



Numéro National de Thèse : 2019LYSEN033

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée par

l'Ecole Normale Supérieure de Lyon

Ecole Doctorale N° 340

Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Spécialité de doctorat : **Virologie**

Discipline : **Biologie**

Soutenue publiquement le 04/10/2019, par :

Elodie TERUEL

**Identification par BioID de nouveaux partenaires de la
protéine Tax d'HTLV-1
au cours de la transformation cellulaire**

Devant le jury composé de :

TWIZERE Jean-Claude
BASTO Renata
MARECHAL Vincent
VIDALAIN Pierre-Olivier
JOURNO Chloé

Maître de recherche FNRS
Directrice de Recherche
Professeur des Universités
Directeur de Recherche
Maître de conférences

Université de Liège
CNRS
Sorbonne Université
CNRS
ENS de Lyon

Rapporteur
Rapporteuse
Examinateur
Examinateur
Directrice de thèse



Numéro National de Thèse : 2019LYSEN033

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée par
l'Ecole Normale Supérieure de Lyon

Ecole Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Spécialité de doctorat : **Virologie**
Discipline : **Biologie**

Soutenue publiquement le 04/10/2019, par :
Elodie TERUEL

**Identification par BioID de nouveaux partenaires de la
protéine Tax d'HTLV-1
au cours de la transformation cellulaire**

Devant le jury composé de :

TWIZERE Jean-Claude
BASTO Renata
MARECHAL Vincent
VIDALAIN Pierre-Olivier
JOURNO Chloé

Maître de recherche FNRS
Directrice de Recherche
Professeur des Universités
Directeur de Recherche
Maître de conférences

Université de Liège
CNRS
Sorbonne Université
CNRS
ENS de Lyon

Rapporteur
Rapporteuse
Examineur
Examineur
Directrice de thèse

RESUME

Identification par BioID de nouveaux partenaires de la protéine Tax d'HTLV-1 au cours de la transformation cellulaire

Le virus HTLV-1 est l'agent étiologique de la leucémie T de l'adulte. L'oncoprotéine virale Tax contribue à la transformation cellulaire en provoquant entre autres une activation constitutive de la voie NF- κ B et des dysfonctions du centrosome. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces activités, notre équipe cherche à identifier et analyser fonctionnellement les partenaires cellulaires ciblés par Tax.

Le premier objectif de ce projet est de développer au sein de l'équipe une approche de protéomique innovante basée sur la biotinylation de proximité *in situ* (BioID). Tax est fusionnée à BirA*, une forme modifiée d'une biotine ligase d'*E. coli*. Après expression de BirA*-Tax en cellules, l'analyse par spectrométrie de masse des protéines biotinylées permet d'identifier de potentiels partenaires de proximité de Tax. Par le biais de cette technique, le second objectif est d'identifier spécifiquement de nouveaux partenaires centrosomaux de Tax, puis de caractériser leur implication dans les dysfonctions oncogènes du centrosome induites par Tax.

Nous validons ici la pertinence de la stratégie de BioID appliquée à Tax et présentons les résultats de protéomique obtenus. Parmi les partenaires identifiés, nous avons validé l'interaction de Tax avec la protéine p62, un récepteur autophagique impliqué dans l'activation de la voie NF- κ B. Nous avons également validé l'interaction de Tax avec la protéine centrosomale Cep63 impliquée dans le cycle de duplication du centrosome. Nous discutons enfin des autres partenaires centrosomaux potentiels identifiés par BioID, ainsi que de la pertinence d'étendre cette approche à d'autres virus oncogènes tels qu'EBV et HPV.

De manière générale, ces travaux offrent de nouvelles perspectives quant à la caractérisation des mécanismes moléculaires dérégulés au cours de l'oncogenèse viro-induite.

ABSTRACT

In situ biotinylation identification of new HTLV-1 Tax partners in cellular transformation

The HTLV-1 retrovirus is the etiological agent of adult T-cell leukemia. The Tax oncoprotein contributes to cellular transformation by inducing, among other processes, a constitutive activation of the NF- κ B pathway and centrosomal dysfunctions. In order to better understand the underlying mechanisms leading to these dysfunctions, we aim at identifying new partners targeted by Tax and analysing their functional alterations.

The first aim of this project is to develop in the team an innovative proteomic strategy based on *in situ* biotinylation (BioID). Tax is fused to BirA*, a modified biotin ligase from *E. coli*. After expression of BirA*-Tax in cells, mass spectrometry analysis of biotinylated proteins allow us to identify potential partners of Tax. The second aim is to specifically identify Tax centrosomal partners and then characterize their implication in the oncogenic dysfunctions of the centrosome.

