interactions binaires de Tax-1 avec chaque protéine à domaines PDZ partenaire. Puis, nous avons introduit chaque liste séparément dans le logiciel Cytoscape. Enfin, nous avons appliqué le code couleur nécessaire à la distinction des caractéristiques de chaque partenaire de Tax-1.

La création de réseaux protéiques complexes permet de remettre les interactions Tax-1/PDZ dans leur contexte physiologique. En effet, nous avons introduit à cet effet les listes d'interactions issues des cartes interactomiques, mais aussi d'autres protéines partenaires des protéines à domaines PDZ connues dans la littérature.

Ces différentes représentations permettent de mieux visualiser les partenaires qui y figurent et d'analyser leurs affinités.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Gallo, R. C. The discovery of the first human retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology* **2**, 17, doi:10.1186/1742-4690-2-17 (2005).
- 2 Poiesz, B. J. *et al.* Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 7415-7419 (1980).
- 3 Takatsuki, K. Discovery of adult T-cell leukemia. *Retrovirology* **2**, 16, doi:10.1186/1742-4690-2-16 (2005).
- 4 Uchiyama, T., Yodoi, J., Sagawa, K., Takatsuki, K. & Uchino, H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* **50**, 481-492 (1977).
- 5 Hinuma, Y. *et al.* Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 6476-6480 (1981).
- 6 Gessain, A. *et al.* HTLV antibodies in patients with non-Hodgkin lymphomas in Martinique. *Lancet* **1**, 1183-1184 (1984).
- 7 Osame, M. *et al.* HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity. *Lancet* **1**, 1031-1032 (1986).
- 8 Hanchard, B. *et al.* Childhood infective dermatitis evolving into adult T-cell leukaemia after 17 years. *Lancet* **338**, 1593-1594 (1991).
- 9 LaGrenade, L., Hanchard, B., Fletcher, V., Cranston, B. & Blattner, W. Infective dermatitis of Jamaican children: a marker for HTLV-I infection. *Lancet* **336**, 1345-1347 (1990).
- 10 Mochizuki, M. *et al.* HTLV-I and uveitis. *Lancet* **339**, 1110 (1992).
- 11 Morgan, O. S., Rodgers-Johnson, P., Mora, C. & Char, G. HTLV-1 and polymyositis in Jamaica. *Lancet* **2**, 1184-1187 (1989).
- 12 Sugimoto, M. *et al.* T-lymphocyte alveolitis in HTLV-I-associated myelopathy. *Lancet* **2**, 1220 (1987).
- 13 Kalyanaraman, V. S. *et al.* A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science* **218**, 571-573 (1982).
- 14 Feuer, G. & Green, P. L. Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2. *Oncogene* **24**, 5996-6004, doi:10.1038/sj.onc.1208971 (2005).
- 15 Hjelle, B. *et al.* Chronic neurodegenerative disease associated with HTLV-II infection. *Lancet* **339**, 645-646 (1992).
- 16 Wolfe, N. D. *et al.* Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 7994-7999, doi:10.1073/pnas.0501734102 (2005).
- 17 Calattini, S. *et al.* Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa. *Retrovirology* **2**, 30, doi:10.1186/1742-4690-2-30 (2005).
- 18 Slattery, J. P., Franchini, G. & Gessain, A. Genomic evolution, patterns of global dissemination, and interspecies transmission of human and simian T-cell leukemia/lymphotropic viruses. *Genome research* **9**, 525-540 (1999).
- 19 Gessain, A. & Cassar, O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Frontiers in microbiology* **3**, 388, doi:10.3389/fmicb.2012.00388 (2012).
- 20 Mahieux, R. & Gessain, A. HTLV-3/STLV-3 and HTLV-4 viruses: discovery, epidemiology, serology and molecular aspects. *Viruses* **3**, 1074-1090, doi:10.3390/v3071074 (2011).
- 21 Proietti, F. A., Carneiro-Proietti, A. B., Catalan-Soares, B. C. & Murphy, E. L. Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* **24**, 6058-6068, doi:10.1038/sj.onc.1208968 (2005).
- 22 Maeda, Y. *et al.* Prevalence of possible adult T-cell leukemia virus-carriers among volunteer blood donors in Japan: a nation-wide study. *International journal of cancer* **33**, 717-720 (1984).
- 23 Courtois, F. *et al.* HTLV-I/II infection in pregnant women in Paris. *Lancet* **335**, 1103 (1990).

- 24 Courouce, A. M., Pillonel, J., Lemaire, J. M., Maniez, M. & Brunet, J. B. Seroepidemiology
of HTLV-I/II in universal screening of blood donations in France. *Aids* **7**, 841-847 (1993).
- 25 Nightingale, S. *et al.* Antenatal survey for the seroprevalence of HTLV-1 infections in the
West Midlands, England. *Epidemiology and infection* **110**, 379-387 (1993).
- 26 Zaaijer, H. L., Cuypers, H. T., Dudok de Wit, C. & Lelie, P. N. Results of 1-year screening of
donors in The Netherlands for human T-lymphotropic virus (HTLV) type I: significance of
Western blot patterns for confirmation of HTLV infection. *Transfusion* **34**, 877-880 (1994).
- 27 Dalekos, G. N. *et al.* Prevalence of antibodies to human T-lymphotropic virus types I and II in
volunteer blood donors and high-risk groups in northwestern Greece. *Transfusion* **35**, 503-506
(1995).
- 28 Ferrante, P. *et al.* Molecular analysis of HTLV-I and HTLV-II isolates from Italian blood
donors, intravenous drug users and prisoners. *The new microbiologica* **20**, 93-104 (1997).
- 29 Hale, A., Leung, T., Sivasubramaniam, S., Kenny, J. & Sutherland, S. Prevalence of
antibodies to HTLV in antenatal clinic attenders in south east London. *Journal of medical
virology* **52**, 326-329 (1997).
- 30 Tuset, C., Gutierrez, M., Carbonell, C., Tuset, T. & Soriano, V. Human T-cell lymphotropic
virus infection in pregnant women in Spain. *European journal of clinical microbiology &
infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* **16**,
771-773 (1997).
- 31 Poljak, M. *et al.* Seroprevalence of human T cell leukaemia/lymphoma virus type I (HTLV-I)
in pregnant women, patients attending venereological outpatient services and intravenous drug
users from Slovenia. *Folia biologica* **44**, 23-25 (1998).
- 32 Ades, A. E. *et al.* Human T cell leukaemia/lymphoma virus infection in pregnant women in
the United Kingdom: population study. *Bmj* **320**, 1497-1501 (2000).
- 33 Machuca, A. *et al.* Prevalence of HTLV infection in pregnant women in Spain. *Sexually
transmitted infections* **76**, 366-370 (2000).
- 34 Tseliou, P. M. *et al.* Prevalence of human T-cell lymphotropic virus-I/II-indeterminate
reactivities in a Greek blood bank population. *Transfusion medicine* **14**, 253-254,
doi:10.1111/j.0958-7578.2004.00509.x (2004).
- 35 Tseliou, P. M. *et al.* Prevalence of infection by HTLV-I/II among pregnant women and high-
risk groups in the Peloponnese peninsula, Greece. *International journal of STD & AIDS* **17**,
543-546, doi:10.1258/095646206778145541 (2006).
- 36 Vrieling, H. & Reesink, H. W. HTLV-I/II prevalence in different geographic locations.
Transfusion medicine reviews **18**, 46-57 (2004).
- 37 Taylor, G. P. *et al.* The seroepidemiology of human T-lymphotropic viruses: types I and II in
Europe: a prospective study of pregnant women. *Journal of acquired immune deficiency
syndromes* **38**, 104-109 (2005).
- 38 Davidson, F. *et al.* Detection of HTLV-I and -II in Scottish blood donor samples and archive
donations. *Vox sanguinis* **91**, 231-236, doi:10.1111/j.1423-0410.2006.00816.x (2006).
- 39 Laperche, S., Worms, B., Pillonel, J., European Network of Transfusion Medecine, S. &
Steering, C. Blood safety strategies for human T-cell lymphotropic virus in Europe. *Vox
sanguinis* **96**, 104-110, doi:10.1111/j.1423-0410.2008.01136.x (2009).
- 40 Brant, L. J., Cawley, C., Davison, K. L., Taylor, G. P. & Group, H. N. R. S. Recruiting
individuals into the HTLV cohort study in the United Kingdom: clinical findings and
challenges in the first six years, 2003 to 2009. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les
maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **16** (2011).
- 41 Gout, O. *et al.* Chronic myelopathies associated with human T-lymphotropic virus type I. A
clinical, serologic, and immunovirologic study of ten patients in France. *Archives of neurology*
46, 255-260 (1989).
- 42 Rio, B. *et al.* [Adult T-cell leukemia and non-malignant adenopathies associated with HTLV I
virus. Apropos of 17 patients born in the Caribbean region and Africa]. *Presse medicale* **19**,
746-751 (1990).
- 43 Plumelle, Y. *et al.* Adult T-cell leukemia-lymphoma: a clinico-pathologic study of twenty-six
patients from Martinique. *Hematologic pathology* **7**, 251-262 (1993).

- 44 Martin, F., Fedina, A., Youshya, S. & Taylor, G. P. A 15-year prospective longitudinal study of disease progression in patients with HTLV-1 associated myelopathy in the UK. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **81**, 1336-1340, doi:10.1136/jnnp.2009.191239 (2010).
- 45 Ceesay, M. M. *et al.* Phase II study on combination therapy with CHOP-Zenapax for HTLV-I associated adult T-cell leukaemia/lymphoma (ATLL). *Leukemia research* **36**, 857-861, doi:10.1016/j.leukres.2011.12.004 (2012).
- 46 Catovsky, D. *et al.* Adult T-cell lymphoma-leukaemia in Blacks from the West Indies. *Lancet* **1**, 639-643 (1982).
- 47 Dougan, S. *et al.* New diagnoses of HTLV infection in England and Wales: 2002-2004. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* **10**, 232-235 (2005).
- 48 Gessain, A. *et al.* Epidemiology and immunovirology of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I-associated adult T-cell leukemia and chronic myelopathies as seen in France. *Cancer research* **50**, 5692S-5696S (1990).
- 49 Gessain, A. *et al.* Cutaneous type of adult T cell leukemia/lymphoma in a French West Indian woman. Clonal rearrangement of T-cell receptor beta and gamma genes and monoclonal integration of HTLV-I proviral DNA in the skin infiltrate. *Journal of the American Academy of Dermatology* **23**, 994-1000 (1990).
- 50 Mahe, A. *et al.* [Adult T-cell leukemia associated with HTLV-1 in a HIV-2 seropositive African]. *Annales de dermatologie et de venerologie* **121**, 704-709 (1994).
- 51 Duval, A. *et al.* Atypical presentation of adult T-cell leukaemia/lymphoma due to HTLV-1: prurigo nodularis lasting twelve years followed by an acute micropapular eruption. *Acta dermato-venereologica* **90**, 287-290, doi:10.2340/00015555-0846 (2010).
- 52 Toro, C. *et al.* Clinical impact of HTLV-1 infection in Spain: implications for public health and mandatory screening. *Journal of acquired immune deficiency syndromes* **30**, 366-368 (2002).
- 53 Trevino, A. *et al.* Trends in the prevalence and distribution of HTLV-1 and HTLV-2 infections in Spain. *Virology journal* **9**, 71, doi:10.1186/1743-422X-9-71 (2012).
- 54 Paun, L., Ispas, O., Del Mistro, A. & Chieco-Bianchi, L. HTLV-I in Romania. *European journal of haematology* **52**, 117-118 (1994).
- 55 Veelken, H. *et al.* HTLV-I-associated adult T cell leukemia/lymphoma in two patients from Bucharest, Romania. *Leukemia* **10**, 1366-1369 (1996).
- 56 Watanabe, T. HTLV-1-associated diseases. *International journal of hematology* **66**, 257-278 (1997).
- 57 Yoshida, M., Miyoshi, I. & Hinuma, Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 2031-2035 (1982).
- 58 Hiroshi Ureshino, N. K., Eizaburo Sueoka, Walid Hleihe1, Shinya Kimura, Masaharu Miyahara. Mogamulizumab for adult T-cell leukemia/ lymphoma expressing atypical phenotype CD4S/CD8+/ CCR4+. *Journal of Hematology* (2014).
- 59 Shimoyama, M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *British journal of haematology* **79**, 428-437 (1991).
- 60 Phillips, A. A. *et al.* A critical analysis of prognostic factors in North American patients with human T-cell lymphotropic virus type-1-associated adult T-cell leukemia/lymphoma: a multicenter clinicopathologic experience and new prognostic score. *Cancer* **116**, 3438-3446, doi:10.1002/cncr.25147 (2010).
- 61 Ikeda, S. *et al.* Detection of preleukemic state of adult T-cell leukemia (pre-ATL) in HTLV-1 carriers. *Cancer detection and prevention* **14**, 431-435 (1990).
- 62 Nagai, M. *et al.* 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. *Journal of neurovirology* **4**, 586-593 (1998).

- 63 Olindo, S. *et al.* HTLV-1 proviral load in peripheral blood mononuclear cells quantified in 100 HAM/TSP patients: a marker of disease progression. *Journal of the neurological sciences* **237**, 53-59, doi:10.1016/j.jns.2005.05.010 (2005).
- 64 Tattermusch, S. *et al.* Systems biology approaches reveal a specific interferon-inducible signature in HTLV-1 associated myelopathy. *PLoS pathogens* **8**, e1002480, doi:10.1371/journal.ppat.1002480 (2012).
- 65 Iwanaga, M. *et al.* Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) proviral load and disease progression in asymptomatic HTLV-1 carriers: a nationwide prospective study in Japan. *Blood* **116**, 1211-1219, doi:10.1182/blood-2009-12-257410 (2010).
- 66 Kikuchi M, J. E., Ralfkiaer E. Adult T-cell leukaemia/ lymphoma. In WHO Classification of Tumours; Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Edited by Jaffe ES, Harris NL, Stein H. Lyon, France: IARC Press (2001).
- 67 Cook, L. B. *et al.* The role of HTLV-1 clonality, proviral structure, and genomic integration site in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* **123**, 3925-3931, doi:10.1182/blood-2014-02-553602 (2014).
- 68 Tsukasaki, K. *et al.* Integration patterns of HTLV-I provirus in relation to the clinical course of ATL: frequent clonal change at crisis from indolent disease. *Blood* **89**, 948-956 (1997).
- 69 Gallamini, A. *et al.* Peripheral T-cell lymphoma unspecified (PTCL-U): a new prognostic model from a retrospective multicentric clinical study. *Blood* **103**, 2474-2479, doi:10.1182/blood-2003-09-3080 (2004).
- 70 Utsunomiya, A. *et al.* Adult T-cell leukemia with leukemia cell infiltration into the gastrointestinal tract. *Cancer* **61**, 824-828 (1988).
- 71 Tsukasaki, K. *et al.* Comparative genomic hybridization analysis in adult T-cell leukemia/lymphoma: correlation with clinical course. *Blood* **97**, 3875-3881 (2001).
- 72 Itoyama, T. *et al.* Cytogenetic analysis and clinical significance in adult T-cell leukemia/lymphoma: a study of 50 cases from the human T-cell leukemia virus type-1 endemic area, Nagasaki. *Blood* **97**, 3612-3620 (2001).
- 73 Tawara, M. *et al.* Impact of p53 aberration on the progression of Adult T-cell Leukemia/Lymphoma. *Cancer letters* **234**, 249-255, doi:10.1016/j.canlet.2005.03.039 (2006).
- 74 Ramos, J. C. *et al.* IRF-4 and c-Rel expression in antiviral-resistant adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* **109**, 3060-3068, doi:10.1182/blood-2006-07-036368 (2007).
- 75 Kinpara, S. *et al.* Interferon-alpha (IFN-alpha) suppresses HTLV-1 gene expression and cell cycling, while IFN-alpha combined with zidovudine induces p53 signaling and apoptosis in HTLV-1-infected cells. *Retrovirology* **10**, 52, doi:10.1186/1742-4690-10-52 (2013).
- 76 Takasaki, Y. *et al.* Impact of visceral involvements and blood cell count abnormalities on survival in adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL). *Leukemia research* **31**, 751-757, doi:10.1016/j.leukres.2006.11.013 (2007).
- 77 Tsukasaki, K. *et al.* Definition, prognostic factors, treatment, and response criteria of adult T-cell leukemia-lymphoma: a proposal from an international consensus meeting. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**, 453-459, doi:10.1200/JCO.2008.18.2428 (2009).
- 78 Takasaki, Y. *et al.* Long-term study of indolent adult T-cell leukemia-lymphoma. *Blood* **115**, 4337-4343, doi:10.1182/blood-2009-09-242347 (2010).
- 79 Tsukasaki, K. *et al.* VCAP-AMP-VECP compared with biweekly CHOP for adult T-cell leukemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG9801. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **25**, 5458-5464, doi:10.1200/JCO.2007.11.9958 (2007).
- 80 Ratner, L. *et al.* Dose-adjusted EPOCH chemotherapy with bortezomib and raltegravir for human T-cell leukemia virus-associated adult T-cell leukemia lymphoma. *Blood cancer journal* **6**, e408, doi:10.1038/bcj.2016.21 (2016).
- 81 Ratner, L. *et al.* Human T cell leukemia virus reactivation with progression of adult T-cell leukemia-lymphoma. *PloS one* **4**, e4420, doi:10.1371/journal.pone.0004420 (2009).
- 82 Gill, P. S. *et al.* Treatment of adult T-cell leukemia-lymphoma with a combination of interferon alfa and zidovudine. *The New England journal of medicine* **332**, 1744-1748, doi:10.1056/NEJM199506293322603 (1995).

