



UNIVERSITE DES ANTILLES ET DE LA GUYANE

École doctorale pluridisciplinaire de l'UAG

THESE

En vue d'obtenir le grade de **Docteur de l'Université des Antilles et de la Guyane**

Spécialité : Sciences de la vie

**Etude de la régulation d'HBZ et son rôle sur la biogenèse des
miARN chez les patients infectés par HTLV-1**

Présentée par **Hélène GAZON**

Soutenue publiquement le 21 Février 2014

Devant la commission d'examen composée de :

Madame Isabelle Jariel-Encontre	Chargé de recherche CNRS Montpellier	Rapporteur
Madame Laurence Briant	Directeur de recherche CNRS Montpellier	Rapporteur
Madame Isabelle Lemasson	Professeur Université de Caroline du Nord	Examineur
Mr Raymond Césaire	Directeur de recherche UAG Martinique	Directeur de thèse
Mr Jean-Marie Péloponèse	Chargé de recherche CNRS Montpellier	Co-directeur de thèse

«Notre plus grande faiblesse réside dans l'abandon; La façon la plus sûre de réussir est d'essayer une autre fois» Thomas A. Edison

A ma mère pour son soutien sans faille. Tu as toujours été présente dans les bons comme les mauvais moments. Tu m'as appris le courage et la ténacité, sans toi je ne serais rien. J'espère de tout mon cœur avoir été à la hauteur de tes espérances. Tu es une mère formidable !

A toute ma famille pour leur soutien permanent depuis toujours.

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé grâce à une collaboration entre le laboratoire de Virologie et d'Immunologie au CHU de Fort de France et l'équipe HTLV-1 et Leucémie au CPBS de Montpellier.

Mon premier mot ira pour mes directeurs de thèse Mr Raymond Césaire et Jean-Marie Péloponèse que je tiens à remercier pour la confiance qu'ils m'ont accordée et leur soutien au cours de cette thèse. Merci Jean-Marie pour tout ce que tu m'as apporté durant ces 3 années et de m'avoir réconciliée avec la recherche. Quand nous nous sommes rencontrés j'étais prête à arrêter la recherche et maintenant, toujours grâce à toi, je pars pour une nouvelle aventure dans un post-doc. Je crois que peu de directeurs de thèse sont aussi disponibles et à l'écoute. Merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et ta patience. Merci de m'avoir fait travailler sur des sujets innovants et vraiment passionnants, j'ai énormément appris durant ces années de thèse. Merci beaucoup d'avoir participé à la rédaction de ce mémoire et de l'avoir corrigé.

Je tiens à remercier Mme Isabelle Jariel-Encontre et Mme Laurence Briant d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse ainsi que Mme Isabelle Lemasson d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

Je remercie également Mr Jean-Michel Mesnard pour cette seconde chance au sein de son équipe et sa confiance ainsi que toute l'équipe HTLV-1 du CPBS au CNRS de Montpellier pour leur accueil. Merci à Bruno, Antoine, Charlotte et Sylvain pour leurs conseils avisés et leur aide lors des problèmes techniques que j'ai pu rencontrer au cours de ma thèse.

Mes séjours à Montpellier ont été riches en connaissances scientifiques mais également en amitiés. Merci à Simon, pour sa bonne humeur et son optimisme. J'ai adoré même si ce ne fut que pour quelques mois partager un bureau avec toi. Marie, travailler avec toi fût un réel plaisir, sans oublier nos discussions ainsi que nos sorties. Bon courage pour ta thèse qui j'en suis certaine sera une réussite. Christophe, après trois ans, tout ce que je peux te dire c'est merci d'être toi. On a passé cette étape qu'est la rédaction du manuscrit ensemble et je te remercie pour toutes les fois où tu as été à la pêche aux infos afin de me rassurer. Merci également pour toutes tes recettes de pâtisseries et les dégustations... . Merci également à Lucie, Célia avec qui j'ai passé de bons moments. Les « tea times » avec vous tous me

manquent déjà... !!!!! Je tiens également à remercier Lucile, Christine et Sandrine pour leur bonne humeur et leur accueil à chacune de mes venues à Montpellier.

Je remercie chaleureusement l'ensemble des membres du laboratoire de Virologie et Immunologie qui m'ont tous accueillie et accompagnée durant ces trois années. Malgré beaucoup de temps passé à Montpellier, je n'oublie pas votre soutien et votre bonne humeur. Merci du fond du cœur à Véronique Thimon-Callier pour son soutien durant ces trois ans mais surtout pour son aide pour la correction du manuscrit.

Un merci particulier pour les filles du Cerbim, Isabelle, Gilda et Régine pour leur accueil, leur écoute et leur aide. Je remercie également Fabienne pour sa bonne humeur et son enthousiasme, Maryvonne Dueymes, Fatima, Germaine et « Bibi » sans qui cette thèse n'aurait peut-être jamais eu lieu.

Je n'oublie pas l'aide apportée par le conseil régional de la Martinique qui m'a accordé une bourse de formation doctorale. Mes sincères remerciements à Mr le Président, Mme Vartel et Mme Cesto.

Et pour finir, un immense merci à tous mes amis. Nous suivons tous des chemins différents dans la vie, mais, peu importe où nous allons, nous apportons partout une petite parcelle de l'autre (*Tim McGraw*). Merci, à toi Grégory qui a réussi à me supporter durant la rédaction et qui a tout encaissé sans te plaindre. Merci également de m'avoir aidé pour mes images. Vanessa, Doriane et Yannice, merci les filles d'avoir su m'écouter me plaindre et surtout d'être là tout simplement... . Joham, malgré un lendemain incertain, merci pour ton soutien, ta présence et ton amour durant ces années de thèse. Dans bien des cas, tu as été le moteur de ma volonté, tu as et auras toujours une place particulière dans mon cœur.

Table des matières

Liste des abréviations	8
Liste des Illustrations	11
Etudes bibliographiques	14
Introduction générale	15
Chapitre 1	19
HTLV-1 et maladies associées	19
I. HTLV-1	20
I.1. Historique et épidémiologie	20
I.2. Répartition géographique	22
I.3. Transmission virale	23
I.4. Modèle d'infection	24
I.5. Stratégie de réplication d'HTLV-1	27
I.6. Structure et organisation génomique d' HTLV-1	29
I.7. Organisation génomique d'HTLV-1	30
II. LA LEUCEMIE DES CELLULES T CHEZ L'ADULTE (ATL)	34
II.1. Processus de leucémogénèse	35
III. LA PROTEINE ANTISENS D'HTLV-1	43
III.1. Transcription du gène <i>hbz</i>	44
III.2. Structure et Propriétés de la protéine HBZ	46
III.3. Rôle d' HBZ dans la pathogénicité induite par HTLV-1	48
IV. LA TRANSCRIPTION ANTISENS ET LES AUTRES HTLV	63
Chapitre 2	67
Les miARN et leurs rôles dans la carcinogénèse induite par HTLV-1	67
I. LA VOIE DES MICRO-ARN	68
I.1. L'interférence ARN	69
I.1.1. Origine et découverte de l'interférence ARN	69
I.2. Biogénèse des micro-ARN	77
I.3. Mécanismes d'actions	93
I.4. Rôles biologiques	105
II. ROLE DES MIARN DANS LA PATHOGENESE DE L'ATL	118
II.1. L'infection par HTLV-1 change le profil des miARN cellulaire	118

II.2.	<i>Mécanismes impliqués dans la dérégulation des miARN lors de l'infection par HTLV-1</i>	121
II.3.	<i>miARN comme nouveaux marqueurs pronostics et diagnostics dans la pathogénèse de l'ATL</i>	125

Résultats expérimentaux **127**

I.	ARTICLE I. REGULATION DE L'EXPRESSION D'HBZ DANS UN CLONE MALIN ATL	128
I.1.	<i>Analyse de la transcription antisens dans un contexte de répression du LTR5'</i>	129
I.2.	<i>Identification de la voie de signalisation requise pour l'activation de la transcription antisens par HBZ.</i>	131
I.3.	<i>Effet de l'expression d'HBZ sur la prolifération et la transformation cellulaire dans le contexte d'un provirus délété du LTR 5'</i>	140
I.4.	<i>Conclusion & Discussion</i>	143
II.	ARTICLE II. ETUDE DE L'EFFET D'HBZ SUR LA VOIE DES MICROARN DANS LES CELLULES LEUCEMIQUES	148
II.1.	<i>Analyse de l'influence d'HBZ sur les miARN cellulaires</i>	148
II.2.	<i>Mesure de l'expression des acteurs de la biogénèse des miARN en présence d'HBZ</i>	154
II.3.	<i>Etudes des mécanismes sous jacent à la répression de Dicer par HBZ</i>	158
II.4.	<i>Etude de l'effet de la dérégulation de Dicer dans les cellules de patients ATL</i>	163
II.5.	<i>Conclusion & Discussion</i>	165

Conclusions générales & Perspectives **171**

Matériels & Méthodes **187**

A. Matériels **188**

I.	LES CELLULES	188
I.1.	<i>Les cellules eucaryotes</i>	188
I.2.	<i>Les cellules procaryotes</i>	190
I.	LES ANTICORPS.....	191
II.	LES PLASMIDES	191
III.	LES AMORCES.....	193

B. Méthodes **195**

I.	PURIFICATION DES CELLULES DE PATIENTS.....	195
I.1.	<i>Séparation des cellules mononuclées</i>	195
I.2.	<i>Numération cellulaire</i>	195
I.3.	<i>Tri cellulaire en CD8 négatif</i>	196
II.	CULTURE CELLULAIRE ET TRAITEMENT DES CELLULES DE PATIENTS	196
II.1.	<i>Double extraction ADN/ARN</i>	196
II.2.	<i>Mesure de la charge provirale HTLV-1 par PCR TaqMan</i>	197
III.	EXTRACTION D'ARN TOTAL ET REVERSE TRANSCRIPTION	198
III.1.	<i>Extraction de l'ARN au Trizol™</i>	198

III.2.	<i>Reverse transcription protocole SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen)</i>	198
III.3.	<i>Reverse Transcription pour analyse des miARN protocole Kit RT QuantiMiR™ (Système Biosciences)</i>	198
IV.	PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL (qRT-PCR).....	199
V.	TRANSFORMATION BACTERIENNE EN DH5A.....	200
VI.	TRANSFECTION.....	200
VI.1.	<i>Transfection des cellules adhérentes au jetPEI</i>	200
VI.2.	<i>Transfection des cellules infectées chroniquement par HTLV-1</i>	202
VII.	WESTERN BLOT DANS DES CONDITIONS DENATURANTES.....	202
VIII.	MESURE D'ACTIVITE B-GALACTOSIDASE ET LUCIFERASE.....	203
VIII.1.	<i>Dosage de l'activité β-galactosidase</i>	203
VIII.2.	<i>Dosage de l'activité luciférase</i>	204
IX.	TEST DE PROLIFERATION (CELL COUNTING KIT-8, DOJINDO).....	204
X.	EXPERIENCE DE FORMATION DE COLONIES EN SOFT-AGAR.....	205
XI.	IMMUNOPRECIPITATION DE LA CHROMATINE (CHIP).....	206
Bibliographie		209
Annexe		243

Liste des abréviations

aa : acides aminés	CDC2 : cell division cycle 2
AD: activation domain	CeRBIM: Neuro-virothèque du centre de Ressources Biologiques de la Martinique
ADN: Acide Désoxyribonucléique	CHIP: Chromatin immunoprecipitation
ADNc: ADN complémentaire	CHS : chalcone synthase
AGO: Argonaute	CIRC : Centre international de Recherche sur le Cancer
Alb: Albumine	CMH-I : Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe I
AMPc: adénosine mono-phosphate cyclique	CRE : cAMP Responsive Elements
AP-1: Activator Protein-1	CREB : CRE-Binding Protein
APC: Activated protein C	CTL : cytotoxique T lymphocyte
APH: protéine antisens d'HTLV	<i>D. melanogaster</i> : <i>Drosophila melanogaster</i>
ARN: Acide Ribonucléique	db : double brin
ARNm: ARN messager	DBD : DNA Binding Domain
ARNr: ARN ribosomique	DC: domaine central
ARNt: ARN de transfert	DDX17: DEAD box protein 17
ASP: Antisens Protein	DDX5: DEAD box protein 5
ATF: activating transcription factor	DGCR8: DiGeorge syndrome critical region gene 8
ATL ou ATLL: Adult T-cell Leukemia/Lymphoma	DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
ATLV: Adult T-cell Lymphoma Virus	DNMT3b: DNA (cytosine-5)-methyltransferase 3 beta
BCL2: B-cell CLL/lymphoma-2	dsRBD: Double-stranded RNA-binding domain
BLV Bovine leukemia virus	Dvl: Dishevelled
BMP: Bone morphogenic protein bZIP: Basic leucine Zipper	EBV: Epstein-Barr virus
<i>C. elegans</i> : <i>Caenorhabditis elegans</i>	ECL: Enhanced Chemiluminescence substrate
C19MC: chromosome 19 microRNA cluster	eIF: eukaryotic translation initiation factor
CA: capsid	EIAV : Equine infectious anemia virus (virus de l'anémie infectieuse équine)
LTR: Long Terminal Repeat	Env: protéine de l'enveloppe
CACNG8: Calcium Channel, Voltage-Dependent, Gamma Subunit 8	FoxP3: Forkhead box P3
CBP: CREB Binding Protein	
CCS : cervical squamous cell	
CD4+ et CD8+ : Clusters de Différentiation 4 et 8	

Gag: Group specific Antigen
 GDP: guanosine diphosphate
 Glut1 : transporteur de glucose-1
 GSK3: Glycogen synthase kinase 3
 GTP: guanosine triphosphate
 HBV: Hepatitis B virus
 HBZ: HTLV-1 basic leucine zipper factor
 HEK 293T: human Embryonic Kidney 293 transformed by expression of the Large T antigen
 hnRNP: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
 HSPG: héparanes sulfates protéoglycanes
 hTERT: Human Telomerase Reverse Transcriptase
 HTLV: Human T Lymphotropic Virus
 iARN: interference ARN
 IL-2: Interleukine-2
 IN: Integrase
 IRES: internal ribosome entry site
 JNK: Jun N-terminal Kinase
 KO: knockout
 KSHV: Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus
 KSRP: KH-type splicing regulatory protein
 LB: Luria Broth
 LEF1: Lymphoid enhancer-binding factor-1
 LLC: leucémie lymphoïde chronique
 MA : matrice
 MAF: Avian musculoaponeurotic fibrosarcoma
 MEF: Mouse Embryonic Fibroblast
 mi-ARN: micro-ARN
 miRISC: miRNA associated-RNA-induced silencing complex
 miRNP: miRNA associated ribonucleoprotein complex
 MRE: miRNA Response Element
 MTOC: Microtubule Organizing Center
 NC: nucléocapside
 NFAT: Nuclear Factor of Activated T-cells
 NF- κ B: Nuclear Factor-kappa B
 NRP-1: neuropiline 1
 nt: nucléotide
 OG: oncogène
 OMS: Organisation mondiale de la santé
 ORF: Open Reading Frame
 p/CAF: p300/CBP Associated Factor
 PABPC: poly(A)-binding protein, cytoplasmic
 PACT: protein activator of PKR
 PAZ: Proteins Piwi Argonaut and Zwillig
 pb: paire de bases
 PBMC: peripheral blood mononuclear cell
 PBS: Phosphate Buffered Saline
 PCR: Polymerase Chain Reaction
 PKR: protein kinase R
 PMA: phorbol-12-myristate-13-acétate
 PolII : Polymérase II
 poly(A) : Signal de Polyadénylation
 pré-miARN: microARN précurseur
 pri-miARN: miARN primaire
 PTGS: Post Transcriptional Gene Silencing
 PVDF: Polyvinylidene Difluoride
 qRT-PCR : PCR quantitative en temps réel
 Ran: RAS-related nuclear protein
 RHA: RNA hélicase A
 RIIID: RNase III domain
 RISC: RNA-induced silencing complex
 RITS: RNA-induced transcriptional silencing
 RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute 1640
 RRM: RNA recognition motives
 RSS: RNA silencing suppressor activity
 RT: Reverse Transcriptase

RxRE: Rex Response Element
shARN: short hairpin ARN
sHBZ: Spliced HBZ
siARN: short interfering RNA
SP1: Spliced RNA 1 of HBZ
SP2: Spliced RNA 2 of HBZ
SRF: Serum Response Factor
ST: Suppresseur de Tumeur
STLV-1: Simian T Lymphotropic Virus
Tax: Transactivator of pX
TCF1: T-Cell Factor 1
TGF- β : Transforming Growth Factor β
TGS: Transcriptional Gene Silencing
TRBP: TAR RNA-binding protein
TRE: TPA responsive element
T-reg: Lymphocyte T-regulateur

TSP/HAM: tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy
TxRE: Tax responsive element
U3 : région unique en 3'
U5 : région unique en 5'
usHBZ: unspliced HBZ
UTR: untranslated region
vCRE: viral cAMP-responsive element
FIV : Feline Immunodeficiency Virus (Virus de l'immunodéficience féline)
HIV : human immunodeficiency virus (virus de l'immunodéficience humaine)
VZV: varicella-zoster virus
WHV: Woodchuck hepatitis virus
WT: Wild Type

Liste des Illustrations

Figure 1 Carte d'identité du virus HTLV-1	20
Figure 2 Prévalence du virus HTLV-1.	22
Figure 3 Représentation schématique des différents mécanismes de transmissions cellule-cellule d'HTLV-1.....	25
Figure 4 Structure de la particule virale ou virion d'HTLV-1	29
Figure 5 Représentation schématique du génome proviral d'HTLV-1, des ARNm viraux et des protéines correspondantes.....	30
Figure 6 Représentation schématique de l'activation de la transcription à partir du LTR5'	34
Figure 7 Expression des ARNm viraux Tax, Gag et HBZ dans les PBMC en culture de patients infectés par HTLV-1.....	40
Figure 8 Représentation schématique du développement de l'ATL.....	41
Figure 9 Représentation schématique de la structure des gènes épissés et non épissés d' <i>hbz</i>	44
Figure 10 Représentation schématique de la structure moléculaire d'HBZ.....	46
Figure 11 Membres de la superfamille AP-1	55
Figure 12 Schéma récapitulatif du mécanisme d'action d'HBZ sur les voies de signalisation cellulaires.....	62
Figure 13 Représentation schématique des transcrits antisens des génomes proviraux d'HTLV et du VIH.....	63
Figure 14 Représentation chronologique de l'historique de l'interférence ARN	69
Figure 15 Représentation schématique de la voie des siARN	73
Figure 16 Exemples de miARN et leurs structures secondaires chez <i>C. elegans</i>	76
Figure 17 Organisation génomique des pri-miARN	79
Figure 18 Représentation schématique des domaines moléculaires des acteurs de la biogénèse des miARN.....	81
Figure 19 Biogénèse du pré-miARN.....	87
Figure 20 Structure de la protéine AGO2 humaine.....	90
Figure 21 Voie de biogénèse des miARN.	93
Figure 22 Mécanismes possibles de la répression post-transcriptionnelle des ARNm cibles induite par les miARN.....	103
Figure 23 Les miARN comme gènes suppresseurs de tumeurs ou oncogènes.....	108
Figure 24 Mécanismes de dérégulation de l'expression des miARN dans les cancers.....	111

Figure 25 miARN cellulaires prédits à interagir avec des séquences 3'UTR d'HTLV-1.....	117
Figure 26 Expression des miARN cellulaires dans (A) les cellules infectées par HTLV-1 et (B) les échantillons ATL.....	120
Figure 27 miARN identifiés comme des biomarqueurs de la progression de l'ATL.....	126
Figure 28 Diagramme schématique du plasmide rapporteur luciférase K30-3'-asLuc.....	129
Figure 29 Effet de HBZ sur la transcription antisens.	130
Figure 30 Rôle des partenaires d'HBZ dans l'activation de son propre promoteur.....	131
Figure 31 Effet des Jun sur l'activation transcriptionnelle du <i>LTR3'</i>	132
Figure 32 Effet de JunD et HBZ sur la transcription antisens.	133
Figure 33 Rôle de JunD dans l'activation de son propre promoteur par HBZ.	134
Figure 34 Rôle de JunD dans l'activation de son propre promoteur par HBZ.	135
Figure 35 Rôle des sites TxRE dans l'activation de la transcription sens par JunD et HBZ. .	136
Figure 36 Analyse de l'interaction éventuelle des hétérodimères JunD/HBZ sur la région U5 du <i>LTR3'</i>	137
Figure 37 Rôle des sites sp1 dans l'activation de la transcription antisens par HBZ et JunD.	139
Figure 38 Effet de la protéine Sp1 sur la transcription antisens induite par HBZ et JunD. ...	140
Figure 39 Effet d'HBZ sur la prolifération des fibroblastes immortalisés NIH3T3.....	141
Figure 40 Effet d'HBZ sur l'ancrage cellulaire au substrat.....	143
Figure 41 Représentation schématique du mécanisme de régulation du gène viral <i>hbz</i>	145
Figure 42 Principe de l'expérience de clivage par les miARN de l'ARNm rapporteur.....	149
Figure 43 Effet d'HBZ sur l'activité répressive des miARN cellulaires.....	150
Figure 44 Quantification des microARN par RT-PCR quantitative.	151
Figure 45 Expression des miARN dans les lignées infectées par HTLV-1.....	152
Figure 46 Effet d'HBZ sur la maturation des miARN	153
Figure 47 Expression des acteurs de la biogénèse dans les lignées infectées par HTLV-1. ...	155
Figure 48 Expression des acteurs de la biogénèse dans les cellules de patients.	156
Figure 49 HBZ mais pas Tax influe sur l'expression de Dicer.....	157
Figure 50 Domaine d'interaction d'HBZ impliqué dans la dérégulation de l'expression de Dicer.	159
Figure 51 Analyse par bioinformatique du promoteur de Dicer.	159
Figure 52 Effet des différentes protéines Jun en présence ou non d'HBZ sur la transcription de Dicer.	161
Figure 53 Effet d'HBZ sur la trans-activation du promoteur de Dicer induite par JunD.	162

Figure 54 Expression des gènes Tax, HBZ et Dicer durant la culture ex-vivo des cellules PBMC déplétées en T CD8+ des patients leucémiques (ATL) ou asymptomatiques (AC). ..	164
Figure 55 Représentation schématique du mécanisme d'inhibition globale des miARN par HBZ dans les cellules ATL.....	168
Figure 56 Schéma récapitulatif du Rôle et de la fonction de l'hétéodimère JunD/ HBZ dans l'expression d'HBZ et dans la régulation des miARN cellulaires	172
Figure 57 Analyse de la forme d'HBZ impliquée dans la transformation cellulaire	174
Figure 58 Effet des mutant HBZ sur la prolifération des fibroblastes immortalisés.....	175
Figure 59 Représentation schématique du gène <i>jund</i> et des isoformes JunD-FL et ΔJunD..	177
Figure 60 Analyse de l'expression des gènes AP-1 dans les cellules de patients.....	179
Figure 61 HBZ induit l'expression de la forme constitutivement activé de JunD.....	180
Figure 62 Effet des miARN endogènes sur le 3'UTR de JunD.....	184
Figure 63 Etapes pour l'analyse des microARN cellulaires	198
Figure 64 Protocole de transfection avec le JetPEI™	201
Figure 65 Principe du réactif du CCK8.....	204
Figure 66 Représentaion schématique de l'expérience de Soft Agar.....	205
Figure 67 Principe du CHIP.....	207
Tableau 1 Tableau récapitulatif des fonctions des protéines accessoires (p8, p12, p13 et p30) et de leur contribution à la persistance et à la pathogénèse virale. (<i>Adapté de Yasunaga and Matsuoka, 2007</i>).....	33
Tableau 2 Tableau récapitulatif des fonctions moléculaires des domaines d'HBZ. (<i>Adapté de (Zhao and Matsuoka, 2012)</i>).....	48
Tableau 3 Partenaires d'interaction d'HBZ de la famille AP-1 <i>Les domaines de liaison et les conséquences de ce partenariat sont indiqués.</i>	57
Tableau 4 microARN associés avec des cancers humains. <i>N/A: non renseigné; OG: oncogène; ST: suppresseur de tumeur (D'après Esquela-Kerscher and Slack, 2006).</i>	109
Tableau 5 Liste de miARN dérégulées dans les cellules infectées par HTLV-1 et des effets de Tax et HBZ sur leurs expressions (<i>Adapaté de Samprey, Van Duyne et al, 2012</i>).....	182
Tableau 6 Données clinicopathologiques des patients	190
Tableau 7 Tableau récapitulatif des différentes amorces utilisées. <i>Les expériences associées ainsi que le nom des gènes sont indiqués.</i>	194

Partie 1

Etudes bibliographiques

PDF Pro Evaluation

Introduction générale

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS) le cancer est l'une des principales causes de décès dans le monde, avec 7,6 millions de décès en 2008, soit près de 13% de la mortalité mondiale (OMS, 2013). D'après les projections, ce nombre devrait augmenter dans les prochaines années pour atteindre 13,1 millions de décès en 2030 à l'échelle mondiale (OMS, 2013). Le cancer est le résultat d'accumulations d'anomalies physiologiques et d'altérations de gènes qui conduisent à la transformation progressive de la cellule saine en cellule maligne. Ces altérations aboutissent à des défauts dans les circuits de régulations qui gouvernent la prolifération et l'homéostasie de la cellule normale. La prévention du cancer repose sur l'identification de ses causes et, logiquement, l'étiologie des cancers est l'un des principaux terrains de recherche de la biologie moderne. On dénombre plus de 100 types distincts de cancers, et parallèlement encore plus de sous-types différents de tumeurs pouvant être retrouvés dans des organes spécifiques (Hanahan and Weinberg, 2000). Cette complexité soulève de nombreuses questions sur le type et le nombre de circuits de régulations cellulaires dont l'altération mène au processus de cancérogenèse. Malgré les avancées réalisées ces dernières décennies, les mécanismes tumorigéniques restent encore à définir avec précision.

Les observations réalisées sur les cancers humains et les modèles animaux soutiennent que la cellule acquière des propriétés cancéreuses grâce au bouleversement de nombreux gènes (Hanahan and Weinberg, 2000). L'activation ou l'inhibition de ces gènes appelés oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs peut, par la modulation d'une ou plusieurs voies de signalisation et la modification d'activités transcriptionnelles, entraîner une cascade de conséquences de nature à modifier le phénotype cellulaire (Weinberg, 1995; Stewart and Kleihues, 2003). De nombreux agents physiques, chimiques ou biologiques peuvent moduler ces proto-oncogènes menant à leurs activations ou sur-activations et ainsi leurs conférant une

activité transformante. Symétriquement, les suppresseurs de tumeurs présentent des activités anticancéreuses et doivent être inactivés pour initier la transformation de la cellule.

Les fonctions des gènes impliqués dans l'oncogenèse sont variées, et incluent la signalisation cellulaire et la transduction du signal, la prolifération cellulaire, la mort cellulaire et la sénescence, la signalisation immune, la réparation de l'ADN, l'adhérence cellulaire ...etc. La plupart des gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes sont initialement décrits comme de l'ADN transcrit en ARN, puis traduit en protéines pour exercer leurs effets. De récentes données indiquent que de petites molécules d'ARN non codants, appelées microARN (miARN), pourraient également agir comme des suppresseurs de tumeurs et des oncogènes. Les miARN sont de petits ARN non codants codés par le génome avec un rôle crucial dans la régulation post-transcriptionnelle génique. A cela s'ajoute que, ces régulateurs contrôlent de nombreuses fonctions biologiques telles que la prolifération, la différenciation et l'apoptose avec un rôle majeur dans la détermination du destin cellulaire (Fabian, Mathonnet et al., 2009); il n'est donc pas étonnant que ces petits ARN soient impliqués dans le processus de carcinogénèse chez l'homme.

Il existe différents agents causatifs amenant au processus oncogénique. Beaucoup peuvent être classés comme des agents chimiques ou physiques qui endommagent directement ou indirectement l'ADN. Dans ce cas, se sont les échecs occasionnels de la machinerie de réparation de l'ADN qui, en affectant un gène impliqué dans l'étiologie du cancer, pourrait positionner la cellule sur la voie du processus d'oncogenèse.

Les agents infectieux (bactéries, parasites, protozoaires et virus) jouent un rôle crucial dans le développement des cancers et représentent l'une des principales causes de cancers (18% des cas dans le monde, CIRC). Depuis 1990, le nombre de publications scientifiques étudiant ces agents infectieux ont significativement augmenté et les infections virales ont été confirmées comme ayant un rôle étiologique distinct dans le développement des cancers chez l'homme.

Durant le 2 dernières décennies, l'implication des virus dans le processus oncogénique a permis une avancée majeure dans le domaine de la biologie des cancers. Ils ont révélé les fondations fonctionnelles de la base génétique du cancer et ont fourni un cadre conceptuel applicable non seulement aux cancers induits par les virus mais à tout le processus néoplasique (Butel, 2000). Par ailleurs, il a été estimé que plus de 15% des cancers chez l'homme ont une étiologie virale (zur Hausen, 1991 ; Parkin DM, Pisani P et al., 1999). En particulier, certains virus se sont révélés être de véritables facteurs causatifs dans de

nombreux cancers chez l'homme, tels que les virus de l'hépatite B et C responsables de carcinomes hépatocellulaires, le virus T-lymphotrope humain (HTLV-1) qui peut favoriser la survenue de la leucémie/lymphome T de l'adulte, le papillomavirus humain qui cause le cancer du col de l'utérus ou encore le virus de l'Epstein-Barr impliqué dans le développement de carcinomes et de lymphomes. Par conséquent, la pathogénèse de l'infection virale et la réponse de l'hôte sont intégrante à la compréhension de comment le cancer pourrait résulter de ce background. Les virus oncogènes établissent des infections chroniques et de longues périodes de latences sont la norme entre le temps de l'infection virale et l'apparition d'un cancer chez l'individu (Stewart and Kleihues, 2003).

Dans ces cancers qui ont une étiologie virale, les virus apparaissent comme étant nécessaire, mais pas suffisant, pour le développement tumoral. Cela s'explique par le fait que généralement les virus ne se comportent pas comme des carcinogènes, mais plutôt agissent comme des facteurs d'initiation ou de promotion (Zur Hausen, 1999). Des changements additionnels doivent ainsi s'accumuler pour compléter ceux induits par les fonctions virales afin d'inhiber les multiples voies régulatrices et les points de contrôles (checkpoints) de la cellule normale et permettre sa transformation complète. Les virus oncogènes peuvent être classés en 2 groupes selon leur matériel génétique : les virus oncogènes à ADN et les virus oncogènes à ARN (Butel, 2000). Ces virus présentent une diversité de mécanismes oncogéniques, néanmoins, on distingue deux catégories, les virus à effets directs et ceux à effets indirects (Zur Hausen, 1999). Les virus à actions directes comportent des protéines oncogènes qui jouent directement un rôle dans la transformation cellulaire et causent des tumeurs avec une courte période de latence après l'infection. Les autres, en opposition, n'ont pas d'oncogènes mais génèrent des conditions pathologiques qui favorisent la transformation cellulaire avec une longue période de latence (Zur Hausen, 1999; Stewart and Kleihues, 2003). Ces virus établissent des infections chroniques et pour se répliquer dans la cellule hôte la plupart s'intègre dans le génome cellulaire et doivent déréguler le cycle cellulaire, le métabolisme d'acides nucléiques ainsi que les mécanismes de détection et de reconnaissance du système immunitaire qui jouent un rôle dans la suppression tumorale. La persistance chronique de l'infection des virus oncogène peut ainsi mener au processus d'oncogénèse (Stewart and Kleihues, 2003).

Le 1^{er} rétrovirus humain étiologique d'un cancer découvert chez l'homme fut le virus HTLV-1 isolé en 1980. Des études intensives ultérieures ont montré que ce rétrovirus utilisait des protéines régulatrices et non structurales pour échapper à l'élimination immune, induire sa

réplication virale, et initier des événements menant à la transformation de la cellule infectée. Plus de 30 ans après la découverte de ce virus, le mécanisme précis de la pathogénèse induite par HTLV-1 reste encore évasif. La protéine Tax du HTLV-1 a été mise en avant comme étant responsable de l'activation du génome viral et identifiée comme l'onco-protéine majeure de la pathogénèse induite par HTLV-1, subséquemment elle est devenue le sujet de larges études. Néanmoins, les récentes études sur la pathogénèse et la persistance virale induite par HTLV-1 convergent toutes vers l'importance centrale de la protéine virale HBZ. Il a été démontré que HBZ était l'unique gène viral détectable dans toutes les cellules cancéreuses et qu'elle contribue à la prolifération cellulaire et est capable d'induire la transformation cellulaire (Satou Y, Yasunaga J et al., 2006; Fan, Ma et al., 2010).

Le potentiel oncogénique de HTLV-1 ne serait-il pas lié à la capacité de la protéine HBZ à déréguler de nombreuses voies de signalisation importantes pour l'intégrité cellulaire ? Ce changement de paradigme dans la recherche sur HTLV-1 pourrait fournir une nouvelle cible dans la prévention ou le traitement des pathologies chez l'homme associées à HTLV-1. Mieux appréhender le mécanisme de leucémogénèse induit par HTLV-1 passe par une meilleure compréhension des interactions des protéines virales avec les voies de signalisation cellulaires et surtout de la régulation des protéines virales elles-mêmes. Considérant l'expression exclusive de *hbz* mais surtout son maintien dans toutes les cellules ATL contrairement aux autres protéines virales, je m'intéresserais dans une première partie au mécanisme de régulation de l'expression de cette protéine. Nous montrerons que HBZ induit sa propre expression à travers une boucle d'autorégulation impliquant la protéine cellulaire JunD. Mais également que JunD agirait comme un régulateur positif de la régulation des cellules T infectées par HTLV-1.

L'émergence du rôle des miARN dans le développement tumoral et l'infection virale a suscité des investigations sur les interactions entre HTLV-1 et les réseaux de régulation des miARN (Grassmann and Jeang, 2008). L'altération des miARN dans le cycle de réplication de HTLV-1, et dans sa pathogénèse a été récemment montrée par différentes études (Pichler, Schneider et al., 2008; Yeung, Yasunaga et al., 2008; Bellon, Lepelletier et al., 2009; Rahman, Quann et al., 2012). Nous allons, donc, discuter dans une deuxième partie du lien entre l'expression de HBZ et la dérégulation des miARN dans les cellules ATL.

Chapitre 1

HTLV-1 et maladies associées

Le terme « virus » a été initialement utilisé dans les laboratoires de Dimitri Ivanovski et Martinus Beijerinck en 1890 pour décrire un « agent qui cause des maladies infectieuses ». La curiosité causée par ces « particules infectieuses » qui étaient plus petites que les bactéries s'est accrue durant les décennies suivantes. L'intérêt pour les rétrovirus remonte à 1904 quand le premier Virus de l'Anémie Infectieuse Equine (VAIE) a été identifié (Vallée and Carré, 1904). Des infections rétrovirales ont été retrouvées dans une vaste majorité d'organismes pluricellulaires au cours des années, notamment dans des groupes aussi distincts que les insectes, les mollusques et les vertébrées (Coffin, 1996). La majorité des rétrovirus oncogènes sont des virus à ARN responsables de leucémies ou de sarcomes. La découverte en 1970 par Howard Temin et David Baltimore de la reverse transcriptase, l'enzyme clef de la famille des rétrovirus, a accentué la recherche en rétrovirologie et confirmé l'hypothèse « provirus » proposé par Temin (Temin and Mizutani, 1970). Cette dernière stipule que ces virus oncogènes à ARN se répliquent en convertissant leur génome en ADN s'intégrant dans le génome de la cellule hôte, allant ainsi à l'encontre du dogme de la biosynthèse à sens unique de l'ADN vers l'ARN puis la protéine.

La découverte du virus lymphotrope T humain de type 1 (HTLV-1) a permis l'établissement du rôle des rétrovirus dans les pathologies humaines. L'association du HTLV-1 avec une leucémie chez l'homme, a ouvert la porte à de nombreuses investigations sur ces agents infectieux et initié le développement de nombreux domaines de la médecine tels que l'épidémiologie, la virologie, la biologie moléculaire et l'oncologie. Des études ont, ensuite, caractérisés d'autres virus lymphotropiques des cellules T chez l'homme (HTLV-2 en 1982, HTLV-3 et HTLV-4 en 2005). Depuis, la famille des rétrovirus est devenue l'une des plus

étudiée, surtout depuis la fameuse pandémie du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) qui a émergé dans les années 1980 et qui affecte près de 34 millions de personnes en 2011.

I. HTLV-1

La carte d'identité du virus HTLV-1 se présente comme suit (Figure 1):

HTLV-1 (Human T-cell Leukemia Virus type 1)	
Famille : Retroviridae	Sous Famille : Orthoretrovirinae
Genre : Deltarétrovirus	Taille : 110-140 nm de diamètre
Date de découverte : 1979	
Origine : Afrique-Asie puis dissémination vers les autres régions endémiques suite aux commerces et aux trafics d'esclaves durant le 16 ^{ème} siècle (Gallo et al, 1983)	
Virus Enveloppé avec une capsidie icosaédrique	
Génome : 2 molécules d'ARN monocaténaïres, de polarité positive 9000pb Intégration dans le noyau sous forme d'ADN proviral	

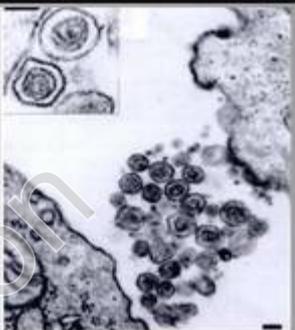


Figure 1 Carte d'identité du virus HTLV-1. L'image en haut à droite est une photographie en microscopie électronique de la particule virale d'HTLV-1 montrant des amas de particules virales visibles dans l'espace extracellulaire de la cellule productrice d'HTLV-1 (barre = 100nm).

I.1. Historique et épidémiologie

L'histoire d'HTLV-1 commence en 1979, suite à son identification par une équipe américaine dirigée par le Professeur Robert Gallo à partir d'une culture de lymphocytes T CD4+ issue d'un patient ayant une hémato dermatie T, considérée initialement comme un lymphome T cutané avec une phase leucémique (Poiesz, Ruscetti et al., 1980). De façon indépendante, un virus identique fut isolé au Japon quelques mois plus tard dans une lignée de lymphocytes T établie à partir du sang d'un patient ayant une leucémie/lymphome T de l'adulte (ATL) (Yoshida, Miyoshi et al., 1982). Cette lymphoprolifération maligne T avait été décrite cliniquement dès 1977, à partir d'un cluster géographique de leucémies dans le sud-

ouest du Japon, par l'équipe de Takatsuki (Uchiyama, Yodoi et al., 1977; Takatsuki, 2005). Le virus japonais fut tout d'abord appelé ATL, puis il fut rapidement établi que ATL et HTLV-1 ne correspondaient qu'à un seul et même rétrovirus, et l'appellation HTLV-1 fut conservée. Subséquemment l'association entre l'infection par ce virus et l'ATL fut établie, faisant d'HTLV-1 le premier onco-rétrovirus humain.

En 1985, des études sérologiques et épidémiologiques réalisées en Martinique en partenariat avec l'institut Pasteur démontraient que l'infection par HTLV-1 était aussi associée à la paraparésie spastique tropicale, nommée ultérieurement aussi myélopathie associée à HTLV-1 (TSP/HAM), une neuromyélopathie progressive affectant le système nerveux central (Gessain, Barin et al., 1985; Osame, Usuku et al., 1986). Depuis, d'autres pathologies inflammatoires telles que l'uvéite ou la dermatite infectieuse ont également été associées à HTLV-1, suite à la détection d'une concentration importante de lymphocytes T infectés au niveau des tissus correspondants. Les cellules infiltrantes correspondent dans la plupart de ces maladies inflammatoires à des lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺ ainsi que des macrophages en faible proportion (Saito, Higuchi et al., 2002; Taylor and Matsuoka, 2005; Nomori, Mori et al., 2011; Kawabata, Higashimoto et al., 2012).

Un autre rétrovirus humain nommé HTLV-2 a été identifié en 1982 à nouveau dans le laboratoire de R. Gallo, à partir d'une culture de cellules spléniques d'un patient ayant une hémopathie maligne considérée initialement comme une forme variante de « leucémie T à tricholeucocytes » (Kalyanaraman, Sarngadharan et al., 1982). Ce virus partage plus de 50% d'identité génétique avec HTLV-1 mais diffère par certains aspects épidémiologiques et pathogéniques (Kalyanaraman, Sarngadharan et al., 1982). Il ne semble être associé qu'à de rares cas de neuromyélopathies primitives proches des TSP/HAM (Kalyanaraman, Sarngadharan et al., 1982). Deux autres souches d'HTLV, les virus HTLV3 et HTLV4, ont été découverts récemment par PCR au sud Cameroun chez des personnes ayant des réactions HTLV indéterminées (Calattini, Chevalier et al., 2005; Wolfe, Heneine et al., 2005). A ce jour, aucune pathologie n'a été associée avec l'infection par ces deux virus (Mahieux and Gessain, 2005; Duong, Jia et al., 2008; Thomas, Perzova et al., 2010) et on ne dénombre que 4 individus infectés par HTLV-3 (Calattini, Chevalier et al., 2005; Calattini, Betsem et al., 2009; Zheng, Wolfe et al., 2010) contre une unique souche humaine pour le type 4 au Cameroun (Wolfe, Heneine et al., 2005).

L'origine suspectée de l'HTLV-1 est le STLV-1, équivalent simien de l'HTLV-1, isolé en 1982. Le STLV-1 est endémique chez de nombreuses espèces de singes de l'Ancien

Monde. Des cas de leucémie ou de lymphome T similaire à l'ATL ont été décrits chez des singes infectés par le STLV-1, mais aucun cas de neuromyélopathie similaire à la TSP/HAM n'a été rapporté. Selon les spéculations, les HTLV ont dérivé du STLV à la suite de transmissions virale inter-espèces (du singe à l'homme) par des évènements indépendants il y a $50000 \pm 10,000$ ans ; résultant en la formation de plusieurs sous-types dans le monde.

I.2. Répartition géographique

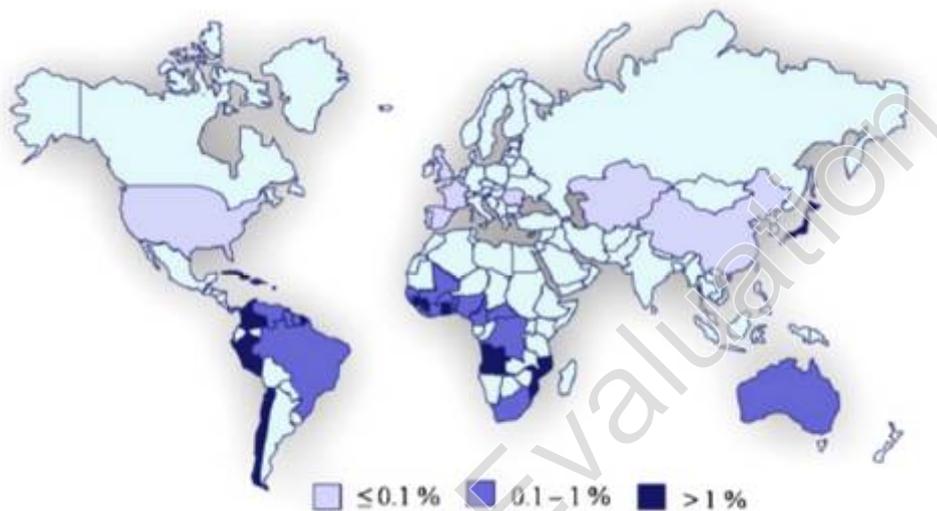


Figure 2 Prévalence du virus HTLV-1. Répartition des individus infectés par le virus HTLV-1 à travers le monde (Adapté de Bai and Nicot, 2012)

HTLV-1 n'est pas réparti de façon ubiquitaire dans le monde, mais présent sous forme de foyers souvent proches de zones desquelles le virus est quasiment absent (Mueller, 1991; Gessain, 1996). Même si le nombre exact d'individus séropositifs n'est pas connu, les épidémiologistes estiment actuellement que 10 millions de personnes seraient infectées par HTLV-1 dans le monde avec des zones d'endémie élevée dont la séoprévalence est $>2\%$ chez l'adulte et pouvant atteindre 20-40% chez les personnes de plus de 50 ans dans certains clusters spécifiques (Gessain and Cassar, 2012). Ces principales zones endémiques sont le Japon, le bassin Caraïbéen, l'Afrique central et du sud, une partie de certaines régions du Moyen-Orient et de Mélanésie et des régions aborigènes australiennes (TARC, 1996). En Europe, la Roumanie semble aussi constituer une zone d'endémie virale et HTLV-1 est également présent en Amérique du Nord où l'infection est épidémique (Figure 2). Dans ces

zones, de 0,5 à 50 % des sujets, selon le sexe, l'âge, le groupe ethnique et l'origine géographique, possèdent des anticorps spécifiquement dirigés contre les antigènes viraux d'HTLV-1. L'origine de cette répartition géographique surprenante est encore sujette à débat. Cependant, il semble établi qu'un effet fondateur dans certains groupes isolés, suivi d'une transmission efficace peut expliquer l'existence des foyers isolés. Enfin, il est clair que l'origine du virus dans les Amériques et la région Caraïbe est due aux mouvements, lors de la traite des esclaves, de populations d'origine africaine infectées par HTLV-1 (Gessain, 2011). A noter que malgré des environnements socioéconomiques et culturels différents, la séroprévalence à HTLV-1 augmente graduellement avec l'âge (après 30–40 ans), particulièrement chez les femmes, dans les zones endémiques (Oguma, Imamura et al., 1992; Gonçalves, Proietti et al., 2010).

I.3. Transmission virale

Le virus HTLV-1 se transmet assez difficilement dans les populations humaines et nécessite avant tout des contacts répétés. Néanmoins, on distingue 3 voies de propagation du virus dans les populations :

- Transmission de la mère à l'enfant

C'est la voie majeure de propagation d'HTLV-1 et probablement la principale dans les pays d'endémie. La transmission de la mère à l'enfant se produit essentiellement par l'allaitement avec un taux de transmission d'environ 10 à 30% (Hino, Sugiyama et al., 1986; Ando, Nakano et al., 1987; Takahashi, Sano et al., 1991; Takezaki, Tajima et al., 1997; Wiktor, Pate et al., 1997). Les facteurs de risques liés à ce mode de transmission sont, outre un allaitement prolongé, un titre d'anticorps anti-HTLV-1 élevé chez la mère ainsi qu'une charge provirale HTLV-1 élevée dans le sang et le lait maternel (Ureta-Vidal, Angelin-Duclos et al., 1999; Hino, 2011).

- Transmission parentérale

Ce type de transmission fait appel à des contacts avec des fluides corporels tels que le sang ou les composés sanguins contenant des lymphocytes T infectés (Watanabe, 2011). La transfusion de plasma ne permet pas quant à elle de transmettre le virus, car ce dernier est avant tout présent dans les lymphocytes T et n'est que très peu présent sous forme libre

circulante. Une séroconversion a été recensée chez 15 à 60% des receveurs de produits sanguins cellulaires issus de donneurs de sang séropositifs (Okochi, Sato et al., 1984; Inaba, Sato et al., 1989) d'où la mise en place de procédures de screening particulières dans les régions endémiques développées (Etats-Unis, Japon, Antilles françaises). L'HTLV-1 peut aussi se transmettre chez les toxicomanes aux drogues intraveineuses, toujours par l'intermédiaire de cellules lymphoïdes infectées.

- Transmission sexuelle

La transmission sexuelle du virus est possible en raison de la présence du virus HTLV-1 dans les sécrétions génitales des individus infectés ; mais elle est considérée comme une transmission faible nécessitant des contacts répétés (Stuver, Taehibana et al., 1993).

I.4. Modèle d'infection

HTLV-1 a la capacité d'infecter *in vitro* aussi bien des cellules lymphoïdes que non lymphoïdes tels que les lymphocytes T, les lymphocytes B, les macrophages et les cellules dendritiques (Macatonia, Cruickshank et al., 1992; Koyanagi, Itoyama et al., 1993; Nagai, Brennan et al., 2001; Jones, Petrow-Sadowski et al., 2008). Néanmoins, son tropisme préférentiel inclut *in vivo* les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ ainsi que les cellules dendritiques ; et il ne peut transformer que les lymphocytes T primaires.

Considérant les 3 méthodes de transmission, la contamination s'effectue alors par l'échange direct des liquides corporels donc par contact entre une cellule infectée et une cellule saine. En effet, contrairement aux autres rétrovirus, le virion libre du HTLV-1 présente la particularité d'être très peu infectieux, et de se transmettre presque exclusivement par contact cellule-cellule via une synapse virologique. Récemment, d'autres modes de transmission ont été décrits mettant en jeu les cellules dendritiques, des conduits cellulaires probablement une variante de la synapse virologique et des « biofilms viraux » (Pique and Jones, 2012) (Figure3).

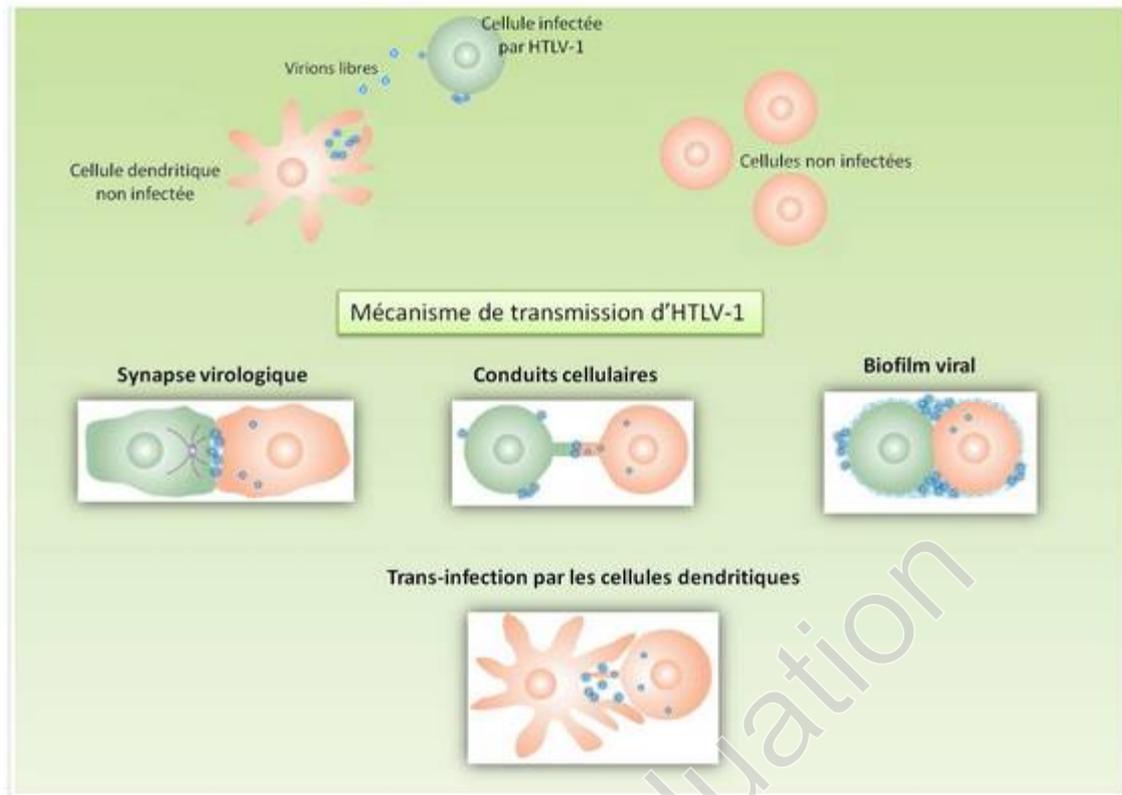


Figure 3 Représentation schématique des différents mécanismes de transmissions cellule-cellule d'HTLV-1.

- La synapse virologique

Les études microscopiques réalisées ont montré que, lors du contact entre une cellule T infectée par HTLV-1 et une cellule non infectée s'effectue la formation d'une synapse virologique qui est formée à la jonction entre les deux cellules par la polarisation du centre d'organisation microtubulaire (MTOC pour Microtubule Organizing Center) et le cytosquelette de la cellule infectée (Igakura, Stinchcombe et al., 2003) (Figure 3). Les protéines virales et le génome viral s'accumulent au niveau du point de contact intercellulaire et sont par la suite transmis à la cellule non infectée (Igakura, Stinchcombe et al., 2003; Majorovits, Nejmeddine et al., 2008).

- Les conduits cellulaires

Des observations réalisées par microscopie électronique, récemment, ont montré que la transmission des particules virales d'une cellule infectée à une cellule non-infectée peut s'effectuer aussi *via* des extensions membranaires transitoires appelées «conduits cellulaires».

De plus, les particules virales se trouvent concentrées au niveau des points d'interactions de ces conduits (Van Prooyen, Gold et al., 2010). Ces dernières peuvent se former soit entre deux conduits soit entre un conduit et une cellule, suggérant que cette voie de transmission pourrait être une variante de la synapse virologique.

- Les « biofilms viraux »

Récemment, une étude a montré que la transmission du HTLV-1 par des synapses virologiques met en jeu des structures extracellulaires complexes, générées par les lymphocytes T infectés, induites par le virus et similaires aux biofilms bactériens (Pais-Correia, Sachse et al., 2010) (Figure 3). Ces « biofilms viraux » sont formés de particules virales infectieuses et de protéines de la matrice extracellulaire riches en résidus glycosylés. Ils sont présents à la surface des cellules T infectées productrices de virus, et se transmettent à d'autres cellules lors de contacts cellulaires. L'élimination du biofilm viral de la surface de cellules infectées diminue fortement leur capacité à infecter d'autres cellules (Pais-Correia, Sachse et al., 2010). Néanmoins, ces résultats sont à prendre avec prudence car seule une étude a démontré l'existence des biofilms et le mécanisme impliqué reste à confirmer.

- Les virions libres

La faible infectiosité du virion libre du HTLV-1 a été longtemps renforcée par l'incapacité de ce dernier à infecter ou transformer des cellules T *in vitro* (Feuer and Green, 2005). Mais également *in vivo*, étant donné que les études d'infection post-transfusion indiquent que la transmission d'HTLV-1 exige un passage cellulaire (Donegan, Lee et al., 1994). Ce n'est qu'en 2008, que les travaux de Jones viennent ébranler cette notion en montrant que les cellules dendritiques primaires plasmacytoïdes et myéloïdes peuvent être infectées efficacement et d'une manière reproductive par les virions libres (Jones, Petrow-Sadowski et al., 2008). Durant la transmission par les muqueuses, ce type de cellule pourrait jouer un rôle clé dans la diffusion précoce du virus. En effet, durant les premiers jours après l'exposition virale, les cellules dendritiques capturent et transfèrent les virions aux cellules T CD4⁺ (trans-infection). Par la suite, les cellules T sont principalement infectées par transmission de virus produit de novo par les cellules dendritiques infectées (cis-infection) (Boxus and Willems, 2009).

Le taux de réplication d'HTLV-1 étant généralement faible, HTLV-1 pourrait combiner de multiples stratégies pour établir une transmission virale efficace directement entre cellules.

L'entrée du HTLV-1 dans les cellules fait appel à des interactions spécifiques entre l'enveloppe et des molécules de la surface cellulaire indiquant que les récepteurs sont des molécules communément exprimées à la surface des différents types de cellules infectés par le virus. La composition du complexe protéique permettant à HTLV-1 d'infecter une cellule est toujours l'objet de débat. Cependant trois types de molécules ont été identifiées comme étant importantes pour l'entrée d'HTLV-1 dans la cellule en jouant un rôle coordonné: les héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG), la neuropiline1 (NRP-1) et le transporteur de glucose-1 (Glut1) (Manel, Kim et al., 2003; Ghez, Lepelletier et al., 2006; Lambert, Bouttier et al., 2012). Récemment, les événements d'entrée ont été spécifiés et le modèle proposé est le suivant (Lambert, Bouttier et al., 2012): L'attachement du virus est permis par l'interaction de la protéine d'enveloppe gp46 avec la molécule de HSPG. Des complexes gp46/HSPG lient ensuite la protéine NRP-1 induisant des changements de conformation de la molécule Glut1 et permettant son interaction avec la gp46. Enfin, des interactions entre ce complexe et Glut-1 entraînent l'exposition des peptides de fusion de la gp46 qui, ainsi exposés, sont ancrés au niveau de la membrane cellulaire, induisent la formation de pores et par la suite la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme cellulaire (Lambert, Bouttier et al., 2012).

I.5. Stratégie de réplication d'HTLV-1

Comme la plupart des rétrovirus, suite à l'entrée dans la cellule hôte, la capside virale relarguée est dégradée. L'ARN génomique libéré est alors rétro-transcrit par la RT en ADN complémentaire puis en ADN double brin, lequel est ensuite intégré dans l'ADN chromosomal de l'hôte par l'intégrase viral au cours de la mitose suite à la rupture de l'enveloppe nucléaire (Green and Chen, 1994; Goff, 2001). Une fois intégrée, L'ADN proviral est dépendante de la machinerie cellulaire de l'hôte et se comporte comme un gène cellulaire. Il est transcrit en ARNm par l'ARN polymérase II, dont une partie va être non épissée ce qui permettra à la fois l'expression de *gag* et *pol*, tandis qu'une autre partie épissée permettra l'expression de certains gènes, notamment *env*. Les précurseurs viraux mais également deux molécules d'ARN viral produits ainsi que d'autres composants viraux et cellulaires vont migrer au niveau de la membrane plasmique et bourgeonner. Les nouvelles

particules virales constituées sont relarguées dans le milieu extracellulaire, où une étape de maturation prend place.

Comment HTLV-1 persiste indéfiniment dans les cellules hôtes infectées malgré la présence d'une réponse immune réactive est encore une intrigue. L'opinion actuelle au sujet de ce paradoxe postule que le virus se réplique rarement via la voie infectieuse c'est-à-dire l'infection de novo de cellules non infectées par les cellules infectées mais plutôt via la mitose des cellules infectées c'est-à-dire l'expansion clonale (Asquith and Bangham, 2008). L'infection de novo se fait essentiellement via les contacts cellules-cellules et rarement par les particules virales circulantes. Néanmoins, quelque soit l'un ou l'autre des procédés, il requière l'expression des protéines virales structurales et l'assemblage des particules virales. Ce type d'expansion virale contribue à l'établissement initial d'une population de cellules infectées. Cependant les cellules qui expriment Tax peuvent être éliminées par la réponse cytotoxique CTL (cytotoxic T lymphocyte) mise en place par l'immunité de l'hôte contre HTLV-1. Suite à l'établissement de cette réponse immunitaire anti-HTLV-1, le virus se réplique principalement par l'intermédiaire de sa seconde forme de réplication, l'expansion clonale des cellules infectées (Etoh, Tamiya et al., 1997; Cavrois, Leclercq et al., 1998).

Afin d'échapper à la réponse immune anti-HTLV-1 mise en place par l'hôte, la prolifération des lymphocytes infectés se fait par division cellulaire (Etoh, Tamiya et al., 1997; Cavrois, Leclercq et al., 1998). Les protéines virales accessoires et régulatrices sont capables de stimuler la progression du cycle cellulaire maintenant ainsi la charge provirale dans l'hôte. L'analyse de la dynamique des lymphocytes T chez les sujets infectés par HTLV-1 montre que la prolifération des cellules T est accrue par rapport aux sujets non infectés (Asquith and Bangham, 2008). Ce burst prolifératif est corrélé avec l'expression des protéines virales *ex vivo* (Asquith and Bangham, 2008). Une étude récente a également révélé que le virus s'intègre préférentiellement dans des régions génomiquement actives (Salcedo-Cifuentes, Cabrera et al., 2009).

Il a été montré qu'après la phase polyclonale initiale se met en place une phase oligoclonale laquelle résulte en la sélection d'un clone unique avec de grandes propriétés invasives. Ainsi la charge provirale est due à l'expansion clonale du virus plutôt qu'à la propagation *de novo*.

I.6. Structure et organisation génomique d' HTLV-1

HTLV-1 appartient au genre des Deltarétrovirus et se classe dans la sous famille des Orthorétrovirus qui inclut les autres HTLV, HTLV-2,-3 et -4 mais également le virus de la leucémie bovine (BLV).

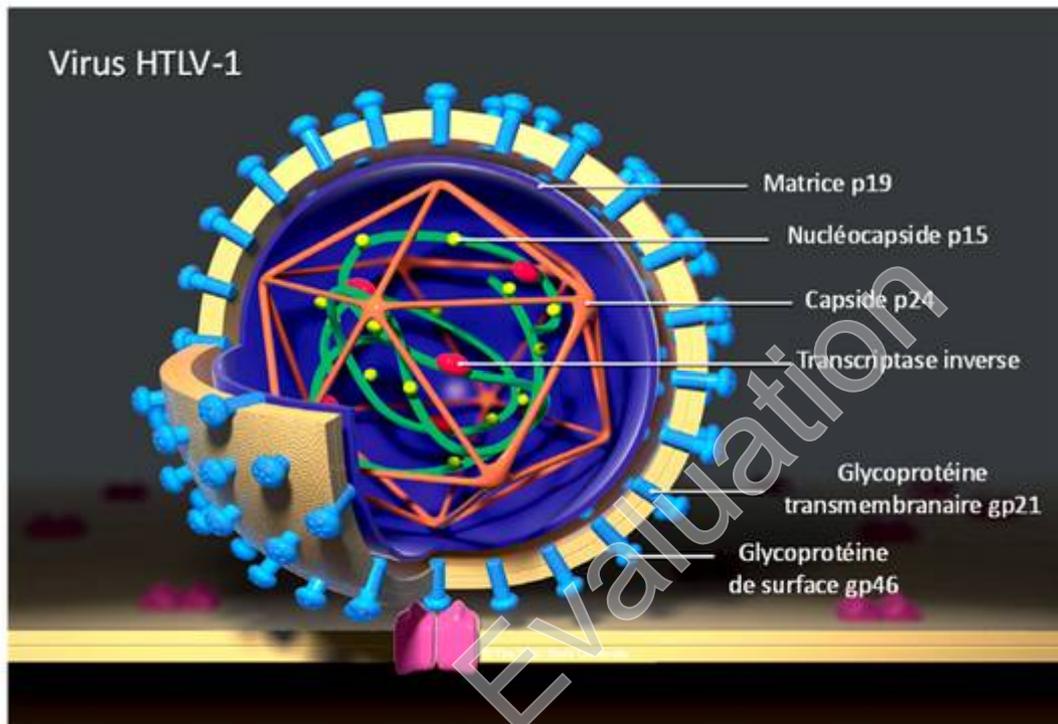


Figure 4 Structure de la particule virale ou virion d'HTLV-1 (Adapté de Lairmore, Haines et al, 2012)

HTLV-1 se présente sous forme de virions sphériques enveloppés contenant une nucléocapside qui protège le génome viral (Figure 4). La particule virale ou virion d'HTLV-1 contient deux molécules d'ARN (acide ribonucléique) génomiques associées à des protéines de nucléocapside (NC/p15). L'ensemble est entouré d'une capside icosaédrique (CA/p24) au sein de laquelle se trouvent les différentes enzymes virales: la transcriptase inverse (RT), l'intégrase (IN) et la protéase (PR). La matrice (p19) entoure et protège l'ensemble et est elle-même recouverte de l'enveloppe constituée d'une bicouche lipoprotéique dérivée de la membrane plasmique de la cellule hôte. Dans cette bicouche, sont enchâssées les glycoprotéines de l'enveloppe (Env) composée de deux sous-unités ; la glycoprotéine de

surface gp46 (SU) et la glycoprotéine transmembranaire gp21 (TM) (Lairmore, Haines et al., 2012).

I.7. Organisation génomique d'HTLV-1

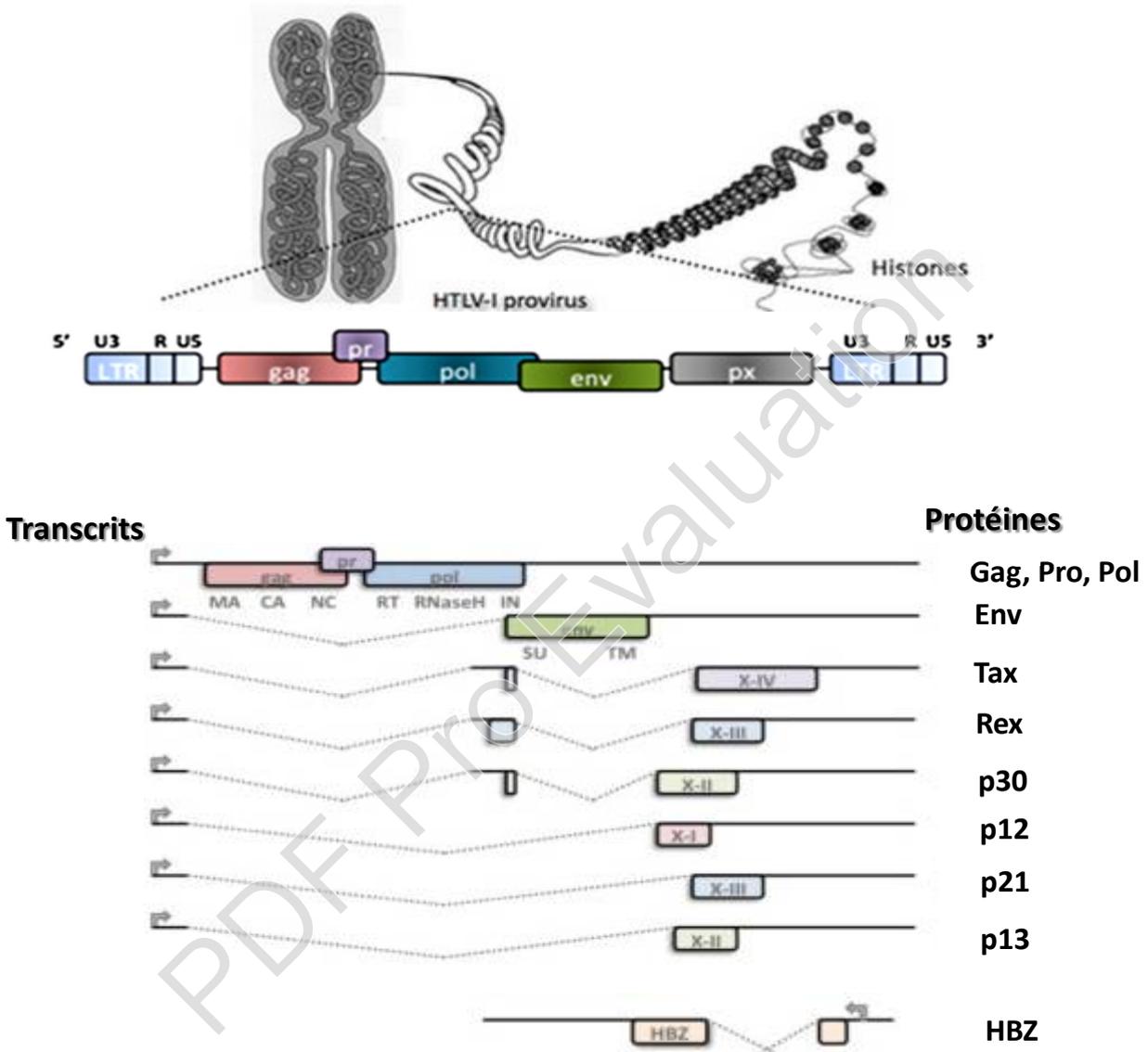


Figure 5 Représentation schématique de l'ADN proviral d'HTLV-1, des ARNm viraux et des protéines correspondantes. Les introns des ARNm épissés sont représentés en pointillés et les exons en traits pleins

La première séquence provirale complète d'un HTLV-1 a été réalisée en 1983 à partir d'une souche provenant d'un patient ayant une ATL (Seiki, Hattori et al., 1983). Sous forme

intégré (provirus) dans les cellules infectées, le génome de HTLV-1 est d'environ 9 000 paires de bases et est encadré aux extrémités 5' et 3' par deux séquences LTR (Long Terminal Repeat) (Lairmore M and Franchini G, 2007). Les LTR sont des unités non codantes constitués de trois régions distinctes (U3 (Unique 3), R (repeated) et U5 (Unique 5)) qui contiennent les éléments cis-acting essentiels à l'expression des gènes viraux : sites de liaison des facteurs de transcription, sites d'initiation et de terminaison de la transcription, sites de polyadénylation et d'épissage ainsi que de transfert du brin durant la transcription inverse.

Comme les autres rétrovirus, il possède les gènes *Gag*, *Pro*, *Pol* et *Env* qui codent pour des protéines indispensables à la formation de particules virales infectieuses (Figure 5):

- Le gène *gag* code pour un polyprécurseur de 53 kD (pr53) dont le clivage permet d'obtenir les protéines de capsid (CA), de nucléocapsid (NC) ainsi que celle de la matrice virale (MA).
- Le gène *pro* (dont le cadre de lecture est à cheval en 5' sur la région *gag* et en 3' sur la région *pol*) code pour la protéase virale (PR), nécessaire à la maturation des protéines. PR est responsable, après autocatalyse de son propre clivage, du processing du précurseur p53 en produits *gag* matures (Nam, Kidokoro et al., 1988).
- Le gène *pol* code pour deux enzymes virales : la reverse transcriptase (RT) et l'intégrase (IN). La RT possède une activité ADN polymérase ARN et ADN dépendant associée à une activité RNase H qui permet la conversion de l'ARN génomique en une molécule d'ADN double brin (Trentin, Rebeyrotte et al., 1998). IN intervient après la transcription inverse pour permettre l'intégration de l'ADN viral néosynthétisé dans le génome de la cellule hôte. Elle est responsable du clivage de deux nucléotides à l'extrémité 3' de chaque brin de la molécule d'ADN proviral nécessaire aux étapes d'intégration (Seiki, Hattori et al., 1983).
- *Env* est synthétisé sous la forme d'un précurseur transmembranaire de 61kD (gp61). Ce précurseur permet l'expression des deux glycoprotéines de surface: gp46 et gp21 (Hattori, Kiyokawa et al., 1984), retrouvées au niveau de l'enveloppe du virus et permettent l'entrée dans la cellule hôte. L'enveloppe est le premier élément qui interagit avec la cellule cible, elle présente donc un rôle crucial.

Cependant, HTLV-1 est un rétrovirus dit complexe, car, en plus de ces gènes communs aux autres rétrovirus, son génome contient une région supplémentaire localisée entre le gène *env* et le LTR en 3' du génome viral, nommé pX (Franchini, Fukumoto et al., 2003) (Figure 5). Sous contrôle du promoteur localisé dans le LTR5', par un mécanisme d'épissage alternatif et de codons initiateurs internes, il peut ainsi produire plusieurs protéines codées par des cadres ouverts de lecture (ORF) dans la région pX (Franchini, Fukumoto et al., 2003). On y trouve des gènes codants pour les protéines régulatrices Tax et Rex (Figure 5). Tax agit *in trans* pour activer l'initiation de la transcription à partir du promoteur viral dans le LTR 5' et Rex régule post-transcriptionnellement l'expression des gènes viraux en facilitant l'export cytoplasmique des ARNm viraux partiellement ou non épissés (Younis and Green, 2005). Dans cette région, HTLV-1 arbore également des gènes codants pour des protéines dites accessoires : p8, p12, p13, p30 (Azran, Schavinsky-Khrapunsky et al., 2004; Matsuoka, 2005) (Figure 5). Bien qu'initialement identifiées comme des protéines non essentielles pour l'infection *in vitro* et la transformation des cellules T, ces protéines accessoires se sont révélées être importantes pour l'infektivité virale, le maintien du cycle de vie du virus et la charge provirale *in vivo*, mais également l'activation de la cellule et la régulation de la transcription des gènes viraux (Albrecht and Lairmore, 2002; Franchini, Fukumoto et al., 2003; Nicot, Harrod et al., 2005; Edwards, Fenizia et al., 2011) (Tableau 1). Le LTR3' constitue aussi un promoteur viral qui permet de transcrire, à partir d'un ORF dit « antisens » localisé sur le brin complémentaire de la région pX, l'ARNm codant une protéine régulatrice, HBZ (HTLV-1 Basic leucine Zipper, p25) (Gaudray, Gachon et al., 2002).

Protéine	Taille	Localisation	Fonctions	
p8	8kDa	Synapse virologique	Inhibition de la signalisation du TCR (Anergie des cellules infectées) Transfert de Gag et Env via les conduits intercellulaires	Infectivité virale Latence virale Echappement immun
p12	12kDa	Endomembrane: Golgi & Réticulum endoplasmique	Inhibition de la présentation antigénique (interaction avec les molécules du CMH-I) Altération de la capacité d'interaction entre les cellules de l'immunité Interaction avec le récepteur de l'IL-2	Echappement immun Prolifération
p13	13kDa	Membrane mitochondriale interne Noyau	Modification de la polarité mitochondriale Interfère avec le complexe Tax/CBP/p300 (Interaction avec Tax)	Prolifération Latence virale
p30	30kDa	Noyau	Inhibition de l'export nucléaire de l'ARNm Tax/Rex Inhibition de la transcription virale (interfère avec le complexe Tax/CBP/p300) Altération du cycle cellulaire Inhibe la réparation de l'ADN	Latence Virale Transformation Survie cellulaire

Tableau 1 Tableau récapitulatif des fonctions des protéines accessoires (p8, p12, p13 et p30) et de leur contribution à la persistance et à la pathogénèse virale. (Adapté de Yasunaga and Matsuoka, 2007).

À l'exception d'un seul d'entre eux (*hbz*), tous les messagers viraux, non épissés (*gag*, *pol*), simplement épissés (*env*, *p12*, *p13*) ou doublement épissés (*tax*, *rex*, *p30*) sont donc transcrits à partir du LTR5'. La région U3 du LTR 5' contient trois séquences répétées correspondant à des sites de réponse à l'AMPc viraux (séquences nommées vCRE, cAMP-responsive element) ou éléments de réponse à Tax, TxRE (Tax-responsive elements) sur lesquelles sont recrutés par Tax les facteurs de transcription CREB/ATF puis les coactivateurs de transcription CBP/p300 (Zhao and Giam, 1992; Kwok, Laurance et al., 1996; Journo, Douceron et al., 2009) (Figure 6). Le recrutement de CBP/p300 sur le promoteur viral induit la modification des histones présents par leurs acétylation et ainsi la stimulation de la transcription virale via la machinerie de transcription cellulaire (polymérase de type II cellulaire) (Journo, Douceron et al., 2009). La régulation de la transcription d'*hbz*, médiée par le LTR 3', fait quant à elle intervenir les facteurs cellulaires Sp1 (Yoshida, Satou et al., 2008).

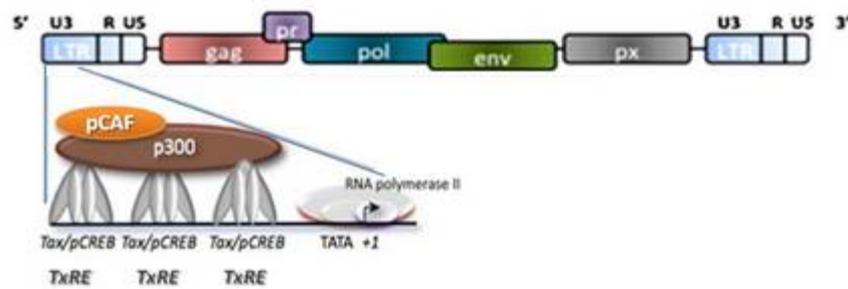


Figure 6 Représentation schématique de l'activation de la transcription à partir du LTR5'

Parmi ces protéines virales, les propriétés oncogéniques clés d'HTLV-1 ont été attribuées à Tax et HBZ qui apparaissent jouer des rôles importants dans la persistance virale et la pathogénèse de l'ATL (Bex, Murphy et al., 1999; Matsuoka and Green, 2009; Lodewick, Lamsoul et al., 2011).

II. La leucémie des cellules T chez l'adulte (ATL)

La plupart des individus porteurs du virus HTLV-1 ne développe aucune manifestation clinique majeure et reste donc asymptomatique. De façon surprenante, seul 2 à 10% des personnes infectées développent au cours de leur vie une des maladies associées à HTLV-1 (Lairmore and Franchini, 2007). Parmi elles, 2.1% (chez les femmes) à 6.6% (chez les hommes) des sujets infectés progresseront vers une ATL, avec une incidence de l'ordre d'un cas par an pour 1000 personnes infectées. Malgré tout, il est à noter que plus de 700 cas d'ATL sont diagnostiqués chaque année au Japon et qu'environ 50 à 60 cas sont vus, chaque année, aux Antilles françaises et en Guyane (Gérard, Lepere et al., 1995; Arisawa, Soda et al., 2000; Besson, Gonin et al., 2001).

La période de latence clinique de l'infection initiale jusqu'au début de l'ATL est de l'ordre de 30 à 50 ans. Il s'agit donc d'une maladie de l'adulte qui touche, principalement, selon les études épidémiologiques les individus infectés durant l'enfance (Kondo, Kono et al., 1987; Murphy, Figueroa et al., 1989). L'ATL est une leucémie agressive caractérisée par la prolifération monoclonale ou oligoclonale des cellules T CD4+, activées (CD25+), qui

contiennent, intégrés de façon clonale, un ou plusieurs provirus HTLV-1. (Wattel, Cavrois et al., 1996; Gessain, 2011).

La diversité des caractéristiques cliniques et des pronostics chez les patients atteints de cette maladie a mené à sa classification en 4 sous-types: chronique, indolente, leucémique et lymphomateuse définis selon l'organe impliqué, les taux de lactate déhydrogénase (LDH) et de calcium (Tsukasaki, 2012; Tsukasaki and Tobinai, 2013). Les deux premières (chronique et indolente) représentent les formes les moins agressives de la pathologie tout en ayant la capacité d'évoluer vers les formes aiguës (leucémique ou lym

phomateuse) en seulement quelques mois (Johnson, Harrod et al., 2001). La médiane de survie de ces formes aiguës varie entre 6 mois et 1 an et elles se traduisent cliniquement par la survenue d'une lymphoadénopathie associée fréquemment à une hépatosplénomégalie, une hypercalcémie parfois révélatrice d'une leucocytose et des lésions cutanées variées dues à l'infiltration de cellules tumorales (Gonçalves, Proietti et al., 2010).

Les patients ATL ont des cellules lymphoïdes atypiques avec un phénotype T-helper et anormalement dentelées ou des noyaux multilobés appelés cellules en fleurs dans leur sang périphérique (Takatsuki, Yamaguchi et al., 1985; Takatsuki, 2005). Les complications infectieuses des ATL sont fréquentes à cause du dysfonctionnement de l'immunité cellulaire induit par l'HTLV-1 et sont fréquemment responsables du décès des patients (Taylor and Matsuoka, 2005).

La variété des approches thérapeutiques qui ont été testées pendant ces vingt dernières années est immense. Cependant les traitements anti-HTLV-1 sont encore limités et les résultats décevants surtout dans les formes aiguës pour lesquelles il n'existe à ce jour aucun traitement efficace. L'arsenal des thérapies dirigées contre HTLV-1 est en fait actuellement cantonné à des traitements des symptômes, mais ne cible pas le virus. Des stratégies d'allogreffes de cellules souches ont été développées et donnent des résultats intéressants malgré une forte iatrogénicité, y compris chez les patients atteints de formes aiguës ou lymphomateuses (Hishizawa, Kanda et al., 2010).

II.1. Processus de leucémogénèse

II.1.1. Tax et HBZ : acteurs principaux de l'oncogénèse médié par HTLV-1

Comme pour de nombreuses autres tumeurs humaines et en conformité avec la longue période de latence induite suite à l'infection, le développement de l'ATL suppose plusieurs étapes impliquant plusieurs facteurs dont les protéines virales (Matsuoka and Jeang, 2007). Les études conduites depuis plus de 30 ans sur HTLV-1 ont permis de définir les fonctions de la plupart des protéines virales, et notamment d'identifier les protéines régulatrices Tax et HBZ comme les acteurs clés dans l'oncogenèse de l'ATL.

De façon intéressante, Tax et HBZ ont des effets distincts, essentiellement opposés, sur la régulation des voies de signalisation cellulaires. Tax active la transcription virale à partir du LTR 5'; induit la signalisation AP-1 et la voie classique NF- κ B, et supprime la voie TGF- β . A contrario, HBZ supprime la transcription du LTR5' stimulée par Tax et active sa propre transcription à partir du LTR3' ; inhibe la signalisation de certains facteurs AP-1 et la voie classique NF- κ B activées par Tax. Parallèlement, HBZ induit la voie TGF- β (Matsuoka and Green, 2009). De plus, Tax comme HBZ sont des instigateurs de la prolifération, cependant dans le cas d'HBZ il a été suggéré que l'ARNm ait un rôle dans ce processus (Satou, Yasunaga et al., 2006), suggérant des mécanismes de régulation distincts du contrôle du cycle cellulaire mis en jeu par HBZ et Tax. Cette modulation négative de la fonction de Tax par HBZ tout en induisant la prolifération cellulaire suggère des régulations complexes des voies de signalisation cellulaires.

HTLV-1 tire avantage de ces mécanismes de régulations distincts employés par Tax et HBZ, et de la modulation fine des voies de signalisation cellulaires, pour induire avec précision la transformation, la meilleure survie des cellules T infectées et échapper à la surveillance immune de l'hôte (Zhao and Matsuoka, 2012). Comprendre comment Tax et HBZ de façon synergique, compétitive, ou indépendante contribuent aux différents aspects de la pathogénèse virale est donc d'un grand intérêt.

Propriétés	Tax	HBZ
Expression dans les cellules ATL	~30%	100%
Modifications génétiques	Oui	Non
Fonction sous forme d'ARNm	Non démontré	A confirmer
Transcription du LTR5' d'HTLV-1	Activation	Inhibition
Transcription du LTR3' d'HTLV-1	Activation	Activation
Cible de la réponse CTL	Oui	Non
Effet sur la réponse immune de l'hôte	Activation	Inhibition
Immortalisation des cellules T	Oui	Non
Induction de la prolifération des cellules T	Oui	Oui
Voie classique NF-κB	Activation	Inhibition
Voie alternative NF-κB	Activation	Favorise
Signalisation AP-1	Activation	Inhibition
Transcription de JunD	Activation	Activation
Signalisation TGF-β	Inhibition	Activation

Tableau 2. Propriétés des oncogènes viraux Tax et HBZ : Tax et HBZ montrent des profils d'expression distincts au cours du processus de développement de l'ATL, exercent également des fonctions biologiques distinctes souvent opposées. Tax et HBZ sont impliqués dans la régulation de la réplication virale, la modulation de la réponse immune, la dérégulation de la progression du cycle cellulaire et des voies de signalisation de la cellule, conduisant donc à la transformation cellulaire tout en assurant la persistance virale. Adapté de Zhao and Matsuoka, 2012)

Tax est la protéine virale la plus étudiée parmi les protéines codées par HTLV-1 en raison de ses actions pléiotropiques sur les gènes cellulaires et viraux (Yoshida, 2001; Grassmann, Aboud et al., 2005). Tax augmente l'expression des gènes viraux via les LTRs viraux, et stimule également la transcription des gènes cellulaires via les voies de signalisation cellulaire NF-κB, SRF, CREB, et AP-1. Tax ne se lie pas directement aux séquences promotrices mais interagit avec des facteurs de transcription ou des modulateurs des fonctions cellulaires. Tax est reconnue comme une oncoprotéine de par sa capacité à transformer les cellules T primaires et à conférer des propriétés prolifératives aux cellules infectées via l'altération d'événements de signalisation ou génétiques distincts. Ainsi, en plus de ses

fonctions de transactivateur du promoteur viral, Tax supporte la prolifération cellulaire, inhibe l'apoptose, perturbe les points de contrôle du cycle cellulaire et induit des dommages à l'ADN (Portis, Harding et al., 2001; Marriott and Semmes, 2005).