Here, we validate the BioID technology applied to Tax and present the results obtained from the proteomic analysis. Among the potential partners identified by BioID, we validate the interaction of Tax with p62, an autophagic receptor involved in the activation of NF- κ B signalling. We also validate the interaction of Tax with the centrosomal protein Cep63 involved in the centrosome duplication cycle. We discuss the other potential centrosomal partners identified by BioID, as well as the opportunity to extend this study to other oncogenic viruses such as EBV and HPV.

This study open new perspectives on the characterization of molecular mechanisms deregulated during viral-induced oncogenesis.

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier Renaud Mahieux pour m'avoir accueillie dès le Master au sein de l'équipe. Je tiens tout particulièrement à remercier ma directrice de thèse, Chloé Journo, de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné la possibilité d'être auditionnée au concours de l'Ecole Doctorale, ce qui m'a permis de décrocher ma bourse de thèse. Je lui suis extrêmement reconnaissante du temps et de la patience qu'elle a su m'accorder tout au long de ces quatre années passées ensemble. Ses qualités pédagogiques et scientifiques m'ont apporté bien plus que ce à quoi je m'attendais au début de ma thèse, je lui adresse toute ma gratitude.

Je tiens à remercier les rapporteurs de cette thèse, Mr Jean-Claude Twizere et Mme Renata Basto ainsi que les examinateurs Mr Vincent Maréchal et Mr Pierre-Olivier Vidalain pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes travaux.

Je remercie également les membres de mon Comité de Suivi de Thèse, Mme Véronique Marthiens et Mr Franck Mortreux pour les échanges scientifiques et précieux conseils qu'ils ont pu me donner au cours de ma thèse.

Je tiens également à remercier nos collaborateurs, Mr Henri Gruffat et Mr Massimmo Tommassino pour leur enthousiasme vis-à-vis du projet et leur implication scientifique et morale.

Je souhaite également remercier les membres de l'équipe passés et présents, Hélène, Sandrine, Florence, Amandine, Aurélien, Brice, Nicolas, Gerges, Laurent, Clara, Auriane, Benjamin, Sarah, Emeline ... Avec Amandine nous avons partagé quelques mois au labo durant notre Master, merci pour toutes ces discussions et nos cafés matinaux au lever du soleil ! Emeline a été ma stagiaire durant une semaine, c'est grâce à elle que j'ai appris à former, et surtout que j'ai découvert que c'était quelque chose que j'appréciais ! Quant à toi Sarah ... Nous serons venus à bout des bradford en série ! Merci à toi pour tous ces moments de complicité et de fous rires à la paillasse avec Auriane et Benjamin.

Je suis également reconnaissante envers la plateforme de microscopie de l'ENS, et en particulier Elodie, pour leur précieuse aide lors des acquisitions d'images et échanges scientifiques. J'en profite pour faire une parenthèse et remercier Didier Décimo pour m'avoir permis de participer à l'école thématique de microscopie du CNRS MiFoBio en 2018 à Seignosse. Ce fut un sacré moment que de suivre des conférences tout en gérant un labo mobile de culture cellulaire en bord de mer ! Merci pour cette folle semaine passée avec Elodie, Solène et Maryline ! Je tiens à remercier la plateforme de spectrométrie de masse de l'IBCP et en particulier Frédéric Delolme et Adeline Page pour l'identification des protéines biotinyllées et leur précieux conseils pour mener à bien le projet. Je remercie également les membres du secrétariat du CIRI à l'ENS, et plus particulièrement Clara, qui s'est toujours si bien occupée de mes missions nationales et internationales, de mes commandes parfois urgentes et de l'impression de mon manuscrit de thèse. Toutes ces choses qui m'ont drôlement facilité mon organisation durant ma thèse !

Au cours de ces quatre années passées à l'ENS, j'ai rencontré des personnes merveilleuses, parfois au détour d'un couloir ou dehors sur les escaliers, drôles, à l'écoute, qui tous ont su à leur manière, consciemment ou inconsciemment, me faire aller de l'avant malgré mes doutes et remises en question, et j'en remercie chacun d'eux.

Je souhaite remercier mes amis scientifiques, « compagnons de galère » : Flore, Marion, Clémence, Delphine, Charlotte, Sophie, Lamya, Vincent, Séverin, Sonia, Claire, nous avons la thèse en commun et ce n'est pas rien que de se serrer les coudes au quotidien. Merci pour toute cette complicité, ces pauses café et surtout de m'avoir calmée dans mes grands instants de stress ! Flore, une petite pensée spéciale pour toi, les mots ne seraient jamais assez justes pour te dire merci ! Mélanie, un merci spécial pour toi qui est avec moi depuis la Licence, tu sauras pourquoi ! Je remercie bien évidemment aussi mes amis « non-scientifiques » : Fanny, Jimmy, Jérémy, Alison, Marine, Alex et Antoine, nous arriverons à le faire ce camping, et sans la pluie ! Morgane, même si depuis la fin du DUT nous sommes séparés par la frontière espagnole, je me souviens de ces moments attablées à l'étage de l'IUT à discuter de savoir si on voulait faire une thèse ou pas ... Et nous voilà, avec tout notre chemin parcouru, cela ne nous a pas empêcher de se retrouver chaque année au même endroit, comme si l'on s'était quitté la veille !