- 83 Hermine, O. *et al.* Brief report: treatment of adult T-cell leukemia-lymphoma with zidovudine and interferon alfa. *The New England journal of medicine* **332**, 1749-1751, doi:10.1056/NEJM199506293322604 (1995).
- 84 White, J. D. *et al.* The combination of zidovudine and interferon alpha-2B in the treatment of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia & lymphoma* **40**, 287-294, doi:10.3109/10428190109057927 (2001).
- 85 Bazarbachi, A. *et al.* Meta-analysis on the use of zidovudine and interferon-alfa in adult T-cell leukemia/lymphoma showing improved survival in the leukemic subtypes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**, 4177-4183, doi:10.1200/JCO.2010.28.0669 (2010).
- 86 Fukushima, T. *et al.* Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation provides sustained long-term survival for patients with adult T-cell leukemia/lymphoma. *Leukemia* **19**, 829-834, doi:10.1038/sj.leu.2403682 (2005).
- 87 Hishizawa, M. *et al.* Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells for adult T-cell leukemia: a nationwide retrospective study. *Blood* **116**, 1369-1376, doi:10.1182/blood-2009-10-247510 (2010).
- 88 Kawada, H. *et al.* A retrospective analysis of treatment outcomes in adult T cell leukemia/lymphoma patients with aggressive disease treated with or without allogeneic stem cell transplantation: A single-center experience. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* **21**, 696-700, doi:10.1016/j.bbmt.2014.12.020 (2015).
- 89 Ishitsuka, K. & Tamura, K. Human T-cell leukaemia virus type I and adult T-cell leukaemia-lymphoma. *The Lancet. Oncology* **15**, e517-526, doi:10.1016/S1470-2045(14)70202-5 (2014).
- 90 Bomford, R., Kazanji, M. & De The, G. Vaccine against human T cell leukemia-lymphoma virus type I: progress and prospects. *AIDS research and human retroviruses* **12**, 403-405, doi:10.1089/aid.1996.12.403 (1996).
- 91 Rodriguez, S. M. *et al.* Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses* **3**, 1210-1248, doi:10.3390/v3071210 (2011).
- 92 Suehiro, Y. *et al.* Clinical outcomes of a novel therapeutic vaccine with Tax peptide-pulsed dendritic cells for adult T cell leukaemia/lymphoma in a pilot study. *British journal of haematology* **169**, 356-367, doi:10.1111/bjh.13302 (2015).
- 93 Sugata, K. *et al.* Protective effect of cytotoxic T lymphocytes targeting HTLV-1 bZIP factor. *Blood* **126**, 1095-1105, doi:10.1182/blood-2015-04-641118 (2015).
- 94 Orland, J. R. *et al.* Prevalence and clinical features of HTLV neurologic disease in the HTLV Outcomes Study. *Neurology* **61**, 1588-1594 (2003).
- 95 Goncalves, D. U. *et al.* Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases. *Clinical microbiology reviews* **23**, 577-589, doi:10.1128/CMR.00063-09 (2010).
- 96 Bangham, C. R. & Osame, M. Cellular immune response to HTLV-1. *Oncogene* **24**, 6035-6046, doi:10.1038/sj.onc.1208970 (2005).
- 97 Kamoi, K. & Mochizuki, M. HTLV-1 uveitis. *Frontiers in microbiology* **3**, 270, doi:10.3389/fmicb.2012.00270 (2012).
- 98 McGill, N. K., Vyas, J., Shimauchi, T., Tokura, Y. & Pigué, V. HTLV-1-associated infective dermatitis: updates on the pathogenesis. *Experimental dermatology* **21**, 815-821, doi:10.1111/exd.12007 (2012).
- 99 Primo, J. *et al.* High HTLV-1 proviral load, a marker for HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis, is also detected in patients with infective dermatitis associated with HTLV-1. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* **42**, 761-764 (2009).
- 100 Ohtsuki, Y., Akagi, T., Takahashi, K. & Miyoshi, I. Ultrastructural study on type C virus particles in a human cord T-cell line established by co-cultivation with adult T-cell leukemia cells. *Archives of virology* **73**, 69-73 (1982).
- 101 Verdonck, K. *et al.* Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect Dis* **7**, 266-281, doi:10.1016/S1473-3099(07)70081-6 (2007).

- 102 Seiki, M., Hattori, S., Hirayama, Y. & Yoshida, M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **80**, 3618-3622 (1983).
- 103 Gaudray, G. *et al.* The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription. *Journal of virology* **76**, 12813-12822 (2002).
- 104 Larocca, D., Chao, L. A., Seto, M. H. & Brunck, T. K. Human T-cell leukemia virus minus strand transcription in infected T-cells. *Biochemical and biophysical research communications* **163**, 1006-1013 (1989).
- 105 Zhao, T. The Role of HBZ in HTLV-1-Induced Oncogenesis. *Viruses* **8**, doi:10.3390/v8020034 (2016).
- 106 Miyazato, P., Matsuo, M., Katsuya, H. & Satou, Y. Transcriptional and Epigenetic Regulatory Mechanisms Affecting HTLV-1 Provirus. *Viruses* **8**, doi:10.3390/v8060171 (2016).
- 107 Heger, P., Rosorius, O., Hauber, J. & Stauber, R. H. Titration of cellular export factors, but not heteromultimerization, is the molecular mechanism of trans-dominant HTLV-1 rex mutants. *Oncogene* **18**, 4080-4090, doi:10.1038/sj.onc.1202762 (1999).
- 108 Hidaka, M., Inoue, J., Yoshida, M. & Seiki, M. Post-transcriptional regulator (rex) of HTLV-1 initiates expression of viral structural proteins but suppresses expression of regulatory proteins. *The EMBO journal* **7**, 519-523 (1988).
- 109 Giebler, H. A. *et al.* Anchoring of CREB binding protein to the human T-cell leukemia virus type 1 promoter: a molecular mechanism of Tax transactivation. *Molecular and cellular biology* **17**, 5156-5164 (1997).
- 110 Pise-Masison, C. A., Mahieux, R., Radonovich, M., Jiang, H. & Brady, J. N. Human T-lymphotropic virus type I Tax protein utilizes distinct pathways for p53 inhibition that are cell type-dependent. *The Journal of biological chemistry* **276**, 200-205, doi:10.1074/jbc.M005601200 (2001).
- 111 Yin, M. J. & Gaynor, R. B. Complex formation between CREB and Tax enhances the binding affinity of CREB for the human T-cell leukemia virus type 1 21-base-pair repeats. *Molecular and cellular biology* **16**, 3156-3168 (1996).
- 112 Berneman, Z. N. *et al.* Expression of alternatively spliced human T-lymphotropic virus type I pX mRNA in infected cell lines and in primary uncultured cells from patients with adult T-cell leukemia/lymphoma and healthy carriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 3005-3009 (1992).
- 113 Ciminale, V., D'Agostino, D. M., Zotti, L. & Chieco-Bianchi, L. Coding potential of the X region of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type II. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association* **13 Suppl 1**, S220-227 (1996).
- 114 Furukawa, K., Furukawa, K. & Shiku, H. Alternatively spliced mRNA of the pX region of human T lymphotropic virus type I proviral genome. *FEBS letters* **295**, 141-145 (1991).
- 115 Koralnik, I. J. *et al.* Protein isoforms encoded by the pX region of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 8813-8817 (1992).
- 116 Valeri, V. W. *et al.* Requirement of the human T-cell leukemia virus p12 and p30 products for infectivity of human dendritic cells and macaques but not rabbits. *Blood* **116**, 3809-3817, doi:10.1182/blood-2010-05-284141 (2010).
- 117 Silic-Benussi, M. *et al.* Redox regulation of T-cell turnover by the p13 protein of human T-cell leukemia virus type 1: distinct effects in primary versus transformed cells. *Blood* **116**, 54-62, doi:10.1182/blood-2009-07-235861 (2010).
- 118 Okochi, K., Sato, H. & Hinuma, Y. A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients. *Vox sanguinis* **46**, 245-253 (1984).
- 119 Stuver, S. O. *et al.* Heterosexual transmission of human T cell leukemia/lymphoma virus type I among married couples in southwestern Japan: an initial report from the Miyazaki Cohort Study. *The Journal of infectious diseases* **167**, 57-65 (1993).

- 120 Panfil, A. R., Martinez, M. P., Ratner, L. & Green, P. L. Human T-cell leukemia virus-associated malignancy. *Current opinion in virology* **20**, 40-46, doi:10.1016/j.coviro.2016.08.009 (2016).
- 121 Jones, K. S., Petrow-Sadowski, C., Huang, Y. K., Bertolette, D. C. & Ruscetti, F. W. Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells. *Nature medicine* **14**, 429-436, doi:10.1038/nm1745 (2008).
- 122 Manel, N. *et al.* The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV. *Cell* **115**, 449-459 (2003).
- 123 Barnard, A. L., Igakura, T., Tanaka, Y., Taylor, G. P. & Bangham, C. R. Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes. *Blood* **106**, 988-995, doi:10.1182/blood-2004-07-2850 (2005).
- 124 Nejmeddine, M., Barnard, A. L., Tanaka, Y., Taylor, G. P. & Bangham, C. R. Human T-lymphotropic virus, type 1, tax protein triggers microtubule reorientation in the virological synapse. *The Journal of biological chemistry* **280**, 29653-29660, doi:10.1074/jbc.M502639200 (2005).
- 125 Nejmeddine, M. *et al.* HTLV-1-Tax and ICAM-1 act on T-cell signal pathways to polarize the microtubule-organizing center at the virological synapse. *Blood* **114**, 1016-1025, doi:10.1182/blood-2008-03-136770 (2009).
- 126 Pais-Correia, A. M. *et al.* Biofilm-like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses. *Nature medicine* **16**, 83-89, doi:10.1038/nm.2065 (2010).
- 127 Jaworski, E. *et al.* Human T-lymphotropic virus type 1-infected cells secrete exosomes that contain Tax protein. *The Journal of biological chemistry* **289**, 22284-22305, doi:10.1074/jbc.M114.549659 (2014).
- 128 Giam, C. Z. & Semmes, O. J. HTLV-1 Infection and Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma-A Tale of Two Proteins: Tax and HBZ. *Viruses* **8**, doi:10.3390/v8060161 (2016).
- 129 Martin, J. L., Maldonado, J. O., Mueller, J. D., Zhang, W. & Mansky, L. M. Molecular Studies of HTLV-1 Replication: An Update. *Viruses* **8**, doi:10.3390/v8020031 (2016).
- 130 Gessian, A. *et al.* Highly divergent molecular variants of human T-lymphotropic virus type I from isolated populations in Papua New Guinea and the Solomon Islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 7694-7698 (1991).
- 131 Lambert, S. *et al.* HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. *Blood* **113**, 5176-5185, doi:10.1182/blood-2008-04-150342 (2009).
- 132 Jones, K. S., Petrow-Sadowski, C., Bertolette, D. C., Huang, Y. & Ruscetti, F. W. Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells. *J Virol* **79**, 12692-12702, doi:10.1128/JVI.79.20.12692-12702.2005 (2005).
- 133 Sagara, Y. *et al.* Identification and mapping of functional domains on human T-cell lymphotropic virus type 1 envelope proteins by using synthetic peptides. *Journal of virology* **70**, 1564-1569 (1996).
- 134 Delamarre, L. *et al.* The HTLV-I envelope glycoproteins: structure and functions. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology : official publication of the International Retrovirology Association* **13 Suppl 1**, S85-91 (1996).
- 135 Blot, V. *et al.* Human Dlg protein binds to the envelope glycoproteins of human T-cell leukemia virus type 1 and regulates envelope mediated cell-cell fusion in T lymphocytes. *Journal of cell science* **117**, 3983-3993, doi:10.1242/jcs.01266 (2004).
- 136 Ilinskaya, A., Heidecker, G. & Derse, D. Opposing effects of a tyrosine-based sorting motif and a PDZ-binding motif regulate human T-lymphotropic virus type 1 envelope trafficking. *Journal of virology* **84**, 6995-7004, doi:10.1128/JVI.01853-09 (2010).
- 137 Jones, K. S. *et al.* Molecular aspects of HTLV-1 entry: functional domains of the HTLV-1 surface subunit (SU) and their relationships to the entry receptors. *Viruses* **3**, 794-810, doi:10.3390/v3060794 (2011).
- 138 Lairmore, M. D., Haines, R. & Anupam, R. Mechanisms of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and disease. *Current opinion in virology* **2**, 474-481, doi:10.1016/j.coviro.2012.06.007 (2012).

- 139 Grassmann, R. *et al.* Role of human T-cell leukemia virus type 1 X region proteins in immortalization of primary human lymphocytes in culture. *Journal of virology* **66**, 4570-4575 (1992).
- 140 Hasegawa, H. *et al.* Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nature medicine* **12**, 466-472, doi:10.1038/nm1389 (2006).
- 141 Ohsugi, T. A transgenic mouse model of human T cell leukemia virus type 1-associated diseases. *Frontiers in microbiology* **4**, 49, doi:10.3389/fmicb.2013.00049 (2013).
- 142 Seiki, M., Inoue, J., Takeda, T. & Yoshida, M. Direct evidence that p40x of human T-cell leukemia virus type I is a trans-acting transcriptional activator. *The EMBO journal* **5**, 561-565 (1986).
- 143 Shimotohno, K., Takano, M., Teruuchi, T. & Miwa, M. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 8112-8116 (1986).
- 144 Zhang, W. *et al.* Human T-lymphotropic virus type 1 p30(II) regulates gene transcription by binding CREB binding protein/p300. *Journal of virology* **75**, 9885-9895, doi:10.1128/JVI.75.20.9885-9895.2001 (2001).
- 145 Zhao, L. J. & Giam, C. Z. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) transcriptional activator, Tax, enhances CREB binding to HTLV-I 21-base-pair repeats by protein-protein interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 7070-7074 (1992).
- 146 Zhao, L. J. & Giam, C. Z. Interaction of the human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) transcriptional activator Tax with cellular factors that bind specifically to the 21-base-pair repeats in the HTLV-I enhancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 11445-11449 (1991).
- 147 Lenzmeier, B. A., Giebler, H. A. & Nyborg, J. K. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax requires direct access to DNA for recruitment of CREB binding protein to the viral promoter. *Molecular and cellular biology* **18**, 721-731 (1998).
- 148 Fujii, M. & Masao, M. Human T-Cell Leukemia Virus Types 1 and 2. *Fields Virology* **2**, 1474-1501 (2013).
- 149 Kwok, R. P. *et al.* Control of cAMP-regulated enhancers by the viral transactivator Tax through CREB and the co-activator CBP. *Nature* **380**, 642-646, doi:10.1038/380642a0 (1996).
- 150 Lemasson, I., Polakowski, N. J., Laybourn, P. J. & Nyborg, J. K. Tax-dependent displacement of nucleosomes during transcriptional activation of human T-cell leukemia virus type 1. *The Journal of biological chemistry* **281**, 13075-13082, doi:10.1074/jbc.M512193200 (2006).
- 151 Lu, H. *et al.* Tax relieves transcriptional repression by promoting histone deacetylase 1 release from the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Journal of virology* **78**, 6735-6743, doi:10.1128/JVI.78.13.6735-6743.2004 (2004).
- 152 Siu, Y. T. *et al.* TORC1 and TORC2 coactivators are required for tax activation of the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeats. *Journal of virology* **80**, 7052-7059, doi:10.1128/JVI.00103-06 (2006).
- 153 Zhou, M. *et al.* Tax interacts with P-TEFb in a novel manner to stimulate human T-lymphotropic virus type 1 transcription. *Journal of virology* **80**, 4781-4791, doi:10.1128/JVI.80.10.4781-4791.2006 (2006).
- 154 Hishiki, T., Ohshima, T., Ego, T. & Shimotohno, K. BCL3 acts as a negative regulator of transcription from the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat through interactions with TORC3. *J Biol Chem* **282**, 28335-28343, doi:10.1074/jbc.M702656200 (2007).
- 155 Curren, R. *et al.* HTLV tax: a fascinating multifunctional co-regulator of viral and cellular pathways. *Front Microbiol* **3**, 406, doi:10.3389/fmicb.2012.00406 (2012).
- 156 Azran, I., Schavinsky-Khrapunsky, Y. & Aboud, M. Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity. *Retrovirology* **1**, 20, doi:10.1186/1742-4690-1-20 (2004).