Au contraire de Tax, HBZ ne semble pas indispensable pour le processus d'immortalisation des cellules. En effet, la perturbation de la protéine HBZ dans un clone proviral infectieux n'affecte pas la capacité du virus à immortaliser les lymphocytes T dans les tissus en culture (Arnold, Yamamoto et al., 2006). Néanmoins HBZ possède des fonctions prolifératives. En effet, il a été montré que les souris transgéniques exprimant HBZ développent des tumeurs (Satou, Yasunaga et al., 2006) et la suppression de la transcription de HBZ par ARN interférence réduit la prolifération des cellules ATL mais également la capacité des cellules T infectées à former des tumeurs chez la souris (Satou, Yasunaga et al., 2006; Arnold, Zimmerman et al., 2008). De plus, la perte d'HBZ résulte en une diminution significative de la charge provirale, suggérant un rôle de la protéine HBZ dans l'établissement de l'infection chronique et le maintien de la persistance virale très tôt dans le processus d'infection (Arnold, Yamamoto et al., 2006).

L'ensemble de ces données montre que, les multiples fonctions de Tax et HBZ, rendent ces protéines prédominantes dans le processus de leucémogénèse aboutissant au développement de l'ATL. Cependant, malgré ses fonctions pléiotropiques et son rôle essentiel durant la leucémogénèse induite par HTLV-1, l'ARNm de Tax n'est détectée que dans 30% des cellules de patients ATL. Cette absence de Tax s'explique par une extinction progressive de l'activité du promoteur viral lorsque la cellule infectée évolue en cellule leucémique (Taniguchi, Nosaka et al., 2005).

Tax est la cible majeure des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et par conséquent son expression induit une réponse immune (Kannagi, Ohashi et al., 2004). Ainsi, l'ARNm de Tax dans les cellules infectées fournit des avantages mais également des inconvénients à leur survie. Pour échapper aux CTL les cellules ATL perdent fréquemment l'expression de Tax par plusieurs mécanismes. En effet, les cellules ATL contiennent souvent des altérations génétiques et épigénétiques du 5'LTR du provirus HTLV-1, à partir duquel est induite l'expression des protéines virales codées par le brin sens, résultant au mutisme de la transcription virale en sens (Taniguchi, Nosaka et al., 2005) et en la perte d'expression de Tax (Takeda, Maeda et al., 2004; Nicot, Harrod et al., 2005). A cela s'ajoutent d'autres mécanismes complémentaires d'élimination de l'expression de Tax identifiés dans les cellules

ATL, incluant les changements génétiques dans le gène *tax* tels que des délétions et des insertions ou encore des mutations non sens (Takeda, Maeda et al., 2004; Fan, Ma et al., 2010). Récemment, une étude a également montré que l'ubiquitine ligase E3 PDLIM2 induit la dégradation de Tax, via sa délocalisation du cytoplasme et des « corps nucléaires » vers la matrice nucléaire où elle est polyubiquitinilée, puis dégradé dans le protéasome (Yan, Fu et al., 2009). A cela s'ajoutent les données dans les modèles de souris transgéniques exprimant Tax qui développent une grande variété de tumeurs telles que des tumeurs mésoenchymateuses, des adénomes mammaires, ou encore des anomalies du squelette incluant des métastases ostéolitiques osseuses; mais, aucune leucémie ou lymphome exceptées sous certaines conditions (Hinrichs, Nerenberg et al., 1987; Nerenberg, Hinrichs et al., 1987; Ruddle, Li et al., 1993; Gao, Deng et al., 2005). L'ensemble de ces données suggèrent que Tax est requis pour la transformation maligne mais n'est pas essentiel pour la maintenance des cellules leucémiques *in vivo*.

A l'inverse de Tax, l'ARNm de HBZ a été détecté dans 100% des cellules de patients ATL (Satou, Yasunaga et al., 2006; Fan, Ma et al., 2010). Cette propriété est due à la localisation particulière du gène HBZ sur le brin antisens du provirus mais également à sa régulation transcriptionnelle qui se fait à partir d'un promoteur dans le LTR 3' alors que le promoteur en LTR 5' est responsable de la transcription de tous les autres gènes d'HTLV-1 (Gaudray, Gachon et al., 2002; Yoshida, Satou et al., 2008). De plus aucune modification répressive n'a été reportée dans la séquence codante de HBZ, et des analyses du provirus d'HTLV-1 ont montré que le LTR3' n'était ni délété ni méthylé dans les cellules ATL (Saito, Matsuzaki et al., 2009; Fan, Ma et al., 2010).

A ces observations s'ajoutent les études sur la cinétique de l'expression des gènes viraux dans les PBMC issus de lapins infectés révélant que les ARNm de *tax/rex* et *gag/pol* étaient exprimés à des niveaux élevés immédiatement après l'infection et qu'ils déclinaient progressivement au cours du temps, se stabilisant éventuellement à de faibles niveaux. A l'inverse, *hbz* était exprimé à un faible niveau tout de suite après l'infection, et augmentait pour atteindre un plateau au cours du temps, et ceci à un niveau d'expression beaucoup plus élevé que les autres ARNm mesurés (Li, Kesic et al., 2009). Ces données ont été confirmées dans un système de culture de cellules primaires de patients infectés par HTLV-1 où l'expression de *tax* et *gag* augmente pour atteindre son maximum au bout de 24h de culture puis diminue de façon concomitante à l'augmentation de celle d'*hbz* (Belrose, Gross et al., 2011) (Figure 7).

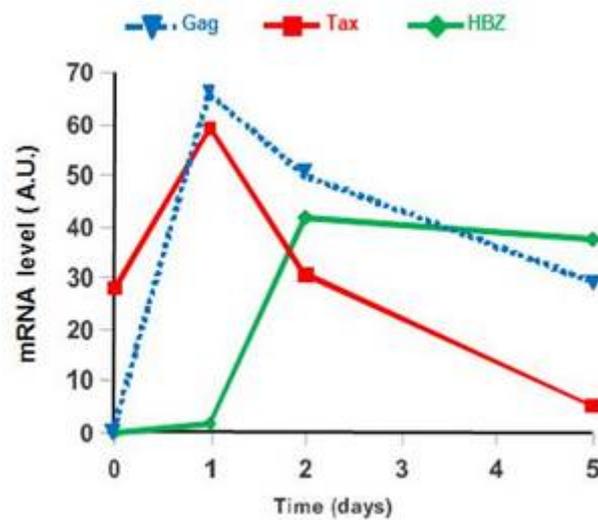


Figure 7 Expression des ARNm viraux Tax, Gag et HBZ dans les PBMC en culture de patients infectés par HTLV-1. (D'après Belrose, Gross et al., 2011)

De plus, il a été reporté que l'expression d'HBZ est corrélée avec la quantité de provirus intégré chez les individus infectés par HTLV-1, contrairement à celle de *tax* (Usui, Yanagihara et al., 2008). Ces résultats mettent en évidence une corrélation inverse entre l'expression des ARNm de *tax/rex* et *hbz* au cours du temps et permet de corréler l'expression d'HBZ à la charge provirale ainsi que la survie de la cellule infectée dans l'hôte. Plus encore, une corrélation entre le niveau de transcription d'*hbz* et la sévérité de la TSP/HAM a été mise en évidence récemment (Saito, Matsuzaki et al., 2009; Mota-Miranda, Barreto et al., 2013).

Par conséquent, contrairement aux autres protéines virales transcrites à partir du brin sens du provirus d'HTLV-, le gène *hbz* est constamment présent dans les cellules ATL de tous les patients ATL et dans de nombreux cas c'est le seul gène viral qui est exprimé. De plus, HBZ s'avère être indispensable pour l'oncogenèse induite par HTLV-1, à la fois durant les étapes initiales du développement de l'ATL mais également durant la maintenance du phénotype transformé.

II.1.2. Processus leucémogénique provoqué par HTLV-1

Actuellement, il est estimé que le processus leucémogénique provoqué par HTLV-1 suppose quatre phases : (1) la primo-infection par 1 virus HTLV-1 lors d'un allaitement maternel prolongé. La quasi-totalité (> 95 %) des ATL surviennent chez des patients qui ont été infectés par cette voie. (2) l'expansion clonale des cellules T infectées, puis (3) la latence clinique de la cellule et (4) finalement la tumorigénèse (Figure 8).

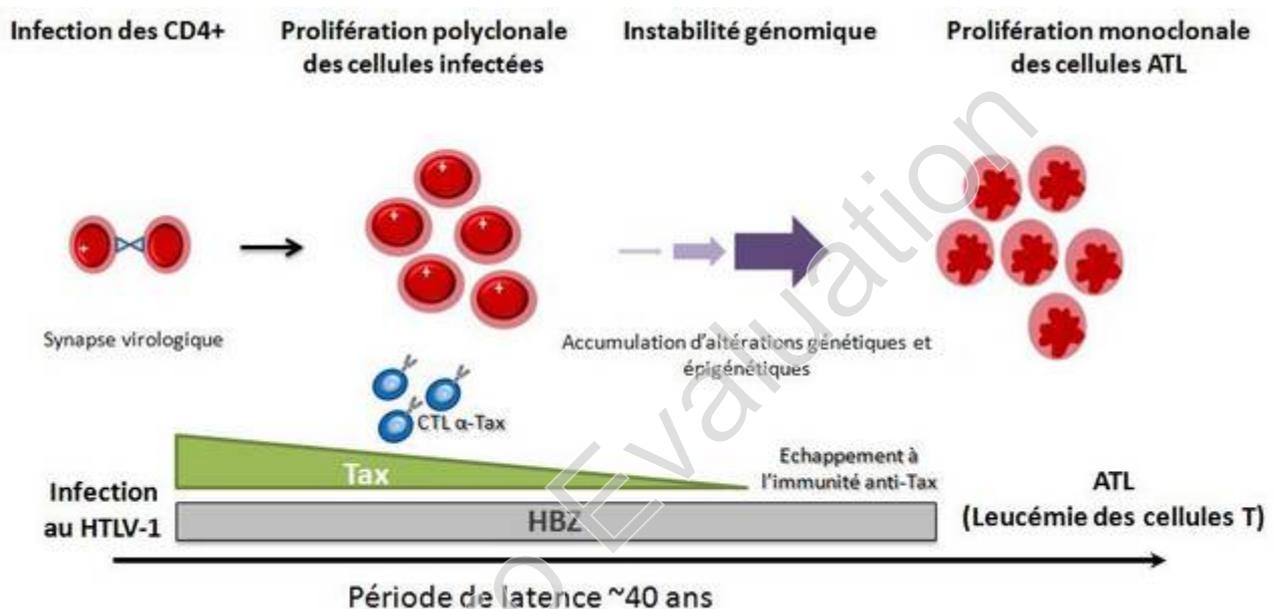


Figure 8 Représentation schématique du développement de l'ATL. HTLV-1 infecte les lymphocytes CD4+ par contact entre une cellule infectée et une cellule saine. Suite à l'infection, les cellules expriment les oncogènes viraux, Tax et HBZ, lesquels initient la prolifération clonale des cellules T HTLV-1+. Cependant, la prolifération est également contrôlée par les CTL *in vivo*. Durant la phase de latence, des altérations génétiques et épigénétiques s'accumulent dans les génomes des cellules hôtes. La dernière phase de l'ATL est caractérisée par la prolifération monoclonale des cellules transformées. Tout au long de ce processus à étapes multiples la protéine HBZ est constitutivement exprimée, alors que Tax est inactivée et son expression dans les cellules entraîne leurs éliminations par le système immunitaire (CTL anti-Tax). Ce qui suggère que Tax n'est nécessaire que durant les étapes initiales de la leucémogénèse, alors qu'HBZ tient une place importante tout au long du processus. (Adapté de (Hivin, Frederic et al., 2005))

Tax est considéré comme étant important durant les deux premières phases du développement de l'ATL, car il active la transcription virale et provoque à travers la modulation d'une variété de voies de signalisation intracellulaires la dérégulation des

mécanismes de contrôle de la prolifération cellulaire, de points de contrôle mitotiques et l'inactivation de suppresseurs de tumeurs (Peloponese, Kinjo et al., 2007; Matsuoka and Jeang, 2011). Cependant, Tax n'est apparemment pas essentielle durant les phases tardives de la leucémogénèse. En raison de la forte réponse CTL suscitée par Tax *in vivo*, son expression est très défavorable pour la persistance virale et un contrôle pointu de l'expression de Tax semble nécessaire pour éviter que la cellule infectée ne soit éliminée par le système immunitaire de l'individu infecté (Kannagi, Harada et al., 1991; Takeda, Maeda et al., 2004; Satou, Yasunaga et al., 2006). Durant les étapes tardives, l'extinction de l'expression de Tax est avantageux pour la cellule qui acquière un phénotype transformé en l'absence de Tax ; les cellules tumorales n'exprimant pas Tax sont sélectionnées et fréquemment observées dans des cas d'ATL (Takeda, Maeda et al., 2004; Satou, Yasunaga et al., 2006). D'autre part, le gène HBZ semble être important tout au long du processus de développement de l'ATL puisqu'il est constamment exprimé

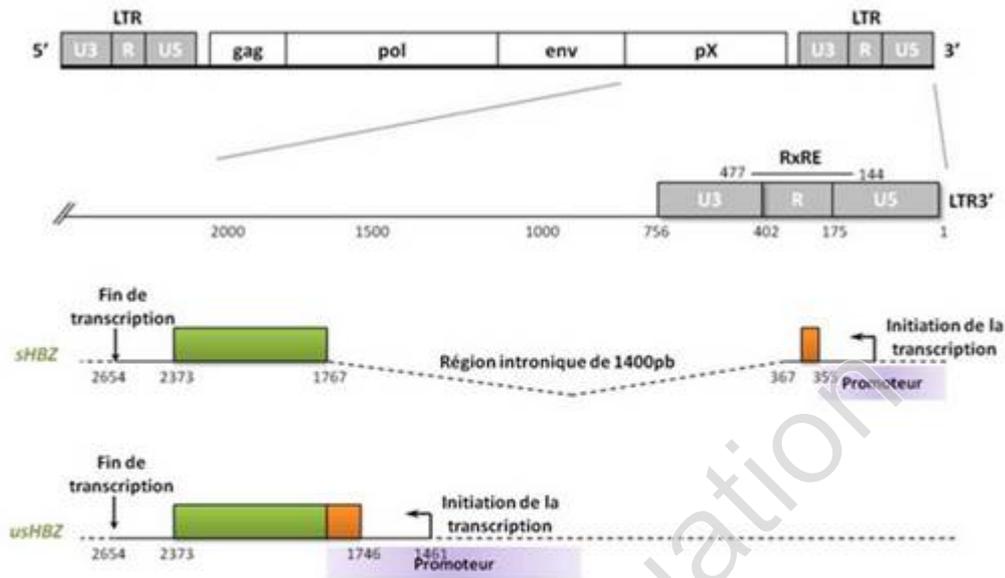
L'expression d'HBZ à partir du LTR 3' permettrait de contrôler négativement l'expression sens favorisant ainsi l'échappement des cellules infectées à la réponse immunitaire de l'hôte (Duc Dodon, Mesnard et al., 2010). Ainsi, le taux d'expression d'HBZ dans une cellule infectée pourrait déterminer le survie ou non de cette cellule dans l'organisme infecté. Une forte expression de HBZ permettrait de contrôler l'expression de Tax dont la présence est nécessaire à la prolifération des cellules infectées (Duc Dodon, Mesnard et al., 2010). En outre, HBZ contribue à l'oncogénèse via l'induction de la croissance cellulaire, la modulation négative des effets de Tax en atténuant son activité sur les voies cellulaires et la perturbation des voies de signalisation cellulaires (Basbous, Arpin et al., 2003; Arnold, Zimmerman et al., 2008; Zhao, Yasunaga et al., 2009). L'accroissement des données sur le rôle d'HBZ dans la pathogénicité d'HTLV-1 sous-tend que HBZ est un acteur clé de la leucémogénèse, étant important dans les étapes initiales après l'infection (éventuellement également dans la phase de latence) mais également après l'établissement du phénotype leucémogénique, au vu de ses fonctions dans les étapes tardives du développement de l'ATL. HBZ est vraisemblablement un pré-requis nécessaire pour la transformation maligne des cellules infectées et est essentiel pour la maintenance de l'oncogénèse. Par conséquent, malgré le fait que le rôle de Tax dans la leucémogénèse induite par HTLV-1 soit plus étudié car cette protéine a été découverte plus de 20 ans avant que nous ne connaissions l'existence d'HBZ, nous ne pouvons pas négliger l'importance d'HBZ.

III. La protéine antisens d'HTLV-1

L'ADN proviral des rétrovirus est flanqué de part et d'autre par deux régions LTR qui portent les régions promotrices de l'expression virale. La production d'ARNm à partir du LTR en 3', c'est-à-dire une transcription allant dans le sens opposé à celle permettant l'expression de tous les autres transcrits viraux, avait été exclue rapidement par les rétrovirologistes. Pourtant, en 1989 le phénomène de transcription antisens a été suggéré suite à la détection de deux ARNm antisens dans des lignées cellulaires infectées par HTLV-1 (Larocca, Chao et al., 1989). Ce n'est qu'en 2002, soit 20 ans après le séquençage complet de l'ADN proviral, que notre équipe a pu détecter la protéine virale dans les lignées de cellules transformées par HTLV-1 comme une protéine de liaison à CREB-2 (cAMP-response element binding protein-2) par une méthode de double hybride. La protéine virale se lie à CREB-2 via son domaine bZIP et a été désignée comme le facteur bZIP d'HTLV-1 (HBZ, HTLV-1 bZIP factor) (Gaudray, Gachon et al., 2002).

III.1. Transcription du gène *hbz*

A



B



Figure 9 Représentation schématique de la structure des transcrits épissés et non épissés d'*hbz*. (A) La région U5 et une partie de la région R du LTR3' composent le promoteur du gène HBZ. Le premier exon de l'isoforme épissée d'HBZ correspond à la région qui code l'élément de réponse à Rex (Rex, responsive element, RxRE) (Adapté de Masuoka and Green, 2009). (B) Séquence nucléotidiques et des acides aminés de la région N-terminale des deux isoformes d'HBZ. La différence entre les protéines dérivées de la forme épissée et non épissée d'HBZ sont les 4 acides aminés de la forme épissée et les 7 acides aminés de la forme non épissée ici représentés en orange. (Cavanagh, Landry et al., 2006).

La région codante d'*hbz* est localisée entre l'exon 3 de *Tax* et l'exon 2 d'*Env* sur le brin antisens (Gaudray, Gachon et al., 2002). Deux transcrits sont produits par le gène *hbz*: une forme épissée sHBZ (Spliced HBZ) ou SP1 (Spliced RNA 1) possédant un AUG initiateur dans l'exon 1 au niveau dans les régions U3 et R du LTR3' et une forme non épissée

usHBZ (Unspliced HBZ) ou SP2 (Spliced RNA 2) ne possédant pas d'AUG initiateur en phase avec la séquence du transcrit (Cavanagh, Landry et al., 2006) (Figure 9A). Ces deux formes se différencient par 7 acides aminés présents au niveau de la région N-terminale (Murata, Hayashibara et al., 2006) (Figure 9B).

sHBZ a de multiples sites d'initiation transcriptionnelles qui sont dispersés dans les régions U5 et R du LTR 3' tandis que le gène usHBZ s'initie dans le gène *tax* (Cavanagh, Landry et al., 2006; Yoshida, Satou et al., 2008). L'analyse de la séquence détaillée a révélé que le transcrit antisens sHBZ est épissé à la position 367 du brin antisens et relié à une région interne de l'ORF HBZ en position 1767, ce qui résulte en une région intronique de 1400 nucléotides (Cavanagh, Landry et al., 2006). Les promoteurs des gènes sHBZ et usHBZ sont dépourvus de boîtes TATA (Yoshida, Satou et al., 2008). Des études détaillées du promoteur ont montré que trois sites SP1 situés dans la région U5 étaient critiques pour la transcription et mis en évidence que la transcription de sHBZ est dépendante du facteur de transcription constitutivement exprimé Sp1. De plus, les activités des promoteurs des gènes sHBZ et usHBZ étaient sur-régulées par Tax via les séquences TRE (Tax-responsive element). En effet, la région U3 des LTR aux deux extrémités du génome proviral d'HTLV-1 contient des séquences TRE, lesquelles agissent comme des « enhancers » de la transcription sens des gènes viraux. Tax et CREB peuvent ainsi activer la transcription du gène HBZ via le LTR3' (Landry, Halin et al., 2009). On peut donc supposer que, le site d'intégration de l'ADN proviral joue également sur l'activité du promoteur du LTR3' et donc probablement sur la production d'HBZ. Cependant, cette activation du LTR3' par Tax est relativement faible par rapport à celle de la transcription du brin sens et l'expression de Tax est sujette à des régulations abortives. L'influence de Tax sur la transcription de HBZ est donc très probablement limitée dans les cellules ATL (Landry, Halin et al., 2009). En accord avec cette hypothèse Yoshida et al ont rapporté une activité plus importante du promoteur du gène sHBZ que celle du gène usHBZ, sans doute due au rôle additionnel des factor Sp1 dans l'expression de l'isoforme sHBZ (Yoshida, Satou et al., 2008).

Les deux isoformes du gène *hbz* ne sont pas exprimés de façon équivalente dans les cellules ATL. Le transcrit sHBZ a été trouvé quatre fois plus exprimé que le transcrit usHBZ chez les patients ATL mais également chez les patients asymptomatiques porteurs du virus (Usui, Yanagihara et al., 2008). Cette observation pourrait être le résultat direct de la plus forte activité promotrice du gène sHBZ rapporté par Yoshida. A cela s'ajoute le fait que la

de demi-vie de la protéine de l'isoforme sHBZ est plus longue que celle de l'isoforme usHBZ (Yoshida, Satou et al., 2008). Mais également que dans les cellules ATL, seule l'isoforme sHBZ est détecté au niveau protéique (Arnold, Zimmerman et al., 2008; Usui, Yanagihara et al., 2008), suggérant une prévalence significativement plus élevée de l'isoforme épissé d'HBZ. A noter également que les protéines dérivées de la forme épissée et non épissée d'HBZ montrent certaines différences au niveau fonctionnel, malgré le fait que les transcrits ne diffèrent que de quelques acides aminés au niveau N-terminal. Entre autre, sHBZ supprime plus significativement l'activation transcriptionnelle induite par Tax comparé à usHBZ. A noter que, l'ARNm de sHBZ promeut la croissance des cellules T, tandis que l'ARNm d'usHBZ ne présente pas d'activité proliférative (Yoshida, Satou et al., 2008). Il apparaît donc que la forme épissée d'HBZ joue un rôle plus important dans la pathogénèse de l'ATL, c'est pourquoi durant ma thèse je me suis focalisée sur cet isoforme d'HBZ.

III.2. Structure et Propriétés de la protéine HBZ

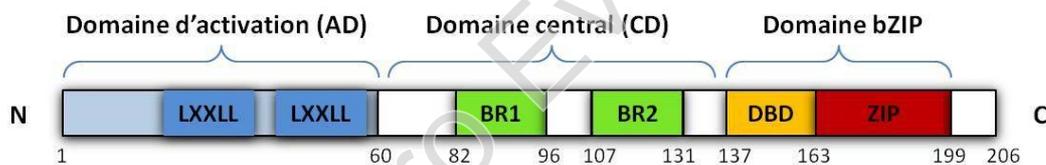


Figure 10 Représentation schématique de la structure moléculaire d'HBZ. A l'extrémité N-terminal le domaine d'activation (AD, activation domain) contient 2 motifs LXXLL-like, dans le domaine central on trouve 2 régions basiques (BR1 et BR2, basic region) et un domaine de liaison à l'ADN (DBD, DNA binding domain précédé de ses leucines zipper (ZIP) en C-terminal (Adapté de Matsuoka and Green, 2009)

Les transcrits épissés ou non épissés d'HBZ sont traduits en polypeptides de 206 et 209 acides aminés, respectivement. HBZ, sous ses deux formes, possède 3 domaines : un domaine d'activation (DA) en N-terminale, un domaine central (DC) et un domaine « leucine zipper » (bZIP) en C-terminal. (Figure 10). La protéine HBZ est localisée dans le noyau, où elle présente une distribution granulaire plus précisément elle s'accumule dans les « speckles » nucléaires. Ces sites nucléaires contenant HBZ correspondent à de l'hétérochromatine (Gaudray, Gachon et al., 2002; Hivin, Frederic et al., 2005). Trois régions

sont associées avec cette localisation nucléaire : deux régions riches en amino-acides basiques (BR1 et BR2,) et un domaine de liaison à l'ADN (DBD), lesquels sont tous situés dans le domaine central (Hivin, Frederic et al., 2005) (Figure 10). De plus, l'intégrité de la séquence en amino-acides d'HBZ est nécessaire pour sa distribution dans les « speckles » dans le noyau (Hivin, Frederic et al., 2005). Et, malgré plus de 95% d'identité entre les amino-acides, sHBZ et usHBZ montrent des profils de distribution sub-nucléaires distincts (Murata, Hayashibara et al., 2006).

- Le domaine d'activation est composé de deux motifs LXXLL-like, lesquels sont responsable de l'interaction avec le KIX domaine des co-activateurs cellulaires CBP/p300 (Lemasson, Lewis et al., 2007; Clerc, Polakowski et al., 2008).

Cette interaction avec HBZ mène à la séquestration de CBP/p300 dans les corps nucléaires et subséquemment l'association de ces co-activateurs avec le promoteur viral, aboutissant à la répression de l'activation transcriptionnelle Tax-dépendante des LTR viraux et probablement à la régulation négative des autres gènes régulés par CBP/p300.

- Le domaine central contient des régions basiques et un domaine de liaison à l'ADN, cependant l'analyse de la séquence amino-acide de ces régions basiques se prononce contre une liaison directe à l'ADN (Reinke, Grigoryan et al., 2010). En effet, le recrutement direct d'HBZ sur l'ADN n'a pas encore été démontré.

- Le domaine bZIP localisé en C-terminal, consiste en une région basique suivie d'un heptade de résidus hydrophobiques répétés formant un zipper de leucine en hélice α . Ce domaine permet la dimérisation indispensable à l'interaction avec l'ADN. HBZ n'est pas capable de former des homodimères stables mais forme préférentiellement des hétérodimères notamment avec d'autres protéines cellulaires de type bZIP (Basbous, Arpin et al., 2003). Initialement identifiée comme une protéine interagissant avec CREB2, via son domaine bZIP HBZ se fixe à cet activateur transcriptionnel nécessaire à la transactivation du LTR5'. CREB2 joue également un rôle important dans la régulation des gènes cellulaire dont la transcription dépend des séquences CRE (cAMP response element) (Gaudray, Gachon et al., 2002; Lemasson, Lewis et al., 2007). La séquestration de ce facteur dans les « corps nucléaires », empêche son recrutement de CREB au site TRE (CRE viral) dans le LTR mais également aux sites CRE cellulaires et entraîne la diminution de la transcription Tax-dépendante et probablement de l'expression des gènes cellulaire CREB-dépendant ; suggérant que HBZ utilise un mécanisme bipartite pour la répression de la transcription virale à partir du LTR5'.

HBZ, via son domaine bZIP, s'hétérodimérise également avec les protéines AP-1 incluant les membres de la famille Jun (c-Jun, JunB et JunD), modulant ainsi leurs activités transcriptionnelles et par voie de conséquence l'expression de leurs gènes cibles (Basbous, Arpin et al., 2003; Thebault, Basbous et al., 2004). Toujours par l'intermédiaire de son domaine bZIP, auquel s'ajoute le domaine d'activation cette fois, HBZ peut se lier également à la sous-unité p65 du facteur de transcription NF- κ B (Zhao, Yasunaga et al., 2009).

Domaines	Fonctions	Références
AD	Interaction avec CBP/p300	Clerc, Polakowski et al, 2008
	Activation la signalisation TGF- β	Zhao, Satou et al, 2011
	Liaison avec la sous-unité 26S du protéasome	Isono, Ohshima et al, 2008
CD	Responsable de la localisation nucléaire	Hivin, Frederick et al, 2008
bZIP	Interaction et inhibition de c-Jun, JunB	Basbous, Arpin et al, 2003
	Interaction et inhibition de CREB, CREB2	Gaudray, Gachon et al, 2002; Lemasson, Lewis et al, 2007
	Inhibition de l'activation du LTR5'	Lemasson, Lewis et al, 2007
AD+CD	Inhibition de la signalisation Wnt/ β -caténine	Ma, Yasunaga et al, 2012
AD+bZIP	Liaison à p65 et inhibition de la voie canonique NF- κ B	Zhao, Yasunaga et al, 2009
	Activation de l'activité transcriptionnelle de JunD	Thebault, Basbous et al, 2004

Tableau 2 Tableau récapitulatif des fonctions moléculaires des domaines d'HBZ. (Adapté de (Zhao and Matsuoka, 2012))

III.3. Rôle d' HBZ dans la pathogénicité induite par HTLV-1

III.3.1. Activation de la prolifération cellulaire

Un nombre croissant d'études indique qu' HBZ a une activité promotrice de la croissance cellulaire et qu'il peut stimuler la prolifération des cellules T *in vitro* et *in vivo*. Les premières expériences ayant établi la responsabilité d'HBZ dans la prolifération montrent que l'inhibition de son expression par de petits ARN interférants spécifiques est suivie d'un ralentissement significatif de la prolifération des cellules leucémiques d'ATL (Satou,

Yasunaga et al., 2006). Le même phénotype est obtenu dans les lignées cellulaires transformées par HTLV-1 et dans les lymphocytes T nouvellement immortalisés (Arnold, Zimmerman et al., 2008).

De plus, comme montré par Arnold et al, la formation de tumeur solide et l'infiltration tumorale sont significativement diminuées dans des souris immunodéficiente NOG greffées avec ces cellules infectées par HTLV-1 sous exprimant HBZ comparé aux animaux contrôles greffés avec des cellules infectées par HTLV-1 exprimant normalement HBZ (Arnold, Yamamoto et al., 2006).

A l'inverse la surexpression d'HBZ maintient la croissance des lymphocytes T humains, dépendant de l'interleukine 2 pour leur prolifération, en l'absence de cette cytokine et accélère la division cellulaire des cellules Jurkat, une lignée de lymphocytes T humains (Satou, Yasunaga et al., 2006). L'ensemble de ces données démontre que l'expression d'HBZ stimule la capacité proliférative des cellules infectées par HTLV-1 et suggère un rôle critique dans la survie cellulaire et, en fin de compte, la tumorigénèse dans l'hôte infecté (Arnold, Yamamoto et al., 2006).

De manière surprenante, dans une étude sur la prolifération induite par HBZ dans les cellules T, l'équipe du Pr Matsuoka a montré que la capacité d'HBZ à stimuler la prolifération n'était pas affectée lorsqu'on empêchait la traduction de la protéine, présumant un rôle de l'ARN d'HBZ dans ce processus (Satou, Yasunaga et al., 2006). A noter que cette activité promotrice de la prolifération n'était observée que dans une lignée spécifique de cellule T exprimant l'isoforme sHBZ (Satou, Yasunaga et al., 2006). La différence entre sHBZ et usHBZ vient de la présence ou non du premier exon. Cette région correspond à la séquence RxRE (Rex-responsive element) dans le LTR3', lequel forme une structure secondaire en tige boucle (Matsuoka and Green, 2009). En effet, les analyses mutationnelles du gène d'HBZ ont montré que la structure en tige boucle stimule la prolifération, cependant le mécanisme moléculaire mis en jeu est encore inconnu (Satou, Yasunaga et al., 2006). Il est tout de même spéculé que cette structure en tige boucle, connue pour interagir avec la protéine Rex, interagirait avec des facteurs de l'hôte pour induire la prolifération des cellules ATL (Matsuoka and Green, 2009).

L'ARNm d'HBZ semblerait impliqué dans la stimulation de l'expression du gène E2F1 et de ses gènes cibles (Satou, Yasunaga et al., 2006). E2F-1 est un facteur de transcription qui stimule la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire en transactivant des gènes cibles spécifiques, c'est donc un régulateur clé du cycle cellulaire dont la surexpression est associée avec l'oncogénèse (Pierce, Gimenez-Conti et al., 1998; Nevins,

2001). Les effets du transcrit d'HBZ sur la prolifération des cellules T se ferait donc probablement via un mécanisme impliquant ce facteur de transcription mais qui reste encore à être déterminé. Une autre étude a associé l'activité proliférative d'HBZ au facteur ATF3, dont on connaît l'interaction avec HBZ. L'inhibition de l'expression d'ATF3 corrèle avec une diminution de la prolifération et une réduction sévère de la viabilité des cellules ATL (Hagiya, Yasunaga et al., 2011). Dans des conditions physiologiques, l'expression d'ATF3 module à la fois positivement et négativement la prolifération et la survie des cellules. A savoir qu'ATF3 a des fonctions pro-apoptotiques en induisant l'activité transcriptionnelle de p53 et parallèlement il induit la prolifération cellulaire en stimulant la transcription de facteurs qui contrôlent la transition G1-S tels que CDC2 (cell division cycle 2) et la cycline E2. Il a été démontré que HBZ perturbe uniquement les effets négatifs d'ATF3 conduisant ATF3 à favoriser la prolifération des cellules ATL via un mécanisme inhibant p53 et stimulant CDC2 et la cycline E2 (Hagiya, Yasunaga et al., 2011).

En résumé, l'induction de la prolifération cellulaire par HBZ semble être un processus complexe faisant intervenir différents mécanismes et probablement deux formes moléculaires d'HBZ, l'ARNm et la protéine. La stimulation de la prolifération est particulièrement importante dans la pathogénicité des cellules infectées par HTLV-1 en raison du mode de propagation contact-dépendant du virus (Yoshida, 2005). Afin de faciliter sa transmission, HTLV-1 augmente le nombre de cellules infectées par expansion clonale (Wattel, Cavrois et al., 1996). Cette caractéristique fonctionnelle est régulée par l'expression contrebalancée de Tax et HBZ par la réponse immunitaire de l'organisme hôte. La perte de l'expression de Tax dans les cellules ATL suggère un rôle essentiel d'HBZ dans l'oncogénicité d'HTLV-1, surtout durant les stades tardives de l'oncogénèse ; La prolifération cellulaire induite par HBZ assure la persistance virale, supporte la survie et, subséquemment, maintient l'état leucémique de la cellule infectée (Satou, Yasunaga et al., 2006).

III.3.2. Modification des voies de signalisation cellulaires

In vivo, HBZ peut interagir avec de nombreux facteurs de la cellule infectée via ses 3 domaines fonctionnels (AD, CD, bZIP). La formation de ces complexes induit la dérégulation des voies de signalisation cellulaires. Bien qu'il soit difficile d'identifier comment chaque mécanisme moléculaire affecte le destin des cellules infectées, ils semblent contribuer au

phénotype de ces cellules de manière coordonnée. HBZ interagit avec des facteurs de transcription qui jouent un rôle central dans la cellule T CD4⁺ tels que NF- κ B, FoxP3, Wnt et AP-1; par conséquent ces interactions moléculaires pourraient expliquer la spécificité cellulaire type de transformation d'HTLV-1.

III.3.2.1. Inhibition de la voie classique NF- κ B

Le facteur nucléaire- κ B (NF- κ B) est une des voies majeures de survie détournée par HTLV-1. Ce facteur est activé dans de nombreux cancers humains, et bien qu'il soit finement régulé dans les cellules T normales, cette voie est constitutivement activée dans les cellules infectées par HTLV-1 et dans les cellules ATL (Sun and Yamaoka, 2005). Tax peut activer les deux voies de signalisation de NF- κ B, la voie classique et alternative, lesquelles jouent un rôle important dans la prolifération des cellules ATL, l'inhibition de l'apoptose et donc dans l'activité transformante d'HTLV-1 (Sun and Yamaoka, 2005). Différemment de Tax, HBZ inhibe la voie classique d'activation de NF- κ B mais ne module pas la voie alternative (Zhao, Yasunaga et al., 2009). Cette inhibition sélective se fait via deux mécanismes distincts. Le premier implique l'interaction d'HBZ avec la sous-unité p65 de NF- κ B, inhibant sa capacité de se lier à l'ADN. Dans le second mécanisme, HBZ induit la dégradation de p65 en stimulant l'expression de l'ubiquitine ligase E3, PDLIM2, conduisant à une augmentation de l'ubiquitination de p65 et par la suite sa dégradation (Zhao, Yasunaga et al., 2009) (Figure 12). Ceci a pour conséquence la diminution de la transcription des gènes cibles de la voie d'activation classique du facteur NF- κ B. De plus, comme mentionné précédemment, PDLIM2 induit la dégradation de Tax, supprimant ainsi sa tumorigénicité (Yan, Fu et al., 2009). La stimulation de l'expression de PDLIM2, induit alors subséquentement la dégradation de Tax. Ce qui pourrait offrir une explication à la répression de Tax dans les cellules ATL et dès lors suggérer un scénario complexe dans lequel HBZ supprimerait l'expression de Tax en entraînant la dégradation du transcrit Tax.

Les voies classique et alternative de NF- κ B ont des fonctions régulatrices distinctes. De nombreuses données tendent à montrer que la voie classique de NF- κ B est principalement impliquée dans l'immunité innée et la réponse inflammatoire (Zhao and Matsuoka, 2012). A noter que le ciblage de p65 et l'inhibition de cette voie classique d'activation de NF- κ B est commun chez de nombreux virus tel que le VIH ou le virus de l'Épstein Barr (Morrison and

Kenney, 2004; Qiao, He et al., 2006). Ce qui suggère que l'inhibition de cette voie pourrait être un mécanisme commun pour échapper à la clairance virale par le système immunitaire. En effet, en inhibant la voie classique de NF- κ B, HBZ inhibe la transcription des gènes IRFg et IRF4, facilitant probablement l'échappement d'HTLV-1 de la réponse immune de l'hôte (Zhao and Matsuoka, 2012).

Selon une étude, la voie alternative de NF- κ B aurait un rôle essentiel dans la transformation cellulaire par Tax. Ainsi, dans les cellules exprimant Tax et HBZ, HBZ en supprimant sélectivement la voie classique de NF- κ B permet une activation prédominante de la voie alternative par Tax. Une telle fonction d'HBZ en coopération avec l'activité de Tax pourrait être avantageuse pour la prolifération des cellules infectées et l'oncogénèse. D'autre part, via l'inhibition de la voie classique de NF- κ B, HBZ permet de contourner subtilement la réponse antivirale innée et adaptative, assurant la survie du virus et la réussite de la propagation de la maladie (Zhao and Matsuoka, 2012).

III.3.2.2. Augmentation de la signalisation FoxP3 (TGF- β)

TGF- β est un facteur de croissance transformant qui contrôle un éventail de processus biologiques incluant la prolifération, la différenciation et l'homéostasie immune. La voie de signalisation implique des médiateurs Smad qui transduisent le signal des récepteurs du TGF- β à la surface cellulaire au noyau pour réguler la transcription de gènes cibles (Shi and Massagué, 2003). Les protéines Smad peuvent réguler soit positivement l'expression de gènes en recrutant des co-activateurs tels que CBP/p300, ou négativement par le recrutement direct d'histones déacétylases ou de co-répresseurs tels que c-Ski et SnoN (Feng and Derynck, 2005). HBZ, via ses motifs LXXLL-like en N-terminal, active la signalisation TGF- β (Zhao, Satou et al., 2011). En effet, il a été montré que HBZ interagit avec Smad2/3 et recrute le co-activateur p300 pour induire des réponses transcriptionnelles dépendantes de TGF/Smad (Figure 12). HBZ induit l'association entre p300 et Smad3 en formant un complexe ternaire avec ces dernières. Ainsi, HBZ contourne l'effet inhibiteur de Tax sur la signalisation TGF- β et active l'expression de gènes cibles de TGF- β même en présence de Tax. Cette stimulation de la signalisation TGF- β par HBZ conduit à l'activation du gène *FoxP3* dans les cellules T naïves (Zhao, Satou et al., 2011). Ceci est confirmé par la détection de l'expression de *FoxP3* dans deux-tiers des cas d'ATL examinés (Karube, Ohshima et al., 2004). De cause à effet, en accord avec le rôle de FoxP3 dans le développement et la fonction des cellules T régulatrices

(T-reg), on dénombre une plus grande proportion de T-reg FoxP3+ parmi les cellules infectées par HTLV-1 comparé aux cellules CD4+ non infectées par HTLV-1 (Toulza, Heaps et al., 2008). Un tel phénotype Treg des cellules ATL s'avère être inhibiteur pour la réponse immune et pourrait donc être impliqué dans l'immunodéficience.

Des études mettent en évidence que les cellules infectées par HTLV-1 sont résistantes à l'inhibition de croissance induite par TGF- β et cette résistance est associée à l'action inhibitrice de Tax sur TGF- β . De façon surprenante, HBZ maintient la croissance cellulaire en présence de TGF- β , et HBZ n'a aucune influence sur l'expression des gènes associés avec le cycle cellulaire et la prolifération. Ces données indiquent que HBZ module sélectivement la voie de signalisation TGF- β (Zhao and Matsuoka, 2012).

En bref, malgré l'action inhibitrice de Tax sur TGF- β , HBZ induit la signalisation TGF- β et l'expression de FoxP3, permettant ainsi la conversion des cellules T infectées en cellules T régulateurs ; une stratégie qui pourrait expliquer pourquoi l'infection au HTLV-1 augmente le nombre de cellules T régulateurs et s'avère essentielle pour la persistance du virus.

III.3.2.3. Modification de la voie Wnt

Récemment, une étude a montré qu'HBZ interagit avec les protéines LEF1 et TCF1 et que les domaines d'activation et central d'HBZ sont impliqués dans cette interaction (Ma, Yasunaga et al., 2012). Ces protéines sont connues comme étant associées avec la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (Oshita, Kishida et al., 2003), laquelle est une voie de signalisation oncogénique très étudiée. La signalisation Wnt est une voie de signalisation très conservée chez les eucaryotes qui a un rôle crucial dans le développement embryonnaire et l'homéostasie des tissus (MacDonald, Tamai et al., 2009). Cette signalisation Wnt est constituée de deux voies, la voie la plus étudiée dite canonique qui est dépendante de la β -caténine (aussi appelée voie Wnt/ β -caténine) et la voie non canonique dont la signalisation est indépendante de la β -caténine.

La voie canonique Wnt/ β -caténine contrôle principalement la différenciation cellulaire, la prolifération et l'apoptose. En l'absence de signal, la β -caténine est prise dans un complexe formé de GSK3-APC-axine qui la phosphoryle avant qu'elle soit dégradée par le protéasome. En présence de ligand Wnt, l'activation des récepteurs conduit au recrutement de

la protéine adaptatrice Disheveled (Dvl), dont l'activation prévient la formation du complexe de destruction de la β -caténine. La β -caténine cytosolique s'accumule et est transloquée dans le noyau où elle s'associe aux facteurs TCF-LEF pour activer la transcription de nombreux gènes, en particulier ceux qui codent des protéines impliquées dans la prolifération (Cycline D1, Myc,...) (Staal and Clevers, 2005; Staal, Luis et al., 2008). D'autres branches de la signalisation Wnt, telles que la voie Wnt dépendant du Ca^{2+} qui passe par l'activation des protéines GTPases monomériques ou une autre voie Wnt qui utilise Dvl pour induire l'activation de la sérine-thréonine kinase JNK, une protéine sérine/thréonine kinase déjà impliquée dans bon nombre de voies de signalisation, sont référencées comme des voies Wnt non canoniques (Staal, Luis et al., 2008). A noter que les ligands Wnt non canoniques antagonisent la signalisation canonique de la voie Wnt (Oshita, Kishida et al., 2003).

Dans cette étude, il a été montré que la liaison d'HBZ avec LEF1 altère sa capacité de liaison à l'ADN et par voie de conséquence inhibe la voie canonique de la signalisation Wnt. Parallèlement, HBZ induit la transcription de Wnt5 en activant son promoteur via la signalisation TGF- β . En accord avec ces résultats, la voie canonique Wnt est retrouvée inactive dans les lignées infectées par HTLV-1 et une forte expression de Wnt5 est détectée. Wnt 5 est un ligand non canonique qui antagonise la voie canonique Wnt et de récentes études ont montré que cette protéine est impliquée dans les processus métastatiques cancéreux (Dissanayake, Wade et al., 2007; MacDonald, Tamai et al., 2009). De façon intéressante, les auteurs ont également montré que l'inhibition de Wnt5 par ARN interférence est associée avec une diminution significativement de la migration et la prolifération cellulaires dans les lignées infectées par HTLV-1 (Ma, Yasunaga et al., 2012).

La dérégulation des voies Wnt est impliqué dans la transformation virale et de nombreuses protéines virales interagissent avec des facteurs clés de cette voie (Fujimuro, Wu et al., 2003; Street, Macdonald et al., 2005). Néanmoins la dérégulation induite par ces virus de la voie Wnt est associée à une activation de la voie canonique et la stabilisation de la β caténine. A l'inverse, il semblerait donc qu'HTLV-1 utiliserait un mécanisme unique visant à inhiber la voie canonique Wnt. La protéine virale HBZ est ainsi capable de supprimer l'activation de la voie canonique en ciblant des effecteurs en aval de la β -caténine. Parce que les voies canoniques et non canoniques sont antagonistes, il est probable que l'inhibition de cette voie canonique par HBZ faciliterait l'activation de la voie non canonique, supportant par conséquent la migration et la prolifération des cellules ATL. L'ensemble de ces données suggère que la modulation des voies de signalisation Wnt par HBZ est associée avec le processus de leucémogénèse de l'ATL (Ma, Yasunaga et al., 2012).

III.3.2.4. Modification de la signalisation AP-1

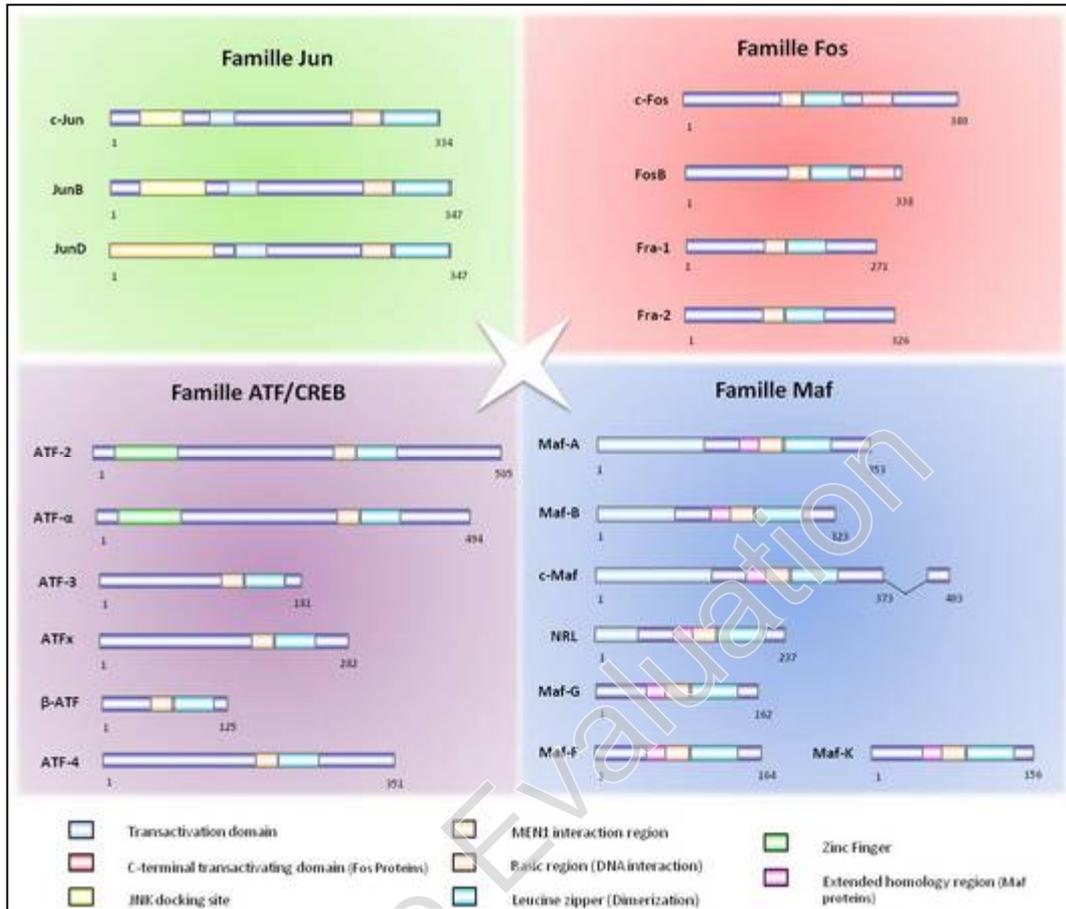


Figure 11 Membres de la superfamille AP-1. Les différentes familles sont représentées ainsi que les domaines de chaque facteur.

Les facteurs de la famille AP-1 sont une collection de complexes dimériques composés de protéines de liaison à l'ADN de la famille JUN (JunB, c-Jun et JunD), FOS (FosB, c-Fos, Fra1 et Fra2) et MAF (MafA, MafB, c-Maf, MafG/F/K and Nrl) grâce à des interactions via leur domaine leucine zipper (ZIP). Les hétérodimères AP-1 peuvent aussi se former entre les familles Jun ou Fos et d'autres protéines de type ZIP, comme les facteurs de transcription des familles ATF/CREB (ATF1 à 4, ATF-6, b-ATF, ATFx) (Figure 11).

Les facteurs de transcription AP-1 sont des régulateurs centraux dans la prolifération et la transformation des cellules T, la mort cellulaire et la production de cytokines tel que le TGF-β ou l'IL-2 (Angel and Karin, 1991; Shaulian and Karin, 2002). Ils ont tout d'abord été identifiés par leur capacité à se lier à l'ADN au niveau de séquences appelées TRE (TPA

responsive element, identifiées sur le promoteur de la collagénase comme élément de réponse au TPA) (TGAC/GTCA) (Lee, Mitchell et al. 1987). Par la suite, des sites de liaison aux facteurs AP-1 ont été identifiés dans de nombreux gènes cellulaires et viraux, comme par exemple les gènes codant pour l'IL-2, la cycline D1, le TGF- β (Angel and Karin, 1991). Selon l'hétérodimère formé, les protéines AP-1 peuvent également reconnaître les sites CRE (cAMP response element) (TGACGTCA). Ainsi, les combinaisons possibles d'hétérodimères ou d'homodimères pour certains et leurs modifications post-traductionnelles offrent une régulation fine et variée de l'expression des gènes contenant des éléments de réponse aux protéines AP-1 (Chinenov and Kerppola, 2001).

Dans des lymphocytes T non stimulés, le niveau basal de protéines AP-1 (notamment c-Jun et JunB et les protéines Fos) est très faible, et une activation entraîne une induction rapide des gènes *jun* et *fos*. L'activité AP-1 est induite par une pléiade de stimuli extracellulaires tels que des cytokines des facteurs de croissance, des infections virales et bactériennes, ainsi qu'une variété de stress chimiques et physiques. Ces stimuli induisent une cascade de phosphorylation qui aboutit à la dimérisation, l'activation puis la translocation dans le noyau des facteurs AP-1 qui vont alors se fixer sur la région promotrices de leurs gènes cibles. La régulation de l'activité d'AP-1 est complexe et se produit à différents niveaux, qui incluent la composition des dimères, des événements transcriptionnels et post-transcriptionnels, et l'interaction spécifique entre les protéines AP-1 et d'autres facteurs ou co-facteurs de transcription (Herrlich, 2001; Shaulian and Karin, 2002).

Les cellules T infectées par HTLV-1 et les cellules de patients ATL montrent une activation constitutive de ces gènes AP-1 indépendamment de signaux externes (Mori, Fujii et al., 1999; Hall and Fujii, 2005). Dès lors, en raison de leur implication dans la tumorigénèse (Eferl and Wagner, 2003), il a été suggéré que les facteurs de transcription AP-1 contribuent au phénotype dérégulé de la cellule infectée par HTLV-1 et au processus de transformation durant le développement de l'ATL. Les protéines AP-1 sont caractérisées par la présence d'un domaine bZIP leur permettant d'interagir non seulement entre elles mais également avec d'autres protéines de type bZIP. L'identification des facteurs cellulaires interagissant avec HBZ *in vivo* et *in vitro*, parmi les facteurs supposés être impliqués dans la voie de signalisation de l'ATL, a mis en lumière de nombreuses protéines de la voie AP-1 (Tableau 3) (Basbous, Arpin et al., 2003; Thebault, Basbous et al., 2004; Matsumoto, Ohshima et al., 2005; Lemasson, Lewis et al., 2007).

Partenaire d'interaction	Domaine de liaison	Références	Conséquence interaction
ATF3	bZIP	Hagiya, Ysanuga et al, 2011	•Régulation activité transcriptionnelle
c-Jun	bZIP	Basbous, Arpin et al, 2003	•Régulation activité transcriptionnelle •D égradation
JunB	bZIP	Basbous, Arpin et al, 2003	•Régulation activité transcriptionnelle
JunD	bZIP	Thebault, Basbous et al, 2004	•Régulation activité transcriptionnelle
MafB	bZIP	Ohshima, Mukai et al, 2010	•Régulation activité transcriptionnelle •D égradation

Tableau 3 Partenaires d'interaction d'HBZ de la famille AP-1 Les domaines de liaison et les conséquences de ce partenariat sont indiqués.

Il a ainsi été rapporté qu'HBZ, via son domaine bZIP forme des hétérodimères avec c-Jun, JunB et JunD, mais pas cFos (Basbous, Arpin et al., 2003; Matsumoto, Ohshima et al., 2005). Suite à cette interaction, HBZ affecte leur localisation cellulaire, module leur activité transcriptionnelle et par conséquent dérégule l'expression de leurs gènes cibles. Il est intéressant de noter qu'HBZ peut être à la fois un répresseur mais également activateur des facteurs AP-1. En effet, il a été démontré que c-Jun et JunB sont inhibés par HBZ alors que JunD est fortement activé, à la fois au niveau transcriptionnel que fonctionnel. L'inhibition de l'activité transcriptionnelle de JunB et c-Jun se produit à différents niveaux et implique des mécanismes moléculaires distincts.

L'hétérodimérisation d'HBZ avec JunB et c-Jun diminue l'affinité de leur liaison à l'ADN, atténuant ainsi leur potentiel de transactivation (Basbous, Arpin et al., 2003; Matsumoto, Ohshima et al., 2005; Hivin, Arpin-André et al., 2006). Le domaine de liaison à l'ADN d'HBZ a été mis en cause dans ce processus (Hivin, Arpin-André et al., 2006). En effet, il a été montré que les hétérodimères formés par HBZ et c-Jun ou JunB n'ont plus la capacité de former des complexes stables sur les motifs AP-1 et la comparaison de séquence indique qu'HBZ possède un domaine de liaison à l'ADN particulier qui ne présente pas les aminoacides consensus nécessaires à la liaison à l'ADN (Reinke, Grigoryan et al., 2010), soutenant que la dimérisation avec HBZ diminuerait l'affinité de ces facteurs avec l'ADN.

Un autre aspect de cette inhibition transcriptionnelle est basé sur des observations montrant la séquestration des facteurs JunB et c-Jun dans les « corps nucléaires » par HBZ (Hivin, Basbous et al., 2007; Clerc, Hivin et al., 2009). Ces structures ne co-localisent pas avec l'ARN polymérase II et ont donc été considérées comme des sites nucléaires transcriptionnellement inactifs (Hivin, Basbous et al., 2007). Paradoxalement, la délétion du domaine bZIP d' HBZ perturbe sa localisation dans ces « corps nucléaires ». Tout ceci suggère que les partenaires cellulaires d'HBZ, y compris les facteurs bZIP sont nécessaires pour la localisation d'HBZ dans les « corps nucléaires » et qu'ils sont donc impliqués dans le contrôle de leur propre trafic nucléaire (Hivin, Basbous et al., 2007). Plus important encore, comme montré par Clerc et al, *in vivo*, l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de c-Jun induite par HBZ résulte principalement de sa séquestration dans les « corps nucléaires » (Clerc, Hivin et al., 2009). Il a également été montré que HBZ affectait l'activité transcriptionnelle de c-Jun via un mécanisme additionnel dépendant du protéasome (Matsumoto, Ohshima et al., 2005). En effet, des études montrent qu' HBZ diminue le niveau d'expression de c-Jun et ainsi réduit l'expression de ses gènes cibles. Cette diminution est restaurée lors d'un traitement avec des inhibiteurs du protéasome, suggérant un mécanisme de dégradation faisant appel au protéasome (Matsumoto, Ohshima et al., 2005). Bien que la plupart des substrats protéasomiques sont ciblés pour la dégradation via la conjugaison de chaînes de polyubiquitines, Isono et al ont montré que l'ubiquitination n'était pas requise pour la dégradation protéosomique de c-Jun induite par HBZ (Matsumoto, Ohshima et al., 2005; Isono, Ohshima et al., 2008). HBZ interagit directement à la fois avec la sous-unité 26S du protéasome et c-Jun et facilite l'acheminement de c-Jun au protéasome sans l'ubiquitination. HBZ agit comme une protéine de liaison entre le protéasome et son substrat, contournant ainsi la fonction de routage de l'ubiquitination (Isono, Ohshima et al., 2008).

En conclusion, l'interaction d'HBZ avec les facteurs AP-1 cJun et JunB résulte en la diminution de leurs activités transcriptionnelles via des mécanismes variés et prévient l'activation de la transcription des gènes régulés par ces protéines AP-1. A noter qu'AP-1 et spécifiquement l'hétérodimère cJun/cFos est capable de transactiver le promoteur d'HTLV-1 et est donc impliqué dans l'augmentation de la transcription basale du promoteur HTLV-1 (Jeang, Chiu et al., 1991). Subséquemment, en présence d'HBZ, cette activation virale par c-Jun est abrogée.

Récemment, l'interaction d'HBZ avec une autre protéine de la voie AP-1 a été rapportée. Par une méthode de double hybride, une interaction entre HBZ et la protéine de la sous famille MAF, MafB a été mise en évidence, via leur domaine bZIP. Similairement à c-

Jun, la formation de l'hétérodimère HBZ/MafB inhibe l'activité de liaison sur les sites AP-1 de MafB et diminue son niveau d'expression via un mécanisme dépendant du protéasome (Ohshima, Mukai et al., 2010) (Figure 12).

A l'inverse de toutes les autres protéines AP-1, JunD, qui a également été montré interagir avec HBZ via son domaine bZIP (Thebault, Basbous et al., 2004), est transcriptionnellement activée par HBZ. Des expériences de luciférase en utilisant un plasmide rapporteur où le gène de la luciférase était sous contrôle du promoteur cellulaire de la collagénase qui contient des sites consensus AP-1, ont révélé qu'en présence d'HBZ, l'activité transcriptionnelle de JunD était considérablement augmentée (Thebault, Basbous et al., 2004). De manière intéressante, l'effet d'HBZ sur JunD n'est vraisemblablement pas dû à une modification de l'activité de liaison de JunD à l'ADN (Thebault, Basbous et al., 2004). De plus, contrairement aux autres protéines Jun, les hétérodimères HBZ/JunD ne sont pas retrouvés dans les sites transcriptionnellement inactifs que sont les « corps nucléaires ». A l'inverse, lors l'expression ectopique de JunD dans les cellules, HBZ n'a plus un pattern de localisation granulaire mais plutôt une co-localisation diffuse dans le nucléole avec JunD (Hivin, Basbous et al., 2007), suggérant un rôle de JunD dans la détermination de la localisation d'HBZ et pas l'inverse.

Il a été montré que l'effet stimulateur d'HBZ et l'accroissement du potentiel transcriptionnel de JunD qui en résulte requière le domaine d'activation en N-terminal d'HBZ (Thebault, Basbous et al., 2004). Ce domaine contient des motifs LXXLL responsable de l'interaction avec les co-activateurs transcriptionnels CBP/p300 (Clerc, Polakowski et al., 2008), on peut donc s'interroger sur éventuel le rôle de ces facteurs dans ce processus. De plus, la délétion de ce domaine d'activation dans des expériences de luciférase inhibe l'activité transcriptionnelle de JunD, suggérant non seulement que la partie N-terminal d'HBZ est nécessaire pour l'effet stimulateur sur la transcription dépendante de JunD mais également qu'en absence de son domaine d'activation, HBZ pourrait antagoniser l'action de JunD. Ce mécanisme pourrait ne pas être le seul pouvant expliquer l'effet d'HBZ sur le potentiel transcriptionnel de JunD. Une autre hypothèse suggère qu'HBZ pourrait prévenir l'interaction et subséquemment l'inhibition de ce facteur AP-1 avec des co-répresseurs, tel que la ménine qui réprime l'activité transcriptionnelle de JunD (Thebault, Basbous et al., 2004). De plus il a été montré que les 6 acides aminés chargés à proximité immédiate du domaine de liaison à l'ADN d'HBZ sont particulièrement important pour la régulation du potentiel transcriptionnel des Jun. Ce sous-domaine pourrait, probablement, être impliqué dans l'efficacité de présentation des complexes AP-1 à la machinerie transcriptionnelle (Hivin, Arpin-André et

al., 2006). Malgré tout, de plus amples études sont nécessaires afin de comprendre précisément le rôle du domaine DA et de la région basique d'HBZ dans l'activation de la transcription induite par JunD. En résultat de ce processus d'activation transcriptionnelle des gènes dépendant de JunD, il a été rapporté que l'hétérodimère JunD/HBZ stimule l'expression du gène cellulaire de la télomérase humaine (hTERT) (Kuhlmann, Villaudy et al., 2007). Cette observation concorde avec des études précédentes indiquant une forte activité télomérique principalement due à une expression accrue de la télomérase hTERT chez les patients ATL. A noter que l'expression de la télomérase est une des caractéristiques des cellules cancéreuses dans laquelle ce complexe ribonucléoprotéique préserve l'intégrité des chromosomes en maintenant la longueur des télomères et ainsi prévient de la mort cellulaire. (Gilson and Géli, 2007; Harley, 2008). Par conséquent, l'activation de la télomérase est un événement crucial et tardif dans la progression tumorale. A l'inverse d'HBZ, il semblerait que durant les phases précoces de l'infection, Tax diminuerait l'activité de la télomérase hTERT favorisant ainsi l'instabilité génétique (Gabet, Mortreux et al., 2000). Lors de la répression de Tax, durant les phases tardives, HBZ réactiverait l'expression de la télomérase permettant l'évolution vers des cellules leucémiques entièrement transformées (Kuhlmann, Villaudy et al., 2007). Il a été mis en évidence que cette activation transcriptionnelle de la télomérase requière l'association des hétérodimères HBZ/JunD au facteur de transcription Sp1 et que ce complexe ternaire se fixe sur les sites Sp1 présent sur la séquence proximale du promoteur de hTERT (Kuhlmann, Villaudy et al., 2007).

L'ensemble de ces données suggèrent que la régulation de l'expression de gènes par l'hétérodimère HBZ/JunD requière d'autres facteurs permettant leur recrutement sur les promoteurs des gènes.

De plus, récemment, ce mécanisme d'activation de l'expression de la télomérase hTERT a été approfondi. Dans la cellule normale, l'activité transcriptionnelle de JunD est restreinte en raison de son interaction avec un co-facteur, la ménine. La ménine est un suppresseur de tumeur qui régule négativement l'activité transcriptionnelle de JunD. Son interaction avec JunD forme un complexe répresseur de l'expression de hTERT. A l'inverse, dans la cellule infectée, l'expression d'HBZ abolie la fonction inhibitrice de la ménine et JunD devient donc un activateur transcriptionnel. En effet, l'interaction d'HBZ avec JunD entraîne la formation d'un complexe ternaire JunD/HBZ/ménine et le recrutement de l'activité histone acétyl transférase de p300 par HBZ entraîne une diminution de l'effet de la ménine sur JunD et donc l'activation de la transcription de la télomérase (Borowiak, Kuhlmann et al., 2013). Ces données suggèrent qu'HBZ, en bloquant l'activité de la ménine, agit comme un

cofacteur leucémogénique qui stimule la transcription de gènes et favorise la leucémogénèse induite par JunD (Borowiak, Kuhlmann et al., 2013). En plus de la stimulation de l'activité transcriptionnelle de JunD, il a été montré que toutes les cellules de patients ATL et les lignées cellulaires dérivées d'ATL présentaient une forte expression ainsi qu'une activité élevée de JunD (Fujii, Iwai et al., 2000; Mori, Fujii et al., 2000). Des études précédentes suggèrent que JunD joue un rôle crucial dans la survie des cellules leucémiques (Mori, Fujii et al., 2000) et la quantité croissante de données sur l'effet pathogénique de JunD encouragent le développement de cet axe de recherche.

La synthèse des études sur la régulation des facteurs AP-1 par HBZ, présentée ci-dessus, révèle des mécanismes d'action distincts d'HBZ, menant à la repression de JunB et c-Jun et l'activation de la transcription dépendante de JunD (Figure 12). Bien qu'ils présentent de grandes similarités de séquences, les membres de la famille Jun ont des rôles biologiques distincts en fonction du contexte cellulaire. Par exemple, c-Jun est un régulateur positif, alors que JunD agit comme un régulateur négatif du cycle cellulaire (Mechta-Grigoriou, Gerald et al., 2001). Par conséquent, la régulation distincte des facteurs AP-1 par HBZ contribue à une voie très élaborée du développement de l'ATL.

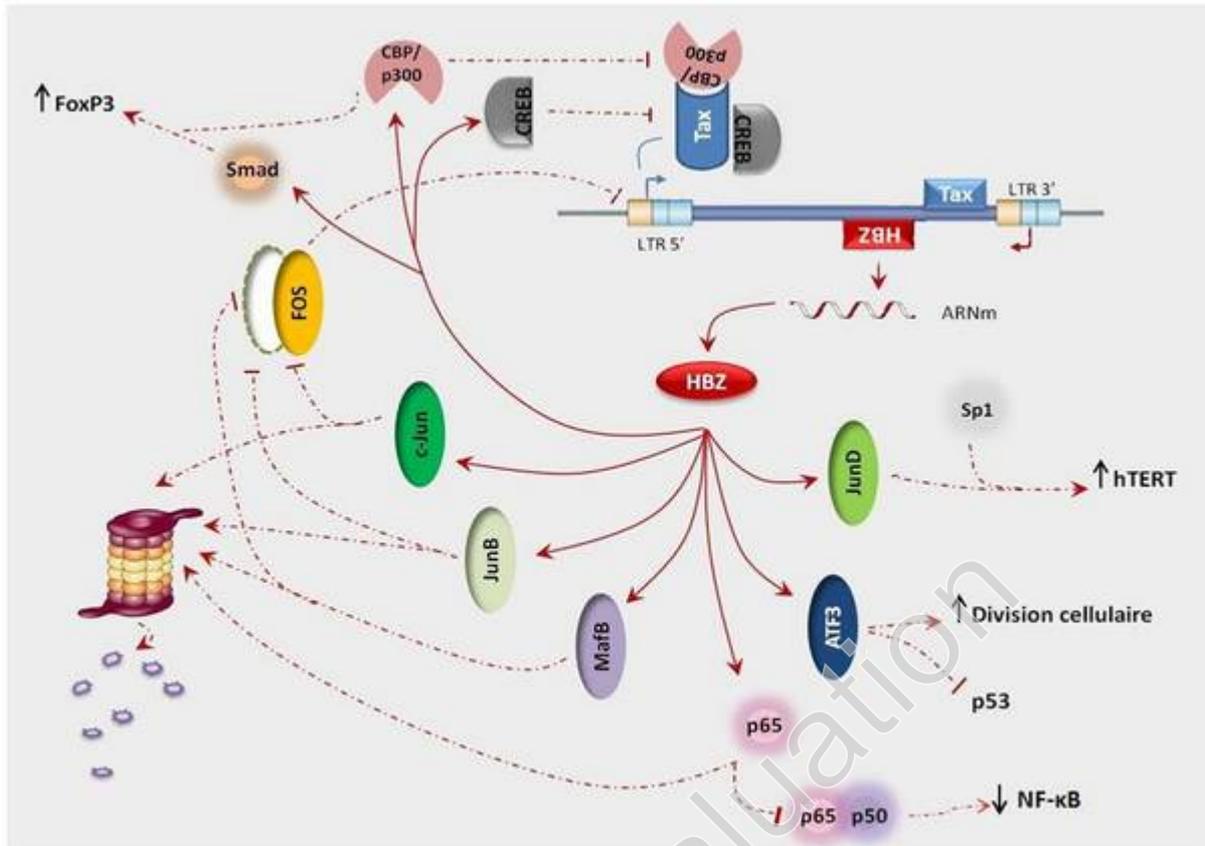


Figure 12 Schéma récapitulatif du mécanisme d'action d'HBZ sur les voies de signalisation cellulaires. La séquestration des facteurs CREB et CBP/p300 par HBZ les empêchant de se lier au promoteur viral et supprimant ainsi la transcription sens induite par Tax. HBZ interagit avec les membres de la famille AP-1 et module leur activité transcriptionnelle et/ou leur expression. Son interaction avec la sous-unité p65 de la famille NF-κB inhibe son expression et provoque alors l'inhibition de la voie classique de NF-κB. A contrario, l'interaction avec Smad permet l'activation de la voie TGF-β et de ces gènes cibles tel que Foxp3 ou Wnt-5 (non montré ici).

En conclusion, depuis la découverte de HBZ dans les lignées cellulaires infectées par HTLV-1, un grand nombre de travaux ont été réalisés, permettant de mettre à jour l'importance de la transcription antisens dans le cycle répliatif du rétrovirus. C'est en particulier le rôle prépondérant que joue cette protéine dans la persistance du HTLV-1 *in vivo* qui a démontré, à tel point qu'aujourd'hui HBZ fasse figure de candidat dans la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques. Cette accumulation de résultats extrêmement novateur à peu à peu suscité l'intérêt, et aujourd'hui de nombreuses équipes travaillent sur le sujet. Ceci a permis d'étendre ce travail aux autres rétrovirus. Il a ainsi pu être montré que tous ces virus possédaient un ORF sur le brin « antisens » de leur génome, systématiquement localisé à proximité du LTR en 3' (Halin, Douceron et al., 2009).

IV. La transcription antisens et les autres HTLV

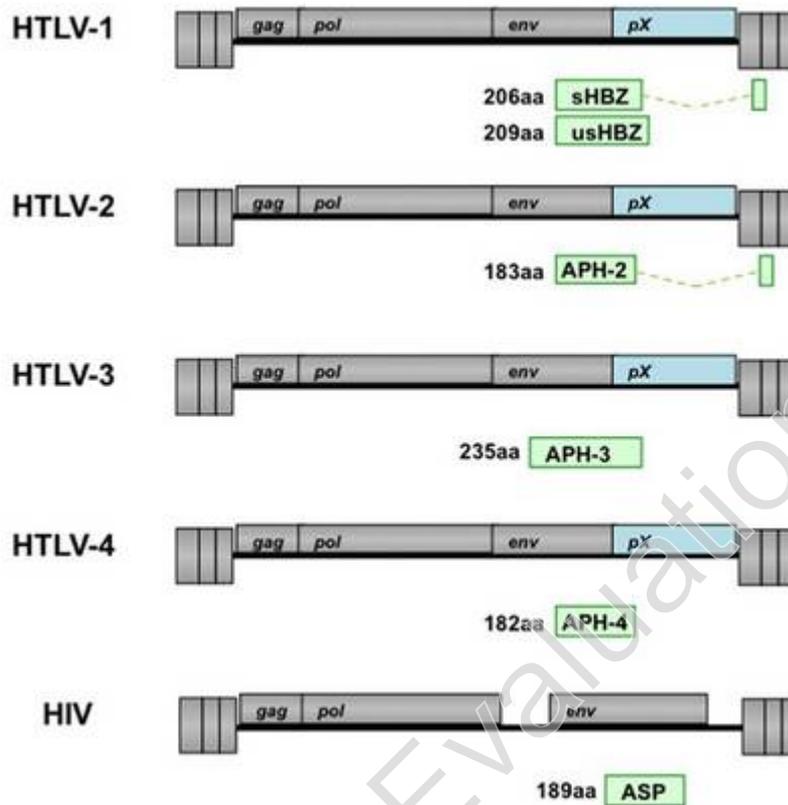


Figure 13 Représentation schématique des transcrits antisens des génomes proviraux d'HTLV et du VIH. La position des transcrits antisens codants les protéines (APH2/3/4) dans HTLV-2, HTLV3 et HTLV4 similaire à celle d' HBZ dans le génome du HTLV-1. La protéine antisens ASP codé à partir du brin antisens dans le génome du VIH est indiquée. Les nombres correspondent aux acides aminés totaux de chaque protéine. (Tiré de Zhao and Matsuoka, 2012)

HTLV-1 n'est pas unique dans sa capacité à produire des transcrits ARN à partir du brin antisens. Similairement à HTLV-1, les autres membres de la famille HTLV codent pour des protéines antisens (Figure 12). Ce phénomène de transcription antisens permet aux virus d'augmenter considérablement leur capacité codante. Il semble donc être commun parmi différentes familles de virus quelque soit le type de matériel génétique et la stratégie de répllication utilisée. La transcription bidirectionnelle a été trouvée par exemple chez les virus à ADN double brin comme le virus de la varicelle et du zona (VZV), et les virus à ADN double brin rétro-transcrit incluant le virus de l'hépatite de la marmotte (WHV) et le virus de l'hépatite B (HBV) (Meier, Luo et al., 1994; Velhagen, Hilger et al., 1995; Shimoda, Sugata et al., 1998). Le virus de l'hépatite D humain également, lequel possède un génome à ARN

simple brin circulaire, utilise un ARN complémentaire antigénomique intermédiaire comme une forme pour la transcription (Lai, 1995). Parmi les rétrovirus, en dehors d'HTLV, la transcription antisens a été rapportée également chez les lentivirus, le virus de l'immunodéficience féline (VIF) et plus récemment le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) où la protéine antisens ASP (Antisens Protein) a été identifiée au sein de notre équipe (Michael, Vahey et al., 1994; Briquet, Richardson et al., 2001; Ludwig, Ambrus et al., 2006; Clerc, Laverdure et al., 2011).

Cependant, en raison de la découverte relativement récente de ce phénomène de transcription antisens, les protéines antisens restent très peu étudiées. L'initiation de la transcription antisens dans le LTR 3' d'HTLV-2 a été rapportée pour la première fois en 2009 (Halin, Douceron et al., 2009). La protéine qui résulte de ce transcrite antisens a été nommée protéine antisens d'HTLV-2 (APH-2) et différemment d'HBZ d'HTLV-1, elle ne possède pas de domaine consensus bZIP. Toutefois cette protéine montre certaines caractéristiques moléculaires et des propriétés fonctionnelles semblables à celles d'HBZ (Halin, Douceron et al., 2009). Le transcrite APH-2 a une structure similaire à celle du transcrite codant HBZ : il est épissé, initié à des sites multiples dans le LTR3' et est polyadénylé. La longueur de l'intron et les régions non traduites en 5' en 3' sont également comparable à ceux du transcrite d'HBZ. A noter que tous les transcrits APH-2 sont sujet à l'épissage, puisque qu'aucun transcrite APH-2 non épissé n'a été détecté, à l'inverse d'HBZ, qui produit une quantité substantielle de transcrits non épissés codant pour une isoforme d'HBZ (Halin, Douceron et al., 2009). APH-2 est constitutivement exprimé dans les cellules infectées, et a été détecté *in vivo* dans la majorité des échantillons de PBMC de patients séropositifs (Halin, Douceron et al., 2009). Cette expression corrèle avec la charge provirale, rappelant HBZ (Douceron, Kaidarova et al., 2012). Cependant, APH-2 n'induit pas la prolifération des cellules et ne cause pas de lymphocytose *in vivo* (Bartman, Kaidarova et al., 2008). La protéine APH-2 montre une localisation nucléaire dans les cellules, mais à la différence d'HBZ, elle n'est pas retrouvée dans le nucléole (Halin, Douceron et al., 2009). Similairement à HBZ, APH-2 contient un domaine LXXLL et un motif LXXLL-like (ILXXLL) mais leur localisation est différente. Le motif LXXLL d'APH-2 est localisé en C-terminal alors que le motif ILXXLL est dans le domaine central d'APH-2. De plus au contraire d'HBZ ces domaines ne montre qu'une faible capacité d'interaction avec le cofacteur p300 (Halin, Douceron et al., 2009), néanmoins il n'a pas encore été déterminé si cela est dû à la différence de localisation des domaines d'interactions. De façon inattendue, malgré l'absence du domaine bZIP classique, APH-2 a conservé la capacité d'inhiber l'activation du LTR par la protéine Tax d'HTLV-2 et

d'interagir avec le facteur de transcription CREB (Halin, Douceron et al., 2009). Selon une étude récente, le motif LXXLL d'APH-2 est impliqué dans cette interaction avec CREB et dans la répression de la fonction de Tax2 sur l'expression des gènes viraux (Yin, Kannian et al., 2012).

A défaut d'un domaine bZIP type comme HBZ, le domaine central d'APH-2 contient un motif bZIP dit non conventionnel, en raison de l'absence de régularité entre les intervalles entre les résidus leucines modifiant la structure secondaire de l'hélice α . Cependant, APH-2 peut interagir avec les facteurs c-Jun et JunB via son domaine bZIP non conventionnel (Marban, McCabe et al., 2012). Cette interaction entre APH-2 et les différents membres Jun aboutit à une potentialisation de leurs activités basales et à la stimulation de la transcription dépendante de JunB et c-Jun par APH-2 (Marban, McCabe et al., 2012). Ce qui contraste avec la modulation négative ou positive d'HBZ sur les différents facteurs Jun (voir paragraphe « modification de la signalisation AP-1 »). Il est intéressant de noter que malgré l'absence d'interaction *in vivo* avec JunD, APH-2 est tout de même capable de stimuler l'activité transcriptionnelle de JunD. Cet effet d'APH-2 sur JunD se fait donc indirectement par l'intermédiaire de mécanismes différents de ceux mis en jeu pour c-Jun et JunB. Le mutant APH-2 Δ bZIP n'étant plus capable de stimuler l'activité transcriptionnelle de JunD, on peut donc conclure que le leucine zipper est nécessaire à APH-2 pour la transactivation induite par JunD. Des études supplémentaires sont tout de même nécessaires pour comprendre le mécanisme moléculaire précis et les partenaires protéiques impliqués dans ce processus. De plus, il a été montré que Tax d'HTLV-2 induit la transcription des facteurs AP1. Etonnamment, la co-expression de Tax2 et APH2 inhibe la transactivation induite par Tax2, tandis que l'expression individuelle de Tax2 et APH2 induit fortement la transcription des facteurs AP-1 (Marban, McCabe et al., 2012).

Contrairement à HBZ et Tax d'HTLV-1, une interaction a été mise en évidence entre APH2 et Tax d'HTLV-2. La même étude a également montré qu'il n'y avait pas de compétition d'interaction entre les facteurs Jun et Tax2 pour la liaison à APH2, suggérant que la région d'interaction de Tax2 se trouve hors du domaine bZIP-like (Marban, McCabe et al., 2012). Ces données démontrent une interaction hautement complexe entre Tax2 et APH-2 dans leur relation avec les autres facteurs de transcription. En raison de l'implication de la voie AP-1 dans de nombreuses fonctions cellulaires susceptibles d'affecter le destin de la cellule, les propriétés biologiques distinctes entre HBZ et APH-2 pourraient contribuer au potentiel pathogénique différentiel d'HTLV-1 et HTLV-2.

Les virus HTLV-3 et HTLV-4 récemment découvertes produisent également des transcrits antisens épissés et polyadénylés, dont le modèle d'épissage est similaire à celui d'HBZ avec une taille intronique comparable (Larocque, Halin et al., 2011). Par analogie à APH-2, les protéines codées ont été nommées APH-3 et APH-4 respectivement. Ces protéines montrent certaines similarités avec HBZ et APH-2 bien que leur localisation cellulaire et leur séquence d'acides aminés n'indiquent pas de différences fonctionnelles. La protéine APH-3 présente une localisation nucléaire et cytoplasmique alors qu'APH-4 est exclusivement nucléaire (Larocque et al, unpublished results).

De plus comme APH-2, APH-3 et APH-4 sont dépourvues d'un domaine bZIP type mais contiennent des régions riches en acides aminés basiques, lesquelles sont hautement conservées et prédites pour former des structures secondaires super enroulées de leucine zipper-like (Larocque, Halin et al., 2011). Des motifs LXXLL et LXXLL-like (responsable de la liaison de CBP/p300) ont été également observés mais leurs positions diffèrent de ceux observés chez HBZ. Et pour finir, APH-2 et APH-3 inhibent l'activation des LTR par Tax 1 (HTLV-1) et Tax3 (HTLV-3) (Larocque, Halin et al., 2011).

Les propriétés oncogéniques de tous les membres de la souche HTLV sont différentes. Comme HTLV-1, HTLV-2 a été associée à des pathologies semblables à la TSP/HAM, mais à aucune pathologie lymphoproliférative (Roucoux and Murphy, 2004), alors que l'infection à HTLV-3 et HTLV-4 n'est à ce jour associée à aucune pathologie (Duong, Jia et al., 2008; Thomas, Perzova et al., 2010).

Les manifestations cliniques distinctes peuvent être attribuées à des fonctions biologiques distinctes des protéines virales, notamment des protéines HBZ/APH. Comme présenté ci-dessus, les protéines antisens des différents membres de la souche HTLV, montrent des différences structurales et fonctionnelles suggérant des disparités potentielles dans leurs capacités à moduler l'expression cellulaire et/ou virale. Ces différences fonctionnelles pourraient éventuellement conditionner leurs propriétés oncogéniques différentielles et expliquer les devenir distincts des patients infectés. Par conséquent des études comparatives de ces protéines virales pourraient fournir des informations sur les mécanismes pathogéniques et améliorer la compréhension du processus de leucémogénèse induit par HTLV-1.