Cette partie ne peut se clôturer sans remercier ma famille : mes parents Marie et Joël, ma petite sœur Coralie ainsi que mon fiancé Kevin. C'est grâce à eux que j'en suis là ; merci de m'avoir épaulé, soutenu, supporté (encore une fois !), encouragé dans mes plus grands instants de faiblesse et de doutes, de m'avoir poussé à persévérer. Ces mots à eux-seuls ne suffisent pas pour exprimer l'immense gratitude que j'ai.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS.....	15
INTRODUCTION.....	18
PREAMBULE : HISTORIQUE DE LA DECOUVERTE DE L'ONCOGENESE VIRALE	20
I. Le virus du Sarcome de Rous : la découverte du premier virus oncogène animal	20
II. Les virus oncogènes humains	21
CHAPITRE 1 : LE VIRUS ONCOGENE HTLV-1.....	24
I. HTLV-1, un rétrovirus oncogène.....	24
1. Épidémiologie et pathologies associées	24
2. Le virus HTLV-1 à l'échelle cellulaire et moléculaire.....	29
3. Modèle du développement de l'ATL	37
II. Rôles de la protéine Tax dans la transformation cellulaire induite par HTLV-1.....	39
1. Structure protéique et localisation cellulaire de Tax en lien avec ses modifications post-traductionnelles.....	39
2. Tax dérégule la transcription de certains gènes cellulaires.....	44
3. Tax promeut la survie et la prolifération cellulaire.....	46
CHAPITRE 2 : INTRODUCTION A L'ONCOGENESE MEDIEE PAR VIRUS ONCOGENES EBV et HPV.....	58
I. Le virus oncogène EBV	58
1. Épidémiologie et pathologies associées	58
2. La particule et le cycle viral d'EBV	59
II. Le virus oncogène HPV	62
1. Épidémiologie et pathologies associées	62
2. La particule et le cycle viral d'HPV.....	62
CHAPITRE 3 : ONCOGENESE VIRALE ET INSTABILITE GENOMIQUE : LA CONNEXION CENTR(OSOM)ALE	66
PROBLEMATIQUE DU TRAVAIL DE THESE.....	104
MATERIELS & METHODES	109
I. Plasmides et clonages	111
II. Culture cellulaire et transfections	112
III. Anticorps	112
IV. Immunofluorescence	113
V. Immunoprécipitation et purification d'affinité (Ni-NTA)	114
VI. Essais d'ubiquitination.....	115
VII. Fractionnement cellulaire	115
VIII. Principe de la technique de BioID.....	116
IX. Purification des protéines biotinylées : protocole initial	117
X. Purification des protéines biotinylées : protocole final optimisé	118

XI. Analyse qualitative en spectrométrie de masse.....	119
XII. Analyse quantitative en spectrométrie de masse.....	119

RESULTATS.....123

CHAPITRE 1 : IDENTIFICATION PAR BioID DE P62 COMME PARTENAIRE DE TAX DANS L'ACTIVATION DE LA VOIE NF-κB 125

Résultats principaux de l'étude.....	125
--------------------------------------	-----

CHAPITRE 2 : IDENTIFICATION PAR BioID DES PARTENAIRES CENTROSOMAUX DE L'ONCOPROTEINE VIRALE TAX D'HTLV-1 127

I. Caractérisation phénotypique des altérations centrosomales induites par Tax..... 127

1. Tax est une protéine associée au centrosome.....	127
2. Tax altère l'aspect de la centrine1 au centrosome.....	128

II. Validation de la construction BirA*-Tax pour l'identification de partenaires centrosomaux de Tax..... 131

1. BirA*-Tax présente une distribution de sa localisation cellulaire similaire à Tax.....	131
2. BirA*-Tax induit des altérations centrosomales numériques de manière similaire à Tax... 137	137

III. L'analyse des données de BioID permet l'identification de potentiels partenaires centrosomaux de Tax 140

1. Purification des protéines biotinylées.....	140
2. Tri initial des données brutes.....	142
3. Voies cellulaires représentatives des protéines identifiées par le BioID.....	146
4. Protéines centrosomales identifiées par BioID.....	148