- 157 Matsuoka, M. & Jeang, K. T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and
cellular transformation. *Nature reviews. Cancer* **7**, 270-280, doi:10.1038/nrc2111 (2007).
- 158 Kannian, P. & Green, P. L. Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular
Biology and Oncogenesis. *Viruses* **2**, 2037-2077, doi:10.3390/v2092037 (2010).
- 159 Ross, T. M., Pettiford, S. M. & Green, P. L. The tax gene of human T-cell leukemia virus type
2 is essential for transformation of human T lymphocytes. *Journal of virology* **70**, 5194-5202
(1996).
- 160 Mahieux, R. *et al.* Differences in the ability of human T-cell lymphotropic virus type 1
(HTLV-1) and HTLV-2 tax to inhibit p53 function. *Journal of virology* **74**, 6866-6874 (2000).
- 161 Tabakin-Fix, Y., Azran, I., Schavinky-Khrapunsky, Y., Levy, O. & Aboud, M. Functional
inactivation of p53 by human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein: mechanisms and
clinical implications. *Carcinogenesis* **27**, 673-681, doi:10.1093/carcin/bgi274 (2006).
- 162 Dayaram, T., Lemoine, F. J., Donehower, L. A. & Marriott, S. J. Activation of WIP1
phosphatase by HTLV-1 Tax mitigates the cellular response to DNA damage. *PloS one* **8**,
e55989, doi:10.1371/journal.pone.0055989 (2013).
- 163 Ohsugi, T., Ishida, T., Shimasaki, T., Okada, S. & Umezawa, K. p53 dysfunction precedes the
activation of nuclear factor-kappaB during disease progression in mice expressing Tax, a
human T-cell leukemia virus type 1 oncoprotein. *Carcinogenesis* **34**, 2129-2136,
doi:10.1093/carcin/bgt144 (2013).
- 164 Sun, S. C. Non-canonical NF-kappaB signaling pathway. *Cell research* **21**, 71-85,
doi:10.1038/cr.2010.177 (2011).
- 165 Neumann, M. & Naumann, M. Beyond IkappaBs: alternative regulation of NF-kappaB
activity. *FASEB J* **21**, 2642-2654, doi:10.1096/fj.06-7615rev (2007).
- 166 Sun, S. C. & Yamaoka, S. Activation of NF-kappaB by HTLV-I and implications for cell
transformation. *Oncogene* **24**, 5952-5964, doi:10.1038/sj.onc.1208969 (2005).
- 167 Romanelli, M. G. *et al.* Highlights on distinctive structural and functional properties of HTLV
Tax proteins. *Front Microbiol* **4**, 271, doi:10.3389/fmicb.2013.00271 (2013).
- 168 Journo, C. *et al.* NRP/Optineurin Cooperates with TAX1BP1 to potentiate the activation of
NF-kappaB by human T-lymphotropic virus type 1 tax protein. *PLoS pathogens* **5**, e1000521,
doi:10.1371/journal.ppat.1000521 (2009).
- 169 Shembade, N., Pujari, R., Harhaj, N. S., Abbott, D. W. & Harhaj, E. W. The kinase IKKalpha
inhibits activation of the transcription factor NF-kappaB by phosphorylating the regulatory
molecule TAX1BP1. *Nature immunology* **12**, 834-843, doi:10.1038/ni.2066 (2011).
- 170 Yasunaga, J., Lin, F. C., Lu, X. & Jeang, K. T. Ubiquitin-specific peptidase 20 targets TRAF6
and human T cell leukemia virus type 1 tax to negatively regulate NF-kappaB signaling.
Journal of virology **85**, 6212-6219, doi:10.1128/JVI.00079-11 (2011).
- 171 Gao, C. *et al.* Knockdown of Bcl-3 inhibits cell growth and induces DNA damage in HTLV-1-
infected cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* **14**, 405-408 (2013).
- 172 Kim, Y. M., Sharma, N. & Nyborg, J. K. The proto-oncogene Bcl3, induced by Tax, represses
Tax-mediated transcription via p300 displacement from the human T-cell leukemia virus type
1 promoter. *Journal of virology* **82**, 11939-11947, doi:10.1128/JVI.01356-08 (2008).
- 173 Ishikawa, C., Kawakami, H., Uchihara, J. N., Senba, M. & Mori, N. CD69 overexpression by
human T-cell leukemia virus type 1 Tax transactivation. *Biochimica et biophysica acta* **1833**,
1542-1552, doi:10.1016/j.bbamcr.2013.03.006 (2013).
- 174 Higuchi, M. *et al.* 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. *Journal of
virology* **81**, 11900-11907, doi:10.1128/JVI.00532-07 (2007).
- 175 Shoji, T. *et al.* 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, doi:10.1186/1742-4690-6-83 (2009).
- 176 Journo, C. *et al.* Human T cell leukemia virus type 2 tax-mediated NF-kappaB activation
involves a mechanism independent of Tax conjugation to ubiquitin and SUMO. *Journal of
virology* **87**, 1123-1136, doi:10.1128/JVI.01792-12 (2013).

- 177 Lamsoul, I. *et al.* Exclusive ubiquitination and sumoylation on overlapping lysine residues mediate NF-kappaB activation by the human T-cell leukemia virus tax oncoprotein. *Molecular and cellular biology* **25**, 10391-10406, doi:10.1128/MCB.25.23.10391-10406.2005 (2005).
- 178 Meertens, L., Chevalier, S., Weil, R., Gessain, A. & Mahieux, R. A 10-amino acid domain within human T-cell leukemia virus type 1 and type 2 tax protein sequences is responsible for their divergent subcellular distribution. *The Journal of biological chemistry* **279**, 43307-43320, doi:10.1074/jbc.M400497200 (2004).
- 179 Avesani, F. *et al.* Association of HTLV Tax proteins with TAK1-binding protein 2 and RelA in calreticulin-containing cytoplasmic structures participates in Tax-mediated NF-kappaB activation. *Virology* **408**, 39-48, doi:10.1016/j.virol.2010.08.023 (2010).
- 180 Ho, Y. K. *et al.* HTLV-1 tax-induced rapid senescence is driven by the transcriptional activity of NF-kappaB and depends on chronically activated IKKalpha and p65/RelA. *Journal of virology* **86**, 9474-9483, doi:10.1128/JVI.00158-12 (2012).
- 181 Zhi, H. *et al.* NF-kappaB hyper-activation by HTLV-1 tax induces cellular senescence, but can be alleviated by the viral anti-sense protein HBZ. *PLoS pathogens* **7**, e1002025, doi:10.1371/journal.ppat.1002025 (2011).
- 182 Alefantis, T., Jain, P., Ahuja, J., Mostoller, K. & Wigdahl, B. HTLV-1 Tax nucleocytoplasmic shuttling, interaction with the secretory pathway, extracellular signaling, and implications for neurologic disease. *Journal of biomedical science* **12**, 961-974, doi:10.1007/s11373-005-9026-x (2005).
- 183 Bertazzoni, U. *et al.* Intracellular localization and cellular factors interaction of HTLV-1 and HTLV-2 Tax proteins: similarities and functional differences. *Viruses* **3**, 541-560, doi:10.3390/v3050541 (2011).
- 184 Smith, M. R. & Greene, W. C. Characterization of a novel nuclear localization signal in the HTLV-I tax transactivator protein. *Virology* **187**, 316-320 (1992).
- 185 Semmes, O. J. & Jeang, K. T. Localization of human T-cell leukemia virus type 1 tax to subnuclear compartments that overlap with interchromatin speckles. *Journal of virology* **70**, 6347-6357 (1996).
- 186 Bex, F., McDowall, A., Burny, A. & Gaynor, R. The human T-cell leukemia virus type 1 transactivator protein Tax colocalizes in unique nuclear structures with NF-kappaB proteins. *Journal of virology* **71**, 3484-3497 (1997).
- 187 Alefantis, T., Barmak, K., Harhaj, E. W., Grant, C. & Wigdahl, B. Characterization of a nuclear export signal within the human T cell leukemia virus type I transactivator protein Tax. *The Journal of biological chemistry* **278**, 21814-21822, doi:10.1074/jbc.M211576200 (2003).
- 188 Jin, D. Y. & Jeang, K. T. HTLV-I Tax self-association in optimal trans-activation function. *Nucleic acids research* **25**, 379-387 (1997).
- 189 Fryrear, K. A., Durkin, S. S., Gupta, S. K., Tiedebohl, J. B. & Semmes, O. J. Dimerization and a novel Tax speckled structure localization signal are required for Tax nuclear localization. *Journal of virology* **83**, 5339-5352, doi:10.1128/JVI.00232-09 (2009).
- 190 Basbous, J., Bazarbachi, A., Granier, C., Devaux, C. & Mesnard, J. M. The central region of human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein contains distinct domains involved in subunit dimerization. *Journal of virology* **77**, 13028-13035 (2003).
- 191 Kfoury, Y. *et al.* The multifaceted oncoprotein Tax: subcellular localization, posttranslational modifications, and NF-kappaB activation. *Advances in cancer research* **113**, 85-120, doi:10.1016/B978-0-12-394280-7.00003-8 (2012).
- 192 Gatzka, M. L., Dayaram, T. & Marriott, S. J. Ubiquitination of HTLV-I Tax in response to DNA damage regulates nuclear complex formation and nuclear export. *Retrovirology* **4**, 95, doi:10.1186/1742-4690-4-95 (2007).
- 193 Yan, P. *et al.* PDLIM2 suppresses human T-cell leukemia virus type I Tax-mediated tumorigenesis by targeting Tax into the nuclear matrix for proteasomal degradation. *Blood* **113**, 4370-4380, doi:10.1182/blood-2008-10-185660 (2009).
- 194 Lodewick, J. *et al.* Acetylation of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein by p300 promotes activation of the NF-kappaB pathway. *Virology* **386**, 68-78, doi:10.1016/j.virol.2008.12.043 (2009).

- 195 Lodewick, J., Lamsoul, I. & Bex, F. Move or die: the fate of the Tax oncoprotein of HTLV-1. *Viruses* **3**, 829-857, doi:10.3390/v3060829 (2011).
- 196 Lavorgna, A. & Harhaj, E. W. An RNA interference screen identifies the Deubiquitinase STAMBPL1 as a critical regulator of human T-cell leukemia virus type 1 tax nuclear export and NF-kappaB activation. *Journal of virology* **86**, 3357-3369, doi:10.1128/JVI.06456-11 (2012).
- 197 Tsuji, T. *et al.* The nuclear import of the human T lymphotropic virus type I (HTLV-1) tax protein is carrier- and energy-independent. *The Journal of biological chemistry* **282**, 13875-13883, doi:10.1074/jbc.M611629200 (2007).
- 198 Bex, F. & Gaynor, R. B. Regulation of gene expression by HTLV-I Tax protein. *Methods* **16**, 83-94, doi:10.1006/meth.1998.0646 (1998).
- 199 Huang, J., Ren, T., Guan, H., Jiang, Y. & Cheng, H. HTLV-1 Tax is a critical lipid raft modulator that hijacks IkappaB kinases to the microdomains for persistent activation of NF-kappaB. *The Journal of biological chemistry* **284**, 6208-6217, doi:10.1074/jbc.M806390200 (2009).
- 200 Legros, S. *et al.* The HTLV-1 Tax protein inhibits formation of stress granules by interacting with histone deacetylase 6. *Oncogene* **30**, 4050-4062, doi:10.1038/onc.2011.120 (2011).
- 201 Alefantis, T., Flaig, K. E., Wigdahl, B. & Jain, P. Interaction of HTLV-1 Tax protein with calreticulin: implications for Tax nuclear export and secretion. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedicine & pharmacotherapie* **61**, 194-200, doi:10.1016/j.biopha.2007.02.005 (2007).
- 202 Kfoury, Y. *et al.* Ubiquitylated Tax targets and binds the IKK signalosome at the centrosome. *Oncogene* **27**, 1665-1676, doi:10.1038/sj.onc.1210804 (2008).
- 203 Yamamoto, K. *et al.* SMYD3 interacts with HTLV-1 Tax and regulates subcellular localization of Tax. *Cancer science* **102**, 260-266, doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01752.x (2011).
- 204 Fryrear, K. A., Guo, X., Kerscher, O. & Semmes, O. J. The Sumo-targeted ubiquitin ligase RNF4 regulates the localization and function of the HTLV-1 oncoprotein Tax. *Blood* **119**, 1173-1181, doi:10.1182/blood-2011-06-358564 (2012).
- 205 Kubota, R., Nagai, M., Kawanishi, T., Osame, M. & Jacobson, S. Increased HTLV type 1 tax specific CD8+ cells in HTLV type 1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis: correlation with HTLV type 1 proviral load. *AIDS research and human retroviruses* **16**, 1705-1709, doi:10.1089/08892220050193182 (2000).
- 206 Levin, M. C. *et al.* Autoimmunity due to molecular mimicry as a cause of neurological disease. *Nature medicine* **8**, 509-513, doi:10.1038/nm0502-509 (2002).
- 207 Levin, M. C., Lee, S. M., Morcos, Y., Brady, J. & Stuart, J. Cross-reactivity between immunodominant human T lymphotropic virus type I tax and neurons: implications for molecular mimicry. *The Journal of infectious diseases* **186**, 1514-1517, doi:10.1086/344734 (2002).
- 208 Alefantis, T. *et al.* Secretion of the human T cell leukemia virus type I transactivator protein tax. *The Journal of biological chemistry* **280**, 17353-17362, doi:10.1074/jbc.M409851200 (2005).
- 209 Szymocha, R. *et al.* Astrocytic alterations induced by HTLV type 1-infected T lymphocytes: a role for Tax-1 and tumor necrosis factor alpha. *AIDS research and human retroviruses* **16**, 1723-1729, doi:10.1089/08892220050193218 (2000).
- 210 Szymocha, R. *et al.* Human T-cell lymphotropic virus type 1-infected T lymphocytes impair catabolism and uptake of glutamate by astrocytes via Tax-1 and tumor necrosis factor alpha. *Journal of virology* **74**, 6433-6441 (2000).
- 211 Szymocha, R. *et al.* Long-term effects of HTLV-1 on brain astrocytes: sustained expression of Tax-1 associated with synthesis of inflammatory mediators. *Journal of neurovirology* **6**, 350-357 (2000).
- 212 Asquith, B. & Bangham, C. R. How does HTLV-I persist despite a strong cell-mediated immune response? *Trends in immunology* **29**, 4-11, doi:10.1016/j.it.2007.09.006 (2008).
- 213 Majorovits, E. *et al.* Human T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography. *PloS one* **3**, e2251, doi:10.1371/journal.pone.0002251 (2008).