Chapitre 2

Les miARN et leurs rôles dans la carcinogénèse induite par HTLV-1

Au cours de l'établissement de la carcinogénèse, les cellules saines acquièrent une succession de caractéristiques moléculaires durant leur passage progressif à un stade néoplasique et le processus à étapes multiples de la pathogénèse peut être justifié par le besoin des cellules cancéreuses émergentes d'acquérir des caractéristiques leur permettant de devenir leucémiques. Les mécanismes moléculaires par lesquels les virus peuvent progresser dans leur cycle de vie et induire des états pathologiques dans l'organisme hôte sont variés et notre compréhension de ces mécanismes en constante évolution. Ces changements moléculaires induits principalement par les protéines virales Tax et HBZ confèrent le potentiel caractéristique des cellules leucémiques : la résistance à la mort cellulaire, la promotion du cycle cellulaire, l'invasion, la prolifération chronique, l'immortalité de réplication et la résistance aux traitements (Yamagishi and Watanabe, 2012).

Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires sous jacent qui induisent la leucémogénèse est donc primordial pour développer de nouvelles cibles thérapeutiques. Bien qu' HTLV-1 soit indubitablement impliqué dans l'immortalisation et la leucémogénèse des cellules infectées, les fondements mécanistiques de sa pathophysiologie dans la longue période de latence de l'ATL reste à être clarifiés.

L'une des avancées récentes la plus significative dans la recherche biomédicale a été la découverte des petits ARN non codants nommés microARN (miARN). Les miARN sont de petits ARN de 20-22 nucléotides, transcrits à partir du génome, qui régulent l'expression de protéines cibles en s'appariant de manière spécifique aux ARN messagers, inhibant ainsi leur traduction ou entraînant leur dégradation. Ces dix dernières années, il a été démontré que plusieurs virus à ADN, tel que l'EBV (Virus de l'Epstein-Barr), le KSHV (virus de l'herpès associé au sarcome de Kaposi) ou le VIH (Virus de l'immunodéficience humaine) peuvent

altérer les profils des miARN de l'hôte et même coder leurs propres miARN viraux dans le but d'avantager leur réplication (Pfeffer, Zavolan et al., 2004; Cameron, Yin et al., 2008; Gatto, Rossi et al., 2008). Plus récemment, il a été montré que des rétrovirus, tel que le VIH-1 (virus de l'immunodéficience humaine - 1) et le BLV (virus de la leucémie bovine), peuvent effectuer des changements similaires dans les miARN de l'hôte et coder également plusieurs miARN viraux malgré leur petit génome (Klase, Kale et al., 2007; Houzet, Yeung et al., 2008; Ouellet, Plante et al., 2008; Klase, Winograd et al., 2009; Althaus, Vongrad et al., 2012; Kincaid, Burke et al., 2012; Schopman, Willemsen et al., 2012). Par ailleurs, diverses études ont également démontré que le virus HTLV-1 altère le profil des miARN de l'hôte (Bellon, Lepelletier et al., 2009; Rahman, Quann et al., 2012). Si on prend en compte ces données sur HTLV-1 et les miARN ainsi que les récentes découvertes de modulation des miARN par d'autres rétrovirus on peut concevoir l'importance de la machinerie de l'interférence ARN (ARNi) dans ces infections virales oncogéniques.

Dans cette deuxième partie, nous allons nous intéresser à la régulation de la voie des micro-ARN dans le processus leucémique induit par HTLV-1. Avant d'aborder ce sujet nous allons tout d'abord discuter des connaissances actuelles sur la voie miARN: le mécanisme d'interférence par l'ARN, les étapes de la biogenèse des miARN, les modes de répression des ARNm cibles et les fonctions biologiques de ces petits ARN non codants. Ensuite nous aborderons les liens qui existent entre miARN et cancer et plus précisément l'ATL nous amenant à notre problématique qui est de comprendre les mécanismes potentiels responsable de l'altération de l'expression des miARN lors de l'infection par HTLV-1.

I. La voie des micro-ARN

Le dogme de la biologie moléculaire suppose que les ARN ont un rôle structural (ARNr, ARNt) ou de porteur d'information (ARNm). La découverte des miARN et de leur rôle comme régulateurs de l'expression du génome a ainsi remis en question le dogme central de gènes fonctionnels codant nécessairement pour des protéines qui par conséquent ne représente qu'une vision partielle de la complexité du fonctionnement des cellules. Ces miARN font partie intégrante du fonctionnement de la cellule : la régulation de certains gènes est indispensable pour que les cellules, bien que partageant le même ADN, puissent remplir des fonctions différentes. Les miARN sont de petits ARN non codant qui ont été mis en

évidence à la fin du XXe siècle suite comme étant un des effecteurs du mécanisme de l'interférence ARN ou *RNA silencing* consistant en l'inactivation séquence spécifique de l'expression des gènes au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel par un ARN.

I.1. L'interférence ARN

I.1.1. Origine et découverte de l'interférence ARN

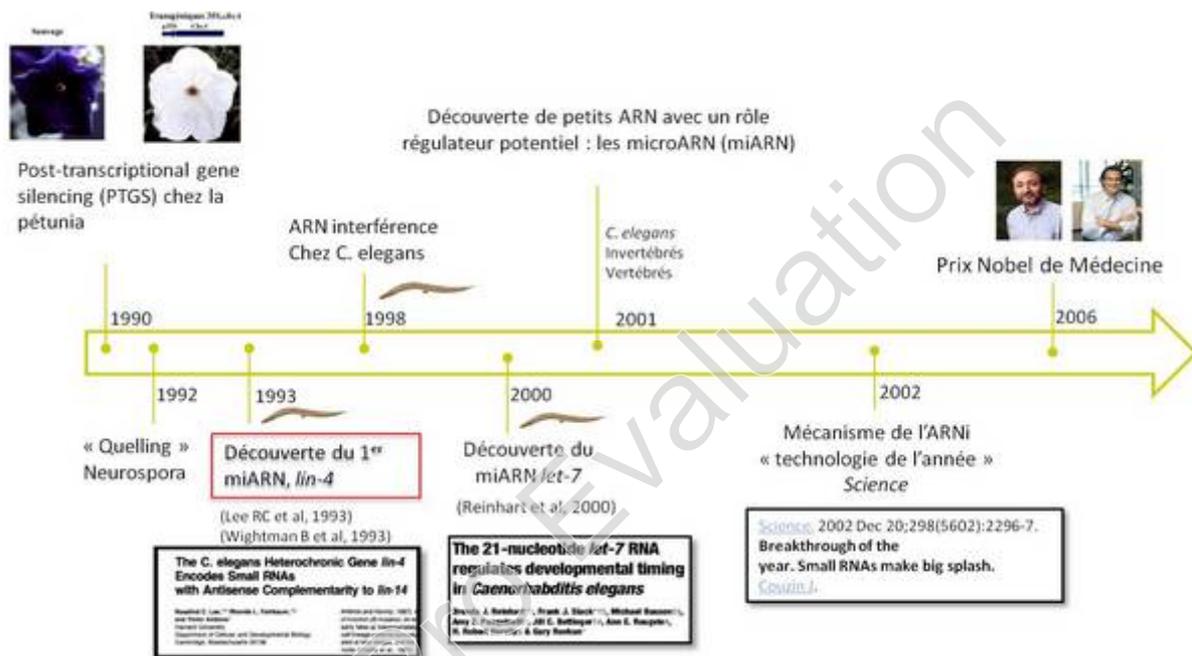


Figure 14 Représentation chronologique de l'historique de l'interférence ARN

L'idée qu'un ARN peut réguler un autre ARN est survenue dès 1985 par une équipe allemande. Ces chercheurs ont mis en évidence qu'on pouvait éteindre sélectivement l'expression du gène *Krüppel (Kr)* chez la *Drosophile* en injectant des ARN antisens complémentaires à *Kr* dans les embryons (Rosenberg, Preiss et al., 1985). Les mécanismes moléculaires, permettant d'expliquer cette étonnante technique pour produire des mutants sans mutation, sont restés mystérieux durant de nombreuses années.

Par la suite, ce phénomène a été mis en évidence chez les végétaux lors d'expériences de transgénése. En 1990, l'équipe de Richard Jorgensen a observé ce phénomène, tout à fait par hasard, lors de l'injection de copies supplémentaires du gène de la chalcone synthase

(CHS), afin de renforcer la couleur violette des pétunias. Or, cette intervention a plutôt eu l'effet inverse et les fleurs obtenues se sont avérées au contraire partiellement ou totalement blanches et le niveau d'ARNm de la CHS cinquante fois inférieure aux fleurs sauvages (Figure 14). Ce mécanisme, encore incompris, est alors appelé « co-suppression » puisque les deux copies du gène (endogène et transgène) semblent interagir de manière négative en se « co-supprimant » (Napoli, Lemieux et al., 1990; Jorgensen, Cluster et al., 1996). En 1995, Guo et Kemphues injectent un ARN antisens à l'ARNm de *par-1* dans les gonades du ver *C. elegans*, l'ARN antisens étant supposé s'hybrider à l'ARNm et inhiber ainsi l'expression du gène dans la descendance. De manière surprenante, le contrôle effectué avec l'ARN sens de *par-1* donne des résultats similaires, mimant le phénotype d'un mutant *par-1* (Guo and Kemphues, 1995).

Ce n'est qu'en 1998 que les travaux d'Andrew Fire et Craig Mello ont apporté une explication à ces résultats étranges en décrivant pour la première fois le mécanisme d'interférence ARN (iARN) chez le nématode *C. elegans*. Leurs résultats montrent que l'expression de gènes endogènes est inhibée de manière spécifique et très efficace par l'injection d'ARN double brin (ARNdb) homologue au gène visé, tandis que l'ARN sens ou l'ARN antisens seuls sont relativement inefficaces (Fire, Xu et al., 1998) (Figure 14).

Peu de temps après, il est montré que le mécanisme de l'iARN est également fonctionnel chez la drosophile où de l'ARNdb est utilisé de manière efficace sur des embryons pour inactiver des gènes et mimer des phénotypes mutants (Kennerdell and Carthew, 1998). Les résultats obtenus par Guo et Kemphues étaient en fait dus à une faible contamination des préparations d'ARN par de l'ARNdb, liée à l'activité non spécifique des ARN polymérase utilisés produisant une petite quantité d'ARN antisens. De même, les résultats de Jorgensen sur le pétunia étaient dus à une faible transcription de l'ARN antisens pouvant former un ARNdb avec l'ARN sens. Ce premier pas vers la compréhension du mécanisme de *RNA silencing* permettra à Fire et Mello de se voir attribuer le prix Nobel de Médecine en 2006 (Figure 14). Ces découvertes ont unifié un nombre de phénomènes de « silencing » induit par l'ARN décrits précédemment tel que le « Post Transcriptional Gene Silencing » (PTGS) chez les plantes (Ingelbrecht, Van Houdt et al., 1994; Baulcombe, 1996) et le « quelling » chez les champignons (Romano and Macino, 1992; Cogoni, Romano et al., 1994) (Figure 14).

Subséquentement, des études chez *C. elegans* ont indiqué que la première étape de la voie de l'interférence ARN implique la production d'une molécule effectrice spécifique à la

séquence cible (Grishok, Tabara et al., 2000). C'est en 1999 que la notion d'ARN de petites tailles comme intermédiaires du mécanisme d'interférence a été suggérée par Beaucombe et Hamilton suite à la découverte que la dégradation de l'ARN induite par le PTGS s'accompagne de la production d'ARN d'une longueur moyenne de 25 nucléotides correspondant aux séquences sens et antisens de l'ARN cible (Hamilton and Baulcombe, 1999). Par la suite par une dissection approfondie du phénomène de l'iARN chez la drosophile en utilisant des systèmes d'études *in vitro* et *in vivo*, des études confirment et complètent le mécanisme d'interférence ARN. Dans un système *in vitro* dérivé d'embryons de drosophile, elles montrent que l'introduction d'ARNdb entraîne la dégradation spécifique de l'ARNm correspondant en produisant des fragments d'ARN de 21 à 23 nucléotides (Hamilton and Baulcombe, 1999). Thomas Tuschl et ses collaborateurs démontrèrent que ces ARN sont générés à partir du double brin d'ARN (Tuschl, Zamore et al., 1999). Puis la même équipe montre que l'ARNm cible est clivé dans la région correspondant à l'ARNdb, et tous les 21-23 nt environ, suggérant que les siARN sont les éléments nécessaires pour guider le clivage de l'ARN cible (Zamore, Tuschl et al., 2000; Elbashir, Lendeckel et al., 2001).

Par ailleurs, Hammond et ses collaborateurs mettent ainsi en évidence, dans des extraits cellulaires préalablement transfectés avec un ARNdb, une activité nucléase possédant l'activité de dégradation de l'ARNm homologue cible. Cette activité nucléase est nommée RISC pour RNA-induced silencing complex, et le fractionnement des extraits cellulaires permet de montrer que cette activité RISC co-purifie avec des petits ARN de 25 nt correspondant à des fragments sens et antisens dérivant de la séquence de l'ARNdb introduit (Hammond, Bernstein et al., 2000). Ces résultats suggèrent donc que les petits ARN associés au complexe guident la nucléase pour permettre la reconnaissance spécifique de l'ARN cible. Une étape supplémentaire est franchie lorsqu'Elbashir et ses collaborateurs montrent que des fragments synthétiques d'ARNdb de 21-22 nt sont suffisants pour éteindre de manière spécifique de la séquence l'expression d'un gène rapporteur de la luciférase dans ce modèle *in vitro* (Elbashir, Lendeckel et al., 2001). Ils confirment ainsi que les principaux acteurs de la voie de l'iARN et de la répression traductionnelle sont de petites molécules d'ARNdb et les nomment siARN pour « short interfering RNAs » (Elbashir, Lendeckel et al., 2001).

I.1.2. Mécanisme de l'interférence ARN

La caractérisation biochimique a montré que les siARN sont des duplexes d'ARN doubles brins avec des extrémités hydroxylées en 3' sortantes de 2 à 3 nt et un groupement phosphate en 5' (5'-P) (Elbashir, Lendeckel et al., 2001) (Figure 15A). Cette structure est caractéristique d'un motif de clivage enzymatique semblable aux RNase III, ce qui mène à l'identification de la famille très conservée d'enzymes RNase de type III Dicer comme les médiateurs du clivage des ARN db (Bernstein, Caudy et al., 2001; Billy, Brondani et al., 2001; Ketting, Fischer et al., 2001). Des indices biochimiques et génétiques plus étendus ont permis une meilleure compréhension de la manière dont de longs ARNdb pourraient causer la dégradation de l'ARNm cible (Sharp, 2001; Hannon, 2002; McManus and Sharp, 2002; Zamore, 2002) (Figure 15B). Restreint au cytoplasme (Hutvagner and Zamore, 2002); (Zeng and Cullen, 2002; Kawasaki and Taira, 2003), ce processus commence par le clivage de longs ARN db pour produire des siARN par Dicer. Ces siARN sont incorporés dans le complexe multiprotéique RISC (RNA-inducing silencing complex). Le duplexe siARN est dissocié, menant le brin antisens à guider RISC à son ARNm cible homologue pour le clivage endonucléolytique. L'ARNm cible est clivé à un site unique dans le centre de la région du duplexe entre le siARN guide et l'ARNm cible, à 10 nucléotide de l'extrémité 5' du siARN (Elbashir, Lendeckel et al., 2001).

La purification des complexes RISC dans des cellules HeLa a permis de montrer que le brin antisens du siRNA réside dans le complexe RISC avec AGO1 et AGO2, des protéines de la famille Argonaute (Martinez, Patkaniowska et al., 2002). Il existe huit protéines de la famille Argonaute dans le génome humain, quatre de la sous-catégorie AGO (AGO1-4) et quatre de la sous-catégorie Piwi (Sasaki, Shiohama et al., 2003). Chez les mammifères, toutes les protéines de la sous-catégorie AGO sont capables de fixer les siARN, mais seule AGO2 possède l'activité catalytique de clivage de l'ARNm cible (Liu, Carmell et al., 2004; Meister, Landthaler et al., 2004). AGO2 sert également à activer le complexe RISC en clivant le brin sens ou brin passager pendant l'assemblage du complexe (Matranga, Tomari et al., 2005; Rand, Petersen et al., 2005). Les fonctions de Dicer, des protéines AGO et du complexe RISC seront abordées plus en détails dans la partie « *Biogenèse des micro-ARN* ».

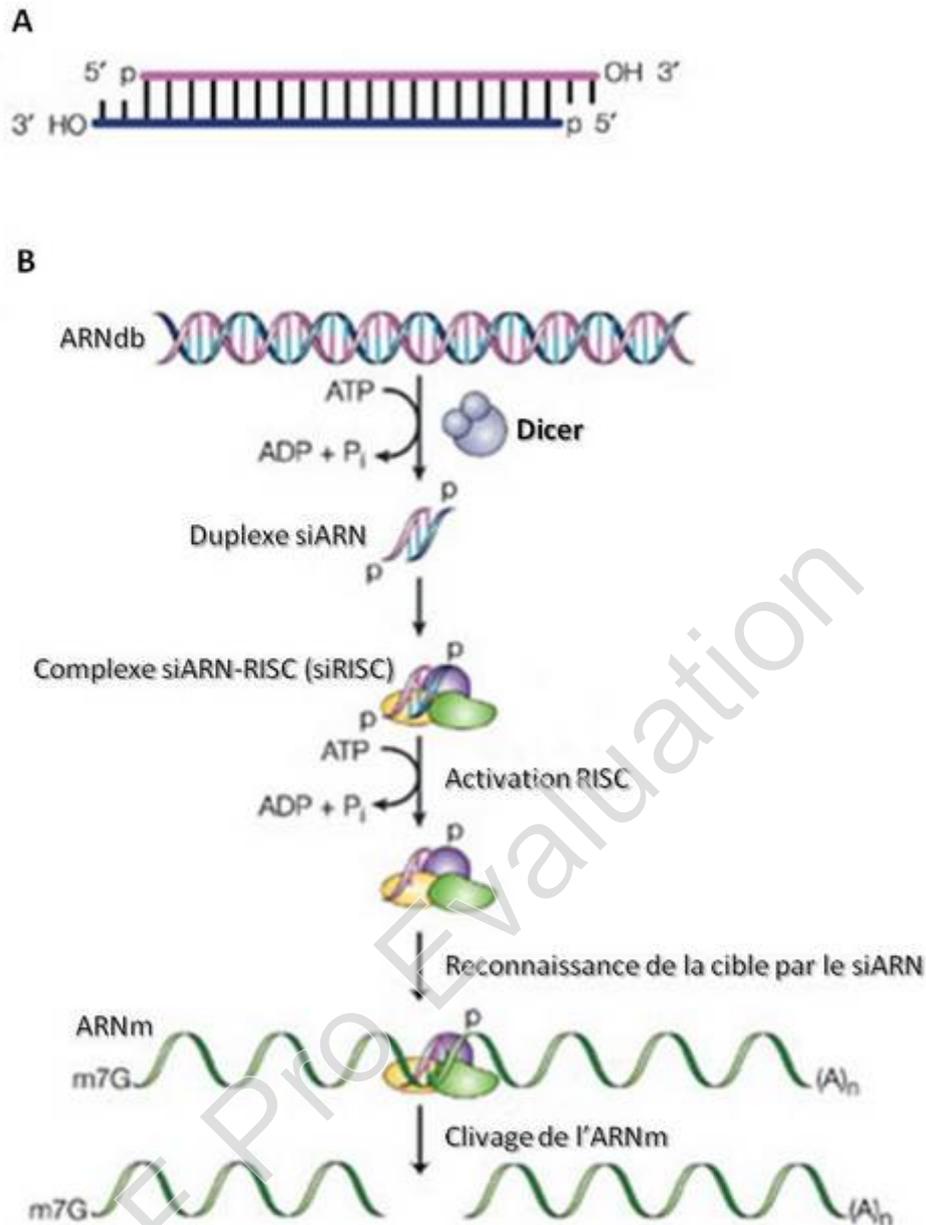


Figure 15 Représentation schématique de la voie des siARN. (A) Caractéristiques moléculaires d'un siARN (Short interfering ARN). Il est représenté l'extrémité 5' phosphorylée, la région duplexée de 19 nucléotides et 2 nt non appariés et l'extrémité 3' non phosphorylée qui sont les caractéristiques de produits d'un clivage par une RNAase de type III. (B) la voie des siARN L'ARNdb est fragmenté en siARN par la ribonucléase Dicer. Les siARN sont ensuite pris en charge par le complexe RISC. L'activation du complexe RISC permet la dégradation spécifique de l'ARN correspondant guidée par le siARN (Adaptée de Dykxhoorn, Novina et al. 2003).

À ce jour, les siARN représentent un outil moléculaire très puissant de plus en plus utilisé en recherche fondamentale et thérapeutique. C'est une méthode d'investigation de la fonction d'un gène chez les eucaryotes en bloquant spécifiquement et transitoirement l'expression du gène en question, et en observant les conséquences sur le fonctionnement cellulaire. L'application de cette méthode est limitée chez les mammifères car l'intrusion d'ARN db de plus de 30 nt dans les cellules déclenche une réponse de défense antivirale non spécifique appelée « réponse interféron » (Elbashir, Lendeckel et al., 2001). L'ARNdb active la protéine kinase dépendante de l'ARNdb (PKR) et la 2'-5'-oligoadenylate synthétase. La PKR phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α , déclenchant ainsi une inhibition globale de la traduction, tandis que la 2'-5'-oligoadenylate synthetase active indirectement la RNase L qui dégrade de manière non-spécifique les ARNm (Baglioni, Minks et al., 1978; Clemens and Williams, 1978; Clemens, 1997). Lorsque cette réponse a lieu, si elle ne conduit pas à l'apoptose, elle provoque une inhibition globale et non spécifique de la traduction (Caplen, Fleenor et al., 2000).

De façon intéressante, aucun siARN exprimé de manière endogène n'a été trouvé chez les mammifères. Cependant de petits ARN non codant appelés microARN (miARN) ont été clonés chez divers organismes et dans différents types cellulaires (Pasquinelli, 2002). D'emblée, précisons qu'un miARN est le produit d'un gène situé sur un locus distinct de celui du gène dont il va « éteindre » l'expression. Ce processus endogène « d'hétérosilence », propre aux plantes et aux métazoaires, s'oppose à celui « d'autosilence » d'un siARN consécutif à l'intrusion d'un ARN double brin (transposon, virus) dans la cellule eucaryote.

I.1.3. Découverte des micro-ARN (miARN)

Le premier miARN, lin-4, a été décrit de manière concomitante par les équipes de Victor Ambros et Gary Ruvkun en 1993 en tentant de décrypter les mécanismes de développement du ver *C. elegans* (Figure 14). Des cribles génétiques sur des mutants de cet organisme modèle avaient déjà permis d'identifier les gènes lin-4 et lin-14 comme essentiels pour le contrôle temporel du développement post-embryonnaire du nématode (Chalfie, Horvitz et al., 1981; Ambros and Horvitz, 1984). En effet, le développement de *C. elegans* comporte six stades successifs: l'embryogenèse, quatre stades larvaires (L1 à L4) et le stade adulte. Il a ainsi été montré que la délétion du gène lin-4 engendre un mutant qui « réitère » le

premier stade larvaire (L1) donc bloqué dans le processus de développement et que le phénotype sauvage est restauré par l'ajout d'un fragment d'ADN contenant le gène *lin-4*. A l'inverse, des mutations de *lin-14* entraînaient de manière prématurée des caractéristiques de stades larvaires plus avancés. Ruvkun et ses collaborateurs ont montré que *lin-14* codait pour une protéine nucléaire dont la diminution graduelle d'expression à la fin du stade larvaire L1 initiait le passage au stade L2 (Ruvkun and Giusto, 1989).

Les membres de l'équipe d'Ambros recherchaient la protéine codée par le gène *lin-4* qui contrôle le développement larvaire de *C. elegans* et réprime l'expression de la protéine *lin-14*. La protéine codée par *lin-4* restait introuvable et ils finirent par démontrer que ce gène ne code pas pour une protéine mais pour deux petits ARN non traduits de 66 et 22 nucléotides, l'un étant le précurseur de l'autre (Lee, Feinbaum et al., 1993; Bartel, DP, 2004). Il a ensuite été montré qu'une partie de la séquence du plus petit des deux ARN est complémentaire de l'extrémité 3' l'ARNm de *lin-14* (Lee, Feinbaum et al., 1993; Bartel, DP, 2004). Au même moment, Whightman et al. montrent que la région 3'UTR de *lin-14* est suffisante à sa régulation par *lin-4* au niveau post-transcriptionnel (Wightman, Ha et al., 1993). Il est ensuite montré que c'est une interaction directe par un appariement partiel antisens du petit ARN *lin-4* avec les séquences contenues dans le 3'UTR de l'ARNm de *lin-14* qui est responsable de l'inhibition de *lin-14* au moment de la traduction, permettant la transition du stade larvaire L1 vers le stade L2 (Ha, Wightman et al., 1996; Olsen and Ambros, 1999). Après cette découverte surprenante, aucune homologie de séquence avec le gène *lin-4* n'a été identifiée dans les bases de données disponibles à l'époque. Ce mode de régulation a été catalogué alors comme une bizarrerie spécifique du développement des nématodes.

En 2000, l'équipe de Gary Ruvkun découvre un nouveau miARN, *let-7*, chez *C. elegans* (Figure 14); il contrôle la transition entre le stade larvaire L4 et le stade adulte. Cette découverte a permis de généraliser le mode d'action de *lin-4*. En effet, le gène *let-7* code pour un ARN de 21 nucléotides qui inhibe l'expression des protéines LIN-41 et LIN-42 en se fixant sur la région 3'UTR des ARNm correspondants permettant ainsi la transition vers le stade adulte (Reinhart, Slack et al., 2000). Contrairement à *lin-4*, des homologues de *let-7* sont rapidement découverts dans d'autres organismes, y compris les mammifères, et une structure conservée de type tige-boucle est prédite pour le transcrite précurseur (Pasquinelli, Reinhart et al., 2000). Une structure similaire de type tige-boucle est prédite pour le précurseur de *lin-4* et correspond à la forme plus grande de 61 nt que Lee et al. avaient détecté (Lee, Feinbaum et al., 1993). En 2001, les groupes de Victor Ambros, David Bartel et Thomas Tuschl publient

simultanément des études montrant l'existence de nombreux autres gènes, conservés du ver à l'humain, codant pour des petits ARN comme lin-4 et let-7 (Lagos-Quintana, Rauhut et al., 2001; Lau, Lim et al., 2001; Lee and Ambros, 2001) (Figure 16). Par la suite le nombre de miARN identifiés, aussi bien que le nombre de publications les décrivant a connu une considérable expansion. On compte aujourd'hui plus de 1600 miARN humains identifiés, séquencés et annotés dans le génome (www.mirbase.org). Contrairement à ce qui avait été envisagé lors de la découverte, on sait maintenant que l'expression de ces microARN n'est pas seulement régulée dans le temps, au cours des différentes phases du développement, mais qu'elle est également spécifique des cellules et des tissus : ainsi miR-1 est majoritairement exprimé dans le cœur chez l'homme et chez la souris où il représente jusqu'à 45% de tous les microARN exprimés (Lee and Ambros, 2001; Lagos-Quintana, Rauhut et al., 2002). En conséquence, ces petits ARN qui avaient tout d'abord été appelés « small temporal RNA » sont désormais nommés micro-ARN (miARN) (Lagos-Quintana, Rauhut et al., 2001; Lau, Lim et al., 2001; Lee and Ambros, 2001; Bartel, DP, 2004). Les miARN sont nommés miR- plus un nombre donné (exemple, miR-125), bien qu'il y ait quelques exceptions. Les miARN de séquences similaires sont en général distingués par l'ajout d'une lettre après le nombre du miARN (exemple miR125-b).

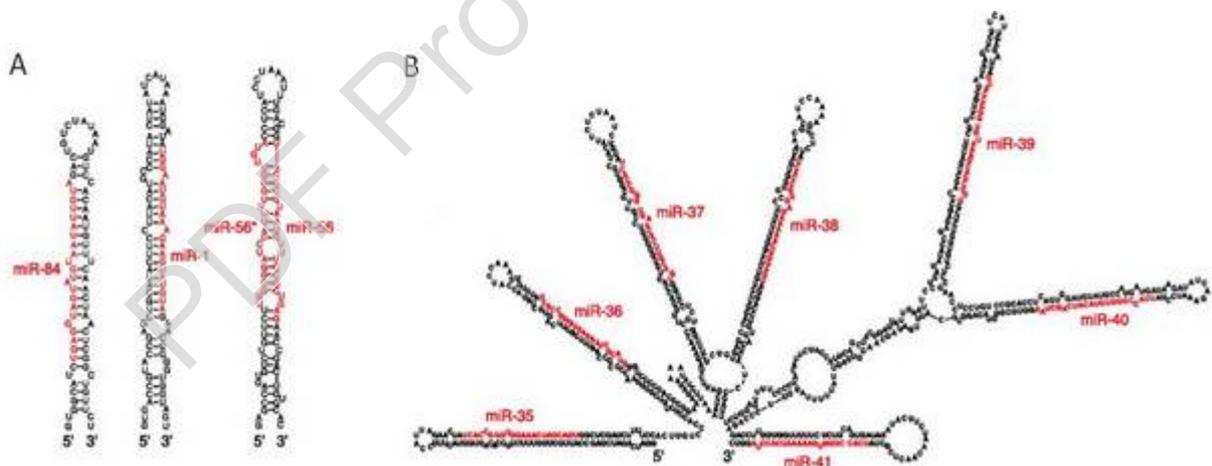


Figure 16 Exemples de miARN et leurs structures secondaires chez *C. elegans*. Structures secondaires de type tige-boucle prédites par « RNAfold » pour les précurseurs de miRNAs matures (en rouge) clonés chez *C. elegans* en 2001. (A) miARN individuels : miR-84 (un miRNA de la même famille que let-7), miR-1 (un miARN conservé au cours de l'évolution), miR-56 et miR-56* (deux miRNAs clonés provenant des deux bras de la même structure tige-boucle) (B) Exemple d'un cluster de sept miRNAs, le cluster miR-35-41. (D'après Lau, Lim et al., 2001).

I.1.4. Origine et évolution des miARN

Les miARN existent chez des organismes aussi éloignés que les plantes et les animaux mais leurs voies de biogenèse et les mécanismes par lesquels ils régulent leurs cibles sont très différents. Les plantes favoriseraient davantage un mode de dégradation de l'ARNm par une forte homologie du miARN avec l'ARNm cible alors que la branche animale s'orienterait d'avantage sur un mode de répression traductionnelle qui préserverait la stabilité des ARNm ciblés (Ambros, 2004; Bartel, DP, 2004). Dans le cas d'une inhibition de la traduction, on remarque que les microARN ciblent généralement dans la région 3' non traduite des ARNm (ou 3'UTR) (Rhoades, Reinhart et al., 2002; Jackson, Hellen et al., 2010). De plus, aucune famille de miARN n'a été trouvée conservée entre les deux règnes, conduisant à l'hypothèse que les miARN des plantes et des animaux ont des origines indépendantes au cours de l'évolution (Jones-Rhoades, Bartel et al., 2006).

Comme let-7, de nombreux miARN sont conservés chez les animaux bilatériens (Prochnik, Rokhsar et al., 2007). Par exemple, 55% des miARN de *C. elegans* ont des miARN homologues dans le génome humain, indiquant leur rôle important au cours de l'évolution animale (Ibáñez-Ventoso, Vora et al., 2008). En revanche, il n'y a pas de miARN décrit chez les organismes unicellulaires, qu'il s'agisse des bactéries ou des levures. Quelques miARN ont été trouvés chez des organismes métazoaires ancêtres des bilatériens : environ 40 chez l'anémone de mer *Nematistella vectensis* et 8 chez la demosponge *Amphimedon queenslandica* (Grimson, Srivastava et al., 2008). Leur nombre est beaucoup moins important que chez les organismes métazoaires plus complexes. Cette expansion spectaculaire du répertoire des miARN suggère que la régulation génique par les miARN a augmenté parallèlement, et a contribué à la complexité des organismes (Sempere, Cole et al., 2006).

I.2. Biogénèse des micro-ARN

La biogénèse des miARN est un processus à plusieurs étapes et commence par la synthèse d'un long transcrit appelée un pri-miARN à partir de différentes régions du génome. Les pri-miARN présentent localement une ou plusieurs structures secondaires de type tige-boucle de 70 nucléotides constituent les futurs précurseurs des miARN et ont leur propre promoteur ou partagent des promoteurs avec leurs gènes hôtes codant des protéines.

I.2.1. Organisation génomique

On estime que 1 à 5% des gènes chez les animaux codent pour des miARN. Lesquels sont éparpillés sur tous les chromosomes chez l'homme à l'exception du chromosome Y et sont codés au sein d'unités transcriptionnelles codant ou non pour des protéines. Ainsi un gène dit non codant (c.-a.-d. ne codant pas pour une protéine) peut coder pour un miARN. Bien qu'il n'y ait pas de statistique claire sur la répartition des miARN entre gènes codant ou non, il est considéré qu'environ 60% des miARN sont localisés dans des gènes non-codant et environ 40% dans des gènes codants des protéines. Environ 50% des miARN humains appartiennent à des unités transcriptionnelles déjà connues et annotées du génome, et sont principalement trouvés dans les introns de ces gènes (Rodriguez, Griffiths-Jones et al., 2004; Saini, Griffiths-Jones et al., 2007; Griffiths-Jones, Saini et al., 2008). Quelques miARN sont présents dans des exons mais il s'agit alors principalement de gènes codant pour des miARN et non des protéines. Il est intéressant de noter par exemple qu'une structure de type tige-boucle avait été identifiée comme seul élément conservé dans l'ARN « non-codant » BIC et ainsi supposée constituer l'élément fonctionnel de ce gène (Tam, 2001). On sait aujourd'hui qu'il s'agit du miARN miR-155 (Figure 4). Enfin il existe de très rares cas (deux dans l'étude de (Rodriguez, Griffiths-Jones et al., 2004) de miARN codés dans un exon de gène codant une protéine, comme miR-985 dans le dernier exon de l'ARNm de CACNG8 (Figure 17).

Bien que la plupart des gènes des miARN dérivent d'unités transcriptionnelles indépendant, environ un tiers des miARN sont regroupés en clusters (Lagos-Quintana, Rauhut et al., 2001; Lau, Lim et al., 2001; Mourelatos, Dostie et al., 2002) et transcrits sous forme de long transcrit primaire polycistronique comprenant plusieurs miARN régulée de façon coordonnée (Lee, Jeon et al., 2002). Cette organisation génomique confère une expression simultanée de miARN similaires, probablement conduisant à une diversité combinatoire et une synergie dans les effets biologiques (Lee and Dutta, 2009). Il a été proposé que les transcrits ARNm codants pour des protéines qui interagissent les unes avec les autres sont typiquement ciblées par les miARN d'un même cluster polycistronique (Yuan, Liu et al., 2009). Ceci soutient que les miARN en cluster sont fonctionnellement liés par le ciblage d'un même gène ou de différents gènes d'une même voie de signalisation. Néanmoins, tous les miARN issus d'un même cluster transcriptionnel ne sont pas exprimés à des niveaux comparables, suggérant que les miARN sont également régulés au niveau post-transcriptionnel (Lee and Dutta, 2009).

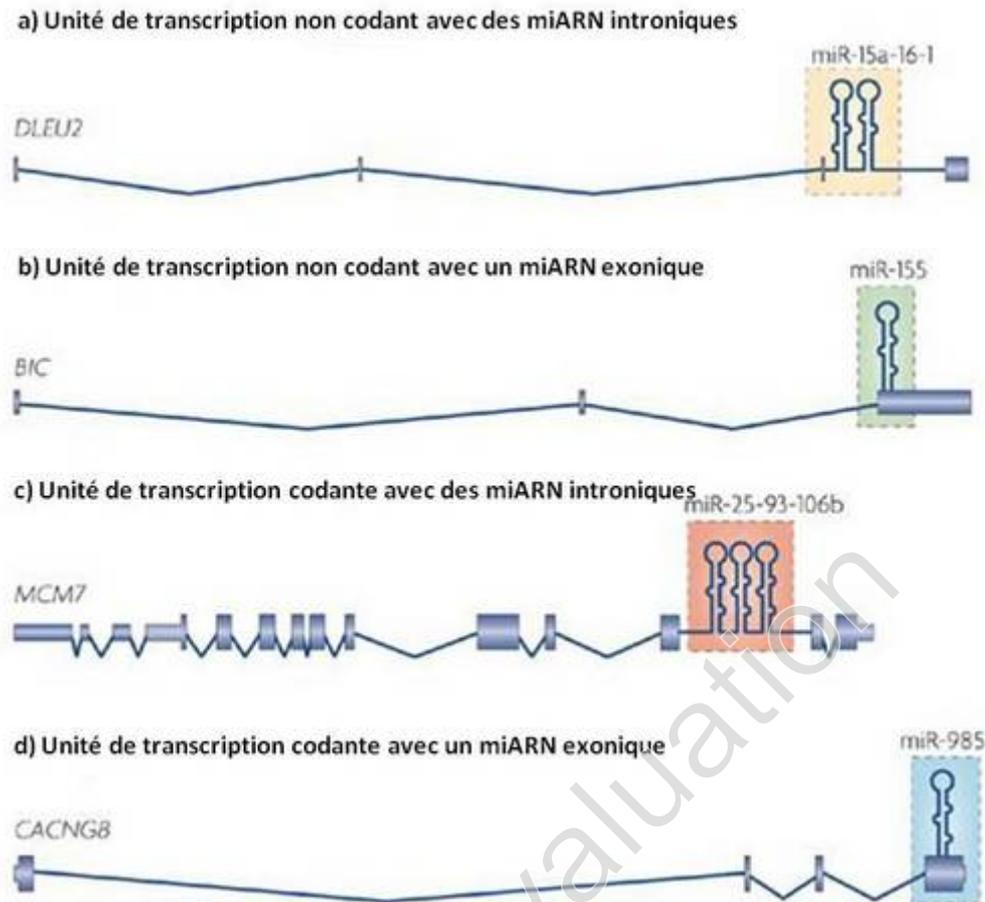


Figure 17 Organisation génomique des pri-miARN (a) Le cluster *miR-15a~16-1* est localisé dans un intron du long ARN non codant appelé *DLEU2* (« *deleted in lymphocytic leukemia 2* »). (b) Le précurseur de *miR-155* se trouve dans un exon de l'ARN non codant du gène *BIC* (« *B-cell integration cluster*»). (c) Le cluster *miR-106b~93~25* est intégré dans un intron du gène codant pour *MCM7* (« *minichromosome maintenance déficient 7* »). (d) Le précurseur de *miR-985* est localisé dans le dernier exon de l'ARNm de *CACNG8*. Les structures en épingle à cheveux représentent les motifs tiges boucles des miARN. Les boîtes bleues indiquent les régions codantes des protéines (D'après Kim, Han et al. 2009).

I.2.2. Transcription

Les miARN introniques sont généralement présents dans des gènes codants et sont retrouvés préférentiellement dans la même orientation que les ARNm, suggérant qu'ils sont co-transcrits avec leur gène hôte (Aravin, Lagos-Quintana et al., 2003; Lagos-Quintana, Rauhut et al., 2003; Lai, Tomancak et al., 2003). Cela fournit un mécanisme propice à l'expression coordonnée d'un miARN et d'une protéine. On peut donc imaginer un scénario dans lequel une telle expression coordonnée pourrait être utile, ce qui pourrait expliquer les

relations conservées entre les miARN et les ARNm. Un exemple frappant de cette conservation est celui de miR-7, trouvé dans l'intron de hnRNP K à la fois chez les insectes et les mammifères (Aravin, Lagos-Quintana et al., 2003). A cela s'ajoute un profil d'expression tissu-spécifique du miARN qui est corrélé avec celle de l'ARNm (Rodriguez, Griffiths-Jones et al., 2004; Baskerville and Bartel, 2005), et des évidences expérimentales montrant la possibilité de produire des miARN matures introniques à partir de l'expression du gène hôte (Kim and Kim, 2007; Morlando, Ballarino et al., 2008). Cependant, l'équipe de Monteys a montré que des promoteurs dépendant de l'ARN polymérase II (et/ou ARN polymérase III), étaient présents dans les introns de gènes hébergeant des gènes de miARN, et qu'environ 30% des miARN introniques peuvent être transcrits à partir d'un promoteur indépendant du gène hôte (Ozsolak, Poling et al., 2008; Corcoran, Pandit et al., 2009; Monteys, Spengler et al., 2010). Certains miARN pourraient d'ailleurs être transcrits à la fois à partir de leur promoteur indépendant et à partir du promoteur du gène hôte.

A contrario, les miARN codés par des gènes indépendants semblent avoir leurs propres promoteurs et systèmes de régulation. Les miARN contenus dans des unités transcriptionnelles ne codant pas de protéines sont transcrits comme les ARNm par l'ARN polymérase II en un long transcrit primaire mesurant plusieurs kilobases, possédant une coiffe m⁷G en 5', polyadénylée et appelé pri-miARN (Cai, Hagedorn et al., 2004; Lee, Kim et al., 2004; Gu, He et al., 2006; Saini, Griffiths-Jones et al., 2007). Cependant, la transcription d'une minorité de miARN est générée par d'autres voies, particulièrement les miARN issus de répétitions génomiques. En effet, il a été proposé que certains miARN associés à des répétitions Alu, tels que ceux du mégacuster C19MC sur le chromosome 19, puissent être transcrits par l'ARN polymérase III (Borchert, Lanier et al., 2006). De plus, les études récentes ayant identifiées de nouveaux promoteurs de miARN introniques indiquent que 5% d'entre eux portent des marques de promoteurs dépendants de l'ARN polymérase III et que certains de ces promoteurs sont effectivement occupés par celle-ci (Ozsolak, Poling et al., 2008; Monteys, Spengler et al., 2010). Cependant, les résultats de Bortolin-Cavaille et ses collaborateurs, en 2009, remettent en question la transcription du mégacuster de miARN C19MC par l'ARN polymérase III et indiquent qu'ils sont bien transcrits par l'ARN polymérase II sous la forme d'un long transcrit non codant (Bortolin-Cavaille, Dance et al., 2009). La grande majorité des pri-miARN semble donc être transcrite par l'ARN polymérase II et porte les marques caractéristiques de ce mode de transcription (coiffe en 5', polyadénylation) mais la possibilité que certains miARN soient transcrits par l'ARN polymérase III ne peut être exclue. Si la grande majorité des miARN matures sont aujourd'hui

identifiés et annotés dans le génome, la compréhension de leur organisation génomique (comme la localisation exacte de leurs promoteurs) et de leurs mécanismes de transcription reste encore incomplète.

I.2.3. Maturation dans le noyau et export dans le cytoplasme

Le pri-miARN transcrit par la PolIII contient généralement plus d'un pré-miARN sous forme de structure en tige-boucle (Cai, Hagedorn et al., 2004; Lee, Kim et al., 2004). La maturation de ce précurseur des miARN fait intervenir au moins deux ribonucléases de type III (doubles brins) : Drosha et Dicer (Hutvagner, McLachlan et al., 2001; Lee, Ahn et al., 2003). Ainsi, la deuxième étape de la biosynthèse des miARN est le clivage d'une structure en tige boucle par un complexe appelé «microprocesseur» constitué par Drosha et son co-facteur DGCR8. Parce que la prochaine enzyme qui rentre dans la biogénèse, Dicer, est confiné dans le cytoplasme, le produit de Drosha, le pré-miARN, nécessite d'être transporté dans le cytoplasme. Cet export est réalisé par un des récepteurs de transport nucléaire dépendant de Ran, l'Exportine 5.

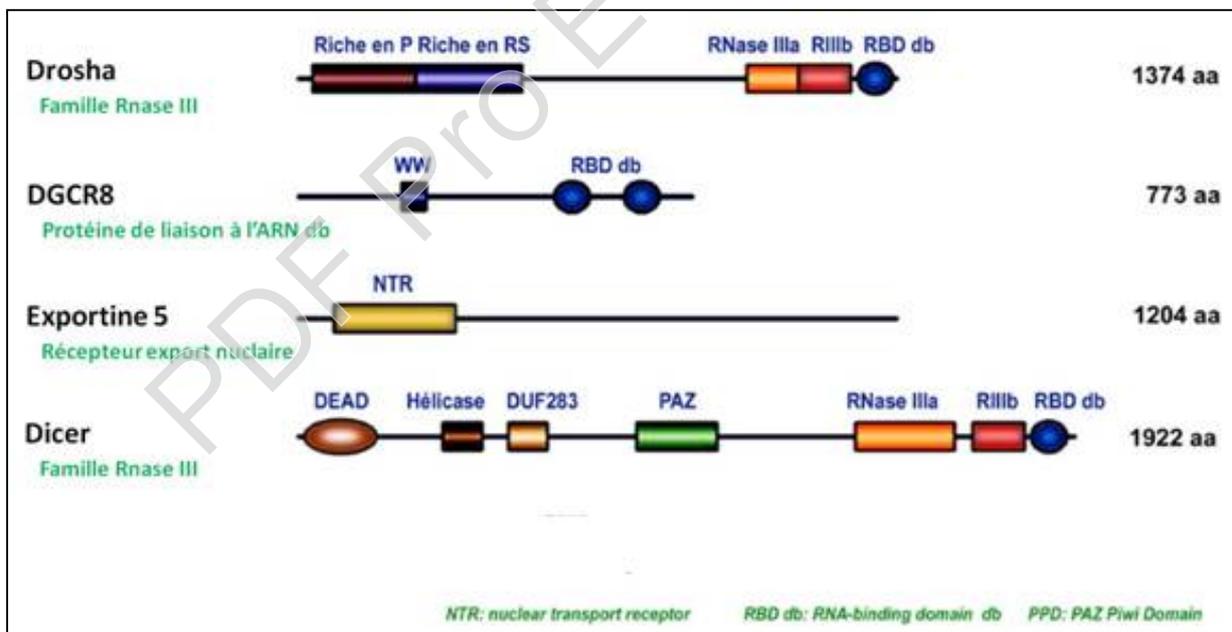


Figure 18 Représentation schématique des domaines moléculaires des acteurs de la biogénèse des miARN. Dicer et Drosha sont des protéines de la famille des RNases III. Ces deux protéines ont un tandem de domaines RNase III (RIIID) et un domaine de liaison à l'ARN double brin (dsRBD). Les deux domaines interagissent l'un avec l'autre et forment un dimère intramoléculaire dans lequel les deux sites catalytiques sont localisés à proximité l'un de l'autre. Le premier RIIID coupe le brin 3' de l'ARN

db, tandis que le second clive le brin 5', générant une extrémité de 2 nt non appariés en 3'. La région centrale de Dicer contient un domaine PAZ qui se lie à l'extrémité 3' saillante de l'ARN. La distance entre le domaine PAZ et le site catalytique correspond approximativement à la longueur du produit de Dicer, le duplexe de miARN). On trouve également un petit domaine DYF283 de fonction inconnue et un domaine hélicase en N-terminal (D'après Kim, Han et al, 2009).

I.2.3.1. Clivage du pri-miARN par le complexe micropcesseur Drosha-CGCR8

Dans le noyau, le pri-miARN transcrit est clivé localement pour libérer des structures tige-boucle d'environ 70 nt qui constituent les pré-miARN (Lee, Jeon et al., 2002). Ce clivage est réalisé par un complexe hétérodimérique, appelé microprocesseur nucléaire formé par Drosha, une nucléase nucléaire de la famille des RNase de type III (Lee, Ahn et al., 2003) et son partenaire d'interaction DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8) (aussi connu sous le nom de Pasha (Partner of Drosha) chez la Drosophile et *C. elegans*) qui reconnaît la structure de l'ARN double brin (Denli, Tops et al., 2004); (Gregory, Yan et al., 2004; Han, Lee et al., 2004; Landthaler, M, Yalcin, A et al., 2004) (Figure 18).

Le clivage du pri-miARN par le microprocesseur est une étape critique dans la biogenèse des miARN puisqu'il détermine une des extrémités finales du duplex miARN. En raison de l'absence de séquences conservées communes aux pri-miARN, ce sont des éléments structuraux qui permettent leur reconnaissance par le microprocesseur. Le pri-miRNA est caractérisé par une tige d'ARNdb d'environ 33 paires de bases présentant des mésappariements, une boucle terminale, et deux fragments d'ARN simple brin de part et d'autre de cette structure tige-boucle (Winter, Jung et al., 2009) (Figure 19). Il a été montré que DGCR8 reconnaît la jonction entre les fragments d'ARN simple brin en 5' et 3' et l'ARNdb de la tige, et que cette jonction est indispensable à la reconnaissance de la structure tige-boucle et à son clivage (Han, Lee et al., 2004). La fixation de DGCR8 au niveau de la jonction simple brin-double brin permettrait au domaine de liaison à l'ARNdb (dsRBD, pour « double-stranded RNA binding domain ») de Drosha d'interagir transitoirement avec la tige, et positionnerait le centre catalytique de l'enzyme (constitué des deux domaines RNase IIIa et IIIb (Figure 18) de manière à ce qu'elle clive le duplex d'ARN 11 pb après la jonction à la base de la tige (Han, Lee et al., 2006) (Figure 19). Le pré-miARN produit de ce clivage en forme de tige boucle possède une extrémité chevauchante de 2 nucléotides non appariés en 3' et un groupement phosphate en 5', signature du clivage par un membre de la famille des RNases III et détermine ainsi l'une des extrémités du miARN mature (Lee, Jeon et al., 2002; Basyuk, Suavet et al., 2003; Lee, Ahn et al., 2003). Le clivage induit par Drosha du pri-

miARN s'effectue co-transcriptionnellement ou précède l'épissage des ARN hôtes codant ou non une protéine qui contient les miARN. L'épissage n'est pas inhibé par le clivage induit par Droscha, car un intron ininterrompu n'est pas nécessaire pour l'épissage (Kim and Kim, 2007; Morlando, Ballarino et al., 2008).

I.2.3.2. Régulation du complexe microprocesseur

S'il a été montré que Droscha et DGCR8 constituent les éléments nécessaires et suffisants à la maturation des pri-miARN, plusieurs complexes de différentes tailles contenant Droscha ont été purifiés et différents facteurs auxiliaires associés à Droscha et DGCR8 pourraient permettre de réguler l'activité du complexe ou de l'orienter vers certains pri-miARN spécifiques (Gregory, Yan et al., 2004; Shiohama, Sasaki et al., 2007). En effet, Droscha a été trouvé dans deux complexes multiprotéiques différents, un petit complexe microprocesseur qui contient uniquement Droscha et DGCR8 et procède à l'excision de nombreux pri-miARN et un complexe plus grand qui contient des ARN hélicases, des protéines de liaison à l'ARN db, des ribonucléoprotéines et des protéines de la famille du sarcome d'Ewing (Gregory, Yan et al., 2004). Par exemple, les ARN hélicases p68 (DDX5) et p72 (DDX17) joueraient un rôle de facteurs auxiliaires qui favoriserait la maturation de certains miARN spécifiques. Les souris homozygotes KO p68 et p72 montre une réduction du niveau d'expression de plusieurs miARN alors que d'autres miARN ne sont pas affectés (Fukuda, Yamagata et al., 2007).

Par ailleurs, d'autres facteurs capables de moduler la maturation de certains pri-miARN par le microprocesseur ont été identifiés. Davis et ses collaborateurs ont mis en évidence que le facteur TGF- β (« Transforming growth factor- β ») ou des protéines BMP (« Bone morphogenic protein ») induisent la maturation des miARN miR21 et miR-199a en régulant l'activité du microprocesseur. Les protéines SMAD, responsables de la transduction du signal de la voie TGF β , reconnaissent un motif (5'-CAGAC-3') présent dans la tige de certains pri-miRNAs et recrutent ainsi le microprocesseur, y compris l'ARN hélicase p68, pour maturer spécifiquement ces pri-miARN (Davis, Hilyard et al., 2008; Davis, Hilyard et al., 2010). En conséquence, l'excision par Droscha du pri-miR21 par exemple est fortement augmentée et l'abondance de miR21 mature augmente. Une autre étude montre que la protéine suppresseur de tumeur p53, induite en réponse à un dommage à l'ADN, est capable

de s'associer au microprocesseur d'une manière dépendante de p68 et p72, et favorise ainsi la maturation de certains pri-miARN spécifiques (Suzuki, Yamagata et al., 2009).

La protéine de liaison à l'ARN hnRNPA1 (« heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A ») reconnaît spécifiquement une région de la boucle du pri-miR-18a et facilite ainsi le clivage par Drosha, en induisant un relâchement au niveau de la structure de la tige pour créer un site de clivage plus favorable par Drosha (Michlewski, Guil et al., 2008). La protéine de régulation de l'épissage KSRP (« KH-type splicing regulatory protein ») facilite aussi spécifiquement la maturation par Drosha de quelques pri-miARN en reconnaissant des triplets « GGG » dans la région de la boucle (Trabucchi, Briata et al., 2009). Environ 14% des boucles des pri-miARN humains sont conservées entre différentes espèces et pourraient fournir des points d'ancrage pour des mécanismes de régulation similaires.

D'autres facteurs sont capables au contraire de réguler négativement la maturation de certains pri-miARN par le microprocesseur. C'est le cas du complexe de facteurs nucléaires NF90-NF45 qui est capable de se lier spécifiquement à certains pri-miARN, empêchant ainsi l'accès du microprocesseur (Sakashita, Hattori et al., 1992). Différents niveaux de régulation croisée existent entre let-7 et lin-28, parmi lesquels lin-28 inhibe spécifiquement la maturation de pri-let-7 par le microprocesseur en se fixant au niveau de la boucle (Piskounova, Viswanathan et al., 2008) (Viswanathan, Daley et al., 2008; Newman and Hammond, 2010). Les enzymes ADARs (« Adenosine deaminase acting on RNA ») catalysent la conversion d'adénosines en inosines au sein de segments d'ARNdb altérant l'appariement et les propriétés structurales du transcrite. Des résidus adénosines de certains pri-miARN sont ainsi édités en inosines par des protéines ADARs (Blow, Grocock et al., 2006). Ceci peut avoir pour conséquence une inhibition du clivage par Drosha (Yang, Chendrimada et al., 2006; Kawahara, Megraw et al., 2008), qui s'accompagne dans le cas de pri-miR-142 de sa dégradation par la ribonucléase Tudor-SN, laquelle clive préférentiellement l'ARN db contenant des paires inosine-uracile (Scadden, 2005; Yang, Chendrimada et al., 2006). Dans d'autres cas, cela peut au contraire favoriser la maturation par Drosha (Kawahara, Megraw et al., 2008).

I.2.3.3. Auto-régulation post-transcriptionnelle du complexe microprocesseur

Un important mécanisme de régulation croisée entre Drosha et DGCR8 a été mis en évidence (Han, Pedersen et al., 2009; Triboulet, Chang et al., 2009). DGCR8 induit la stabilité de son partenaire Drosha grâce à leur interaction protéine-protéine (Han, Pedersen et al., 2009). En revanche, Drosha, au sein du complexe microprocesseur, clive une structure tige-boucle similaire à un pre-miRNA présente dans la région 5'UTR de l'ARNm de DGCR8 (Han, Pedersen et al., 2009; Kadener, Rodriguez et al., 2009; Triboulet, Chang et al., 2009). L'ARNm de DGCR8 est alors dégradé, résultant en une boucle de rétrocontrôle négative de l'expression de DGCR8 quand une activité suffisante du microprocesseur est disponible. Cette autorégulation croisée entre le microprocesseur et DGCR8 peut ainsi servir à maintenir un niveau d'activité constant du microprocesseur en évitant de fortes fluctuations d'expression.

I.2.3.4. Cas particulier, des mirtrons : l'épissage remplace le clivage par Drosha

De façon surprenante, dans certains cas le clivage induit par le microprocesseur du pri-miARN en pré-miARN n'est pas nécessaire. Une voie alternative de maturation utilise l'épissage des transcrits de pri-miARN pour libérer des introns mimant avec précision les caractéristiques structurales des pre-miARN (Figure 21). Dans ce cas particulier, après épissage et débranchement de la forme lasso de l'intron, celui-ci forme directement une structure tige boucle de type pré-miARN, contournant le clivage par Drosha. Ces miARN particuliers découverts en premier lieu chez les invertébrés sont appelés « mirtrons » (Okamura, Hagen et al., 2007; Ruby, Jan et al., 2007). Ils existent également chez les mammifères mais constituent un groupe relativement minoritaire : trois mirtrons conservés chez les mammifères et 16 mirtrons spécifiques des primates ont été identifiés, ainsi qu'une cinquantaine d'autres mirtrons candidats chez différentes espèces de mammifères (Berezikov, Chung et al., 2007).

I.2.3.5. Export dans le cytoplasme des pré-miARN par l'exportine 5 (XPO5)

Après clivage nucléaire ou production par la voie des mirtrons, le pré-miARN généré est exporté dans le cytoplasme, au travers du complexe de pore nucléaire, par un récepteur de

transport nucléaire dépendant de la GTPase Ran, l'Exportine-5 (XPO5) (Yi, Qin et al., 2003) (Figure 18). La fixation de XPO5 au pré-miARN est dépendante d'un co-facteur, la GTPase Ran sous sa forme GTP. L'hydrolyse de RanGTP en RanGDP dans le cytoplasme permet la dissociation du complexe et la libération du pré-miRNA. L'Exportine 5 reconnaît le pré-miARN indépendamment de sa séquence ou sa structure en tige boucle. Une longueur définie de la « tige » double brin et des 2 nt sortant en 3' sont importants pour la liaison à l'Exportine 5, assurant l'export uniquement des pré-miARN correctement excisés (Lund, Güttinger et al., 2004; Zeng and Cullen, 2004; Lund and Dahlberg, 2006). La déplétion de l'Exportine 5 est associée à une diminution des miARN matures mais aucune accumulation de pré-miARN n'est retrouvée dans le noyau, indiquant que les pré-miARN serait relativement instable mais également l'interaction avec l'XPO5 protège le pré-miARN de la dégradation par des nucléases nucléaires (Yi, Qin et al., 2003; Zeng and Cullen, 2004; Okada, Yamashita et al., 2009).

I.2.4. Maturation cytoplasmique du pre-miRNA et formation du complexe RISC

I.2.4.1. Maturation du pre-miARN

Une fois exporté dans le cytoplasme, le pré-miARN est clivé par une deuxième RNase III, Dicer (Hutvagner, McLachlan et al., 2001; Ketting, Fischer et al., 2001) (Figures 18 et 19). Ce clivage génère un duplex miARN-miARN* d'environ 20 pb avec des extrémités 3' sortantes de 2 nt de chaque côté, caractéristiques des clivages successifs par les RNases III Drosha et Dicer. Le duplex miARN-miARN* correspond à la partie inférieure de la « tige » du pré-miARN débarrassé de la boucle. Ce clivage est essentiel pour la maturation des miARN et a été décrit chez plusieurs organismes incluant *C. elegans*, *D. melanogaster* et les mammifères. La délétion de Dicer réduit ou abolit la production des miARN matures (Grishok, Tabara et al., 2000; Hutvagner, McLachlan et al., 2001). Chez la souris, la délétion de cette endonucléase conservé au cours de l'évolution aboutit à la létalité précocement au cours du développement (Bernstein, Kim et al., 2003), un effet qui est sans doute relatif à son rôle crucial dans la biogénèse des miARN.

Alors que chez *D. melanogaster*, il existe deux protéines Dicer, l'une responsable de la génération des siARN à partir d'ARNdb (Dicer-2) et l'autre responsable de la maturation des pré-miARN (Dicer-1) (Lee, Nakahara et al., 2004), il n'existe qu'une seule protéine Dicer chez les mammifères. Cette unique copie de Dicer dans le génome des mammifères suggère

son rôle fondamental dans la biogénèse des miARN. Le domaine PAZ (PIWI-Argonaute-Zwille) de Dicer (Figure 18) est retrouvé également dans les protéines Argonautes (Figure 20). D'après une étude structurale du domaine PAZ de AGO1 humaine complexe avec un petit duplex de type siARN, ce domaine servirait à la reconnaissance des extrémités 3' sortantes des duplexes d'ARNdb (Ma, Ye et al., 2004). Un modèle basé sur la structure d'une protéine Dicer « minimal » trouvée chez *Giardia intestinalis* à été proposé pour le clivage du pre-miARN par Dicer à une distance précise. Le domaine PAZ associé à l'extrémité de l'ARNdb est séparé des 2 domaines RNases III formant un dimère intramoléculaire par une hélice α (Zhang, Kolb et al., 2004; Macrae, Li et al., 2006). La distance qui sépare le domaine PAZ du site catalytique formé par les 2 domaines RNases III correspond à la longueur de ≈ 22 nt (25 nt pour Dicer de *Giardia intestinalis*) des duplexes de siARN ou miARN-miARN* générés par Dicer (Macrae, Li et al., 2006). Les brins 5' et 3' de la tige du pre-miARN sont clivés respectivement par les domaines RNase IIIa et RNase IIIb au sein du site catalytique qu'ils constituent (Zhang, Kolb et al., 2004) (Figure 18).

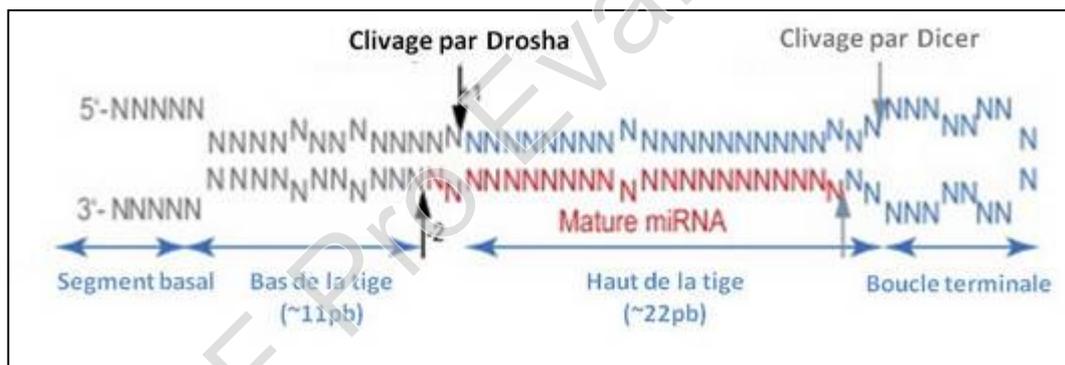


Figure 19 Biogénèse du pre-miARN. Un pri-miARN peut être divisé en 4 parties: une boucle terminale, le haut de la tige, le bas de la tige et des segments à la base. Le pri-miARN est clivé par Drosha à 11pb de la jonction entre les segments simples brins et doubles brins puis par Dicer, générant un miARN mature de 22 nt. Les sites prédits de clivage par Drosha et par Dicer sont indiqués avec des flèches noires et grises, respectivement (D'après Han, Lee et al., 2006).

In vivo, de façon similaire à Drosha, Dicer interagit avec des protéines de liaison à l'ARN db TRBP (TAR RNA-binding protein, également appelée TARBP2) et/ou PACT (proteïn activator of PKR) (Chendrimada, Gregory et al., 2005; Lee, Hur et al., 2006). Ni TRBP, ni PACT ne sont indispensables à l'activité catalytique de Dicer en soi, mais elles semblent

stabiliser Dicer *in vivo*, et contribuer à la formation du complexe effecteur RISC (Chendrimada, Gregory et al., 2005; Lee, Hur et al., 2006).

Plusieurs modes de régulation de l'activité de clivage de Dicer ont été décrits. Chez l'homme, le domaine hélicase de la boîte DE-xD/H de Dicer inhibe son activité de clivage ; TRBP se lie à Dicer dans cette région et active Dicer via un réarrangement conformationnel (Ma, MacRae et al., 2008) Dicer est également régulé par son produit let7, lequel cible l'ARNm de Dicer, créant une boucle de rétrocontrôle (Forman, Legesse-Miller et al., 2008). Des mécanismes additionnels régulant l'activité de Dicer existe vraisemblablement : par exemple, le pre-miR-138 est exprimé de façon ubiquitaire mais sa forme mature est restreinte à certains types cellulaires, indiquant une maturation tissue-spécifique des miARN (Obernosterer, Leuschner et al., 2006).

Curieusement, TRBP était initialement connue comme une protéine régulant de manière négative la protéine kinase dépendante de l'ARNdb (PKR), intervenant dans la réponse interféron décrite précédemment, tandis que PACT est au contraire une protéine activatrice de PKR (Park, Davies et al., 1994; Patel and Sen, 1998; Gupta, Huang et al., 2003). Il semble donc exister un lien entre la voie de l'ARN interférence (siRNA/miRNA) et la signalisation de PKR mais cela n'a pas été encore clairement établi. Dicer constitue donc le premier point commun entre la voie siARN et la voie miARN. Après le clivage induit par Dicer, Dicer et ses interacteurs TRBP ou PACT se dissocient du duplexe miARN. Pour former le complexe RISC actif qui réalise le « silencing » des gènes le duplexe db est séparé. L'un des deux brins du duplexe miARN-miARN*, communément appelé le brin « guide » ou miARN mature, lequel est complémentaire à la cible, est ensuite incorporé au sein d'un complexe RISC, rejoignant ainsi la voie de l'iARN (Hutvagner and Zamore, 2002). L'autre brin, miRNA* ou brin « passager » est exclu du complexe RISC et subséquemment dégradé. De multiples hélicases ont été associées à la voie des miARN, mais aucune hélicase universelle responsable de la séparation du duplexe n'a encore été identifiée. Les hélicases associées avec la formation ou même l'activité de RISC incluent p68, p72, la RNA hélicase A (RHA/DHX9), RCK/p54, TNRC6B, Gemine 3/4 et Mov10 humain et son orthologue Armitage chez *D.melanogaster* (Meister, Landthaler et al., 2004; Tomari, Matranga et al., 2004; Chu and Rana, 2006; Robb and Rana, 2007; Salzman, Shubert-Coleman et al., 2007).

La sélection de l'un des deux brins du duplexe miARN est déterminée par la stabilité thermodynamique relative des deux extrémités des duplexes de siARN et miARN. Ainsi, le brin le plus faiblement apparié à son extrémité 5' est majoritairement incorporé (Khvorova,

Reynolds et al., 2003; Schwarz, Hutvagner et al., 2003). Cependant cette règle n'est pas absolue, certains pré-miARN donnent des miARN matures provenant des deux brins à une fréquence comparable (parfois distingués dans ce cas par la notation miRx- 3p (brin en 3') et miR-x-5p (brin en 5'), ou parfois non négligeable pour le brin miARN* (Ro, Park et al., 2007; Okamura, Phillips et al., 2008; Kuchenbauer, Mah et al., 2011). La notation miARN et miARN* est établie à partir du ratio entre les nombres de séquençages obtenus pour les deux espèces respectives, le miARN mature étant celui trouvé le plus abondamment (www.mirbase.org). Pourtant ce ratio varie fortement (entre 1 et plus de 100) en fonction du pré-miARN, et varie également en fonction du tissu considéré pour certains pré-miARN, indiquant que le brin « passager » miARN* est dans certains cas exprimé de manière significative (Ro, Park et al., 2007; Biasiolo, Sales et al., 2011; Kuchenbauer, Mah et al., 2011). De plus, les miARN* exprimés sont fonctionnels et peuvent aussi induire la répression de cibles *in vivo* (Ro, Park et al., 2007; Okamura, Phillips et al., 2008; Yang, Phillips et al., 2011).

1.2.4.2. Le(s) complexe(s) RISC

RISC est en fait un terme générique pour la machinerie effectrice cytoplasmique de l'iARN programmées pour éteindre l'expression de gènes cibles par divers mécanismes comme la dégradation de l'ARNm ou la répression de la traduction. Un complexe RISC est caractérisé par la présence d'une protéine effectrice de la famille Argonaute (Figure 20) et d'un petit ARN (siARN, miARN entre autres) servant de guide en s'appariant à un ARN cible. De même que pour Dicer, il existe deux protéines Argonaute de la sous-famille AGO chez la drosophile, chacune dédiée préférentiellement à la voie siARN (AGO2) ou miARN (AGO1) (Okamura, Ishizuka et al., 2004); et les termes siRISC et miRISC ont été employés pour distinguer les complexes RISC associés à un siARN de ceux associés à un miARN (Lee, Nakahara et al., 2004). En revanche, il existe quatre protéines AGO chez les mammifères (AGO1-4). Alors que seule AGO2 possède une activité catalytique de clivage d'un ARNm cible lorsqu'associée à un siARN/miARN parfaitement complémentaire à la cible, toutes les protéines AGO sont capables de se lier avec la même affinité aux petits duplexes d'ARNs (siRNA ou miRNA) (Liu, Carmell et al., 2004; Meister, Landthaler et al., 2004), et les protéines AGO1-4 sont redondantes pour l'utilisation des miARN (Su, Trombly et al., 2009). Le nom de miRNP (« miRNA associated ribonucleoprotein complex ») est aussi utilisé pour

designer les complexes RISC associés à des miARN (Mourelatos, Dostie et al., 2002). Les protéines Argonautes (AGO) possèdent trois domaines conservés (Figure 18). Le domaine PAZ (« Piwi-Argonaute-Zwille »), que possède aussi Dicer, reconnaît et se fixe à l'extrémité 3' sortante du duplex siARN ou miARN (Song, Liu et al., 2003; Yan, Yan et al., 2003; Lingel, Simon et al., 2004; Ma, Ye et al., 2004); le domaine MID constitue une poche de fixation du 5'-phosphate du duplex (Ma, Yuan et al., 2005; Parker, Roe et al., 2005), et le domaine PIWI, qui adopte une conformation secondaire ressemblant à une RNase H, constitue le domaine catalytique de certaines AGO (comme AGO2 chez les mammifères) (Liu, Carmell et al., 2004; Parker, Roe et al., 2004; Song, Smith et al., 2004; Ma, Yuan et al., 2005).

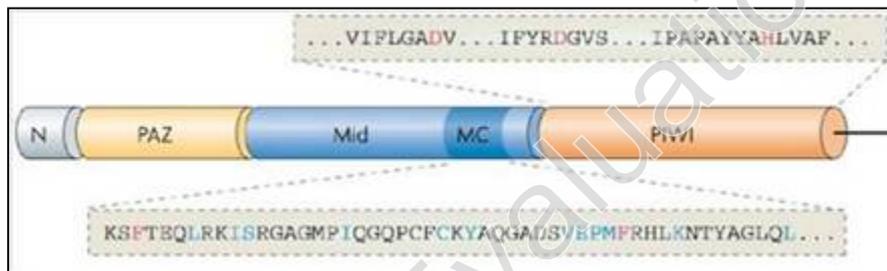


Figure 20 Structure de la protéine AGO2 humaine. Le domaine PAZ (en jaune), situé près du côté N-terminal de la protéine (en gris) est nécessaire à la reconnaissance et à la fixation de l'extrémité 3' sortante du duplex d'ARN. Le domaine MID (en bleu) permet de fixer l'extrémité 5'-phosphate du duplex d'ARN. Une partie du domaine MID, le domaine MC (en bleu foncé), présente une homologie de séquence avec le motif de reconnaissance de la coiffe présent dans le facteur eIF4E, particulièrement deux résidus aromatiques (en rouge). Ce domaine entrerait donc en compétition avec eIF4E pour la reconnaissance de la coiffe de l'ARNm cible, bloquant ainsi l'initiation de la traduction, mais il a été également montré que c'est ce domaine qui permettrait l'interaction avec la protéine GW182 (voir 1.3.2.1 Inhibition de la Traduction). Le domaine PIWI (en orange) est le domaine contenant les résidus catalytiques (en rouge) des protéines AGO compétentes pour le clivage endonucléolytique (D'après Hutvagner and Simard, 2008).

AGO2 purifiée seule est capable d'utiliser un siARN simple brin pour cliver un ARNm cible mais n'est pas suffisante pour utiliser directement un siRNA double brin, suggérant la nécessité de cofacteurs (Liu, Carmell et al., 2004). Des complexes RISC de tailles et de compositions moléculaires très variables, ont été purifiés dans différents organismes et parfois caractérisés moléculairement (Nykänen, Haley et al., 2001; Martinez, Patkaniowska et al., 2002; Pham, Pellino et al., 2004; Gregory, Chendrimada et al., 2005; Höck, Weinmann et al., 2007). Un complexe « minimal » RISC composé de AGO2, TRBP et Dicer, a été purifié à

partir de cellules humaines et caractérisé *in vitro* (Chendrimada , Gregory et al., 2005; Gregory, Chendrimada et al., 2005; Maniataki and Mourelatos, 2005). Ce complexe « minimal » immunopurifié ou reconstitué *in vitro* à l'aide des trois protéines recombinantes est capable de cliver un pré-miARN pour générer un miARN mature, présente l'activité catalytique de RISC puisqu'il est capable de cliver un ARN cible, et sélectionne préférentiellement le brin guide du pre-miARN fourni (Gregory, Chendrimada et al., 2005; Maniataki and Mourelatos, 2005; Macrae, Li et al., 2006). Après clivage du pré-miARN par Dicer, le complexe RISC activé, c'est-à-dire chargé avec le miARN mature et possédant l'activité catalytique sur l'ARN cible, est dissocié de Dicer (Maniataki and Mourelatos, 2005; MacRae, Ma et al., 2008). Ces études suggèrent donc un couplage entre l'activité de maturation du pré-miARN par Dicer et l'assemblage du complexe RISC grâce à l'interaction de Dicer/TRBP avec AGO2. Une autre étude suggère que l'activité de Dicer et l'assemblage/activation du complexe RISC sont dissociés du fait que le complexe RISC immunopurifié peut utiliser directement un duplex d'ARN ne nécessitant pas de clivage par Dicer (Yoda, Kawamata et al., 2010). Il est vrai que par ailleurs, l'immuno-déplétion de Dicer n'empêche pas l'activité de RISC *in vitro* (clivage d'un ARN cible via un siARN) (Martinez, Patkaniowska et al., 2002), et que des cellules ES déficientes pour Dicer supportent une activité iARN via l'utilisation de siARN (Kanellopoulou, Muljo et al., 2005; Murchison, Partridge et al., 2005). Ces résultats suggèrent que Dicer n'est pas indispensable à la constitution d'un complexe RISC fonctionnel mais ne sont pas incompatibles pour autant avec l'existence *in vivo* de complexes RISC associés à Dicer, pouvant faciliter le couplage entre la maturation du pré-miARN et le chargement du miARN mature sur la protéine AGO (Landthaler, Markus, Yalcin, Abdullah et al., 2004; Chendrimada , Gregory et al., 2005; Gregory, Chendrimada et al., 2005; Maniataki and Mourelatos, 2005; Höck, Weinmann et al., 2007).

Trois complexes RISC différents ont été purifiés à partir de cellules humaines et correspondent probablement à différentes formes de pré-RISC et RISC actives. Des approches protéomiques ont permis d'identifier des dizaines d'autres protéines associées aux protéines AGO au sein de ces trois complexes RISC, dont des hélicases, des hnRNPs (heterogenous nuclear ribonucleoprotein particles) et d'autres protéines de liaison aux ARNm , lesquelles sont probablement des facteurs d'assemblage ou régulateurs, ou encore des effecteurs arbitrant les fonctions répressives des miRNP (Landthaler, M, Yalcin, A et al., 2004; Höck, Weinmann et al., 2007; Peters and Meister, 2007).

Tout comme dans le cas des miRtrons, vu précédemment, qui sont générés indépendamment de Drosha, la maturation d'un certain nombre de miARN requière uniquement les protéines Ago, et elle est indépendante de Dicer. Par exemple, la maturation par le microprocesseur des transcrits primaires de miR-451, un miARN conservé chez les vertébrés, libère des pré-miARN avec une structure en tige boucle anormale et sont donc des substrats non optimaux pour Dicer. A la place, la seconde étape de maturation de ces miARN est réalisée par l'activité de clivage d'Ago2. En effet, la longueur particulièrement courte de ce pré-miARN lui permet d'interagir directement dans les protéines Ago. S'il est pris en charge par une Ago2, la partie en position de brin passager peut être coupée. Des cofacteurs d'Ago2 interviennent ensuite pour raccourcir la partie retenue dans Ago2 par l'extrémité 3' et finaliser l'incorporation du brin guide miR-451 (Cheloufi, Dos Santos et al., 2010; Cifuentes, Xue et al., 2010; Yang and Lai, 2010). Un autre exemple est celui des petits ARN nucléolaires non codants (snoRNA, small nucléolar RNA) qui ont été décrits comme s'associant directement aux protéines Ago et sont capable de réprimer l'expression d'ARN cibles complémentaires (Ender, Krek et al., 2008).

I.2.5. Vue générale de la biogénèse canonique

Brièvement, les miARN matures de 20-23 nt sont excisés dans un processus à étapes multiple à partir d'un long transcrit primaire (pri-miARN) qui contient une ou plusieurs structures en tige boucle de 70 nt environ qui sont les précurseurs des miARN (pré-miARN) synthétisé par la ARN polymérase II. Dans le noyau ces structures sont reconnues par DGCR8 et Drosha, et individualisées pour former un pré-miARN (voie canonique). Alternativement, quelques pré-miARN constituant de courts introns sont générés directement par épissage (mirtrons). Ces molécules sont subséquemment transportées par l'exportine 5 couplé à la Ran-GTP dans le cytoplasme où elles sont ensuite clivées par Dicer1 en association avec TRBP et/ou la PRKRA en un duplex d'ARN intermédiaire miARN:miARN*. Les deux brins du duplexe sont séparés par une RNA hélicase durant l'assemblage spécifique du complexe ribonucléoprotéique RISC contenant le miARN mature (miRNP ou miRISC) (Figure 21).

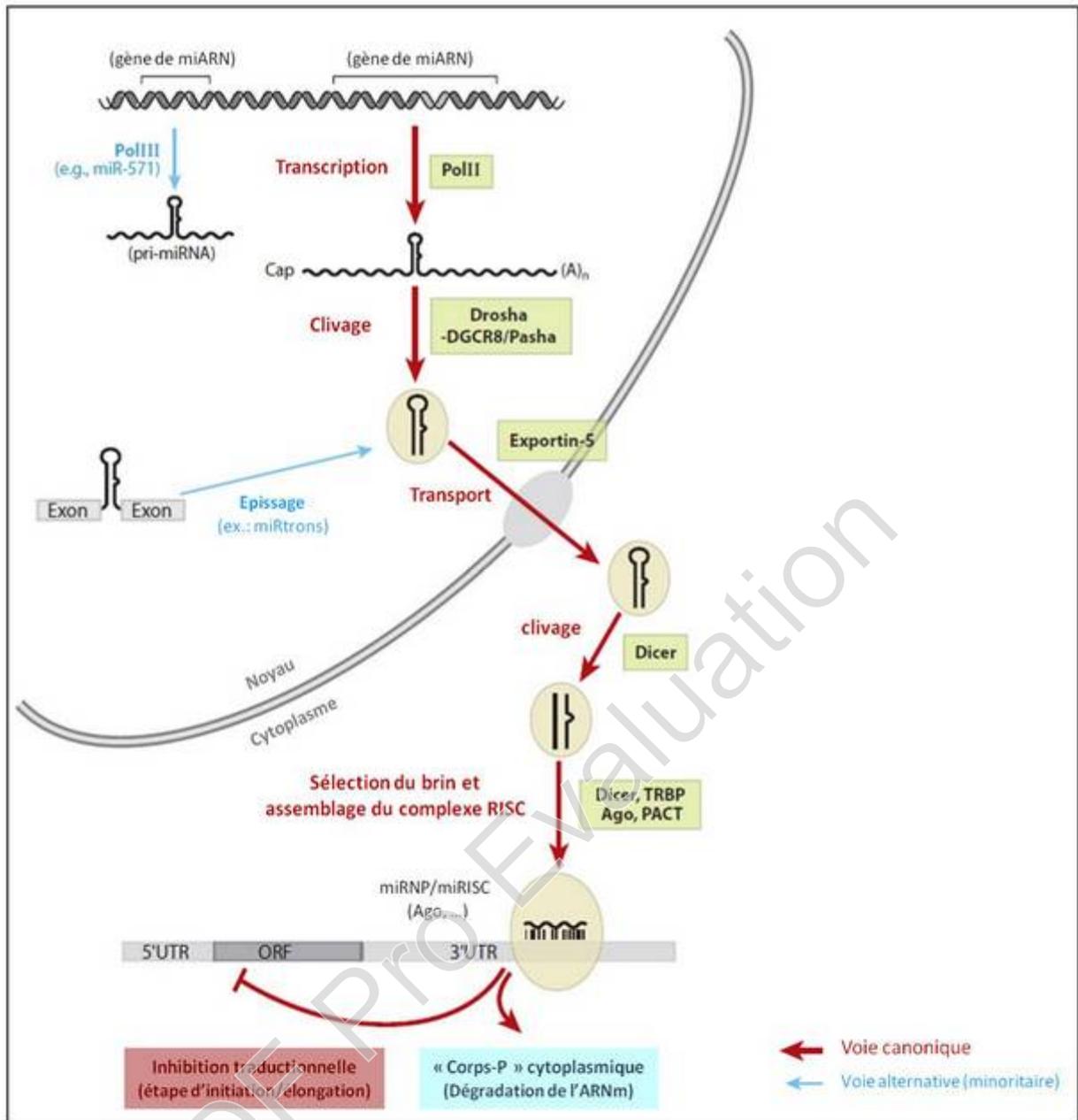


Figure 21 Voie de biogénèse des miARN. La voie canonique (flèches rouges) et la voie minoritaire des miRtrons (flèches bleues claires) sont représentées (D'après Lee and Dutta, 2009).

I.3. Mécanismes d'actions

I.3.1. Interaction des microARN avec leur cibles

La régulation exercée par les miARN est spécifique grâce à l'appariement du miARN mature contenu dans le complexe miRNP avec une séquence partiellement complémentaire

située généralement dans le 3'UTR de l'ARNm cible et appelée MRE pour « miRNA Response Element » (Elément de réponse au miRNA). A l'inverse de la parfaite complémentarité de séquences entre les siARN et les ARNm, il y a de nombreux mésappariements entre les miARN et leurs sites cibles sur les ARNm. Ce mode d'appariement basé sur une complémentarité imparfaite entre le miARN et sa cible qui prévaut chez l'homme a pour conséquence une grande combinatoire d'interactions miARN:ARN. Ainsi, un miARN est capable de contrôler l'expression de plus d'un ARNm cible et que chaque ARNm peut être régulé par de multiples miARN. La région 5' des miARN contribue généralement d'avantage à la spécificité et l'activité de fixation aux ARNm cibles d'après les données expérimentales. Les interactions entre miARN et ARNm sont en général restreintes à la séquence noyau (dite « seed ») des miARN constituée des huit premiers nucléotides en 5' terminal, dont un appariement parfait et continue avec l'ARNm cible est impératif. En effet, la séquence la plus conservée des miARN chez les métazoaires est la région 5' contenant cette séquence noyau où le moindre changement pourrait altérer son spectre de cibles ou donner lieu à des mésappariements qui diminueraient considérablement la répression de la cible (Lim, Lau et al., 2003; Doench and Sharp, 2004; Kloosterman, Wienholds et al., 2004; Brennecke, Stark et al., 2005). Il a également été suggéré que l'emplacement de la boucle centrale dans les duplexes miARN:ARNm pourrait jouer un rôle clé en affectant l'efficacité de régulation génique par les miARN (Ye, Lv et al., 2008).