CHAPITRE 3 : IDENTIFICATION PAR BioID DE CEP63 : INTERACTION ENTRE TAX ET CEP63..... 155

I. Confirmation de l'interaction physique de Tax avec Cep63..... 155

1. Tax interagit avec la protéine centrosomale Cep63.....	155
2. L'interaction entre Tax et Cep63 requiert la partie N-terminale de Cep63 et l'ubiquitination de Tax.....	159

II. Tax colocalise avec Cep63 au centrosome et altère son organisation spatiale..... 163

III. Données préliminaires - Aspect fonctionnel de l'interaction entre Tax et Cep63 : Cep63 ne semble pas être directement impliquée dans les altérations centrosomales induites par Tax 165

CHAPITRE 4 : APPLICATION DE LA TECHNIQUE DE BioID AUX PROTEINES BNRF1 D'EBV ET E7 D'HPV-16 – DONNEES PRELIMINAIRES 169

I. BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 s'expriment en cellules 293T 169

II. BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 biotinylent des protéines cellulaires 171

III. BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 sont localisés dans une fraction cellulaire contenant le centrosome 173

DISCUSSION179

I. Caractérisation phénotypique des altérations du centrosome induites par Tax..... 182

1. Quelles sont les altérations du centrosome induites par Tax ?.....	182
2. Apport de la microscopie super-résolutive pour la caractérisation des altérations centrosomales.....	185

II. Quelles informations les données obtenues par la technique de BioID nous apportent-elles sur l'interactome de Tax ?	186
1. <i>Tax interagit avec des clusters d'interactions de protéines centrosomales</i>	186
2. <i>Tax interagit avec des protéines cellulaires non-centrosomales</i>	190
III. Tax interagit avec la protéine centrosomale Cep63 : Quelle signification biologique ?	197
1. <i>Modalités de l'interaction physique entre Tax et Cep63 : quelle signification ?</i>	197
2. <i>Tax induit des points surnuméraires de Cep63 : quelles sont ces structures ?</i>	199
3. <i>Quelles sont les fonctions de Cep63 manipulées par Tax ?</i>	199
IV. Validation des constructions BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 : Vers la mise en place du BioID pour l'étude des interactions centrosomales de ces protéines.....	202
V. Repousser les limites du BioID ?	204
CONCLUSION GENERALE	209
REFERENCES.....	215
ANNEXES.....	237
Annexe 1 : Optimisation du BioID - Purification des protéines biotinylées	i
Annexe 2 : Liste des partenaires connus de Tax	viii
Annexe 3 : Données issues de la spectrométrie de masse	x
Annexe 4 : Alignement des séquences protéiques des quatre isoformes de Cep63	xviii
PUBLICATIONS	249

Table des illustrations

Figure 1. Virus du Sarcome de Rous	21
Figure 2. Découverte des virus oncogènes humains.....	22
Figure 3. Répartition géographique des sept sous-types d'HTLV-1	25
Figure 4. Modes de transmission associés à HTLV-1.....	29
Figure 5. Particule virale mature d'HTLV-1	30
Figure 6. Génome proviral d'HTLV-1.....	31
Figure 7. Cycle viral d'HTLV-1.....	34
Figure 8. Pathogenèse ATL.....	38
Figure 9. Principaux domaines fonctionnels de Tax.....	40
Figure 10. Les modifications post-traductionnelles de Tax	40
Figure 11. Localisation intracellulaire de Tax.....	43
Figure 12. Tax active la voie canonique NF- κ B.....	49
Figure 13. Tax active la voie non-canonique NF- κ B	52
Figure 14. Tax accélère la progression du cycle cellulaire	54
Figure 15. Particule virale d'EBV	59
Figure 16. Les protéines virales des familles EBNA et LMP ainsi que les ARN non-codants coopèrent au cours de l'oncogenèse médiée par EBV	61
Figure 17. Particule et génome viral de HPV-16	63
Figure 18. Les protéines virales E6 et E7 coopèrent au cours de l'oncogenèse médiée par HPV-16	63
Figure 19. Principe de la technique de BioID	117
Figure 20. Tax est une protéine associée au centrosome.....	128
Figure 21. Tax altère l'aspect de la centrine1 au centrosome	130
Figure 22. BirA*-Tax présente une localisation cellulaire similaire à Tax en cellules U2OS C1G	133
Figure 23. BirA*-Tax présente une localisation cellulaire similaire à Tax en cellules 293T – Marquage du centrosome	134
Figure 24. BirA*-Tax présente une localisation cellulaire similaire à Tax en cellules 293T – Marquage de l'appareil de Golgi.....	135
Figure 25. BirA*-Tax présente une localisation similaire à Tax au sein d'une population cellulaire	137
Figure 26. BirA*-Tax induit une altération des centrosomes similaire à Tax.....	139
Figure 27. Purification des protéines biotinylées : premier envoi des échantillons pour analyse en spectrométrie de masse.....	141
Figure 28. Schéma explicatif du tri des données brutes issues de l'analyse quantitative en spectrométrie de masse.....	143
Figure 29. Volcano plot représentatif de la première expérience quantitative de spectrométrie de masse.....	144
Figure 30. Diagramme de Venn représentant le nombre de protéines identifiées dans chacune des trois expériences indépendantes de BioID. Liste des protéines identifiées communes aux trois expériences ..	145
Figure 31. Voies cellulaires dans lesquelles sont impliquées les protéines identifiées dans au moins une des trois analyses	147
Figure 32. Représentation des protéines centrosomales et des voies cellulaires associées	153
Figure 33. Interactions connues entre les 27 protéines centrosomales identifiées comme partenaires potentiels de Tax.	154
Figure 34. Tax interagit avec Cep63	158
Figure 35. Tax interagit avec la partie N-terminale de Cep63	160
Figure 36. Les mutants de Tax défectifs pour l'ubiquitination n'interagissent plus avec Cep63	162
Figure 37. Tax altère l'organisation spatiale de Cep63 au centrosome	164
Figure 38. L'extinction de Cep63 n'a pas d'effet sur les altérations centrosomales induites par Tax	167
Figure 39. BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 sont exprimées en cellules 293T	170
Figure 40. BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 biotinylent des protéines cellulaires après traitement à la biotine.....	172
Figure 41. BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 ne sont pas enrichies au niveau du centrosome	174
Figure 42. BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 sont détectables dans une fraction cellulaire contenant le centrosome ..	177