- 214 Ng, P. W. *et al.* Genome-wide expression changes induced by HTLV-1 Tax: evidence for
MLK-3 mixed lineage kinase involvement in Tax-mediated NF-kappaB activation. *Oncogene*
20, 4484-4496, doi:10.1038/sj.onc.1204513 (2001).
- 215 Giam, C. Z. & Xu, Y. L. HTLV-I tax gene product activates transcription via pre-existing
cellular factors and cAMP responsive element. *The Journal of biological chemistry* **264**,
15236-15241 (1989).
- 216 Ku, S. C. *et al.* XBP-1, a novel human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) tax binding
protein, activates HTLV-1 basal and tax-activated transcription. *Journal of virology* **82**, 4343-
4353, doi:10.1128/JVI.02054-07 (2008).
- 217 Koga, H., Ohshima, T. & Shimotohno, K. Enhanced activation of tax-dependent transcription
of human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) long terminal repeat by TORC3. *The Journal*
of biological chemistry **279**, 52978-52983, doi:10.1074/jbc.M409021200 (2004).
- 218 Dodon, M. D., Li, Z., Hamaia, S. & Gazzolo, L. Tax protein of human T-cell leukaemia virus
type 1 induces interleukin 17 gene expression in T cells. *The Journal of general virology* **85**,
1921-1932, doi:10.1099/vir.0.79921-0 (2004).
- 219 Alexandre, C. & Verrier, B. Four regulatory elements in the human c-fos promoter mediate
transactivation by HTLV-1 Tax protein. *Oncogene* **6**, 543-551 (1991).
- 220 Kibler, K. V. & Jeang, K. T. CREB/ATF-dependent repression of cyclin a by human T-cell
leukemia virus type 1 Tax protein. *Journal of virology* **75**, 2161-2173,
doi:10.1128/JVI.75.5.2161-2173.2001 (2001).
- 221 Mulloy, J. C. *et al.* Human T-cell lymphotropic/leukemia virus type 1 Tax abrogates p53-
induced cell cycle arrest and apoptosis through its CREB/ATF functional domain. *Journal of*
virology **72**, 8852-8860 (1998).
- 222 Nicot, C. *et al.* Tax oncoprotein trans-represses endogenous B-myb promoter activity in
human T cells. *AIDS research and human retroviruses* **16**, 1629-1632,
doi:10.1089/08892220050193065 (2000).
- 223 Fujii, M. *et al.* HTLV-1 Tax induces expression of various immediate early serum responsive
genes. *Oncogene* **6**, 1023-1029 (1991).
- 224 Alexandre, C., Charnay, P. & Verrier, B. Transactivation of Krox-20 and Krox-24 promoters
by the HTLV-1 Tax protein through common regulatory elements. *Oncogene* **6**, 1851-1857
(1991).
- 225 Matsumoto, K. *et al.* Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein transforms rat
fibroblasts via two distinct pathways. *Journal of virology* **71**, 4445-4451 (1997).
- 226 Dittmer, J., Pise-Masison, C. A., Clemens, K. E., Choi, K. S. & Brady, J. N. Interaction of
human T-cell lymphotropic virus type I Tax, Ets1, and Sp1 in transactivation of the PTHR α P2
promoter. *The Journal of biological chemistry* **272**, 4953-4958 (1997).
- 227 Shuh, M. & Derse, D. Ternary complex factors and cofactors are essential for human T-cell
leukemia virus type 1 tax transactivation of the serum response element. *Journal of virology*
74, 11394-11397 (2000).
- 228 Winter, H. Y. & Marriott, S. J. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax enhances serum
response factor DNA binding and alters site selection. *Journal of virology* **81**, 6089-6098,
doi:10.1128/JVI.02179-06 (2007).
- 229 Grassmann, R., Aboud, M. & Jeang, K. T. Molecular mechanisms of cellular transformation
by HTLV-1 Tax. *Oncogene* **24**, 5976-5985, doi:10.1038/sj.onc.1208978 (2005).
- 230 Twizere, J. C. *et al.* The homeobox protein MSX2 interacts with tax oncoproteins and
represses their transactivation activity. *J Biol Chem* **280**, 29804-29811,
doi:10.1074/jbc.M503674200 (2005).
- 231 Perkins, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nature*
reviews. Molecular cell biology **8**, 49-62, doi:10.1038/nrm2083 (2007).
- 232 Karin, M. & Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-
[kappa]B activity. *Annual review of immunology* **18**, 621-663,
doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.621 (2000).
- 233 Suzuki, T., Hirai, H., Fujisawa, J., Fujita, T. & Yoshida, M. 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**, 2391-2397 (1993).
- 234 Murakami, T., Hirai, H., Suzuki, T., Fujisawa, J. & Yoshida, M. HTLV-1 Tax enhances NF-kappa B2 expression and binds to the products p52 and p100, but does not suppress the inhibitory function of p100. *Virology* **206**, 1066-1074 (1995).
- 235 Suzuki, T., Hirai, H. & Yoshida, M. Tax protein of HTLV-1 interacts with the Rel homology domain of NF-kappa B p65 and c-Rel proteins bound to the NF-kappa B binding site and activates transcription. *Oncogene* **9**, 3099-3105 (1994).
- 236 Azran, I., Jeang, K. T. & Aboud, M. High levels of cytoplasmic HTLV-1 Tax mutant proteins retain a Tax-NF-kappaB-CBP ternary complex in the cytoplasm. *Oncogene* **24**, 4521-4530, doi:10.1038/sj.onc.1208645 (2005).
- 237 Petropoulos, L., Lin, R. & Hiscott, J. Human T cell leukemia virus type 1 tax protein increases NF-kappa B dimer formation and antagonizes the inhibitory activity of the I kappa B alpha regulatory protein. *Virology* **225**, 52-64, doi:10.1006/viro.1996.0574 (1996).
- 238 Bex, F., Yin, M. J., Burny, A. & Gaynor, R. B. Differential transcriptional activation by human T-cell leukemia virus type 1 Tax mutants is mediated by distinct interactions with CREB binding protein and p300. *Molecular and cellular biology* **18**, 2392-2405 (1998).
- 239 Tsukada, J. *et al.* Human T-cell leukemia virus type I Tax transactivates the promoter of human prointerleukin-1beta gene through association with two transcription factors, nuclear factor-interleukin-6 and Spi-1. *Blood* **90**, 3142-3153 (1997).
- 240 Hivin, P., Gaudray, G., Devaux, C. & Mesnard, J. M. Interaction between C/EBPbeta and Tax down-regulates human T-cell leukemia virus type I transcription. *Virology* **318**, 556-565, doi:10.1016/j.virol.2003.10.027 (2004).
- 241 Pise-Masison, C. A., Dittmer, J., Clemens, K. E. & Brady, J. N. Physical and functional interaction between the human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax1 protein and the CCAAT binding protein NF-Y. *Molecular and cellular biology* **17**, 1236-1243 (1997).
- 242 Trejo, S. R., Fahl, W. E. & Ratner, L. The tax protein of human T-cell leukemia virus type 1 mediates the transactivation of the c-sis/platelet-derived growth factor-B promoter through interactions with the zinc finger transcription factors Sp1 and NGFI-A/Egr-1. *The Journal of biological chemistry* **272**, 27411-27421 (1997).
- 243 Richard, V. *et al.* Humoral hypercalcemia of malignancy: severe combined immunodeficient/beige mouse model of adult T-cell lymphoma independent of human T-cell lymphotropic virus type-1 tax expression. *The American journal of pathology* **158**, 2219-2228, doi:10.1016/S0002-9440(10)64694-9 (2001).
- 244 Nadella, M. V. *et al.* Expression of parathyroid hormone-related protein during immortalization of human peripheral blood mononuclear cells by HTLV-1: implications for transformation. *Retrovirology* **5**, 46, doi:10.1186/1742-4690-5-46 (2008).
- 245 Moriuchi, M., Moriuchi, H. & Fauci, A. S. HTLV type I Tax activation of the CXCR4 promoter by association with nuclear respiratory factor 1. *AIDS research and human retroviruses* **15**, 821-827, doi:10.1089/088922299310728 (1999).
- 246 Clemens, K. E. *et al.* Interaction of the human T-cell lymphotropic virus type 1 tax transactivator with transcription factor IIA. *Molecular and cellular biology* **16**, 4656-4664 (1996).
- 247 Caron, C. *et al.* Functional and biochemical interaction of the HTLV-I Tax1 transactivator with TBP. *The EMBO journal* **12**, 4269-4278 (1993).
- 248 Ching, Y. P. *et al.* Specific TATAA and bZIP requirements suggest that HTLV-I Tax has transcriptional activity subsequent to the assembly of an initiation complex. *Retrovirology* **1**, 18, doi:10.1186/1742-4690-1-18 (2004).
- 249 Harrod, R. *et al.* p300 and p300/cAMP-responsive element-binding protein associated factor interact with human T-cell lymphotropic virus type-1 Tax in a multi-histone acetyltransferase/activator-enhancer complex. *The Journal of biological chemistry* **275**, 11852-11857 (2000).
- 250 Lemasson, I., Polakowski, N. J., Laybourn, P. J. & Nyborg, J. K. Transcription regulatory complexes bind the human T-cell leukemia virus 5' and 3' long terminal repeats to control

- gene expression. *Mol Cell Biol* **24**, 6117-6126, doi:10.1128/MCB.24.14.6117-6126.2004 (2004).
- 251 Kwon, S., Zhang, Y. & Matthias, P. The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response. *Genes Dev* **21**, 3381-3394, doi:10.1101/gad.461107 (2007).
- 252 Kamoi, K. *et al.* SUV39H1 interacts with HTLV-1 Tax and abrogates Tax transactivation of HTLV-1 LTR. *Retrovirology* **3**, 5, doi:10.1186/1742-4690-3-5 (2006).
- 253 Gray, S. G. *et al.* Functional characterization of JMJD2A, a histone deacetylase- and retinoblastoma-binding protein. *The Journal of biological chemistry* **280**, 28507-28518, doi:10.1074/jbc.M413687200 (2005).
- 254 Wu, K. *et al.* Protein profile of tax-associated complexes. *The Journal of biological chemistry* **279**, 495-508, doi:10.1074/jbc.M310069200 (2004).
- 255 Cho, W. K. *et al.* Modulation of the Brd4/P-TEFb interaction by the human T-lymphotropic virus type 1 tax protein. *Journal of virology* **81**, 11179-11186, doi:10.1128/JVI.00408-07 (2007).
- 256 Doucas, V. & Evans, R. M. Human T-cell leukemia retrovirus-Tax protein is a repressor of nuclear receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 2633-2638 (1999).
- 257 Chin, K. T., Chun, A. C., Ching, Y. P., Jeang, K. T. & Jin, D. Y. Human T-cell leukemia virus oncoprotein tax represses nuclear receptor-dependent transcription by targeting coactivator TAX1BP1. *Cancer research* **67**, 1072-1081, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3053 (2007).
- 258 Twizere, J. C. *et al.* Interaction of retroviral Tax oncoproteins with tristetraprolin and regulation of tumor necrosis factor-alpha expression. *Journal of the National Cancer Institute* **95**, 1846-1859 (2003).
- 259 Desbois, C., Rousset, R., Bantignies, F. & Jalinot, P. Exclusion of Int-6 from PML nuclear bodies by binding to the HTLV-I Tax oncoprotein. *Science* **273**, 951-953 (1996).
- 260 Donzeau, M., Winnacker, E. L. & Meisterernst, M. Specific repression of Tax trans-activation by TAR RNA-binding protein TRBP. *Journal of virology* **71**, 2628-2635 (1997).
- 261 Xiao, G. *et al.* Retroviral oncoprotein Tax induces processing of NF-kappaB2/p100 in T cells: evidence for the involvement of IKKalpha. *The EMBO journal* **20**, 6805-6815, doi:10.1093/emboj/20.23.6805 (2001).
- 262 Harhaj, E. W. & Sun, S. C. IKKgamma serves as a docking subunit of the IkappaB kinase (IKK) and mediates interaction of IKK with the human T-cell leukemia virus Tax protein. *The Journal of biological chemistry* **274**, 22911-22914 (1999).
- 263 Jin, D. Y., Giordano, V., Kibler, K. V., Nakano, H. & Jeang, K. T. Role of adapter function in oncoprotein-mediated activation of NF-kappaB. Human T-cell leukemia virus type I Tax interacts directly with IkappaB kinase gamma. *The Journal of biological chemistry* **274**, 17402-17405 (1999).
- 264 Yin, M. J. *et al.* HTLV-I Tax protein binds to MEKK1 to stimulate IkappaB kinase activity and NF-kappaB activation. *Cell* **93**, 875-884 (1998).
- 265 Wu, X. & Sun, S. C. Retroviral oncoprotein Tax deregulates NF-kappaB by activating Tak1 and mediating the physical association of Tak1-IKK. *EMBO reports* **8**, 510-515, doi:10.1038/sj.embor.7400931 (2007).
- 266 Chu, Z. L., DiDonato, J. A., Hawiger, J. & Ballard, D. W. The tax oncoprotein of human T-cell leukemia virus type 1 associates with and persistently activates IkappaB kinases containing IKKalpha and IKKbeta. *The Journal of biological chemistry* **273**, 15891-15894 (1998).
- 267 Hirai, H., Suzuki, T., Fujisawa, J., Inoue, J. & Yoshida, M. Tax protein of human T-cell leukemia virus type I binds to the ankyrin motifs of inhibitory factor kappa B and induces nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B proteins for transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 3584-3588 (1994).
- 268 Suzuki, T., Hirai, H., Murakami, T. & Yoshida, M. Tax protein of HTLV-1 destabilizes the complexes of NF-kappa B and I kappa B-alpha and induces nuclear translocation of NF-kappa B for transcriptional activation. *Oncogene* **10**, 1199-1207 (1995).

- 269 Rousset, R., Desbois, C., Bantignies, F. & Jalinot, P. Effects on NF-kappa B1/p105 processing of the interaction between the HTLV-1 transactivator Tax and the proteasome. *Nature* **381**, 328-331, doi:10.1038/381328a0 (1996).
- 270 Fu, D. X., Kuo, Y. L., Liu, B. Y., Jeang, K. T. & Giam, C. Z. Human T-lymphotropic virus type I tax activates I-kappa B kinase by inhibiting I-kappa B kinase-associated serine/threonine protein phosphatase 2A. *The Journal of biological chemistry* **278**, 1487-1493, doi:10.1074/jbc.M210631200 (2003).
- 271 Hong, S. *et al.* Heptad repeats regulate protein phosphatase 2a recruitment to I-kappaB kinase gamma/NF-kappaB essential modulator and are targeted by human T-lymphotropic virus type 1 tax. *The Journal of biological chemistry* **282**, 12119-12126, doi:10.1074/jbc.M610392200 (2007).
- 272 Shembade, N., Harhaj, N. S., Yamamoto, M., Akira, S. & Harhaj, E. W. The human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein requires the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 for NF-kappaB activation. *Journal of virology* **81**, 13735-13742, doi:10.1128/JVI.01790-07 (2007).
- 273 Shembade, N. *et al.* The E3 ligase Itch negatively regulates inflammatory signaling pathways by controlling the function of the ubiquitin-editing enzyme A20. *Nature immunology* **9**, 254-262, doi:10.1038/ni1563 (2008).
- 274 Gohda, J. *et al.* HTLV-1 Tax-induced NFkappaB activation is independent of Lys-63-linked-type polyubiquitination. *Biochemical and biophysical research communications* **357**, 225-230, doi:10.1016/j.bbrc.2007.03.125 (2007).
- 275 Suzuki, S. *et al.* Constitutive activation of TAK1 by HTLV-1 tax-dependent overexpression of TAB2 induces activation of JNK-ATF2 but not IKK-NF-kappaB. *The Journal of biological chemistry* **282**, 25177-25181, doi:10.1074/jbc.C700065200 (2007).
- 276 Yu, Q. *et al.* HTLV-1 Tax-mediated TAK1 activation involves TAB2 adapter protein. *Biochemical and biophysical research communications* **365**, 189-194, doi:10.1016/j.bbrc.2007.10.172 (2008).
- 277 Jin, D. Y. *et al.* A human suppressor of c-Jun N-terminal kinase 1 activation by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of biological chemistry* **272**, 25816-25823 (1997).
- 278 Twizere, J. C. *et al.* Human T-cell leukemia virus type-1 Tax oncoprotein regulates G-protein signaling. *Blood* **109**, 1051-1060, doi:10.1182/blood-2006-06-026781 (2007).
- 279 Reddy, T. R. *et al.* Specific interaction of HTLV tax protein and a human type IV neuronal intermediate filament protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 702-707 (1998).
- 280 Trihn, D., Jeang, K. T. & Semmes, O. J. HTLV-I Tax and Cytokeratin: Tax-Expressing Cells Show Morphological Changes in Keratin-Containing Cytoskeletal Networks. *Journal of biomedical science* **4**, 47-53 (1997).
- 281 Zhang, X., Jin, B. & Huang, C. The PI3K/Akt pathway and its downstream transcriptional factors as targets for chemoprevention. *Current cancer drug targets* **7**, 305-316 (2007).
- 282 Ueki, K. *et al.* Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cell signaling and survival. *Molecular and cellular biology* **22**, 965-977 (2002).
- 283 Peloponese, J. M., Jr. & Jeang, K. T. Role for Akt/protein kinase B and activator protein-1 in cellular proliferation induced by the human T-cell leukemia virus type 1 tax oncoprotein. *The Journal of biological chemistry* **281**, 8927-8938, doi:10.1074/jbc.M510598200 (2006).
- 284 Arnulf, B. *et al.* Human T-cell lymphotropic virus oncoprotein Tax represses TGF-beta 1 signaling in human T cells via c-Jun activation: a potential mechanism of HTLV-I leukemogenesis. *Blood* **100**, 4129-4138, doi:10.1182/blood-2001-12-0372 (2002).
- 285 Mori, N. *et al.* Human T-cell leukemia virus type I oncoprotein Tax represses Smad-dependent transforming growth factor beta signaling through interaction with CREB-binding protein/p300. *Blood* **97**, 2137-2144 (2001).
- 286 Lee, D. K., Kim, B. C., Brady, J. N., Jeang, K. T. & Kim, S. J. Human T-cell lymphotropic virus type 1 tax inhibits transforming growth factor-beta signaling by blocking the association of Smad proteins with Smad-binding element. *The Journal of biological chemistry* **277**, 33766-33775, doi:10.1074/jbc.M200150200 (2002).