Des programmes de prédiction de cibles des miARN (miRanda, PicTar, TargetScan...) ont été développés sur des bases dépendant l'appariement parfait au niveau de la séquence noyau, ainsi que sur la conservation des MRE pour favoriser l'identification de sites fonctionnels sélectionnés au cours de l'évolution (John, B., Enright, A.J. et al., 2004; Krek, Grun et al., 2005; Lewis, Burge et al., 2005) Ils prédisent plusieurs dizaines à centaines de cibles pour un miARN donné mais elles n'ont pas toujours une réalité biologique. Des validations expérimentales sont nécessaires dans chaque cas pour confirmer les cibles réelles *in vivo*. Elles reposent sur la démonstration biologique que (1) un rapporteur luciférase fusionné au 3'UTR d'une cible prédite *in silico* est réprimé par la surexpression du miARN et (2) cette répression est abolit lors de mutations ponctuelles dans la (ou les) séquence(s) cible(s) dans le 3'UTR.

D'autres facteurs, autres que l'appariement lui-même, peuvent influencer la reconnaissance d'une séquence cible par un miARN et dans sa fonctionnalité. Un de ces facteurs est l'accessibilité du MRE *in vivo*, qui peut être influencée par la structure secondaire de l'ARNm ou encore par l'association de protéines de liaison à l'ARNm, qui peuvent agir comme des

modulateurs de l'effet des miARN (Bhattacharyya, Habermacher et al., 2006; Ameres, Martinez et al., 2007; Kedde, Strasser et al., 2007; Kertesz, Iovino et al., 2007; Glorian, Maillot et al., 2011). De plus, le contexte dans lequel se situe le MRE influence l'effet du miARN sur la cible. Des éléments de séquence non complémentaires au miARN mais présents dans le 3'UTR, comme une région riche en A/U à proximité et, pour les long 3'UTR, la proximité de la queue poly(A), sont nécessaires ou améliorent dans certains cas la répression de la cible par le miARN (Vella, Reinert et al., 2004; Didiano and Hobert, 2006; Grimson, Farh et al., 2007; Nielsen, Shomron et al., 2007; Sun, Li et al., 2010).

Généralement, les MRE connus chez les métazoaires tapissent les régions 3'UTR et sont présents en copies multiples dans un même ARNm. A noter que, de multiples MRE pour le même ou différents miARN sont généralement nécessaires pour une répression plus efficace (Lewis, Hung Shih et al., 2003; Brennecke, Stark et al., 2005; Nielsen, Shomron et al., 2007). En effet, des MRE proches (10-40 nt d'écart) semblent agir de manière coopérative, avec des effets de répression de la cible plus importants que ceux attendus de la contribution de deux MRE indépendants (Doench and Sharp, 2004; Grimson, Farh et al., 2007; Saetrom, Heale et al., 2007; Broderick, Salomon et al., 2011). Cependant, la localisation des MRE dans les 3'UTR est potentiellement biaisée par le fait que les logiciels de prédiction ont précisément focalisé la recherche de ces sites dans les 3'UTR. Ceci est du premierement au fait que les MRE des deux premiers miARN découverts chez *C. elegans*, lin-4 et let-7, étaient situés dans les 3'UTR des gènes cibles, et deuxièmement au fait que ces logiciels se basent sur la conservation au cours de l'évolution des MRE, plus visibles dans les 3'UTR que dans la séquence codante où ils seraient masqués par la conservation des codons. Or, des études basées sur des constructions de gènes rapporteurs montrent que des MRE localisés artificiellement dans le 5'UTR ou la région codante sont capables de guider la répression du transcrite cible (Kloosterman, Lagendijk AK et al., 2007; Lytle, Yario et al., 2007). A cela s'ajoute l'existence de MRE fonctionnels dans la séquence codante de plusieurs ARNm, dont Dicer et certains variants de DNMT3b (DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta) chez l'humain, ou encore les facteurs de pluripotence Nanog, Oct4 et Sox2 chez la souris qui ont été mis en évidence par différentes études (Duursma, Kedde et al., 2008; Forman, Legesse-Miller et al., 2008; Tay, Kats et al., 2011). L'utilisation d'un algorithme optimisé pour identifier des MRE conservés dans les séquences codantes montre que chez la drosophile, les MRE seraient aussi répandus dans les ORFs que dans les 3'UTR, et quelques MRE identifiés par cette méthode ont été valides fonctionnellement (Schnall-Levin, Zhao et al., 2010). Toutefois, ces exemples restent rares, et des évidences expérimentales suggèrent

que la traduction activée par les ribosomes limite l'association de complexes miRISC au niveau de la séquence codante, apportant une explication mécanistique à la localisation préférentielle des MRE dans les régions non codantes (Gu, He et al., 2006). D'autres exemples montrent que certains miARN sont capables de réguler l'expression de gènes cibles via des MRE situés dans le 5'UTR. Curieusement, dans la plupart des cas, la fixation d'un miARN sur un MRE localisé dans le 5'UTR s'accompagne d'une activation de la traduction, et non pas à la répression normalement induite par les miARN (Henke, Goergen et al., 2008; Ørom, Nielsen et al., 2008; Tsai, Lin et al., 2009). L'impact de l'interaction entre les miARN et leurs cibles est donc plus compliqué qu'il n'y paraît. Par exemple, miR-122, un miARN spécifique du foie, se fixe sur des sites de réponses présents dans le 5'UTR de l'ARN génomique du virus de l'hépatite C et induit l'accumulation d'ARN viraux. Il semble donc que miR-122 peut moduler la réplication de l'ARN virale plutôt que la traduction ou la stabilité (Jopling, Yi et al., 2005). Dans une autre étude, Vasudevan et ses collaborateurs ont démontré que des miARN oscillent entre répression et activation au cours du cycle cellulaire, et ils ont identifié miR-369-3 dans les cellules en prolifération, où il réprime la traduction mais au contraire active la traduction des ARNm cibles lors de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/G0 (Vasudevan, Tong et al., 2007). Des miARN apparaissent également activer certains ARNm cibles dans des conditions de stress, telles que l'hypoxie et la privation en nutriments (Leung and Sharp, 2007; Vasudevan, Tong et al., 2007). Si ces phénomènes de sur-régulation se produisent dans des conditions particulières ou dans des mécanismes régulateurs ubiquitaires, ils restent à être illustrés plus en détail.

I.3.2. Répression post-transcriptionnelle par les miARN

L'interaction d'un miARN, associé au complexe RISC activé (miRISC), avec un ARNm cible a pour conséquence une inhibition de l'expression de la cible via différents modes d'action. Le type de répression dépend du degré de complémentarité entre la séquence « seed » et la séquence cible. Tandis qu'une complémentarité partielle induirait la répression de la traduction ou l'instabilité de l'ARNm, une complémentarité parfaite cause normalement la destruction de l'ARNm (He and Hannon, 2004). Il a été établi que la répression est le mécanisme par défaut par lequel les miARN répriment l'expression de gènes. Bien que l'occurrence d'un appariement parfait est rare, dans ce cas un clivage de l'ARNm est additionnellement engagé exclusivement par Ago2, de telle façon que les effets des miARN

sont un résultat des deux mécanismes à la fois. De façon inattendue, dans certains cas particuliers discutés dans le paragraphe précédent, les miARN peuvent au contraire activer la traduction d'ARNm cibles. Ces exceptions mis à part, quelque soit le mécanisme en cause, les miARNs sont toujours des régulateurs négatifs de l'expression de leurs gènes cibles. En dehors des rares cas de clivage, les mécanismes de régulation de l'expression de la cible par les miARN sont détaillés dans les paragraphes suivants (Figure 22).

I.3.2.1. Inhibition de la traduction

Le mécanisme par lequel miRISC inhibe la traduction est controversé. Plusieurs études présentent des résultats indiquant un blocage de l'initiation de la traduction, tandis que d'autres études présentent des évidences concernant une répression à des stades post-initiation.

La traduction d'un ARNm est un processus pouvant être divisé en 3 étapes : l'initiation, l'élongation et la terminaison. La traduction débute par la reconnaissance de la coiffe m7G en 5' de l'ARNm par eIF4E, une sous-unité du complexe d'initiation eIF4F qui contient également les sous-unités eIF4A et eIF4G. L'interaction d'eIF4G avec eIF3 facilite le recrutement de la petite sous-unité ribosomique 40S (Kapp and Lorsch, 2004), qui commence alors le balayage de la région 5' à la recherche du codon d'initiation AUG, où son association avec la grande sous-unité 60S permet de former le complexe ribosomique 80S et de commencer l'élongation. Lorsque le ribosome rencontre un codon de terminaison, les sous-unités ribosomales se dissocient l'une de l'autre et de l'ARNm. eIF4G interagit également avec PABPC (poly(A)-binding protein, cytoplasmic), une protéine associée à la queue poly(A) en 3', ce qui permet de donner une conformation circulaire à l'ARNm, et améliore ainsi l'efficacité de la traduction tout en protégeant l'ARNm de la dégradation (Wells, Hillner et al., 1998; Derry, Yanagiya et al., 2006). Certains ARNm cellulaires et viraux initient la traduction indépendamment de la coiffe m7G et d'eIF4E; dans ce cas de figure, les ribosomes 40S sont recrutés à l'ARNm via l'interaction avec une séquence IRES (« internal ribosome entry site ») (Wells, Hillner et al., 1998; Derry, Yanagiya et al., 2006). L'assemblage de la sous-unité 60S au codon AUG précède la phase d'élongation de la traduction.

I.3.2.1.1. Inhibition de l'initiation ou de l'élongation ?

La question de la réactivité du miRISC à l'initiation versus post-initiation a été évaluée de deux façons. Un critère d'évaluation a été si la centrifugation sur gradient de densité montre des ARNm réprimés localisés dans le pool de RNPm libres (réprimé à l'initiation) ou dans de larges polysomes (réprimés à l'élongation ou à la terminaison). Un second critère a été de déterminer si les ARNm réprimés qui contiennent un IRES sont résistants à la répression. Sur la base de ces critères, plusieurs études ont trouvé des évidences pour une répression par le miRISC à l'initiation (Humphreys, Westman et al., 2005; Pillai, Bhattacharyya et al., 2005); (Kiriakidou, Tan et al., 2007; Mathonnet, Fabian et al., 2007; Wakiyama, Takimoto et al., 2007; Ding and Grosshans, 2009). Néanmoins, d'autres études vont dans le sens d'une répression des processus post-initiation (Seggerson, Tang et al., 2002; Maroney, Yu et al., 2006; Nottrott, Simard et al., 2006; Petersen, Bordeleau et al., 2006). Il n'y a aucunes indications expérimentales ou techniques pour expliquer la divergence. Les incohérences suggèrent, plutôt, que la répression puisse être exercée à l'étape de l'initiation ou à une certaine étape ultérieure. On pourrait expliquer ces résultats divergents par différentes étapes limitant la traduction globale dans les divers systèmes expérimentaux.

Comment les miARN pourrait moduler les processus d'initiation ou d'élongation et de terminaison reste vague. Néanmoins quelques exemples de régulation ciblant les étapes après l'initiation ont été rapportés : Petersen et ses collaborateurs suggèrent qu'un mécanisme probable par lequel les miRISC répriment l'élongation est l'induction du détachement des ribosomes (Figure 22, schéma du bas à droite). Un miARN réprimé peut être associé avec des polysomes, mais lorsque l'initiation de la traduction est bloquée avec de l'hippuristanol, un inhibiteur de eIF4A, les ribosomes se dissocient plus rapidement des ARNm réprimés par les miARN que des ARNm contrôles. Leurs résultats suggèrent que miRISC induit la dissociation prématurée des ribosomes des ARNm (Petersen, Bordeleau et al., 2006).

Un autre type de régulation impliquant la dégradation des polypeptides naissants a également été proposé (Figure 22, schéma du haut à droite). L'association d'ARNm réprimés avec des polysomes traductionnellement compétents a soulevé des spéculations suggérant que des protéines sont continuellement synthétisées à partir d'ARNm mais ne s'accumulent pas car ils sont rapidement dégradés par des protéases recrutées par les miRISC. Nottrott et al. suggèrent donc que miRISC recrute ou est associé à des protéases spécifiques permettant de dégrader les polypeptides naissants (Nottrott, Simard et al., 2006). Cependant, aucune

protéase pouvant jouer ce rôle n'a été identifiée à ce jour et des résultats démontrant que la répression induite par des miARN est maintenue lorsque les polypeptides rapporteurs sont adressés au réticulum endoplasmique (où ils sont protégés de la protéolyse) remettent en question la possibilité d'un mécanisme par lequel les protéines naissantes seraient dégradées dans le cytosol (Pillai, Bhattacharyya et al, 2005).

Des systèmes cellulaires *in vitro* ont été cruciaux pour apporter des aperçus des mécanismes par lesquels miRISC réprime l'initiation, mais même ces études sont controversées. Actuellement, différents modèles sont en lice pour expliquer l'inhibition de l'initiation de la traduction par les miARN (Figure 22). Un modèle propose l'existence d'une compétition entre miRISC et le facteur eIF4E pour la liaison à la coiffe de l'ARNm en 5' ce qui sous tend une inhibition de la reconnaissance de la coiffe par les facteurs d'initiation de la traduction (Figure 22, schéma du bas à gauche). Si miRISC rentre en compétition avec eIF4E, alors on pourrait s'attendre à ce que l'ajout en excès de complexe eIF4F (contenant eIF4E) atténuerait la répression. C'est en effet le cas lorsque eIF4F est ajouté dans un système *in vitro* basé sur des extraits cellulaires de cellules tumorales d'ascites de souris, l'inhibition induit par let7 est levée (Mathonnet, Fabian et al., 2007). Un soutien additionnel à ce type de mécanisme vient d'extraits d'embryons de Drosophile, où miRISC inhibe l'association du complexe de pré-initiation 40S à l'ARNm (Thermann and Hentze, 2007). Les travaux de Kiriakidou et al. apportent une hypothèse mécanistique en montrant que chez l'homme AGO2 est capable de se fixer spécifiquement à la coiffe via un motif, principalement 2 résidus aromatiques présents dans le domaine MID (Figure 20), ressemblant à celui d'eIF4E. La mutation de ces 2 résidus lève l'inhibition de la traduction induite par la fixation directe d'AGO2 sur l'ARNm, suggérant donc qu'AGO2 lui-même rentre en compétition avec le complexe d'initiation eIF4E pour la fixation à la coiffe (Kiriakidou, Tan et al., 2007). D'autres études chez la drosophile et dans les cellules humaines montrent qu'Ago2 n'est pas la seule protéine Ago à avoir ces résidus qui sont retrouvés chez tous les membres de la famille Ago à travers le règne animal. Les résultats de mutagenèse de ces phénylalanines dans Ago1 de drosophile viennent contredire l'hypothèse précédente en proposant que ces résidus soient en fait nécessaires à la liaison avec les protéines GW182 (Eulalio, Huntzinger et al., 2008; Chen, Zheng et al., 2009). De plus, GW182 se lie aux ARNm et est suffisant pour réprimer leur traduction en absence d'Ago1, argumentant contre un mécanisme obligatoire de liaison à la cap par Ago1. Ces données suggèrent que GW182 ou un facteur en aval pour être le compétiteur d'eIF4E.

Un second modèle a proposé que miRISC bloque l'association de la sous unité ribosomale 60S avec le complexe de pré-initiation 40S (Figure 22, schéma du bas à gauche). Chendrimada et al. (Chendrimada, Finn et al., 2007) rapportent que la sous-unité ribosomale 60S et la protéine eIF6 co-immunoprécipitent avec le complexe Ago2-Dicer-TRBP. eIF6 est une protéine impliquée dans la biogenèse et la maturation des sous-unités ribosomiques 60S et empêche l'association prématurée des sous-unités 60S et 40S. Son association au complexe miRISC au niveau de l'ARNm cible permettrait donc d'empêcher le recrutement de la sous-unité 60S et donc l'initiation de la traduction. Chendrimada et ses collaborateurs montrent également que la déplétion partielle d'eIF6 dans les cellules humaines et chez *C. elegans* lève l'inhibition induite par les miARN. Cette hypothèse est corroborée par des expériences de reconstitution acellulaire montrant que les ARNm réprimés par des miARN sont enrichis en ribosomes 40S mais pas 60S (Wang, Yanez et al., 2008). Toutefois, ces résultats ne sont pas reproduits par la déplétion d'eIF6 dans les cellules de drosophile (Eulalio, Huntzinger et al., 2008). De plus, le rôle d'eIF6 dans la biogenèse de la sous-unité ribosomale 60S complique l'interprétation des résultats obtenus par Chendrimada et al. et suggère que l'effet de la déplétion d'eIF6 puisse être indirect.

I.3.2.1.2. Déadénylation et dégradation de l'ARNm

Les premiers travaux sur ce sujet avaient semblé indiquer que le niveau des ARNm ciblés par des miARN n'était pas notablement réduit et suggéraient que la répression dépendante des miARN n'affectait pas la stabilité des ARNm (Wightman, Ha et al., 1993; Olsen and Ambros, 1999; Seggerson, Tang et al., 2002). C'est plutôt la notion contraire qui prévaut actuellement où il semble que les messagers sont souvent déstabilisés par leur interaction avec leurs miARN cibles. De plus, dans les cellules de mammifères, il a été montré que le miARN conduisant à la déstabilisation et la dégradation de l'ARNm est la voie prédominante de la suppression subséquente du niveau de protéines (Guo, Ingolia et al., 2010). En effet, différentes études réalisées sur l'animal, des cellules en culture ou encore des extraits cellulaires, ont montré depuis que la répression de nombreuses cibles de miARN s'accompagne de leur déadénylation et de leur dégradation (Lim, Lau et al., 2005; Giraldez, Mishima et al., 2006; Wu, Fan et al., 2006; Wakiyama, Takimoto et al., 2007; Eulalio, Huntzinger et al., 2009) (Figure 22). Récemment, des analyses comparatives des modifications protéomiques et transcriptomiques à grande échelle, suite à la sur-expression ou

à l'inhibition d'un miARN dans des cellules de mammifères, montrent que la grande majorité des cibles réprimées par un miARN présente une diminution de leur niveau d'ARNm qui reflète la diminution en protéines (Baek, Villén et al., 2008; Selbach, Schwanhäusser et al., 2008; Hendrickson, Hogan et al., 2009; Guo, Ingolia et al., 2010). Ces études montrent donc que la répression induite par les miARN se traduit majoritairement par une dégradation des transcrits. Cette élévation de dégradation résulte de la déadénylation, du décoiffage, et de la digestion exonucléolytique de l'ARNm (Behm-Ansmant, Rehwinkel et al., 2006; Giraldez, Mishima et al., 2006; Wu, Fan et al., 2006). Les niveaux d'ARNm sont contrôlés par les miARN via le recrutement de composants de la machinerie de dégradation, menant à la déadénylation et au décoiffage. En accord avec la déstabilisation généralisée de l'ARNm, les composants du complexe de répression des miARN, les protéines AGO, les miARN, et les ARNm ciblés inhibés sont enrichis dans les « corps-P ». « Les corps-P » sont des foci cytoplasmiques qui contiennent des enzymes dégradant les ARNm et impliqués dans le catabolisme (déadénylation, décoiffage et dégradation des ARNm) et/ou le stockage des ARNm non traduits.

Les protéines de la famille GW182 (GW182 chez la drosophile ; TNRC6A, B et C chez les mammifères ; AIN-1 et AIN-2 chez *C. elegans*) ont émergé récemment comme des composants particulièrement importants du « corps-P » impliqués dans la répression des miARN (Jakymiw, Lian et al., 2005; Liu, Rivas et al., 2005; Behm-Ansmant, Rehwinkel et al., 2006) (Eulalio, Huntzinger et al., 2008; Ding and Grosshans, 2009). Par ailleurs, les protéines GW182 sont retrouvées au sein des complexes miRISC en association avec les protéines AGO où elles jouent un rôle clé dans la répression induite par les miARN (Jakymiw, Lian et al., 2005; Liu, Rivas et al., 2005; Rehwinkel, Behm-Ansmant et al., 2005; Eulalio, Huntzinger et al., 2008). Les protéines de cette famille sont caractérisées par la présence de répétitions glycine-tryptophane (GW), mais ils contiennent des domaines supplémentaires, tels que des régions riches en glutamine ou moteur de reconnaissance à l'ARN (RNA recognition motives (RRM)), ce dernier présent chez les mammifères et la Drosophile mais pas chez *C. elegans* (Eystathioy, Chan et al., 2002; Behm-Ansmant, Rehwinkel et al., 2006; Ding and Han, 2007). Il a été montré que les répétitions GW (glycine-tryptophane) en N-terminal sont responsables de l'interaction avec les protéines AGO et la disruption de cette interaction empêche la répression induite par les miARN (Behm-Ansmant, Rehwinkel et al., 2006; Till, Lejeune et al., 2007; Eulalio, Huntzinger et al., 2008; Lian, Li et al., 2009; Takimoto, Wakiyama et al., 2009). La fixation artificielle, sans miARN, de GW182 à un ARNm dans des cellules de drosophile conduit à une répression de la traduction et la

dégradation du transcrit, même en absence de AGO1, indiquant que GW182 agit en aval de AGO1 (Behm-Ansmant, Rehwinkel et al., 2006). De même, dans des cellules humaines, le domaine C-terminal (RRM) des protéines TNRC6A-C suffit à la répression de la cible, alors que ce domaine n'est pas responsable de l'interaction avec AGO (Lazzaretti, Tournier et al., 2009; Zipprich, Bhattacharyya et al., 2009). L'ensemble de ces résultats suggère donc que la protéine AGO recrute GW182 au niveau du transcrit cible, puis la région C-terminale de GW182 agit en aval pour induire la répression traductionnelle et/ou la dégradation de l'ARNm. Différentes expériences montrent que GW182 entraîne une déadénylation de l'ARNm cible en recrutant le complexe déadénylase CAF1 :CCR4 :NOT1 (plus PAN2 :PAN3 chez les mammifères), puis le décoiffage par le complexe DCP1 :DCP2 et enfin la digestion exonucléolytique 5'-3' vraisemblablement par XRN1 (Rehwinkel, Behm-Ansmant et al., 2005; Behm-Ansmant, Rehwinkel et al., 2006; Eulalio, Rehwinkel et al., 2007; Chen, Zheng et al., 2009; Eulalio, Huntzinger et al., 2009; Fabian, Mathonnet et al., 2009). Si beaucoup des composants des « corps-P », comme DCP1, DCP2, GW182 ou encore des activateurs du décoiffage comme RCK/p54, jouent un rôle dans la répression induite par les miARN (Eystathioy, Jakymiw et al., 2003; Liu, Rivas et al., 2005; Rehwinkel, Behm-Ansmant et al., 2005; Behm-Ansmant, Rehwinkel et al., 2006; Chu and Rana, 2006; Eulalio, Behm-Ansmant et al., 2007), l'intégrité des « corps-P » n'est pas indispensable en soi à la fonction des miARN, ce qui suggère que l'enrichissement dans les « corps-P » des ARNm ciblés par les miARN est plutôt une conséquence de leur répression qu'une nécessité fonctionnelle (Chu and Rana, 2006; Eulalio, Behm-Ansmant et al., 2007). Ceci est conforté par le fait que la formation des « corps-P » est en revanche dépendante d'une voie miARN ou d'iARN fonctionnelle (Pauley, Eystathioy et al., 2006).

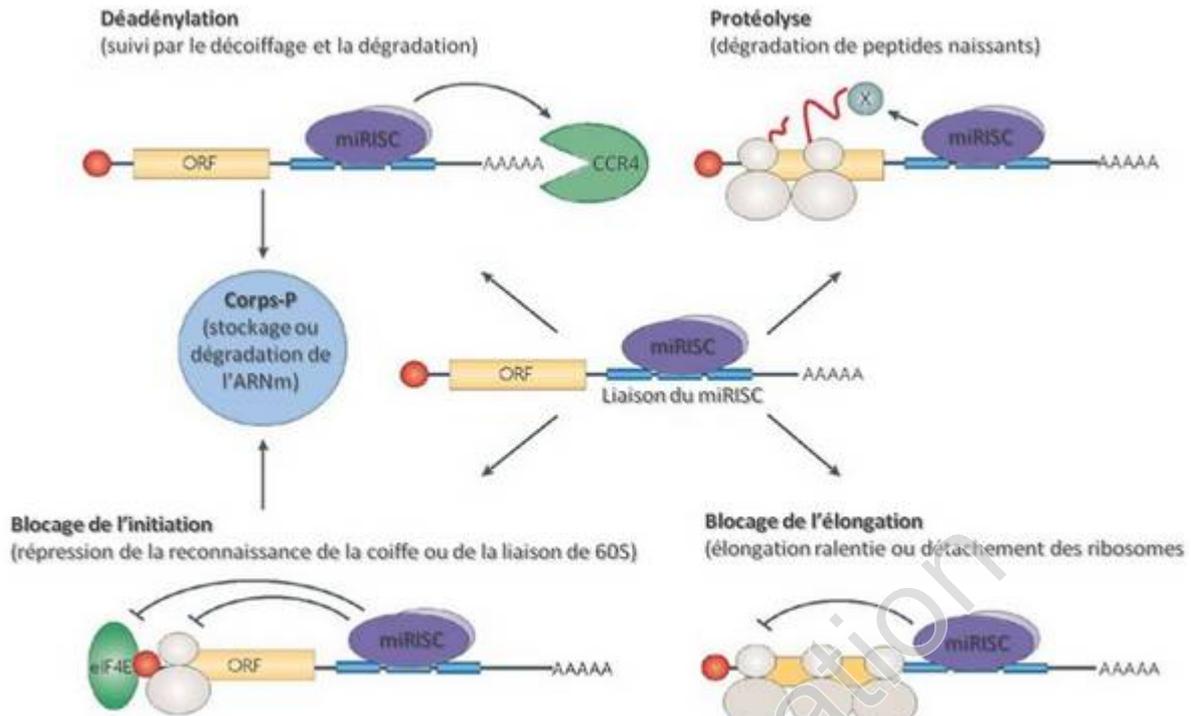


Figure 22 Mécanismes possibles de la répression post-transcriptionnelle des ARNm cibles induite par les miARN. La liaison de miRISC ou miRNP, probablement complexé avec des facteurs accessoires, au 3'UTR de l'ARNm peut induire le déadénylation et la dégradation de l'ARNm cible (en haut à gauche). Alternativement, le complexe miRISC peut réprimer l'initiation de la traduction soit à l'étape de reconnaissance de coiffe ou celle de la liaison de la sous-unité 60S (en bas à gauche). Les ARNm réprimés par déadénylation ou à l'étape de l'initiation de la traduction sont envoyés dans les "corps-P" pour être dégradés ou stockés. La répression peut également se produire aux étapes post-initiation de la traduction, menant à soit une élévation ralentie soit un détachement des ribosomes (en bas à droite). Le clivage protéolytique des polypeptides naissants a également été proposé comme un mécanisme de répression de la production des protéines induit par les miARN (en haut à droite). La protéase X potentiellement impliquée dans ce processus n'a pas été identifiée. La coiffe 7-méthylguanosine est représentée par un cercle rouge. eIF4e, facteur 4e d'initiation de la traduction eucaryotique (D'après Filipowicz, Bhattacharyya et al., 2008).

I.3.2.1.3. Plusieurs mécanismes ?

Si les mécanismes exacts permettant la répression traductionnelle sont encore sujets à controverse, il paraît clair que les miARN peuvent inhiber l'expression de leurs cibles aussi bien par des mécanismes d'inhibition de la traduction que par la dégradation des ARNm, cette deuxième étant beaucoup plus répandue que ce qui était cru initialement (Hendrickson, Hogan et al., 2009; Guo, Ingolia et al., 2010). On peut alors légitimement se demander si les deux types de mécanismes ne sont pas en fait couplés. La dégradation des ARNm pourrait finalement être une conséquence du blocage de la traduction, et inversement, la déadénylation

pourrait conduire indirectement à une inhibition de la traduction, en empêchant l'interaction de PABPC1 avec eIF4G et donc la conformation circulaire de l'ARNm, comme cela a été proposé par Wakiyama et al. Leurs travaux sur des extraits de cellules humaines soulignent l'importance de la queue poly(A) dans la répression induite par let-7 et montre une forte corrélation entre déadénylation et arrêt de la traduction (Wakiyama, Takimoto et al., 2007). Cette hypothèse est confortée par plusieurs études récentes qui apportent un éclairage sur le lien entre déadénylation et inhibition de la traduction en montrant que GW182 interagit avec PAPBC (Fabian, Mathonnet et al., 2009; Zekri, Huntzinger et al., 2009; Huntzinger, Braun et al., 2010).

Cependant, d'autres éléments indiquent que les deux mécanismes (inhibition de la traduction et déadénylation/dégradation) sont indépendants. Par exemple, il a été montré que la déadénylation induite par les miARN pouvait avoir lieu en présence d'inhibiteurs de la traduction (Eulalio, Rehwinkel et al., 2007; Wakiyama, Takimoto et al., 2007; Fabian, Mathonnet et al., 2009). La réciproque est également vraie, l'inhibition de la traduction peut avoir lieu sans déadénylation puisque des ARNm sans queue poly(A) (remplacée par une structure tige-boucle dérivée d'un ARNm d'histone ou par un ribozyme auto-catalytique) sont réprimés de manière dépendante d'un miARN (même si parfois moins efficacement que leur équivalent polyadénylé) (Wu, Fan et al., 2006; Eulalio, Huntzinger et al., 2008; Eulalio, Huntzinger et al., 2009).

Il est difficile de réconcilier les divers mécanismes d'action des miARN les uns avec les autres. Bien que probablement le fruit d'artéfacts liés aux différentes approches expérimentales, une explication possible est que les différents mécanismes d'inhibition proposés reflètent des événements secondaires à un unique mécanisme commun. Si les miARN sont capables de réprimer leurs cibles par différents mécanismes indépendants, il est possible que des mécanismes particuliers soient prédominants en fonction des conditions telles que le contexte cellulaire, la cible, le type d'interaction miARN-cible ou encore de la présence d'autres protéines de liaison à l'ARNm. De cette façon, nous pourrions être dans une situation analogue à la fable des aveugles qui tentent de décrire l'éléphant. Nous ne voyons pas encore le tour que fait le phénomène complet et unifié. A noter qu'en plus de ces actions au niveau post-transcriptionnel, la répression induite par l'ARN peut également s'opérer au niveau de la chromatine pour réguler l'expression de gènes. En effet, le système d'interférence par l'ARN a été mis en évidence dans le processus d'hétérochromatinisation notamment dans la lignée germinale où il réprimerait les transposons durant la spermatogénèse ou l'ovogénèse. Les

miARN peuvent s'associer avec le complexe de répression transcriptionnelles induit par l'ARN (RITS, RNA-*induce* transcriptional silencing) et être guidés aux régions complémentaires dans l'ADN chromosomique (Zofall and Grewal, 2006; Bühler and Moazed, 2007). Chez les mammifères, il a été mis en évidence que les sous-unités du complexe RITS incluent Ago1, Ago2, et TRBP2. (Janowski, Huffman et al., 2006; Kim, Villeneuve et al., 2006; Ahlenstiel, Lim et al., 2012). En plus de ces sous-unités du complexe RITS, l'association de Pol II avec un domaine terminal non phosphorylé (CTP, unphosphorylated C-terminal domain) est nécessaire pour l'interaction à l'ADN complémentaire chromosomique (Kim, Villeneuve et al., 2006). Suite à cette association avec de telles régions génomiques, le complexe RITS recrute des facteurs tels que des enzymes modifiant les histones, lesquelles altèrent la structure de la chromatine et induisent la TGS (Verdel, Jia et al., 2004; Bühler and Moazed, 2007).

I.4. Rôles biologiques

Il a été estimé à plus de 60% les gènes humains codant pour des protéines qui seraient régulés par des miARN (Friedman, Farh et al., 2009). L'aptitude à identifier des centaines de gènes cibles des miARN avec l'assurance que la plupart des cibles prédites sont authentiques permet l'analyse des types de gènes les plus communément visés par les miARN chez les mammifères (Lewis, Shih et al., 2003). Ces cibles potentielles sont significativement enrichies en gènes impliqués dans la régulation transcriptionnelle et représentent une diversité étonnante de fonctions moléculaires et de processus biologiques. Ainsi, chez les mammifères, les miARN apparaissent agir à plusieurs niveaux pour réguler l'expression d'une batterie de gènes (Lewis, Shih et al., 2003). Ils contribuent en grande partie à plusieurs circuits de types régulateurs (Tsang, Zhu et al., 2007; Ebert and Sharp, 2012): des miARN peuvent induire ou moduler des signaux, mais également supprimer ou amplifier des signaux en participant à des boucles de rétrocontrôle négatifs ou positifs, respectivement. Ainsi comme des facteurs de transcription, les miARN régulent diverses voies de signalisation et nombre de fonctions élucidées à ce jour pointent des rôles essentiels dans la régulation d'une myriade d'aspects du développement et de la physiologie des eucaryotes. De plus, l'étude de mutants de la voie des miARN a fournis rapidement des évidences de leurs influences dans des processus biologiques. La perte de Dicer ou des protéines Argonaute est presque toujours létale chez les animaux ou associée à des défauts sévères de développement.

Les patterns d'expression des miARN sont souvent tissus spécifiques (Lagos-Quintana, Rauhut et al., 2002) et, dans de nombreux cas, définissent la nature physiologique de la cellule (Lim, Lau et al., 2005). Démontrant l'importance de ces petits ARN chez l'homme, une étude a démontré que le profil d'expression génique d'une cellule non neuronale devient semblable à celui d'un neurone lors de l'expression ectopique de miR-124 à l'intérieure de celle-ci (Lim, Lau et al., 2005).

Impliqués dans la régulation de quasiment tous les processus biologiques, ils jouent des rôles importants dans la détermination du destin cellulaire incluant développement d'organe, la différenciation du lignage hématopoïétique mais également la prolifération, et la mort cellulaire. En plus de ces processus vitaux, les miARN sont impliqués dans diverses activités cellulaires, telles que la réponse immune, la sécrétion d'insuline, la synthèse de neurotransmetteurs, le rythme circadien, et la réplication virale (Ambros, 2004; Bartel, D. P., 2004; Grassmann and Jeang, 2008; Slezak-Prochazka, Durmus et al., 2010; Bivalkar-Mehla, Vakharia et al., 2011; Houzet and Jeang, 2011). A noter que cette liste s'allonge indubitablement à mesure que les données expérimentales s'accumulent. De façon logique avec leurs fonctions critiques assurant le développement et l'homéostasie cellulaire, il a été mis en évidence que l'activité anormale des miARN contribue à de nombreuses pathologies humaine telles que les désordres métaboliques, des maladies infectieuses, des maladies auto-immunes, et la pathologie dont fait l'objet de ce manuscrit le cancer (Yeung and Jeang, 2011; Ebert and Sharp, 2012).

I.4.1. MiARN & Cancer

I.4.1.1. Implication des miARN dans le cancer

Au cours des premières études *in vitro* explorant la fonction des miARN, il a été observé à maintes reprises que l'expression dérégulée des miARN sous-tend une variété d'événements pathologiques, incluant la carcinogénèse. La croissance maligne des cellules est caractérisée par la perte de l'identité cellulaire, une prolifération accrue et une mort cellulaire dérégulée. Les premières pistes sur l'importance des miARN dans la régulation de ces phénotypes cellulaires relevant du cancer viennent d'indices génétiques chez *C. elegans* et la *Drosophile*. Comme mentionné plus tôt, le premier miARN identifié, *lin-4* contrôle la chronologie d'événements développementaux chez le ver. La perte de fonction de *lin-4* résulte

en la différenciation anormale du lignage spécifique de cellules et la répétition de cellules embryonnaires types dans les phases tardives du développement (Lee, Feinbaum et al., 1993). Ces anomalies rappellent des tumeurs qui sont causées par un échec de l'exécution complète d'un programme de différenciation. Par exemple, dans de nombreuses tumeurs hématologiques, un blocage dans la différenciation engendre des cellules immatures qui s'accumulent avec des conséquences pathologiques. Chez la drosophile, la surexpression du miARN « Bantam » entraîne une croissance démesurée des tissus des yeux et des ailes. Subséquemment, il a été démontré que « Bantam » stimule la prolifération cellulaire et prévient l'apoptose au moins en partie par la régulation négative du gène pro-apoptotique « hid » (Brennecke, Hipfner et al., 2003).

Chez l'homme, le lien entre la fonction des miARN et la carcinogénèse a été mis en évidence lors d'une tentative d'identification de suppresseurs de tumeurs sur le chromosome 13q14, impliqué dans la pathogénèse de la leucémie lymphoïde chronique (LLC). Des délétions de la région 13q14.3 sont communément observées chez les patients LCC et il a été postulé qu'un gène suppresseur de tumeur y réside. Croce et ses collaborateurs ont démontré que cette région critique ne contient pas un gène codant une protéine, mais plutôt deux gènes de microARN miR-15a et miR-16-1, indiquant que la fonction de suppresseur de tumeur est vraisemblablement assurée par ces deux miARN. Des études supplémentaires ont montré que la perte de miR-15a et miR-16-1 résulte en une perte de la régulation de leurs gènes cibles identifiés comme étant impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (Cycline D1, cycline D3, cycline E1, CDK6...) et l'inhibition de l'apoptose notamment du gène anti-apoptotique BCL2 (B-cell CLL/lymphoma-2) dont l'expression est alors augmentée. (Calin, Dumitru et al., 2002). Subséquemment tous les gènes humains de miARN connus ont été cartographiés et trouvés localisés pour la plupart au niveau de sites chromosomiques fragiles ou dans des régions chromosomiques fréquemment altérées, (délétées ou amplifiées) dans les cancers, dans lesquelles des gènes suppresseurs de tumeurs ou oncogènes, respectivement, ont échoué à être découvert après plusieurs années d'investigations (Calin, Liu et al., 2004).

Par la suite, l'expression des miARN a été corrélée avec de nombreux cancers et ces gènes ont été mis en évidence à fonctionner comme des suppresseurs de tumeurs et des oncogènes (Figure 23, Tableau 4). Par exemple, les niveaux de miARN matures de miR-143a et miR145 sont significativement réduits dans des tumeurs colorectales mais également dans des lignées de cancer du sein ou lymphoïdes, suggérant comme miR-16a et miR-15 une activité de suppresseur de tumeur de ce miARN (Michael, O' Connor et al., 2003; Iorio,

Ferracin et al., 2005) (Tableau 4). A l'inverse, d'autres études rapportent une expression accrue de d'autres miARN et une activité oncogène à été démontré pour certains d'entre eux, on parle d'oncoMir. C'est le cas de miR-21 dont l'expression est augmentée dans les tumeurs de glioblastomes (Chan, Krichevsky et al., 2005) (Tableau 4). Ce miARN contrôle la croissance cellulaire en inhibant l'apoptose mais n'affectant pas la prolifération cellulaire, ce qui implique un rôle oncogénique. A noter que miR-21 n'est pas un gène spécifique du cerveau et son expression est accrue dans les échantillons de cancer du sein (Iorio, Ferracin et al., 2005), ce miARN aurait une fonction plus vaste dans la progression tumorale.

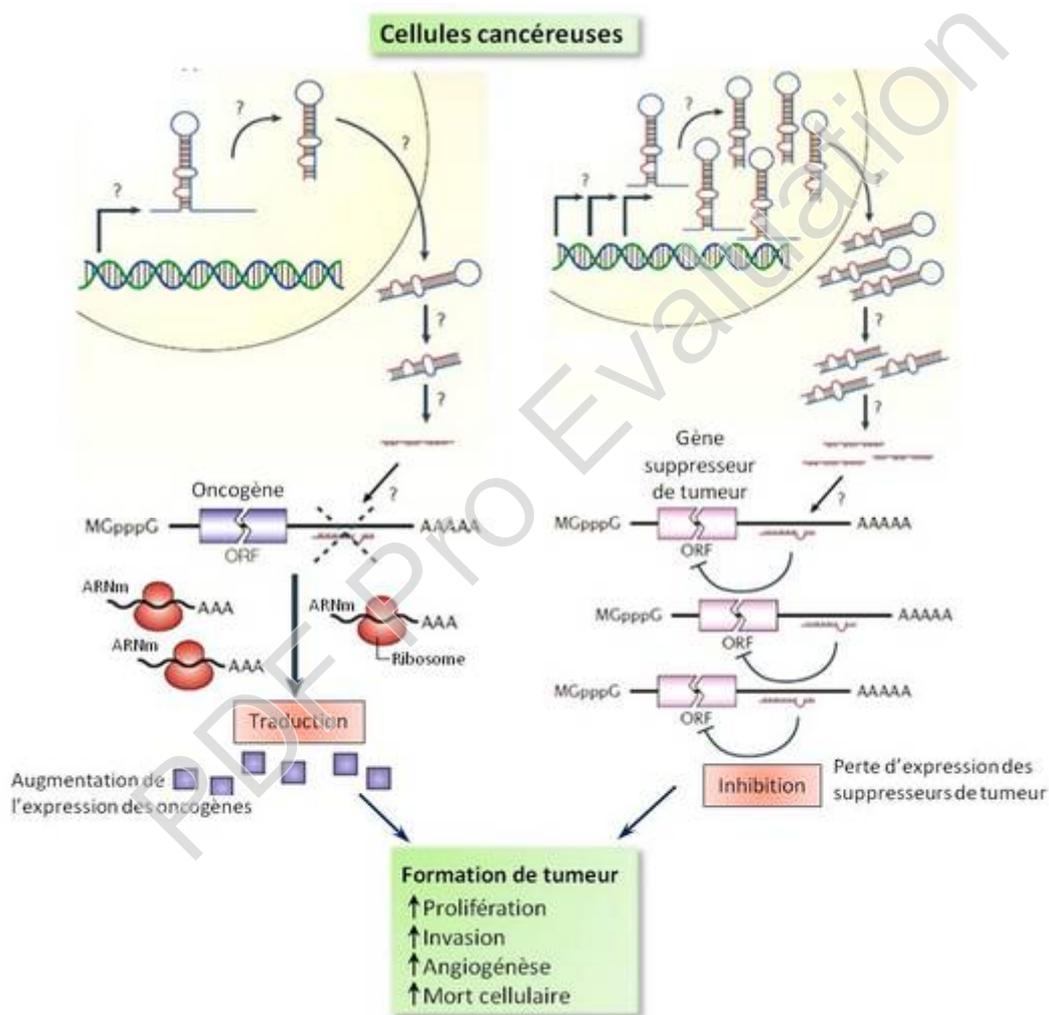


Figure 23 Les miARN comme gènes suppresseurs de tumeurs ou oncogènes. (A) La diminution ou la délétion d'un miARN qui a un rôle de suppresseur de tumeur mène à la formation tumorale. Une diminution ou l'élimination des niveaux de miARN matures peut se produire suite à un défaut à l'une des étapes de la biogénèse (indiquée sous forme de points d'interrogation) et finalement mener à une expression inappropriée d'oncoprotéines ciblées par ces miARN (carrés violets). (B) L'amplification ou la sur-expression d'un miARN qui a un rôle oncogénique résulte en la formation de tumeur. Dans ce cas, l'augmentation d'un miARN, lequel pourrait être produit à un moment inapproprié ou dans le

mauvais tissu, pourrait éliminer l'expression d'un gène suppresseur de tumeur (en rose) et conduire à la progression de la carcinogénèse. ORF: Cadre ouvert de lecture (D'après Esquela-Kersher and Slack, 2006).

miARN	Loci du gène	Association avec le cancer	Fonction	Références
miR-15a, miR-16-1	Chromosome 13q14	Fréquemment délété ou réprimé dans les leucémies lymphotropiques chroniques des cellules B; régule négativement le gène anti-apoptotique BCL2	ST	Calin GA et al, 2002, Cimmino A et al, 2005
miR-143, miR-145	Chromosome 5q32-33	Expression diminuée dans le cancer colorectal; réprimé dans les lignées de cancer du sein, de la prostate, cervical et lymphoïde	ST	Iorio MV et al, 2005; Michael MZ et al, 2003
miR-21	Chromosome 17q23.2	Facteur anti-apoptotique; activé dans les glioblastomes et le cancer du sein	OG	Iorio MV et al, 2005; Clafre SA et al, 2005; Chan JA et al, 2005
Membres de la famille let-7	Loci multiples	Régule négativement les oncogènes Ras; dirige la prolifération et la différenciation cellulaire; expression réduite dans le cancer du poulmon	ST	Takamizawa J et al, 2004; Johnson SM et al, 2005
miR-142	Chromosome 17q22		N/A	Lagos-Quintana M et al, 2002
BIC/miR-155	Chromosome 21q21	Expression augmentée dans le lymphome pédiatrique de Burkitt, d'Hodgkin, diffus des grandes cellules B; idem dans le cancer du sein	OG	Iorio MV et al, 2005; Metzler M et al, 2004; Eis PS et al, 2005; Kluiver J et al, 2005; van den Berg A et al, 2003
Cluster miR-17-19Bb	Chromosome 13q31-32	Expression augmentée par Myc; module négativement l'oncogène E2F1; une perte de l'hétérozygotie de ce cluster est trouvée dans les carcinomes hépatocellulaires; expression augmentée dans le lymphome des cellules B	ST/OG	He L et al, 2005; O'Donnell KA et al, 2005

Tableau 4 microARN associés avec des cancers humains. N/A: non renseigné; OG: oncogène; ST: suppresseur de tumeur (D'après Esquela-Kerscher and Slack, 2006).

I.4.1.2. Profils d'expression des micro-ARN dans les cancers

L'intensification des recherches dans ce domaine, utilisant une diversité de techniques incluant le clonage des miARN, la PCR quantitative, les puces (microarray) et le profil d'expression des miARN par cytométrie de flux, a résulté en l'identification et la confirmation de l'expression anormale de miARN dans la plupart des tumeurs malignes

humaines. De nombreux miARN ont été retrouvés régulés positivement ou négativement dans des échantillons de tumeurs solides ou hématopoïétiques en comparaison avec les tissus normaux correspondants (Croce, 2009). En plus de la distinction des tissus tumoraux par rapport aux tissus sains, l'expression des miARN est caractéristique d'un type de cancer, d'un stade de différenciation, et d'autres variables cliniques. Les premières analyses systématiques de centaines d'échantillons de cancers et de tissus normaux (Lu, J., Getz, G et al., 2005) ont classé avec succès des cancers variés à partir du miRnome. De façon surprenante, le miRnome s'est révélé être une méthode de prédiction du type et du stade de progression des cancers plus précise que le profil d'expression des ARNm (Lu, J., Getz, G. et al., 2005), indiquant que les profils des miARN sont un outil utile pour le diagnostic mais également le pronostic des cancers.

Bien que certains miARN soient retrouvés augmentés, la plupart sont réprimés dans les cancers par rapport aux tissus sains équivalents (Lu, J., Getz, G. et al., 2005); (Chen and Stallings, 2007; Porkka, Pfeiffer et al., 2007; Visone, Pallante et al., 2007). En accord avec ces observations, il a été montré que la déplétion globale des miARN par inhibition de la machinerie de biogénèse des miARN stimule la transformation cellulaire et la tumorigénèse *in vivo* (Kumar, Lu et al., 2007), indiquant que l'altération des miARN n'est pas une conséquence de la tumorigénèse mais qu'elle y contribue. En plus de leur implication dans le développement des tumeurs primaires, de nombreuses données mettent en avant un rôle des miARN dans la progression et les phases métastatiques de la maladie en raison de leur implication dans des processus biologiques tel que l'adhésion, la migration et l'invasion, ainsi que l'angiogénèse menant à l'acquisition d'un potentiel métastatique.

I.4.1.3. Mécanismes de dérégulations des miARN dans les cancers

Comme décrit dans la partie précédente, de nombreux gènes de miARN apparaissent être fréquemment perturbés dans les cancers. Cette expression aberrante des miARN peut résulter de plusieurs mécanismes différents (Figure 24) :

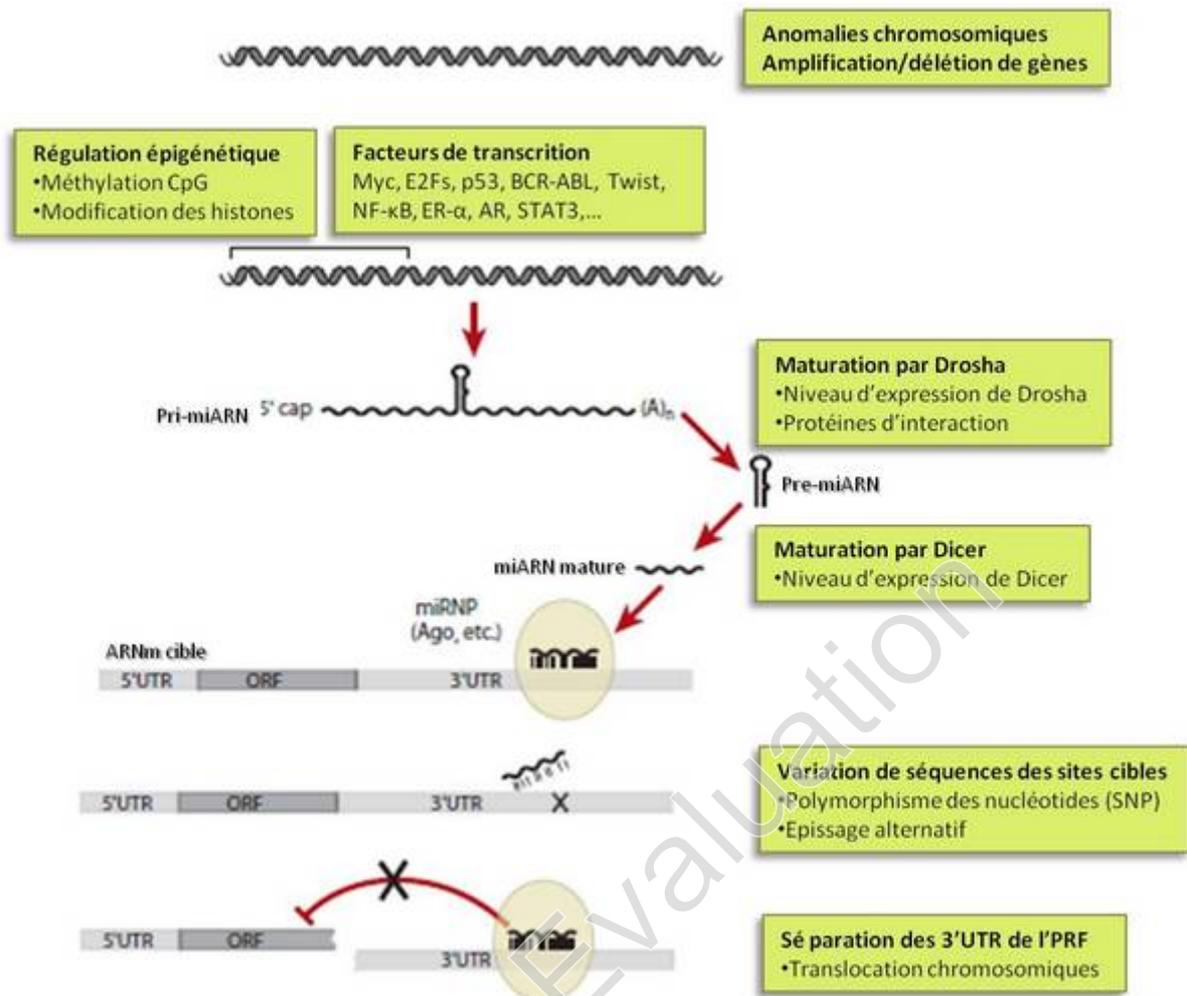


Figure 24 Mécanismes de dérégulation de l'expression des miARN dans les cancers (D'après Lee and Dutta, 2009).

1. des anomalies chromosomiques

Comme illustré par miR-15a, miR-16-1 et suggéré par la localisation des miARN dans des régions génomiques ou des sites fragiles associés au cancer chez l'homme (Calin, Sevignani et al., 2004), l'anomalie chromosomique est une des causes de la dérégulation des miARN dans les cancers. La tumorigénèse est souvent accompagné d'aberrations chromosomiques telles que la délétion, l'amplification, et la translocation. Dans la plupart des cas, les niveaux de miARN sont corrélés avec des changements dans le nombre de copies de loci génomiques, comme démontré par la comparaison entre les données d'hybridation génomique comparative et des données d'expression des miARN (Tagawa and Seto, 2005;

Porkka, Pfeiffer et al., 2007; Rinaldi, Poretti et al., 2007; Tagawa, Karube et al., 2007; Welch, Chen et al., 2007).

2. Facteurs épigénétiques

Les facteurs épigénétiques, tel que l'altération de la méthylation de l'ADN, peuvent également affecter l'expression des miARN. Dans plusieurs cancers, l'hyperméthylation des îlots CpG de régions promotrices résulte au mutisme transcriptionnel de gènes suppresseurs de tumeur. Le mutisme de gènes par méthylation de l'ADN est étroitement lié à la modification des histones. Des analyses *in silico* des séquences génomiques des gènes de miARN ont montré que la moitié d'entre eux sont associés avec des îlots CpG (Weber, Stresemann et al., 2007), suggérant qu'ils pourraient être sujet à ce mécanisme de régulation. Plusieurs données ont en effet prouvé qu'un statut de méthylation altéré peut être responsable de l'expression dérégulée des miARN dans les cancers, comme le « silencing » des miARN supposés être des suppresseurs de tumeurs : en traitant les cellules de tumeurs de vessie et des fibroblastes humains avec un inhibiteur des méthyltransférases (5-Aza-2'-deoxycytidine), Saito et al. (Saito, Liang et al., 2006) ont observé une forte sur-régulation de miR-127, un miARN caractérisé par un promoteur de l'ADN recouvert par un îlot CpG, capable de cibler la proto-oncogène BCL-6, et réprimé dans plusieurs cancers. Avec la même approche de démasquage de miARN épigénétiquement réprimés en induisant le remodelage de la chromatine suite au traitement avec des drogues, il a été montré que miR-9-1 est hyperméthylé et donc réprimé dans le cancer du sein (Lehmann, Hasemeier et al, 2008), tout comme les miARN en cluster miR-34b et miR-34c dans le cancer du colon (Toyota, Suzuki et al., 2008).

A noter que, le mutisme épigénétique d'un miARN peut être le reflet d'une spécificité d'expression dans un tissu donné. Par exemple, miR-124a est normalement exprimé dans les tissus neuronaux, par conséquent sa répression génétique dans les tumeurs colorectales n'est pas surprenante (Lujambio, Ropero et al., 2007). Réciproquement la sur-modulation de miARN oncogéniques putatifs dans les cancers peut être due à une hypométhylation, comme montré dans des adénocarcinomes de pumon pour let7-a-3 (Lujambio, Ropero et al., 2007) ou dans des cancers épithéliaux ovariens pour miR-21 (Iorio, Visone et al., 2007).

3. Régulation transcriptionnelle

Les miARN proviennent de gènes codés à partir du génome. En tant que telle, comme tous les gènes génomiques, leur transcription est régulée par la fixation d'un facteur de

transcription qui va permettre de générer le pri-miARN. Ce mécanisme a été bien documenté dans plusieurs cas où plusieurs miARN spécifiques d'un tissu sont activés par des facteurs de transcription durant la différenciation. Considérant l'impact considérable des facteurs de transcription dans les processus cellulaires fondamentaux, il n'est surprenant que de nombreux oncogènes ou suppresseurs de tumeurs soient des facteurs de transcription. De nombreuses relations miARN-facteurs de transcription ont été mises en évidence dans les cancers. Par exemple, il a été montré que dans le développement des lymphomes de cellules B est significativement accéléré par l'expression forcée du cluster miR-17-92 dans les souris transgéniques sur exprimant l'oncogène c-myc (He, Thomson et al., 2005). En effet, le facteur de transcription c-Myc se fixe sur un locus génomique en amont du cluster et active son expression. A noter que le cluster miR-17-92 contient les premiers miARN démontrés comme étant oncogénique entre autre car ils ciblent un facteur pro-apoptotique et leur expression ectopique accélère le développement de tumeur. Un autre exemple, le miARN miR-34 est induit par le facteur de transcription p53. En accord avec le rôle suppresseur de tumeur de p53, miR-34 est retrouvé sous-régulé dans de nombreux cancers (Bommer, Gerin et al., 2007) (Chang, Wentzel et al., 2007).

4. Régulation des acteurs de la biogenèse des miARN

Le niveau d'expression d'un miARN mature est déterminé non seulement par le taux de transcription du pri-miARN mais également par l'efficacité de maturation de leurs précurseurs et sa stabilité. Les miARN montrent souvent des différences d'expression entre leurs formes matures par rapport à celle de leurs précurseurs (Obernosterer, Leuschner et al., 2006; Kluiver, van den Berg et al., 2007; Mott, Kobayashi et al., 2007; Shah, Morimura et al., 2007); (Michael, O' Connor et al., 2003). Ce mécanisme a été documenté et confirmé dans les cancers via des analyses exhaustives de données d'expression (Thomson, Newman et al., 2006). La comparaison de données microarray entre les ARNm hôtes codant des miARN et les miARN matures ont révélé que la diminution des miARN dans les cancers est difficilement corrélée avec une diminution de l'expression du gène hôte. Ainsi, l'expression aberrante des miARN durant la tumorigénèse est vraisemblablement souvent due à des altérations à des étapes post-transcriptionnelles. En effet, les niveaux d'expression de Dicer et Drosha sont altérés dans plusieurs cancers (Karube, Tanaka et al., 2005; Blenkiron, Goldstein et al., 2007; Kumar, Lu et al., 2007). Par exemple, la sur-régulation de Drosha est observée dans plus de la moitié des prélèvements de carcinomes de cellules squameuses cervicales (CCS) et est probablement due à une amplification de la région 5p du chromosome, où est

localisé le gène de Drosha (Muralidhar, Goldstein et al., 2007). Le regroupement hiérarchique des données d'expression des miARN a classé avec succès les échantillons de CCS cervicales en deux groupes selon la surexpression de Drosha. Étonnamment, l'expression de certains miARN est retrouvée diminuée lors de la surexpression de Drosha, indiquant que les miARN répondent différemment à une élévation de la machinerie de maturation des miARN. De façon intéressante, il a été rapporté que Drosha interagit avec une protéine oncogénique de fusion dérivée d'une translocation chromosomique dans certaines leucémies (Nakamura, Canaani et al., 2007). Cette interaction affecte la sélection des pri-miARN par Drosha et, par conséquent, influence les patterns d'expression des miARN.

I.4.2. Micro-ARN et virus

Il a été mis en évidence que plus de 15% des cancers chez l'homme ont une étiologie virale. Le rôle crucial des miARN dans la régulation de gènes en font une cible de choix indéniable pour les virus à usurper afin de réguler l'expression de gènes de la cellule hôte mais également de gènes viraux et ainsi réaliser leurs fonctions essentielles (une réplication active et une infection réussie). Parce que les miARN contrôlent l'expression de protéines (Baek, Villén et al., 2008), ils pourraient influencer sur le tropisme cellulaire des virus, moduler l'infectivité virale et jouer un rôle crucial en induisant des réponses antivirales appropriées (Meier, Chang et al., 2009; Umbach and Cullen, ; Mosoian, Teixeira et al., 2010; Mureith, Chang et al., 2010; Papadopoulos, Ferwerda et al., 2010). Il n'est donc pas surprenant que les virus pourraient réguler l'expression de miARN spécifiques pour l'infection, la réplication virale et l'échappement au système immunitaire.

I.4.2.1. Micro-ARN viraux

Bien que les miARN aient été identifiés chez les eucaryotes, il a été démontré que les virus eux-mêmes génèrent des microARN. Contrairement aux protéines virales, les miARN ne sont pas antigéniques et ils peuvent ainsi éviter « la voie de l'interféron » (IFN/PKR) induite par les ARNdb d'au moins 45pb de long (Botos, Liu et al., 2009; Umbach and Cullen, 2009). Le premier miARN viral a été cloné à partir d'une lignée de cellules latentes de lymphome de Burkitt infectée par le virus Epstein-Barr (EBV) (Pfeffer, Zavolan et al., 2004). Suite à cette découverte inédite, approximativement 436 miARN viraux ont été identifiés dans

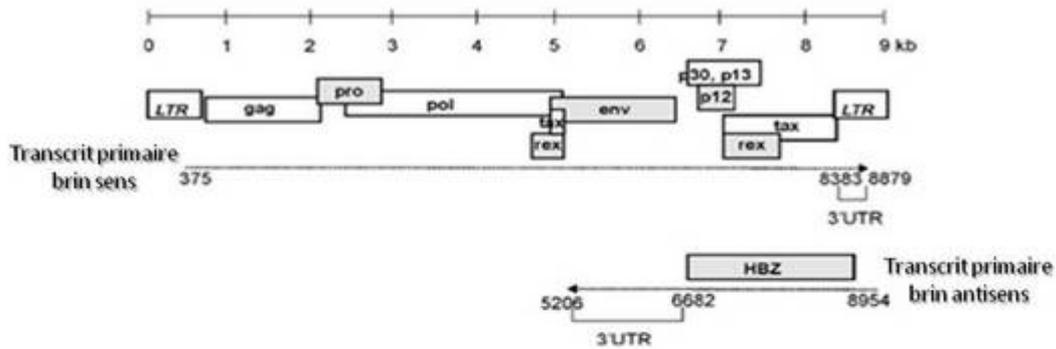
différentes familles de virus (polyomavirus, adénovirus, lentivirus) et répertoriés dans la miRBase (Griffiths-Jones, Grocock et al., 2006; Griffiths-Jones, Saini et al., 2008; Kozomara and Griffiths-Jones, 2011). Les miARN viraux suivent la même biogénèse que les miARN cellulaires et donc, de façon similaire au génome virale, ils sont synthétisés par la machinerie cellulaire. L'identification des gènes cibles de certains de ces miARN viraux montre qu'ils régulent à la fois des gènes viraux et cellulaires et leur attribue un rôle dans le contrôle de la réplication et la latence virale, dans la limitation des réponses antivirales, dans l'inhibition de l'apoptose, et dans la stimulation de la croissance cellulaire (Pfeffer and Voinnet, 2006; Grassmann and Jeang, 2008). Par exemple, le virus oncogénique de l'herpès associé au sarcome de Kaposi (KSHV), code des miARN qui ciblent directement un facteur anti-angiogénique, la thrombospondine 1 (Tsp-1) (Samols, Skalsky et al., 2007), p21, Ikb α , qui sont impliqués dans l'adhésion cellulaire, la régulation du cycle, l'activation de la voie NF κ B, ces miARN agissent donc comme des oncogènes viraux ce qui illustre le rôle des miARN viraux dans la tumorigénèse. La mise en évidence de nombreux miARN viraux chez le VIH-1 (Omoto, Ito et al., 2004; Omoto and Fujii, 2005) et d'autres rétrovirus démontrent une grande probabilité que le génome d'HTLV-1 code également pour des miARN. A ce jour, aucun miARN codé par HTLV-1 n'a été identifié. Néanmoins, Ruggero et ses collaborateurs, dans une étude non publiée ont mis en évidence deux segments du génome d'HTLV-1 formant potentiellement des miARN. Cependant ces deux séquences n'étaient retrouvées qu'une fois et uniquement dans les cellules MT-2 suggérant qu'elles pourraient être cellules spécifiques et que leur production ne serait pas favorisée dans le contexte d'une infection chronique (Ruggero, Corradin et al., 2010).

I.4.2.2. Manipulation virale de la régulation des micro-ARN cellulaires

Au-delà de la production de miARN codés par les génomes viraux, alternativement, les virus peuvent également exploiter le réseau de miARN en régulant l'expression des miARN cellulaires à leur avantage. Par exemple, au contraire du KSHV qui code un miARN viral, miR-K12-11, le virus de l'Epstein-Barr est capable d'induire l'expression du miARN cellulaire miR-155, un orthologue de miR-k12-11 (Gatto, Rossi et al., 2008). Ces miARN ciblent le même set de gènes cellulaires, indiquant une fonction similaire (Gottwein, Mukherjee et al., 2007). Une étude a montré que l'expression de ces miARN prévient l'apoptose des cellules infectées favorisant ainsi la persistance virale, conduit l'expansion des

cellules B infectées et induit la transformation (Linnstaedt, Gottwein et al., 2010). Ces données démontrent les conséquences potentielles d'un gain de contrôle par le virus de l'expression des miARN cellulaires pour sa survie. A noter que dans certains cas, bien que l'expression des miARN ne soit pas directement régulée par des virus, le maintien de leur niveau intracellulaire est essentiel pour l'infection et la réplication virale. Par exemple, des niveaux d'expression élevés de miR-122 spécifique du foie est nécessaire pour la réplication du virus de l'hépatite C à la fois *in vitro* et *in vivo* (Jopling, Yi et al., 2005; Lanford, Hildebrandt-Eriksen et al., 2010), alors que l'infection et la réplication virale n'affecte pas l'expression de miR-122 (Randall, Panis et al., 2007). A l'inverse, des copies de miR-28, miR-125b, miR-150, miR-223 et miR-382 sont maintenues à des niveaux élevés dans les cellules T CD4+ en repos, mais significativement diminués dans les cellules T CD4+ activées, résultant en l'infection productive du VIH-1 dans seulement le dernier cas. Ces miARN sont capables d'influer sur la réplication du VIH-1 via des interactions avec le 3'UTR viral de transcrits qui contribuent à la latence dans la population de cellules T CD4+ (Huang, Wang et al., 2007).

Dans le cas d'HTLV-1, deux études ont mis en évidence la présence de plusieurs sites cibles des miARN dans le génome d'HTLV-1 (Hakim, Alsayari et al., 2008; Ruggero, Corradin et al., 2010) (Figure 25). Hakim et ses collaborateurs ont comparé les séquences de 451 miARN humains avec le génome d'un panel de rétrovirus. Ils ont ainsi identifié 7 microARN avec plus de 80% d'homologies de séquences avec le brin sens d'HTLV-1. Un de ces miARN, miR-648, serait capable de s'hybrider à une région qui est localisée dans le transcrit HBZ. Dans la seconde étude réalisé par Ruggero et al., les microARN potentiel qui cibleraient les transcrits HTLV-1 ont été analysés en utilisant le logiciel de prédiction des cibles MiRanda à partir des miARN de la miRBase de Sanger (John, B, Enright, AJ et al., 2004; Betel, Wilson et al., 2008). Ils rapportent 15 miARN ciblant les transcrits HTLV-1 dont 9 qui cibleraient le transcrit antisens. Parmi les miARN affectant la latence du VIH, deux ont été retrouvés à cibler également HTLV-1, miR-150 pour lequel 2 sites de liaison ont été identifiés sur le brin antisens et miR-145b avec un site potentiel dans l'ORF de pol sur le brin sens (Ruggero, Corradin et al., 2010)



Génome d'HTLV-1	MicroARN cellulaires	Références
Brin sens	miR-653, miR-648, miR-596, miR-644, miR-496, miR-431, miR-326	Hakim, Alsayari et al, 2008
Brin sens	miR-125b, miR-432, miR-125a, miR-663, miR-939, miR-1538, miR-1908	Ruggero, Corradin et al, 2010
Brin antisens*	miR-150, miR-24, miR-20b, miR-337, miR-432, miR-125a, miR-324-3p, miR766, miR-1913	

Figure 25 miARN cellulaires prédits à interagir avec des séquences 3'UTR d'HTLV-1. Le brin antisens correspond au transcrit antisens HBZ (D'après Houzet and Jeang, 2011).

L'altération des niveaux de miARN par les virus leur permet donc de moduler une gamme de réponse de l'hôte et ainsi de déréguler à leur avantage de nombreuses réponses cellulaires telles que la résistance à l'apoptose, une augmentation de la prolifération cellulaire mais également l'évasion à la réponse immunitaire de l'hôte via la diminution des miARN anti-viraux, ou l'établissement de la latence dans une population de cellules infectées. Par conséquent, la manipulation des miARN cellulaires représente un mécanisme clé dans la dérégulation de l'équilibre cellulaire par les virus infectieux leur permettant d'établir un environnement cellulaire optimisé et à terme conduire une cellule infectée à devenir cancéreuse.

II. Rôle des miARN dans la pathogénèse de l'ATL

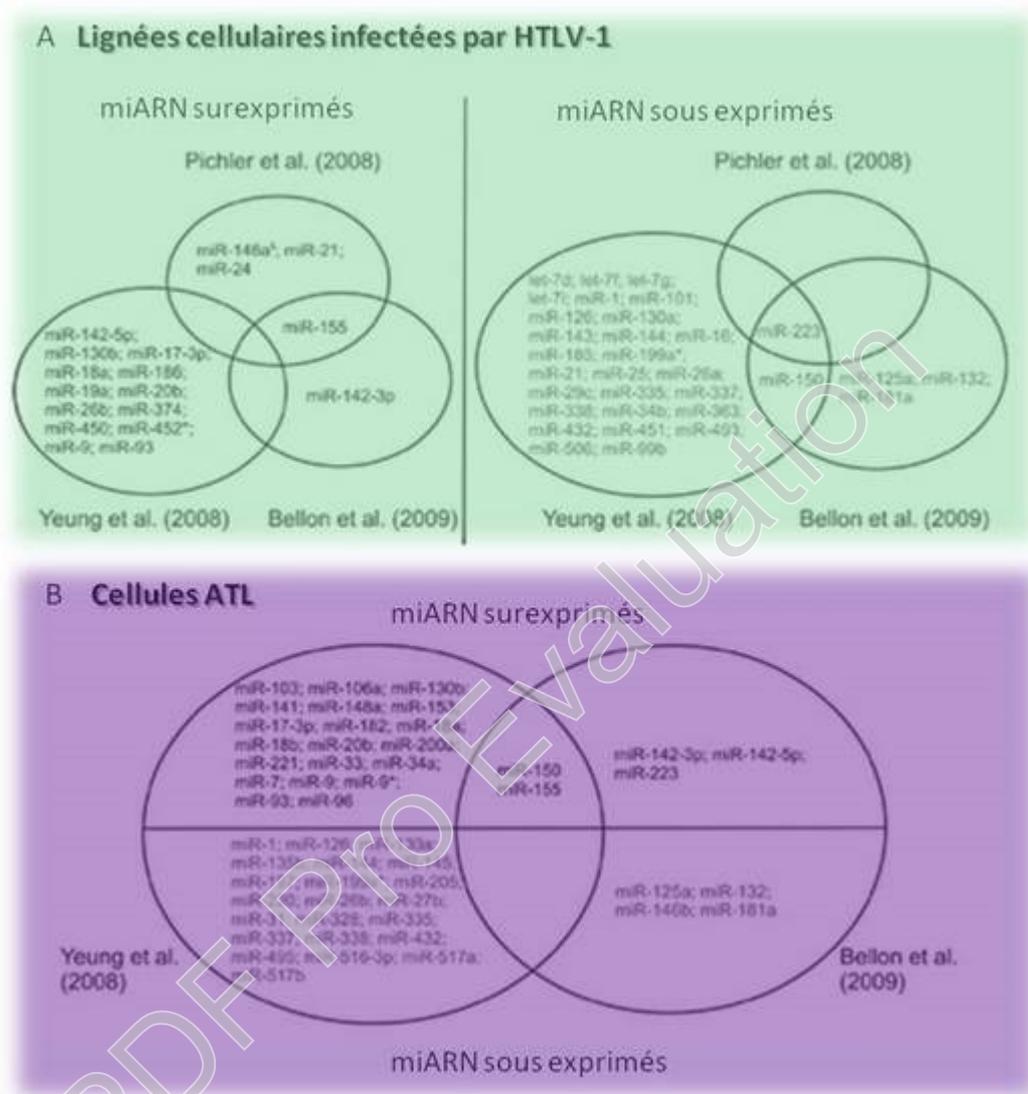
II.1. L'infection par HTLV-1 change le profil des miARN cellulaire

Trois études récentes ont rapporté des changements dans le profil d'expression des miARN cellulaires dans les cellules infectées par HTLV-1 et les échantillons de patients ATL (Figure 26). Pichler et ses collaborateurs (2008) ont, pour la première fois, mis en évidence que l'expression des miARN est dérégulée dans les cellules infectées par HTLV-1. En optant pour une technique de RT-PCR quantitative, ils ont exploré la connexion entre HTLV-1 et les miARN cellulaires dans plusieurs lignées transformées par HTLV-1. En raison de l'expression d'un certain nombre de marqueurs phénotypiques des Tregs par les cellules infectées par HTLV-1, les chercheurs se sont focalisés sur 7 miARN qui sont sur-régulés dans ce set de cellules T comparé aux autres cellules T CD4+ (Cobb, Hertweck et al., 2006) et qui ont été déjà impliqués dans la transformation oncogénique. Ils ont ainsi démontré que l'expression des miARN, miR-21, miR-24, miR-146a, et miR-155 étaient significativement augmentée à contrario de miR-223 qui est diminué dans les cellules infectées par HTLV-1. A noter que l'analyse *in silico* prédit que de nombreux gènes candidats pourraient être dérégulés par cette modification des miARN (Pichler, Schneider et al., 2008). Les deux autres études ont examiné les profils d'expression des miARN dans le contexte d'une infection par HTLV-1 en utilisant une technique de microARN-array (Yeung, Yasunaga et al., 2008; Bellon, Lepelletier et al., 2009). Yeung et ses collaborateurs ont analysé 327 miARN déjà caractérisés chez l'homme dans 7 lignées cellulaires infectées par HTLV-1 et 4 échantillons de PBMC (peripheral blood mononuclear cell) de patients ATL. Malgré des profils d'expression quelques peu différents entre les échantillons ATL et les lignées infectées, ils identifient miR-18a, miR-93 et miR-130b, des miARN qui ont été rapportés être stimulés en réponse à un agent inducteur de tumeur tel que le PMA (phorbol-12-myristate-13-acétate) dans les cellules T, comme étant sur-régulés dans les cellules ATL ; un miARN additionnel, miR-335, retrouvé quand à lui inhibé par le PMA dans les cellules T, est également sous-exprimé dans les cellules ATL. Après confirmation de l'augmentation d'expression de miR-93 et miR-130b dans les cellules ATL par RT-PCR en temps réel, les auteurs ont montré que le gène suppresseur de tumeur TP53INP1 (Tumor protein p53 inducible nuclear protein 1) est ciblé par miR-93 et miR-130b, et que l'inhibition d'expression de TP53INP1 induite par l'expression élevée de ces deux miARN contribue à la prolifération et la survie de la cellule. (Yeung, Yasunaga et al., 2008).

De façon intéressante, la perte d'expression de TP53INP1 a été rapportée dans les cancers gastriques et dans les adénocarcinomes pancréatiques où il est considéré comme un marqueur de distinction entre les lésions bénignes et les lésions précancéreuses pancréatiques (Gironella, Seux et al., 2007). Bellon et ses collègues (2009) ont réalisé leur étude sur 7 échantillons de cellules ATL comparé à des PBMC normaux et des cellules T CD4+. Ils ont montré que des miARN spécifiques de l'hématopoïèse, incluant miR-150, miR-155, miR-223, miR-142-3p, et miR-142-5p sont sur-régulés, tandis que l'expression des miR-181a, miR-132, miR-125a, and miR-146ba est diminuée dans les cellules ATL. Suite à l'analyse des processus ciblés par ces miARN, les auteurs concluent que les miARN impliqués dans l'hématopoïèse normale et les réponses immunes sont totalement dérégulés dans les cellules tumorales ATL ex vivo (Bellon, Lepelletier et al., 2009). De plus, il a été montré que cette dérégulation de miARN favorise la différenciation des lignées infectées

Bien que le peu de recouvrement de l'ensemble des résultats soit frappant, chacune de ces études a identifié un ou plusieurs miARN avec des rôles établis dans la transformation qui sont dérégulés dans les cellules ATL et ainsi méritent de plus amples investigations pour comprendre la pathogénèse d'HTLV-1. La diversité dans les profils d'expression reflète sans doute les nombreuses variables inhérentes à chaque étude. Par exemple, la quantité de miARN cellulaires pourrait être sensible aux conditions environnementales variées telles que l'activité transcriptionnelle, le processus de maturation et la régulation épigénétique. Les résultats semblent être dépendants de la méthodologie utilisée, des conditions ainsi que du type d'échantillons testé. Néanmoins, il y a un consensus intrigant dans les 3 études. En effet, comme discuté plus haut, dans leur étude, Yeung et al. ont rapporté que la protéine suppresseur de tumeur TP53INP1 dans les transformées ou infectées par HTLV-1 était ciblée par la répression des miARN sur-exprimés miR-93 et miR130b (Yeung, Yasunaga et al., 2008). Par comparaison, dans l'étude ultérieure réalisée par Pichler et al., TP53INP1 était également rapporté être ciblé dans les cellules infectées par HTLV-1, mais par l'expression sur-régulée de miR-21, miR-24, miR146a et miR-155 (Pichler et al., 2008). De façon intéressante, séparément Bellon et al. et Yeung et al., à partir de cellules infectées/transformées par HTLV-1 *in vitro* puis par la suite *in vivo* de cellules leucémiques ATL de patients, ont tous les deux constaté l'augmentation de l'expression de miR-155 (Yeung, Yasunaga et al., 2008; Bellon, Lepelletier et al., 2009), ce qui est cohérent avec une extinction de TP53INP1 qui est une cible de miR-155 (Gironella, Seux et al., 2007). Ainsi,

conjointement, les 3 études s'accordent et convergent vers TP53INP1 comme une des cibles importante régulée par les miARN dans la transformation de l'ATL par HTLV-1.



Très récemment, Yamagishi et ses collaborateurs ont établis des analyses de l'expression globale des gènes d'une grande cohorte d'étude de patients ATL qui incluent des analyses d'expression des ARNm, des niveaux de miARN et du nombre de copies génomiques (Yamagishi, Nakano et al., 2012). Ils ont ainsi identifié 61 miARN avec des niveaux

d'expression significativement altérés dans les cellules ATL comparé aux cellules T CD4+. L'un des points importants révélés dans cette étude est une diminution globale de la régulation des miARN dans les échantillons d'ATL, similairement aux données rapportées dans d'autres cancers (Lu, J., Getz, G. et al., 2005; Gaur, Jewell et al., 2007). En effet, l'expression de 55 des 61 miARN dérégulés est retrouvée diminuée chez les ATL. Parmi eux, miR-31, dont la perte d'expression a également été rapportée dans l'étude de Yeung et al. (2008), est le miARN le plus réprimé dans tous les individus ATL. Ce miARN est connu comme étant un suppresseur de tumeur qui pourrait également être associé avec le cancer du sein métastatique (Valastyan, Reinhardt et al., 2009).

L'ensemble des miARN dont l'expression est trouvée dérégulée dans les cellules infectées par HTLV-1 et dans les cellules de patients ATL a également été identifié dans d'autres cancers. Chacun d'entre eux module un nombre varié de processus cellulaires et la dérégulation de ces miARN résulte en des shifts dans la balance de plusieurs voies de signalisation, lesquelles contribuent à la transformation cellulaire et ainsi l'acquisition des caractéristiques leucémogéniques.

II.2. Mécanismes impliqués dans la dérégulation des miARN lors de l'infection par HTLV-1

Malgré les avancées réalisées sur l'expression aberrante des miARN cellulaires dans différents types de cancers induit par des virus, le mécanisme impliqué dans l'induction de cette dérégulation reste encore à être élucidé. Cependant, plusieurs études rapportent que les protéines virales pourraient jouer un rôle important dans ce bouleversement de l'expression des miARN cellulaires, y compris les miARN oncogéniques ou suppresseurs de tumeurs. Dans le cas d'HTLV-1, les études réalisées jusqu'à maintenant pointent un rôle des protéines virales régulatrices Tax, la protéine aux propriétés oncogéniques d'HTLV-1 et Rex dans la manipulation de l'expression des miARN cellulaires et le détournement de la machinerie de l'interférence ARN.

II.2.1. Effet de Tax sur les miARN cellulaires

La protéine virale Tax est un facteur de transcription pléiotropiques qui modulent de nombreux gènes cellulaires via des interactions avec des activateurs transcriptionnels, des protéines impliquées dans le remodelage de la chromatine mais également du cycle cellulaire (Jin, Teramoto et al., 1997; Rosin, Koch et al., 1998; Iha, Kibler et al., 2003; Peloponese and Jeang, 2006). C'est donc logiquement que les recherches ont convergé vers l'étude de l'influence cette protéine aux activités oncogéniques sur les miARN cellulaires. De nombreuses études ont ainsi mis en évidence un rôle de Tax dans l'augmentation de l'expression de certains miARN.

miR-146a est l'un des miARN dont l'expression est accrue dans les cellules infectées par HTLV-1 et deux études indépendantes ont mis en évidence que l'expression de miR-146a est stimulée par Tax via l'activation de son promoteur par les complexes NF- κ B (Pichler, Schneider et al., 2008; Tomita, Tanaka et al., 2009). En effet, l'expression ectopique de Tax dans les cellules Jurkat, induit une augmentation de l'expression de miR-146a, démontrant que Tax est capable de booster les signaux cellulaires sous-jacents à cette expression. Des formes mutées de Tax, la mutation des éléments de réponse à NF- κ B sur le promoteur de miR-146a ou l'ajout d'un inhibiteur de NF- κ B dans les cellules infectées par HTLV-1, interfère avec l'expression du miARN, permettant de préciser que la transactivation est dépendante de NF- κ B. Par ailleurs, l'inhibition de miR-146a diminue la croissance des lignées infectées et augmente les niveaux de TRAF6, une cible de miR-146a qui contrôle le cycle cellulaire (Bouzar and Willems, 2008; Tomita, Tanaka et al., 2009). L'augmentation de l'expression de miR-146a apparaît donc être une des stratégies utilisées par HTLV-1 pour favoriser la prolifération cellulaire dans les cellules infectées.

Yeung et ses collaborateurs ont analysé la région promotrice prédite de miR-130b, un autre miARN abondant dans les cellules infectées par HTLV-1 et dans les cellules ATL. Les auteurs rapportent plusieurs sites de liaison pour des facteurs de transcription, incluant NF- κ B. La séquence promotrice a été clonée dans un vecteur d'expression de la luciférase et les résultats d'expériences rapporteurs de promoteurs ont démontré également que Tax transactive miR-130b via NF- κ B.