Figure 43. Purification des protéines biotinylées : protocole initial	ii
Figure 44. Purification des protéines biotinylées : analyse des flow-throughs et des fractions de lavages.....	iv
Figure 45. Schéma général de l'optimisation de la purification des protéines biotinylées	v
Figure 46. Purification des protéines biotinylées : variation du ratio billes/protéines.....	vii

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribo-Nucléique	LQ	Label Free Quantification
APC	Anaphase Promoting Complex	LMP 1/2	Latent Membrane Protein 1/2
ARN	Acide Ribo-Nucléique	LTR	Long Terminal Repeats
Asl	Asterless	Lys	Lysine
ATL	Leucémie T de l'Adulte		
		MA	Protéine de matrice
BioID	Proximity-dependent Biotinylation	MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
BNRF1	BamHI N Rightward Frame 1	MCPyV	Merkel Cell Polyoma Virus
BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility protein	MS	Mass Spectrometry
BZLF1	BamHI Z Leftward Frame 1		
		NC	Nucléocapside
CA	Protéine de capsid	NEMO	NF- κ B Essential Modulator
CBP	CREB binding protein	NES	Nuclear Export Signal
CD	Cluster of Differentiation	NF- κ B	Nuclear Factor - κ B
Cdc	Cell division control protein	NIK	NF- κ B-Inducing Kinase
CDK	Cyclin-Dependent Kinase	NLS	Nuclear Localization Signal
Cep	Centrosomal protein	NRP-1	Neuropilin
CREB	C-AMP Response Element-binding protein		
CRM1	Chromosome Region Maintenance 1	OPTN	Optineurin
CTL	Lymphocytes T cytotoxiques	ORF	Open Reading Frame
CYLD	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase		
		PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells
DTT	Dithiothréitol	PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
		PLK1/4	Polo-like kinase 1/4
EBNA	Epstein-Barr Nuclear Antigen 3C	pRb	Retinoblastoma protein
EBV	Epsten-Barr Virus	Pro	Protéase
Env	Protéine d'enveloppe		
ERK	Extracellular-signal-Regulated Kinase	RanBP1	Ran-binding protein 1
		RNF	Ring Finger protein
FT	Flow-Through	RSV	Rous Sarcoma Virus
		RT	Reverse Transcriptase
GLUT1	Transporteur de glucose 1		
GM130	130 kDa cis-Golgi matrix protein	Ser	Sérine
Gp	Glycoprotéine	siARN	petits ARN interférants
		SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
HAM/TSP	HTLV-1-associated myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis		
HBV	Hepatitis B Virus	TAK1	Transforming growth factor- β -Activated Kinase 1
HBZ	HTLV-1 bZIP factor	TAX1BP2	Tax1-Binding Protein 2
HCV	Hepatitis C Virus	Thr	Thréonine
HPV	Human Papilloma Virus	TM	Trans-Membranaire
HSPG	Heparan Sulfate Proteoglycan	TNF	Tumor Necrosis Factor
HTLV	Human T-cell Leukemia Virus	TRAF	TNF Receptor-Associated Factor
		TRE	Tax Responsive Element
IAP	Inhibitor of Apoptosis Proteins	TSS	Tax-Speckled Structures
IFN	Interferon		
IKK	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase	U2OS C1G	U2OS Centrine1-GFP (cellules)
IL	Interleukin	Ubc9/13	Ubiquitin carrier protein
IN	Intégrase		
JNK	c-Jun N-terminal Kinase		
KSHV	Kaposi's Sarcoma-associated HerpesVirus		