- 287 Iwata, S. *et al.* HTLV-I Tax induces and associates with Crk-associated substrate lymphocyte
type (Cas-L). *Oncogene* **24**, 1262-1271, doi:10.1038/sj.onc.1208261 (2005).
- 288 Harper, J. V. & Brooks, G. The mammalian cell cycle: an overview. *Methods in molecular
biology* **296**, 113-153 (2005).
- 289 Jeang, K. T., Giam, C. Z., Majone, F. & Aboud, M. Life, death, and tax: role of HTLV-I
oncoprotein in genetic instability and cellular transformation. *The Journal of biological
chemistry* **279**, 31991-31994, doi:10.1074/jbc.R400009200 (2004).
- 290 Marriott, S. J. & Semmes, O. J. Impact of HTLV-I Tax on cell cycle progression and the
cellular DNA damage repair response. *Oncogene* **24**, 5986-5995, doi:10.1038/sj.onc.1208976
(2005).
- 291 Haller, K. *et al.* Physical interaction of human T-cell leukemia virus type 1 Tax with cyclin-
dependent kinase 4 stimulates the phosphorylation of retinoblastoma protein. *Molecular and
cellular biology* **22**, 3327-3338 (2002).
- 292 Neuveut, C. *et al.* Human T-cell leukemia virus type 1 Tax and cell cycle progression: role of
cyclin D-cdk and p110Rb. *Molecular and cellular biology* **18**, 3620-3632 (1998).
- 293 Suzuki, T., Kitao, S., Matsushime, H. & Yoshida, M. HTLV-1 Tax protein interacts with
cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4A and counteracts its inhibitory activity towards
CDK4. *The EMBO journal* **15**, 1607-1614 (1996).
- 294 Suzuki, T., Narita, T., Uchida-Toita, M. & Yoshida, M. Down-regulation of the INK4 family
of cyclin-dependent kinase inhibitors by tax protein of HTLV-1 through two distinct
mechanisms. *Virology* **259**, 384-391, doi:10.1006/viro.1999.9760 (1999).
- 295 Kehn, K. *et al.* The HTLV-I Tax oncoprotein targets the retinoblastoma protein for
proteasomal degradation. *Oncogene* **24**, 525-540, doi:10.1038/sj.onc.1208105 (2005).
- 296 Zhou, B. B. & Elledge, S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective.
Nature **408**, 433-439, doi:10.1038/35044005 (2000).
- 297 Suzuki, T., Uchida-Toita, M., Andoh, T. & Yoshida, M. HTLV-1 tax oncoprotein binds to
DNA topoisomerase I and inhibits its catalytic activity. *Virology* **270**, 291-298,
doi:10.1006/viro.2000.0266 (2000).
- 298 Branzei, D. & Foiani, M. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature reviews.
Molecular cell biology* **9**, 297-308, doi:10.1038/nrm2351 (2008).
- 299 Haoudi, A., Daniels, R. C., Wong, E., Kupfer, G. & Semmes, O. J. Human T-cell leukemia
virus-I tax oncoprotein functionally targets a subnuclear complex involved in cellular DNA
damage-response. *The Journal of biological chemistry* **278**, 37736-37744,
doi:10.1074/jbc.M301649200 (2003).
- 300 Liang, M. H., Geisbert, T., Yao, Y., Hinrichs, S. H. & Giam, C. Z. Human T-lymphotropic
virus type 1 oncoprotein tax promotes S-phase entry but blocks mitosis. *Journal of virology*
76, 4022-4033 (2002).
- 301 Marriott, S. J., Lemoine, F. J. & Jeang, K. T. Damaged DNA and miscounted chromosomes:
human T cell leukemia virus type I tax oncoprotein and genetic lesions in transformed cells.
Journal of biomedical science **9**, 292-298, doi:64998 (2002).
- 302 Peloponese, J. M., Jr., Haller, K., Miyazato, A. & Jeang, K. T. Abnormal centrosome
amplification in cells through the targeting of Ran-binding protein-1 by the human T cell
leukemia virus type-1 Tax oncoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of
the United States of America* **102**, 18974-18979, doi:10.1073/pnas.0506659103 (2005).
- 303 Ching, Y. P., Chan, S. F., Jeang, K. T. & Jin, D. Y. The retroviral oncoprotein Tax targets the
coiled-coil centrosomal protein TAX1BP2 to induce centrosome overduplication. *Nature cell
biology* **8**, 717-724, doi:10.1038/ncb1432 (2006).
- 304 Wong, C. & Stearns, T. Centrosome number is controlled by a centrosome-intrinsic block to
reduplication. *Nature cell biology* **5**, 539-544, doi:10.1038/ncb993 (2003).
- 305 Pumfery, A., de la Fuente, C. & Kashanchi, F. HTLV-1 Tax: centrosome amplification and
cancer. *Retrovirology* **3**, 50, doi:10.1186/1742-4690-3-50 (2006).
- 306 Kuo, Y. L. & Giam, C. Z. Activation of the anaphase promoting complex by HTLV-1 tax
leads to senescence. *The EMBO journal* **25**, 1741-1752, doi:10.1038/sj.emboj.7601054
(2006).

- 307 Merling, R. *et al.* HTLV-1 Tax mutants that do not induce G1 arrest are disabled in activating
the anaphase promoting complex. *Retrovirology* **4**, 35, doi:10.1186/1742-4690-4-35 (2007).
- 308 Jain, P. *et al.* Identification of human T cell leukemia virus type 1 tax amino acid signals and
cellular factors involved in secretion of the viral oncoprotein. *The Journal of biological
chemistry* **282**, 34581-34593, doi:10.1074/jbc.M707317200 (2007).
- 309 Boxus, M. *et al.* The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology* **5**, 76, doi:10.1186/1742-4690-
5-76 (2008).
- 310 Simonis, N. *et al.* Host-pathogen interactome mapping for HTLV-1 and -2 retroviruses.
Retrovirology **9**, 26, doi:10.1186/1742-4690-9-26 (2012).
- 311 Vandermeulen, C., Hajingabo, L.-J. & Twizere, J.-C. Comparative Interactome of HIV-1 Tat
and Human T Lymphotropic Virus Type-1 Tax and the Cellular Transcriptional Machinery.
(2017).
- 312 Gould, C. M. *et al.* ELM: the status of the 2010 eukaryotic linear motif resource. *Nucleic
Acids Res* **38**, D167-180, doi:10.1093/nar/gkp1016 (2010).
- 313 Rousset, R., Fabre, S., Desbois, C., Bantignies, F. & Jalinot, P. The C-terminus of the HTLV-
1 Tax oncoprotein mediates interaction with the PDZ domain of cellular proteins. *Oncogene*
16, 643-654, doi:10.1038/sj.onc.1201567 (1998).
- 314 Ohashi, M. *et al.* Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein induces and interacts
with a multi-PDZ domain protein, MAGI-3. *Virology* **320**, 52-62,
doi:10.1016/j.virol.2003.11.014 (2004).
- 315 Arpin-Andre, C. & Mesnard, J. M. The PDZ domain-binding motif of the human T cell
leukemia virus type 1 tax protein induces mislocalization of the tumor suppressor hScrib in T
cells. *J Biol Chem* **282**, 33132-33141, doi:10.1074/jbc.M702279200 (2007).
- 316 Hirata, A. *et al.* PDZ domain-binding motif of human T-cell leukemia virus type 1 Tax
oncoprotein augments the transforming activity in a rat fibroblast cell line. *Virology* **318**, 327-
336, doi:10.1016/j.virol.2003.10.006 (2004).
- 317 Ishidate, T., Matsumine, A., Toyoshima, K. & Akiyama, T. The APC-hDLG complex
negatively regulates cell cycle progression from the G0/G1 to S phase. *Oncogene* **19**, 365-372,
doi:10.1038/sj.onc.1203309 (2000).
- 318 Senda, T., Shimomura, A. & Iizuka-Kogo, A. Adenomatous polyposis coli (Apc) tumor
suppressor gene as a multifunctional gene. *Anatomical science international* **80**, 121-131,
doi:10.1111/j.1447-073x.2005.00106.x (2005).
- 319 Suzuki, T., Ohsugi, Y., Uchida-Toita, M., Akiyama, T. & Yoshida, M. 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**, 5967-5972,
doi:10.1038/sj.onc.1203008 (1999).
- 320 Aoyagi, T. *et al.* 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**, 193-199, doi:10.1007/s11262-009-0447-x (2010).
- 321 Javier, R. T. & Rice, A. P. Emerging theme: cellular PDZ proteins as common targets of
pathogenic viruses. *J Virol* **85**, 11544-11556, doi:10.1128/JVI.05410-11 (2011).
- 322 Mee, C. J. *et al.* Hepatitis C virus infection reduces hepatocellular polarity in a vascular
endothelial growth factor-dependent manner. *Gastroenterology* **138**, 1134-1142,
doi:10.1053/j.gastro.2009.11.047 (2010).
- 323 Awad, A. *et al.* SHIP2 regulates epithelial cell polarity through its lipid product, which binds
to Dlg1, a pathway subverted by hepatitis C virus core protein. *Molecular biology of the cell*
24, 2171-2185, doi:10.1091/mbc.E12-08-0626 (2013).
- 324 Li, S., Yu, X., Guo, Y. & Kong, L. Interaction networks of hepatitis C virus NS4B:
implications for antiviral therapy. *Cellular microbiology* **14**, 994-1002, doi:10.1111/j.1462-
5822.2012.01773.x (2012).
- 325 Hirakawa, T., Galet, C., Kishi, M. & Ascoli, M. GIPC binds to the human lutropin receptor
(hLHR) through an unusual PDZ domain binding motif, and it regulates the sorting of the
internalized human choriogonadotropin and the density of cell surface hLHR. *The Journal of
biological chemistry* **278**, 49348-49357, doi:10.1074/jbc.M306557200 (2003).

- 326 Sun, F., Xiao, Y. & Qu, Z. Oncovirus Kaposi sarcoma herpesvirus (KSHV) represses tumor suppressor PDLIM2 to persistently activate nuclear factor kappaB (NF-kappaB) and STAT3 transcription factors for tumorigenesis and tumor maintenance. *The Journal of biological chemistry* **290**, 7362-7368, doi:10.1074/jbc.C115.637918 (2015).
- 327 Henning, M. S., Morham, S. G., Goff, S. P. & Naghavi, M. H. PDZD8 is a novel Gag-interacting factor that promotes retroviral infection. *Journal of virology* **84**, 8990-8995, doi:10.1128/JVI.00843-10 (2010).
- 328 Guth, C. A. & Sodroski, J. Contribution of PDZD8 to stabilization of the human immunodeficiency virus type 1 capsid. *Journal of virology* **88**, 4612-4623, doi:10.1128/JVI.02945-13 (2014).
- 329 Valenzuela-Fernandez, A. *et al.* Histone deacetylase 6 regulates human immunodeficiency virus type 1 infection. *Molecular biology of the cell* **16**, 5445-5454, doi:10.1091/mbc.E05-04-0354 (2005).
- 330 Javier, R., Raska, K., Jr., Macdonald, G. J. & Shenk, T. Human adenovirus type 9-induced rat mammary tumors. *Journal of virology* **65**, 3192-3202 (1991).
- 331 Javier, R., Raska, K., Jr. & Shenk, T. Requirement for the adenovirus type 9 E4 region in production of mammary tumors. *Science* **257**, 1267-1271 (1992).
- 332 Glaunsinger, B. A., Lee, S. S., Thomas, M., Banks, L. & Javier, R. Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. *Oncogene* **19**, 5270-5280, doi:10.1038/sj.onc.1203906 (2000).
- 333 Glaunsinger, B. A., Weiss, R. S., Lee, S. S. & Javier, R. Link of the unique oncogenic properties of adenovirus type 9 E4-ORF1 to a select interaction with the candidate tumor suppressor protein ZO-2. *The EMBO journal* **20**, 5578-5586, doi:10.1093/emboj/20.20.5578 (2001).
- 334 Lee, S. S., Glaunsinger, B., Mantovani, F., Banks, L. & Javier, R. T. Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *Journal of virology* **74**, 9680-9693 (2000).
- 335 Latorre, I. J. *et al.* Viral oncoprotein-induced mislocalization of select PDZ proteins disrupts tight junctions and causes polarity defects in epithelial cells. *Journal of cell science* **118**, 4283-4293, doi:10.1242/jcs.02560 (2005).
- 336 Prehaud, C. *et al.* Attenuation of rabies virulence: takeover by the cytoplasmic domain of its envelope protein. *Sci Signal* **3**, ra5, doi:10.1126/scisignal.2000510 (2010).
- 337 Mansfield, K. L. *et al.* Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis. *J Gen Virol* **90**, 1781-1794, doi:10.1099/vir.0.011437-0 (2009).
- 338 Werme, K., Wigerius, M. & Johansson, M. Tick-borne encephalitis virus NS5 associates with membrane protein scribble and impairs interferon-stimulated JAK-STAT signalling. *Cell Microbiol* **10**, 696-712, doi:10.1111/j.1462-5822.2007.01076.x (2008).
- 339 Ellencrona, K., Syed, A. & Johansson, M. Flavivirus NS5 associates with host-cell proteins zonula occludens-1 (ZO-1) and regulating synaptic membrane exocytosis-2 (RIMS2) via an internal PDZ binding mechanism. *Biol Chem* **390**, 319-323, doi:10.1515/BC.2009.041 (2009).
- 340 Teoh, K. T. *et al.* The SARS coronavirus E protein interacts with PALS1 and alters tight junction formation and epithelial morphogenesis. *Mol Biol Cell* **21**, 3838-3852, doi:10.1091/mbc.E10-04-0338 (2010).
- 341 Ponting, C. P., Phillips, C., Davies, K. E. & Blake, D. J. PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **19**, 469-479, doi:10.1002/bies.950190606 (1997).
- 342 Ponting, C. P. Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein science : a publication of the Protein Society* **6**, 464-468, doi:10.1002/pro.5560060225 (1997).
- 343 Audebert, S. *et al.* Mammalian Scribble forms a tight complex with the betaPIX exchange factor. *Current biology : CB* **14**, 987-995, doi:10.1016/j.cub.2004.05.051 (2004).
- 344 Thomas, M., Dasgupta, J., Zhang, Y., Chen, X. & Banks, L. Analysis of specificity determinants in the interactions of different HPV E6 proteins with their PDZ domain-containing substrates. *Virology* **376**, 371-378, doi:10.1016/j.virol.2008.03.021 (2008).
- 345 Gardoni, F. *et al.* CaMKII-dependent phosphorylation regulates SAP97/NR2A interaction. *The Journal of biological chemistry* **278**, 44745-44752, doi:10.1074/jbc.M303576200 (2003).

- 346 Kranjec, C. & Banks, L. A systematic analysis of human papillomavirus (HPV) E6 PDZ substrates identifies MAGI-1 as a major target of HPV type 16 (HPV-16) and HPV-18 whose loss accompanies disruption of tight junctions. *Journal of virology* **85**, 1757-1764, doi:10.1128/JVI.01756-10 (2011).
- 347 Erlendsson, S. & Madsen, K. L. Membrane Binding and Modulation of the PDZ Domain of PICK1. *Membranes* **5**, 597-615, doi:10.3390/membranes5040597 (2015).
- 348 Tonikian, R. *et al.* A specificity map for the PDZ domain family. *PLoS biology* **6**, e239, doi:10.1371/journal.pbio.0060239 (2008).
- 349 Tomaic, V. *et al.* Human and primate tumour viruses use PDZ binding as an evolutionarily conserved mechanism of targeting cell polarity regulators. *Oncogene* **28**, 1-8, doi:10.1038/onc.2008.365 (2009).
- 350 Aranda, V., Nolan, M. E. & Muthuswamy, S. K. Par complex in cancer: a regulator of normal cell polarity joins the dark side. *Oncogene* **27**, 6878-6887, doi:10.1038/onc.2008.340 (2008).
- 351 Kim, D. Y. & Kim, K. K. Structure and function of HtrA family proteins, the key players in protein quality control. *J Biochem Mol Biol* **38**, 266-274 (2005).
- 352 Runyon, S. T. *et al.* Structural and functional analysis of the PDZ domains of human HtrA1 and HtrA3. *Protein Sci* **16**, 2454-2471, doi:10.1110/ps.073049407 (2007).
- 353 Petit, C. M., Zhang, J., Sapienza, P. J., Fuentes, E. J. & Lee, A. L. Hidden dynamic allostery in a PDZ domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 18249-18254, doi:10.1073/pnas.0904492106 (2009).
- 354 Lee, H. J., Wang, N. X., Shi, D. L. & Zheng, J. J. Sulindac inhibits canonical Wnt signaling by blocking the PDZ domain of the protein Dishevelled. *Angew Chem Int Ed Engl* **48**, 6448-6452, doi:10.1002/anie.200902981 (2009).
- 355 Wong, H. C. *et al.* Direct binding of the PDZ domain of Dishevelled to a conserved internal sequence in the C-terminal region of Frizzled. *Mol Cell* **12**, 1251-1260 (2003).
- 356 Im, Y. J. *et al.* Crystal structure of the Shank PDZ-ligand complex reveals a class I PDZ interaction and a novel PDZ-PDZ dimerization. *J Biol Chem* **278**, 48099-48104, doi:10.1074/jbc.M306919200 (2003).
- 357 Im, Y. J. *et al.* Crystal structure of GRIP1 PDZ6-peptide complex reveals the structural basis for class II PDZ target recognition and PDZ domain-mediated multimerization. *J Biol Chem* **278**, 8501-8507, doi:10.1074/jbc.M212263200 (2003).
- 358 Utepergenov, D. I., Fanning, A. S. & Anderson, J. M. Dimerization of the scaffolding protein ZO-1 through the second PDZ domain. *J Biol Chem* **281**, 24671-24677, doi:10.1074/jbc.M512820200 (2006).
- 359 Wu, J. *et al.* Domain-swapped dimerization of the second PDZ domain of ZO2 may provide a structural basis for the polymerization of claudins. *J Biol Chem* **282**, 35988-35999, doi:10.1074/jbc.M703826200 (2007).
- 360 Fanning, A. S., Lye, M. F., Anderson, J. M. & Lavie, A. Domain swapping within PDZ2 is responsible for dimerization of ZO proteins. *J Biol Chem* **282**, 37710-37716, doi:10.1074/jbc.M707255200 (2007).
- 361 Chen, J., Pan, L., Wei, Z., Zhao, Y. & Zhang, M. Domain-swapped dimerization of ZO-1 PDZ2 generates specific and regulatory connexin43-binding sites. *EMBO J* **27**, 2113-2123, doi:10.1038/emboj.2008.138 (2008).
- 362 Long, J. *et al.* Supramodular nature of GRIP1 revealed by the structure of its PDZ12 tandem in complex with the carboxyl tail of Fras1. *J Mol Biol* **375**, 1457-1468, doi:10.1016/j.jmb.2007.11.088 (2008).
- 363 Feng, W., Shi, Y., Li, M. & Zhang, M. Tandem PDZ repeats in glutamate receptor-interacting proteins have a novel mode of PDZ domain-mediated target binding. *Nat Struct Biol* **10**, 972-978, doi:10.1038/nsb992 (2003).
- 364 Long, J. F. *et al.* Supramodular structure and synergistic target binding of the N-terminal tandem PDZ domains of PSD-95. *J Mol Biol* **327**, 203-214 (2003).
- 365 Kang, B. S. *et al.* PDZ tandem of human syntenin: crystal structure and functional properties. *Structure* **11**, 459-468 (2003).
- 366 Grembecka, J. *et al.* The binding of the PDZ tandem of syntenin to target proteins. *Biochemistry* **45**, 3674-3683, doi:10.1021/bi052225y (2006).