De même, une autre étude a démontré que l'augmentation de l'expression de miR-155 dans les lignées infectées par HTLV-1 était due à Tax (Tomita, 2012). En effet, des cellules

inductible pour l'expression de Tax ont permis de corrélérer l'expression de Tax avec celle de miR-155. L'analyse du promoteur de miR-155 a révélé la présence de sites NF- κ B mais également de sites AP-1. Afin de déterminer la voie impliquée dans la transcription de miR-155 par Tax, le promoteur muté ou non pour ces sites a été cloné dans un plasmide luciférase. Les résultats indiquent que l'expression de miR-155 est activée par AP-1 et NF- κ B. Comme de nombreux promoteurs de miARN sont positivement régulés par NF- κ B, on peut, donc, supposer que l'activation de NF- κ B par Tax augmente l'expression de plusieurs miARN (Li, Wang et al., 2012; Lukiw, 2012; Wang, Legesse-Miller et al., 2012). De plus, considérant la capacité de Tax à influencer beaucoup d'autres facteurs de transcription en plus de NF- κ B tels que CREB, AP-1, Myc, NFAT, SRF, p53, TGF- β (Hall and Fujii, 2005) (Tabakin-Fix, Azran et al., 2006), il est probable que d'autres investigations rapporteront d'autres miARN activés par Tax.

Une étude récente a analysé les profils de facteurs de transcription mais également les profils des protéines et des miARN qui sont modulés par Tax, dans des clones T ayant intégrés de façon stable le LTR d'HTLV-1 (Rahman, Quann et al., 2012). Cette étude a identifié que non seulement Tax induit l'activation de substrats et de facteurs associés avec le remodelage de la chromatine, mais inhibe, également, les miARN qui ciblent les facteurs nécessaires au remodelage de la chromatine. Le remodelage de la chromatine joue un rôle critique dans la pathogénèse de l'ATL. En effet, la transcription du génome d'HTLV-1 est en grande partie réalisée par la formation du complexe Tax/CREB/CBP/p300 qui se fixe aux sites TRE-1. Le recrutement de CBP/p300 par le complexe Tax/CREB permet de moduler le degré d'acétylation des histones et ainsi d'ouvrir la structure de la chromatine. L'expression de ces protéines facilite l'accessibilité du promoteur et le recrutement du complexe de transcription. Dans leur étude, Rahman et ses collaborateurs, ont analysé le profil altéré de miARN par Tax et mis en évidence une diminution spécifique de l'expression des miARN qui ciblent p300 et pCAF en présence de Tax. Parmi eux, miR-149 et miR-873, lesquels ciblent p300, ont été démontrés être diminués d'un facteur 7 et 5 respectivement dans les cellules infectées MT-2, comparé aux cellules Jurkat non infectées (Rahman, Quann et al., 2012). Ces observations démontrent le rôle de Tax dans le détournement de la machinerie de l'iARN pour moduler l'expression des gènes viraux et cellulaires. La capacité de Tax à manipuler la machinerie de l'iARN a été également mise en évidence par une autre étude montrant que Tax interagit avec l'enzyme de maturation des miARN, Drosha et induit sa dégradation par le protéasome (Van Duyne, Guendel et al., 2012). En effet, à travers une série d'expériences de transfection, Van Dueynes et ses collaborateurs démontrent que Tax interagit avec Drosha

dans le noyau et conduit subséquemment son ubiquitination et sa dégradation protéasomique. Ce mécanisme de suppression de Drosha réduit la capacité de maturation des pri-miARN en miARN matures, présentant ainsi un probable mécanisme de la diminution globale de la plupart des miARN observée lors de l'expression de Tax dans les cellules (Rahman, Quann et al., 2012).

II.2.2. Effet de la protéine virale Rex sur les miARN cellulaires

Récemment, il a été mis en évidence un rôle pour une autre protéine régulatrice d'HTLV-1 dans la dérégulation de la machinerie des miARN. En effet, Abe et ses collaborateurs ont mis en évidence que la protéine Rex avait une activité de suppresseur du « silencing » de l'ARN (RSS, RNA silencing suppressor activity) (Abe, Suzuki et al., 2010). Par une série d'expériences de transfection, les auteurs montrent que l'expression ectopique de Rex réduit le mécanisme d'interférence ARN induit par les Sh ARN *in vitro* soit directement ou indirectement en inhibant la production de siARN. La protéine Rex supprime directement l'activité enzymatique de Dicer. Ainsi Rex bloque la répression induite par le mécanisme d'interférence ARN par la subversion de la capacité de Dicer à maturer les précurseurs d'ARN db en siARN (Abe, Suzuki et al., 2010).

D'autres protéines virales avec une fonction RSS ont été décrites chez les virus de mammifères. Par exemple, tout comme Rex, la protéine Tat chez le VIH-1 interagit avec l'ARN et atténue la fonction de Dicer ou encore l'ARN VA1 chez l'adénovirus exerce son activité RSS en saturant l'Exportine-5 et Dicer (Lu and Cullen, 2004). Il a été suggéré que les RSS sont une stratégie développée par les virus de mammifères afin de contrer la défense antivirale induite par l'interférence ARN de la cellule hôte. Comme discuté précédemment, des études ont mis en évidence des miARN ciblant potentiellement les transcrits HTLV-1. De façon intéressante, 4 de ces miARN ciblant potentiellement les transcrits HTLV-1 (miR-432, miR-125a, miR-337 et miR-150) sont dérégulés dans le contexte d'une infection à HTLV-1, suggérant qu'il pourrait y avoir une sélection contre leur expression (Ruggero, Corradin et al., 2010). Ces prédictions pourraient fournir un raisonnement biologique expliquant la fonction de RSS (RNA Silencing Suppressor) de la protéine Rex qui permettrait de réprimer la restriction par les miARN (Abe, Suzuki et al., 2010).

II.3. miARN comme nouveaux marqueurs pronostics et diagnostics dans la pathogénèse de l'ATL

Comme discuté précédemment, en plus de leur rôle dans le développement tumoral, les miARN ont été démontrés comme étant des biomarqueurs diagnostics et pronostics de l'évolution de la pathogénèse. Dans le contexte de l'ATL, une étude a analysé les profils d'expression de 40 échantillons d'ATL et mis en évidence que les miRNomes permettent de discriminer les cellules ATL des cellules contrôles (Sato, 2012). A cela s'ajoute une seconde étude qui a examiné les profils d'expression des miARN de PBMC de 6 patients ATL caractérisées par différents signes cliniques (3 patients ATL aigues et 3 patients ATL chroniques et de 2 patients sains (non infectés)) (Ishihara, Sasaki et al., 2012). Les miRNomes obtenus permettent de clustériser les échantillons en fonction de l'évolution de la pathologie. De plus, le nombre de miARN sur-régulés est apparu significativement plus important chez les patients présentant une ATL aigüe que chez les patients ATL chroniques. D'un autre côté, ceux réprimés ont montré une corrélation inverse. Par ailleurs, les auteurs identifient 5 miARN (miR-155, let-7g, let-7b, miR-126 and miR-130a) qui se distinguent par leur fort différentiel d'expression et semblent être suffisant pour la classification des échantillons (Figure 27). Ils se sont ensuite intéressés plus particulièrement à 2 de ces miARN, miR-155 et miR-126, dont les niveaux d'expression montrent une association inverse avec le stade de la maladie. En effet, ils mettent en évidence que l'augmentation de miR-155 et la diminution de miR-126 est corrélée avec un mauvais pronostic, suggérant que miR-155 et miR-126 pourraient être de nouveaux biomarqueurs permettant d'évaluer la progression et le pronostic de la maladie (Ishihara, Sasaki et al., 2012).

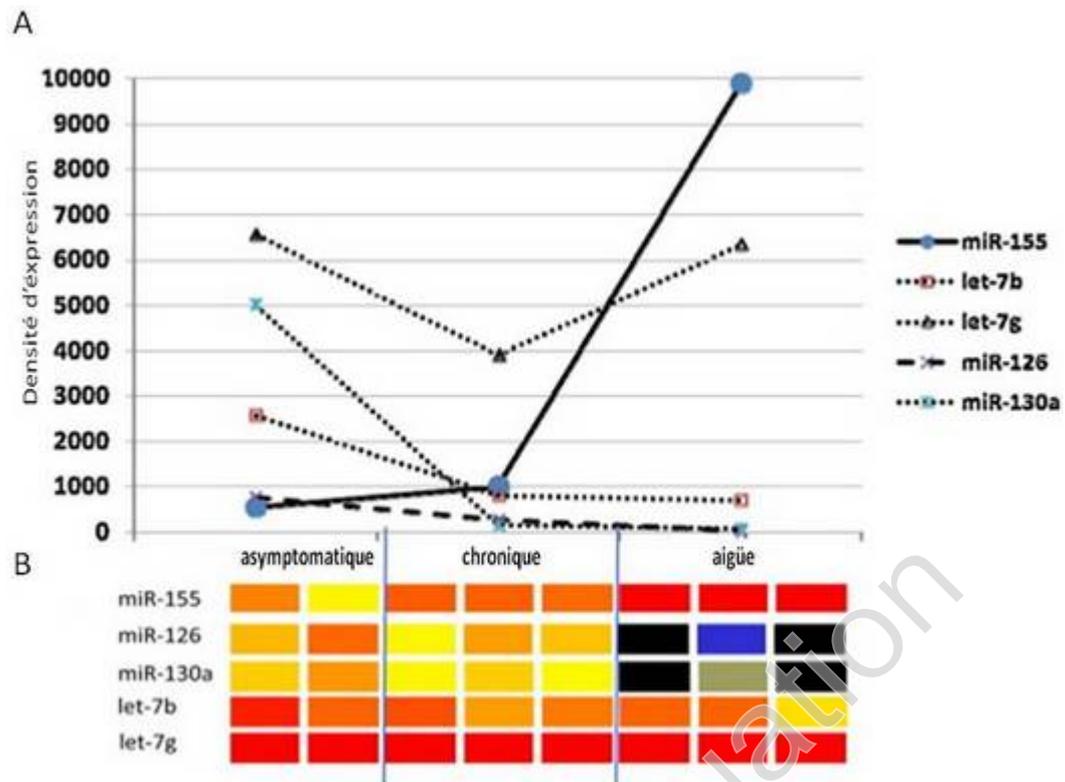


Figure 27 miARN identifiés comme des biomarqueurs de la progression de l'ATL. Cinq miARN cellulaires permettent de classer les stades de l'ATL selon leurs expressions relatives (b) et absolues (a) fluctuant avec la progression de la maladie d'ATL chronique à ATL aigüe (D'après Ishihara, Sasaki et al., 2012).

Partie 2

Résultats expérimentaux

PDF Pro Evaluation

I. Article I. Régulation de l'expression d'HBZ dans un clone malin ATL

Cette première partie de mon travail de thèse aborde le mécanisme de régulation de l'expression d'HBZ dans les cellules infectées par HTLV-1. Le développement de l'ATL chez les individus infectés par HTLV-1 est précédé par une longue période de latence de 40 à 60 ans (Tamiya, Matsuoka et al., 1996; Koiwa, Hamano-Usami et al., 2002; Takeda, Maeda et al., 2004; Taniguchi, Nosaka et al., 2005; Miyazaki, Yasunaga et al., 2007). De plus, seul 5% des porteurs HTLV-1 développent une ATL. Par conséquent, plusieurs événements dans les cellules infectées sont nécessaires pour le développement du phénotype tumoral. L'analyse des clones leucémiques chez les patients atteints d'une ATL montrent que dans la majorité des cas le LTR5' subit des modifications répressives telles que la délétion ou la méthylation (Gaudray, Gachon et al., 2002; Yoshida, Satou et al., 2008). Ce qui se traduit par l'élimination de l'expression de Tax et des autres protéines virales codées à partir du brin sens dans ces cellules. Ainsi, l'expression des protéines virales sens ne semble pas être nécessaire pour la prolifération des cellules leucémiques durant les stades tardives de la maladie. Néanmoins, les événements cellulaires qui causent la prolifération dérégulée des cellules leucémiques *in vivo*, n'ont pas encore été élucidés.

Le gène *hbz* est le seul gène d'HTLV-1 transcrit à partir du brin complémentaire du provirus. Il est, par conséquent, régulé par un promoteur indépendant dans le LTR3' (Fan, Ma et al., 2010). Contrairement au LTR5', aucune modification suppressive n'a été rapportée affectant le LTR3' durant la progression vers l'ATL (Gaudray, Gachon et al., 2002; Mesnard, Barbeau et al., 2006; Murata, Hayashibara et al., 2006; Satou, Yasunaga et al., 2006), et l'expression d'HBZ est constitutivement détectée dans les échantillons de patients ATL (Fan, Ma et al., 2010). L'analyse du séquençage du provirus HTLV-1 provenant de 60 patients ATL différent révèle que seule la séquence codante d'*hbz* est préservé, en dépit de nombreuses mutations non sens ou délétions observés dans les autres gènes régulateurs et accessoires d'HTLV-1 (Landry, Halin et al., 2009). Le paradoxe évident entre les propriétés oncogéniques de la protéine pléiotropique Tax et sa faible expression durant les étapes tardives de la pathogénèse liée aux mécanismes répressifs retrouvés dans les cellules pourrait donc être expliquée par HBZ. De par cet état de fait, il n'est pas étonnant qu'HBZ soit depuis sa découverte le sujet de recherches intensives. Néanmoins, la plupart des études précédentes se sont toutes focalisées sur la compréhension du rôle de la protéine HBZ dans la pathogénèse de l'ATL et peu est connu sur le ou les mécanisme(s) de régulation de ce gène viral.

I.1. Analyse de la transcription antisens dans un contexte de répression du LTR5'

Afin de comprendre comment *hbz* est régulé dans le contexte d'un provirus ATL c'est-à-dire en absence du LTR5', nous avons utilisé le système rapporteur luciférase K30-3'-asLuc décrit précédemment par Landry et al. (Clerc, Polakowski et al., 2008; Barbeau and Mesnard, 2011). L'intérêt de ce plasmide est que, premièrement, il est dérivé de l'ADN du clone proviral K30 d'HTLV-1, secondement, le 5'LTR est absent et pour finir, via le rempliment du second exon d'*hbz* par la séquence codante de la firefly luciférase, on peut réellement suivre l'expression d'*hbz*. (Figure 28).

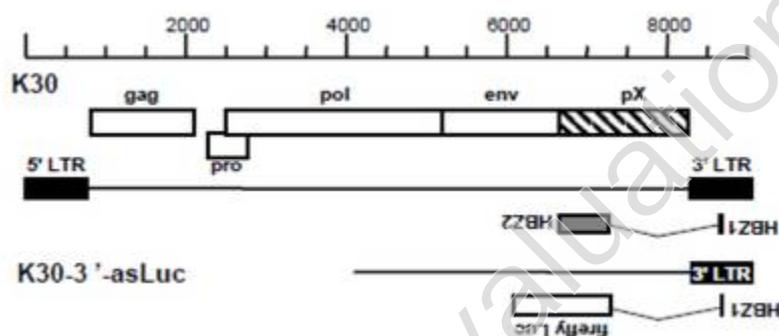


Figure 28 Diagramme schématique du plasmide rapporteur luciférase K30-3'-asLuc

Nous avons donc co-transfecté la lignée cellulaire humaine HEK293T avec ce système rapporteur et un vecteur d'expression d'HBZ portant un tag Myc à l'extrémité C-terminal (HBZ-Myc). L'analyse de l'expression de la luciférase montre un effet modéré d'HBZ sur la transcription de son propre promoteur dans les cellules cultivées en forte concentration de sérum (10% SVF) alors qu'une forte induction est observée en faible concentration de sérum (2% SVF) (Figure 29). Ces observations suggèrent qu'HBZ transactiverait son propre promoteur.

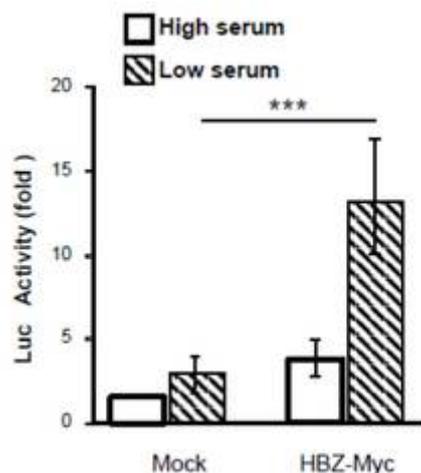


Figure 29 Effet de HBZ sur la transcription antisens. Les cellules HEK 293T ont été transfectées avec 0,1 μ g de vecteur rapporteur K30-3'-asLuc, 0,1 μ g d'actine- β Gal et 1 μ g de plasmide pcDNA-HBZ-Myc. 12h post-transfection, les cellules ont été cultivées en milieu 10% (histogramme blanc) ou 2% (histogramme hachuré) sérum.

Les valeurs luciférase obtenue ont été mesurés 48h après transfection et normalisées par les activités β -galactosidase obtenues. Les valeurs indiquées représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. Les différences observées lors de l'expression ou non d'HBZ dans les HEK 293T ont été considéré comme étant significative à $p < 0,01$ (**) et $p < 0,001$ (***).

Cependant jusqu'à maintenant aucune étude n'a rapporté une interaction directe entre HBZ et l'ADN. De plus, les études bibliographiques montrent que la modulation de l'expression génique par HBZ passe par ses interactions avec des facteurs transcriptionnelles cellulaires tels que les co-activateurs cellulaires, p300 et CBP, et certains facteurs de la famille bZIP. Afin de déterminer si l'activation de la transcription antisens par HBZ n'impliquerait pas l'un de ces interacteurs, nous avons examiné les effets transcriptionnels de différents mutants de liaisons d'HBZ sur la transcription antisens : HBZ-Myc LXXAA2 qui contient des mutations qui inhibent la liaison au facteur CBP/p300 et HBZ-Myc Δ ZIP qui a été délésté de ces leucines zipper et donc ne peut plus se lier aux facteurs de transcription bZIP (Shaywitz and Greenberg, 1999; Angel, Szabowski et al., 2001) (**Figure 30**).

Toujours par la même approche de système rapporteur de l'activité de la luciférase dans les HEK 293T, on observe que seul le mutant d'HBZ délésté du motif Zip (ligne 4 de l'histogramme **Figure 30**) n'active pas la transcription antisens. Ces résultats suggèrent qu'HBZ interagit avec des facteurs de transcription bZIP pour induire sa propre transcription. Nous nous sommes alors demandé lequel des facteurs bZIP connu à se lier avec HBZ seraient impliqués dans cette autorégulation d'HBZ.

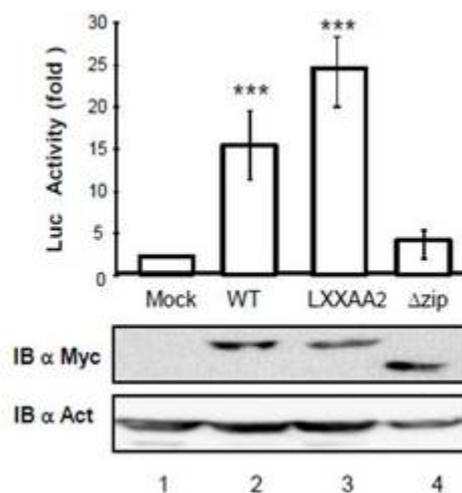


Figure 28 Rôle des partenaires d'HBZ dans l'activation de son propre promoteur. Les cellules HEK 293T ont été co-transfectées avec 0,1 μ g de plasmide rapporteur K30-3'-asLuc, 0,1 μ g d'actine- β Gal et 1 μ g soit de pcDNA-HBZ-Myc (WT), pcDNA-HBZ-LXXAA₂ ou pcDNA-HBZ- Δ ZIP puis cultivées durant 48h en milieu 2% sérum. Les activités de la luciférase obtenues ont été normalisées par les activités β -galactosidase mesurées. Le panel du bas montre l'analyse par Western Blot des niveaux d'expression d'HBZ wt et des différents mutants HBZ détectés en utilisant l'anticorps anti-Myc. L'actine été utilisé comme contrôle de charge. Les différences d'activités de la luciférase observées en fonction du mutant HBZ exprimé dans les HEK293T sont indiquées comme suit *** pour $p < 0.001$

I.2. Identification de la voie de signalisation requise pour l'activation de la transcription antisens par HBZ.

Parmi les facteurs bZIP, les facteurs de transcription ATF/CREB sont exprimés de façon ubiquitaires dans les cellules et de façon intéressante, ceux de la famille AP-1 sont régulés par l'état d'activation de la cellule (Hai and Curran, 1991; Wessner and Wigdahl, 1997). Ainsi, nous avons analysé si la transcription antisens induite par HBZ dans les cellules carencées en sérum n'impliquerait pas la formation d'un hétérodimère entre HBZ et un membre de la famille Jun. Pour cela, dans un premier temps, nous avons analysé par Western Blot les niveaux d'expression de JunB, c-Jun et JunD dans les cellules HEK 293T et dans les cellules CEM cultivées en faible ou forte concentration de sérum. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 32A et montrent que dans les deux lignées cellulaires testées, la déplétion en sérum diminue l'expression de c-Jun et, à contrario, stimule l'expression de JunD. A noter que l'expression endogène de JunB n'a pas été détectée dans aucune des deux lignées. Ensuite afin de comparer la capacité de chacun des facteurs Jun à activer la transcription, nous avons transfecté les HEK 293T avec un système rapporteur dans lequel le gène de la luciférase était sous contrôle d'un promoteur contenant des sites AP-1 (**Figure 31B**), ou du promoteur d'hbz

dans le plasmide K30-3'-asluc (**Figure 31C**), en faible concentration de sérum. La co-transfection de ces cellules avec les vecteurs exprimant c-Jun ou JunD indépendamment active le promoteur contenant des sites AP-1, néanmoins seule la co-transfection de JunD augmente l'activité transcriptionnelle du vecteur K30-asLuc. Au vue de l'ensemble des résultats, le facteur JunD se présente comme un bon candidat en raison de son expression en faible concentration de sérum et de son activité sur le promoteur d'*hbz*.

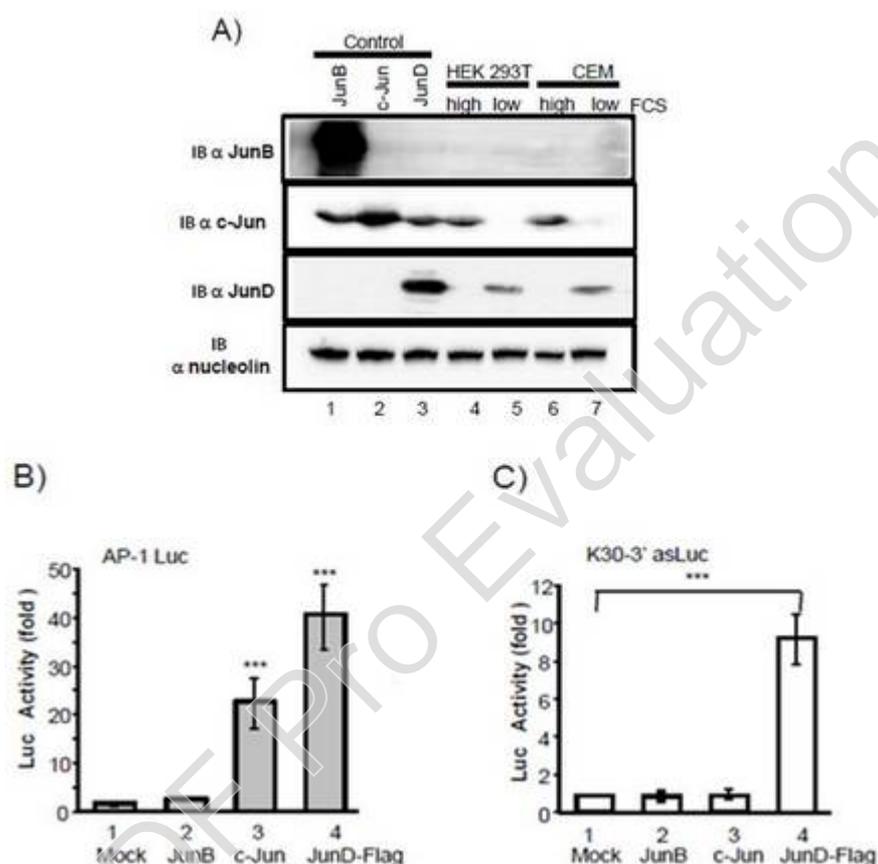


Figure 29 Effet des Jun sur l'activation transcriptionnelle du *LTR3'* (A) Analyse de l'expression des protéines Jun transfectées (lignes 1 à 3) ou endogènes (lignes 4 à 7) dans les HEK293T et les CEM cultivés en milieu 10% et 2% sérum. Après la lyse cellulaire, les extraits protéiques totaux ont été séparés sur gel SDS-PAGE. La nucléoline a été utilisée comme contrôle de charge. (B et C) Les HEK 293T ont été co-transfectées avec 0,1 μ g du système rapporteur contenant le gène de la luciférase qui est mis sous le contrôle du promoteur contenant des sites AP-1 (AP-1Luc) (B) ou du promoteur d'*HBZ* (K30-3'-Luc) (C) et 0,1 μ g d'actine- β Gal avec 2 μ g de pcDNA 3.1 JunB, cJun ou JunD. Après 48h de culture en milieu 2% sérum, la luciférase a été mesurée et normalisée avec les activités de β Galactosidase mesurées. Les valeurs indiquées représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

Nous avons donc évalué si JunD et HBZ coopèrent pour la transactivation du promoteur d'*hbz*. Pour se faire, nous avons co-transfecté le vecteur rapporteur K30-3'-asLuc avec les vecteurs d'expression d'HBZ-Myc JunD-Flag dans les HEK 293 T et dans les CEM.

On observe que la co-expression des 2 protéines induit une activité 3 fois plus importante de la luciférase par rapport à leur expression seule dans nos différentes lignées transfectées transitoirement (**Figure 32**).

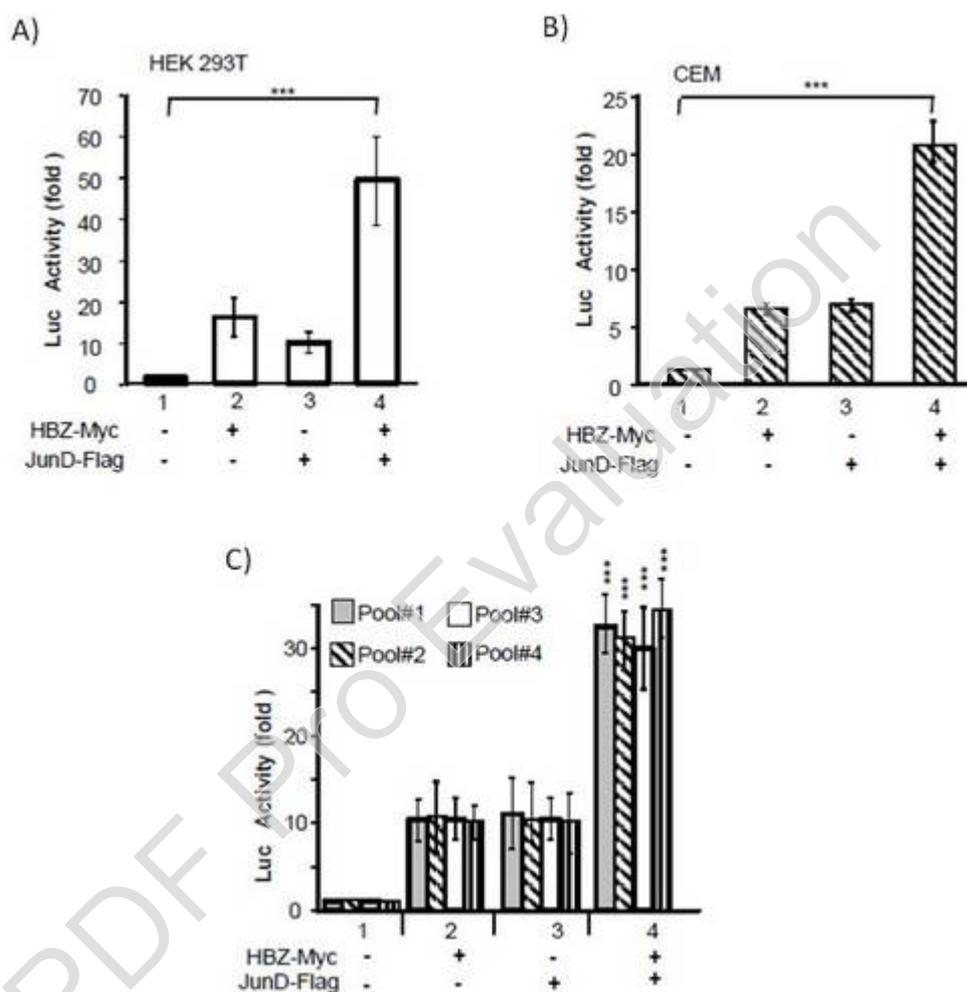


Figure 30 Effet de JunD et HBZ sur la transcription antisens. Les cellules HEK 293T (A) et CEM (B) ont été transfectées avec 0,1 μ g de vecteur rapporteur K30-3'-asLuc, 0,1 μ g d'actine- β Gal et 2 μ g de vecteur vide pcDNA 3.1 (ligne 1), de pcDNA-HBZ-Myc (ligne 2 et 4) ou de pCMV-JunD-Flag (ligne 3 et 4). Après 48h de culture en milieu 2% sérum, l'activité de la luciférase est mesurée puis normalisée par les activités β -galactosidase mesurées. (C) Les HEK 293T ont été co-transfectées avec 10 μ g de la construction rapporteur K30-3'-asLuc et 1 μ g du vecteur pcDNA3.1-Hygromycine. Après 48h les cellules ont été sélectionnées dans un milieu contenant 100 μ g/ml d'Hygromycine. Puis 4 populations de HEK293T K30-3'-asLuc stables ont été co-transfectées avec 0.1 μ g d'actine- β Ga et 2 μ g de chacun des vecteurs suivants selon le tableau : le vecteur vide pcDNA3.1 pcDNA-HBZ-Myc et pCMV JunD-Flag. L'activité luciférase à été mesurée 48h post-transfection puis normalisée avec les valeurs d'activités de la β -Gal relevées. Toutes les valeurs présentées sont la moyenne de trois expériences indépendantes.

Cependant, il faut prendre en compte, que dans ces expériences de transfections transitoires, l'environnement chromatinien du K30-3'-asLuc ne reflètent pas forcément celui dans lequel se trouve le provirus HTLV-1 dans la cellule leucémique. Afin de se rapprocher le plus possible des conditions physiologiques, nous avons établie des pools de cellules HEK 293T ayant intégrées de façon stable des copies de notre construction K30-3'-asLuc. Nous observons que dans ce nouveau contexte cellulaire, la co-expression d'HBZ-Myc et JunD-Flag est associée avec une augmentation trois fois plus importante de l'expression relative de la luciférase que celle obtenue avec les protéines seules (**Figure 32**). Les résultats obtenus suggèrent un effet coopératif entre HBZ et JunD pour promouvoir la transcription antisens à partir du LTR3' d'HTLV-1.

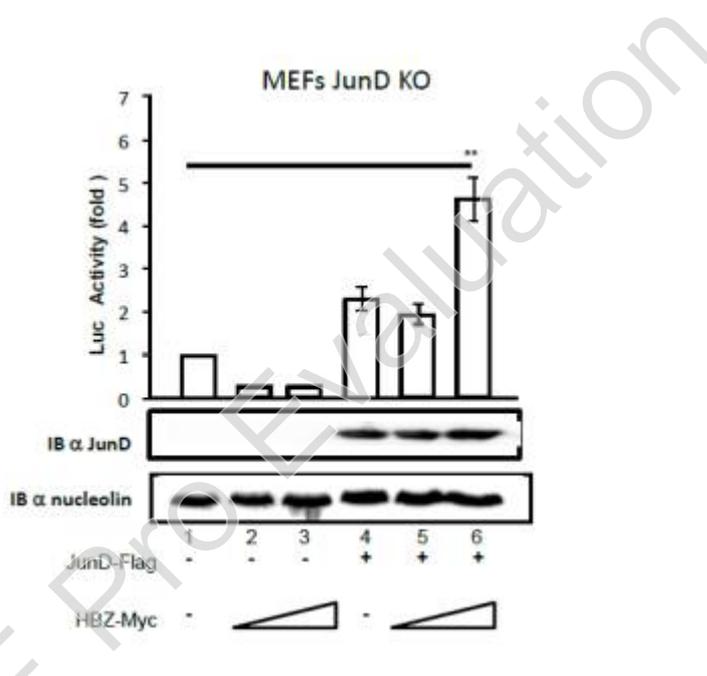


Figure 31 Rôle de JunD dans l'activation de son propre promoteur par HBZ. Les MEF JunD KO ont été co transfectées avec 0,1 μ g du vecteur rapporteur K30-3'-asLuc, 0,1 μ g d'actine- β Gal et 2 μ g de vecteur vide pcDNA3.1 (ligne 1), 1 et 3 μ g de pcDNA HBZ-Myc et 1 μ g de pCMV JunD-Flag selon le tableau. Après 48h de culture en milieu 2% sérum, l'activité luciférase est mesurée puis normalisée par l'activité de la β Gal. Le panel du bas montre l'analyse par Western de l'expression de JunD et de la nucléonine (contrôle de charge). Les valeurs présentées sont la moyenne de trois expériences indépendantes et les différences statistiques obtenues lors de la comparaison des MEF KO JunD transfectées ou non avec la protéine JunD sont représentées comme suit ** $p < 0.01$.

Pour confirmer ces résultats et évaluer la contribution de l'expression endogène de JunD dans l'activité d'HBZ, la transcription de notre système rapporteur K30-3'-asLuc a été analysée dans des fibroblastes embryonnaires de souris déficientes pour la protéine JunD (MEF JunD KO) (**Figure 33**).

Dans ces cellules, l'induction de l'expression d'HBZ-Myc n'active pas la transcription antisens du K30-3'-asLuc (**Figure 33 lignes 2 et 3**). Cependant, lorsque l'on restaure l'expression de JunD (par un vecteur d'expression JunD-Flag), parallèlement on stimule la transcription antisens et cet effet est accru par l'expression d'HBZ comme le montre l'activité de la luciférase (**Figure 33, lignes 4 à 6**). Pour étendre cette analyse, nous avons procédé à l'extinction de l'expression endogène de JunD dans les cellules HEK 293T, par la méthode d'ARN interférence. Pour cela, nous avons co-transfecté ces cellules avec le K30-3'-asLuc, le vecteur HBZ-Myc et deux shARN distincts dirigés spécifiquement contre l'ARN de JunD ou un shARN contrôle ne reconnaissant aucun gène de mammifères.

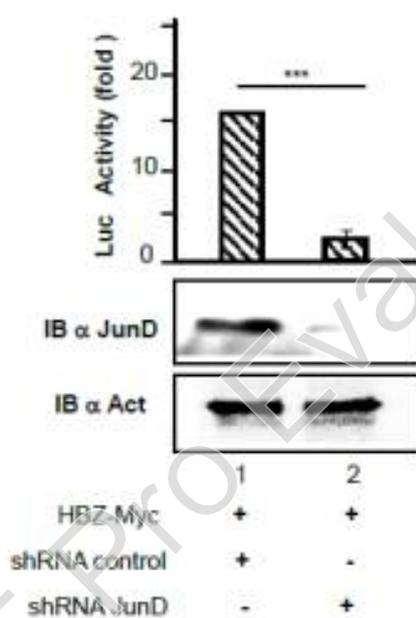


Figure 32 Rôle de JunD dans l'activation de son propre promoteur par HBZ. Les HEK 293T ont été co-transfectées avec 0,1 μ g de vecteur rapporteur K30-3'-asLuc, 0,1 μ g d'actine- β Gal, 2 μ g de pcDNA HBZ-Myc et soit 2 μ g de Sh ARN p-GFP-V-RS (contrôle) (ligne 1) ou 2 μ g Sh ARN JunD humain p-GFP-V-RS (ligne 2). 48 h après transfection les cellules, à partir de quantités équivalentes d'extraits cellulaires on a analysé l'activité de la luciférase (panel du haut) ainsi que les niveaux d'expression protéiques par Western Blot (panel du bas) en utilisant un anticorps anti-JunD et anti-actine comme contrôle de charge. Les valeurs présentées sont la moyenne de trois expériences indépendantes. Les différences obtenues lors de la comparaison des cellules transfectées ou non avec le shARN JunD humain sont présentées comme suit *** $p < 0.001$.

La quantification de l'expression de la luciférase montrent, comme attendu, que l'inhibition de l'expression de JunD provoque une diminution importante de l'ordre de 5 fois de l'activation de la transcription antisens induite par HBZ (**Figure 34, ligne 2**) comparée aux cellules contenant le ShARN contrôle (**Figure 34, ligne 1**). L'ensemble de ces expériences

rapporteurs de l'activité de la luciférase indique que la l'induction de la transcription antisens par HBZ est dépendante de JunD.

Ce rôle de JunD, mis en évidence par nos résultats, suggère que l'activation de la transcription antisens par HBZ se fait via la voie de signalisation AP-1. Des séquences homologues aux sites consensus de fixation des AP-1 se trouvent dans les séquences centrales des éléments de réponse à Tax (TxRE) qui sont localisés dans la région U3 des LTR d'HTLV-1 (**Figure 35A**). Les séquences TxRE sont des éléments de 21 paires de bases très conservés qui sont essentiels pour la transcription induite par Tax, et en plus de leur ressemblance aux sites de fixation AP-1, le centre des séquences TxRE présente des homologies avec la séquence consensus reconnue par ATF/CREB (**Figure 35A**) (Yoshida, Satou et al., 2008). Afin de tester si l'activation du promoteur d'hbz par JunD et HBZ implique la liaison à ces séquences, nous avons co-transfecté les HEK 293T avec les vecteurs d'expression HBZ-Myc et/ou JunD-Flag et notre système rapporteur K30-3'-asLuc soit sauvage (K30-3'-asLuc), soit avec le LTR3' muté dans la séquence centrale de chaque TxRE (K30-3'-asLuc 21PMD) (**Figure 35B**).

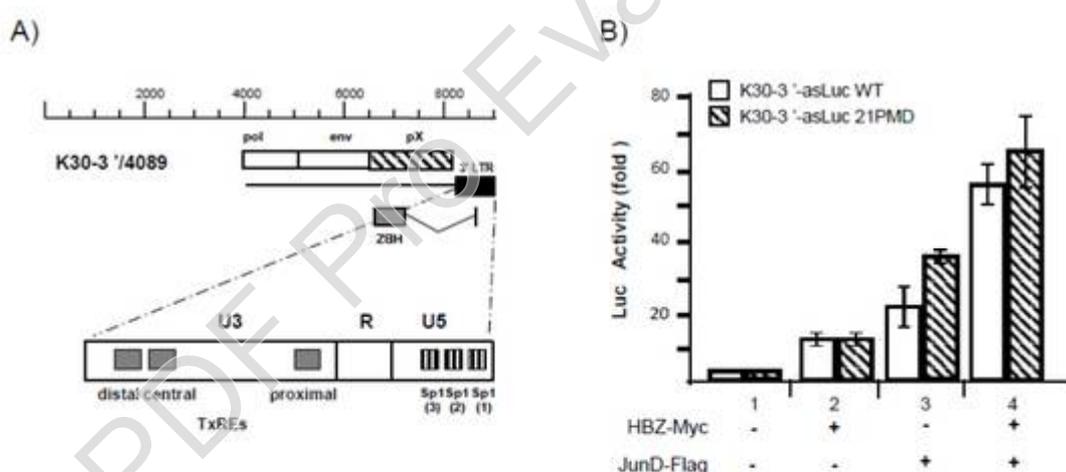


Figure 33 Rôle des sites TxRE dans l'activation de la transcription sens par JunD et HBZ. (A) Diagramme schématique de la construction de l'ADN proviral K30-3'/4089. Les sites de liaison SP1 (boîtes hachurées) et les éléments TxRE (boîtes grises) dans le LTR3' d'HTLV-1 sont indiqués. (B) Les cellules HEK 293T ont été co-transfectées avec 0,1µg de chaque système rapporteur contenant le gène de la luciférase qui est mis sous le contrôle du promoteur d'HBZ sauvage (K30-3'-asLuc, histogrammes blancs) ou muté pour ses séquences TxRE (K30-3'-asLuc 21PMD, histogrammes hachurés) et 0,1µg d'actine-β Gal en plus de 2µg de pcDNA3.1 (ligne 1), 2µg de pcDNA3.1 HBZ-Myc (ligne 2 et 4), ou 2µg pCMV JunD-Flag (ligne 3 et 4). Ces cellules ainsi transfectées ont été cultivées en milieu 2% sérum. L'activité luciférase a été mesurée 48h post-transfection et normalisée par l'activité mesurée de la β Gal. Les valeurs présentées sont la moyenne de trois expériences indépendantes.

L'analyse de l'activité de la luciférase montre que l'activation du LTR3' induite par HBZ et JunD n'est pas affectée par la mutation de ces sites TxRE (Figure 8B, ligne 4 histogramme hachuré) puisque l'on retrouve des niveaux de transcription antisens comparables à ceux du promoteur wt (Figure 35B, ligne 4 histogramme blanc). Ceci suggère que l'activation du promoteur induit par JunD se fait, probablement, via des éléments en cis autres que les séquences TxREs.

Une étude réalisée par Yoshida et ses collaborateurs, a démontré que la transcription antisens basale du LTR 3' d'HTLV-1 est contrôlée par 3 sites Sp1 localisés dans la région U5 (Figure 35A) (Li, He et al., 2004; Deniaud, Baguet et al., 2009). Afin d'étudier cette piste, nous avons évalué l'existence ou non d'une interaction entre les hétérodimères JunD/HBZ et la région U5 du LTR 3' d'HTLV-1 en réalisant des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (CHIP) sur des extraits nucléaires de nos cellules HEK293T exprimant de façon stable le vecteur K30-3'-asLuc co-transfectées avec JunD-Flag et HBZ-Myc (Figure 36).

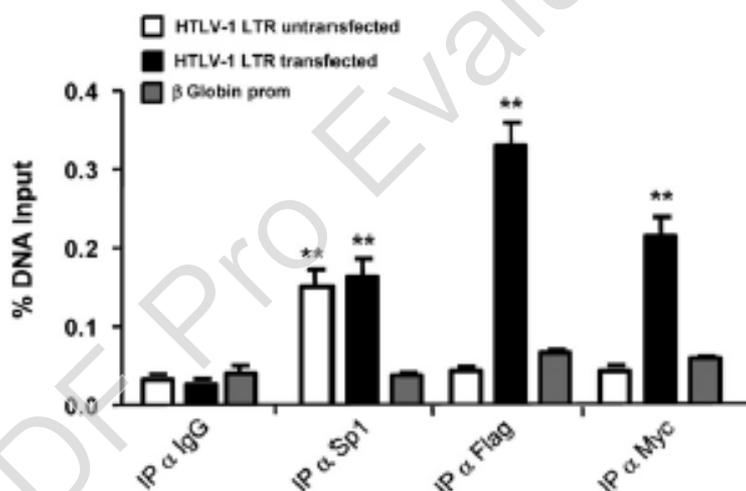


Figure 34 Analyse de l'interaction éventuelle des hétérodimères JunD/HBZ sur la région U5 du LTR3'. Les HEK293T K30-3'-asLuc ont été transfectées (HTLV-1 LTR transfected) ou non (HTLV-1 LTR untransfected) avec 2 μ g de pCMV JunD-Flag et 2 μ g de pcDNA HBZ-Myc. 48h après transfection, les cellules ont été fixées puis l'ADN récupéré et fractionné. Les complexes ADN-Protéines ont été immunoprécipités avec les anticorps anti-Flag (JunD), anti-Myc (HBZ), anti-SP1 et anti-IgG (anticorps contrôle non spécifique). Les fractions d'ADN précipitées ont été purifiées puis analysées par PCR quantitative. L'axe des y indique le pourcentage de signal précipité par rapport à un input de 100%. Les valeurs indiquées représentent la moyenne de trois expériences indépendantes et ont été normalisées par rapport aux contrôles IgG avec les courbes standards de chaque paire de primers. Les différences sont représentées comme suit **p<0,01.

L'immunoprécipitation avec des anticorps anti-sp1, anti-Flag et anti-Myc montre une occupation du LTR 3' par les protéines Sp1, JunD-Flag et HBZ-Myc. A l'inverse, ces protéines n'immunoprécipitent avec le promoteur de la β -globuline ce qui confirme la spécificité de l'interaction avec le LTR 3'. La quantification par RT-PCR révèle que les niveaux d'occupation de Sp1 sur le LTR3' d'HTLV-1 reste constant dans les cellules co-exprimant JunD et HBZ comparé aux cellules contrôles. Ces résultats confortent notre piste d'étude pour décrypter la voie de signalisation mise en jeu dans cette activation antisens, et nous amène à nous intéresser au facteur de transcription Sp1.

Sp1 est un facteur de transcription ubiquitaire qui régule la transcription d'un grand nombre de gènes en recrutant et en formant des complexes avec de nombreux facteurs associés à la transcription (Song, Ugai et al., 2001). Le domaine de liaison à l'ADN de Sp1 consiste en 3 motifs an doigts de Zinc (Zn) dont les motifs 2 et 3 sont essentiels pour l'activité de liaison à l'ADN (Kardassis, Papakosta et al., 1999; Wu, Zhang et al., 2003; Kuhlmann, Villaudy et al., 2007). De plus, de nombreux articles montrent une interaction entre les membres de la famille Jun, incluant JunD, avec Sp1 (Yoshida, Satou et al., 2008). Il est donc probable que la liaison de Sp1 au LTR3' agirait donc, comme un site d'ancrage pour les hétérodimères HBZ/JunD sur le LTR3'. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé un plasmide rapporteur pGL4 -3' LTR qui contient la région R et U5 du LTR3' en orientation antisens conduisant l'expression du gène de la luciférase (Song, Ugai et al., 2001). Ce plasmide portant les sites de liaisons Sp1 wt (PGL4-3'LTR wt) ou avec différentes combinaisons de mutations de ces sites (PGL4-3'LTR sp1 mut), à été co-transfecté dans les HEK293T avec les vecteurs d'expression HBZ-Myc et JunD-Flag (**Figure 37**). De façon intéressante, on observe que la mutation du site proximal Sp1 (Sp1 (3) mut; voir **Figure 37**) à un impact significatif sur l'expression de la luciférase qui diminue d'un facteur 7 alors que la mutation simultanée des 2 autres sites n'affecte pas l'activation transcriptionnelle HBZ/JunD.

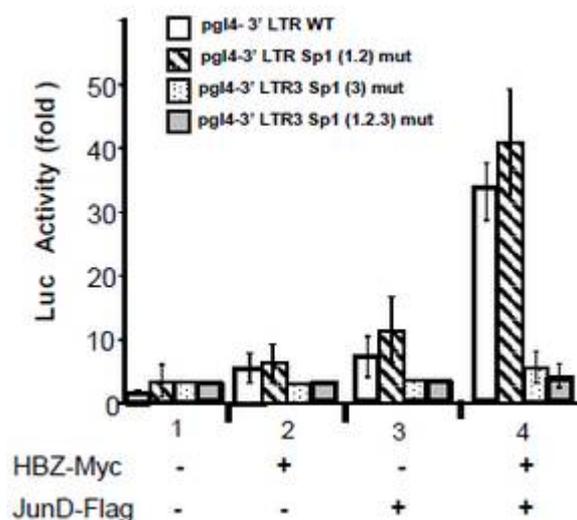


Figure 35 Rôle des sites sp1 dans l'activation de la transcription antisens par HBZ et JunD. Les HEK 293T ont été co-transfectées avec 2 μ g de la construction rapporteur contenant le gène de la luciférase qui est mis sous le contrôle du promoteur antisens sauvage (PGL4-3'LTRWT) ou du promoteur avec les mutations indiquées des sites Sp1 (PGL43'LTR Sp1 mut) et 0,1 μ g d'actin- β Gal, et 2 μ g de pcDNA3.1 (ligne 1), 2 μ g de pcDNA HBZ-Myc (ligne 2 et 4) et 2 μ g de pCMV JunD-Flag (ligne 3 et 4). La quantité totale d'ADN transfecté dans chacune des conditions a été maintenue constante par l'addition d'un plasmide vide pcDNA 3.1. Les valeurs luciférase obtenues 48h après transfection ont été normalisées par les activités β -galactosidase mesurées. Les valeurs indiquées représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

Afin de préciser le rôle du facteur Sp1 dans l'activation de la transcription antisens par HBZ et JunD, nous avons ensuite utilisé le mutant dominant négatif (DN) Sp1^{zn2,3} dont les motifs essentiels pour la liaison à l'ADN ont été mutés (Cavanagh, Landry et al., 2006). Les cellules HEK 293T ont été co-transfectées avec le rapporteur K30-3'asLuc, les vecteurs d'expression d'HBZ (HBZ-Myc), JunD (JunD-Flag) et le facteur Sp1 WT ou DN (**Figure 38A**). Les résultats obtenus montrent la perte de l'activation par HBZ/JunD du LTR3' lorsque Sp1 n'est plus capable d'interagir avec l'ADN (**Figure 38A, ligne 4**). Par la suite, nous avons voulu vérifier l'expression de la protéine HBZ toujours dans des expériences de co-transfection. Pour cela, nous avons réalisé la même expérience de co-transfection en utilisant cette fois la construction K30-3'-4089 dérivé du clone proviral K30 d'HTLV-1. Cette construction est présentée sur la figure 8 et comme on peut le voir elle est dépourvue de la partie 5' du provirus, mais le signal de poly-adénylation d'HBZ y est néanmoins présent (Cavanagh, Landry et al., 2006). Similairement à nos résultats précédents, nous détectons l'expression d'HBZ par Western Blot dans les cellules HEK co-transfectées avec la construction K30-3'/4089 et JunD-Flag (**Figure 38B, ligne 5**). Cependant, HBZ n'est plus détecté lors de la surexpression de Sp1^{zn2, 3} (**Figure 38B, ligne 6**). Ces observations

soutiennent un rôle essentiel de sp1 dans l'activation de la transcription antisens de HTLV-1 par HBZ et JunD.

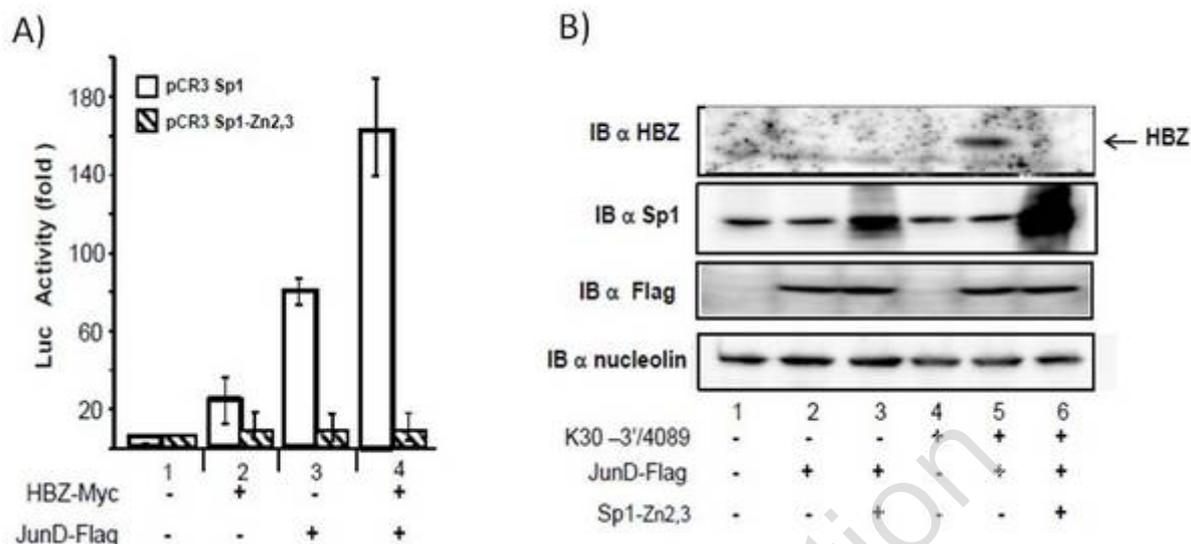


Figure 36 Effet de la protéine Sp1 sur la transcription antisens induite par HBZ et JunD. (A) Les HEK 293T ont été co-transfectées avec 0,1 μ g de la construction rapporteur K30-3'-asLuc, 0,1 μ g d'actin- β Gal, et 0,1 μ g de pCR3 Sp1wt (histogrammes blancs) ou 0,1 μ g de pCR3 Sp1^{zn2,3} (histogrammes hachurés) et 2 μ g de pcDNA3.1 contrôle (ligne 1), 2 μ g de pcDNA HBZ-Myc (lignes 2 et 4) et 2 μ g de pCMV JunD-Flag (lignes 3 et 4). Après 48h de culture en milieu 2% sérum, les valeurs luciférase ont été mesurées et normalisées par les activités β -galactosidase mesurées. Les valeurs indiquées représentent la moyenne de trois expériences indépendantes. (B) Analyse en Western blot de l'expression des protéines Sp1, JunD et HBZ dans cellules HEK 293T co transfectées avec 1 μ g de pcDNA3.1 contrôle (lignes 1 et 3), 1 μ g de la construction rapporteur K30-3'/4089 (lignes 4 et 6), 1 μ g de pCMV JunD-Flag (lignes 2, 3 et 5, 6) et 1 μ g de pCR3 Sp1^{zn2,3} (lignes 3 et 6). Après la lyse cellulaire, les extraits protéiques totaux ont été séparés sur gel SDS-PAGE. La nucléoline a été utilisée comme contrôle de charge.

I.3. Effet de l'expression d'HBZ sur la prolifération et la transformation cellulaire dans le contexte d'un provirus délété du LTR 5'

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact de l'expression d' *hbz* sur la prolifération des cellules immortalisées. Pour analyser cet aspect, nous avons utilisé la lignée cellulaire NIH 3T3, une lignée de fibroblastes murins immortalisés mais non transformés qui présentent une forte inhibition de contacts, dans laquelle nous avons transfecté de façon stable le clone proviral K30-3'/4089 (Risser and Pollack, 1974). Afin de valider notre modèle d'étude, nous avons vérifié l'expression d'HBZ par Western Blot (**Figure 39A**) et de façon intéressante nous avons observé que l'induction de l'expression d'HBZ dans ces cellules est

associée avec une augmentation de l'expression de JunD (**Figure 39A, ligne 2**) comparé aux cellules contrôle n'exprimant que le vecteur de résistance à l'hygromycine (**Figure 39A, ligne 1**), alors que le niveau d'expression de la protéine Sp1 est relativement comparable entre les deux populations (**Figure 39A, lignes 1 et 2**).

Après ensemencement des cellules à faible densité, nous les avons cultivées dans un milieu pauvre en sérum (2%) pendant 5 jours durant lesquels leur taux de prolifération a été mesuré quotidiennement. Parallèlement, nous avons également mesurée la prolifération des 2 populations cellulaires (exprimant HBZ et contrôle) dans lesquelles nous avons inhibé l'expression de JunD par des shARN spécifiques (**Figure 39B**). Nous avons confirmé les données obtenus avec notre modèle cellulaire en renouvelant les mêmes expériences mais cette fois avec trois lignées cellulaires infectées par HTLV-1 (Hut102, C81-66, and ATL-2) (**Figure 39C**).

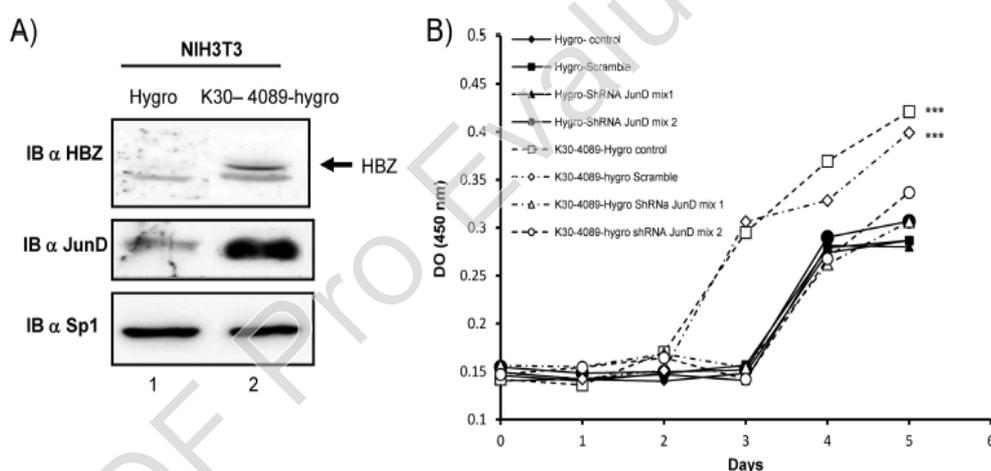


Figure 37 Effet d'HBZ sur la prolifération des fibroblastes immortalisés NIH3T3. (A) Analyse de l'expression d'HBZ et JunD par Western Blot dans les extraits nucléaires des NIH3T3 transfectés de façon stable avec le vecteur pcDNA3.1-Hygromycine seul (ligne1) ou en combinaison avec le vecteur K30-3'/4089 à un ratio 10 :1 (ligne2). (B) Les populations NIH3T3 -hygro (contrôle) et K30-3'/4089 ont été transfectées avec 2µg de p-RS shARN contre JunD murin , 2µg de p-RS vide, ou 2µg de p-RS-non spécifique puis cultivées en milieu 2% sérum supplémenté avec les antibiotiques de sélection (hygromycine et puromycine). La prolifération a été mesurée en utilisant le test colorimétrique CCK8 (Dojindo) quotidiennement durant 4 jours. Les différences obtenues lors de la comparaison des cellules exprimant HBZ des cellules contrôles lors de l'inhibition de JunD ont été analysées par le test de variance ANOVA et représentées comme suit *** $p < 0,0001$. (C) Les lignées infectées par HTLV-1, Hut-102, C81-66 et ATL-2 ont été transfectées avec 2µg de p-RS shARN contre JunD, 2µg de p-RS vide, ou 2µg de p-RS-non spécifique puis cultivées en milieu 1% sérum avec l'antibiotique de sélection puromycine. 48 h post-sélection, la prolifération cellulaire est mesurée par l'intermédiaire du test colorimétrique CCK8.

L'ensemble des résultats durant cette étude montre que l'expression d'HBZ induit une augmentation de la croissance cellulaire en absence de sérum par rapport aux cellules contrôles et que l'inhibition de JunD dans ces cellules annule cet effet d'HBZ (**Figure 39B et C**). Par conséquent, il apparaît que l'expression d'HBZ supporte certains aspects de l'activité transformante définis dans un système de fibroblastes immortalisés (Risser and Pollack, 1974).

L'indépendance vis-à-vis de l'ancrage au substrat lors de la croissance est un autre événement qui définit l'activité de transformation cellulaire. Dans le système cellulaire NIH3T3 cette perte de dépendance vis-à-vis de l'ancrage au substrat est associée à la perte d'inhibition de contacts cellulaires lors de la prolifération (Landry, Halin et al., 2009). Nous avons donc testé si l'expression de HBZ induit également une croissance des fibroblastes NIH3T3 indépendamment de l'ancrage au substrat. Dans cette optique, les cellules NIH3T3 exprimant le vecteur K30-3'/4089 ont été cultivées en soft agar puis nous avons analysé leur capacité à former des colonies dans ce milieu semi-solide (**Figure 40**). 21 jours après leur mise en culture, nous avons quantifié plusieurs foci qui se sont formés dans ces cellules comparées aux cellules contenant uniquement le vecteur de résistance à l'hygromycine, qui n'en avait formé aucun.

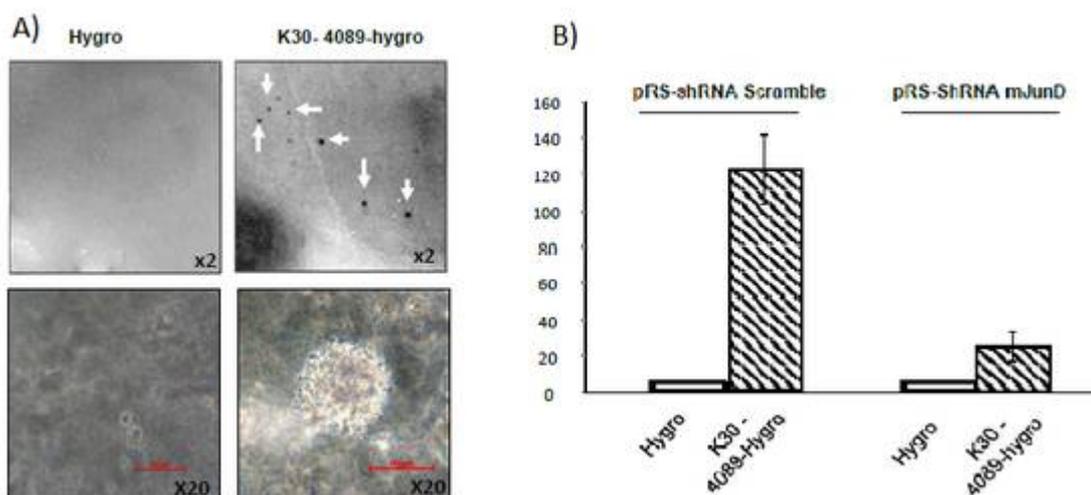


Figure 38 Effet d'HBZ sur l'ancrage cellulaire au substrat. Les populations NIH3T3 –hygro (contrôle) et K30-3'/4089 ont été transfectées avec 2 μ g de p-RS shARN contre JunD, 2 μ g de p-RS vide, ou 2 μ g de p-RS-non spécifique puis cultivé en milieu 2% sérum supplémenté avec les antibiotiques de sélection (hygromycine et puromycine). (A) La capacité de croissance des NIH3T3-hygro et K30-3'/4089 indépendamment de l'ancrage a été testée par culture des cellules en soft agar. Après 21 jours de cultures, les colonies formées ont été colorées au cristal violet 0.05% puis comptées. (B) Ce graphe résume les données obtenues pour le test de soft agar dans les NIH3T3-hygro et K30-3'/4089 transfectés avec p-RS-non spécifique (shARN scramble) ou p-RS shARN JunD murin comme indiqué. Les valeurs indiquées représentent la moyenne de trois expériences indépendantes et les différences statistiques obtenues lors de la comparaison des deux lignées sont représentés comme suit *** $p < 0,001$.

I.4. Conclusion & Discussion

Les études conduites depuis plus de 30 ans sur HTLV-1 ont permis de définir les fonctions de la plupart des protéines virales notamment celles des protéines clés de l'oncogénicité d'HTLV-1, Tax et HBZ. Malgré tout, beaucoup de zones d'ombres subsistent autour d' HBZ, la seule protéine virale encore exprimée dans les cellules de patients leucémiques, et des mécanismes qui lui sont associées participant à la mise en place des pathologies associées à HTLV-1.

Lors de l'infection des cellules T CD4⁺ naïves par HTLV-1, l'expression de la protéine virale Tax active, dans la cellule, la transcription virale et stimule la prolifération en déclenchant des changements dans un panel de transduction de voies de signalisation intracellulaire et dérégulant ainsi l'expression génique. Ceci démontre son rôle crucial durant les étapes d'infection et de prolifération polyclonales de la pathogénèse de l'ATL. Il a également été mis en évidence un rôle de Tax dans la régulation de l'expression d'HBZ. En

effet Tax favorise l'expression d'HBZ en stimulant la transcription antisens via les séquences TRE localisées dans le LTR 3' (Clerc, Polakowski et al., 2008). Paradoxalement, il a été montré qu'HBZ inhibe l'expression de Tax et des autres protéines virales, entre autre via la répression de la transcription virale à partir du LTR5' en dissociant le facteur de transcription CREB des sites TRE et en inhibant la liaison entre Tax et les cofacteurs transcriptionnels CBP/p300 (Tamiya, Matsuoka et al., 1996; Takeda, Maeda et al., 2004). Ce qui suggère une boucle de rétrocontrôle négative qui permet de prévenir l'expression exagérée de Tax et ainsi son effet immunogène. Un tel mécanisme pourrait aider la cellule T infectée à échapper à une forte et défavorable réponse immune anti-Tax induite par le système immunitaire de l'hôte. A noter que Tax et HBZ présentent des cinétiques d'expressions différentes au cours du processus de leucémogénèse. En effet, alors que *hbz* est constamment exprimé, l'expression de *tax* est fréquemment supprimée par des altérations génétiques et épigénétiques dans le promoteur viral dans le LTR5' ou la séquence codante de Tax (Tamiya, Matsuoka et al., 1996; Miyazaki, Yasunaga et al., 2007; Sato, Oka et al., 2010). L'émergence de provirus avec un LTR5' déficient (délétion ou hyperméthylation) est associée avec la progression de la pathogénèse et est considéré comme une des caractéristiques de la progression vers la latence clinique et l'ATL (Yoshida, Satou et al., 2008). Par conséquent, l'influence de Tax sur la transcription d'HBZ est certainement limitée dans les cellules ATL. Ainsi le processus de régulation d'HBZ mis en jeu lors d'une infection par HTLV-1 et surtout dans les cellules ATL en absence de toutes autres protéines virales et son rôle dans la pathogénèse de l'ATL a suscité notre intérêt particulier.

En utilisant un provirus avec une délétion du LTR5', nos tests rapporteurs où le gène de la luciférase a été cloné à la place du gène d'*hbz* indiquent que la protéine HBZ module sa propre expression. HBZ ne pouvant se lier de façon efficace à l'ADN, nous avons suggéré qu'un autre facteur de transcription était requis pour son recrutement sur son promoteur dans le LTR3'. Parmi les facteurs de transcription connus à se lier à HBZ, nous montrons que cette activation de la transcription antisens par HBZ est dépendante de la protéine JunD. En effet, l'inhibition de JunD dans nos expériences de luciférase abolit l'effet d'HBZ sur son promoteur alors que sa co-expression est associée avec un effet accru sur la transcription antisens induite par HBZ. Dans notre étude, nous mettons donc en évidence une boucle de rétrocontrôle positive par laquelle HBZ en coopération avec JunD régule positivement sa propre transcription dans les cellules. Une étude publiée par le groupe de Matsuoka a caractérisé la région promotrice d'*hbz* (Kuhlmann, Villaudy et al., 2007). Ils ont montré que

ce promoteur est dépourvu de boîte TATA mais contient de nombreux sites d'initiation de transcription dont les sites Sp1 qui sont essentiels pour son activité. Les auteurs rapportent donc qu'à l'inverse du LTR5' qui est fortement inductible, le promoteur d'*hbz* est activé par le facteur de transcription constitutivement exprimé Sp1. Nos travaux viennent corroborer ce résultat et montrent un rôle essentiel de Sp1 dans l'activation de la transcription antisens de HTLV-1 par HBZ et JunD.

Nous suggérons donc un modèle selon lequel, dans les cellules infectées par HTLV-1, HBZ induit l'expression de JunD, ce qui permet l'association de JunD et HBZ avec des facteurs cellulaire Sp1 entraînant la liaison de ce complexe au promoteur antisens dans le LTR3' et ainsi l'activation de la transcription d' *hbz* (**Figure 41**).

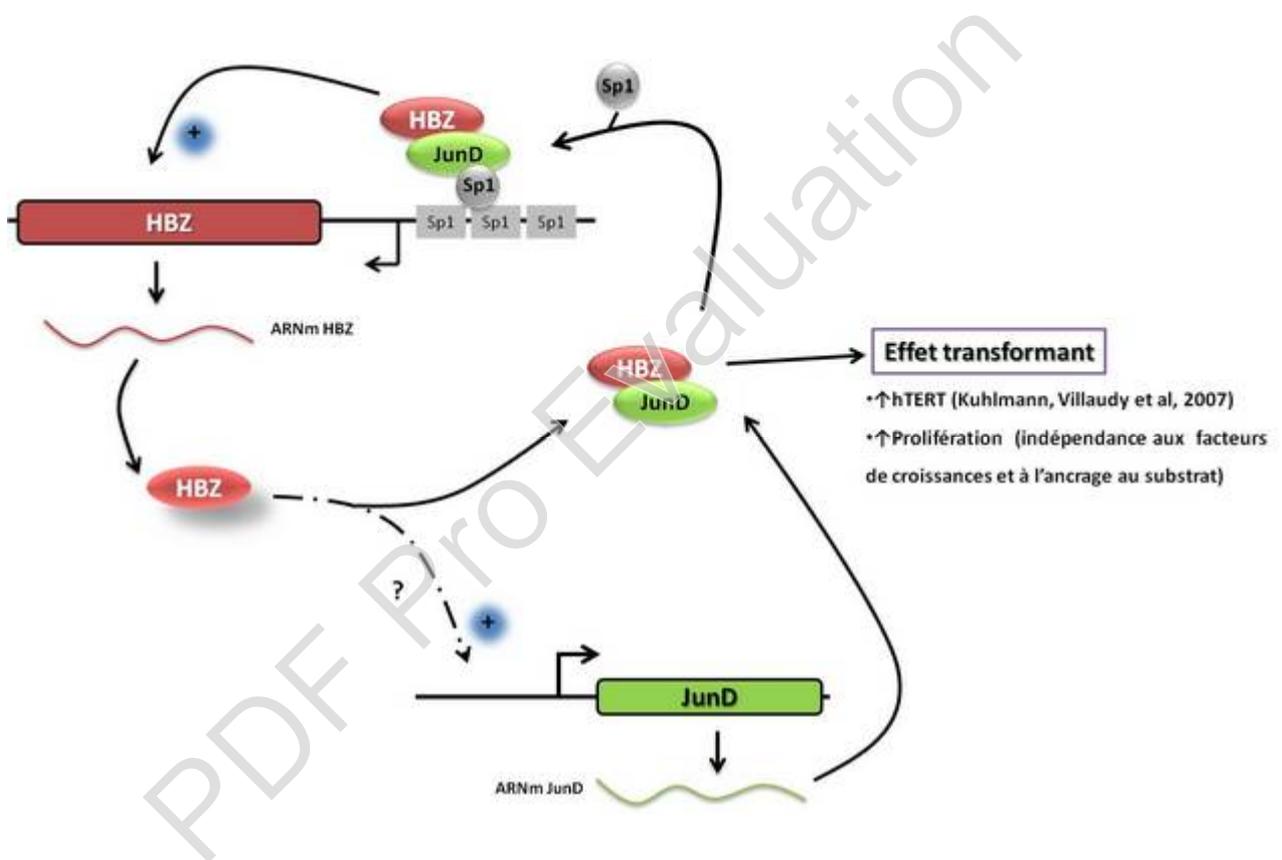


Figure 39 Représentation schématique du mécanisme de régulation du gène viral *hbz*

Un modèle similaire d'activation de la transcription par HBZ en coopération avec JunD a été rapporté par Kuhlmann et ses collaborateurs. Dans leur étude ils montrent que la surexpression de la télomérase hTerT détectée dans les cellules de patients ATL est la conséquence du recrutement du complexe HBZ/JunD, suite à l'interaction de JunD avec Sp1

sur les sites Sp1 présents sur le promoteur proximal de la télomérase induisant ainsi son activation transcriptionnelle (Agarwal, Novotny et al., 2003).

Dans la seconde partie de notre analyse, nous avons également montré que les fibroblastes immortalisés exprimant hbz présentent des caractéristiques phénotypiques de cellules transformées. En effet, ces cellules montrent une prolifération accrue et une croissance indépendante d'ancrage et de facteurs de croissance (faible concentration de sérum) contrairement aux fibroblastes normaux. Comme le montre l'effet de l'inhibition de JunD dans ces cellules, ces processus apparaissent être également dépendants de JunD. Il est intéressant de noter qu'il a été rapporté que les fibroblastes exprimant JunD présentaient certaines propriétés de cellules transformées en absence de la ménine, un inhibiteur de JunD (Tomita, Kawakami et al., 2006) et que la suppression de l'activation constitutive d'AP1 consécutive à l'inhibition de JunD dans les cellules infectées par HTLV-1 est associée avec une diminution de la prolifération incontrôlée de ces cellules (Hernandez, Floyd et al., 2008).

JunD exerce un rôle pivot dans le contrôle de la croissance cellulaire et son activité contribue à des maladies métaboliques, néoplasiques et virales. Dans la cellule normale, il agit comme un activateur ou un répresseur de la transcription de divers gènes impliqués dans le stress oxydatif, la prolifération cellulaire et la différenciation (Fujii, Iwai et al., 2000; Mori, Fujii et al., 2000). Il semblerait donc que l'interaction de JunD avec HBZ, maintienne JunD essentiellement comme un régulateur positif dans la prolifération des cellules T infectées par HTLV-1. Nos résultats favorisent également un modèle dans lequel l'expression d'HBZ régulerait l'expression de JunD comme le montre l'augmentation, observée par Western Blot, de l'expression de JunD suite à la surexpression d'HBZ. De façon intéressante, des études précédentes ont rapporté une forte expression et une activation constitutive de JunD dans les cellules isolées de patients ATL (Hirai, Ryseck et al., 1989; Hernandez, Floyd et al., 2008). Il est donc probable que cette dérégulation de l'expression de JunD dans les cellules ATL jouerait un rôle dans le phénotype dérégulé des cellules infectées par HTLV-1. Contrairement aux autres membres de la famille AP-1, l'expression de JunD est principalement régulée selon des mécanismes post-transcriptionnels et post-translationnels interdépendants. Ces mécanismes assurent un contrôle précis de l'expression et l'activité fonctionnelle de JunD (Kuhlmann, Villaudy et al., 2007). En effet, il a été montré que le promoteur de JunD est constitutivement activé et que par conséquent l'abondance de la protéine JunD est régulée selon un mécanisme sous-jacent à la transcription. Ces données permettent de soutenir l'hypothèse selon laquelle l'activité de JunD pourrait être centrale dans le modèle de

persistance de HTLV-1 et ainsi impliqué dans le développement et de la maintenance du processus leucémique. Cette hypothèse est supportée par l'activation de l'expression de hTERT par le couple JunD/HBZ rapporté par Kuhlmann et al. (Gerald, Berra et al., 2004; Indran, Hande et al., 2011). En effet, JunD et hTERT sont impliqués dans la diminution de la concentration des espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la cellule et par voie de conséquence l'inhibition de l'apoptose induite par les ROS (Uchida, Otsuka et al., 1999; Fujii, Iwai et al., 2000; Mori, Fujii et al., 2000). On peut donc penser que les niveaux élevés de JunD et hTERT dans les cellules ATL pourraient expliquer la résistance de ces cellules à l'arsenal chimiothérapeutiques dont les mécanismes d'action sont dépendant des ROS pour induire l'apoptose (Merritt, Lin et al., 2008). Probablement que, sous certaines conditions, des approches thérapeutiques alternatives telles que le ciblage d'*hbz* ou des défenses cellulaires contre les antioxydants pourraient induire une chimiosensibilité des cellules ATL.

En conclusion, nos résultats concordent avec les études précédentes qui démontrent la capacité du gène *hbz* à induire la prolifération cellulaire. De plus, ces données confirment, en plus de Tax, que *hbz* joue un rôle important dans l'activité oncogénique de HTLV-1. La protéine JunD semble avoir une place centrale dans l'oncogénicité d'HBZ, il serait donc intéressant non seulement d'étudier les mécanismes de régulation de JunD mis en jeu dans les cellules ATL donc en présence d'HBZ, mais également d'approfondir le rôle du tandem HBZ/JunD dans l'évolution de la cellule T infectée vers un phénotype malin et donc la transformation cellulaire.

II. Article II. Etude de l'effet d'HBZ sur la voie des microARN dans les cellules leucémiques

Les propriétés dynamiques de l'interférence par l'ARN (iARN) dans la biologie des cancers ont conduit les chercheurs à poursuivre avec un grand intérêt son rôle dans la tumorigénèse et la thérapie des cancers. Des changements dans les composants de la machinerie des miARN jouent des rôles cruciaux dans la carcinogénèse d'une variété de tumeurs (Pichler, Schneider et al., 2008; Tomita, Tanaka et al., 2009; Rahman, Quann et al., 2012; Sampey, Van Duyne et al., 2012). Ces altérations sont impliquées dans les profils anormaux des miARN trouvés dans de nombreux cancers. Récemment, différents groupes ont démontré l'implication de la dérégulation du profil des miARN cellulaires par HTLV-1 et sa corrélation avec la manifestation de la maladie oncogénique associée à ce rétrovirus. Dans les cellules infectées par HTLV-1, le virus altère la régulation de certains miARN dans le but de promouvoir la survie cellulaire et la prolifération. Principalement focalisées sur l'effet de Tax sur l'expression des miARN, la plupart de ces études mettent en évidence la dérégulation (activation ou répression) de nombreux miARN dans les cellules exprimant Tax, ce qui semble favoriser la transactivation des gènes, la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (Filipowicz, Bhattacharyya et al., 2008). Néanmoins, une des caractéristiques principales de la progression de la latence clinique vers l'ATL est la répression du promoteur viral en 5' (LTR5') et donc la perte de l'expression des gènes viraux à partir de ce promoteur. En outre, l'expression du gène viral *tax* est perdue dans la majorité des cellules malignes alors que le niveau d'expression d'*hbz* reste inchangé. Basée sur ces observations, la seconde partie de mon travail de thèse a consisté à déterminer l'impact de la seule protéine virale exprimée dans les cellules ATL, HBZ, sur la machinerie de l'interférence par l'ARN.

II.1. Analyse de l'influence d'HBZ sur les miARN cellulaires

Le mécanisme d'action des miARN passe par l'inhibition post-transcriptionnelle de l'expression de leur ARNm cibles, à travers des interactions avec le 3'UTR majoritairement (Sampey, Van Duyne et al., 2012). Afin d'étudier si HBZ affecte l'activité des miARN endogènes, nous avons mesuré l'effet inhibiteur des miARN sur leurs gènes cibles en présence d'HBZ par des expériences rapporteurs où le 3'UTR du gène de la luciférase arborait des sites de complémentarité parfaite avec un miARN ubiquitaire, let7. Le niveau du

transcrit chimérique est ainsi régulé par son interaction avec let7a endogène, ce qui résulte en une activité luciférase quantifiable et dépendante de l'activité inhibitrice du miARN (**Figure 42**).

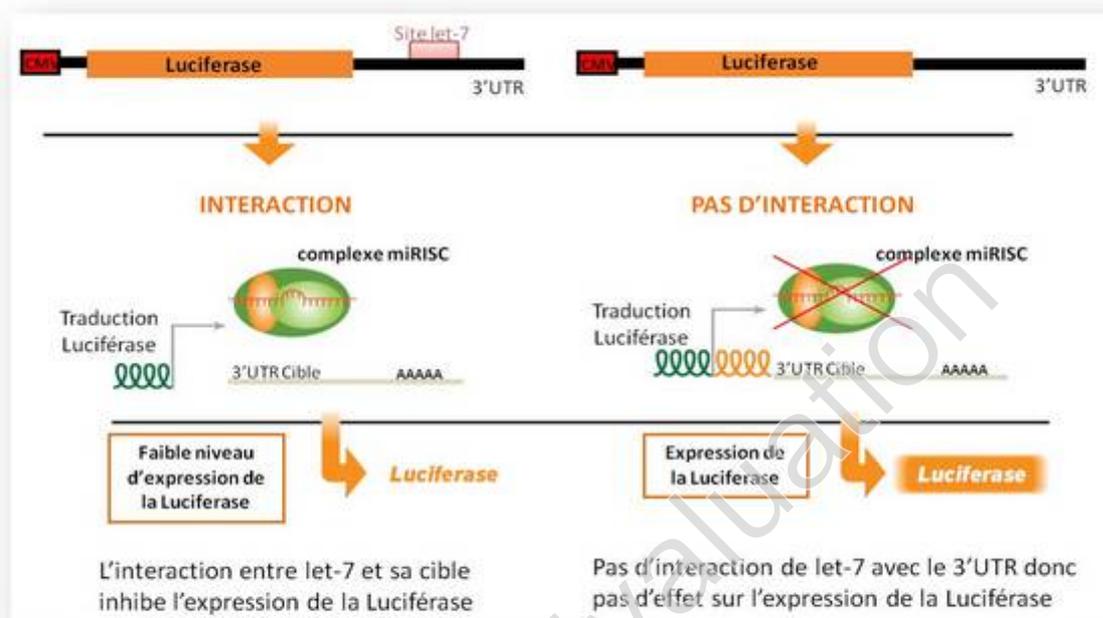


Figure 40 Principe de l'expérience de clivage par les miARN de l'ARNm rapporteur

Des lignées infectées par HTLV-1 (**Figure 43D**) et des cellules HEK 293T exprimant HBZ de façon transitoire ou stable (**Figure 43B et C**) ont été transfectées avec des constructions exprimant le rapporteur luciférase Renilla arborant (pRL-let7a) ou non (pRL-con) en 3'UTR le site d'interaction de let7a (**Figure 43A**). Les résultats obtenus montrent que dans les cellules contrôles, l'insertion du site miR-let7a a réprimée l'expression de la luciférase renilla d'environ 80%. Cependant, dans les cellules qui expriment HBZ cette inhibition était 3 à 4 fois moins importante, ce qui traduit une diminution de l'efficacité de l'interférence par l'ARN induit par le miARN endogène let 7a. L'expression du facteur HBZ semble donc influencer négativement sur l'activité des miARN endogènes.