INTRODUCTION

PREAMBULE : HISTORIQUE DE LA DECOUVERTE DE L'ONCOGENESE VIRALE

I. Le virus du Sarcome de Rous : la découverte du premier virus oncogène animal

Au cours du XIX^{ème} siècle, de nombreuses études ont été menées pour expliquer l'étiologie du cancer. Parallèlement à l'étude de l'oncogénèse, le développement de la microbiologie a fait émerger l'idée d'une potentielle origine infectieuse du cancer. Cependant, le manque d'expérimentations rigoureuses sur l'implication d'agents infectieux dans le processus cancéreux a mené au préjugé dogmatique que le cancer ne pouvait pas avoir une origine infectieuse. Ce point de vue biaisé par le manque de techniques expérimentales adaptées a persisté jusqu'au début du XX^{ème} siècle avec le développement de nouvelles méthodologies et la découverte du premier virus oncogène animal.

En 1911, le chercheur Peyton Rous a mis en évidence la transmission de tumeurs chez le poulet (Rous, 1911). L'utilisation de filtrats ne contenant pas de cellules tumorales a mis en évidence qu'un « agent acellulaire » pouvait être à l'origine de cette transmission. Le virus du sarcome de Rous (RSV) a été découvert suite à ces observations en 1911 (*Figure 1*). Cependant, le travail de Rous n'a eu que peu d'écho dans la communauté scientifique contemporaine, le sarcome du poulet étant considéré comme un cas particulier non-transposable à la santé humaine. L'idée de l'origine virale de certains cancers humains ne fut admise qu'environ 30 ans plus tard.

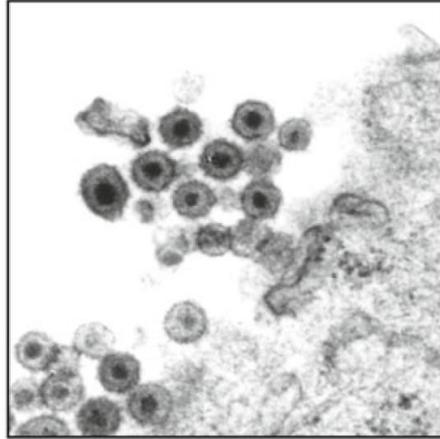


Figure 1. Virus du Sarcome de Rous. Particules matures de RSV après bourgeonnement à la surface d'une cellule observée par microscopie électronique. Image tirée de (Parent, 2012).

Cette découverte a mené à l'émergence d'un nouveau paradigme : les cancers humains viro-induits.

II. Les virus oncogènes humains

Ce n'est qu'environ 50 ans après la découverte du premier rétrovirus oncogène animal que fut découvert le premier virus oncogène humain, le virus d'Epstein Barr (EBV). EBV a initialement été associé au développement du lymphome de Burkitt caractérisé en 1958 (Burkitt 1958; Burkitt 1962; Epstein, Achong, et Barr 1964).

A ce jour, sept virus oncogènes humains ont été caractérisés, se différenciant notamment par la famille virale à laquelle ils appartiennent et les cancers dont ils sont à l'origine (*Figure 2*).