- 367 Long, J. F. *et al.* Autoinhibition of X11/Mint scaffold proteins revealed by the closed
conformation of the PDZ tandem. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 722-728, doi:10.1038/nsmb958
(2005).
- 368 Dong, H. *et al.* GRIP: a synaptic PDZ domain-containing protein that interacts with AMPA
receptors. *Nature* **386**, 279-284, doi:10.1038/386279a0 (1997).
- 369 Feng, W. & Zhang, M. Organization and dynamics of PDZ-domain-related supramodules in
the postsynaptic density. *Nat Rev Neurosci* **10**, 87-99, doi:10.1038/nrn2540 (2009).
- 370 Lee, H. J. & Zheng, J. J. PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and
modification. *Cell Commun Signal* **8**, 8, doi:10.1186/1478-811X-8-8 (2010).
- 371 Kiyono, T. *et al.* Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human
homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proceedings of the
National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 11612-11616 (1997).
- 372 Humbert, P. O. *et al.* Control of tumourigenesis by the Scribble/Dlg/Lgl polarity module.
Oncogene **27**, 6888-6907, doi:10.1038/onc.2008.341 (2008).
- 373 Doyle, D. A. *et al.* Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-
binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell* **85**, 1067-1076 (1996).
- 374 Hung, A. Y. & Sheng, M. PDZ domains: structural modules for protein complex assembly.
The Journal of biological chemistry **277**, 5699-5702, doi:10.1074/jbc.R100065200 (2002).
- 375 Songyang, Z. *et al.* Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains.
Science **275**, 73-77 (1997).
- 376 Stricker, N. L. *et al.* PDZ domain of neuronal nitric oxide synthase recognizes novel C-
terminal peptide sequences. *Nature biotechnology* **15**, 336-342, doi:10.1038/nbt0497-336
(1997).
- 377 van Ham, M. & Hendriks, W. PDZ domains-glue and guide. *Molecular biology reports* **30**,
69-82 (2003).
- 378 Zhang, M. & Wang, W. Organization of signaling complexes by PDZ-domain scaffold
proteins. *Accounts of chemical research* **36**, 530-538, doi:10.1021/ar020210b (2003).
- 379 Sheng, M. & Sala, C. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes.
Annual review of neuroscience **24**, 1-29, doi:10.1146/annurev.neuro.24.1.1 (2001).
- 380 Tochio, H. *et al.* Formation of nNOS/PSD-95 PDZ dimer requires a preformed beta-finger
structure from the nNOS PDZ domain. *Journal of molecular biology* **303**, 359-370,
doi:10.1006/jmbi.2000.4148 (2000).
- 381 Hillier, B. J., Christopherson, K. S., Prehoda, K. E., Brecht, D. S. & Lim, W. A. Unexpected
modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex.
Science **284**, 812-815 (1999).
- 382 Brenman, J. E., Christopherson, K. S., Craven, S. E., McGee, A. W. & Brecht, D. S. Cloning
and characterization of postsynaptic density 93, a nitric oxide synthase interacting protein. *The
Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **16**, 7407-7415
(1996).
- 383 Schepens, J., Cuppen, E., Wieringa, B. & Hendriks, W. The neuronal nitric oxide synthase
PDZ motif binds to -G(D,E)XV* carboxyterminal sequences. *FEBS letters* **409**, 53-56 (1997).
- 384 Lenfant, N. *et al.* A genome-wide study of PDZ-domain interactions in *C. elegans* reveals a
high frequency of non-canonical binding. *BMC genomics* **11**, 671, doi:10.1186/1471-2164-11-
671 (2010).
- 385 Schultz, J. *et al.* Specific interactions between the syntrophin PDZ domain and voltage-gated
sodium channels. *Nature structural biology* **5**, 19-24 (1998).
- 386 Grootjans, J. J., Reekmans, G., Ceulemans, H. & David, G. Syntenin-syndecan binding
requires syndecan-synteny and the co-operation of both PDZ domains of syntenin. *The
Journal of biological chemistry* **275**, 19933-19941, doi:10.1074/jbc.M002459200 (2000).
- 387 Daniels, D. L., Cohen, A. R., Anderson, J. M. & Brunger, A. T. Crystal structure of the
hCASK PDZ domain reveals the structural basis of class II PDZ domain target recognition.
Nature structural biology **5**, 317-325 (1998).
- 388 Zimmermann, P. *et al.* Characterization of syntenin, a syndecan-binding PDZ protein, as a
component of cell adhesion sites and microfilaments. *Molecular biology of the cell* **12**, 339-
350 (2001).

- 389 Javier, R. T. Cell polarity proteins: common targets for tumorigenic human viruses. *Oncogene* **27**, 7031-7046, doi:10.1038/onc.2008.352 (2008).
- 390 Pearson, H. B. *et al.* SCRIB expression is deregulated in human prostate cancer, and its deficiency in mice promotes prostate neoplasia. *The Journal of clinical investigation* **121**, 4257-4267, doi:10.1172/JCI58509 (2011).
- 391 Zhan, L. *et al.* Deregulation of scribble promotes mammary tumorigenesis and reveals a role for cell polarity in carcinoma. *Cell* **135**, 865-878, doi:10.1016/j.cell.2008.09.045 (2008).
- 392 DeMali, K. A. & Burridge, K. Coupling membrane protrusion and cell adhesion. *Journal of cell science* **116**, 2389-2397, doi:10.1242/jcs.00605 (2003).
- 393 Nobes, C. D. & Hall, A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *The Journal of cell biology* **144**, 1235-1244 (1999).
- 394 Garcia-Mata, R. & Burridge, K. Catching a GEF by its tail. *Trends in cell biology* **17**, 36-43, doi:10.1016/j.tcb.2006.11.004 (2007).
- 395 Subbiah, V. K., Kranjec, C., Thomas, M. & Banks, L. PDZ domains: the building blocks regulating tumorigenesis. *The Biochemical journal* **439**, 195-205, doi:10.1042/BJ20110903 (2011).
- 396 Dev, K. K. Making protein interactions druggable: targeting PDZ domains. *Nature reviews. Drug discovery* **3**, 1047-1056, doi:10.1038/nrd1578 (2004).
- 397 Houslay, M. D. Disrupting specific PDZ domain-mediated interactions for therapeutic benefit. *British journal of pharmacology* **158**, 483-485, doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00359.x (2009).
- 398 Tian, Y. S., Kawashita, N., Arai, Y., Okamoto, K. & Takagi, T. Pharmacophore Modeling and Molecular Docking Studies of potential inhibitors to E6 PBM-PDZ from Human Papilloma Virus (HPV). *Bioinformatics* **11**, 401-406, doi:10.6026/97320630011401 (2015).
- 399 Florio, S. K. *et al.* Disruption of nNOS-PSD95 protein-protein interaction inhibits acute thermal hyperalgesia and chronic mechanical allodynia in rodents. *British journal of pharmacology* **158**, 494-506, doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00300.x (2009).
- 400 Grandy, D. *et al.* Discovery and characterization of a small molecule inhibitor of the PDZ domain of dishevelled. *The Journal of biological chemistry* **284**, 16256-16263, doi:10.1074/jbc.M109.009647 (2009).
- 401 Graves, P. R. & Haystead, T. A. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 39-63; table of contents (2002).
- 402 Uetz, P., Titz, B. & Cagney, G. Experimental Methods for Protein Interaction Identification and Characterization. *Protein-protein Interactions and Networks* **9** (2008).
- 403 Huang, D. W. *et al.* The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists. *Genome biology* **8**, R183, doi:10.1186/gb-2007-8-9-r183 (2007).
- 404 Khatri, P. & Draghici, S. Ontological analysis of gene expression data: current tools, limitations, and open problems. *Bioinformatics* **21**, 3587-3595, doi:10.1093/bioinformatics/bti565 (2005).
- 405 De Las Rivas, J. & Fontanillo, C. Protein-protein interactions essentials: key concepts to building and analyzing interactome networks. *PLoS computational biology* **6**, e1000807, doi:10.1371/journal.pcbi.1000807 (2010).
- 406 Higuchi, M. & Fujii, M. Distinct functions of HTLV-1 Tax1 from HTLV-2 Tax2 contribute key roles to viral pathogenesis. *Retrovirology* **6**, 117, doi:10.1186/1742-4690-6-117 (2009).
- 407 Calattini, S. *et al.* Human T-cell lymphotropic virus type 3: complete nucleotide sequence and characterization of the human tax3 protein. *Journal of virology* **80**, 9876-9888, doi:10.1128/JVI.00799-06 (2006).
- 408 Chevalier, S. A. *et al.* 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**, 4470-4482, doi:10.1038/sj.onc.1209472 (2006).
- 409 Sheehy, N. *et al.* Functional analysis of human T lymphotropic virus type 2 Tax proteins. *Retrovirology* **3**, 20, doi:10.1186/1742-4690-3-20 (2006).
- 410 Turci, M., Romanelli, M. G., Lorenzi, P., Righi, P. & Bertazzoni, U. Localization of human T-cell lymphotropic virus type II Tax protein is dependent upon a nuclear localization

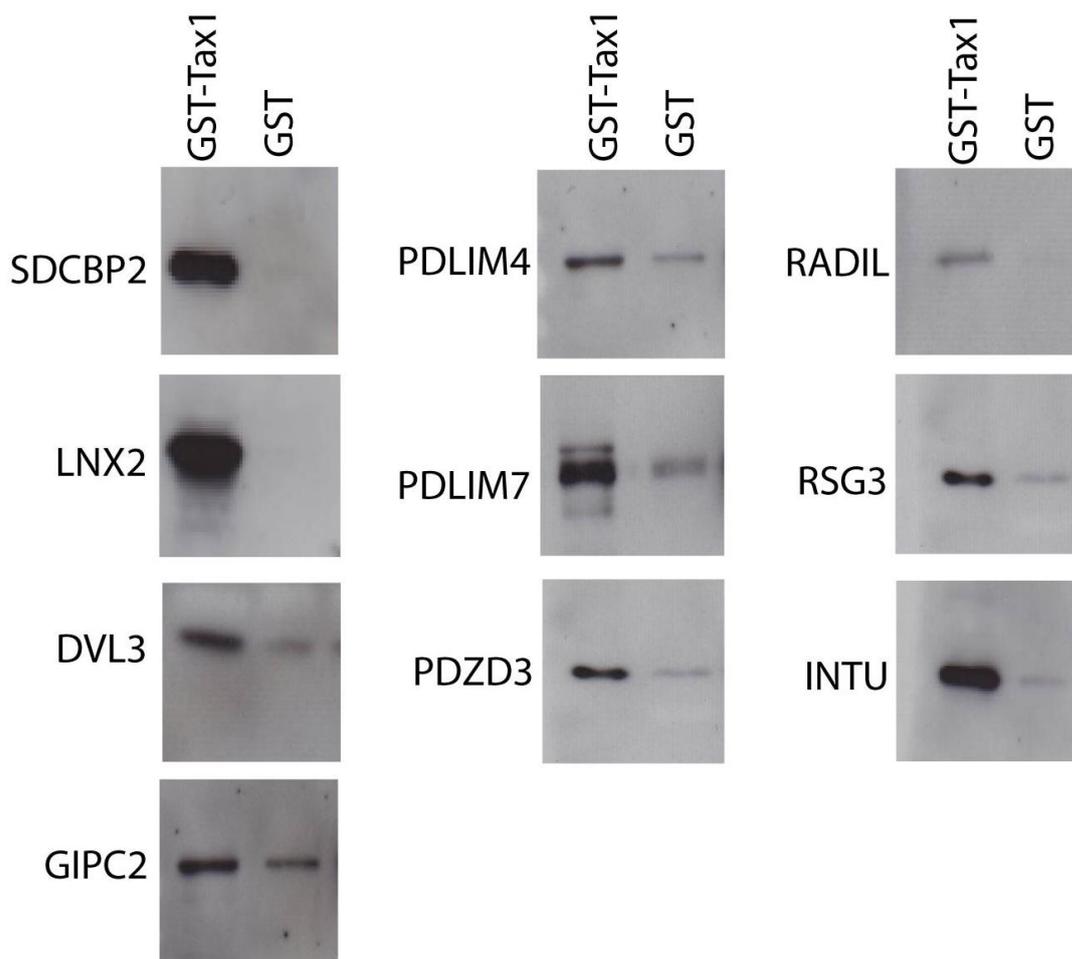
- determinant in the N-terminal region. *Gene* **365**, 119-124, doi:10.1016/j.gene.2005.09.043 (2006).
- 411 Shimotohno, K. *et al.* Complete nucleotide sequence of an infectious clone of human T-cell
leukemia virus type II: an open reading frame for the protease gene. *Proceedings of the*
National Academy of Sciences of the United States of America **82**, 3101-3105 (1985).
- 412 Scoggin, K. E., Ulloa, A. & Nyborg, J. K. The oncoprotein Tax binds the SRC-1-interacting
domain of CBP/p300 to mediate transcriptional activation. *Molecular and cellular biology* **21**,
5520-5530, doi:10.1128/MCB.21.16.5520-5530.2001 (2001).
- 413 Turci, M. *et al.* Ubiquitination and sumoylation of the HTLV-2 Tax-2B protein regulate its
NF-kappaB activity: a comparative study with the HTLV-1 Tax-1 protein. *Retrovirology* **9**,
102, doi:10.1186/1742-4690-9-102 (2012).
- 414 Kfoury, A. G. *et al.* Impact of repetitive episodes of antibody-mediated or cellular rejection on
cardiovascular mortality in cardiac transplant recipients: defining rejection patterns. *The*
Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society
for Heart Transplantation **25**, 1277-1282, doi:10.1016/j.healun.2006.08.009 (2006).
- 415 Nasr, R. *et al.* Tax ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear
steps of NF-kappaB activation. *Blood* **107**, 4021-4029, doi:10.1182/blood-2005-09-3572
(2006).
- 416 Turci, M. *et al.* HTLV-2B Tax oncoprotein is modified by ubiquitination and sumoylation and
displays intracellular localization similar to its homologue HTLV-1 Tax. *Virology* **386**, 6-11,
doi:10.1016/j.virol.2009.01.003 (2009).
- 417 Bonnet, A. *et al.* Low nuclear body formation and tax SUMOylation do not prevent NF-
kappaB promoter activation. *Retrovirology* **9**, 77, doi:10.1186/1742-4690-9-77 (2012).
- 418 Xiao, G. NF-kappaB activation: Tax sumoylation is out, but what about Tax ubiquitination?
Retrovirology **9**, 78, doi:10.1186/1742-4690-9-78 (2012).
- 419 Zane, L. & Jeang, K. T. The importance of ubiquitination and sumoylation on the
transforming activity of HTLV Tax-1 and Tax-2. *Retrovirology* **9**, 103, doi:10.1186/1742-
4690-9-103 (2012).
- 420 Tsubata, C. *et al.* 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, doi:10.1186/1742-4690-2-46 (2005).
- 421 Xie, L., Yamamoto, B., Haoudi, A., Semmes, O. J. & Green, P. L. PDZ binding motif of
HTLV-1 Tax promotes virus-mediated T-cell proliferation in vitro and persistence in vivo.
Blood **107**, 1980-1988, doi:10.1182/blood-2005-03-1333 (2006).
- 422 Belotti, E. *et al.* The human PDZome: a gateway to PSD95-Disc large-zonula occludens
(PDZ)-mediated functions. *Mol Cell Proteomics* **12**, 2587-2603,
doi:10.1074/mcp.O112.021022 (2013).
- 423 Lamesch, P. *et al.* hORFeome v3.1: a resource of human open reading frames representing
over 10,000 human genes. *Genomics* **89**, 307-315, doi:10.1016/j.ygeno.2006.11.012 (2007).
- 424 Huang da, W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large
gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols* **4**, 44-57,
doi:10.1038/nprot.2008.211 (2009).
- 425 Breitkreutz, B. J. *et al.* The BioGRID Interaction Database: 2008 update. *Nucleic Acids Res*
36, D637-640, doi:10.1093/nar/gkm1001 (2008).
- 426 Mishra, G. R. *et al.* Human protein reference database--2006 update. *Nucleic Acids Res* **34**,
D411-414, doi:10.1093/nar/gkj141 (2006).
- 427 Kerrien, S. *et al.* IntAct--open source resource for molecular interaction data. *Nucleic Acids*
Res **35**, D561-565, doi:10.1093/nar/gk1958 (2007).
- 428 Shannon, P. *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular
interaction networks. *Genome Res* **13**, 2498-2504, doi:10.1101/gr.1239303 (2003).
- 429 Grootjans, J. J. *et al.* Syntenin, a PDZ protein that binds syndecan cytoplasmic domains.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**, 13683-
13688 (1997).
- 430 Baietti, M. F. *et al.* Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Nature*
cell biology **14**, 677-685, doi:10.1038/ncb2502 (2012).