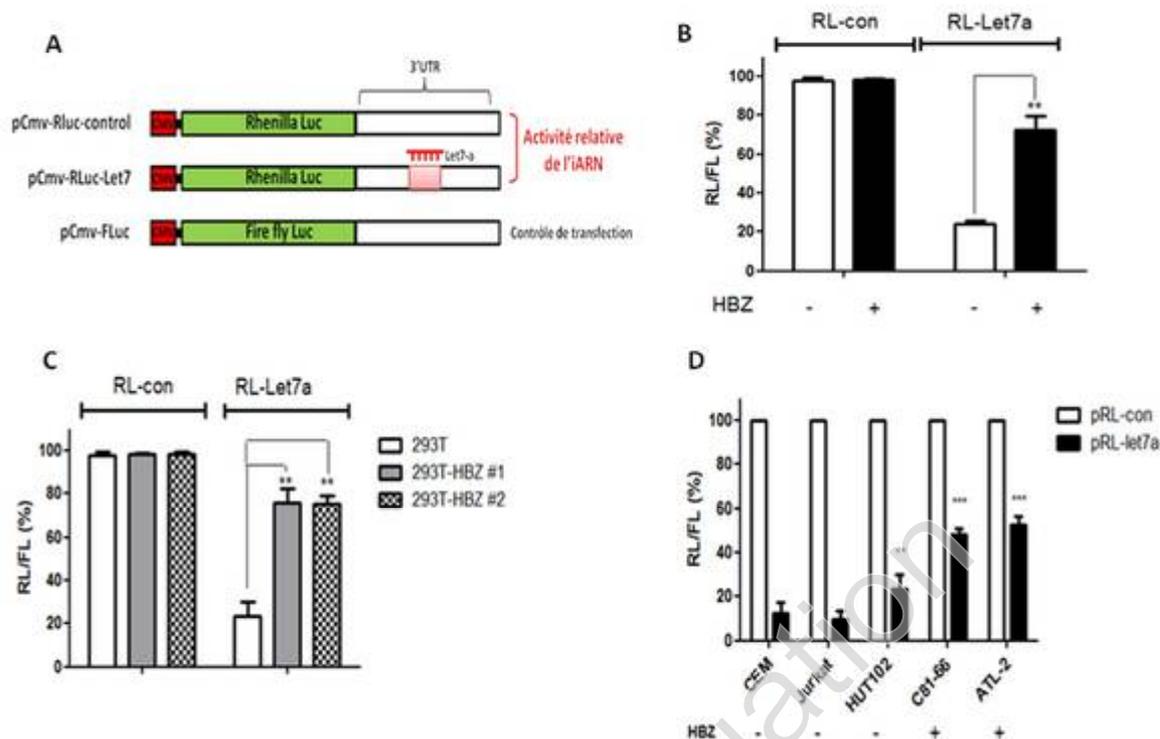


Figure 41 Effet d'HBZ sur l'activité répressive des miARN cellulaires. Les cellules HEK 293T exprimant de façon transitoire (B) ou stable (C) la protéine virale HBZ et les lignées de cellules infectées chroniquement par HTLV-1 (D) ont été transfectées avec le vecteur rapporteur de l'expression de luciférase Renilla arborant ou non en 3'UTR le site de let7a (A). Les activités de la luciférase renilla-miR-let7 (RL-let7a) dans les différentes lignées cellulaire sont exprimé par rapport aux activités mesurés du rapporteur de la luciférase renilla contrôle (RL-con) (fixé à 100%). Les valeurs luciférase obtenue ont été mesuré 48h après transfection et normalisées par les activités de la luciférase firefly mesurées (contrôle de transfection). Les valeurs indiquées représentent la moyenne de quatres expériences indépendantes (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

Nous nous retrouvons alors devant trois possibilités: soit cet effet de l'expression d'HBZ est le reflet d'une altération de l'abondance des miARN, soit de l'assemblage du complexe miRISC ou encore du fonctionnement des miARN. Ainsi, dans le but d'évaluer l'effet d'HBZ sur l'abondance des miARN, nous avons quantifié l'expression des miARN endogènes dans les lignées infectées ou non par HTLV-1 par PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) en utilisant le kit QuantiMiR (System Biosciences). Brièvement, avant de procéder à la quantification par PCR, l'ARN total extrait des lignées cellulaires était au préalable polyadénylé et un adaptateur oligo-dT était rajouté à la réaction. Cette combinaison permet la synthèse des ADN complémentaires des miARN et par la suite les miARN étaient détectés en

utilisant un primer FW spécifique du miARN et un primer reverse universel était utilisé pour l'amplification par PRC (Figure 44).

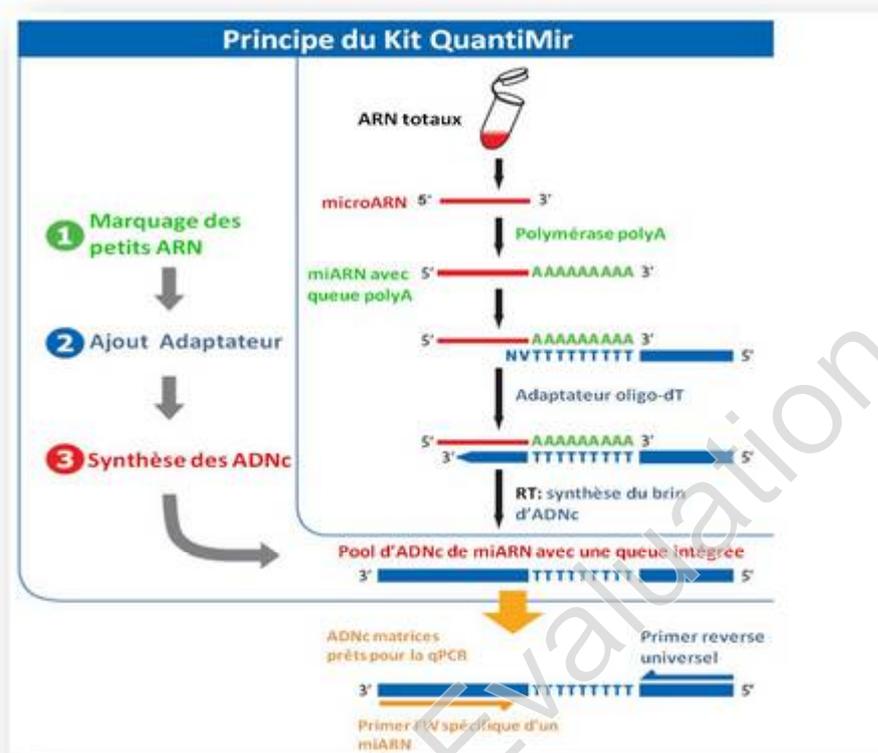


Figure 42 Quantification des microARN par RT-PCR quantitative. Le kit QuantiMirTM est utilisé pour générer des ADNc à partir d'ARN total pour mesurer tous les petits ARN y compris les miARN. Le tag universel en 3' (via l'adaptateur oligo-dT) inséré durant la transcription inverse permet l'analyse évolutive et précise de l'expression des miARN par PCR quantitative. On peut ainsi faire des centaines de profils de miARN différents à partir d'une seule réaction de transcription inverse.

Nous avons ainsi analysé l'expression de 12 miARN décrits dans la littérature comme étant surexprimés en présence de Tax et jouant un rôle dans la transformation lors de l'infection par HTLV-1 (Lee and Dutta, 2009) (Figure 45). On observe dans les lignées T exprimant HBZ (C81-66 et ATL-2), une importante diminution de l'expression de la plupart des miARN cellulaires analysés (Figure 4). En effet, 10 des 12 miARN testés, plus précisément let7-a, miR-16, miR-20, miR-31, miR-93, miR-125, miR-132, miR-143, miR-200 et miR-873, sont retrouvés sous exprimés comparés à leurs expressions mesurées dans les populations contrôles non infectées (CEM et Jurkat) (Figure 45, barres grises). Il semblerait donc que l'expression

d'HBZ soit associée à un défaut d'expression des miARN ayant pour conséquence une diminution de l'activité inhibitrice des miARN.

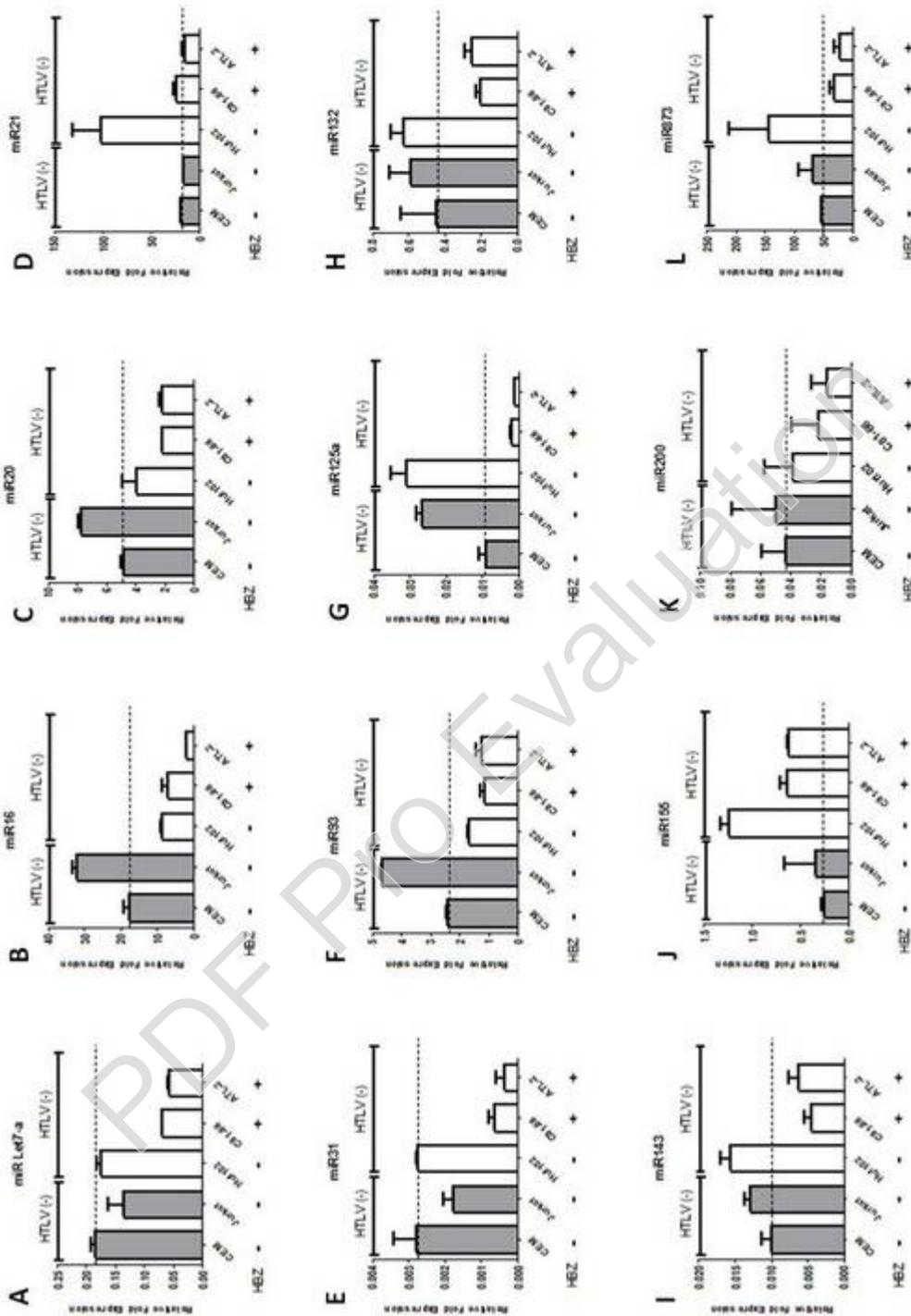


Figure 43 Expression des miARN dans les lignées infectées par HTLV-1. L'expression de plusieurs miARN a été mesurée par RT-PCR quantitative et normalisée par rapport au niveau d'expression du snARN ubiquitaire U6 dans deux lignées cellulaires contrôles CEM et Jurkat (barres grises) et trois lignées de cellules T infectées par HTLV-1, Hut102, C81-66 et ATL-1 (barres blanches). Les données représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

Des défauts d'expression des gènes des miARN peuvent résulter de plusieurs mécanismes. Cependant il a été rapporté que durant la tumorigénèse, l'expression aberrante des miARN est le plus souvent due à des altérations au niveau post-transcriptionnelle donc des altérations au niveau de la maturation des miARN (Basbous, Arpin et al., 2003; Thebault, Basbous et al., 2004; Matsumoto, Ohshima et al., 2005; Hivin, Basbous et al., 2007; Lemasson, Lewis et al., 2007; Clerc, Polakowski et al., 2008). Il est donc probable que la diminution de l'expression des miARN observée suite à l'expression d' HBZ soit le reflet d'un défaut de maturation des miARN. C'est donc logiquement que nous nous sommes intéressés à l'impact d'HBZ sur la voie principale de maturation des miARN.

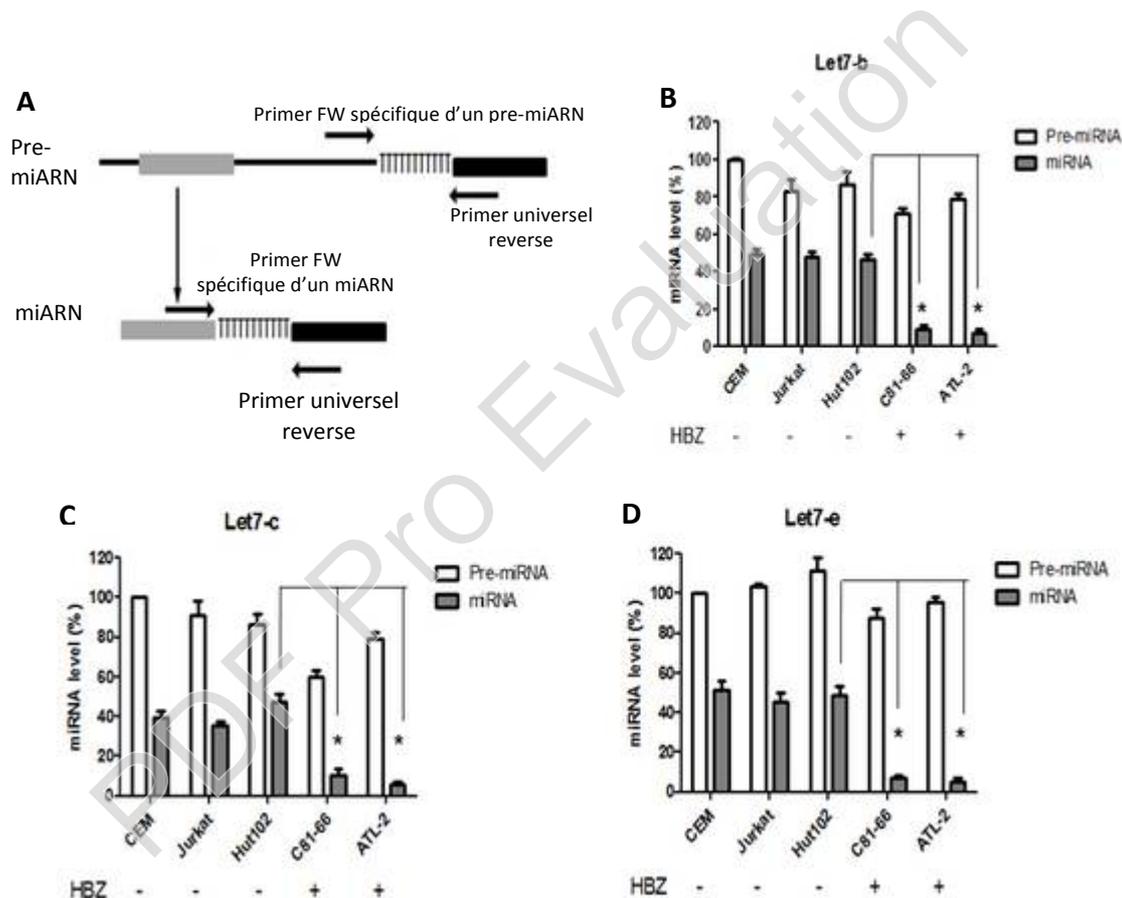


Figure 44 Effet d'HBZ sur la maturation des miARN (A) Représentation schématique du principe expérimental pour détecter les pré-miARN et les miARN matures. (B, C et D) Les niveaux de plusieurs pré-miARN (barres blanches) et des miARN matures (barres grises) ont été mesurés par qRT-PCR et normalisés par rapport aux niveaux d'expression du snARN ubiquitaire, U6, dans deux lignées cellulaires T contrôles (CEM et Jurkat) et trois lignées T infectées (Hut102, C81-66 et ATL-2). Les valeurs représentent la moyennes de trois expériences indépendantes (* p<0.05)

Pour cela, nous avons mesuré et comparé les niveaux d'expression des précurseurs (pré-miARN) par rapport à ceux des formes matures (miARN) de 3 miARN de la famille let7 dans les lignées T infectées ou non par HTLV-1, en utilisant la même stratégie que précédemment (**Figure 44**) à la différence que des primers spécifiques ciblant les pré-miARN et d'autres les formes matures des miARN ont été utilisés. Pour cela comme expliqué en figure 46A, après synthèse des ADNc, les miARN matures étaient détectés par un primer spécifique s'hybridant avec les miARN, tandis que pour les pré-miARN nous avons utilisé un primer spécifique s'hybridant à l'intérieur du pré-miARN mais pas avec le miARN mature correspondant. Dans tous les cas, un primer universel reverse était utilisé pour l'amplification par PCR quantitative (**Figure 46A**).

Les quantifications des pré-miARN de let7-b, c et e ne montrent aucune différence significative dans les 3 lignées infectées par HTLV-1 comparées aux lignées cellulaires non infectées (**Figure 46B à D, barres blanches**). À l'inverse, dans les lignées infectées exprimant HBZ (c.-à-d. C81-66 et ATL-2), les niveaux de miARN matures étaient significativement réduits ($p < 0,05$) par rapport à ceux mesurés dans les populations contrôles (CEM et Jurkat) (**Figure 46B à D, barres grises**). Ces résultats indiquent qu'HBZ diminue les niveaux de miARN fonctionnels dans les cellules infectées par HTLV-1 en altérant le processus de maturation et miARN.

II.2. Mesure de l'expression des acteurs de la biogénèse des miARN en présence d'HBZ

Afin de préciser à quel niveau du processus de maturation des miARN, HBZ agit, nous nous sommes penchés sur les différents acteurs de la voie de biogénèse des miARN et nous avons comparé leur niveau relatif d'expression en présence et en absence d'HBZ. Nous avons ainsi analysé par PCR quantitative l'expression des principaux acteurs de la biogénèse des miARN, Drosha, Dgcr8, l'exportine 5, Dicer, Ago-2 et Ago-3 dans les lignées de cellules T infectées ou non par HTLV-1 (**Figure 47**). De façon intéressante, on observe que seule l'expression de Dicer est affectée de façon significative dans les cellules exprimant HBZ (**Figure 47D**). Nous avons ensuite examiné la corrélation entre l'expression des différents gènes et l'expression d'HBZ dans les cellules infectées par HTLV-1. Les études statistiques ont été réalisées en utilisant le test de Pearson. Les résultats montrent que le taux d'expression

de Dicer est significativement corrélé avec l'augmentation de l'expression de HBZ dans les lignées T infectées par HTLV-1 (Coefficient de corrélation de Pearson=-0,9 ; p=0,0417) (Figure 47I).

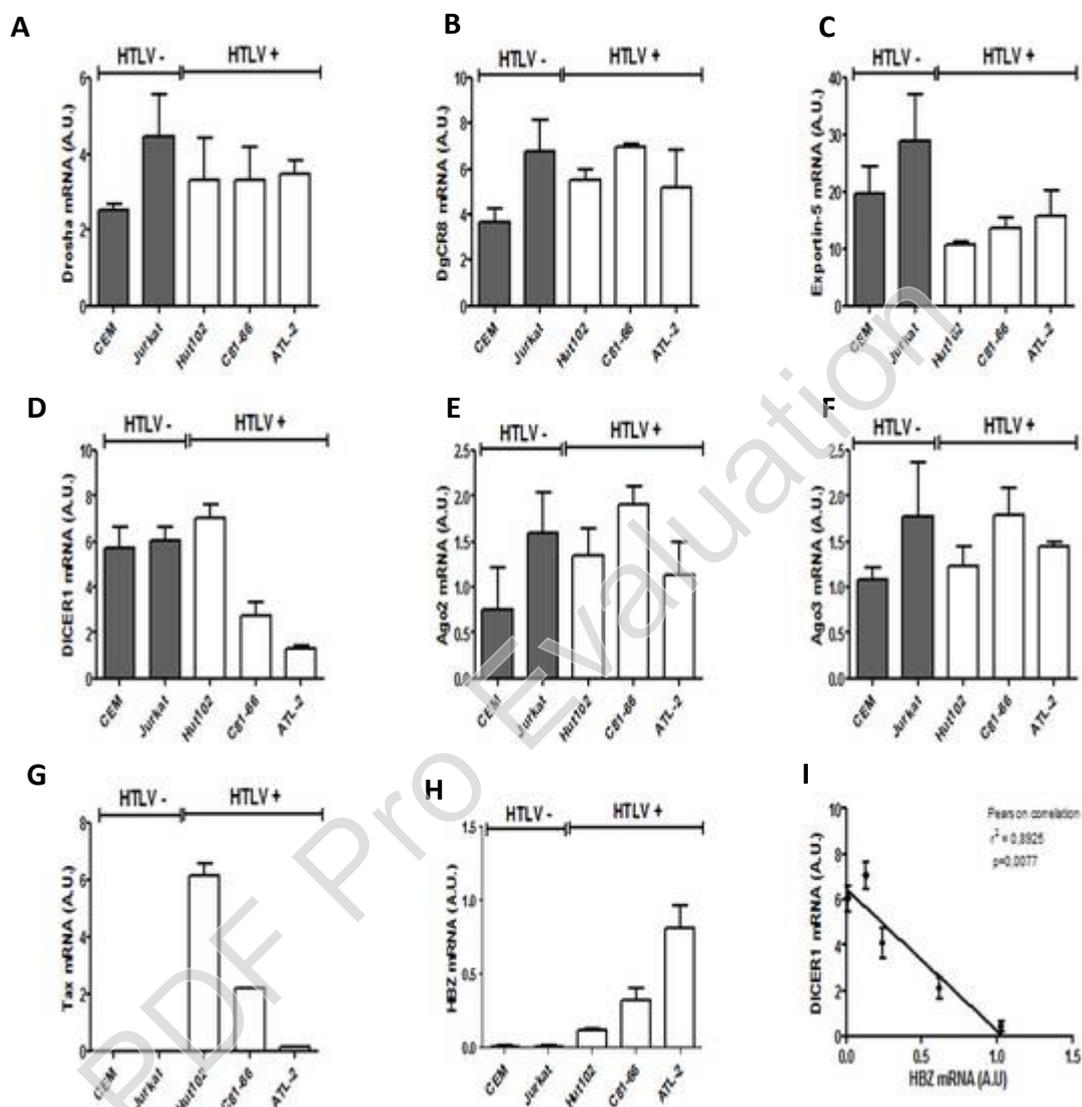


Figure 45 Expression des acteurs de la biogénèse dans les lignées infectées par HTLV-1. (A-F) L'expression relative de six gènes impliqués dans la biogénèse des miARN (Drosha, DgCR8, Exportine-5, Dicer, Ago-2 et Ago-3) et (G et H) de deux gènes viraux d'HTLV-1 Tax et HBZ a été mesurée par RT-PCR quantitative dans les deux lignées T contrôles CEM et Jurkat (barres grises) et les trois lignées T infectées par HTLV-1 Hut-102, C81-66 et ATL-2 (barres blanches). Les valeurs présentées sont la moyenne de trois expériences indépendantes. (I) Dot plot de l'expression d'HBZ versus l'expression de Dicer dans les lignées infectées exprimant HBZ C81-66 et ATL-2. Le coefficient de corrélation de Pearson obtenu était de 0,8925 ($p < 0.01$)

Afin de confirmer ces résultats, nous avons évalué la pertinence de nos données dans le contexte physiopathologique de l'infection par HTLV-1. Dans ce but nous avons analysé l'expression des différents acteurs de la biogénèse des miARN dans des PBMC déplétés en CD8 (PBMC/CD8-) de patients infectés par HTLV-1 parmi lesquels on dénombre 7 patients leucémiques (ATL) et 4 patients asymptomatiques (AC, asymptomatic carriers). Les critères de sélection des patients inclus dans l'étude figurent dans la partie « Matériel et Méthodes ».

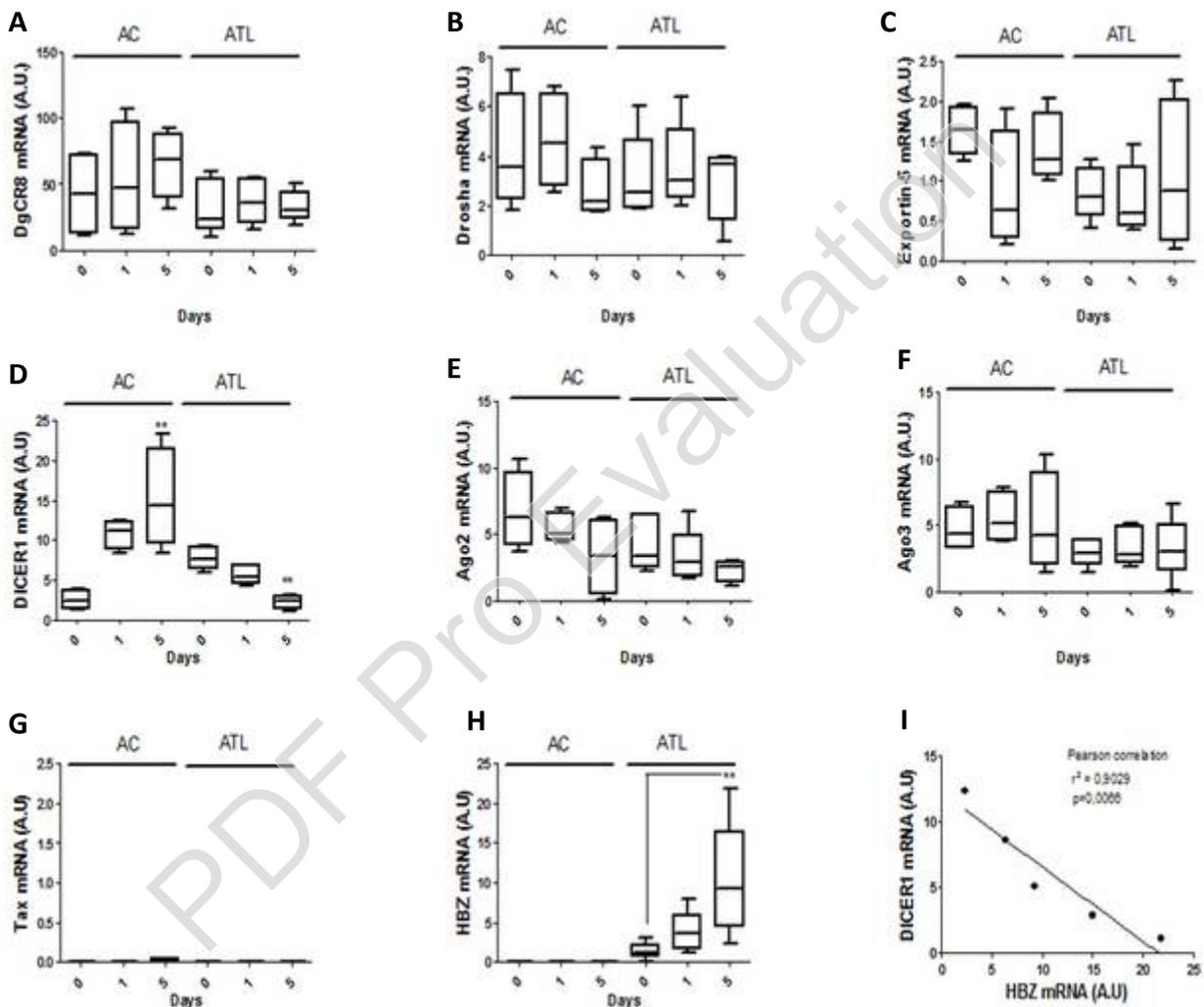


Figure 46 Expression des acteurs de la biogénèse dans les cellules de patients. (A-F) L'expression relative de six gènes impliqués dans la biogénèse des miARN (*Drosha*, *DgCR8*, *Exportine-5*, *Dicer*, *Ago-2* et *Ago-3*) et (G et H) des gènes viraux d'HTLV-1 *Tax* et *HBZ* a été mesurée par RT-PCR quantitative dans les PBMC de quatre patients asymptomatiques (AC, Asymptomatic carriers) six patients avec une ATL aigüe (ATL). Les valeurs présentées sont la moyenne de trois expériences indépendantes et les différences significatives sont représentées par des astérisques (** $p < 0.01$). (I) Dot plot de l'expression d'*HBZ* versus l'expression de *Dicer* dans les cellules de patients ATL. Le coefficient de corrélation de Pearson obtenu était de 0.9029 ($p < 0.01$)

En phase avec les résultats obtenus dans les lignées cellulaires infectées, l'expression croissante d'HBZ dans les cellules ATL après leur remise en culture corrèle avec une forte diminution de l'expression de Dicer (Coefficient de corrélation de Pearson=-1,0 ; $p=0.0083$) (**Figure 48D, H et I**).

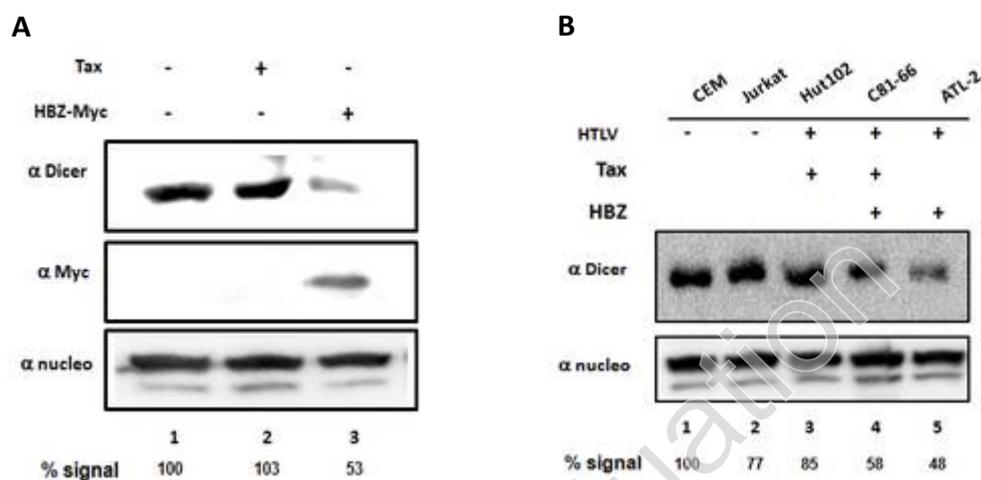


Figure 47 HBZ mais pas Tax influe sur l'expression de Dicer (A) Les cellules HEK 293T ont été transfectées avec un plasmide contrôle (pcDNA) (ligne 1), le vecteur d'expression de Tax (ligne 2) ou le vecteur d'expression d'HBZ-Myc (ligne 3). 48h après transfection l'expression de Dicer, HBZ (Myc), Tax et la nucléoline (contrôle de charge) a été analysé par Western Blot. (B) Analyse de l'expression de Dicer dans les différentes lignées cellulaires infectées ou non. Après la lyse cellulaire, les extraits protéiques totaux ont été séparés sur gel SDS-PAGE. La nucléoline a été utilisée comme contrôle. (A et B) Les signaux Dicer ont été quantifiés par densitométrie et représentés par un pourcentage des niveaux de Dicer par rapport au groupe contrôle.

Afin de confirmer au niveau protéique, les résultats obtenus par qRT-PCR, nous avons transfecté des HEK293T avec des vecteurs d'expression de Tax, HBZ-Myc ou un vecteur contrôle vide et les niveaux protéiques de Dicer ont été analysés par Western Blot (**Figure 49A**). Les résultats obtenus montrent, que seule l'expression ectopique d'HBZ induit une diminution de 47% de l'expression de Dicer. Parallèlement, nous avons analysé l'expression de Dicer dans les cellules infectées par HTLV-1 et comparé nos résultats aux lignées contrôles (**Figure 49B**). Les niveaux de protéines totaux de Dicer et de la nucléoline ont été détectés dans 2 lignées non infectées, CEM et Jurkat (**Figure 49B, ligne 1 et 2**) mais également dans nos 3 lignées de cellules T infectées par HTLV-1 : la lignée HUT-102 qui n'exprime que la protéine virale Tax, C81-66 qui exprime à la fois Tax et HBZ et la lignée ATL-2 où seule HBZ est exprimée (**Figure 49B, lignes 3 à 5** respectivement). Comme

attendu, les niveaux de Dicer ont été significativement retrouvés diminués dans les cellules infectées par HTLV-1 et ce de 42% dans les C81-66 et 52% dans les ATL-2 comparé aux CEM non infectées (normalisés avec la nucléoline) (**Figure 49B, lignes 4 et 5** respectivement). En résumé, l'ensemble de ces résultats indiquent que lors de l'infection par HTLV-1, l'expression d'HBZ régule négativement l'enzyme de l'interférence ARN, Dicer, dans les cellules transfectées, dans les cellules chroniquement infectées et dans les cellules de patients ATL.

II.3. Etudes des mécanismes sous jacent à la répression de Dicer par HBZ

Nous nous sommes ensuite intéressé aux mécanismes sous jacents de cette répression de l'expression de Dicer par HBZ dans les cellules infectées par HTLV-1. La protéine virale HBZ a été bien documentée en tant que facteur de transcription qui forme des complexes avec des co-activateurs cellulaires tels que CBP et p300, et avec certains facteurs de transcription de type bZIP tels que les facteurs de transcription de la famille AP-1 (pour revue, Levy, Khaled et al., 2010).

Afin de déterminer la région d'HBZ impliquée dans la répression de Dicer, nous avons transfecté des HEK293T avec HBZ WT ainsi que les mutants d'HBZ, HBZ-Myc (LXXAA)₂ qui n'interagit plus avec CBP/p300 et HBZ-Myc Δ Zip qui ne se lie aux facteurs de transcription de type bZIP (**Figure 50A**). Nous avons ensuite analysé leurs effets sur l'expression de Dicer par Western Blot et nous trouvons que seul HBZ-Myc (LXXAA)₂ (**Figure 50B, ligne 4**) diminue l'expression de Dicer de façon comparable à HBZ sauvage dans les cellules HEK 293T (**Figure 50B, lignes 2 et 3**). Par conséquent, il semblerait que l'effet inhibiteur d'HBZ sur la voie de l'interférence ARN passe par son interaction avec des facteurs de transcription de type bZIP.

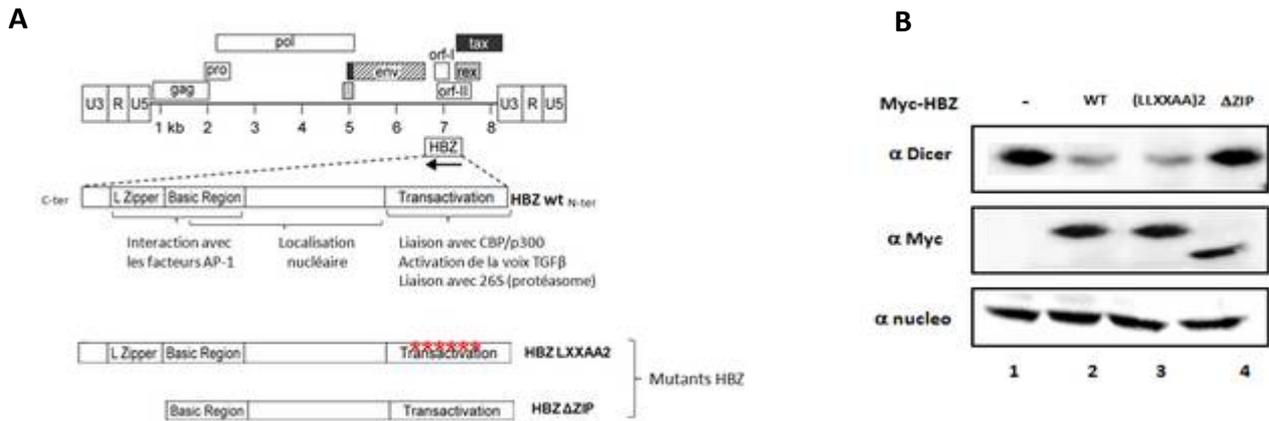


Figure 48 Domaine d'interaction d'HBZ impliqué dans la dérégulation de l'expression de Dicer. (A) Représentation schématiques des domaines d'interaction d'HBZ et des mutants fonctionnels d' HBZ. (B) Les cellules HEK 293T ont été transfectées avec un plasmide contrôle (pcDNA) (ligne1), le vecteur d'expression d'HBZ-Myc wt (ligne 2), et les plasmides exprimant soit les mutants fonctionnels d'HBZ, HBZ-LLXXAA2 ou HBZ Δzip (ligne 3 et 4, respectivement). Après 48h de culture, l'expression de Dicer et HBZ a été analysé par Western Blot. La nucléoline a été utilisé comme contrôle de charge.

Au vue de ces résultats, nous avons voulu déterminer si les promoteurs de Dicer (proximal et distal) pouvait contenir des sites de fixation pour les facteurs de transcription (transcription factor binding site - TFBS) de la famille AP-1. Après une analyse *in silico*, les sites TFBS présents dans les promoteurs de Dicer, nous avons identifié 11 sites de liaison aux facteurs AP-1, répartis sur les deux promoteurs (**Figure 51**).

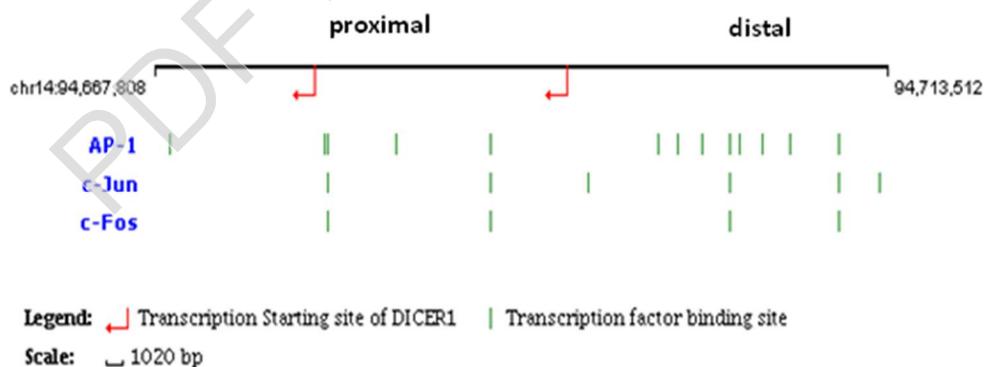


Figure 49 Analyse par bioinformatique du promoteur de Dicer. Les11 sites de liaison aux facteurs AP-1 identifié et leur localisation sur le promoteur sont indiqués et représentés par un trait vertical vert.

Nous nous sommes focalisés dans un premier temps sur les sites AP-1 localisés sur le promoteur proximal de Dicer. En utilisant un plasmide rapporteur où le gène de la luciférase a été placé sous le contrôle de ce promoteur proximal pGL3-proxDicer Luc (Karube, Tanaka et al., 2005; Merritt, Lin et al., 2008; Martin, Payton et al., 2009), nous avons comparé la capacité de chacun des membres de la famille Jun à activer la transcription de la luciférase soit dans les cellules HEK 293T (**Figure 52A**), soit dans la lignée T Jurkat (**Figure 52B**). Les résultats obtenus montrent que l'expression de c-Jun tout comme celle de JunD-Flag a significativement activé le promoteur de Dicer dans les cellules HEK 293T (**Figure 52A, lignes 3 et 4**), seule l'expression de JunD a augmenté l'activité transcriptionnelle du promoteur proximal de Dicer dans les cellules T (**Figure 52B, ligne 4**).

Ensuite, nous avons co-transfecté également le plasmide d'expression d'HBZ afin de voir si HBZ altérerait la capacité de transactivation du promoteur de Dicer par JunD (**Figure 52C et D**). Dans les deux lignées cellulaires utilisées, nous trouvons que la co-expression de JunD et HBZ diminue d'un facteur 3 l'activité luciférase induite par l'expression de JunD seule (**Figure 52C et D, lignes 2 et 4**). Ces résultats suggèrent que JunD régule l'expression de Dicer et que dans le contexte d'une infection par HTLV-1, HBZ altère cette régulation positive.

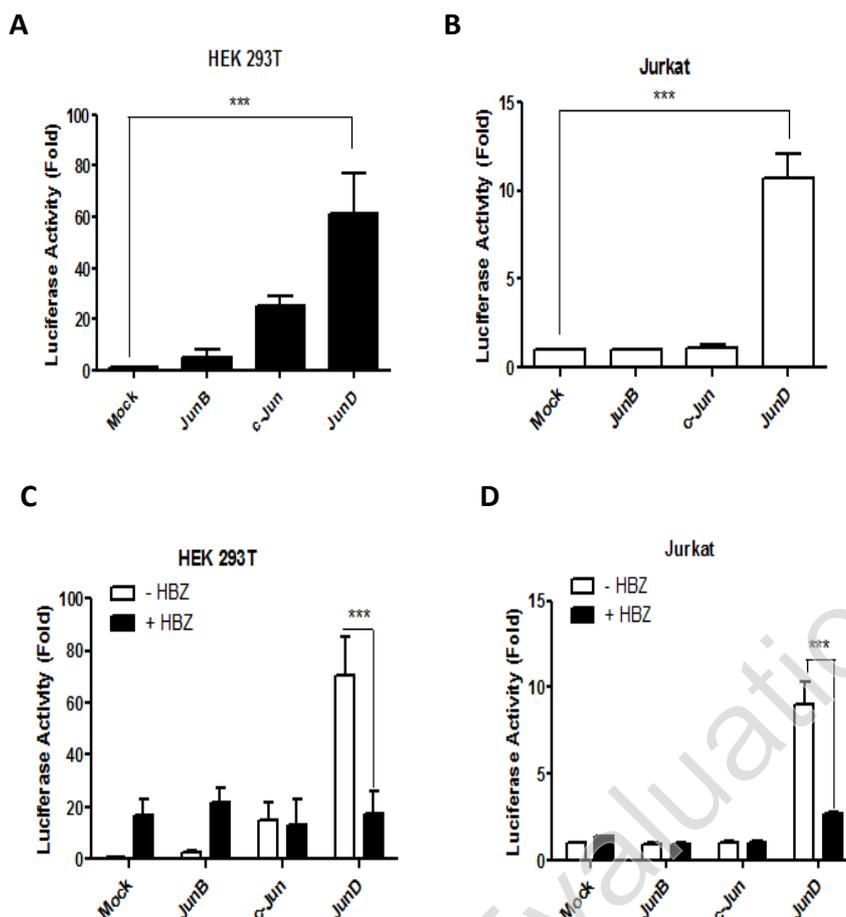


Figure 50 Effet des différentes protéines Jun en présence ou non d'HBZ sur la transcription de Dicer. (A et B) Effet des protéines Jun sur le promoteur proximal de Dicer. Les cellules HEK 293T (A) et Jurkat (B) ont été co-transfectées avec un système rapporteur contenant le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur proximal de Dicer (pGL3-proxDicer-Luc) (Figure 12 A) avec l'un des vecteurs d'expression des protéines de la famille Jun (c-Jun, JunB et JunD). 48h après transfection, l'activité luciférase a été analysée et normalisée à l'activité de la β -galactosidase. (C et D) Effet d'HBZ sur l'activité transcriptionnelle des protéines Jun sur le promoteur de Dicer. Les cellules HEK 293T (C) et Jurkat (D) ont été co-transfectées avec le plasmide rapporteur pGL3-proxDicer-Luc et les vecteurs d'expressions de JunB, c-Jun, JunD et/ou HBZ. Après 48h de culture, l'activité de la luciférase a été mesurée et normalisée par l'activité de la β -Galactosidase. Les valeurs (moyennes et déviation standard) sont représentatives de trois expériences indépendantes.

Néanmoins, dans ces expériences de transfections transitoires, il est possible que le plasmide pGL3-proxDicer-Luc ne soit pas inséré dans des conditions chromatiniennes physiologiques. Ainsi afin de confirmer nos résultats et déterminer comment HBZ altère la capacité de trans-activation du promoteur endogène de Dicer par JunD, nous avons réalisé des expériences d'immonoprécipitation de la chromatine (CHIP) dans les cellules HEK 293T exprimant de façon stable HBZ (293T-HBZ) en utilisant 3 primers A, B et C ciblant la région proximal du promoteur de Dicer (Figure 53A).

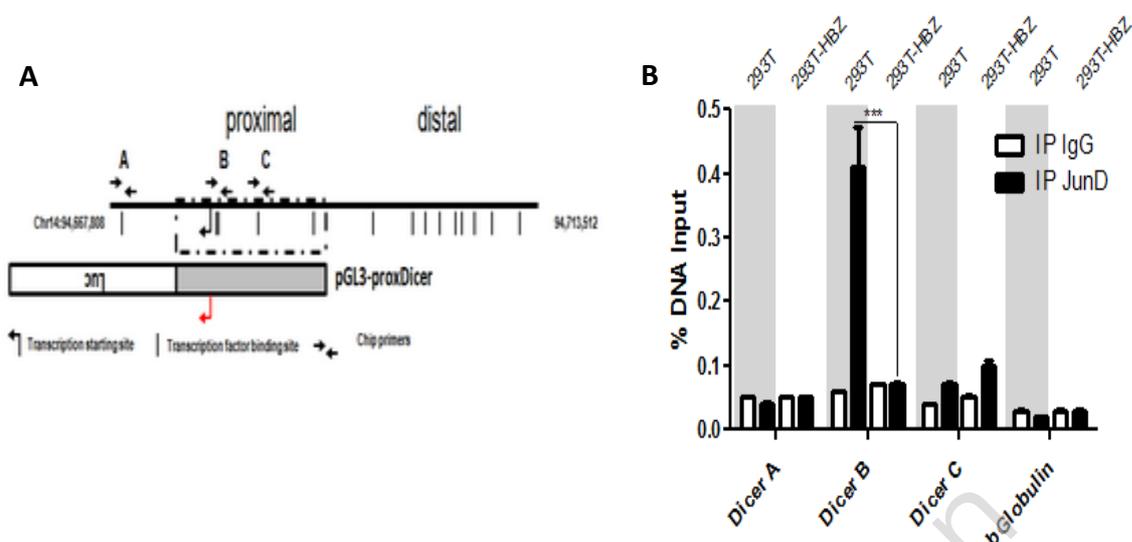


Figure 51 Effet d'HBZ sur la trans-activation du promoteur de Dicer induite par JunD. (A) Représentation schématique des séquences du promoteur de Dicer et de la construction pGL3-proxDicer-Luc. Les flèches indiquent la localisation des primers utilisés pour amplifier les séquences promotrices proximales. (B) Les cellules HEK 293T contrôles (293T) et les cellules HEK 293T exprimant de façon stable HBZ (293T-HBZ) ont été transfectées avec le vecteur rapporteur pGL3-proxDicer-Luc. Après 48h de cultures les cellules ont été fixées en paraformaldéhyde puis l'ADN récupéré et fractionné. Les complexes ADN-Protéines ont été identifiées par immunoprécipitation avec les anticorps anti-JunD, anti-IgG (anticorps contrôle non spécifique). Les fractions d'ADN précipitées ont été purifiées puis analysées par PCR quantitative en utilisant des primers chevauchant le promoteur proximal de Dicer (primer A, B et C) ou le promoteur de la β -globuline (comme contrôle). L'axe des y indique le pourcentage de signal précipité par rapport à un input de 100%. Les valeurs indiquées représentent la moyenne de trois expériences indépendantes et ont été normalisées par rapport aux contrôles IgG avec les courbes standards de chaque paire de primers.

De façon intéressante, JunD était retrouvé associé avec le promoteur de Dicer dans les cellules contrôles n'exprimant pas HBZ (293T) (**Figure 53B, Dicer B**), confirmant nos résultats sur la capacité de trans-activation du promoteur de Dicer par le facteur de transcription JunD. À l'inverse, dans les cellules exprimant HBZ, on observe une diminution substantielle de la fixation de JunD au promoteur de Dicer, suggérant qu'en présence d'HBZ, la liaison de JunD au promoteur de Dicer est fortement restreinte.

En résumé, l'ensemble de ces résultats montrent que HBZ inhibe la fixation de JunD sur le promoteur de Dicer, réprimant ainsi la trans-activation de celui-ci. Cette baisse d'expression de Dicer se traduit par une diminution générale des miARN matures dans les

cellules exprimant HBZ. De nombreuses études associent la dérégulation de Dicer à des stades avancées de la carcinogénèse et présente sa répression comme un facteur de mauvais pronostic dans de nombreux cancers tels que les cancers du sein, du poumon ou encore les leucémies myéloïdes aiguës (Kumar, Lu et al., 2007). A cela s'ajoute une étude qui a mis en évidence que si l'on réduit dans des cellules d'adénocarcinome pulmonaire la production des micro-ARN en inhibant la synthèse des nucléases Drosha ou Dicer, la capacité de prolifération de ces cellules est fortement accrue (Mortreux, Kazanji et al., 2001).

II.4. Etude de l'effet de la dérégulation de Dicer dans les cellules de patients ATL

Dans le contexte d'une infection par HTLV-1, nous avons donc investigué l'effet de cette dérégulation de Dicer induite par HBZ sur la croissance et la prolifération des cellules ATL. Pour cela, nous avons suivi l'évolution de la charge provirale (CPV), reflet de la prolifération clonale des cellules leucémiques, de PBMC déplétés en CD8⁺ de 6 patients leucémiques (ATL) par rapport à celle de 6 patients non leucémiques contrôles (asymptomatic carrier- AC) durant 5 jours de culture cellulaire ex vivo (**Figure 54A**). La CPV est un marqueur de prolifération souvent utilisé par les cliniciens pour suivre la croissance des clones infectés par HTLV-1 chez les patients (Belrose, Gross et al., 2011). Au début de la culture ex vivo (J0), nous avons mesuré une CPV de 60 ± 1 provirus intégrés pour 100 lymphocytes CD4⁺ dans les échantillons ATL et 8 ± 3 provirus intégrés pour 100 lymphocytes CD4⁺ dans les échantillons AC leucémiques respectivement. Après 5 jours de culture (J5) la CPV des patients leucémique a augmenté de façon significative pour atteindre 118 ± 7 provirus intégrés pour 100 lymphocytes CD4⁺ alors que celle des patients AC est apparue stable tout au long de la culture avec 16 ± 8 provirus intégrés. Parallèlement, l'analyse par qRT-PCR de l'expression des protéines virales Tax et HBZ ainsi que celle de Dicer montre ces cellules ATL sont caractérisées par une augmentation d'HBZ induisant une diminution de Dicer alors que l'expression de Tax était quasiment non détectable (**Figure 54 B et C, pannel no VPA**).

Récemment, une étude réalisée au sein du laboratoire a mis en évidence que le valproate (VPA), un inhibiteur des modifications épigénétiques a un effet différentiel sur l'expression des protéines Tax et HBZ (Belrose, Gross et al., 2011). Suite à une étude cinétique de l'expression des protéines virales, nous avons démontré que le traitement au VPA des cellules de patients TSP/HAM favorise l'expression de Tax et inhibe l'expression d'HBZ. Afin de

cerner l'impact du VPA sur les cellules ATL, nous avons traité les PBMC déplétés en CD8+ avec 5mM de VPA durant 5 jours. Après traitement, nous observons une diminution significative de la charge provirale avec 33 ± 5 provirus intégrés pour 100 lymphocytes CD4+. (**Figure 54, pannel 5mM VPA**). L'analyse statistique montre que cette différence d'un facteur de 2,5 entre les échantillons d'ATL non traités et celles traitées au VPA était significative ($P < 0.01$). A contrario, le traitement au VPA n'a eu aucun effet significatif sur la charge provirale des PBMC déplétés en CD8+ de patients asymptomatiques qui est stable avec une CPV mesurée de 18 ± 3 provirus intégrés à 5 jours de culture ($P < 0.0001$).

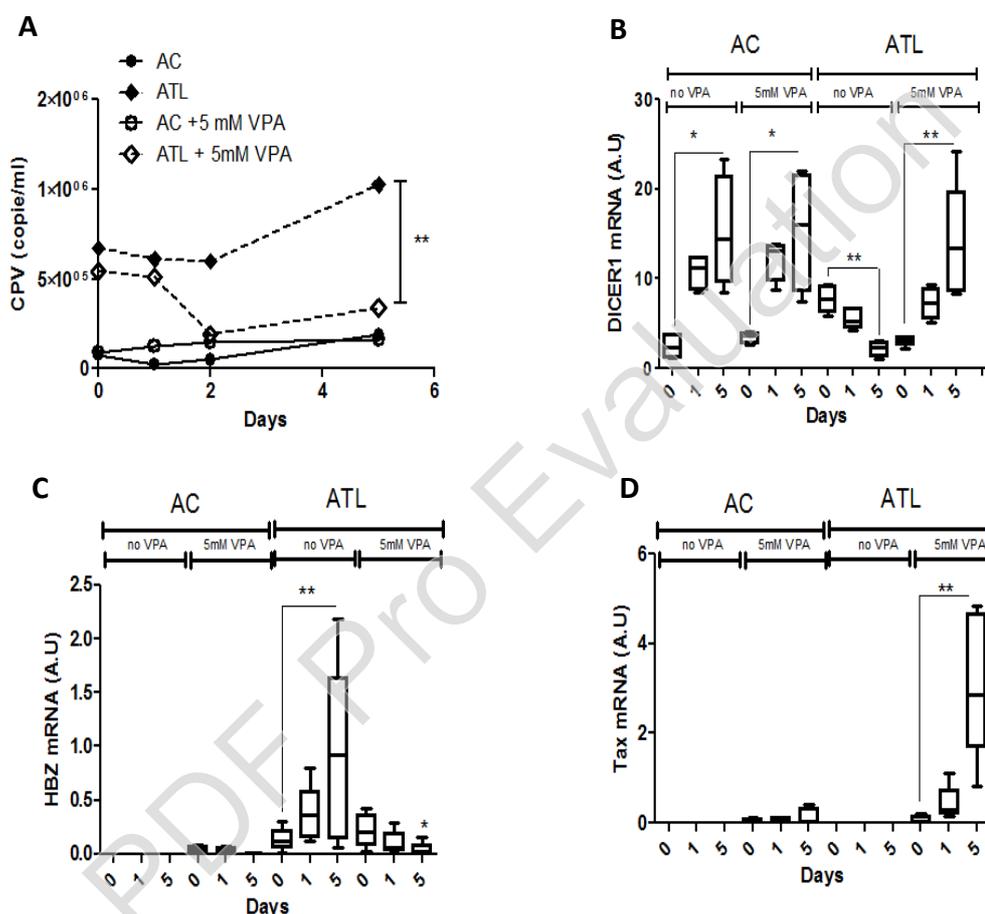


Figure 52 Expression des gènes Tax, HBZ et Dicer durant la culture ex-vivo des cellules PBMC déplétées en T CD8+ des patients leucémiques (ATL) ou asymptomatiques (AC). Les PBMC ont été cultivées sans stimulation exogène pour une période de 5 jours avec ou sans Valproate (VPA). Ces cellules ont été récoltées à J= 0, J= 1, et J= 5. (A) La charge provirale des individus infectés a été mesurée pour tous les sujets par PCR quantitative comme précédemment décrit (Belrose et al, 2011). (B-D) L'expression relative du gène Dicer et des gènes viraux Tax et HBZ a été mesurée par RT-PCR quantitative suite à l'extraction des ARN totaux. Les valeurs représentent la moyenne de trois expériences indépendantes et les différences significatives sont indiquées par un astérisque (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Nous avons ensuite quantifié par RT-PCR quantitative, les niveaux d'expression de Dicer et des gènes viraux d'HTLV-1. Comme précédemment décrit dans les cellules infectées de patients TSP/HAM (Scaria and Jadhav, 2007; Grassmann and Jeang, 2008), le traitement au VPA inhibe fortement et rapidement l'expression d'HBZ dans les cellules ATL et ce de façon concomitante avec la restauration de l'expression de Tax. De façon intéressante, nous trouvons également que sous traitement au VPA et de façon parallèle à l'inhibition de HBZ, l'expression du gène Dicer dans les cellules ATL atteint rapidement un niveau d'expression similaire à celle mesurée chez les asymptomatiques (AC) non traités. Il est important de noter, qu'aucune corrélation significative n'a été trouvée entre l'augmentation de l'expression de Tax et la restauration de l'expression de Dicer dans les cellules leucémiques. Ainsi, le blocage de l'expression de HBZ par le VPA permet de restaurer l'expression de Dicer.

II.5. Conclusion & Discussion

Les mécanismes par lesquels HTLV-1 peut transformer les cellules infectées sont divers et notre compréhension de ces dernières en constante évolution. Les miARN ont émergé comme un facteur important dans la régulation transcriptionnelle de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose, processus communément altérés durant la tumorigénèse. Par conséquent, l'utilisation de la machinerie moléculaire de l'interférence ARN et l'altération des profils de microARN de l'hôte représente un mécanisme important et varié par lequel les virus peuvent faire progresser leur cycle virale, favoriser leur persistance et induire des états pathologies variés. Bien que certains virus oncogéniques tel que le virus Epstein-Barr (EBV) produisent des miARN à partir de leur propre génome (Pichler, Schneider et al., 2008; Yeung, Yasunaga et al., 2008; Bellon, Lepelletier et al., 2009), aucun miARN codé par HTLV-1 n'a été décrit à ce jour suggérant que la perturbation des miARN cellulaires pourrait contribuer au phénotype transformé de la cellule ATL. De nombreux travaux discutent du lien entre HTLV-1 et la modulation des miARN cellulaires et attestent de leur importance dans la prolifération et la survie des cellules infectées par HTLV-1 (Lu, J, Getz, G et al., 2005; Gaur, Jewell et al., 2007). De plus, différents groupes rapportent l'activation et l'inhibition de certains miARN dans les cellules exprimant la protéine virale Tax, cependant il n'est pas clair si cette dérégulation de l'expression des miARN reflète simplement la progression de la cellule vers un caractère

malin ou est déterminante dans l'induction de l'oncogénèse et de la progression vers le stade tumoral.

Hbz est la seule protéine virale dont l'expression est communément retrouvée dans toutes les cellules ATL. En raison de cette caractéristique expressionnelle, nous nous sommes focalisé sur l'effet de cette protéine virale sur la voie des miARN et son rôle dans la pathogénèse de l'ATL. Dans cette étude, nous rapportons qu'HBZ altère fortement l'expression globale (**Figure 45**) et l'activité (**Figure 43**) des miARN en inhibant leur maturation sans changement significatif du niveau des pre-miARN dans la cellule infectées par HTLV-1 (**Figure 46**). Ces résultats concordent avec ceux de Yamagishi et al. (2012) qui rapportent une diminution globale des miARN chez les patients ATL de façon similaire aux observations dans d'autres cancers (Chiosea, Jelezcova et al., 2006; Flavin, Smyth et al., 2008). Notamment, la perte de maturation des miARN, même juste incomplète, cause un changement marqué dans le phénotype transformé des cellules cancéreuses. Ces résultats nous ont amené à investiguer la régulation de la machinerie de biogénèse des miARN dans les lymphocytes T CD4⁺ isolés de patients avec une forme aiguë d'ATL. Par RT-PCR quantitative, nous avons mesurée les niveaux d'expression de plusieurs enzymes essentiels pour la maturation correcte des miARN tels que les endonucléases RNase III Droscha et Dicer, la protéine de liaison à l'ARN double brin DgCR8 qui détermine les sites de clivage du pri-miARN ou les composants du complexe RISC, Ago1 et Ago2. De façon intéressante, nous mettons en évidence que l'expression d'HBZ corrèle avec une forte diminution de l'expression de Dicer dans les cellules chroniquement infectées mais également dans les cellules de patients.

Bien que Dicer lui-même ne sois pas un gène suppresseur de tumeur, une diminution des niveaux d'expression des miARN matures est une caractéristique de la carcinogénèse. En effet, les niveaux élevés d'oncoprotéines, et de protéines impliqués dans l'angiogénèse, l'invasion, la formation de métastases et la prolifération ont été lié à la diminution des niveaux de miARN. Certaines études montre une forte expression de Dicer dans les cancers ovariens et de la prostate (Karube, Tanaka et al., 2005; Chiosea, Jelezcova et al., 2007) cependant beaucoup d'autres rapports ont documenté la réduction de Dicer dans des tumeurs. Dans les carcinomes pulmonaires, les niveaux de Dicer sont plus réduits dans les zones d'invasion et dans les carcinomes avancés, et la diminution des quantités d'ARNm de Dicer a été associée avec une faible survie des patients (Grelrier, Voirin et al., 2009; Pampalakis, Diamandis et al., 2010; Wu, Shen et al., 2011; Wu, Tao et al., 2012). Similairement, dans les

cancers du sein, du foie, ovarien et de la vessie, les niveaux d'ARNm de Dicer sont significativement plus bas que dans les tissus non cancéreux (Karube, Tanaka et al., 2005; Merritt, Lin et al., 2008; Grelier, Voirin et al., 2009; Pampalakis, Diamandis et al., 2010; Wu, Shen et al., 2011; Wu, Tao et al., 2012); une association a également été noté entre les niveaux protéique de Dicer et le stade tumoral, la survie diminuée et un mauvais pronostic (Bazarbachi and Hermine, 1996). Malgré cette quantité d'évidences que les niveaux d'ARNm de Dicer diffèrent dans les tumeurs, la régulation de son expression est malcomprise. Nos expériences indiquent que des séquences reconnus par JunD sont localisées sur toute la région promotrice de Dicer (**Figure 51**) et que JunD est capable de réguler l'expression de Dicer (**Figure 52**). Nous avons été capables de confirmer par immunoprécipitation de la chromatine que l'interaction de JunD avec les séquences promotrices de Dicer (**Figure 53**). La réduction de l'activité promotrice de Dicer lors de l'expression d'HBZ a été montrée par des expériences rapporteuses de l'activité de la luciférase et d'immunoprécipitation de la chromatine qui ont également confirmé la régulation transcriptionnelle de Dicer par le facteur AP-1 JunD dans les cellules T (**Figures 52 et 53**).

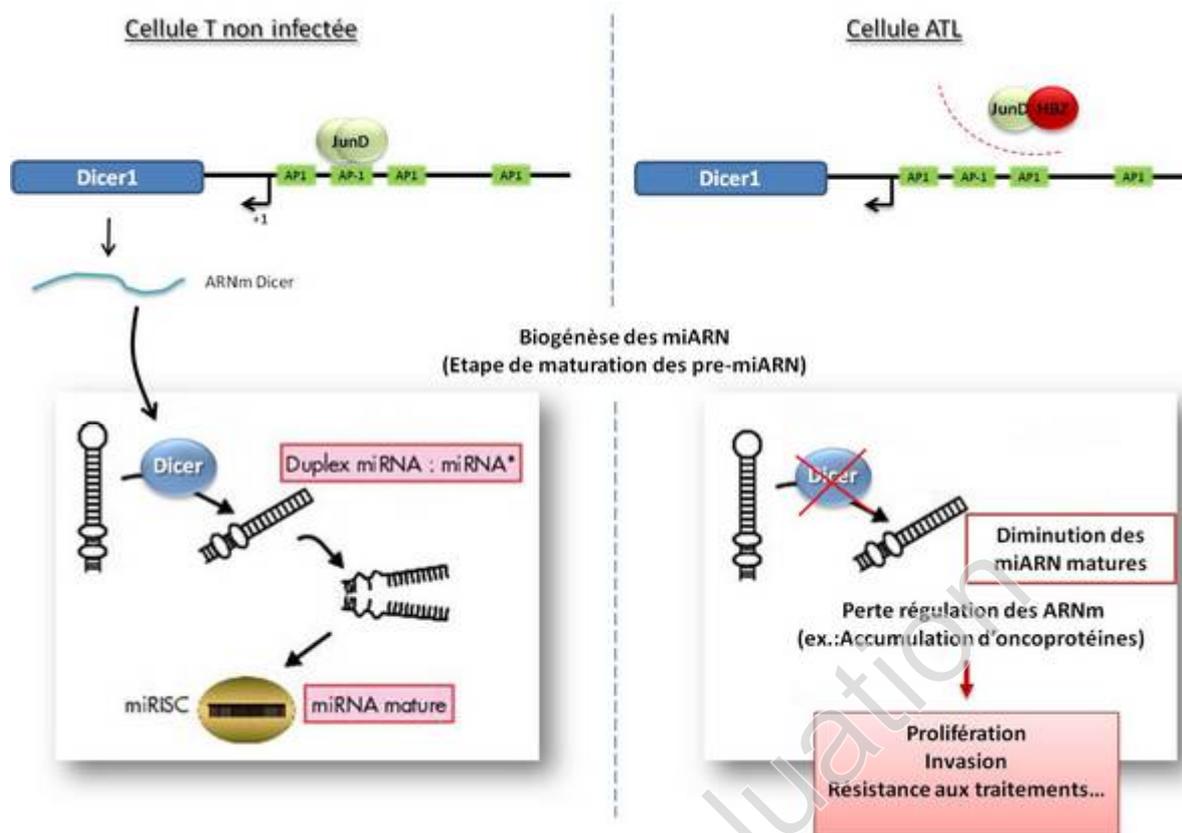


Figure 53 Représentation schématique du mécanisme d'inhibition globale des miARN par HBZ dans les cellules ATL.

En conclusion, nos résultats suggèrent que l'inhibition globale des miARN observée peut être imputée à la protéine virale HBZ et nous proposons un modèle selon lequel la RNase III Dicer serait régulée par les facteurs AP-1, plus précisément JunD qui trans-activerait sa transcription en se fixant sur des sites AP-1 localisés dans le promoteur proximal de Dicer. Dans les cellules ATL, HBZ empêche cette interaction, réduisant ainsi les niveaux d'expression de Dicer et donc de maturation des pre-miARN. Ce mécanisme a pour conséquence la diminution de l'expression des miARN matures et subséquemment la dérégulation de processus cellulaires qui confère des caractéristiques leucémiques à la cellule telles que la prolifération, l'invasion et la résistance aux chimiothérapies (**Figure 55**).

Comme il a été discuté précédemment, l'ATL a un mauvais pronostic avec une médiane de survie moyenne de 13 mois et est réfractaire à toutes les combinaisons de chimiothérapies actuelles. Le caractère incurable de l'ATL est principalement dû à une compréhension partielle de sa base moléculaire, entraînant un manque de cible moléculaire

thérapeutique. Le traitement conventionnel des formes agressives de l'ATL (aigue et lymphomateuse) avec une combinaison de chimiothérapie, en particulier celles désignées pour le traitement des lymphomes agressifs non Hodgkinien ou la leucémie aigue lymphoblastique ont peu d'impact sur la survie à long terme des patients infectés par HTLV-1. Ceci est principalement dû à une chimiorésistance intrinsèque aux cellules tumorales et une importante immunodépression (Song, Wang et al., 2009; Rao, Di Leva et al., 2011; Zhu, Yu et al., 2011; Ma, He et al., 2012; Sun, Yao et al., 2012; Catuogno, Cerchia et al., 2013). Ainsi, l'identification de facteurs et de mécanismes qui sont impliqués dans ces processus est une nécessité. Des évidences expérimentales démontrent que les miARN ont un rôle important dans le mécanisme de résistance aux drogues dans de nombreux cancers (Cawley, Logue et al., 2013). En effet, dans une étude récente, Cawley et ses collaborateurs, montrent que la perte de la biogénèse des miARN induit la résistance à la mort cellulaire induit par le stress du réticulum endoplasmique qui est un mécanisme communément utilisé en chimiothérapie (Bouzar, Boxus et al., 2009). La découverte que HBZ réprime l'expression de Dicer et ainsi contribue à la diminution des niveaux de miARN constitue une dimension importante de l'influence d'HBZ sur la progression de l'ATL. Considérant l'impact d'HBZ sur l'expression de Dicer, il est probable que l'inhibition de l'expression d'HBZ pourrait restaurer la biogénèse des miARN et potentiellement sensibiliser les cellules ATL à la chimiothérapie.

Une nouvelle approche basée sur le principe de la thérapie par activation de gènes a été proposée dans le modèle animal du BLV ou Bovine Leukemia Virus (Achachi, Florins et al., 2005). Le but est d'activer l'expression du génome viral par l'utilisation d'inhibiteurs d'histones déacétylases (HDACi), afin d'exposer toutes les cellules infectées par le virus HTLV-1 aux cellules immunitaires. La molécule candidate pour ces expériences a été l'acide valproïque ou valproate (VPA). Luc Willems et ses collaborateurs ont rapporté l'efficacité de cette molécule dans les cellules lymphoblastoïde transformées par le BLV chez le mouton (Belrose, Gross et al., 2011). Une étude réalisée récemment au sein de notre laboratoire analysant les effets du VPA sur des cellules CD4+ de patients infectées par HTLV-1 a mis en évidence que le VPA avait un effet différentiel sur l'expression des protéines *tax* et *hbz*. En effet, le traitement au VPA a fortement induit l'expression de *tax* et inhibé celle de *hbz* dans cellules de patients infectés par HTLV-1 (Satou, Yasunaga et al., 2006; Arnold, Zimmerman et al., 2008; Yoshida, Satou et al., 2008; Hagiya, Yasunaga et al., 2011). Dans notre étude, le traitement au VPA des PMBC déplétés des CD4+ a induit la restauration de l'expression de Tax chez les patients ATL et réprimer l'expression d'*hbz* (**Figure 54B et D**), similairement à

la cinétique d'expression des protéines virales mesurée par Belrose et al. Nous avons également montré que cette répression d'hbz entraînait la perte d'inhibition de l'expression de Dicer dont l'expression accrue pour atteindre des niveaux similaires à ceux détectés chez les patients non leucémiques. De façon intéressante, la restauration de l'expression de *dicer* suite au traitement par le VPA a également induit une diminution de la charge provirale des patients atteints d'ATL aigue et donc une diminution la prolifération clonale de ces cellules (Figure 52A). La charge provirale est un déterminant majeur de la pathogenèse des infections à HTLV-1. Il est communément admis qu'une diminution prolongée de la charge provirale est susceptible de diminuer le risque de développement d'une des pathologies associés à HTLV-1 ou bien de ralentir la progression de la pathologie dans le cas où elle serait déjà installée. Nos données suggèrent que l'expression de Dicer pourrait être un marqueur pronostic prometteur de l'évolution leucémogène de la cellule infectée et une cible thérapeutique dans l'ATL.

Partie 3

Conclusions générales & Perspectives

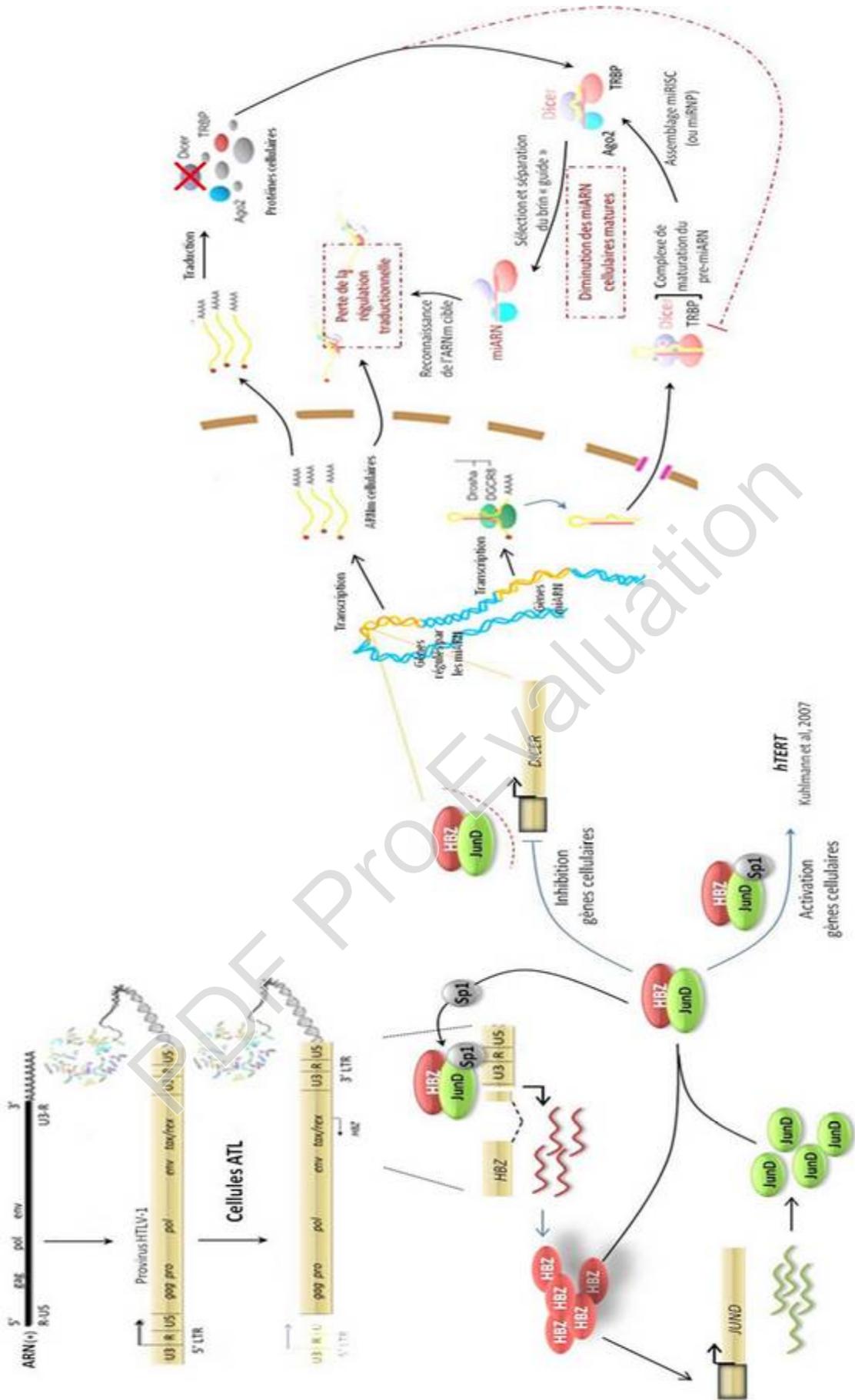


Figure 54 Schéma récapitulatif du Rôle et de la fonction de l'hétéodimère JunD/ HBZ dans l'expression d'HBZ et dans la régulation des miARN cellulaires

Le travail présenté dans ce manuscrit est centré sur la protéine virale HBZ et s'attache à mieux définir les mécanismes de régulation de ce gène durant la phase leucémique et son rôle dans la carcinogénèse induite par HTLV-1.

Dans le premier article présenté dans ce travail, en utilisant un provirus déficient pour le LTR5' qui est l'une des marques de l'évolution leucémogène de la cellule infectée par HTLV-1, nous avons tenté de décrypter les mécanismes de régulation du gène *hbz*. Nous avons ainsi mis en évidence une boucle de rétrocontrôle par HBZ de sa propre expression impliquant les facteurs de transcriptions cellulaires JunD et Sp1 (**Figure 56**). Nos résultats ont mis en lumière que HBZ régule sa propre expression en induisant l'expression de JunD, lequel permet l'association du dimère JunD-HBZ avec les facteurs cellulaires Sp1 et induisant ainsi l'activation de la transcription de *hbz* (**Figure 56**). Nous montrons également que cette augmentation de l'expression de JunD et son hétérodimérisation avec HBZ, est associée avec une activité transformante dans les cellules : une prolifération accrue indépendante de l'ancrage au substrat et des facteurs de croissance (**Figures 39 et 40**). Il serait donc intéressant non seulement d'étudier les mécanismes de régulation de JunD mis en jeu dans les cellules ATL donc en présence d'HBZ, mais également d'approfondir le rôle du tandem HBZ/JunD dans l'évolution de la cellule T infectée vers un phénotype malin et donc la transformation cellulaire.

L'implication d'HBZ dans la prolifération des cellules infectées a été rapportée par de nombreuses études (Yoshida, Satou et al., 2008). Selon une étude récente, l'activité proliférative d'HBZ semble être dépendante de sa forme ARN (Satou, Yasunaga et al., 2006). Il serait intéressant de déterminer dans notre modèle si l'augmentation de la prolifération des fibroblastes était imputable à l'ARN d'*hbz*. Pour répondre à cette question nous avons envisagé une démarche consistant à bloquer la traduction d'*hbz* dans notre lignée cellulaire modèle, les NIH3T3. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus nuancent ceux de Yoshida et ses collaborateurs (2008). (**Figure 57**). En effet, même si un effet de l'ARN n'est pas à exclure, on observe que lorsque l'on exprime de façon stable dans notre modèle cellulaire un mutant d'*hbz* ne pouvant être traduit en protéine (HBZ Δ 2ATG) il en résulte une diminution du nombre de foci formés comparé à l'expression de la forme WT d'*hbz* donc pouvant exprimer l'ARNm et la protéine.

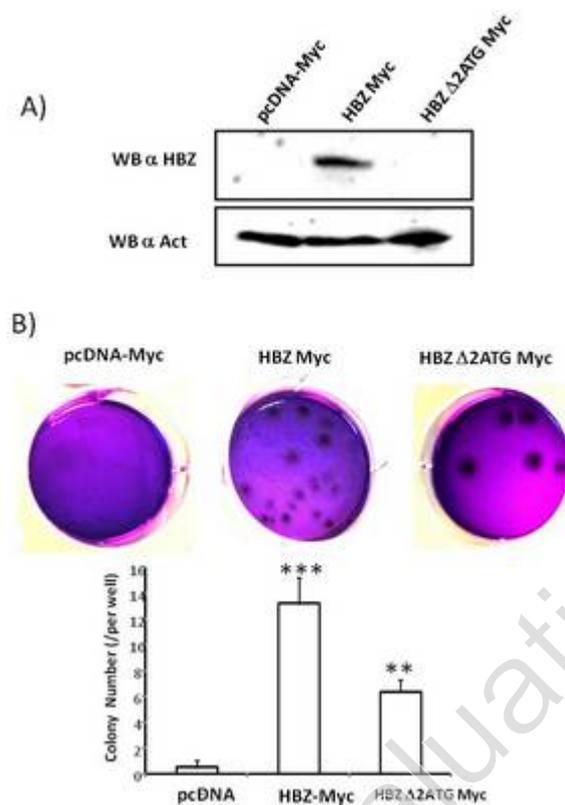


Figure 55 Analyse de la forme d'HBZ impliquée dans la transformation cellulaire (A) Western Blot des NIH3T3 transfectées de façon stable avec les vecteurs d'expression d'HBZ-Myc ou HBZ Δ 2ATG-Myc. (B) La capacité de croissance des NIH3T3-HBZ et HBZ Δ 2ATG indépendamment de l'ancrage a été testé par culture des cellules en soft agar. Après 21 jours de cultures, les colonies formées ont été coloré au crystal violet 0.05%. Le graphe représente la quantification du nombre de colonies formées

De plus l'analyse de la prolifération cellulaire (**Figure 58**) montre que des cellules murines (NIH3T3) exprimant de façon stable le mutant HBZ- Δ 2ATG (qui ne produit pas de protéine) prolifèrent plus que des NIH3T3 contrôles. Cependant nous observons que cette prolifération est moindre lorsque la compare à celle de NIH3T3 exprimant la protéine HBZ sauvage (HBZ WT). Afin de confirmer l'effet prolifératif de la protéine d'HBZ, nous avons obtenue les mutants de Yoshida et al. comportant des mutations silencieuses (HBZ-SM) (Satou, Yasunaga et al., 2006) (**Figure 58**). Ces mutants ont la particularité de produire une protéine HBZ sauvage à partir d'un ARN messenger muté. Afin de comparer ces mutants à nos lignées cellulaires déjà disponible, nous les avons sous cloné dans pcDNA 3.1 Myc. De façon surprenante, les NIH3T3 exprimant HBZ-SM prolifèrent aussi bien que celle exprimant HBZ WT (**Figure 58**). Nos observations indiquent que la forme protéine d'HBZ est importante pour induire la prolifération cellulaire, confortant ainsi nos précédentes observations. De plus,

il apparait, que l'action de la partie codante de l'ARNm ne soit pas indispensable puisque l'altération de cette dernière n'a semble t'il aucun effet significatif sur le taux de croissance des cellules exprimant HBZ-WT comparé à celles HBZ-SM (**Figure 58**). Cependant, on ne peut pas enlever la possibilité que les parties non codantes (UTR5' et UTR 3') de l'ARNm d'HBZ puissent jouer un rôle dans la prolifération des cellules exprimant HBZ. La suite de cette étude consistera à analyser et comparer la capacité de la population NIH3T3 HBZ-SM à former des colonies en milieu semi-solide par rapport à nos autres populations (HBZ-WT et HBZ Δ 2ATG). Afin de confirmer ces données, nous envisageons de réitérer ces expériences dans une autre lignée de fibroblastes murins, les RAT-1 (développé par W.C. Topp) (Topp, 1981).

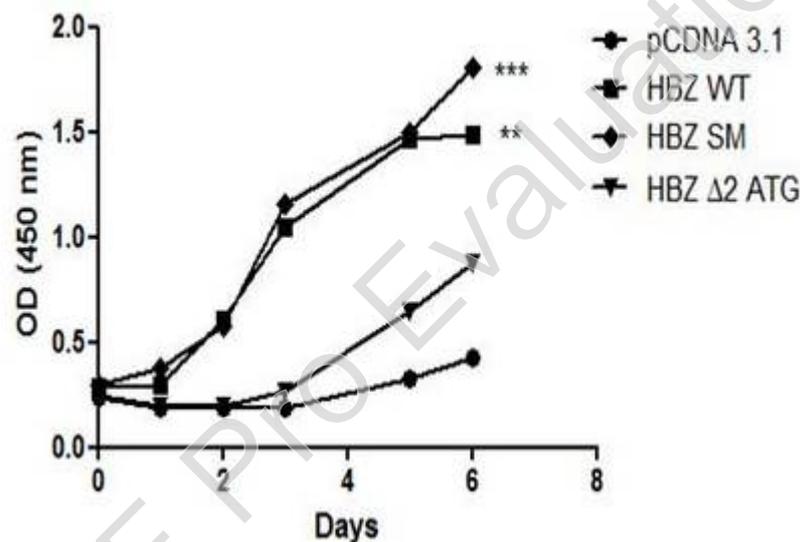


Figure 56 Effet des mutant HBZ sur la prolifération des fibroblastes immortalisés NIH3T3 Les populations NIH3T3 -pCDNA3.1 (contrôle), HBZ-WT HBZ SM et Δ 2ATG ont été cultivé en milieu 2% sérum supplémenté. La prolifération a été mesurée en utilisant le test colorimétrique CCK8 (Dojindo) quotidiennement durant 6 jours. Les différences obtenues lors de la comparaison des cellules exprimant HBZ WT ou SM des cellules Δ 2ATG ont été analysé par le test de variance ANOVA et représenté comme suivant *** $p < 0,0001$.

D'un autre côté nos résultats présentent JunD comme un régulateur positif dans la prolifération des cellules T infectées par HTLV-1. Ils permettent de soutenir l'hypothèse selon laquelle l'activité de JunD pourrait être central dans le model de persistance de HTLV-1. Notion qui est soutenu par les résultats de Kuhlman et al. qui montrent que le dimère

HBZ/JunD est responsable de la réactivation de la télomérase hTERT observé dans les cellules ATL, un autre événement crucial dans la progression tumorale (Neyns, Katesuwanasing et al., 1996; Pollack, Pasquarello et al., 1997; Li, Liu et al., 2002; Li, Dai et al., 2002; Trøen, Nygaard et al., 2004; Hernandez, Floyd et al., 2008). Ceci nous amène à nous interroger sur la régulation de l'expression de JunD dans les cellules ATL.