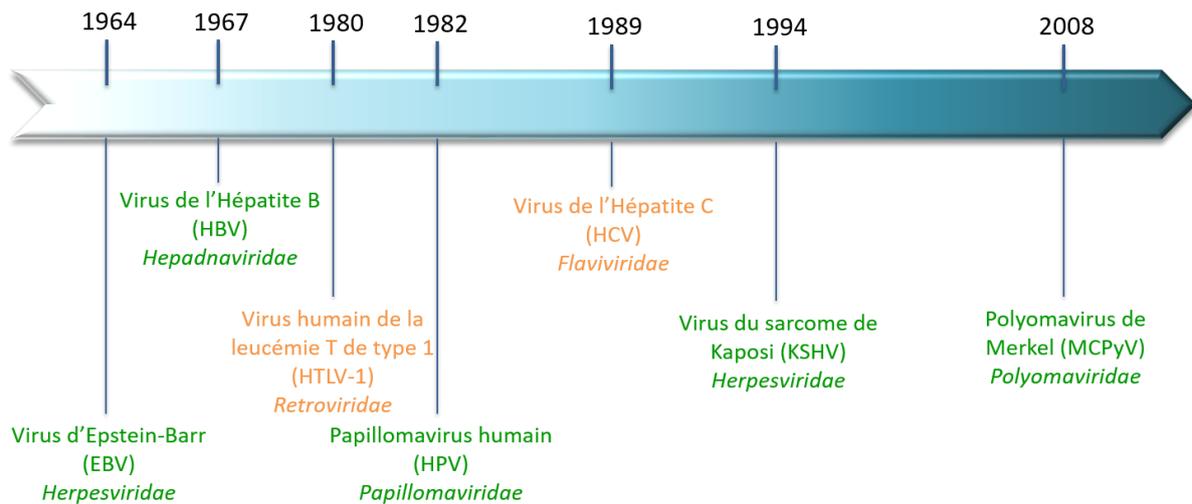


Figure 2. Découverte des virus oncogènes humains. Les virus oncogènes sont annotés sur la frise selon leur année de découverte. La famille virale respective à chaque virus est indiquée en italique. En vert sont indiqués les virus possédant un génome à ADN et en orange les virus possédant un génome à ARN.

Parmi les virus oncogènes à ADN, EBV (également connu sous le nom de Herpès Virus Humain de type 4, HHV-4, famille des *Herpesviridae*) est associé à des lymphomes de type B (lymphome de Burkitt et lymphome de Hodgkin) et à des cancers épithéliaux (cancers du nasopharynx et de l'estomac). Le virus de l'hépatite B (HBV) appartenant à la famille des *Hepadnaviridae* a été identifié peu de temps après EBV et est un des agents causals d'hépatocarcinomes (2012). Les Papillomavirus humains (HPVs, famille des *Papillomaviridae*) à haut-risque sont au nombre de quinze et sont associés au développement de cancer cervicaux et oraux-pharyngés. Parmi eux, HPV-16 et HPV-18 sont les plus oncogènes (2012). L'Herpès virus associé au sarcome de Kaposi (KSHV ou HHV-8 ; famille des *Herpesviridae*) a été détecté pour la première fois dans un sarcome de Kaposi associé au syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) en 1994. KSHV est également associé à des lymphomes non-Hodgkinien et à des myélomes (2012). Le Polyomavirus de Merkel (MCPyV, famille des *Polyomaviridae*) n'a été identifié que très récemment, en 2008, et induit des carcinomes (Feng et al., 2008). Il est à ce jour le seul polyomavirus humain à promouvoir l'oncogenèse.

En plus des virus oncogènes à ADN, deux virus oncogènes possèdent un génome ARN. Le virus de l'hépatite C (HCV) a été identifié en 1989 après des analyses de séquençage sur des cas d'hépatites associées à des transfusions n'étant pas due aux virus de l'hépatite A ou de l'hépatite B. HCV a par la suite été classé dans la famille des *Flaviviridae* et comme HBV, est

associé au développement d'hépatocarcinomes (Choo et al., 1989). Enfin, le virus humain de la leucémie T (HTLV-1, famille des *Retroviridae*, genre δ -retrovirus) a été mis en évidence par l'équipe du docteur Robert Gallo en 1980 et est le premier rétrovirus oncogène humain à avoir été découvert (Poiesz et al., 1980).

Au cours de la thèse, le virus HTLV-1 a fait l'objet du sujet d'étude central et les virus EBV et HPV-16 ont été étudiés en collaboration respectivement avec Henri Gruffat (laboratoire « Herpesvirus oncogènes », Centre International de Recherche en Infectiologie de Lyon) et Massimo Tommasino (groupe « Infections et biologie du cancer », Agence internationale de recherche sur le cancer à Lyon).

CHAPITRE 1 : LE VIRUS ONCOGENE HTLV-1

Comme mentionné dans le préambule, le δ -rétrovirus HTLV-1 est l'agent étiologique de la leucémie T de l'adulte (ATL). Après avoir présenté l'épidémiologie et la structure du virus, nous aborderons la pathogenèse de l'ATL médiée par HTLV-1. Nous reviendrons ensuite plus précisément sur l'implication de l'oncoprotéine Tax dans l'oncogenèse induite par HTLV-1.