- 431 Ramakrishnaiah, V. *et al.* Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human
hepatoma Huh7.5 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States
of America* **110**, 13109-13113, doi:10.1073/pnas.1221899110 (2013).
- 432 Wilson, K. C., Center, D. M., Cruikshank, W. W. & Zhang, Y. Binding of HTLV-1 tax
oncoprotein to the precursor of interleukin-16, a T cell PDZ domain-containing protein.
Virology **306**, 60-67 (2003).
- 433 Rice, D. S., Northcutt, G. M. & Kurschner, C. The Lnx family proteins function as molecular
scaffolds for Numb family proteins. *Molecular and cellular neurosciences* **18**, 525-540,
doi:10.1006/mcne.2001.1024 (2001).
- 434 Pancewicz, J. *et al.* Notch signaling contributes to proliferation and tumor formation of human
T-cell leukemia virus type 1-associated adult T-cell leukemia. *Proceedings of the National
Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 16619-16624,
doi:10.1073/pnas.1010722107 (2010).
- 435 Cassonnet, P. *et al.* Benchmarking a luciferase complementation assay for detecting protein
complexes. *Nature methods* **8**, 990-992, doi:10.1038/nmeth.1773 (2011).
- 436 Fujii, N. *et al.* An antagonist of dishevelled protein-protein interaction suppresses beta-
catenin-dependent tumor cell growth. *Cancer research* **67**, 573-579, doi:10.1158/0008-
5472.CAN-06-2726 (2007).
- 437 Kurashina, R. *et al.* Anti-proliferative activity of heat shock protein (Hsp) 90 inhibitors via
beta-catenin/TCF7L2 pathway in adult T cell leukemia cells. *Cancer letters* **284**, 62-70,
doi:10.1016/j.canlet.2009.04.012 (2009).
- 438 Maldonado, H. *et al.* Inhibition of cyclin-dependent kinase 5 but not of glycogen synthase
kinase 3-beta prevents neurite retraction and tau hyperphosphorylation caused by secretable
products of human T-cell leukemia virus type I-infected lymphocytes. *Journal of neuroscience
research* **89**, 1489-1498, doi:10.1002/jnr.22678 (2011).
- 439 Manes, N. P. *et al.* Comparative proteomics of human monkeypox and vaccinia intracellular
mature and extracellular enveloped virions. *J Proteome Res* **7**, 960-968,
doi:10.1021/pr070432+ (2008).
- 440 Blibek, K. *An interaction map for HTLV-1 Tax and PDZ-containing proteins*, (2017).
- 441 Rual, J. F. *et al.* Human ORFeome version 1.1: a platform for reverse proteomics. *Genome
Res* **14**, 2128-2135, doi:10.1101/gr.2973604 (2004).
- 442 Collaboration, O. R. The ORFeome Collaboration: a genome-scale human ORF-clone
resource. *Nat Methods* **13**, 191-192, doi:10.1038/nmeth.3776 (2016).
- 443 Braun, P. *et al.* An experimentally derived confidence score for binary protein-protein
interactions. *Nat Methods* **6**, 91-97, doi:10.1038/nmeth.1281 (2009).
- 444 Ganti, K. *et al.* The Human Papillomavirus E6 PDZ Binding Motif: From Life Cycle to
Malignancy. *Viruses* **7**, 3530-3551, doi:10.3390/v7072785 (2015).
- 445 Zhang, Q. C. *et al.* Structure-based prediction of protein-protein interactions on a genome-
wide scale. *Nature* **490**, 556-560, doi:10.1038/nature11503 (2012).
- 446 Lee, S. S., Weiss, R. S. & Javier, R. T. Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97,
a mammalian homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad
Sci U S A* **94**, 6670-6675 (1997).
- 447 Makokha, G. N. *et al.* Human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein interacts with and
mislocalizes the PDZ domain protein MAGI-1. *Cancer Sci* **104**, 313-320,
doi:10.1111/cas.12087 (2013).
- 448 Ramadan, E. *et al.* Physical and in silico approaches identify DNA-PK in a Tax DNA-damage
response interactome. *Retrovirology* **5**, 92, doi:10.1186/1742-4690-5-92 (2008).
- 449 Sowa, M. E., Bennett, E. J., Gygi, S. P. & Harper, J. W. Defining the human deubiquitinating
enzyme interaction landscape. *Cell* **138**, 389-403, doi:10.1016/j.cell.2009.04.042 (2009).
- 450 Huttlin, E. L. *et al.* Architecture of the human interactome defines protein communities and
disease networks. *Nature* **545**, 505-509, doi:10.1038/nature22366 (2017).
- 451 Rolland, T. *et al.* A proteome-scale map of the human interactome network. *Cell* **159**, 1212-
1226, doi:10.1016/j.cell.2014.10.050 (2014).

- 452 Yeger-Lotem, E. *et al.* Network motifs in integrated cellular networks of transcription-
regulation and protein-protein interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 5934-5939,
doi:10.1073/pnas.0306752101 (2004).
- 453 Lefebvre, C. *et al.* A human B-cell interactome identifies MYB and FOXM1 as master
regulators of proliferation in germinal centers. *Mol Syst Biol* **6**, 377, doi:10.1038/msb.2010.31
(2010).
- 454 Hajingabo, L. J. *et al.* Predicting interactome network perturbations in human cancer:
application to gene fusions in acute lymphoblastic leukemia. *Mol Biol Cell* **25**, 3973-3985,
doi:10.1091/mbc.E14-06-1038 (2014).
- 455 Kataoka, K. *et al.* Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nat*
Genet **47**, 1304-1315, doi:10.1038/ng.3415 (2015).
- 456 Fares, J., Kashyap, R. & Zimmermann, P. Syntenin: Key player in cancer exosome biogenesis
and uptake? *Cell Adh Migr* **11**, 124-126, doi:10.1080/19336918.2016.1225632 (2017).
- 457 Nguyen, D. G., Booth, A., Gould, S. J. & Hildreth, J. E. Evidence that HIV budding in
primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem* **278**, 52347-
52354, doi:10.1074/jbc.M309009200 (2003).
- 458 Gould, S. J., Booth, A. M. & Hildreth, J. E. The Trojan exosome hypothesis. *Proc Natl Acad*
Sci U S A **100**, 10592-10597, doi:10.1073/pnas.1831413100 (2003).
- 459 Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. Interleukin 15: biology and relevance to human disease.
Blood **97**, 14-32 (2001).
- 460 Hsu, C. *et al.* Cytokine-independent growth and clonal expansion of a primary human CD8+
T-cell clone following retroviral transduction with the IL-15 gene. *Blood* **109**, 5168-5177,
doi:10.1182/blood-2006-06-029173 (2007).
- 461 Friand, V., David, G. & Zimmermann, P. Syntenin and syndecan in the biogenesis of
exosomes. *Biology of the cell* **107**, 331-341, doi:10.1111/boc.201500010 (2015).
- 462 Brass, A. L. *et al.* Identification of host proteins required for HIV infection through a
functional genomic screen. *Science* **319**, 921-926, doi:10.1126/science.1152725 (2008).

ANNEXES

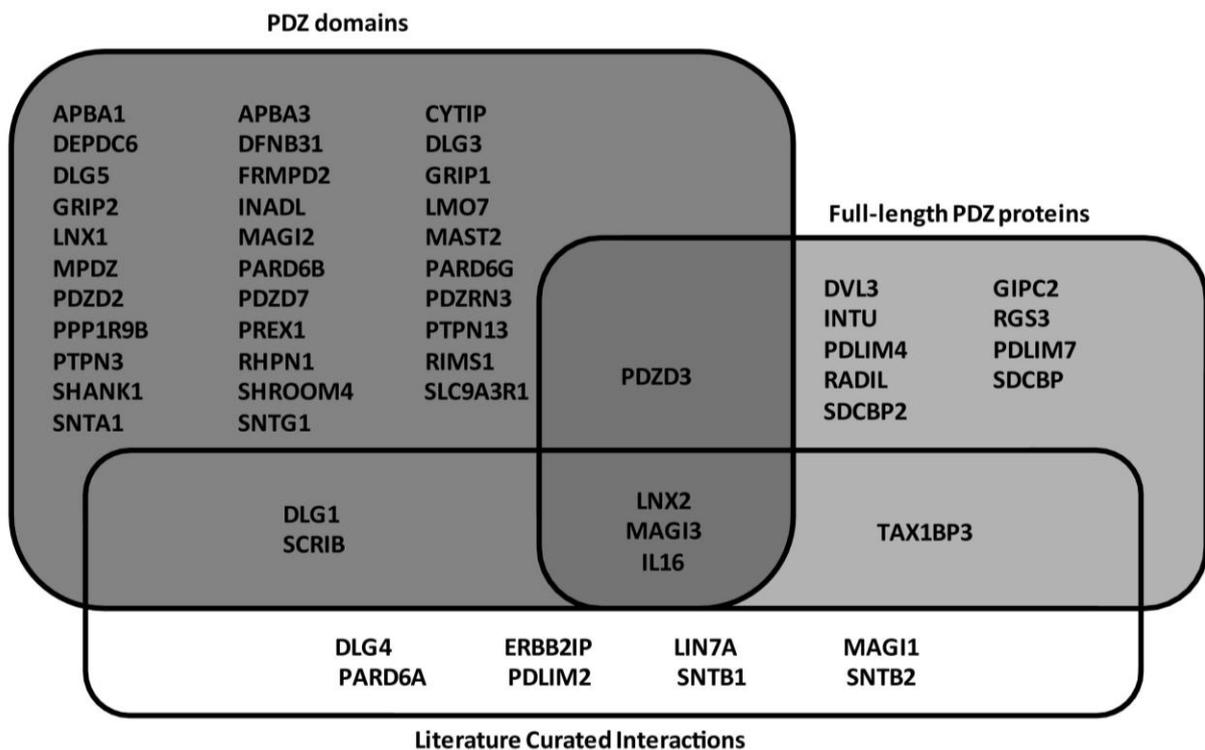
Annexe 1 : Révélation western blot des GST pulldown de quelques protéines à domaines PDZ-Flag avec GST-Tax-1.



Annexe 3 : Protéines à domaines PDZ partenaires de Tax-1 retrouvées par notre étude.

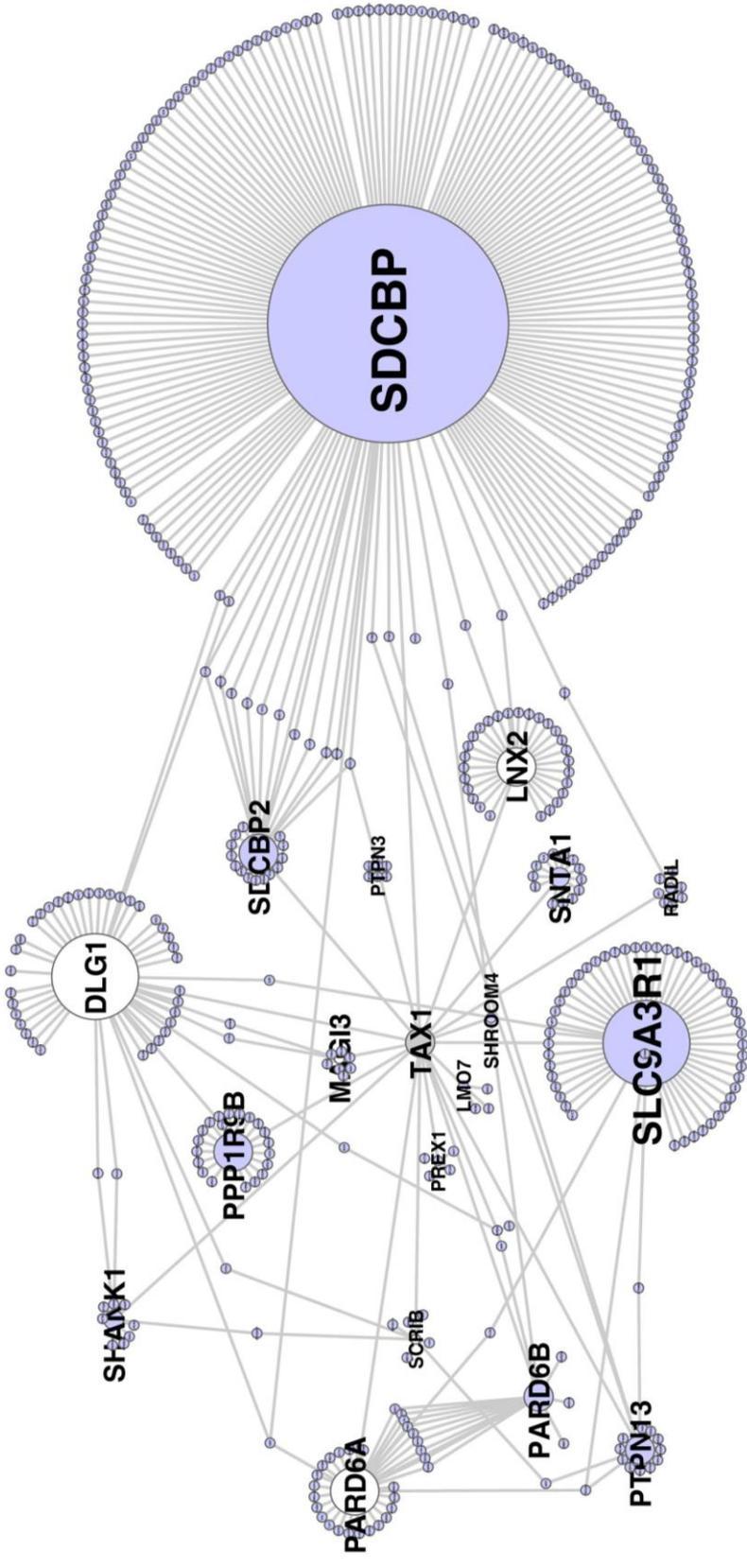
Gene name	Gene ID	PPI assay	Pubmed ID
APBA1	320	Y2H	This study
APBA3	9546	Y2H	This study
CYTIP	9595	Y2H	This study
DEPTOR	64798	Y2H	This study
DFNB31	25861	Y2H	This study
DLG1	1739	LCI + Y2H	9192623 + This study
DLG3	1741	Y2H	This study
DLG4	1742	LCI	9482110
DLG5	9231	Y2H	This study
DVL3	1857	GST pulldown	This study
ERBB2IP	55914	LCI	17100642
FRMPD2	143162	Y2H	This study
GIPC2	54810	GST pulldown	This study
GRIP1	23426	Y2H	This study
GRIP2	80852	Y2H	This study
IL16	3603	LCI + GST pulldown + Y2H	12620798 + This study
INADL	10207	Y2H	This study
INTU	27152	GST pulldown	This study
LMO7	4008	Y2H	This study
LIN7A	8825	LCI	9482110
LNX1	84708	Y2H	This study
LNX2	222484	LCI + GST pulldown + Y2H	22458338 + This study
MAGI1	9223	LCI	23279616
MAGI2	9863	Y2H	This study
MAGI3	260425	LCI + GST pulldown + Y2H	15003862 + This study
MAST2	23139	Y2H	This study
MPDZ	8777	Y2H	This study
PAR6A	50855	LCI	9482110
PAR6B	84612	Y2H	This study
PAR6G	84552	Y2H	This study
PDLIM2	64236	LCI	19131544
PDLIM4	8572	GST pulldown	This study
PDLIM7	9260	GST pulldown	This study
PDZD2	23037	Y2H	This study
PDZD3	79849	GST pulldown + Y2H	This study
PDZD7	79955	Y2H	This study
PDZRN3	23024	Y2H	This study
PPP1R9B	84687	Y2H	This study
PREX1	57580	Y2H	This study
PTPN13	5783	Y2H	This study
PTPN3	5774	Y2H	This study
RADIL	55698	GST pulldown	This study
RGS3	114822	GST pulldown	This study
RHPN1	114822	Y2H	This study
RIMS1	22999	Y2H	This study
SCRIB	23513	LCI + Y2H	17855372 + This study
SDCBP	510979	GST pulldown	This study
SDCBP2	27111	GST pulldown	This study
SHANK1	50944	Y2H	This study
SHROOM4	57477	Y2H	This study
SLC9A3R1	9368	Y2H	This study
SNTA1	6640	Y2H	This study
SNTB1	6641	LCI	9482110
SNTB2	6645	LCI	9482110
SNTG1	54212	Y2H	This study
TAX1BP3	30851	LCI + GST pulldown	9482110 + This study

Annexe 4 : Diagramme des protéines à domaines PDZ partenaires de Tax retrouvées par les différentes méthodes. « PDZ domains » : Y2H et GPCA. « Full-length PDZ proteins » : GST pulldown. « Literature Curated Interactions » : Criblage de la littérature.