JunD est un facteur de transcription de la famille AP-1 qui exerce un rôle pivot dans le contrôle de la croissance cellulaire et son activité contribue à des maladies métaboliques, néoplasiques et virales (Hirai, Ryseck et al., 1989). Cette protéine est exprimée dans tous les types cellulaires (Weitzman, Fiette et al., 2000) et JunD est un membre particulier de la famille Jun car il peut induire à la fois des effets positifs et négatifs sur des événements de signalisations (Weitzman, Fiette et al., 2000; Mensah-Osman, Veniaminova et al., 2011). En effet, JunD peut endosser la double casquette d'activateur ou répresseur de l'expression de gènes en fonction du contexte cellulaire, des partenaires protéiques et des gènes cibles (Hirai, Ryseck et al., 1989; Kameda, Watanabe et al., 1997; Weitzman, Fiette et al., 2000; Zhou, Gao et al., 2007; Hernandez, Floyd et al., 2008). Il n'est donc pas étonnant que le contrôle précis de l'expression de JunD et de ses interactions protéine-protéine module l'angiogénèse, la différenciation, la prolifération et l'apoptose (Hernandez, Floyd et al., 2008). Contrairement aux autres membres de la famille AP-1, l'expression de JunD est principalement régulée selon un mécanisme post-transcriptionnel (Hernandez, Floyd et al., 2008). En effet, il a été montré que le promoteur de JunD est constitutivement activé et que par conséquent l'abondance de la protéine JunD est régulée selon un mécanisme sous-jacent à la transcription (Hernandez, Floyd et al., 2008). Malgré leur rôle majeur dans l'expression des gènes, les régulations post-transcriptionnelles ne sont étudiées que depuis peu. Les investigations sur JunD ont révélé des caractéristiques complexes de son transcrite qui implique des mécanismes régulateurs spécialisés (de Groot, Meijer et al., 1991; Berger and Shaul, 1994). Ces mécanismes sont le plus souvent guidés par des structures particulières de l'ARNm, dans ses régions UTR (UTR 5' et UTR 3'), qui peuvent être reconnues par des complexes protéiques.

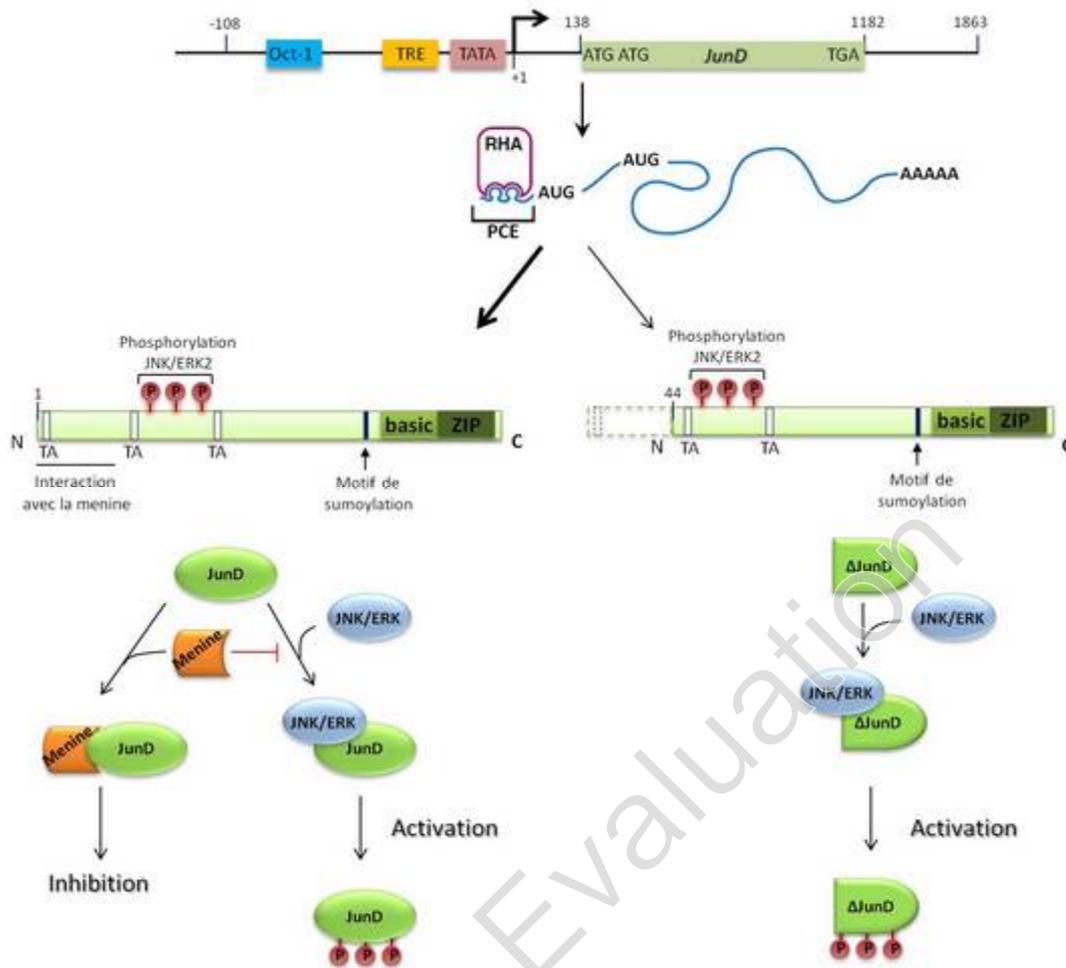


Figure 57 Représentation schématique du gène *jund* et des isoformes JunD-FL et Δ JunD. Le site de liaison de la ménine est localisé dans les 44 premiers acides aminés dans la partie N-terminale de JunD-FL, tronquée dans Δ JunD. TA : domaine de transactivation, ZIP : leucine zipper et région basique responsable de l'interaction avec l'ADN (Adapté de Hernandez, Flyod et al, 2008).

Le promoteur de JunD contient plusieurs séquences cis-acting homologues, dont un motif CRE, TRE et octamer (Oct-1) lequel est reconnu par des facteurs de transcription de la famille Oct (**Figure 59**). Le niveau d'activation basal du promoteur JunD est réalisé par le motif Oct-1, et le promoteur est positivement autorégulé par la protéine JunD via la séquence TRE (Berger and Shaul, 1998). L'autorégulation de JunD est induite en condition de faibles concentrations de sérum (Lallemand, Spyrou et al., 1997), un résultat qui corrèle avec les niveaux élevés d'expression de JunD dans les cellules quiescentes (Okazaki, Ito et al., 1998).

L'ARNm de JunD présente un UTR 5' long (plus de 100 nt) riche en GC, prédit comme étant hautement structuré, dont il a été montré l'importance pour la régulation de l'expression du ratio des 2 isoformes prédominants de la protéine JunD (Okazaki, Ito et al., 1998; Short and Pfarr, 2002) (**Figure 59**). En effet, l'un des mécanismes régulant l'expression de JunD est l'initiation alternative de la traduction au niveau de l'UTR 5' de l'ARNm et résulte en la formation de 2 isoformes distincts dans le même cadre de lecture, JunD-FL (une protéine de 39 kDa) et Δ JunD (une protéine de 34kDa) qui orchestrent des interactions protéine-protéine différentes (Yazgan and Pfarr 2002) (**Figure 59**). Les deux isoformes interagissent avec les kinases Jun en N-terminal (JNK), cependant en raison d'une plus grande affinité, JunD-FL est beaucoup plus phosphorylé par les JNK que Δ JunD (Agarwal, Guru et al., 1999; Yazgan and Pfarr 2002). De plus, JunD-FL est régulé par la protéine suppresseur de tumeur Menine laquelle supprime son activité transcriptionnelle. De façon intéressante, la Ménine n'interagit pas et donc n'affecte pas l'activité de l'isoforme plus courte Δ JunD (Yazgan and Pfarr 2002) (**Figure 59**). En effet, le domaine de liaison de la menine qui est localisé au niveau des premiers 48 acides aminés de JunD-FL, est tronqué dans l'isoforme Δ JunD (Yazgan and Pfarr, 2001; Yazgan and Pfarr 2002). Ces interactions ont pour conséquence des différences transcriptionnelles *in vivo* (Nishina, Sato et al., 1990; Kameda, Akahori et al., 1993).

L'analyse par qRT-PCR de l'expression des différents facteurs de transcriptions AP-1 dans lignées infectées par HTLV-1 et dans les cellules de patients développant une ATL confirment nos résultats obtenus dans les NIH3T3 et montrent une forte expression de *jund* dans les cellules T infectées exprimant HBZ et dans les cellules de patients développant une ATL (**Figure 60**). Au niveau protéique, nos résultats préliminaires suggèrent que HBZ induirait de façon dose dépendante l'expression de la forme constitutivement activé de JunD, Δ JunD (**Figure 61**). Il semblerait que HBZ module de façon différentielle l'expression des deux isoformes de JunD contournant ainsi l'inhibition induite par la ménine. Ces données restent à confirmer dans des cellules T CD4+ primaires et soulèvent de nouvelles interrogations notamment sur le mécanisme moléculaire impliquée dans cette expression différentielle. De plus, il serait intéressant de comparer l'effet de l'expression de JunD et Δ JunD en association avec HBZ sur la prolifération cellulaire. Cette analyse permettrait de mieux appréhender les conséquences de cette induction différentielle.

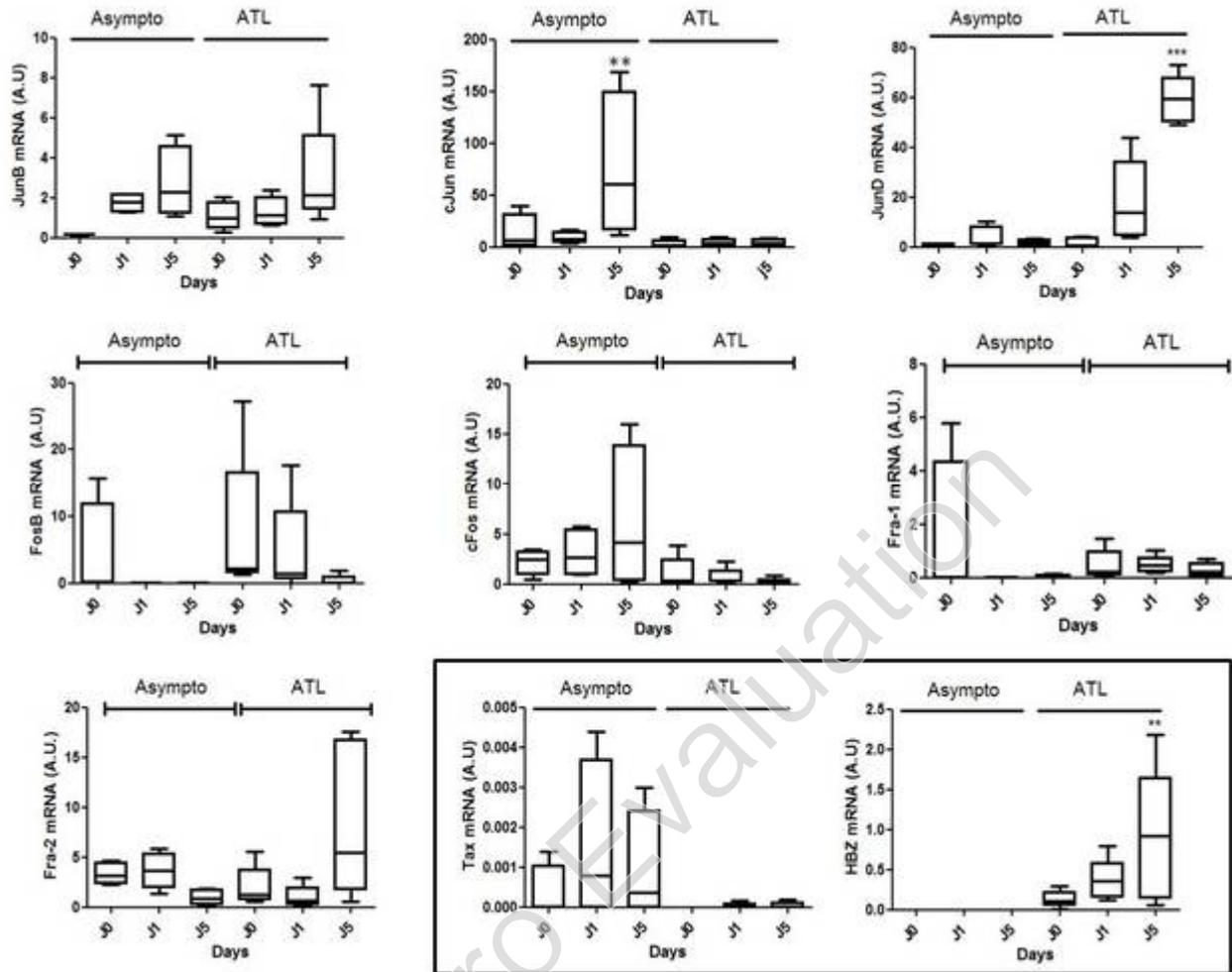


Figure 58 Analyse de l'expression des gènes AP-1 dans les cellules de patients. L'expression relative des gènes AP-1 et des gènes viraux d'HTLV-1 Tax et HBZ a été mesurée par RT-PCR quantitative dans les PBMC de quatre patients asymptomatiques (Asympto, Asymptomatic carriers) et six patients avec une ATL aigüe (ATL). Les valeurs présentées sont la moyenne de trois expériences indépendantes et les différences significatives sont représentées par des astérisques.

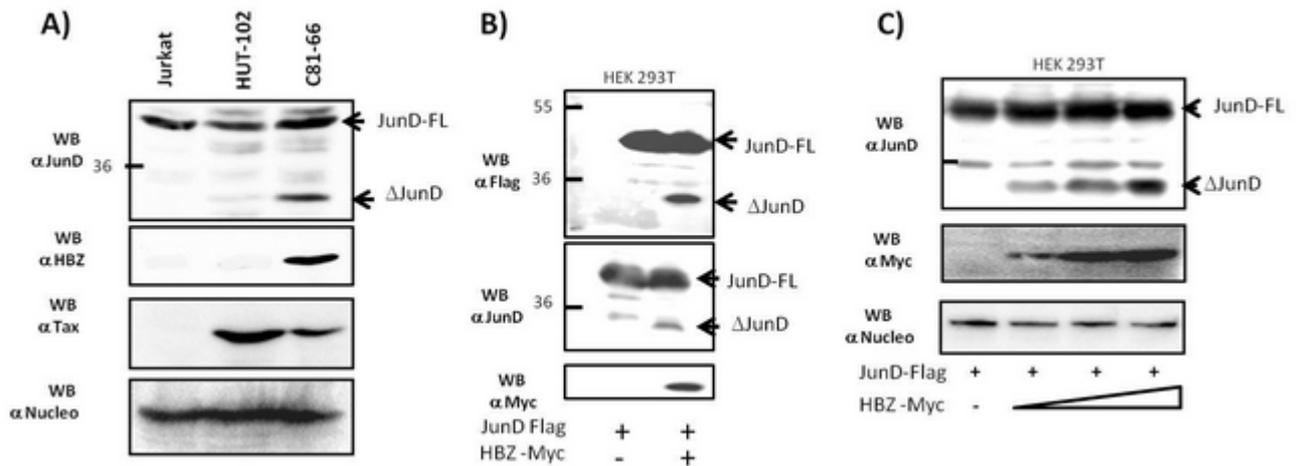


Figure 59 HBZ induit l'expression de la forme constitutivement activé de JunD. (A) Analyse de l'expression de JunD dans les différentes lignées cellulaires infectées ou non. Après la lyse cellulaire, les extraits protéiques totaux ont été séparés sur gel SDS-PAGE. La nucléoline a été utilisée comme contrôle. (B et C) Analyse de l'effet d'HBZ sur l'expression de JunD par western blot dans les HEK293T co-transfectées JunD-Flag et HBZ-Myc à une concentration donnée (B) ou à concentration croissante de HBZ-Myc (1, 2 et 3µg).

Lors de l'analyse par qRT-PCR des protéines AP-1 dans les PBMC de patients, on observe en plus de cette augmentation de l'expression de *JunD*, une élévation de celle du gène *FRA2* (Figure 60). Des études précédentes ont mis en évidence FRA-2 comme étant un facteur oncogénique dans les fibroblastes embryonnaires de poulet (CEFs, chicken embryonic fibroblasts) et un partenaire essentiel pour l'activité oncogénique spontanément acquise de mutants JunD isolés dans les CEFs (Nakayama, Hieshima et al., 2008; Ramsay and Gonda, 2008; Nakayama, Higuchi T et al., 2012). Des résultats concordants avec nos données de qRTPCR, obtenus dans une étude précédente par Nakayama et ses collaborateurs ont relevé une forte expression de *FRA2* et *JunD* dans les cellules ATL. Ils ont également montré l'implication de ces deux protéines AP-1 dans le processus oncogénique via l'augmentation de l'expression de proto-oncogènes tels que l'ubiquitine ligase E3 MDM2, un régulateur négatif de p53 ou encore le proto-oncogène MYB (Yamagishi, Nakano et al., 2012). Ces données viennent conforter notre axe de recherche sur le tandem JunD/HBZ et ouvre une voie à l'exploration d'un éventuel effet d'HBZ sur la protéine FRA2 afin de mieux comprendre les mécanismes oncogéniques mis en place par le virus HTLV-1 durant les phases tardives et plus précisément lors du passage du stade de la cellule pré-leucémique à la cellules leucémogène.

Dans la deuxième partie de mon travail de thèse, nous nous sommes penchés sur le rôle d'HBZ dans la carcinogénèse induite par HTLV-1. Nous nous sommes demandé si HBZ ne jouerait pas un rôle dans la forte diminution globale des micro-ARN (miARN) cellulaires observée dans les cellules ATL par Yamagishi et ses collaborateurs (Pichler, Schneider et al., 2008; Tomita, Tanaka et al., 2009; Rahman, Quann et al., 2012; Van Duyne, Guendel et al., 2012; Sampey, Van Duyne et al., 2012). Nous montrons que via son interaction avec JunD, HBZ réprime l'expression de la RNase III, Dicer dans les cellules ATL, altérant ainsi la maturation d'une grande partie des miARN cellulaires (**Figure 56**).

Au cours de notre étude nous avons analysé les miARN connu comme étant dérégulés dans les cellules infectées par HTLV-1 et notamment par Tax. En effet plusieurs études ont montré que lors de la phase pré-leucémique, Tax dérégule un certains nombre de miARN (Kumar, Lu et al., 2007). Dans le tableau 5, je résume les caractéristiques et les cibles cellulaires principales des différents miARN ainsi que l'effet différentiel des protéines virales Tax et HBZ.

miARN cellulaires	Effet de Tax	Effet de HBZ	ARNm cibles
miR Let 7a-c	augmentation	inhibition	CDC25 / CDK6
miR 16	inhibition	inhibition	CDK6 / Cyclin E1
miR 20	augmentation	inhibition	p21 ^{waf} / E2F1
miR 21	augmentation	inhibition	PTEN / p53
miR 31	augmentation	inhibition	NIK / FoxP3
miR 93	augmentation	inhibition	p21 ^{waf} / E2F1
miR 125a	augmentation	inhibition	ERBB2 / p53
miR 132	inhibition	inhibition	p300
miR 143	augmentation	inhibition	PKA / ERK5
miR 146a	augmentation	augmentation	TRAF6 / NF- κ B
miR 155	augmentation	augmentation	TP53/INP1/ SOCS1
miR 200	augmentation	inhibition	ZEB1
miR873	inhibition	inhibition	p300

Tableau 5 Liste de miARN dérégulées dans les cellules infectées par HTLV-1 et des effets de Tax et HBZ sur leurs expressions (Adapté de Samprey, Van Duyne et al, 2012)

De façon générale, comme pour de nombreux gènes cellulaires, HBZ antagonise l'effet de Tax. Alors que Tax active plutôt la voie canonique de biogénèse des miRNAs cellulaires, nos résultats montrent qu'HBZ réprime cette même voie. Il est donc probable que cette diminution de la voie canonique de biogénèse des miARN cellulaires soit une caractéristique du passage de la cellule pré-leucémique vers un stade leucémogène. Une expression dérégulée des miARN et de Dicer (Calin, Liu et al., 2004) a été démontré dans de nombreux types de cancers, incluant la leucémie lymphocytaire chronique (Takamizawa, Konishi et al., 2004), le cancer des poumons (Michael, O' Connor et al., 2003), la néoplasie colorectale (Roldo, Missiaglia et al., 2006), et les tumeurs pancréatiques (Huang J, Wang et al., 2007; Wang, Ye et al., 2009; Houzet and Jeang, 2011). Par conséquent, la compréhension des mécanismes qui contrôlent l'expression des miARN dans les cancers et leurs conséquences fonctionnelles pourrait améliorer la classification, le pronostic prévisionnel et le traitement des cancers. Il serait donc nécessaire de confirmer nos résultats en analysant le profil d'expression de ces

microARN dans les PBMC CD4+ de patients ayant développés une ATL versus les patients asymptomatiques.

En plus de leurs implications dans de nombreux processus cellulaires, les miARN ont également une activité antivirale via le ciblage des transcrits viraux (Huang, Wang et al., 2007; Wang, Ye et al., 2009). Certains miARN en interagissant avec l'UTR 3' du HIV-1 influent sur la capacité du virus à infecter les cellules T CD4+, les monocytes et les macrophages (Hakim, Alsayari et al., 2008; Ruggero, Corradin et al., 2010). Une autre explication à cette inhibition des miARN induite par HBZ est sans doute dans un souci de défense du virus contre l'action des miARN. Des études menées dans ce sens ont montré que ces régulateurs géniques cibleraient certains transcrits HTLV-1 dont le transcrit HBZ (Vesely, Staber et al., 2009; Tili, Michaille et al., 2010) (**Figure 25**). Parallèlement on peut également s'interroger sur une dérégulation de la biogénèse des miARN par HTLV-1 en raison d'une inhibition des partenaires cellulaires des protéines virales. En effet, dans notre cas précis, il est probable que JunD soit un gène cible des miARN et que son inhibition aurait probablement un impact significatif au cours de l'infection par HTLV-1, au vue de l'importance du tandem JunD/HBZ durant la transition leucémique. De façon intéressante et en concordance avec la littérature, l'analyse par bioinformatique de l'UTR 3' du transcrit de JunD confirme cette hypothèse et montre que cette région est la cible d'une vingtaine de microARN (Merritt, Lin et al., 2008; Mezzanzanica, Bagnoli et al., 2010; Kuang, Cai et al., 2013). Cette présence de sites de fixation des miARN au niveau de l'UTR 3' de JunD et d'HBZ nous amène à nous demander si l'expression d'HBZ et de JunD ne serait également régulé par les miARN et que la dérégulation de ces derniers ne serait pas un mécanisme permettant de préserver leurs expressions dans la cellule infectée par HTLV-1. L'analyse de l'activité des miARN endogènes sur le 3'UTR de JunD en clonant en aval du gène de la luciférase le 3'UTR de JunD a donc été réalisée (**Figure 62A**). Le transcrit chimérique ainsi sous la régulation des miARN ciblant le 3'UTR de JunD est inhibé comparé aux cellules contrôles ce qui se traduit par une régulation de JunD par les miARN cellulaires (**Figure 62B**). Nous avons ensuite évalué cet effet des miARN en présence de HBZ et les résultats obtenus montrent une perte de la régulation du transcrit chimérique par les miARN dans les cellules exprimant HBZ, confirmant nos données précédentes sur l'effet inhibiteur de HBZ sur l'activité des miARN endogènes (**Figure 62B**). Au vue de ces résultats, il semblerait donc que l'action de HBZ sur les miARN favorise l'expression de JunD. Les analyses sont en cours afin d'étudier l'effet des miARN sur le 3'UTR du transcrit HBZ.

Outres la mise en évidence d'un mécanisme pouvant expliquer la diminution globale des miARN cellulaires dans les cellules ATL, nos données indiquent que Dicer est potentiellement un marqueur pronostic de l'évolution de la pathogénèse dans les cellules ATL. Il semblerait donc que *dicer* soit un gène pertinent à étudier dans les cellules ATL à plusieurs niveaux.

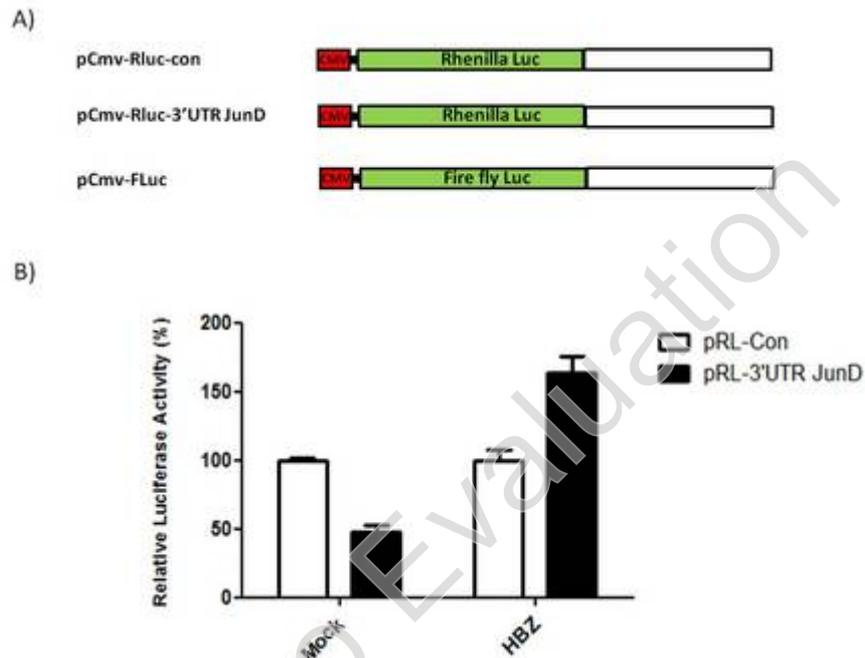


Figure 60 Effet des miARN endogènes sur le 3'UTR de JunD. Les cellules HEK 293T wt ou exprimant de façon transitoire HBZ ont été transfectées avec le vecteur rapporteur de l'expression de luciférase Renilla arborant ou non le 3'UTR de JunD. Les activités de la luciférase rénilla-3'UTR JunD (pRL-3'UTR JunD) dans les cellules sont exprimées par rapport aux activités mesurées du rapporteur de la luciférase Renilla contrôle (pRL-con) (fixé à 100%). Les valeurs luciférase obtenue ont été mesuré 48h après transfection et normalisées par les activités de la luciférase Firefly mesurées (contrôle de transfection). Les valeurs indiquées représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

Tout d'abord d'un point de vue clinique où il apparait qu'une faible expression de Dicer est un facteur de mauvais pronostic et de résistance aux chimiothérapies (Lezin, Gillet et al., 2007; Lezin, Olindo et al., 2009). Dans notre étude nous montrons que le taux d'ARNm de *dicer* peut être associé à l'évolution leucémogène de la cellule puisqu'un faible taux de *dicer* n'est détecté que dans les cellules ATL comparée aux cellules de patients asymptomatiques. Il semblerait important de pouvoir confirmer ces résultats sur des séries plus conséquentes de patients. Si ces résultats sont confirmés, la recherche du taux

d'expression de Dicer pourrait alors devenir une analyse réalisée en anatomie pathologique dans le but de dresser un profil précis et personnalisé des patients. Par ailleurs, nous montrons que l'inhibition de l'expression de *hbz* par le traitement au VPA restaure l'expression de Dicer dans les cellules ATL ce qui entraîne une diminution de la charge provirale caractéristique de la prolifération des cellules infectées. Au vue de ces résultats, il est probable que l'activité transformante induite par l'expression de HBZ passerait également par la dérégulation de la voie de biogénèse des miARN conduisant à l'augmentation de la prolifération des cellules infectées. Il serait nécessaire d'analyser les profils d'expression des miARN suite au traitement des cellules au VPA afin de confirmer la restauration de l'expression des miARN. De plus, nous aurions alors la possibilité de re-sensibiliser les cellules ATL aux traitements chimiothérapeutiques et ainsi améliorer les traitements actuels qui sont inefficaces avec un taux moyen de survie inférieur à 5% à 5 ans.

La protéine HBZ est essentielle au virus pour l'établissement de la latence qui passe par l'élimination des protéines virales immunogéniques tel que Tax et Gag et ainsi l'échappement au système immunitaire. Le VPA est un régulateur épigénétique qui inhibe les histones déacétylases (HDAC) et ainsi favorise l'expression de gènes. Son utilisation a été proposée pour activer transitoirement l'expression virale et ainsi exposer le réservoir de virus latents à la destruction immune (Belrose, Gross et al., 2011). Dans le cas du virus HTLV-1, le VPA inhibe l'expression d'*hbz* et de façon concomitante favorise la réexpression de *tax* et des autres ARNm viraux sens tel que *gag* dans les cellules infectées (Zhao and Matsuoka, 2012) (**Figure 54 C et D**). Ces résultats supportent l'hypothèse d'un contrôle négatif de la transcription sens exercée par HBZ (Schneider, Schwenk et al., 1977) et de son relâchement potentiel si l'expression d'*hbz* est inhibée. Une étude en cours de soumission réalisée au sein de notre laboratoire étudiant l'impact du VPA sur les PBMC de patients ATL confirme nos données sur l'effet d'HBZ sur la prolifération en montrant que la perte d'*hbz* concomitante au traitement des cellules par le VPA est associée avec un ralentissement de la prolifération cellulaire dans les échantillons de patients ATL. En effet l'analyse en cytométrie en flux de la prolifération des cellules ATL en culture montre que le traitement au VPA abolit le doublement des PBMC CD4⁺ leucémiques. Ces résultats montrent l'importance d'HBZ et son rôle crucial dans l'échappement au système immunitaire et dans la prolifération des cellules ATL.

Depuis la découverte d'HBZ, son implication dans les processus oncogéniques est une aire de recherche en pleine expansion. A ce jour, les études ont démontré que le potentiel oncogénique d'HBZ passe par la modulation d'une variété de voies de signalisation cellulaires impliquées dans la croissance cellulaire, la réponse immune et la différenciation des cellules T. Nos données viennent étayer ces études en montrant un rôle central d'HBZ dans l'oncogénicité du virus HTLV-1 en dérégulant la voie canonique de biogénèse des miARN cellulaires, suggérant ainsi un mécanisme expliquant la diminution globale de l'expression de ces régulateurs dans les cellules ATL. De plus, nos données mettent en avant le facteur AP-1, JunD comme un partenaire d'interaction privilégié de la protéine HBZ avec une place centrale dans la leucémogénèse.

En conclusion, notre étude ouvrent de nombreuses voies permettant de mieux comprendre l'activité transformante de HBZ mais également de nouvelles voies de recherche pour la mise au point de traitements plus efficaces pour lutter contre la résistance des cellules ATL.

Partie 4

Matériels & Méthodes

PDF Pro Evaluation

A. Matériels

I. Les cellules

I.1. Les cellules eucaryotes

Lors de ma thèse, plusieurs lignées cellulaires ont été utilisées. Les cellules en suspension comme les Jurkat, les CEM, les HUT102, les C81-66 et les ATL-2 ont été cultivées dans un milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) contenant de la glutamine (GlutamaxTM) (Gibco-Invitrogen) systématiquement additionné de 10 % de sérum de veau foetal (SVF) (Hyclone) avec 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (Life Technologies). Les cellules adhérentes, HEK293T, NIH 3T3 et MEF JunD wt ou KO ont quant à elles été cultivées dans un milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) avec Ultraglutamine (Gibco-Invitrogen), supplémenté de 10 % SVF, 100 U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine. Les différents types de cellules ont été maintenus à 37°C en présence de 5 % de CO₂.

I.1.1. Les cellules en suspension

I.1.1.1. Les lignées cellulaires non infectées par HTLV-1

Jurkat (ATCC : Jurkat, clone E6-1) est une lignée lymphocytaire T, établie à partir du sang périphérique d'un garçon de quatorze ans atteint d'une leucémie T (Foley, Lazarus et al., 1965).

CEM (ATCC : CCRF-CEM) est une lignée lymphoblastoïde T, issue du sang périphérique d'une fille caucasienne de quatre ans atteinte d'une leucémie lymphoblastique T aiguë (Cohen, Broder et al., 1977).

I.1.1.2. Les lignées cellulaires infectées par HTLV-1

HUT102 est une lignée lymphocytaire T issue de cellules ganglionnaires d'un patient de 26 ans diagnostiqué pour avoir une forme agressive de lymphome cutané à cellules T, avec une phase leucémique (Miyoshi, Yoshimoto et al., 1981).

C81-66 est une lignée lymphocytaire T établie par co-culture entre les lymphocytes du cordon ombilical d'un garçon avec les lymphocytes du sang périphérique d'un patient atteint d'une leucémie T de l'adulte (Miyoshi, Yoshimoto et al., 1981).

ATL-2 est une lignée lymphocytaire T établie par co-culture entre les lymphocytes du cordon ombilical d'un garçon avec les lymphocytes du sang périphérique d'un patient atteint d'une leucémie T de l'adulte (Shimoyama, 1991).

I.1.1.3. Les cellules de patients

Nous avons inclus dans l'étude 11 patients dont 4 porteurs asymptomatiques, infectés par HTLV-1 mais ne développant pas de maladies et 7 patients infectés atteints d'une leucémie T de l'adulte dont 6 présentent une forme aiguë et 1 une forme chronique de la maladie. Les patients ont reçu une information écrite et ont donné leur consentement écrit. Les cas d'ATL ont été diagnostiqués selon des caractéristiques cliniques, des résultats hématologiques, la présence du provirus HTLV-1 dans les cellules leucémiques et la détection d'anticorps anti-HTLV-1 dans le sérum des patients. Les différents sous-types cliniques ATL ont été identifiés selon les critères JLSG (Weitzman, Fiette et al., 2000). Les porteurs asymptomatiques d'HTLV-1 ne présentaient aucuns signes pathologiques (hématologiques ou neurologiques). Le tableau 1 résume les caractéristiques des patients inclus dans l'étude.

Les prélèvements de sang périphérique ont été obtenus à l'occasion de détermination de la charge provirale HTLV-1 et les volumes résiduels ont été traités au niveau de la banque Neuro-Virothèque du Centre de Ressources biologiques de la Martinique (CeRBIM). Les échantillons du sang périphérique des patients ont été utilisés en accord avec les lois bioéthiques françaises à propos des collections biologiques.

Caractéristiques		Nombre (%)
Sexe	Homme	1
	Femme	6
Age moyen, Année		50 ± 16
Statut clinique	Asymptomatiques	4 (36,4%)
	ATL chronique	1 (9,1%)
	ATL aigue	6 (54,5%)

Tableau 6 Données clinicopathologiques des patients

I.1.2. Les cellules adhérentes

HEK293T (ATCC : HEK293T/17) est une lignée cellulaire qui dérive des cellules embryonnaires rénales humaines. Ces cellules sont transformées par l'antigène T de SV40 (Graham, Smiley et al, 1977).

NIH 3T3 (ATCC : CRL-1658) est une lignée de fibroblastes immortalisés qui a été établie à partir de cultures d'embryons de souris. Ces cellules possèdent une grande sensibilité à l'inhibition de contact.

MEF JunD wt ou JunD KO sont des fibroblastes isolés à partir d'embryons de souris normales (wt) ou de souris dont le gène *jund* a été délété respectivement. Ces cellules nous ont été généreusement données par le Dr Mechta-Grigorious (Cavanagh, Landry et al., 2006).

I.2. Les cellules procaryotes

Pour les clonages et les productions de plasmides, la souche bactérienne électrocompétente DH5 α a été utilisée. DH5 α est une souche d'*Escherichia coli* utilisée en routine pour le clonage et l'amplification de plasmides. Ces bactéries ont été cultivées dans un milieu LB (Luria Broth-Sigma) sous agitation à 220 rotations par minute (rpm) à 37°C.

Génotype des DH5 α : *fhuA2* Δ (*argF-lacZ*)*U169 phoA glnV44* Φ 80 Δ (*lacZ*)*M15 gyrA96 recA1 endA1 thi-1 hsdR17*

I. Les anticorps

1. Les anticorps primaires

- Anti-JunB (C-11) : anticorps monoclonal de souris (Santa Cruz Biotechnology)
- Anti-cJun (H-79) : anticorps polyclonal de lapin (Santa Cruz Biotechnology)
- Anti-JunD (329) : anticorps polyclonal de lapin (Santa Cruz Biotechnology)
- Anti-Actine: anticorps murin (Sigma)
- Anti-cMyc (9E10) : anticorps monoclonal de souris (Santa Cruz Biotechnology)
- Anti-C23 (MS-3) (nucléoline) : anticorps monoclonal de souris (Santa Cruz Biotechnology)
- Anti-Dicer (A301-937A): anticorps polyclonal de lapin (Bethyl laboratories)
- Anti-HBZ : anticorps polyclonal de lapin reconnaissant le domaine bZIP d' HBZ (Gaudray, Gachon et al, 2002)

2. Les anticorps secondaires

- Anticorps anti-souris conjugué à la peroxydase (GE Healthcare)
- Anticorps anti-lapin conjugué à la peroxydase (GE Healthcare)

II. Les plasmides

- K30-3'asLuc : système rapporteur où le gène de la luciférase a été introduit à la place du gène HBZ construit à partir du vecteur K30-3'/5681 (Landry, Halin et al., 2009).
- K30-3' asLuc 21PMD : système rapporteur dans lequel, la séquence LTR3' du K30-3' as Luc a été remplacé avec un LTR muté au niveau des répétitions TRE1 (Cavanagh, Landry et al., 2006).
- K30-3'/4089: construction dérivée de l'ADN du provirus K30 dont les segments 3' en positions 4089 à 9043 ont été sous clonés dans le vecteur pBlueScript KS (Yoshida, Satou et al., 2008).
- pGL4-3'LTR: système rapporteur où le gène de la luciférase a été introduit sous le contrôle du promoteur antisens du gène *hbz* wt (LTR 300 position -354 to -54) ou muté au niveau des sites SP1 (LTRsp(x)mut). Ces plasmides nous ont été généreusement donnés par le Pr Masao Matsuoka (Yoshida, Satou et al., 2008).
- pActin-βgal: vecteur d'expression, utilisé en co-transfection pour normaliser les activités enzymatiques obtenues par la mesure de l'activité β-galactosidase dans les extraits cellulaires

- pCMV-FLuc : vecteur d'expression, utilisé en co-transfection pour normaliser les activités enzymatiques obtenues par la mesure de l'activité luciférase dans les extraits cellulaires
- pcDNA3.1 : vecteur vide, utilisé pour équilibrer la quantité d'ADN lors des transfections
- pcDNA3.1-Myc-His A: vecteur d'expression de la protéine HBZ (Hivin, Arpin-André et al., 2006) et des mutants HBZ (LXXAA)₂, ΔZIP et Δ2ATG (mutation des deux ATG du gène *hbz*).
- pcDNA-JunB: vecteur d'expression de la protéine AP-1 JunB utilisé lors de la transfection des HEK293T (Hivin, Arpin-André et al., 2006)
- pcDNA-cJun : vecteur d'expression de la protéine AP-1 cJun utilisé lors de la transfection des HEK293T (Thebault, Basbous et al., 2004)
- pCMV JunD-Flag: vecteur d'expression de la protéine AP-1 JunD avec un tag Flag (Dehee, Cesaire et al., 2002)
- pGFP-V-RS shARN JunD (TG312046): vecteur d'expression du shARN ciblant la protéine JunD humaine (Origene)
- p-RS shARN JunD (TR501140): vecteur d'expression du shARN ciblant la protéine JunD de souris (Origène)
- pCR3 : vecteur d'expression de la protéine SP1 wt et du mutant SP1 Zn2 Ces plasmides nous ont été généreusement données par le Dr Yann Leverrier (Deniaud E, et al. 2009)
- pcHTLV-ALB : Ce plasmide correspond à une portion de l'intron 12 du gène de l'albumine humaine (positions 15758-16940, numéro d'accèsion GenBank M12523) et de la région du gène *pol* d'HTLV-1 située entre les positions 4708 et 4953 (numéro d'accèsion GenBank J02029) cloné dans un vecteur pcDNA3.1 (Levy, Khaled et al., 2010)
- pCMV-RL-con, pCMV-RL-let7, pCMV-FL : Les luciférases renilla (RL) ou firefly (FL) ont été placés sous contrôle du promoteur pCMV par insertion de leurs régions codantes dans un vecteur pCIneo (Promega). Le rapporteur RL dont l'expression est contrôlée par le miARN endogène let7a a ensuite été construit par insertion d'un site let7a de complémentarité parfaite (ACTATAACAACCTACTACCTCA) en 3'UTR du pRL-con. Ces plasmides nous ont été généreusement donnés par le Pr Anne Gatignol.
- pGL3-proxDicer-Luc : système rapporteur de l'expression de Dicer où le gène de la luciférase a été introduit sous le contrôle du promoteur proximal du gène *dicer* (Gessain and Cassar, 2012)

III. Les amorces

Primer	SENS	ANTISENS
qRT-PCR		
Drosha	TCTCTGGAAAGGTCCTACAAAAA	CAGGTTCAAGGAACAACCGATA
Dgcr8	AAAACCTTGCGAAGAATAAAGCTG	TCTGTTTAACAAAGTCAGGGATGA
Exportin-5	TATATACTCTCCGCCGCACA	GCCTCTTCAGAAAGACGTAGTGT
Dicer1	GTGGTTCGTTTTGATTTGCC	CGTGTTGATTGTGACTCGTGGA
Ago2	GACACGAAAATCACCCACCC	AGGACGTGATAGTGCGAAGG
Ago3	TGTGGGCTATCGCTTGTTTT	TGTGGGCTATCGCTTGTTTT
Tax	CCAACACCATGGCCCACTT	GATGGGGTCCCAGGTGATCT
HBZ	ATGGCGGCCTCAGGGCTGT	TGGAGGGCCCCGTCGCAG
HPRT1	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
CHIP		
HTLV LTR	AATGACCATGAGCCCCA	GTGAGGGGTTGTCGTCA
Dicer A	TAACACGGGCTGAAATATAGG	CTGTATCCGTTCTAATGGTCTATC
Dicer B	ACTAGGACAGGTGTGAGGGAC	TCAGTAGAGACGGGGTTTCAC
Dicer C	AAATTAGCTGGGTGTGGTGG	GGTGCTGAAACTGCTTCTCTG
β-Globine	AGGCTGCTGGTTGTCTACCCTTG	AGCTCACTGAGGCTGGCAAAGGTG
Charge Provirale		
HTLV-1	CCCTACAATCCAACCAGCTCAG	GTGGTGAAGCTGCCATCGGGTTTT
Taqman	GTTTACTGACAAACCCGACCTACCCATGGA	
Alb	GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT	AAACTCTAGGGAGCTGCTGGTT
Taqman Alb	FAM-CCTGTCATGCCACACAAATCTCTCC-TAMRA	

Primer	SENS	Primer	SENS
miARN	http://www.mirbase.org/	miARN	
let-7a	CTATACAATCTACTGTCTTTC	93	CAAAGTGCTGTTTCGTGCAGGTAG
let-7b	CTATACAACCTACTGCCTTCCC	125a	TCCCTGAGACCCTTTAACCTGTGA
let-7c	TAGAGTTACACCCTGGGAGTTA	132-3p	TAACAGTCTACAGCCATGGTCG
let-7e	CTATACGGCCTCCTAGCTTTCC	143-3p	TGAGATGAAGCACTGTAGCTC
16	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG	155:	TTAATGCTAATCGTGATAGGGGT
20a	TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG	200a:	CATCTTACCGGACAGTGCTGGA
21	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA	873:	GCAGGAACTTGTGAGTCTCCT
31	AGGCAAGATGCTGGCATAGCT	U6	CACCACGTTTATACGCCGGTG
Precurseur let7-b	CTATACAACCTACTGCCTTCCCTG		
Precurseur let7-c	CAACCTTCTAGCTTTCCTTGGAGC		
Precursuer let7-e	TACGGCCTCCTAGCTTTCCTCCAGG		

Tableau 7 Tableau récapitulatif des différentes amorces utilisées. Les expériences associées ainsi que le nom des gènes sont indiqués.

B. Méthodes

I. Purification des cellules de patients

L'isolation des PBMC de patients infectés a été réalisée par séparation des cellules mononuclées suivie d'une élimination des CD8+ par un tri cellulaire.

Solutions utilisées :

- Milieu de séparation lymphocytaire (Eurobio)
- Tubes Leucosep®
- Billes magnétiques Anti-CD8 (MyltenyiBiotec®)
- PBS 1X
- Milieu de culture RPMI 1640, 10% SVF, 2 mmol/l glutamine, 100 µg/ml streptomycine
- 2 mmol/l glutamine, 100 U/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine

I.1. Séparation des cellules mononuclées

On ajoute 3 ml de milieu de séparation des lymphocytes dans les tubes leucocep® puis 7ml de sang total prélevé à partir de prélèvements contenus dans des tubes EDTA. Les tubes sont ensuite centrifugés 15 min à 2000 tr/min à température ambiante et l'anneau lymphocytaire formé est récupéré à l'aide d'une pipette graduée dans un falcon 50ml. La suspension cellulaire est lavée dans 10 ml de PBS et centrifugée durant 10 min à 1800tr/min à 4°. Après élimination du surnageant, le culot est repris dans 5 ml de PBS pour la numération cellulaire.

I.2. Numération cellulaire

Les comptes cellulaires ont été réalisés à l'aide du NucléoCounter®, lequel est un microscope à fluorescence qui détecte les signaux émis par l'iodure de propidium (PI). On prélève un aliquot de 100µl de suspension cellulaire auquel on ajoute 300µl de tampon de lyse et 300µl de tampon stabilisateur. Cet échantillon est aspiré avec la Nucleocassette® qui contient le marqueur PI, que l'on positionne dans le NucléoCounter®. Le résultat affiché correspond au nombre de cellules totales par ml de tampon PBS dilué au 1/7°.

I.3. Tri cellulaire en CD8 négatif

Ce tri est une séparation magnétique faisant intervenir des billes portant un anticorps anti-CD8 et une colonne qui contient des aimants chargés de retenir les billes (MytenyiBiotec®). La quantité de billes est fonction du nombre de cellules, selon les recommandations du fournisseur 20µl de billes ont été incubés avec 10^7 cellules durant 15 minutes à 4°C. Parallèlement la colonne est équilibrée avec 2ml de tampon MACS. La suspension est ensuite centrifugée par la suite à 300g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot est repris dans 500µl de tampon que l'on charge sur la colonne. Après deux lavages de la colonne avec 1 ml de tampon, l'éluât est récupéré et lavée avec 1 à 2ml de PBS 1X. Après centrifugation de 10 min à 300g, le culot est re-suspendu dans 5 ml de tampon de PBS 1X pour un nouveau compte cellulaire avant mise en culture.

II. Culture cellulaire et traitement des cellules de patients

Les cellules sont mises en culture en plaque 24 puits à fonds ronds pendant cinq jours à une concentration de 1×10^6 cellules/ml de RPMI 1640, 10 % SVF, 2 mmol/l glutamine, 100 U/ml pénicilline, 100 µg/ml streptomycine. Pour les puits traités le VPA est ajouté au milieu à la concentration de 5mM. Le schéma de plaque contient les puits J0, J1, J2 et J5. Chacun des puits pour chacune des conditions (contrôle ou traité) était en duplicate. La plaque de culture est ensuite placée dans une étuve à 37°C, 5% CO₂.

II.1. Double extraction ADN/ARN

La double extraction en ARN et ADN a été opérée suivant le protocole du kit Qiagen All prep DNA/RNA mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les extraits sont obtenus à partir de culots secs issus de cultures cellulaires à J0, J1, J2 et J5. Les ARN sont élués dans 50µl de tampon RNase free water et les ADN dans 150µl de tampon EB (Elution buffer). Les deux tampons d'éluion sont fournis dans le kit.

II.2. Mesure de la charge provirale HTLV-1 par PCR TaqMan

Pour la quantification de la charge provirale d'HTLV-1, le plasmide pcHTLV-ALB a été utilisé comme standard dont la concentration a été déterminée par spectrophotométrie à 260 nm. Des solutions stock de dilutions sérielles de pcHTLV-ALB pour les points de gamme allant de 10^6 à 10^1 copies ont été préparées. Les amorces utilisées pour les différentes PCR en temps réelle sont détaillées dans la partie « les amorces » du matériel (A-III). Les amorces sens et antisens utilisées pour la quantification d'HTLV-1 correspondent aux nucléotides 4758-4779 et 4943-4920 du génome d'HTLV-1 respectivement. La sonde interne TaqMan est localisée entre les positions 4829 et 4858 du génome d'HTLV-1, et porte un reporter FAM en 5' et un quencher TAMRA en 3'. La quantification du gène de l'albumine humaine a été prévue en parallèle pour chaque échantillon afin de déterminer la quantité d'ADN cellulaire présente et d'avoir une référence endogène pour normaliser les variations dues aux différences dans l'extraction d'ADN. Les résultats ont été standardisés par quantification du gène de l'albumine humaine (amorces Alb) et la sonde TaqMan Alb décrites par Laurendeau et coll. (Laurendeau et al. 1999). Le mélange réactionnel est composé de 10 µl de l'extrait d'ADN, 200 nM d'amorces sens et antisens HTLV-1 ou Alb-S et Alb-AS, 100 nM de sonde TaqMan HTLV-1 ou albumine, 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl (pH 8.4), 400 nM de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 50 U/ml d'iTaq DNA polymérase, 6 mM MgCl₂, stabilisateurs (IQ supermix, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). L'amplification et l'acquisition des données sont faites à l'aide d'un iCycler (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) dont les paramètres étaient les suivantes : 2 min à 50°C, 10 min à 95°C puis les 45 cycles de PCR alternaient 15 s à 95°C et 1 min à 65°C

Les dilutions de la gamme étalon, des contrôles et des échantillons cliniques sont systématiquement passées en double, la moyenne des deux points étant retenue pour l'HTLV-1 comme pour l'albumine. Les courbes standard étaient acceptées lors d'une efficacité de PCR de 85 à 100 %. L'analyse d'un échantillon était à refaire en cas de variation de plus de 30% du nombre de copies d'ADN HTLV-1 ou albumine entre les doublons. La lignée MT2 a été incorporée dans chaque manipulation, le résultat étant considéré acceptable entre 2,4 et 3,3 copies d'ADN HTLV-1 par cellule MT2. Les charges provirales sont normalisées entre les expériences en prenant comme référence trois copies provirales par cellule MT2. Les valeurs de charge provirale HTLV-1 sont calculées par la formule suivante : (nombre moyen de copies d'ADN HTLV-1 / nombre moyen de copies

III. Extraction d'ARN Total et Reverse Transcription

III.1. Extraction de l'ARN au Trizol™

L'extraction d'ARN total a été réalisée au Trizol™ selon les recommandations du fournisseur :

- 200 µl de Trizol pour 1×10⁶ cellules (Phase de lyse cellulaire)
- 200 µl de chloroforme pour 1 ml de Trizol (Phase de séparation)
- 500 µl d'isopropanol pour 1 ml de Trizol (Phase de précipitation de l'ARN)
- 1 ml d'éthanol 75 % pour 1 ml de Trizol (Phase de lavage de l'ARN)
- Dissolution de l'ARN dans de l'eau RNase-free

Les échantillons d'ARN sont ensuite dosés par spectrophotométrie d'absorbance à 260 nm.

III.2. Reverse transcription protocole SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen)

La synthèse des ADNc a été effectuée avec le kit SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen). Brièvement, 2 µg d'ARN dénaturé ont été homogénéisés avec 1 µL de DTT à 0,1 M, 1 µl d'oligo(dT)12-18, 1 µl de dNTP Mix à 10 mM, 4 µl du tampon 5X First-Strand Buffer et 1µl de SuperScript™ III Reverse Transcriptase. Après 1h d'incubation à 55°C, la réaction a été stoppée en plaçant les échantillons 15 min à 70°C. Les échantillons d'ADN complémentaire (ADNc) ainsi obtenus sont conservés à -80°C

III.3. Reverse Transcription pour analyse des miARN protocole Kit RT QuantiMiR™ (Système Biosciences)

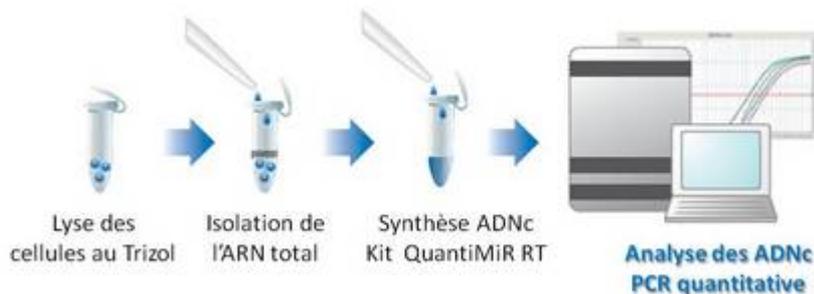


Figure 61 Etapes pour l'analyse des microARN cellulaires

Le Kit RT QuantiMiR™ a été utilisé afin de synthétiser des ADNc des petits ARN (dont les microARN) à partir d'ARN total (Figure 63). Succinctement, 10µg d'ARN total ont été homogénéisés avec 2 µl de PolyA Buffer 5X, 1 µl de MnCl₂ 25mM, 1.5 µl ATP 5mM, 0.5 µl PolyA Polymerase et incubés 30 minutes à 37°C afin d'ajouter une queue polyA à tous les ARN. On hybride ensuite à cette queue polyA un adaptateur un adaptateur OligodT que l'on ajoute au mélange réactionnel qui est chauffé à 60°C durant 5 minutes puis ramené 2 minutes à température ambiante. On réalise ensuite une reverse transcription par ajout de 4 µl de RT Buffer 5X, 2 µl de mix dNTP, 1.5 µl de DTT 0.1M et 1 µl de Reverse Transcriptase que l'on incube 1 heure à 42°C. La réaction est stoppée par augmentation de la température à 95°C durant 10 min. On obtient ainsi un pool d'ADNc de microARN avec une queue que l'on conserve à -20°C.

IV. PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR)

Solutions utilisées

- H₂O DEPC Treated water Pyrogen-Free (Invitrogen).
- LightCycler® 480 SYBER Green I Master Mix (Roche Applied Science)

Protocole:

Le mix de réaction est composé 2 µl d'échantillon de cDNA dilué au 1/16e après RT auquel est ajouté 3 µl du mix d'amorces constitué de 2,5µl de LightCycler® 480 SYBER Green I Master Mix et de 0,25 µM de chaque amorce du gène à tester. Pour les contrôles négatifs, le cDNA est remplacé par de H₂O DEPC Treated water Pyrogen-Free. Les amorces utilisées pour les différentes PCR en temps réelle sont détaillées dans le paragraphe « les amorces » de la partie Matériel. Pour l'analyse des microARN et des pré-microARN, un primer universel reverse fournis dans le kit QuantiMiR™ a été utilisé. Toutes les réactions ont été réalisées en plaque 384 puits sur le LightCycler® 480 System (Roche Applied Science). L'efficacité de chaque PCR a été déterminée, optimisée et validée au niveau de la reproductibilité par la réalisation de courbes standard. De l'ADNc des lignées cellulaires infectées ou non par HTLV-1 1 a été utilisé en dilution sérielle au dixième de 1/16 à 1/160000 et la pente de la droite obtenue permet de connaître l'efficacité. Les résultats ont été analysé avec le programme LightCycler 480 thermo cycler (Roche Applied Science, Myelan, France)

V. Transformation bactérienne en DH5 α

Solutions utilisées :

- SOC Médium.
- Gélose LB + antibiotique.

Protocole :

Pour chaque transformation, on prépare un tube Falcon de 5 ml contenant 500 μ l du milieu SOC et une cuvette d'électroporation que l'on met à refroidir sur la glace. On ajoute à 50 μ l de bactéries électrocompétentes 5 μ l de la solution de ligation dialysée pour un clonage, ou 1 μ l de plasmide pur pour une amplification de plasmide que l'on incube 1 minute (min) sur la glace. On transfère la solution bactéries/plasmide ou ligation dans la cuve froide et on électropore les bactéries à 2 500 V. On ajoute les bactéries électroporées aux 500 μ l de SOC Médium dans le tube Falcon que l'on incube à 37°C sous agitation pendant au moins 45 min avant de les étaler sur une gélose LB+ l'antibiotique de sélection. S'il s'agit d'une transformation d'un plasmide après ligation, on centrifuge les bactéries transformées, et on resuspend le culot dans 200 μ l de SOC que l'on étale en totalité sur la gélose à l'aide de billes de verre. S'il s'agit d'une transformation d'un plasmide pur, on fait un isolement à l'anse sur la gélose.

VI. Transfection

VI.1. Transfection des cellules adhérentes au jetPEI

Solutions utilisées

- NaCl stérile à 150 mM.
- DMEM, 10 % SVF, 100 U/ml de pénicilline et 100 μ g/ml de streptomycine.

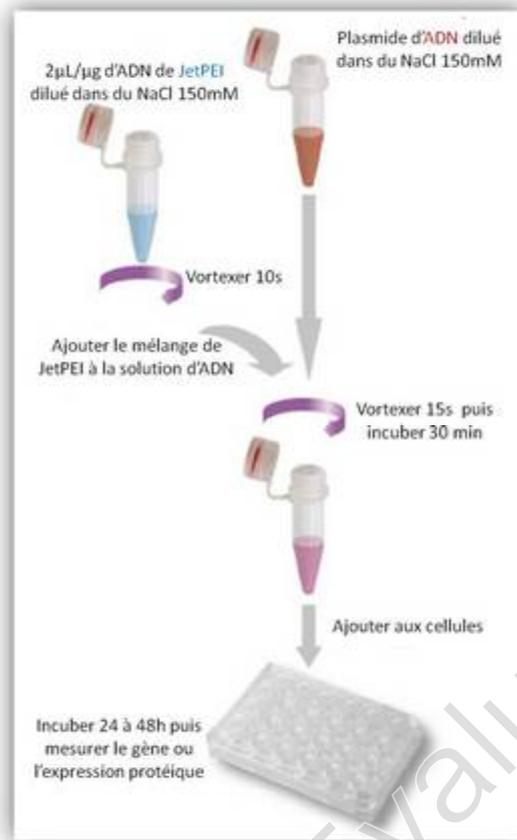


Figure 62 Protocole de transfection avec le JetPEI™

La veille de la transfection, les cellules ont été ensemencées de façon à ce qu'elles soient à 70 % de confluence lors de la transfection. Les mix de plasmide sont préparés en tenant compte des recommandations du fournisseur. 2µl de JetPEI/µd d'ADN et les mix d'ADN sont dilués dans le volume approprié de NaCl 150 mM selon le protocole du fournisseur séparément puis les deux solutions sont mélangées, incubées à température ambiante durant 30 minutes avant d'être ajoutées délicatement sur les cellules (Figure 64).

Dans le cas d'une transfection pour l'établissement de lignées stables, après 48h de culture le milieu est renouvelé par du milieu frais auquel on ajoute l'antibiotique de sélection appropriée. Les cellules sont ensuite cultivées en maintenant la pression de sélection.

La liste des antibiotiques et les concentrations de sélection utilisées en fonction du type cellulaire sont indiquées dans le tableau suivant:

Hygromycine B	
HEK 293T	100µg/mL
NIH 3T3	100µg/ml

VI.2. Transfection des cellules infectées chroniquement par HTLV-1

Les cellules ShJunD ont été transfectées en utilisant un choc DMSO. Brièvement, les cellules ont été incubées sur la nuit avec les plasmides et du polybrène, puis ont subi un choc DMSO 5 min à 37°C en utilisant une solution de DMSO diluée à 20% dans du RPMI. Les cellules ont ensuite été lavées au PBS1X, traitées 24h avec du (Sodium Butyrate) et sélectionnées durant 48h avec de la puromycine (2µg/ml).

VII. Western Blot dans des conditions dénaturantes

Solutions utilisées

- PBS 1X (PBS 10 X : NaCl 1,37 M, KCl 27 mM, KH₂PO₄ 10 mM, Na₂HPO₄ 10 mM ajuster le pH à 7,4).
- Laemmli 2X (Tris HCl pH 6,8, 125 mM, DTT 200 mM, SDS 4 %, β-mercaptoéthanol 5 %, Glycérol 20 %, bleu de bromophénol 0.2 %).
- PBS/0,1% Tween-20/0,5 %. caséine
- Tampon de migration 10 X TGS (Tris Base 250 mM, Glycine 2 M, SDS 10 %).
- Tampon de transfert semi-sec 10 X (Tris Base 200 mM, Glycine 1,5 M, SDS 1 % ajuster le pH à 8,3). A diluer dans une solution à 10 % d'éthanol.

Protocole :

Les cellules ont été lavées au PBS 1X afin d'éliminer toutes traces de milieu et de sérum puis lysées dans du tampon Laemmli 2X et bouilli à 95°C durant 15 minutes. Les échantillons sont ensuite centrifugés 1 minute avant d'être déposés et séparés sur un gel d'électrophorèse de polyacrylamide 8% et électrotransférés sur une membrane PVDF (Polyvinylidène

Difluoride, Millipore). La membrane est ensuite saturée une heure dans une solution de PBS/ 0.1% Tween-20 (PBST) supplémenté avec 0,5% de caséine afin de réduire les liaisons non spécifiques à 4°C.

La membrane est incubée avec l'anticorps primaire dilué dans du PBST pendant 1h à température ambiante ou toute la nuit à 4°C. Elle est ensuite lavée trois fois 10 minutes dans du PBST et incubée avec l'anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (GAM-HRP) dilué dans du PBST 1 h, à température ambiante. Les membranes sont relavées trois fois 10 min au PBST et les complexes anticorps conjugués à la peroxydase visualisés avec le kit ECL (Enhanced Chemiluminescence substrate for detection of HRP) (PIERCE) par un appareil de détection photoluminescence (Gnome) pendant un temps variant entre 30 secondes et 10min.

VIII. Mesure d'activité β -galactosidase et luciférase.

Solutions utilisées

- PBS
- Passive Lysis Buffer 5X (Promega)
- Genofax A (révélation de la « firefly » luciférase) ou Genofax C (révélation de la « renilla » luciférase) (Yelen)
- Réactif Galactostar (Applied Biosystem)

Protocole

Les cellules sont lavées au PBS 1X et lysées avec du Passive Lysis Buffer dilué à 1X. Les cellules sont récupérées dans des tubes eppendorfs et centrifugés 15 min à 1200 g et à 4°C afin d'éliminer les débris cellulaires. 20 μ l du lysat cellulaire est ensuite dilué dans 100 μ l de Passive Lysis Buffer et l'activité luciférase et/ou β -galactosidase mesurée

VIII.1. Dosage de l'activité β -galactosidase

10 μ l de chaque lysat cellulaire est transféré dans une plaque 96 puits en triplicate, auquel on ajoute 100 μ l de réactif Galactostar (2 μ l de réactif « Tropix » et 98 μ l de tampon « Galactostar »). Le mélange réactionnel est incubé 60 min à température ambiante puis analysé au luminomètre (Lumat LB9507 de EG&G, BERTHOLD).

VIII.2. Dosage de l'activité luciférase

Dans une plaque 96 puits, adaptée au luminomètre (Lumat LB9507 de EG&G, BERTHOLD), on transfère 10 µl de chaque lysat cellulaire en triplicate.

On prépare 100µl/lysate/puits de « Genofax A » (luciférase « Firefly ») ou « Genofax C » (luciférase « renilla ») (2 µl de Genofax dans 98 µl d'Immunofax). Le luminomètre est alors paramétré pour l'injection des réactifs et la lecture des activités luciférase.

IX. Test de prolifération (Cell Counting Kit-8, Dojindo)

Le Cell Counting Kit-8 (CCK8) est un test colorimétrique non radioactif utilisé pour la détermination de cellules viables afin de suivre la prolifération ou la cytotoxicité cellulaire. Le CCK8 est un test sensible et pratique qui utilise un sel tétrazolium, le WST-8*, lequel est réduit par les déshydrogénases dans les cellules et donne un composé soluble de coloration orange (WST-8 formazan) (Figure 65). La quantité de Formazan générée est dépendante de l'activité des déshydrogénases cellulaires et ainsi directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

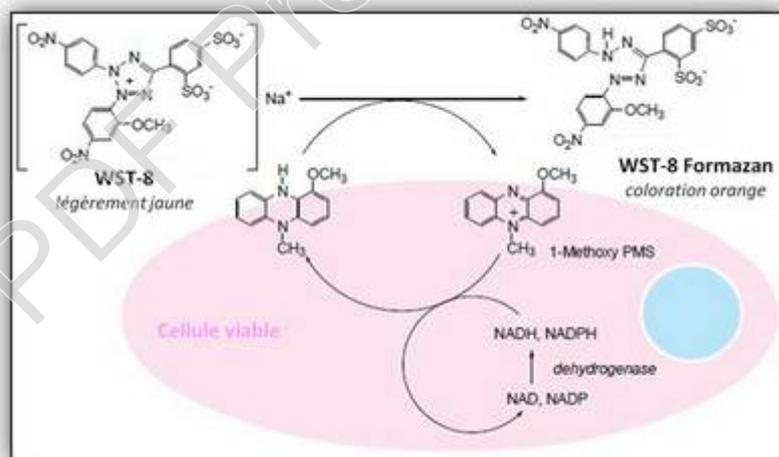


Figure 63 Principe du réactif du CCK8. Le WST-8*est réduit en Formazan de coloration orange via un médiateur d'électrons, le 1-Méthoxy PMS par le NADH ou le NADPH. *WST-8: [2-(2-méthoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfo-phenyl)-2H-tétrazolium, sel monosodique].

Solutions utilisées

- Milieu de culture faible en serum 2%
- Cell Counting Kit-8

Protocole

Les cellules sont ensemencées en plaque 96 puits à raison de 10^3 (dans le cas des NIH3T3) ou 10^4 cellules (dans le cas des lignées cellulaires T) /100 μ l/puits en milieu faible concentration de sérum au J0 et analysées sur 5 jours. Quotidiennement, 10 μ l de solution WST-8 (CCK8) ont été ajoutées dans chaque puit et la plaque est incubée 4h à 37°C. La viabilité cellulaire a été ainsi suivie par mesure au luminomètre de la densité optique à 450nm.

X. Expérience de formation de Colonies en Soft-Agar

L'analyse de la croissance ancrage-indépendante en Soft-Agar est considérée comme le test *in vitro* le plus stringent pour la détection de transformation maligne des cellules. Cette expérience consiste à cultiver des cellules préalablement traitées avec un carcinogène, par exemple, dans un milieu semi solide (soft-agar) durant 21 à 28 jours. Au terme de cette période d'incubation, les colonies éventuellement formées sont quantifiées après coloration des cellules (Figure 66).

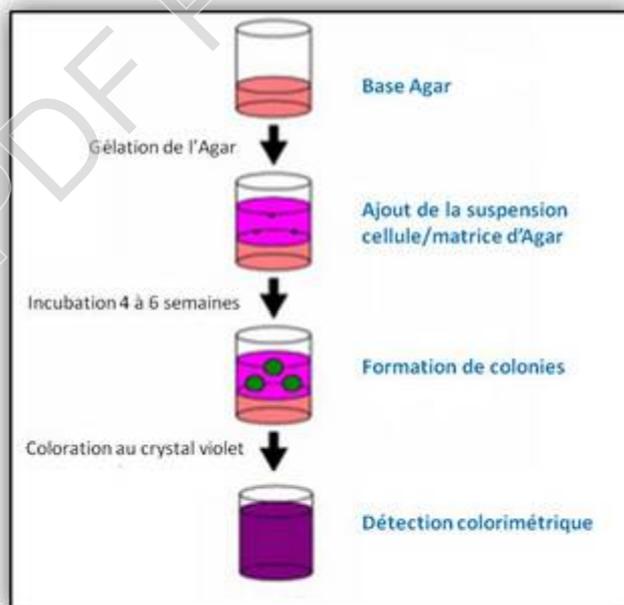


Figure 64 Représentation schématique de l'expérience de Soft Agar

Solutions utilisées

- Solution Agar 0,6%/DMEM (couche de base)
- Solution Agar 0,3%/DMEM (couche supérieure)
- Milieu de culture 2% SVF
- Solution de Crystal violet 0,005%
- PBS1X

Protocole (Figure 66) : Après avoir coater une plaque 6 puits avec une couche d'Agar diluée à 0,6% dans du DMEM, 2500 cellules NIH3T3 exprimant ou non HBZ ont été resuspendues dans une solution d'Agar 0,3% préchauffée à 37°C etensemencées sur la base d'Agar dans les plaques 6 puits. Les cellules ont ainsi été cultivées à 37°C, 5% CO₂ et entretenues deux fois par semaines par ajout de milieu frais DMEM 2% SVF. Après 21 jours de culture, les colonies formées ont été lavées au PBS1X, fixées au paraformaldéhyde et colorées au Crystal violet 0,005%. Le dénombrement des colonies formées est fait avec le logiciel de traitement d'image image J.

XI. Immunoprécipitation de la chromatine (CHIP)

Principe de l'immunoprécipitation de la chromatine (CHIP) (Figure 67) :

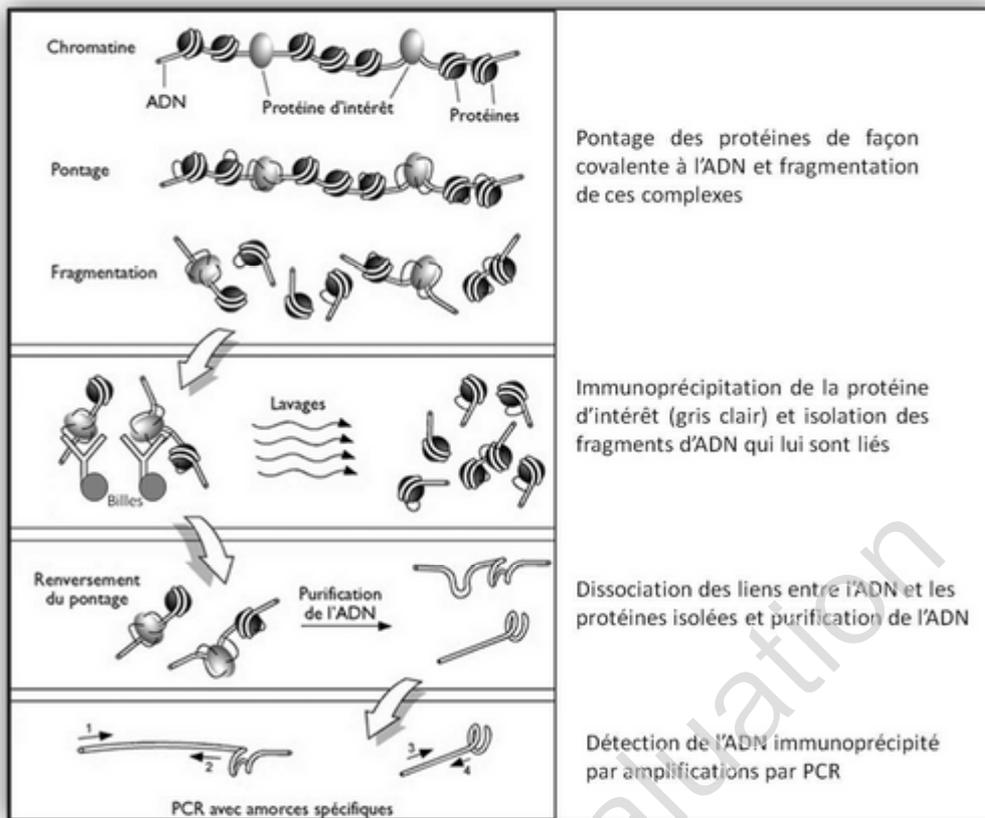


Figure 65 Principe du CHIP. Dans les conditions souhaitées, toutes les protéines qui touchent l'ADN y sont immobilisées par des liens covalents à l'endroit précis de leur interaction grâce à un traitement au formaldéhyde. Par la suite, les cellules sont lysées, puis les complexes ADN-protéines sont fragmentés en courts segments avant d'être immunoprécipités. L'immunoprécipitation, effectuée à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt (l'activateur de transcription X, par exemple), permet de récupérer les protéines d'intérêts ainsi que toutes les régions d'ADN auxquelles elles étaient liées lors du pontage initial au formaldéhyde. (Extrait de *Biologie moléculaire*, page 233)

Solutions utilisées

- PBS1X
- Tampon I (50mM Tris-HCl, 85mMKCl, 0.5% NP-40, mix d'inhibiteurs de protéases)
- Tampon II (50 mM Tris-HCl, 1% SDS, 10 mM EDTA, mix d'inhibiteurs de protéases)
- Billes magnétiques (Invitrogen)

Protocole

Les cellules sont lavées au PBS1X, fixées au formaldéhyde dilué à 1% dans du PBS avant d'être lysées avec le buffer I sur la glace. Après centrifugation, la fraction contenant les culots nucléaires a été lavée avec le buffer puis la chromatine a été fractionnée en fragments de 200

à 500pb par sonication en utilisant un Biorupteur (Diagenode). Les échantillons chromatiniens ont ensuite été incubés avec nos anticorps d'intérêts complexés à des billes magnétiques (anti-sp1 (SP1), anti-Myc (HBZ) et/ou anti-Flag (JunD)) et anti-IgG (anticorps non spécifique contrôle). Après élution des complexes protéine-ADN ainsi immunoprécipitées, l'ADN a été dissocié par incubation des éluats 5h à 65°C et purifié par digestion par la protéinase K 1h à 45°C. 25% de l'ADN récupéré a été analysé par PCR quantitative afin d'amplifier la région promotrice de HTLV-1 ou de Dicer et de la β -Globine. Les amorces utilisées sont détaillées dans le tableau des amorces dans la partie « matériels ». La PCR quantitative a été réalisée en utilisant le LightCycler 480 SYBR green I master mix sur le LightCycler 480 thermocycler (Roche Applied Science) (voir paragraphe « PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) »).

PDF Pro Evaluation

Bibliographie

PDF Pro Evaluation

A

- Abe, Suzuki, et al. (2010). "Interaction of human T-cell lymphotropic virus type I Rex protein with Dicer suppresses RNAi silencing." FEBS Letters 584(20): 4313-4318.
- Achachi, Florins, et al. (2005). "Valproate activates bovine leukemia virus gene expression, triggers apoptosis, and induces leukemia/lymphoma regression in vivo." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(29): 10309-10314.
- Agarwal, Guru, et al. (1999). "Menin Interacts with the AP1 Transcription Factor JunD and Represses JunD-Activated Transcription." Cell 96(1): 143-152.
- Agarwal, Novotny, et al. (2003). "Transcription factor JunD, deprived of menin, switches from growth suppressor to growth promoter." Proc Natl Acad Sci U S A. 100(19): 10770-5.
- Ahlenstiel, Lim, et al. (2012). "Direct evidence of nuclear Argonaute distribution during transcriptional silencing links the actin cytoskeleton to nuclear RNAi machinery in human cells." Nucleic Acids Res. 40(4): 1579-95.
- Albrecht and Lairmore (2002). "Critical role of human T-lymphotropic virus type 1 accessory proteins in viral replication and pathogenesis." Microbiol Mol Biol Rev. 66(3): 396-406.
- Althaus, Vongrad, et al. (2012). "Tailored enrichment strategy detects low abundant small noncoding RNAs in HIV-1 infected cells." Retrovirology 9: 27.
- Ambros (2004). "The functions of animal microRNAs." Nature 431(7006): 350 - 355.
- Ambros and Horvitz (1984). "Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*." Science 226(4673): 409-16.
- Ameres, Martinez, et al. (2007). "Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC." Cell. 130(1): 101-12.
- Ando, Nakano, et al. (1987). "Transmission of adult T-cell leukemia retrovirus (HTLV-I) from mother to child: comparison of bottle- with breast-fed babies." Jpn J Cancer Res. 78(4): 322-4.
- Angel and Karin (1991). "The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation." Biochim. Biophys. 1072: 129-157.
- Angel, Szabowski, et al. (2001). "Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology." Oncogene 20(19): 2413-23.
- Aravin, Lagos-Quintana, et al. (2003). "The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development." Dev Cell. 5(2): 337-50.
- Arisawa, Soda, et al. (2000). "Evaluation of adult T-cell leukemia/lymphoma incidence and its impact on non-Hodgkin lymphoma incidence in southwestern Japan." Int J Cancer 85: 319 - 324.
- Arnold, Yamamoto, et al. (2006). "Enhancement of infectivity and persistence in vivo by HBZ, a natural antisense coded protein of HTLV-1." Blood 107(10): 3976 - 3982.
- Arnold, Zimmerman, et al. (2008). "Human T-cell Leukemia Virus Type-1 Antisense-encoded Gene, Hbz, Promotes T Lymphocyte Proliferation." Blood 112: 3788 - 97.
- Asquith and Bangham (2008). "How does HTLV-I persist despite a strong cell-mediated immune response?" Trends Immunol. 29(1): 4-11.
- Azran, Schavinsky-Khrapunsky, et al. (2004). "Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity." Retrovirology. 1: 20.

B

- Baek, Villén, et al. (2008). "The impact of microRNAs on protein output." *Nature*. 455(7209): 64-71.
- Baglioni, Minks, et al. (1978). "Interferon action may be mediated by activation of a nuclease by pppA2'p5'A2'p5'A." *Nature* 273(5664): 684-7.
- Bai and Nicot (2012). "Overview on HTLV-I p12, p8, p30, p13: accomplices in persistent infection and viral pathogenesis." *Frontiers in Microbiology* 3.
- Barbeau and Mesnard (2011). "Making sense out of antisense transcription in human T-cell lymphotropic viruses (HTLVs)." *Viruses*. 3(5): 456-68.
- Bartel (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." *Cell* 116(2): 281 - 297.
- Bartel (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." *Cell* 116(2): 281-97.
- Bartman, Kaidarova, et al. (2008). "Long-term increases in lymphocytes and platelets in human T-lymphotropic virus type II infection." *Blood*. 112(10): 3995-4002.
- Basbous, Arpin, et al. (2003). "The HBZ factor of human T-cell leukemia virus type I dimerizes with transcription factors JunB and c-Jun and modulates their transcriptional activity." *J Biol Chem* 278(44): 43620 - 43627.
- Baskerville and Bartel (2005). "Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes." *RNA*. 11(3): 241-7.
- Basyuk, Suavet, et al. (2003). "Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products." *Nucleic Acids Res.* 31(22): 6593-7.
- Baulcombe (1996). "RNA as a target and an initiator of post-transcriptional gene silencing in transgenic plants." *Plant Mol Biol.* 32(1-2): 79-88.
- Bazarbachi and Hermine (1996). "Pathologie lymphoïde maligne liée au virus HTLV-1: aspects physiopathologiques et orientations thérapeutiques nouvelles." *Hématologie* 2(4): 312-20.
- Behm-Ansmant, Rehwinkel, et al. (2006). "mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes." *Genes Dev.* 20(14): 1885-98.
- Bellon, Lepelletier, et al. (2009). "Deregulation of microRNA involved in hematopoiesis and the immune response in HTLV-I adult T-cell leukemia." *Blood* 113(20): 4914-7.
- Belrose, Gross, et al. (2011). "Effects of valproate on Tax and HBZ expression in HTLV-1 and HAM/TSP T lymphocytes." *Blood* 118(9): 2483-91.
- Berezikov, Chung, et al. (2007). "Mammalian mirtron genes." *Mol Cell.* 28(2): 328-36.
- Berger and Shaul (1994). "The human junD gene is positively and selectively autoregulated." *DNA Cell Biol.* 13(3): 249-55.
- Berger and Shaul (1998). "c-Fos antagonizes the junD gene positive autoregulatory loop; a novel c-Fos role in promoter switching." *Gene.* 211(2): 375-82.
- Bernstein, Caudy, et al. (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." *Nature* 409(6818): 363-6.
- Bernstein, Kim, et al. (2003). "Dicer is essential for mouse development." *Nat Genet.* 35(3): 215-7.
- Besson, Gonin, et al. (2001). "Incidence of hematological malignancies in Martinique, French West Indies, overrepresentation of multiple myeloma and adult T-cell leukemia/lymphoma." *Leukemia* 15(5): 828-31.

- Betel, Wilson, et al. (2008). "The microRNA.org resource: targets and expression." Nucleic Acids Res. 36(Database issue): D149-53.
- Bex, Murphy, et al. (1999). "Phosphorylation of the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Transactivator Tax on Adjacent Serine Residues Is Critical for Tax Activation." Journal of Virology 73(1): 738-745.
- Bhattacharyya, Habermacher, et al. (2006). "Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells." Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 71: 513-21.
- Biasiolo, Sales, et al. (2011). "Impact of host genes and strand selection on miRNA and miRNA* expression." PLoS One 6(8): e23854.
- Billy, Brondani, et al. (2001). "Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines." Proc Natl Acad Sci U S A. 98(25): 14428-33.
- Bivalkar-Mehla, Vakharia, et al. (2011). "Viral RNA silencing suppressors (RSS): novel strategy of viruses to ablate the host RNA interference (RNAi) defense system." Virus Res. 155(1): 1-9.
- Blenkiron, Goldstein, et al. (2007). "MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype." Genome Biol. 8(10): R214.
- Blow, Grocock, et al. (2006). "RNA editing of human microRNAs." Genome Biol R27.
- Bommer, Gerin, et al. (2007). "p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes." Curr Biol. 17(15): 1298-307.
- Borchert, Lanier, et al. (2006). "RNA polymerase III transcribes human microRNAs." Nat Struct Mol Biol 13(12): 1097 - 1101.
- Borowiak, Kuhlmann, et al. (2013). "HTLV-1 bZIP factor impedes the menin tumor suppressor and upregulates JunD-mediated transcription of the hTERT gene." Carcinogenesis.
- Bortolin-Cavaillé, Dance, et al. (2009). "C19MC microRNAs are processed from introns of large Pol-II, non-protein-coding transcripts." Nucleic Acids Res. 37(10): 3464-73.
- Botos, Liu, et al. (2009). "The Toll-like receptor 3:dsRNA signaling complex." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms 1789(9): 667-674.
- Bouzar, Boxus, et al. (2009). "Reduced levels of reactive oxygen species correlate with inhibition of apoptosis, rise in thioredoxin expression and increased bovine leukemia virus proviral loads." Retrovirology. 6: 102.
- Bouzar and Willems (2008). "How HTLV-1 may subvert miRNAs for persistence and transformation." Retrovirology. 5: 101.
- Boxus and Willems (2009). "Mechanisms of HTLV-1 persistence and transformation." British Journal of Cancer 101.
- Brennecke, Hipfner, et al. (2003). "bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila." Cell. 113(1): 25-36.
- Brennecke, Stark, et al. (2005). "Not miR-ly muscular: microRNAs and muscle development." Genes Dev. 19(19): 2261-4.
- Briquet, Richardson, et al. (2001). "Natural antisense transcripts are detected in different cell lines and tissues of cats infected with feline immunodeficiency virus." Gene. 267(2): 157-64.
- Broderick, Salomon, et al. (2011). "Argonaute protein identity and pairing geometry determine cooperativity in mammalian RNA silencing." RNA. 17(10): 1858-69.

- Bühler and Moazed (2007). "Transcription and RNAi in heterochromatic gene silencing." Nat Struct Mol Biol. 14(11): 1041-8.
- Butel (2000). "Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease." Carcinogenesis 21(3): 405-426.

C

- Cai,Hagedorn, et al. (2004). "Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs." RNA. 10(12): 1957-66.
- Calattini,Betsem, et al. (2009). "New strain of Human T Lymphotropic Virus (HTLV) type 3 in a Pygmy from Cameroon with peculiar HTLV serologic results." Journal of Infectious Diseases 199(4): 561-564.
- Calattini,Chevalier, et al. (2005). "Discovery of a new human T-cell lymphotropic virus (HTLV-3) in Central Africa." Retrovirology. 9(2): 30.
- Calin,Dumitru, et al. (2002). "Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A. 99(24): 15524-9.
- Calin,Liu, et al. (2004). "MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias." Proc Natl Acad Sci U S A. 101(32): 11755-60.
- Calin,Sevignani, et al. (2004). "Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers." Proc Natl Acad Sci U S A. 101(9): 2999-3004.
- Cameron,Yin, et al. (2008). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cellular MicroRNA miR-146a, a modulator of lymphocyte signaling pathways." J Virol 82(4): 1946 - 1958.
- Caplen,Fleenor, et al. (2000). "dsRNA-mediated gene silencing in cultured Drosophila cells: a tissue culture model for the analysis of RNA interference." Gene 252(1-2): 95-105.
- Catuogno,Cerchia, et al. (2013). "miR-34c may protect lung cancer cells from paclitaxel-induced apoptosis." Oncogene. 32(3): 341-51.
- Cavanagh,Landry, et al. (2006). "HTLV-I antisense transcripts initiating in the 3' LTR are alternatively spliced and polyadenylated." Retrovirology 3: 15.
- Cavrois,Leclercq, et al. (1998). "Persistent oligoclonal expansion of human T-cell leukemia virus type 1-infected circulating cells in patients with Tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy." Oncogene. 17(1): 77-82.
- Cawley,Logue, et al. (2013). "Disruption of microRNA biogenesis confers resistance to ER stress-induced cell death upstream of the mitochondrion." PLoS One. 8(8): e73870.
- Chalfie,Horvitz, et al. (1981). "Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*." Cell 24(1): 59-69.
- Chan,Krichevsky, et al. (2005). "MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells." Cancer Res. 65(14): 6029-33.
- Chang,Wentzel, et al. (2007). "Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis." Mol Cell. 26(5): 745-52.
- Cheloufi,Dos Santos, et al. (2010). "A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis." Nature. 465(7298): 584-9.

- Chen and Stallings (2007). "Differential Patterns of MicroRNA Expression in Neuroblastoma Are Correlated with Prognosis, Differentiation, and Apoptosis." Cancer Research 67(3): 976-983.
- Chen,Zheng, et al. (2009). "Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps." Nat Struct Mol Biol. 16(11): 1160-6.
- Chendrimada,Finn, et al. (2007). "MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6." Nature. 447(7146): 823-8.
- Chendrimada ,Gregory, et al. (2005). "TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing." Nature. 436(7051): 740-4.
- Chinenov and Kerppola (2001). "Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity." Oncogene. 20(19): 2438-52.
- Chiosea,Jelezcova, et al. (2006). "Up-regulation of dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate adenocarcinoma." Am J Pathol. 169(5): 1812-20.
- Chiosea,Jelezcova, et al. (2007). "Overexpression of Dicer in precursor lesions of lung adenocarcinoma." Cancer Res.(67): 5.
- Chu and Rana (2006). "Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54." PLoS Biol. 4(7): e210.
- Cifuentes,Xue, et al. (2010). "A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity." Science. 328(5986): 1694-8.
- Clemens (1997). "PKR--a protein kinase regulated by double-stranded RNA." Int J Biochem Cell Biol 29(7): 945-9.
- Clemens and Williams (1978). "Inhibition of cell-free protein synthesis by pppA2'p5'A2'p5'A: a novel oligonucleotide synthesized by interferon-treated L cell extracts." Cell. 13(3): 565-72.
- Clerc,Hivin, et al. (2009). "Propensity for HBZ-SP1 isoform of HTLV-I to inhibit c-Jun activity correlates with sequestration of c-Jun into nuclear bodies rather than inhibition of its DNA-binding activity." Virology. 391(2): 195-202.
- Clerc,Laverdure, et al. (2011). "Polarized expression of the membrane ASP protein derived from HIV-1 antisense transcription in T cells." Retrovirology. ;: 8: 74.
- Clerc,Polakowski, et al. (2008). "An interaction between the human T cell leukemia virus type 1 basic leucine zipper factor (HBZ) and the KIX domain of p300/CBP contributes to the down-regulation of tax-dependent viral transcription by HBZ." J Biol Chem. 283(35): 23903-13.
- Cobb,Hertweck, et al. (2006). "A role for Dicer in immune regulation." J Exp Med 203(11): 2519 - 2527.
- Coffin (1996). "HIV viral dynamics." AIDS Rev.
- Cogoni,Romano, et al. (1994). "Suppression of gene expression by homologous transgenes." Antonie Van Leeuwenhoek. 65(3): 205-9.
- Cohen,Broder, et al. (1977). "Combination chemotherapy with vincristine, adriamycin, and procarbazine in previously treated patients with small cell carcinoma." Cancer Treat Rep. 61(3): 485-7.
- Corcoran,Pandit, et al. (2009). "Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data." PLoS One 4: e5279.
- Croce (2009). "Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer." Nat Rev Genet. 10(10): 704-14.

D

- Davis,Hilyard, et al. (2008). "SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation." Nature. 454(7200): 56-61.
- Davis,Hilyard, et al. (2010). "Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha." Mol Cell 39: 373-384.
- de Groot,Meijer, et al. (1991). "Differential regulation of JunB and JunD by adenovirus type 5 and 12 E1A proteins." Oncogene. 6(12): 2357-61.
- Dehee,Cesaire, et al. (2002). "Quantitation of HTLV-I proviral load by a TaqMan real-time PCR assay." J Virol Methods 102(1-2): 37 - 51.
- Deniaud,Baguet, et al. (2009). "Overexpression of transcription factor Sp1 leads to gene expression perturbations and cell cycle inhibition." PLoS One 4(9): e7035.
- Denli,Tops, et al. (2004). "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex." Nature. 432(7014): 231-5.
- Derry,Yanagiya, et al. (2006). "Regulation of poly(A)-binding protein through PABP-interacting proteins." Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 71: 537-43.
- Didiano and Hobert (2006). "Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions." Nat Struct Mol Biol. 13(9): 849-51.
- Ding and Grosshans (2009). "Repression of *C. elegans* microRNA targets at the initiation level of translation requires GW182 proteins." EMBO J. 28(3): 213-22.
- Ding and Han (2007). "GW182 family proteins are crucial for microRNA-mediated gene silencing." Trends Cell Biol. 17(8): 411-6.
- Dissanayake,Wade, et al. (2007). "The Wnt5A/protein kinase C pathway mediates motility in melanoma cells via the inhibition of metastasis suppressors and initiation of an epithelial to mesenchymal transition." J Biol Chem. 282(23): 17259-71.
- Doench and Sharp (2004). "Specificity of microRNA target selection in translational repression." Genes Dev. 18(5): 504-11.
- Donegan, Lee, et al. (1994). "Transfusion transmission of retroviruses: human T-lymphotropic virus types I and II compared with human immunodeficiency virus type 1." Transfusion. 34(6): 478-83.
- Douceron,Kaidarova, et al. (2012). "HTLV-2 APH-2 expression is correlated with proviral load but APH-2 does not promote lymphocytosis." J. Infect. Dis. 205: 82–86.
- Duc Dodon,Mesnard, et al. (2010). "[Adult T-cell leukemia induced by HTLV-1: before and after HBZ]." Med Sci (Paris) 26(4): 391-6.
- Duong,Jia, et al. (2008). "Short communication: Absence of evidence of HTLV-3 and HTLV-4 in patients with large granular lymphocyte (LGL) leukemia." AIDS Res Hum Retroviruses 24(12): 1503-5.
- Duursma,Kedde, et al. (2008). "miR-148 targets human DNMT3b protein coding region." RNA. 14(5): 872-7.

E

- Ebert and Sharp (2012). "Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes." Cell. 149(3): 515-24.

- Edwards,Fenizia, et al. (2011). "Orf-I and orf-II-encoded proteins in HTLV-1 infection and persistence." Viruses. 3(6): 861-85.
- Eferl and Wagner (2003). "AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis." Nat Rev Cancer 3(11): 859-68.
- Elbashir,Lendeckel, et al. (2001). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." Genes Dev. 15(2): 188-200.
- Ender,Krek, et al. (2008). "A human snoRNA with microRNA-like functions." Mol Cell. 32(4): 519-28.
- Esquela-Kerscher and Slack (2006). "Oncomirs - microRNAs with a role in cancer." Nat Rev Cancer. 6(4): 259-69.
- Etoh,Tamiya, et al. (1997). "Persistent clonal proliferation of human T-lymphotropic virus type I-infected cells in vivo." Cancer Res 57(21): 4862 - 4867.
- Eulalio,Behm-Ansmant, et al. (2007). "P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing." Mol Cell Biol. 27(11): 3970-81.
- Eulalio,Huntzinger, et al. (2008). "GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay." Nat Struct Mol Biol. 15(4): 346-53.
- Eulalio,Huntzinger, et al. (2009). "Deadenylation is a widespread effect of miRNA regulation." RNA. 15(1): 21-32.
- Eulalio,Rehwinkel, et al. (2007). "Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing." Genes Dev. 21(20): 2558-70.
- Eystathioy,Chan, et al. (2002). "A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles." Mol Biol Cell. 2002 13(4): 1338-51.
- Eystathioy,Jakymiw, et al. (2003). "The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLsm4 in cytoplasmic GW bodies." RNA. 9(10): 1171-3.

F

- Fabian,Mathonnet, et al. (2009). "Mammalian miRNA RISC recruits CAF1 and PABP to affect PABP-dependent deadenylation." Mol Cell. 35(6): 868-80.
- Fan,Ma, et al. (2010). "APOBEC3G Generates Nonsense Mutations in Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Proviral Genomes In Vivo." Journal of Virology 84(14): 7278-7287.
- Feng and Derynck (2005). "Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads." Annu Rev Cell Dev Biol 21: 659-93.
- Feuer and Green (2005). "Comparative biology of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2." Oncogene. 24(39): 5996-6004.
- Filipowicz,Bhattacharyya, et al. (2008). "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?" Nat Rev Genet 9(2): 102 - 114.
- Fire,Xu, et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature 391(6669): 806-11.
- Flavin,Smyth, et al. (2008). "Altered eIF6 and Dicer expression is associated with clinicopathological features in ovarian serous carcinoma patients." Mod Pathol. 21(6): 676-84.

- Foley, Lazarus, et al. (1965). "CONTINUOUS CULTURE OF HUMAN LYMPHOBLASTS FROM PERIPHERAL BLOOD OF A CHILD WITH ACUTE LEUKEMIA." Cancer. 18: 522-9.
- Forman, Legesse-Miller, et al. (2008). "A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence." Proc Natl Acad Sci U S A. 105(39): 14879-84.
- Franchini, Fukumoto, et al. (2003). "T-cell control by human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1." Int J Hematol. 78(4): 280-96.
- Friedman, Farh, et al. (2009). "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs." Genome Res. 19(1): 92-105.
- Fujii, Iwai, et al. (2000). "Activation of oncogenic transcription factor AP-1 in T cells infected with human T cell leukemia virus type 1." AIDS Res Hum Retroviruses 16(16): 1603-6.
- Fujimuro, Wu, et al. (2003). "A novel viral mechanism for dysregulation of beta-catenin in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency." Nat Med. 9(3): 300-6.
- Fukuda, Yamagata, et al. (2007). "DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs." Nat Cell Biol. 9(5): 604-11.

G

- Gabet, Mortreux, et al. (2000). "High circulating proviral load with oligoclonal expansion of HTLV-1 bearing T cells in HTLV-1 carriers with strongyloidiasis." Oncogene 19(43): 4954 - 4960.
- Gao, Deng, et al. (2005). "HTLV-1 Tax transgenic mice develop spontaneous osteolytic bone metastases prevented by osteoclast inhibition." Blood 106: 4294-4302.
- Gatto, Rossi, et al. (2008). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 trans-activates miR-155 transcription through the NF-kappaB pathway." Nucleic Acids Research 36(20): 6608-19.
- Gaudray, Gachon, et al. (2002). "The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription." Journal of Virology 76: 12813-12822.
- Gaur, Jewell, et al. (2007). "Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines." Cancer Res. 67(6): 2456-68.
- Gerald, Berra, et al. (2004). "JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress." Cell. 118(6): 781-94.
- Gérard, Lepere, et al. (1995). "Clustering and clinical diversity of adult T-cell leukemia/lymphoma associated with HTLV-I in a remote black population of French Guiana." Int J Cancer 60(6): 773-6.
- Gessain (1996). "Virological aspects of tropical spastic paraparesis/HTLV-I associated myelopathy and HTLV-I infection." J Neurovirol. 2(5): 299-306.
- Gessain (2011). "Human retrovirus HTLV-1: descriptive and molecular epidemiology, origin, evolution, diagnosis and associated diseases." Bull. Soc. Pathol. Exot. 104: 167-180.
- Gessain, Barin, et al. (1985). "Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis." Lancet 2(8452): 407 - 410.
- Gessain and Cassar (2012). "Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection." Frontiers in Microbiology 3: 388.

- Ghez, Lepelletier, et al. (2006). "Neuropilin-1 Is Involved in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Entry." *Journal of Virology* 80(14): 6844-6854.
- Gilson and Géli (2007). "How telomeres are replicated." *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(10): 825-38.
- Giraldez, Mishima, et al. (2006). "Zebrafish MiR-430 Promotes Deadenylation and Clearance of Maternal mRNAs." *Science* 312(5770): 75-79.
- Gironella, Seux, et al. (2007). "Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development." *Proc Natl Acad Sci USA* 104(41): 16170 - 16175.
- Glorian, Maillot, et al. (2011). "HuR-dependent loading of miRNA RISC to the mRNA encoding the Ras-related small GTPase RhoB controls its translation during UV-induced apoptosis." *Cell Death Differ.* 18(11): 1692-701.
- Goff (2001). "Intracellular trafficking of retroviral genomes during the early phase of infection: viral exploitation of cellular pathways." *J Gene Med.* 3(6): 517-28.
- Gonçalves, Proietti, et al. (2010). "Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases." *Clin Microbiol Rev.* 23(3): 577-89.
- Gottwein, Mukherjee, et al. (2007). "A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155." *Nature.* 450(7172): 1096-9.
- Grassmann, Aboud, et al. (2005). "Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax." *Oncogene* 24(39): 5976 - 5985.
- Grassmann and Jeang (2008). "The roles of microRNAs in mammalian virus infection." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1779(11): 706-711.
- Green and Chen (1994). "Molecular features of the human T-cell leukemia virus: Mechanisms of transformation and leukemogenicity." *The Retroviridae* 3: 277-312.
- Gregory, Chendrimada, et al. (2005). "Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing." *Cell.* ;123(4): 123(4): 631-40.
- Gregory, Yan, et al. (2004). "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs." *Nature.* 432(7014): 235-40.
- Grelier, Voirin, et al. (2009). "Prognostic value of Dicer expression in human breast cancers and association with the mesenchymal phenotype." *Br J Cancer.* 101(4): 673-83.
- Griffiths-Jones, Grocock, et al. (2006). "miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature." *Nucleic Acids Res*(34 Database): D140 - 144.
- Griffiths-Jones, Saini, et al. (2008). "miRBase: tools for microRNA genomics." *Nucleic Acids Res.* 36(Database issue): D154-8.
- Grimson, Farh, et al. (2007). "MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing." *Mol Cell.* 27(1): 91-105.
- Grimson, Srivastava, et al. (2008). "Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals." *Nature.* 455(7217): 1193-7.
- Grishok, Tabara, et al. (2000). "Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*." *Science* 287(5462): 2494-7.
- Gu, He, et al. (2006). "Primary transcripts and expressions of mammal intergenic microRNAs detected by mapping ESTs to their flanking sequences." *Mamm Genome.* 17(10): 1033-41.
- Guo, Ingolia, et al. (2010). "Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels." *Nature.* 466(7308): 835-40.

- Guo and Kempthues (1995). "par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed." Cell. 81(4): 611-20.
- Gupta,Huang, et al. (2003). "The carboxy-terminal, M3 motifs of PACT and TRBP have opposite effects on PKR activity." Virology. 315(2): 283-91.

H

- Ha,Wightman, et al. (1996). "A bulged lin-4/lin-14 RNA duplex is sufficient for *Caenorhabditis elegans* lin-14 temporal gradient formation." Genes Dev 10(23): 3041-50.
- Hagiya,Yasunaga, et al. (2011). "ATF3, an HTLV-1 bZip factor binding protein, promotes proliferation of adult T-cell leukemia cells." Retrovirology 8(1): 19.
- Hai and Curran (1991). "Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity." Proc Natl Acad Sci U S A. 88(9): 3720-4.
- Hakim,Alsayari, et al. (2008). "A large number of the human microRNAs target lentiviruses, retroviruses, and endogenous retroviruses." Biochem Biophys Res Commun. 369(2): 357-62.
- Halin,Douceron, et al. (2009). "Human T-cell leukemia virus type 2 produces a spliced antisense transcript encoding a protein that lacks a classic bZIP domain but still inhibits Tax2-mediated transcription." Blood. 114(12): 2427-38.
- Hall and Fujii (2005). "Deregulation of cell-signaling pathways in HTLV-1 infection." Oncogene 24: 5965-5975.
- Hamilton and Baulcombe (1999). "A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants." Science 286(5441): 950-2.
- Hammond,Bernstein, et al. (2000). "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells." Nature. 404(6775): 293-6.
- Han, Lee, et al. (2004). "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. ." Genes Dev 18: 3016-3027.
- Han, Lee, et al. (2006). "Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha- DGCR8 complex. ." Cell 125: 887-901.
- Han ,Pedersen, et al. (2009). "Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8." Cell. 136(1): 75-84.
- Hanahan and Weinberg (2000). "The Hallmarks of Cancer." Cell 100(1): 57-70.
- Hannon (2002). "RNA interference." Nature 418(6894): 244-51.
- Harley (2008). "Telomerase and cancer therapeutics." Nature Reviews Cancer 8: 167-179
- Hattori,Kiyokawa, et al. (1984). "Identification of gag and env gene products of human T-cell leukemia virus (HTLV)." Virology. 136(2): 338-47.
- He and Hannon (2004). "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation." Nat Rev Genet. 5(7): 522-31.
- He,Thomson, et al. (2005). "A microRNA polycistron as a potential human oncogene." Nature. 435(7043): 828-33.
- Hendrickson,Hogan, et al. (2009). "Concordant regulation of translation and mRNA abundance for hundreds of targets of a human microRNA." PLoS Biol. 7(11): e1000238.

- Henke,Goergen, et al. (2008). "microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA." EMBO J. 27(24): 3300-10.
- Hernandez,Floyd, et al. (2008). "Multiple facets of junD gene expression are atypical among AP-1 family members." Oncogene. 27(35): 4757–4767.
- Herrlich (2001). "Cross-talk between glucocorticoid receptor and AP-1." Oncogene 20(19): 2465-75.
- Hino (2011). "Establishment of the milk-borne transmission as a key factor for the peculiar endemicity of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): the ATL Prevention Program Nagasaki." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 87(4): 152–66.
- Hino,Sugiyama, et al. (1986). "Mother-to-child transmission of HTLV-I." Nihon Rinsho. 44(10): 2283-8.
- Hinrichs,Nerenberg, et al. (1987). "A transgenic mouse model for human neurofibromatosis." Science 237: 1340-1343.
- Hirai,Ryseck, et al. (1989). "Characterization of junD: a new member of the jun proto-oncogene family." EMBO J. 8(5): 1433-9.
- Hishizawa,Kanda, et al. (2010). "Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells for adult T-cell leukemia: a nationwide retrospective study." Blood 16(8): 1369–76.
- Hivin,Arpin-André, et al. (2006). "A modified version of a Fos-associated cluster in HBZ affects Jun transcriptional potency." Nucleic Acids Res. 34(9): 2761-72.
- Hivin,Basbous, et al. (2007). "The HBZ-SP1 isoform of human T-cell leukemia virus type I represses JunB activity by sequestration into nuclear bodies." Retrovirology 4: 14.
- Hivin,Frederic, et al. (2005). "Nuclear localization of HTLV-I bZIP factor (HBZ) is mediated by three distinct motifs." J Cell Sci 118((Pt 7)): 1355 - 1362.
- Höck,Weinmann, et al. (2007). "Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells." EMBO Rep. 8(11): 1052-60.
- Houzet and Jeang (2011). "MicroRNAs and human retroviruses." Biochim Biophys Acta. 1809(11-12): 686-93.
- Houzet,Yeung, et al. (2008). "MicroRNA profile changes in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) seropositive individuals." Retrovirology 5: 118.
- Huang J,Wang, et al. (2007). "Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes." Nat Med. 13(10): 1241-7.
- Huang,Wang, et al. (2007). "Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes." Nat Med. 13(10): 1241-7.
- Humphreys,Westman, et al. (2005). "MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function." Proc Natl Acad Sci U S A. 102(47): 16961-6.
- Huntzinger,Braun, et al. (2010). "Two PABPC1-binding sites in GW182 proteins promote miRNA-mediated gene silencing." EMBO J. 29(24): 4146-60.
- Hutvágner,McLachlan, et al. (2001). "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA." Science. 293(5531): 834-8.
- Hutvagner and Simard (2008). "Argonaute proteins: key players in RNA silencing." Nat Rev Mol Cell Biol. 9(1): 22-32.
- Hutvágner and Zamore (2002). "RNAi: nature abhors a double-strand." Curr Opin Genet Dev 12(2): 225-32.

I

- Ibáñez-Ventoso, Vora, et al. (2008). "Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology." *PLoS One* 3(7): e2818.
- Igakura, Stinchcombe, et al. (2003). "Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton." *Science* 299(5613): 1713-6.
- Iha, Kibler, et al. (2003). "Segregation of NF-kappaB activation through NEMO/IKKgamma by Tax and TNFalpha: implications for stimulus-specific interruption of oncogenic signaling." *Oncogene*. 22(55): 8912-23.
- Inaba, Sato, et al. (1989). "Prevention of transmission of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) through transfusion, by donor screening with antibody to the virus One-year experience." *Transfusion* 29(1): 7-11.
- Indran, Hande, et al. (2011). "hTERT overexpression alleviates intracellular ROS production, improves mitochondrial function, and inhibits ROS-mediated apoptosis in cancer cells." *Cancer Research* 71(1): 266-76.
- Ingelbrecht, Van Houdt, et al. (1994). "Posttranscriptional silencing of reporter transgenes in tobacco correlates with DNA methylation." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91(22): 10502-6.
- Iorio, Ferracin, et al. (2005). "MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer." *Cancer Res*. 65(16): 7065-70.
- Iorio, Visone, et al. (2007). "MicroRNA signatures in human ovarian cancer." *Cancer Res*. 67(18): 8699-707.
- Ishihara, Sasaki, et al. (2012). "Impact of miR-155 and miR-126 as novel biomarkers on the assessment of disease progression and prognosis in adult T-cell leukemia." *Cancer Epidemiology* 36(6): 560-565.
- Isono, Ohshima, et al. (2008). "Human T-cell leukemia virus type 1 HBZ protein bypasses the targeting function of ubiquitination." *J Biol Chem* 283(49): 34273 - 34282.

J

- Jackson, Hellen, et al. (2010). "The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation." *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(2): 113-27.
- Jakymiw, Lian, et al. (2005). "Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference." *Nat Cell Biol*. 7(12): 1267-74.
- Janowski, Huffman, et al. (2006). "Involvement of AGO1 and AGO2 in mammalian transcriptional silencing." *Nat Struct Mol Biol*. 13(9): 787-92.
- Jeang, Chiu, et al. (1991). "Induction of the HTLV-I LTR by Jun occurs through the Tax-responsive 21-bp elements." *Virology*. 181(1): 218-27.
- Jin, Teramoto, et al. (1997). "A human suppressor of c-Jun N-terminal kinase 1 activation by tumor necrosis factor alpha." *J Biol Chem*. 272(41): 25816-23.
- John, Enright, et al. (2004). "Human MicroRNA targets." *PLoS Biol*. 2(11): e363.
- John, Enright, et al. (2004). "Human MicroRNA targets." *PLoS Biol* 2: e363.
- Johnson, Harrod, et al. (2001). "Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukaemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1)." *International Journal of Experimental Pathology* 82(3): 135-147.

- Jones-Rhoades, Bartel, et al. (2006). "MicroRNAs and their regulatory roles in plants." Annu Rev Plant Biol 57: 19-53.
- Jones, Petrow-Sadowski, et al. (2008). "Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4(+) T cells." Nat Med. 14(4): 429-36.
- Jopling, Yi, et al. (2005). "Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA." Science. 309(5740): 1577-81.
- Jorgensen, Cluster, et al. (1996). "Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences." Plant Mol Biol. 31(5): 957-73.
- Journo, Douceron, et al. (2009). "HTLV gene regulation: because size matters, transcription is not enough." Future Microbiol 4(4): 425-40.

K

- Kadener, Rodriguez, et al. (2009). "Genome-wide identification of targets of the drosha-pasha/DGCR8 complex." RNA. 15(4): 537-45.
- Kalyanaraman, Sarngadharan, et al. (1982). "A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia." Science 218(4572): 571-3.
- Kameda, Akahori, et al. (1993). "JUND mutants with spontaneously acquired transforming potential have enhanced transactivating activity in combination with FRA2." Proc Natl Acad Sci USA. 90: 9369-9373.
- Kameda, Watanabe, et al. (1997). "C-Jun and JunD suppress maturation of chondrocytes." Cell Growth Differ. 8(5): 495-503.
- Kanellopoulou, Muljo, et al. (2005). "Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing." Genes Dev 19(4): 489-501.
- Kannagi, Harada, et al. (1991). "Predominant recognition of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) pX gene products by human CD8+ cytotoxic T cells directed against HTLV-I-infected cells." Int Immunol 3: 761 - 767.
- Kannagi, Ohashi, et al. (2004). "Immunological risks of adult T-cell leukemia at primary HTLV-I infection." Trends Microbiol 12: 346 - 352.
- Kapp and Lorsch (2004). "The molecular mechanics of eukaryotic translation." Annu Rev Biochem. 73: 657-704.
- Kardassis, Papakosta, et al. (1999). "c-Jun transactivates the promoter of the human p21(WAF1/Cip1) gene by acting as a superactivator of the ubiquitous transcription factor Sp1." J Biol Chem. 274(41): 29572-81.
- Karube, Ohshima, et al. (2004). "Expression of FoxP3, a key molecule in CD4CD25 regulatory T cells, in adult T-cell leukaemia/lymphoma cells." Br J Haematol. 126(1): 81-4.
- Karube, Tanaka, et al. (2005). "Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients." Cancer Sci. 96(2): 111-5.
- Kawabata, Higashimoto, et al. (2012). "Human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I)-specific CD8+ cells accumulate in the lungs of patients infected with HTLV-I with pulmonary involvement." J. Med. Virol. 84: 1120-1127.
- Kawahara, Megraw, et al. (2008). "Frequency and fate of microRNA editing in human brain." Nucleic Acids Res 36: 5270-5280.

- Kawasaki and Taira (2003). "Short hairpin type of dsRNAs that are controlled by tRNA(Val) promoter significantly induce RNAi-mediated gene silencing in the cytoplasm of human cells." Nucleic Acids Res 31(2): 700-7.
- Kedde,Strasser, et al. (2007). "RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA." Cell. 131(7): 1273-86.
- Kennerdell and Carthew (1998). "Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway." Cell. 95(7): 1017-26.
- Kertesz,lovino, et al. (2007). "The role of site accessibility in microRNA target recognition." Nat Genet. 39(10): 1278-84.
- Ketting,Fischer, et al. (2001). "Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*." Genes Dev 15(20): 2654-9.
- Khvorova,Reynolds, et al. (2003). "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias." Cell. ;115(2): 115(2): 209-16.
- Kim and Kim (2007). "Processing of intronic microRNAs. ." EMBO J 26: 775-783.
- Kim,Villeneuve, et al. (2006). "Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells." Nat. Struct. Mol. Biol. 13: 793–797.
- Kincaid,Burke, et al. (2012). "RNA virus microRNA that mimics a B-cell oncomiR." Proc Natl Acad Sci U S A 109(8): 3077-82.
- Kiriakidou,Tan, et al. (2007). "An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation." Cell. 129(6): 1141-51.
- Klase,Kale, et al. (2007). "HIV-1 TAR element is processed by Dicer to yield a viral micro-RNA involved in chromatin remodeling of the viral LTR." BMC Mol Biol 8: 63.
- Klase,Winograd, et al. (2009). "HIV-1 TAR miRNA protects against apoptosis by altering cellular gene expression." Retrovirology 6: 18.
- Kloosterman,Lagendijk AK, et al. (2007). "Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development." PLoS Biol. 5(8): e203.
- Kloosterman,Wienholds, et al. (2004). "Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo." Nucleic Acids Res. 32(21): 6284-91.
- Kluiver,van den Berg, et al. (2007). "Regulation of pri-microRNA BIC transcription and processing in Burkitt lymphoma." Oncogene. 2007 26(26): 3769-76.
- Koiwa,Hamano-Usami, et al. (2002). "5'-long terminal repeat-selective CpG methylation of latent human T-cell leukemia virus type 1 provirus in vitro and in vivo." J Virol 76: 9389 - 9397.
- Kondo,Kono, et al. (1987). "RISK OF ADULT T-CELL LEUKAEMIA/LYMPHOMA IN HTLV-I CARRIERS." The Lancet 330(8551): 159.
- Koyanagi,Itoyama, et al. (1993). "In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells." Virology. 196(1): 25-33.
- Kozomara and Griffiths-Jones (2011). "miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data." Nucleic Acids Research 39(suppl 1): D152-D157.
- Krek,Grun, et al. (2005). "Combinatorial microRNA target predictions." Nat Genet 37(5): 495 - 500.
- Kuang,Cai, et al. (2013). "Repression of Dicer is associated with invasive phenotype and chemoresistance in ovarian cancer." Oncol Lett. 5(4): 1149-1154.
- Kuchenbauer,Mah, et al. (2011). "Comprehensive analysis of mammalian miRNA* species and their role in myeloid cells." Blood. 118(2): 3350-8.

- Kuhlmann,Villaudy, et al. (2007). "HTLV-1 HBZ cooperates with JunD to enhance transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT)." Retrovirology 4: 92.
- Kumar,Lu, et al. (2007). "Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis." Nat Genet. 39(5): 673-7.
- Kwok,Laurance, et al. (1996). "Control of CAMP-Regulated Enhancers by the Viral Transactivator Tax Through CREB and the Co-Activator CBP." Nature 380: 642–646.

L

- Lagos-Quintana,Rauhut, et al. (2001). "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." Science 294(5543): 853-8.
- Lagos-Quintana,Rauhut, et al. (2003). "New microRNAs from mouse and human." RNA. 9(2): 175-9.
- Lagos-Quintana,Rauhut, et al. (2002). "Identification of tissue-specific microRNAs from mouse." Curr Biol. 12(9): 735-9.
- Lai (1995). "The molecular biology of hepatitis delta virus." Annual Review of Biochemistry 64: 259-286.
- Lai,Tomancak, et al. (2003). "Computational identification of Drosophila microRNA genes." Genome Biol. 4(7): R42.
- Lairmore and Franchini (2007). Human T-cell Leukemia Virus Types 1 and 2. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins.
- Lairmore,Haines, et al. (2012). "Mechanisms of human T-lymphotropic virus type 1 transmission and disease." Current Opinion in Virology 2: 474–481.
- Lallemand,Spyrou, et al. (1997). "Variations in Jun and Fos protein expression and AP-1 activity in cycling, resting and stimulated fibroblasts." Oncogene. 14(7): 819-30.
- Lambert,Bouttier, et al. (2012). "Les récepteurs d'entrée du HTLV-1 : un ménage à trois." Virologie 148–157.
- Landry,Halin, et al. (2009). "Upregulation of human T-cell leukemia virus type 1 antisense transcription by the viral tax protein." J Virol 83(4): 2048 - 2054.
- Landthaler,Yalcin, et al. (2004). "The Human DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8 and Its D. melanogaster Homolog Are Required for miRNA Biogenesis." Current Biology 14(23): 2162-2167.
- Landthaler,Yalcin, et al. (2004). "The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis." Curr Biol. 14(23): 2162-7.
- Lanford,Hildebrandt-Eriksen, et al. (2010). "Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection." Science. 327(5962): 198-201.
- Larocca,Chao, et al. (1989). "Human T-cell leukemia virus minus strand transcription in infected cells." Biochem Biophys Res Commun 163(2): 1006 - 1013.
- Larocque,Halin, et al. (2011). "Human T-cell lymphotropic virus type 3 (HTLV-3)- and HTLV-4-derived antisense transcripts encode proteins with similar Tax-inhibiting functions but distinct subcellular localization." Journal of Virology 85(23): 12673-85.
- Lau,Lim, et al. (2001). "An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans." Science 294(5543): 858-62.

- Lazzaretti, Tournier, et al. (2009). "The C-terminal domains of human TNRC6A, TNRC6B, and TNRC6C silence bound transcripts independently of Argonaute proteins." RNA. 15(6): 1059-66.
- Lee, Ahn, et al. (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. ." Nature 425: 415-419.
- Lee and Ambros (2001). "An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*." Science 294(5543): 862-4.
- Lee and Dutta (2009). "MicroRNAs in cancer." Annu Rev Pathol. 4: 199-227.
- Lee, Feinbaum, et al. (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell 75(5): 843-54.
- Lee, Hur, et al. (2006). "The role of PACT in the RNA silencing pathway." EMBO J. 25(3): 522-32.
- Lee, Jeon, et al. (2002). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." Embo J 21(17): 4663 - 4670.
- Lee, Jeon, et al. (2002). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." EMBO J 21: 4663-4670.
- Lee, Kim, et al. (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." Embo J 23(20): 4051 - 4060.
- Lee, Nakahara, et al. (2004). "Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. ." Cell 117: 69-81.
- Lemasson, Lewis, et al. (2007). "Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) bZIP protein interacts with the cellular transcription factor CREB to inhibit HTLV-1 transcription." J Virol 81(4): 1543 - 1553.
- Leung and Sharp (2007). "microRNAs: a safeguard against turmoil?" Cell. 130(4): 581-5.
- Levy, Khaled, et al. (2010). "Lineage-specific transcriptional regulation of DICER by MITF in melanocytes." Cell. 141(6): 994-1005.
- Lewis, Burge, et al. (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." Cell. 120(1): 15-20.
- Lewis, Hung Shih, et al. (2003). "Prediction of mammalian microRNA targets." Cell 115(7): 787 - 798.
- Lewis, Shih, et al. (2003). "Prediction of mammalian microRNA targets." Cell. 115: 787-798.
- Lezin, Gillet, et al. (2007). "Histone deacetylase mediated transcriptional activation reduces proviral loads in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients." Blood. 110(10): 3722-8.
- Lezin, Olindo, et al. (2009). "Gene activation therapy: from the BLV model to HAM/TSP patients." Front Biosci (Schol Ed). 1: 205-15.
- Li, Dai, et al. (2002). "Ultraviolet-induced junD activation and apoptosis in myeloblastic leukemia ML-1 cells." J Biol Chem. 277(36): 32668-76.
- Li, He, et al. (2004). "Gene regulation by Sp1 and Sp3." Biochem Cell Biol 82: 460-471.
- Li, Kesic, et al. (2009). "Kinetic analysis of Human T-cell leukemia virus type 1 gene expression in cell culture and infected animals." J Virol 83: 3788 - 3797.
- Li, Liu, et al. (2002). "JunD stabilization results in inhibition of normal intestinal epithelial cell growth through P21 after polyamine depletion." Gastroenterology. 123(3): 764-79.
- Li, Wang, et al. (2012). "Transcriptional activation of microRNA-34a by NF-kappa B in human esophageal cancer cells." BMC Mol Biol. 14.
- Lian, Li, et al. (2009). "The C-terminal half of human Ago2 binds to multiple GW-rich regions of GW182 and requires GW182 to mediate silencing." RNA. 15(5): 804-13.

- Lim,Lau, et al. (2005). "Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs." Nature. 433(7027): 769-73.
- Lim,Lau, et al. (2003). "The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*." Genes Dev. 17(8): 991-1008.
- Lingel,Simon, et al. (2004). "Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain." Nat Struct Mol Biol. 11(6): 576-7.
- Linnstaedt,Gottwein, et al. (2010). "Virally induced cellular microRNA miR-155 plays a key role in B-cell immortalization by Epstein-Barr virus." J Virol. 84(22): 11670-8.
- Liu,Carmell, et al. (2004). "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi." Science 305: 1437-1441.
- Liu,Rivas, et al. (2005). "A role for the P-body component GW182 in microRNA function." Nat Cell Biol. 7(12): 1261-6.
- Lodewick,Lamsoul, et al. (2011). "Move or Die: the Fate of the Tax Oncoprotein of HTLV-1." Viruses. 3(6): 829–857.
- Lu and Cullen (2004). "Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and MicroRNA biogenesis." J Virol. 78(23): 12868-76.
- Lu,Getz, et al. (2005). "MicroRNA expression profiles classify human cancers." Nature 435(7043): 834 - 838.
- Lu,Getz, et al. (2005). "MicroRNA expression profiles classify human cancers." Nature. 435(7043): 834-8.
- Lu,Getz, et al. (2005). "MicroRNA expression profiles classify human cancers." Nature. 435(7043): 834-8.
- Ludwig,Ambrus, et al. (2006). "Human Immunodeficiency Virus-Type 1 LTR DNA contains an intrinsic gene producing antisense RNA and protein products." Retrovirology 3: 80.
- Lujambio,Ropero, et al. (2007). "Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells." Cancer Res. 67(4): 1424-9.
- Lukiw (2012). "NF- κ B-regulated, proinflammatory miRNAs in Alzheimer's disease." Alzheimers Res Ther. 4(6): 47.
- Lund and Dahlberg (2006). "Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs." Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 71: 59-66.
- Lund,Güttinger, et al. (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." Science. 303(5654): 95-8.
- Lytle,Yario, et al. (2007). "Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR." Proc Natl Acad Sci U S A. 104(23): 9667-72.

M

- Ma,He, et al. (2012). "DNA methylation-regulated miR-193a-3p dictates resistance of hepatocellular carcinoma to 5-fluorouracil via repression of SRSF2 expression." J Biol Chem. 287(8): 5639-49.
- Ma,MacRae, et al. (2008). "Autoinhibition of Human Dicer by Its Internal Helicase Domain." Journal of Molecular Biology 380(1): 237-243.
- Ma,Yasunaga, et al. (2012). "HTLV-1 bZIP factor dysregulates the Wnt pathways to support proliferation and migration of adult T-cell leukemia cells." Oncogene. : 1-9.
- Ma,Ye, et al. (2004). "Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain." Nature. 429(6989): 318-22.

- Ma,Yuan, et al. (2005). "Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein." Nature. 434(7033): 666-70.
- Macatonia,Cruickshank, et al. (1992). "Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation." AIDS Res Hum Retroviruses. 8(9): 1699-706.
- MacDonald,Tamai, et al. (2009). "Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases." Dev Cell. 17(1): 9-26.
- Macrae,Li, et al. (2006). "Structure of Dicer and mechanistic implications for RNAi." Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 71: 73-80.
- MacRae,Ma, et al. (2008). "In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex." Proceedings of the National Academy of Sciences 105(2): 512-517.
- Mahieux and Gessain (2005). "[New human retroviruses: HTLV-3 and HTLV-4]." Med Trop (Mars) 65(6): 525-8.
- Majorovits,Nejmeddine, et al. (2008). "Human T-lymphotropic virus-1 visualized at the virological synapse by electron tomography." PLoS One 3(5): e2251.
- Manel,Kim, et al. (2003). "The ubiquitous glucose transporter GLUT-1 is a receptor for HTLV." Cell. 115(4): 449-59.
- Maniataki and Mourelatos (2005). "A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA." Genes Dev. ;19(24): 19(24): 2979-90.
- Marban,McCabe, et al. (2012). "Interplay between the HTLV-2 Tax and APH-2 proteins in the regulation of the AP-1 pathway." Retrovirology 9: 98.
- Maroney,Yu, et al. (2006). "Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells." Nat Struct Mol Biol. 13(12): 1102-7.
- Marriott and Semmes (2005). "Impact of HTLV-I Tax on cell cycle progression and the cellular DNA damage repair response." Oncogene. 24(39): 5986-95.
- Martin,Payton, et al. (2009). "Dicer and outcomes in patients with acute myeloid leukemia (AML)." Leuk Res. 33(8): e127.
- Martinez,Patkaniowska, et al. (2002). "Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi." Cell 110: 563-574.
- Mathonnet,Fabian, et al. (2007). "MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F." Science. 317(5845): 1764-7.
- Matsumoto,Ohshima, et al. (2005). "HTLV-1 HBZ suppresses AP-1 activity by impairing both the DNA-binding ability and the stability of c-Jun protein." Oncogene. 24(6): 1001-10.
- Matsuoka (2005). "Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL)." Retrovirology 2(1): 27.
- Matsuoka and Green (2009). "The HBZ gene, a key player in HTLV-1 pathogenesis." Retrovirology 6(1): 71.
- Matsuoka and Jeang (2007). "Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation." Nat Rev Cancer 7(4): 270 - 280.
- Matsuoka and Jeang (2011). "Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and leukemic transformation: viral infectivity, Tax, HBZ and therapy." Oncogene 30(12): 1379-89.
- McManus and Sharp (2002). "Gene silencing in mammals by small interfering RNAs." Nat Rev Genet 3(10): 737-47.
- Mechta-Grigoriou,Gerald, et al. (2001). "The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity." Oncogene. 20(19): 2378-89.
- Meier,Chang, et al. (2009). "Sex differences in the Toll-like receptor-mediated response of plasmacytoid dendritic cells to HIV-1." Nat Med. 15(8): 955-9.

- Meier,Luo, et al. (1994). "The cellular transcription factor USF cooperates with varicella-zoster virus immediate-early protein 62 to symmetrically activate a bidirectional viral promoter." Mol Cell Biol 14(10): 6896-906.
- Meister,Landthaler, et al. (2004). "Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs." Mol Cell 15(2): 185-97.
- Mensah-Osman,Veniaminova, et al. (2011). "Menin and JunD regulate gastrin gene expression through proximal DNA elements." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 301(5): G783-90.
- Merritt,Lin, et al. (2008). "Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer." N Engl J Med. 359(25): 2641-50.
- Mesnard,Barbeau, et al. (2006). "HBZ, a new important player in the mystery of adult T-cell leukemia." Blood 108(13): 3979 - 3982.
- Mezzanzanica,Bagnoli, et al. (2010). "Role of microRNAs in ovarian cancer pathogenesis and potential clinical implications." Int J Biochem Cell Biol. 42(8): 1262-72.
- Michael,O' Connor, et al. (2003). "Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia." Mol Cancer Res. 1(12): 882-91.
- Michael,Vahey, et al. (1994). "Negative-strand RNA transcripts are produced in human immunodeficiency virus type 1-infected cells and patients by a novel promoter downregulated by Tat." Journal of Virology 68(2): 979-87.
- Michlewski,Guil, et al. (2008). "Posttranscriptional regulation of miRNAs harboring conserved terminal loops." Mol Cell. 32(3): 383-93.
- Miyazaki,Yasunaga, et al. (2007). "Preferential selection of human T-cell leukemia virus type 1 provirus lacking the 5' long terminal repeat during oncogenesis." J Virol 81(11): 5714 - 5723.
- Miyoshi,Yoshimoto, et al. (1981). "Transformation of normal human cord lymphocytes by co-cultivation with a lethally irradiated human T-cell line carrying type C virus particles." Gann. 72(6): 997-8.
- Monteys,Spengler, et al. (2010). "Structure and activity of putative intronic miRNA promoters." RNA. 16(3): 495-505.
- Mori,Fujii, et al. (1999). "Constitutive activation of NF-kappaB in primary adult T-cell leukemia cells." Blood 93: 2360 - 2368.
- Mori,Fujii, et al. (2000). "Constitutive activation of transcription factor AP-1 in primary adult T-cell leukemia cells." Blood. 95(12): 3915-21.
- Morlando,Ballarino, et al. (2008). "Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally." Nat Struct Mol Biol. 15(9): 902-9.
- Morrison and Kenney (2004). "BZLF1, an Epstein-Barr virus immediate-early protein, induces p65 nuclear translocation while inhibiting p65 transcriptional function." Virology 328(2): 219 - 232.
- Mortreux,Kazanji, et al. (2001). "Two-step nature of human T-cell leukemia virus type 1 replication in experimentally infected squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*)." J Virol. 75(2): 1083-9.
- Mosoian,Teixeira, et al. (2010). "Prothymosin-alpha inhibits HIV-1 via Toll-like receptor 4-mediated type I interferon induction." Proc Natl Acad Sci U S A. 107(22): 10178-83.
- Mota-Miranda,Barreto, et al. (2013). "Molecular Study of HBZ and gp21 Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Proteins Isolated from Different Clinical Profile Infected Individuals." AIDS Res Hum Retroviruses. 29(10): 1370-2.

- Mott, Kobayashi, et al. (2007). "mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis." Oncogene. 26(42): 6133-40.
- Mourelatos, Dostie, et al. (2002). "miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs." Genes Dev. 16(6): 720-8.
- Mueller (1991). "The epidemiology of HTLV-I infection." Cancer Causes Control. 2(1): 37-52.
- Muralidhar, Goldstein, et al. (2007). "Global microRNA profiles in cervical squamous cell carcinoma depend on Drosha expression levels." J Pathol. 212(4): 368-77.
- Murata, Hayashibara, et al. (2006). "A novel alternative splicing isoform of human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ-SI) targets distinct subnuclear localization." J Virol 80(5): 2495 - 2505.
- Murchison, Partridge, et al. (2005). "Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A. 102(34): 12135-40.
- Mureith, Chang, et al. (2010). "Exposure to HIV-1-encoded Toll-like receptor 8 ligands enhances monocyte response to microbial encoded Toll-like receptor 2/4 ligands." AIDS. 24(12): 1841-8.
- Murphy, Figueroa, et al. (1989). "Sexual Transmission of Human T-Lymphotropic Virus Type I (HTLV-I)." Annals of Internal Medicine 111(7): 555-560.

N

- Nagai, Brennan, et al. (2001). "CD8+ T cells are an in vivo reservoir for human T-cell lymphotropic virus type I." Blood 98(6): 1858-1861.
- Nakamura, Canaani, et al. (2007). "Oncogenic All1 fusion proteins target Drosha-mediated microRNA processing." Proc Natl Acad Sci U S A. 104(26): 10980-5.
- Nakayama, Hieshima, et al. (2008). "Aberrant expression of Fra-2 promotes CCR4 expression and cell proliferation in adult T-cell leukemia." Oncogene. 27(23): 3221-32.
- Nakayama, Higuchi T, et al. (2012). "Expression and function of FRA2/JUND in cutaneous T-cell lymphomas." Anticancer Research 32(4): 1367-1373.
- Nam, Kidokoro, et al. (1988). "Processing of gag precursor polyprotein of human T-cell leukemia virus type I by virus-encoded protease." Journal of Virology 62(10): 3718-3728.
- Napoli, Lemieux, et al. (1990). "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans." Plant Cell. 2(4): 279-289.
- Nerenberg, Hinrichs, et al. (1987). "The tat gene of human T-lymphotropic virus type 1 induces mesenchymal tumors in transgenic mice." Science 237: 1324-1329.
- Nevins (2001). "The Rb/E2F pathway and cancer." Hum Mol Genet. 10(7): 699-703.
- Newman and Hammond (2010). "Emerging paradigms of regulated microRNA processing." Genes Dev. 24(11): 1086-92.
- Neyns, Katesuwanasing, et al. (1996). "Expression of the jun family of genes in human ovarian cancer and normal ovarian surface epithelium." Oncogene. 12(6): 1247-57.
- Nicot, Harrod, et al. (2005). "Human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1 nonstructural genes and their functions." Oncogene 24(39): 6026 - 6034.
- Nielsen, Shomron, et al. (2007). "Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs." RNA. 13(11): 1894-910.

- Nishina,Sato, et al. (1990). "Isolation and characterization of FRA2, an additional member of the FOS gene family." Proc Natl Acad Sci USA. 87: 3619-3623.
- Nomori,Mori, et al. (2011). "Risk of bronchioloalveolar carcinoma in patients with human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-I): case-control study results." Ann Thorac Cardiovasc Surg. 17(1): 19-23.
- Nottrott,Simard, et al. (2006). "Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes." Nat Struct Mol Biol. 13(12): 1108-14.
- Nykänen,Haley, et al. (2001). "ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway." Cell. 107(3): 309-21.

O

- Obernosterer,Leuschner, et al. (2006). "Post-transcriptional regulation of microRNA expression." RNA. 12(7): 1161-7.
- Oguma,Imamura, et al. (1992). "Accelerated declining tendency of human T-cell leukemia virus type I carrier rates among younger blood donors in Kumamoto, Japan." Cancer Res 52(9): 2620-3.
- Ohshima,Mukai, et al. (2010). "HTLV-1 basic leucine-zipper factor, HBZ, interacts with MafB and suppresses transcription through a Maf recognition element." J Cell Biochem. 111(1): 187-94.
- Okada,Yamashita, et al. (2009). "A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery." Science. 326(5957): 1275-9.
- Okamura,Hagen, et al. (2007). "The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila." Cell. 130(1): 89-100.
- Okamura,Ishizuka, et al. (2004). "Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways." Genes Dev. 18(14): 1655-66.
- Okamura,Phillips, et al. (2008). "The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution." Nat Struct Mol Biol. 15(4): 354-63.
- Okazaki,Ito, et al. (1998). "Two proteins translated by alternative usage of initiation codons in mRNA encoding a JunD transcriptional regulato." Biochem Biophys Res Commun. 250(2): 347-53.
- Okochi,Sato, et al. (1984). "A retrospective study on transmission of adult T cell leukemia virus by blood transfusion: seroconversion in recipients." Vox Sang. 46(5): 245-53.
- Olsen and Ambros (1999). "The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation." Dev Biol 216(2): 671-80.
- Omoto and Fujii (2005). "Regulation of human immunodeficiency virus 1 transcription by nef microRNA." Journal of General Virology 86(3): 751-755.
- Omoto,Ito, et al. (2004). "HIV-1 nef suppression by virally encoded microRNA." Retrovirology. 1: 44.
- OMS (2013). "Cancer." Aide-mémoire 297.
- Ørom,Nielsen, et al. (2008). "MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation." Mol Cell. 30(4): 460-71.
- Osame,Usuku, et al. (1986). "HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity." Lancet 1(8488): 1031 - 1032.

- Oshita, Kishida, et al. (2003). "Identification and characterization of a novel Dvl-binding protein that suppresses Wnt signalling pathway." Genes Cells. 8(12): 1005-17.
- Ouellet, Plante, et al. (2008). "Identification of functional microRNAs released through asymmetrical processing of HIV-1 TAR element." Nucleic Acids Research 36(7): 2353-65.
- Ozsolak, Poling, et al. (2008). "Chromatin structure analyses identify miRNA promoters." Genes Dev. 22(22): 3172-83.

P

- Pais-Correia, Sachse, et al. (2010). "Biofilm like extracellular viral assemblies mediate HTLV-1 cell-to-cell transmission at virological synapses." Nat Med 16(1): 83-9.
- Pampalakis, Diamandis, et al. (2010). "Down-regulation of dicer expression in ovarian cancer tissues." Clin Biochem. 43(3): 324-7.
- Papadopoulos, Ferwerda, et al. (2010). "Association of toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms with increased infection risk in patients with advanced HIV-1 infection." Clin Infect Dis. 51(2): 242-7.
- Park, Davies, et al. (1994). "TAR RNA-binding protein is an inhibitor of the interferon-induced protein kinase PKR." Proc Natl Acad Sci U S A. 91(11): 4713-7.
- Parker, Roe, et al. (2004). "Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity." EMBO J. 23(24): 4727-37.
- Parker, Roe, et al. (2005). "Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex." Nature. 434(7033): 663-6.
- Parkin DM, Pisani P, et al. (1999). "Global cancer statistics." CA Cancer J Clin 49(1): 33-64.
- Pasquinelli (2002). "MicroRNAs: deviants no longer." Trends Genet 18(4): 171-3.
- Pasquinelli, Reinhart, et al. (2000). "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." Nature. 408(6808): 86-9.
- Patel and Sen (1998). "PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR." EMBO J. 17(15): 4379-90.
- Pauley, Eystathiou, et al. (2006). "Formation of GW bodies is a consequence of microRNA genesis." EMBO Rep. 7(9): 904-10.
- Peloponese and Jeang (2006). "Role for Akt/protein kinase B and activator protein-1 in cellular proliferation induced by the human T-cell leukemia virus type 1 tax oncoprotein." J Biol Chem. 281(13): 8927-38.
- Peloponese, Kinjo, et al. (2007). "Human T-cell leukemia virus type 1 Tax and cellular transformation." Int J Hematol. 86(2): 101-6.
- Peters and Meister (2007). "Argonaute proteins: mediators of RNA silencing." Mol Cell. 26(5): 611-23. .
- Petersen, Bordeleau, et al. (2006). "Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells." Mol Cell. 21(4): 533-42.
- Pfeffer and Voinnet (2006). "Viruses, microRNAs and cancer." Oncogene. 25(46): 6211-9.
- Pfeffer, Zavolan, et al. (2004). "Identification of virus-encoded microRNAs." Science 304(5671): 734-6.
- Pham, Pellino, et al. (2004). "A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in Drosophila." Cell. 117(1): 83-94.

- Pichler,Schneider, et al. (2008). "MicroRNA miR-146a and further oncogenesis-related cellular microRNAs are dysregulated in HTLV-1-transformed T lymphocytes." Retrovirology 5(1): 100.
- Pierce,Gimenez-Conti, et al. (1998). "Increased E2F1 activity induces skin tumors in mice heterozygous and nullizygous for p53." Proc Natl Acad Sci U S A 95(15): 8858-63.
- Pillai,Bhattacharyya, et al. (2005). "Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells." Science. 309(5740): 1573-6.
- Piskounova,Viswanathan, et al. (2008). "Determinants of microRNA processing inhibition by the developmentally regulated RNA-binding protein Lin28." J Biol Chem. 283(31): 21310-4.
- Poiesz,Ruscetti, et al. (1980). "Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma." Proc Natl Acad Sci USA 77(12): 7415 - 7419.
- Pollack,Pasquarello, et al. (1997). "Differential expression of c-jun and junD in end-stage human cardiomyopathy." J Cell Biochem. 65(2): 245-53.
- Porkka,Pfeiffer, et al. (2007). "MicroRNA expression profiling in prostate cancer." Cancer Res. 67(13): 6130-5.
- Portis,Harding, et al. (2001). "The contribution of NF-kappa B activity to spontaneous proliferation and resistance to apoptosis in human T-cell leukemia virus type 1 Tax-induced tumors." Blood 98(4): 1200-1208.
- Prochnik,Rokhsar, et al. (2007). "Evidence for a microRNA expansion in the bilaterian ancestor." Dev Genes Evol 217(7): 73-7.

Q

- Qiao,He, et al. (2006). "Human immunodeficiency virus 1 Nef suppresses CD40-dependent immunoglobulin class switching in bystander B cells." Nat Immunol 7: 302-310.

R

- Rahman,Quann, et al. (2012). "HTLV-1 Tax mediated downregulation of miRNAs associated with chromatin remodeling factors in T cells with stably integrated viral promoter." PLoS One 7(4): e34490.
- Ramsay and Gonda (2008). "MYB function in normal and cancer cells." Nat Rev Cancer. 8: 523-534.
- Randall,Panis, et al. (2007). "Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication." Proceedings of the National Academy of Sciences 104(31): 12884-12889.
- Rao,Di Leva, et al. (2011). "MicroRNA-221/222 confers breast cancer fulvestrant resistance by regulating multiple signaling pathways." Oncogene. 30(9): 1082-97.
- Rehwinkel,Behm-Ansmant, et al. (2005). "A crucial role for GW182 and the DCP1:DCP2 decapping complex in miRNA-mediated gene silencing." RNA. 11(11): 1640-7.
- Reinhart,Slack, et al. (2000). "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*." Nature 403(6772): 901-6.

- Reinke,Grigoryan, et al. (2010). "Identification of bZIP interaction partners of viral proteins HBZ, MEQ, BZLF1, and K-bZIP using coiled-coil arrays." Biochemistry 49(9): 1985-97.
- Rhoades,Reinhart, et al. (2002). "Prediction of plant microRNA targets." Cell 110(4): 513-20.
- Rinaldi,Poretti, et al. (2007). "Concomitant MYC and microRNA cluster miR-17-92 (C13orf25) amplification in human mantle cell lymphoma." Leuk Lymphoma. 48(2): 410-2.
- Risser and Pollack (1974). "A nonselective analysis of SV40 transformation of mouse 3T3 cells." Virology 59: 477-89.
- Ro,Park, et al. (2007). "Tissue-dependent paired expression of miRNAs." Nucleic Acids Res. 35(17): 5944-53.
- Robb and Rana (2007). "RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading." Mol Cell. 26(4): 523-37.
- Rodriguez,Griffiths-Jones, et al. (2004). "Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units." Genome Res. ;14(10A): 14(10A): 1902-10.
- Roldo,Missiaglia, et al. (2006). "MicroRNA Expression Abnormalities in Pancreatic Endocrine and Acinar Tumors Are Associated With Distinctive Pathologic Features and Clinical Behavior." Journal of Clinical Oncology 24(29): 4677-4684.
- Romano and Macino (1992). "Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences." Mol Microbiol. 6(22): 3343-53.
- Rosenberg,Preiss, et al. (1985). "Production of phenocopies by Krüppel antisense RNA injection into *Drosophila* embryos." Nature 313(2004): 703-6.
- Rosin,Koch, et al. (1998). "A human T-cell leukemia virus Tax variant incapable of activating NF-kappaB retains its immortalizing potential for primary T-lymphocytes." J Biol Chem 273(12): 6698 - 6703.
- Roucoux and Murphy (2004). "The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II." AIDS Rev. 6(3): 144-54.
- Ruby,Jan, et al. (2007). "Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing." Nature 448(7149): 83-6.
- Ruddle,Li, et al. (1993). "Mice transgenic for HTLV-I LTR-tax exhibit tax expression in bone, skeletal alterations, and high bone turnover." Virology 197: 196-204.
- Ruggero,Corradin, et al. (2010). "Role of microRNAs in HTLV-1 infection and transformation." Mol Aspects Med. : 31(5): 367-82.
- Ruvkun and Giusto (1989). "The *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-14* encodes a nuclear protein that forms a temporal developmental switch." Nature 338(6213): 313-9.

S

- Saetrom,Heale, et al. (2007). "Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity." Nucleic Acids Res. 35(7): 2333-42.
- Saini,Griffiths-Jones, et al. (2007). "Genomic analysis of human microRNA transcripts." Proc Natl Acad Sci U S A 104(45): 17719-24.
- Saito,Higuchi, et al. (2002). "Molecular analysis of T cell clonotypes in muscle-infiltrating lymphocytes from patients with human T lymphotropic virus type 1 polymyositis. ." J. Infect. Dis. 186: 1231–1241.

- Saito,Liang, et al. (2006). "Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells." Cancer Cell. 9(6): 435-43.
- Saito,Matsuzaki, et al. (2009). "In vivo expression of the HBZ gene of HTLV-1 correlates with proviral load, inflammatory markers and disease severity in HTLV-1 associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP)." Retrovirology 6: 19.
- Sakashita,Hattori, et al. (1992). "Mutations of the p53 gene in adult T-cell leukemia." Blood 79: 477 - 480.
- Salcedo-Cifuentes,Cabrera, et al. (2009). "[Clonal expansion and genomic characterization of the human T-cell lymphotropic virus type I during the integration process in adult T-cell leukemia/lymphoma]." Biomedica. 29(2): 218-31.
- Salzman,Shubert-Coleman, et al. (2007). "P68 RNA Helicase Unwinds the Human let-7 MicroRNA Precursor Duplex and Is Required for let-7-directed Silencing of Gene Expression." Journal of Biological Chemistry 282(45): 32773-32779.
- Samols,Skalsky, et al. (2007). "Identification of cellular genes targeted by KSHV-encoded microRNAs." PLoS Pathog. 3(5): e65.
- Sampey, Van Duyne, et al. (2012). "Complex role of microRNAs in HTLV-1 infections." Front Genet. 3: 295.
- Sasaki,Shiohama, et al. (2003). "Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome small star, filled." Genomics 82: 323-330.
- Sato,Oka, et al. (2010). "Multi-step aberrant CpG island hyper-methylation is associated with the progression of adult T-cell leukemia/lymphoma." Am J Pathol 176(1): 402-15.
- Satoh (2012). "Molecular network analysis of human microRNA targetome: from cancers to Alzheimer's disease." BioData Min. 5(1): 17.
- Satou Y,Yasunaga J, et al. (2006). "HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells." Proc Natl Acad Sci U S A 103(3): 720-725.
- Satou,Yasunaga, et al. (2006). "HTLV-I basic leucine zipper factor gene mRNA supports proliferation of adult T cell leukemia cells." Proc Natl Acad Sci U S A 103(3): 720-725.
- Scadden (2005). "The RISC subunit Tudor-SN binds to hyper-edited double-stranded RNA and promotes its cleavage." Nat Struct Mol Biol. 12(6): 489-96.
- Scaria and Jadhav (2007). "microRNAs in viral oncogenesis." Retrovirology 4: 82.
- Schnall-Levin,Zhao, et al. (2010). "Conserved microRNA targeting in Drosophila is as widespread in coding regions as in 3'UTRs." Proc Natl Acad Sci U S A. 107(36): 15751-6.
- Schneider,Schwenk, et al. (1977). "Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma." Int J Cancer. 19(5): 621-6.
- Schopman,Willemsen, et al. (2012). "Deep sequencing of virus-infected cells reveals HIV-encoded small RNAs." Nucleic Acids Research 40(1): 414-27.
- Schwarz,Hutvágner, et al. (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." Cell. 115(2): 199-208.
- Seggerson,Tang, et al. (2002). "Two genetic circuits repress the Caenorhabditis elegans heterochronic gene lin-28 after translation initiation." Dev Biol. 243(2): 215-25.
- Seiki,Hattori, et al. (1983). "Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA." Proc Natl Acad Sci USA 80(12): 3618-22.

- Selbach, Schwanhäusser, et al. (2008). "Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs." Nature. 455(7209): 58-63.
- Sempere, Cole, et al. (2006). "The phylogenetic distribution of metazoan microRNAs: insights into evolutionary complexity and constraint." J Exp Zool B Mol Dev Evol. 306(6): 575-88.
- Shah, Morimura, et al. (2007). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha regulates a microRNA-mediated signaling cascade responsible for hepatocellular proliferation." Mol Cell Biol. 27(12): 4238-4247.
- Sharp (2001). "RNA interference--2001." Genes Dev. 15(5): 485-90.
- Shaulian and Karin (2002). "AP-1 as a regulator of cell life and death." Nat Cell Biol. 4(5): E131-6.
- Shaywitz and Greenberg (1999). "CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals." Annu Rev Biochem. 68: 821-61.
- Shi and Massagué (2003). "Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus." Cell. 113(6): 685-700.
- Shimoda, Sugata, et al. (1998). "Evidence for a bidirectional promoter complex within the X gene of woodchuck hepatitis virus." Virus Research 56(1): 25-39.
- Shimoyama (1991). "Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87)." Br J Haematol. 79(3): 428-37.
- Shiohama, Sasaki, et al. (2007). "Nucleolar localization of DGCR8 and identification of eleven DGCR8-associated proteins." Exp Cell Res. 313(20): 4196-207.
- Short and Pfarr (2002). "Translational Regulation of the JunD Messenger RNA." J Biol Chem. 277(36): 32697-705.
- Slezak-Prochazka, Durmus, et al. (2010). "MicroRNAs, macrocontrol: Regulation of miRNA processing." RNA 16(6): 1087-1095.
- Song, Liu, et al. (2003). "The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes." Nat Struct Biol. 10(12): 1026-32.
- Song, Smith, et al. (2004). "Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity." Science. 305(5689): 1434-7.
- Song, Ugai, et al. (2001). "Two consecutive zinc fingers in Sp1 and in MAZ are essential for interactions with cis-elements." J Biol Chem. 276: 30429-30434.
- Song, Wang, et al. (2009). "Mechanism of chemoresistance mediated by miR-140 in human osteosarcoma and colon cancer cells." Oncogene 28(46): 4065-4074.
- Staal and Clevers (2005). "WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation." Nat Rev Immunol. 5(1): 21-30.
- Staal, Luis, et al. (2008). "WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings." Nat Rev Immunol. 8(8): 581-93.
- Stewart and Kleihues (2003). "Rapport sur le cancer dans le monde " IARC Press: 351 pages.
- Street, Macdonald, et al. (2005). "Hepatitis C virus NS5A-mediated activation of phosphoinositide 3-kinase results in stabilization of cellular beta-catenin and stimulation of beta-catenin-responsive transcription." J Virol. 79(8): 5006-16.
- Stuver, Taehibana, et al. (1993). "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." Journal of Infectious Diseases 167(1): 57-65.

- Su,Trombly, et al. (2009). "Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing." Genes Dev. 23(3): 304-17.
- Sun,Li, et al. (2010). "Sequence context outside the target region influences the effectiveness of miR-223 target sites in the RhoB 3'UTR." Nucleic Acids Res. 38(1): 239-52.
- Sun and Yamaoka (2005). "Activation of NF-kappaB by HTLV-I and implications for cell transformation." Oncogene 24(39): 5952-64.
- Sun,Yao, et al. (2012). "MiR-200b and miR-15b regulate chemotherapy-induced epithelial-mesenchymal transition in human tongue cancer cells by targeting BMI1." Oncogene. 31(4): 432-45.
- Suzuki,Yamagata, et al. (2009). "Modulation of microRNA processing by p53. ." Nature 460: 529-533.

T

- Tabakin-Fix,Azran, et al. (2006). "Functional inactivation of p53 by human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein: mechanisms and clinical implications." Carcinogenesis 27: 673 - 681.
- Tagawa,Karube, et al. (2007). "Synergistic action of the microRNA-17 polycistron and Myc in aggressive cancer development." Cancer Sci. 98(9): 1482-90.
- Tagawa and Seto (2005). "A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma." Leukemia. 19(11): 2013-6.
- Takahashi,Sano, et al. (1991). "A human T cell leukemia virus type-I carrier with recurrent thrombocytopenia and various autoantibodies." Acta Med Okayama 45(6): 445-9.
- Takamizawa,Konishi, et al. (2004). "Reduced Expression of the let-7 MicroRNAs in Human Lung Cancers in Association with Shortened Postoperative Survival." Cancer Research 64(11): 3753-3756.
- Takatsuki (2005). "Discovery of adult T-cell leukemia." Retrovirology 2: 16.
- Takatsuki,Yamaguchi, et al. (1985). "Clinical Diversity in Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma." Cancer Research 45(9 Supplement): 4644s-4645s.
- Takeda,Maeda, et al. (2004). "Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells." Int J Cancer 109: 559 - 567.
- Takezaki,Tajima, et al. (1997). "Short-term breast-feeding may reduce the risk of vertical transmission of HTLV-I. The Tsushima ATL Study Group." Leukemia. 11 Suppl 3: 60-2.
- Takimoto,Wakiyama, et al. (2009). "Mammalian GW182 contains multiple Argonaute-binding sites and functions in microRNA-mediated translational repression." RNA. 15(6): 1078-89.
- Tam (2001). "Identification and characterization of human BIC, a gene on chromosome 21 that encodes a noncoding RNA." Gene 274(1-2): 157-167.
- Tamiya,Matsuoka, et al. (1996). "Two types of defective human T-lymphotropic virus type I provirus in adult T-cell leukemia." Blood 88: 3065 - 3073.
- Taniguchi,Nosaka, et al. (2005). "Silencing of human T-cell leukemia virus type I gene transcription by epigenetic mechanisms." Retrovirology 2: 64.
- Tay,Kats, et al. (2011). "Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs." Cell. 147(2): 344-57.

- Taylor and Matsuoka (2005). "Natural history of adult T-cell leukemia/lymphoma and approaches to therapy." Oncogene 24(39): 6047-57.
- Temin and Mizutani (1970). "RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus." Nature.
- Thebault,Basbous, et al. (2004). "HBZ interacts with JunD and stimulates its transcriptional activity." FEBS Lett 562(1-3): 165 - 170.
- Thermann and Hentze (2007). "Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation." Nature. 447(7146): 875-8.
- Thomas,Perzova, et al. (2010). "LGL leukemia and HTLV." AIDS Res Hum Retroviruses. 26(1): 33-40.
- Thomson,Newman, et al. (2006). "Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer." Genes Dev. 20(16): 2202-7.
- Tili,Michaille, et al. (2010). "Resveratrol decreases the levels of miR-155 by upregulating miR-663, a microRNA targeting JunB and JunD." Carcinogenesis. 31(9): 1561-6.
- Till,Lejeune, et al. (2007). "A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain." Nat Struct Mol Biol. 14(10): 897-903.
- Tomari,Matranga, et al. (2004). "A protein sensor for siRNA asymmetry." Science. 306(5700): 1377-80.
- Tomita (2012). "Important Roles of Cellular MicroRNA miR-155 in Leukemogenesis by Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infection." ISRN Microbiol. 2012: 978607.
- Tomita,Kawakami, et al. (2006). "Curcumin suppresses constitutive activation of AP-1 by downregulation of JunD protein in HTLV-1-infected T-cell lines." Leukemia Research 30(3): 313-21.
- Tomita,Tanaka, et al. (2009). "MicroRNA miR-146a is induced by HTLV-1 tax and increases the growth of HTLV-1-infected T-cells." Int J Cancer.
- Topp (1981). "Normal rat cell lines deficient in nuclear thymidine kinase." Virology. 113(1): 408-11.
- Toulza,Heaps, et al. (2008). "High frequency of CD4+FoxP3+ cells in HTLV-1 infection: inverse correlation with HTLV-1-specific CTL response." Blood. 111(10): 5047-53.
- Toyota,Suzuki, et al. (2008). "Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer." Cancer Res. 68(11): 4123-32.
- Trabucchi,Briata, et al. (2009). "The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs." Nature. 459(7249): 1010-4.
- Trentin,Rebeyrotte, et al. (1998). "Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Reverse Transcriptase (RT) Originates from the pro and pol Open Reading Frames and Requires the Presence of RT-RNase H (RH) and RT-RH-Integrase Proteins for Its Activity." Journal of Virology 72(8): 6504-6510.
- Triboulet,Chang, et al. (2009). "Post-transcriptional control of DGCR8 expression by the Microprocessor." RNA. 15(6): 1005-11.
- Trøen,Nygaard, et al. (2004). "Constitutive expression of the AP-1 transcription factors c-jun, junD, junB, and c-fos and the marginal zone B-cell transcription factor Notch2 in splenic marginal zone lymphoma." J Mol Diagn. 6(4): 297-307.
- Tsai,Lin, et al. (2009). "MicroRNA mir-346 targets the 5'-untranslated region of receptor-interacting protein 140 (RIP140) mRNA and up-regulates its protein expression." Biochem J. 424(3): 411-8.

- Tsang,Zhu, et al. (2007). "MicroRNA-mediated feedback and feedforward loops are recurrent network motifs in mammals." Mol Cell. 26(5): 753-67.
- Tsukasaki (2012). "Adult T-cell leukemia-lymphoma." Hematology. Suppl 1: S32-5.
- Tsukasaki and Tobinai (2013). "Biology and treatment of HTLV-1 associated T-cell lymphomas." Best Practice & Research Clinical Haematology 26(1): 3-14.
- Tuschl,Zamore, et al. (1999). "Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro." Genes Dev 13(24): 3191-7.

U

- Uchida,Otsuka, et al. (1999). "Correlation of telomerase activity with development and progression of adult T-cell leukemia." Leukemia Research 23(3): 311-6.
- Uchiyama,Yodoi, et al. (1977). "Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases." Blood 50(3): 481-92.
- Umbach and Cullen (2009). "The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity." Genes Dev. 23(10): 1151-64.
- Ureta-Vidal,Angelin-Duclos, et al. (1999). "Mother-to-child transmission of human T-cell-leukemia/lymphoma virus type I: implication of high antiviral antibody titer and high proviral load in carrier mothers." Int J Cancer 82(6): 832-6.
- Usui,Yanagihara, et al. (2008). "Characteristic expression of HTLV-1 basic zipper factor (HBZ) transcripts in HTLV-1 provirus-positive cells." Retrovirology 5: 34.

V

- Valastyan,Reinhardt, et al. (2009). "A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis." Cell. 137(6): 1032-46.
- Vallée and Carré (1904). "Sur la nature infectieuse de l'anémie du cheval." Comp. Rend. Acad. Sci. 139: 331-333.
- Van Duyne,Guendel, et al. (2012). "Localization and sub-cellular shuttling of HTLV-1 tax with the miRNA machinery." PLoS One. 7(7): e40662.
- Van Prooyen,Gold, et al. (2010). "Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission." Proc Natl Acad Sci U S A 107(48): 20738-43.
- Vasudevan,Tong, et al. (2007). "Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation." Science 318(5858): 1931-4.
- Velhagen,Hilger, et al. (1995). "An antisense promoter within the hepatitis B virus X gene." Intervirology 38(3-4): 127-33.
- Vella,Reinert, et al. (2004). "Architecture of a validated microRNA::target interaction." Chem Biol. 11(12): 1619-23.
- Verdel,Jia, et al. (2004). "RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex." Science. 303(5658): 672-6.
- Vesely,Staber, et al. (2009). "Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins." Mutat Res. 682(1): 7-12.
- Visone,Pallante, et al. (2007). "Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas." Oncogene. 26(54): 7590-5.

Viswanathan,Daley, et al. (2008). "Selective blockade of microRNA processing by Lin28. ." Science 320: 97-100.

W

- Wakiyama,Takimoto, et al. (2007). "Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system." Genes Dev. 21(15): 1857-62.
- Wang,Legesse-Miller, et al. (2012). "Regulation of the let-7a-3 promoter by NF-κB." PLoS One 7(2): e31240.
- Wang,Yanez, et al. (2008). "MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components." Proceedings of the National Academy of Sciences 105(14): 5343-5348.
- Wang,Ye, et al. (2009). "Cellular microRNA expression correlates with susceptibility of monocytes/macrophages to HIV-1 infection." Blood. 113(3): 671-4.
- Watanabe (2011). "Current status of HTLV-1 infection." International Journal of Hematology 94(5): 430-434.
- Wattel,Cavrois, et al. (1996). "Clonal Expansion of Infected Cells: A Way of Life for HTLV-I." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol. 13(Supplement 1): S92-S99.
- Weber,Stresemann, et al. (2007). "Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells." Cell Cycle. 6(9): 1001-5.
- Weinberg (1995). "The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes." Ann N Y Acad Sci. 758: 331-8.
- Weitzman,Fiette, et al. (2000). "JunD protects cells from p53-dependent senescence and apoptosis." Mol Cell. 6(5): 1109-19.
- Welch,Chen, et al. (2007). "MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells." Oncogene. 26(34): 5017-22.
- Wells,Hillner, et al. (1998). "Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors." Mol Cell. 2(1): 135-40.
- Wessner and Wigdahl (1997). "AP-1 derived from mature monocytes and astrocytes preferentially interacts with the HTLV-I promoter central 21 bp repeat." Leukemia 11 Suppl 3: 21-4.
- Wightman,Ha, et al. (1993). "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*." Cell 75(5): 855-62.
- Wiktor,Pate, et al. (1997). "Mother-to-child transmission of human T-cell lymphotropic virus type I associated with prolonged breast-feeding." J Hum Virol. 1(1): 37-44.
- Winter,Jung, et al. (2009). "Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation." Nat Cell Biol. 11(3): 228-34.
- Wolfe,Heneine, et al. (2005). "Emergence of unique primate T-lymphotropic viruses among central African bushmeat hunters." Proc Natl Acad Sci U S A. 102(22): 7994-9.
- Wu,Fan, et al. (2006). "MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA." Proc Natl Acad Sci U S A. 103(11): 4034-9.
- Wu,Shen, et al. (2011). "Down-regulation of Dicer in hepatocellular carcinoma." Med Oncol. 28(3): 804-9.
- Wu,Tao, et al. (2012). "Downregulation of Dicer, a component of the microRNA machinery, in bladder cancer." Mol Med Rep. 5(3): 695-9.

Wu,Zhang, et al. (2003). "c-Jun and the dominant-negative mutant, TAM67, induce vimentin gene expression by interacting with the activator Sp1." Oncogene. 22(55): 8891-901.

Y

Yamagishi,Nakano, et al. (2012). "Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF- κ B pathway in adult T cell leukemia and other cancers." Cancer Cell. 21(1): 121-35.

Yamagishi and Watanabe (2012). "miRNA in HTLV-1 related disease." Uirusu. 62(1): 9-18.

Yan,Fu, et al. (2009). "PDLIM2 suppresses human T-cell leukemia virus type I Tax-mediated tumorigenesis by targeting Tax into the nuclear matrix for proteasomal degradation." Blood 113(18): 4370 - 4380.

Yan,Yan, et al. (2003). "Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain." Nature. 426(6965): 468-74.

Yang,Chendrimada, et al. (2006). "Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases." Nat Struct Mol Biol 13: 13-21.

Yang and Lai (2010). "Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis in vertebrates." Cell Cycle. 9(22): 4455-60.

Yang,Phillips, et al. (2011). "Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species." RNA. 17(2): 312-26.

Yasunaga and Matsuoka (2007). "Human T-Cell Leukemia Virus Type I Induces Adult T-Cell Leukemia: From Clinical Aspects to Molecular Mechanisms." Cancer Control. 14(2): 133-40.

Yazgan and Pfarr (2001). "Differential binding of the Menin tumor suppressor protein to JunD isoforms." Cancer Res. 61(3): 916-20.

Yazgan and Pfarr (2002). "Regulation of two JunD isoforms by Jun N-terminal kinases." J Biol Chem. 277(33): 29710-8.

Ye,Lv, et al. (2008). "The effect of central loops in miRNA:MRE duplexes on the efficiency of miRNA-mediated gene regulation." PLoS One 3(3): e1719.

Yeung and Jeang (2011). "MicroRNAs and cancer therapeutics." Pharm Res. 2011 Dec;28(12): 28(12): 3043-9.

Yeung,Yasunaga, et al. (2008). "Roles for microRNAs, miR-93 and miR-130b, and TP53INP1 tumor suppressor in cell growth dysregulation by HTLV-1." Cancer Res 68(21): 8976 - 8985.

Yi,Qin, et al. (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." Genes Dev. 17(24): 3011-6.

Yin,Kannian, et al. (2012). "Human T-cell leukemia virus type 2 antisense viral protein 2 is dispensable for in vitro immortalization but functions to repress early virus replication in vivo." Journal of Virology 86(16): 8412-21.

Yoda,Kawamata, et al. (2010). "ATP-dependent human RISC assembly pathways." Nat Struct Mol Biol. 17(1): 17-23.

Yoshida (2001). "Multiple viral strategies of HTLV-1 for dysregulation of cell growth control." Annu Rev Immunol. 19: 475-496.

Yoshida (2005). "Discovery of HTLV-1, the first human retrovirus, its unique regulatory mechanisms, and insights into pathogenesis." Oncogene. 24(39): 5931-7.

- Yoshida, Miyoshi, et al. (1982). "Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease." Proceedings of the National Academy of Sciences 79(6): 2031-2035.
- Yoshida, Satou, et al. (2008). "Transcriptional control of spliced and unspliced human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ) gene." Journal of Virology 82(19): 9359-68.
- Younis and Green (2005). "The human T-cell leukemia virus Rex protein." Front Biosci. 10: 431-45.
- Yuan, Liu, et al. (2009). "Clustered microRNAs' coordination in regulating protein-protein interaction network." BMC Systems Biology 3(1): 65.

Z

- Zamore (2002). "Ancient pathways programmed by small RNAs." Science 296(5571): 1265-9.
- Zamore, Tuschl, et al. (2000). "RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals." Cell. 101(1): 25-33.
- Zekri, Huntzinger, et al. (2009). "The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release." Mol Cell Biol. 29(23): 6220-31.
- Zeng and Cullen (2002). "RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm." RNA 8(7): 855-60.
- Zeng and Cullen (2004). "Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5." Nucleic Acids Res. 32(16): 4776-85.
- Zhang, Kolb, et al. (2004). "Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III." Cell. 118(1): 57-68.
- Zhao and Giam (1992). "Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) transcriptional activator, Tax, enhances CREB binding to HTLV-I 21-base-pair repeats by protein-protein interaction." Proc Natl Acad Sci U S A. 89(15): 7070-4.
- Zhao and Matsuoka (2012). "HBZ and its roles in HTLV-1 oncogenesis." Front Microbiol. 3: 247.
- Zhao, Satou, et al. (2011). "HTLV-1 bZIP factor enhances TGF- β signaling through p300 coactivator." Blood 118(7): 1865-76.
- Zhao, Yasunaga, et al. (2009). "Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor selectively suppresses the classical pathway of NF-kappaB." Blood 113(12): 2755 - 2764.
- Zheng, Wolfe, et al. (2010). "Emergence of a novel and highly divergent HTLV-3 in a primate hunter in Cameroon." Virology 401(2): 137-145.
- Zhou, Gao, et al. (2007). "Role of c-Fos/JunD in protecting stress-induced cell death." Cell Prolif. 40(3): 431-44.
- Zhu, Yu, et al. (2011). "Reduced miR-128 in breast tumor-initiating cells induces chemotherapeutic resistance via Bmi-1 and ABCC5." Clin Cancer Res. 17(22): 7105-15.
- Zipprich, Bhattacharyya, et al. (2009). "Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression." RNA. 15(5): 781-93.
- Zofall and Grewal (2006). "RNAi-mediated heterochromatin assembly in fission yeast." Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 71: 487-96.
- zur Hausen (1991). "Viruses in human cancers." Science. 254(5035): 1167-73.

Zur Hausen (1999). "Viruses in human cancers." European Journal of Cancer 35(14): 1878–1885.

PDF Pro Evaluation

Annexe

PDF Pro Evaluation

Publications produites durant la thèse

- **Human t-cell leukemia virus type 1 (htlv-1) bzip factor requires cellular transcription factor jund to upregulate htlv-1 antisense transcription from the 3' long terminal repeat**

Gazon H, Lemasson I, Polakowski N, Césaire R, Matsuoka M, Barbeau B, Mesnard JM, and Peloponese JM Jr.

2012- Journal of Virology

- **Deregulation of RNAi silencing pathway by Human T-cell leukemia virus type 1 bZIP factor (HBZ)**

Gazon H, Térol M, Belrose G, Mesnard JM, Césaire R, and Peloponese JM Jr.

(en cours d'écriture)

- **Inhibition of HBZ expression and antiproliferative effects of valproate on adult T-cell leukemia cells**

Belrose G, Gazon H, Meniane JC, Kone M, Olindo S, Jean-Baptiste D, Lézin A, Tanaka Y, Willems L, Mesnard JM, Peloponese JM Jr, and Césaire R.

2013 - Leukemia (soumis, en cours de révision)