Annexe 5 : Protéines à domaines PDZ exprimées en cellules T ou différenciellement exprimées en cellules HTLV+/-

T-cells expression	Differential expression in HTLV+/- Cells	Summary	
APBA3		expressed in Tcells	
CYTIP		expressed in Tcells	
DLG1		expressed in Tcells	
DLG3		expressed in Tcells	
DVL3		expressed in Tcells	
	GRIP1	downregulated in HTLV+ cells	
	GRIP2	downregulated in HTLV+ cells	
	LMO7	upregulated in HTLV+ cells	
LNX2		expressed in Tcells	
MAGI2		expressed in Tcells	
	MAGI3	downregulated in HTLV+ cells	
	MPDZ	downregulated in HTLV+ cells	
PARD6A		expressed in Tcells	
PARD6B		expressed in Tcells	
PDLIM4		expressed in Tcells	
PDZD11		expressed in Tcells	
	PDZD3	downregulated in HTLV+ cells	
	PDZRN3	downregulated in HTLV+ cells	
PPP1R9B		expressed in Tcells	
PREX1	PREX1	expressed and upregulated in HTLV+ cells	
	PTPN13	upregulated in HTLV+ cells	
PTPN3		expressed in Tcells	
RADIL		expressed in Tcells	
SCRIB		expressed in Tcells	
SDCBP	SDCBP	expressed and downregulated in HTLV+ cells	
SDCBP2		expressed in Tcells	
	SHANK1	downregulated in HTLV+ cells	
	SHROOM4	downregulated in HTLV+ cells	
SLC9A3R1	SLC9A3R1	expressed and downregulated in HTLV+ cells	
SNTA1	SNTA1	expressed and downregulated in HTLV+ cells	
SNTB1		expressed in Tcells	
TAX1BP3		expressed in Tcells	
Legend:	Expressed	Upregulated	Downregulated



Annexe 6 : Carte représentant les interactions entre les protéines à domaines PDZ du cluster « Cytoskeleton », leurs interactions avec Tax-1 ainsi que leurs interactions avec des partenaires directs retrouvés dans la littérature. Tax-1 est représenté par un nœud en losange. Les nœuds de grande taille et de forme ronde représentent les protéines à domaines PDZ partenaires de Tax-1. Les nœuds de petite taille et de forme ronde représentent les partenaires communs (n+1 communs) des protéines à domaines PDZ partenaires de Tax-1. Les nœuds blancs représentent les protéines déjà connues comme partenaires de Tax-1 dans la littérature.

Annexe 7 : Liste des lignées cellulaires utilisées pour les tests d'expression des gènes codant les protéines à domaines PDZ.

24 T-cell lines:
PDZ Proteins mRNA expression levels

T-cell lines
ALL-SIL
Be13
CEM
CTV-1
DND-41
DU.528
HPB-ALL
H-SB2
JURKAT
K3P
Karpas 45
KOPT-K1
LOUCY
MOLT-13
MOLT-16
MOLT-4
P12-ICHIKAWA
PEER
PF-382
SKW-3
SUP-T11
SUP-T13
SUP-T7

HTLV infected VS non-infected T cell lines:
Differential PDZ Proteins mRNA expression

Non infected	Infected
CEM	C81-45
CTV1	C91PL
HUT-78	HUT102
JURKAT	MT2
MOLT16	MT4

Annexe 8 : Liste des protéines à domaines PDZ

prédites pour leur interaction avec Tax-1. Les protéines validées expérimentalement sont indiquées en couleur grise.

Prédiction basée sur la structure	Prédiction basée sur la séquence	Notre étude expérimentale
AHNAK2	-	-
APBA1	-	APBA1
APBA2	-	-
APBA3	-	APBA3
ARHGAP21	ARHGAP21	-
ARHGAP23	ARHGAP23	-
ARHGEF12	-	-
CAR14	-	-
CASK	-	-
CYTIP	-	CYTIP
-	-	DEPTOR
DFNB31	DFNB31	DFNB31
DLG1	DLG1	DLG1
DLG2	DLG2	-
DLG3	DLG3	DLG3
DLG4	DLG4	DLG4
		DLG5
DVL1	-	-
DVL1L1	-	-
DVL2	-	-
DVL3	-	DVL3
ERBB2IP	-	ERBB2IP
FRMPD1	-	-
FRMPD2	-	FRMPD2
FRMPD4	-	-
GIPC1	GIPC1	-
GIPC2	GIPC2	GIPC2
GIPC3	GIPC3	-
GRD2I	GRD2I	-
GRIP1	-	GRIP1
GRIP2	-	GRIP2
HTRA2	-	-

IL16	-	IL16
INADL	-	INADL
		INTU
LIMK1	-	-
-	-	LMO7
LIN7A	LIN7A	LIN7A
LIN7B	LIN7B	-
LIN7C	LIN7C	-
-	-	LNK1
-	LNK2	LNK2
LRRC7	-	-
MAGI1	MAGI1	MAGI1
MAGI2	MAGI2	MAGI2
MAGI3	MAGI3	MAGI3
-	MAGIX	-
-	-	MAST2
MLLT4	-	-
MPDZ	MPDZ	MPDZ
MPP1	-	-
MPP5	-	-
MPP6	-	-
NOS1	-	-
PARD3	PARD3	-
PARD3B	PARD3B	-
PARD6A	-	PARD6A
PARD6B	-	PARD6B
PARD6G	-	PARD6G
PDLIM1	-	-
		PDLIM2
PDLIM3	-	-
PDLIM4	-	PDLIM4
PDLIM5	-	-
-	-	PDLIM7
PDZD11	PDZD11	-
PDZD2	-	PDZD2
PDZD3	-	PDZD3
PDZD7	-	PDZD7
PDZRN3	PDZRN3	PDZRN3
-	PDZRN4	-
PICK1	-	-
-		PPP1R9B
-	-	PREX1
PTPN13	-	PTPN13
-	PTPN3	PTPN3

PTPN4	PTPN4	-
RADIL	-	RADIL
RAPGEF6	-	-
-	RGS3	RGS3
RHPN1	RHPN1	RHPN1
RIMS1	-	RIMS1
SCRIB	SCRIB	SCRIB
SDCBP	-	SDCBP
SDCBP2	-	SDCBP2
-	-	SHANK1
-	-	SHROOM4
SIPA1	-	-
SLC9A3R1	-	SLC9A3R1
SNTA1	SNTA1	SNTA1
SNTB1	SNTB1	SNTB1
SNTB2	SNTB2	SNTB2
SNTG1	SNTG1	SNTG1
SNTG2	SNTG2	-
-	SNX27	-
SYNJ2BP	SYNJ2BP	-
-	-	TAX1BP3
TJP1	-	-
TJP2	-	-
TJP3	-	-
USH1C	-	-

PUBLICATIONS

Article publié (co-auteur) :

Molecular & Cellular Proteomics

www.mcponline.org

First Published on May 30, 2013, doi: 10.1074/mcp.O112.021022
September 1, 2013 Molecular & Cellular Proteomics, 12, 2587–2603.

The Human PDZome: A Gateway to PSD95-Disc Large-Zonula Occludens (PDZ)-mediated Functions*

Edwige Belotti^{†S¶||}, Jolanta Polanowska^{†S¶||, **}, Avais M. Daulat^{†S¶|††}, Stéphane Audebert^{†S¶|††}, Virginie Thomé^{¶SS}, Jean-Claude Lissitzky^{†S¶|††}, Frédérique Lembo^{†S¶|††}, Karim Blibek^{†S¶|††¶¶}, Shizue Omi^{†S¶|, **, ††}, Nicolas Lenfant^{†S¶|††}, Akanksha Gangar^{†S¶|††|||}, Mireille Montcouquiol^a, Marie-Josée Santoni^{†S¶|††}, Michael Sebbagh^{†S¶|††}, Michel Aurrand-Lions^{†S¶|††}, Stéphane Angers^{b, c}, Laurent Kodjabachian^{¶SS}, Jérôme Reboul^{†S¶|, **, ††, d} and Jean-Paul Borg^{†S¶|††, a, e}

+ Author Affiliations

+ Author Notes

↵^e To whom correspondence should be addressed: Tel.: 33 4 86 97 72 01, Fax: 33 4 86 97 74 99, E-mail: jean-paul.borg@inserm.fr.

↵|| The authors contributed to this work equally.

Abstract

Protein-protein interactions organize the localization, clustering, signal transduction, and degradation of cellular proteins and are therefore implicated in numerous biological functions. These interactions are mediated by specialized domains able to bind to modified or unmodified peptides present in binding partners. Among the most broadly distributed protein interaction domains, PSD95-disc large-zonula occludens (PDZ) domains are usually able to bind carboxy-terminal sequences of their partners. In an effort to accelerate the discovery of PDZ domain interactions, we have constructed an array displaying 96% of the human PDZ domains that is amenable to rapid two-hybrid screens in yeast. We have demonstrated that this array can efficiently identify interactions using carboxy-terminal sequences of PDZ domain binders such as the E6 oncoviral protein and protein kinases (PDGFR β , BRSK2, PCTK1, ACVR2B, and HER4); this has been validated via mass spectrometry analysis. Taking advantage of this array, we show that PDZ domains of Scrib and SNX27 bind to the carboxy-terminal region of the planar cell polarity receptor Vangl2. We also have demonstrated the requirement of Scrib for the promigratory function of Vangl2 and described the morphogenetic function of SNX27 in the early *Xenopus* embryo. The resource presented here is thus adapted for the screen of PDZ interactors and, furthermore, should facilitate the understanding of PDZ-mediated functions.

Footnotes

↵^d Co-last senior authors.

↵* This work was supported by grants from Association pour la Recherche contre le Cancer (fellowship to E.B. and "Projet ARC" program to MS) and La Ligue Contre le Cancer (Label Ligue (J.P.B.) and Ligue fellowship to A.M.D.), EUCAAD (FP7 program), INCa and IBIISA, ANR-08-MNPS-040-01 (M.M.), and Region Regional Aquitaine. The Marseille Proteomic IBIISA platform (MaP) is supported by Institut Paoli-Calmettes, INCa, Canceropôle PACA.

Received June 10, 2012.
Revision received April 28, 2013.

↵[§] This article contains **supplemental material**.

<http://www.mcponline.org/content/12/9/2587.abstract>

© 2013 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

Articles en préparation (1er auteur):

Blibek et al. *Retrovirology* 2014, 11 (Suppl 1):P101
<http://www.retrovirology.com/content/11/S1/P101>



RETROVIROLOGY

POSTER PRESENTATION

Open Access

An interaction map for HTLV-1 Tax and PDZ-containing proteins

Karim Blibek^{1*}, Xavier Rambout¹, Jérôme Beaufay², Laurence Lin², Franck Dequiedt¹, Jean-Claude Twizer¹

From 16th International Conference on Human Retroviruses: HTLV and Related Viruses
Montreal, Canada. 26-30 June 2013

Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) retrovirus encodes for the Tax protein, which has a transforming capacity in vitro. Tax contains at its C-terminus a binding motif or PDZ domain-containing proteins (PSD95-DLG1-ZO1). It has been shown that the C-terminal motif of Tax is involved in Tax oncogenic capacity. Ten different PDZ domain-containing proteins have been reported to interact with Tax, but the specificity of Tax-human PDZ interactions has not been investigated. The objective of this study is to obtain a comprehensive interactome map for Tax and the human PDZome and to determine a global role of Tax-PDZ interactions in HTLV-1 biology. By using different protein-protein interaction methods we have generated a Tax/human PDZome interaction map. We then performed a clustering analysis to define biological functions associated with Tax/PDZ interactions. PDZ Proteins involved in cell shape, cytoskeleton organization and membrane polarization and traffic were overrepresented, and suggest that Tax/PDZ interactions may be involved in Tax-mediated stimulation of T cell activation pathways.

Authors' details

¹National Fund for Scientific Research, Interdisciplinary Cluster for Applied Genoproteomics (GIGA), University of Liège, Liège, Belgium
²National Fund for Scientific Research, Gembloux Agro-Bio Tech, Center of Numerical Molecular Biophysics, University of Liège, Gembloux, Belgium.

Published: 7 January 2014

doi:10.1186/1742-4690-11-S1-P101
Cite this article as: Blibek et al: An interaction map for HTLV-1 Tax and PDZ-containing proteins. *Retrovirology* 2014 11(Suppl 1):P101.

¹National Fund for Scientific Research, Interdisciplinary Cluster for Applied Genoproteomics (GIGA), University of Liège, Liège, Belgium
Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Blibek et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





Inhibition of Tax transformation activity using a small molecule targeting Tax/PDZ domain interactions

Karim Blibek^{1*}, Naoaki Fujii², Sebastien Legros¹, Mathieu Boxus¹, Jean-François Dewulf¹, Pascale Zimmermann¹, Richard Kettmann¹, Franck Dequiedt¹, Jean-Claude Twizerè¹

From 16th International Conference on Human Retroviruses: HTLV and Related Viruses
Montreal, Canada. 26-30 June 2013

Primate T-lymphotropic virus species comprise four members (HTLV-1 to -4) that have been discovered in human. Only the HTLV-1 infection leads to adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL). All the four viruses share a similar genomic organization and encode transforming Tax oncoproteins. In contrast to HTLV-2 and 4, HTLV-1 and 3 Tax proteins contain a PSD-95/Drosophila Discs Large/Zona Occludens-1 (PDZ) binding motif at their C-terminal that has been shown to play crucial roles in the distinct transforming properties of the Tax proteins.

Here, we used a collection of human full-length protein-coding open reading frames (ORFeome v3.1) to identify novel PDZ domain containing proteins that specifically interact with HTLV-1 Tax. Novel Tax interactors include syntenin-1 and -2, LNX2, DVL3, GIPC2, INTU, PDLIM4 and -7, RADIL and RGS3. These proteins are involved in diverse biological processes including cell division, cell fate determination, and cell survival. We further characterized interaction between Tax and syntenins and showed that, FJ9 a small molecule able to disrupt Tax/PDZ interactions, could antagonize Tax-transformation activity in a Rat-1 model.

Our study identify novel PDZ-containing proteins interacting with HTLV-1 Tax and provides the first example where Tax protein-protein interactions with PDZ containing proteins and Tax-transformation capacity could be inhibited by a small molecule.

Authors' details

¹Interdisciplinary Cluster for Applied Genoproteomics (GIGA), University of Liège, Liège, Belgium; ²Department of Chemical Biology and Therapeutics,

¹Interdisciplinary Cluster for Applied Genoproteomics (GIGA), University of Liège, Liège, Belgium

Full list of author information is available at the end of the article



© 2014 Blibek et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, USA.

³Department of Human Genetics, Faculty of Medicine, University of Leuven, Leuven, Belgium.

Published: 7 January 2014

doi:10.1186/1742-4690-11-S1-P104

Cite this article as: Blibek et al: Inhibition of Tax transformation activity using a small molecule targeting Tax/PDZ domain interactions. *Retrovirology* 2014 11(Suppl 1):P104.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