I. HTLV-1, un rétrovirus oncogène

1. *Épidémiologie et pathologies associées*

a. *Épidémiologie : prévalence et diversité génétique*

Les études épidémiologiques menées sur l'estimation de la prévalence de HTLV-1 se basent sur les données issues de banques de donneurs de sang, et sur le dépistage des femmes enceintes et des patients à haut-risque tels que les personnes hospitalisées, les usagers de drogues par voie intraveineuse, les personnes vivant dans des conditions environnementales et socio-culturelles favorables à la transmission du virus, ou encore les personnes migrant vers des foyers d'endémie. Les données les plus récentes indiquent que HTLV-1 infecte 5 à 10 millions de personnes à travers le monde, et ce dans des foyers d'endémicité bien déterminés : Japon, Afrique subsaharienne, Caraïbes, Amérique du sud et Océanie (Gessain and Cassar, 2012). Cependant, les données concernant certaines régions du monde, comme le Maghreb, l'Afrique de l'est, l'Inde et la Chine ne sont pas accessibles. La prévalence pourrait donc être bien plus élevée. Les études épidémiologiques ont permis de déterminer la diversité génétique du virus HTLV-1 qui présente 7 sous-types (Gessain and Cassar, 2012). La présence des différents sous-types d'HTLV-1 varie selon les continents : le sous-type A, dit cosmopolite, est présent sur tous les continents tandis que le sous-type C est présent seulement en Océanie et les sous-types B, D, E, F et G en Afrique subsaharienne (*Figure 3*).

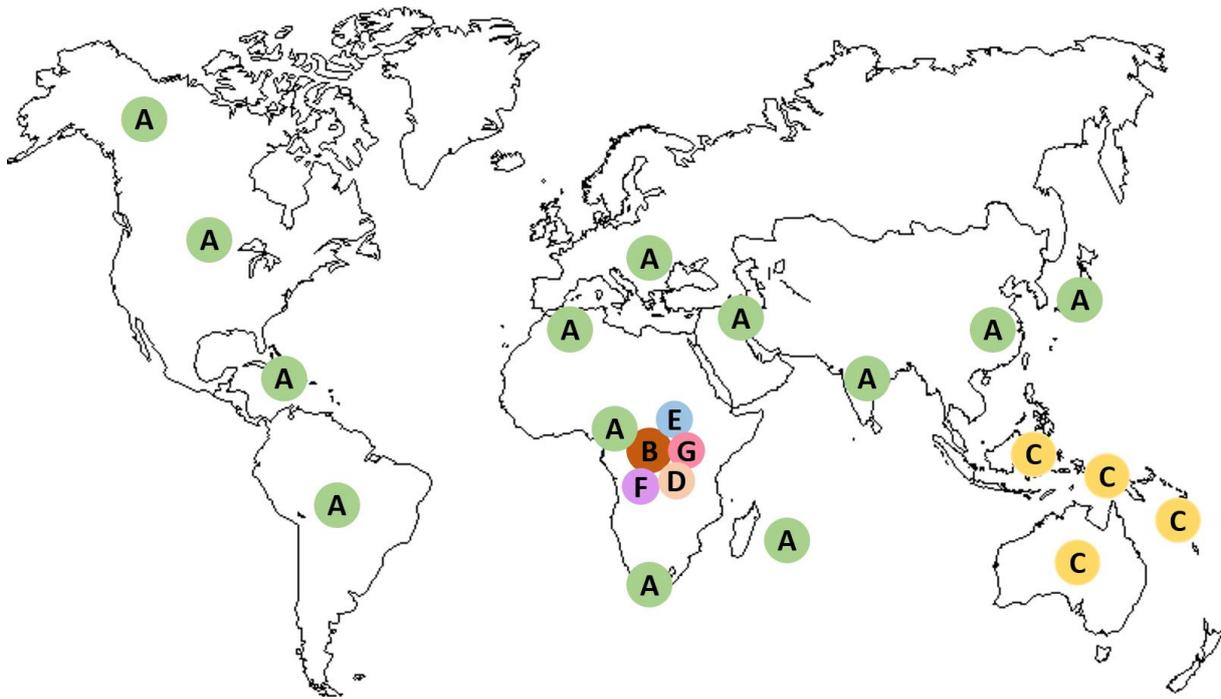


Figure 3. Répartition géographique des sept sous-types d'HTLV-1. Ici sont représentés les différents sous-types du virus HTLV-1 selon leur localisation géographique. Inspiré de (Gessain and Cassar, 2012).

b. Modes de transmission

Il existe trois modes de transmission pour HTLV-1 (Figure 4). HTLV-1 se transmet principalement par voie verticale de la mère à l'enfant. Dix à 25% des enfants allaités par mère séropositive sont infectés. Ceci est généralement lié à un allaitement prolongé de plus de six mois (Hino, 2011). HTLV-1 se transmet également par voie horizontale (ie. contact sexuel), de préférence de l'homme vers la femme, ce qui serait à l'origine de l'augmentation de la séroprévalence avec l'âge chez la femme (Roucoux et al., 2005). HTLV-1 se transmet par ailleurs par voie parentérale (transfusion de produits sanguins contaminés) via la transmission de lymphocytes T infectés ; 15 à 60% des receveurs deviennent infectés (Inaba et al., 1999; Okochi et al., 1984). De plus, HTLV-1 se transmet également chez les utilisateurs de drogues par voie intraveineuse lors de partage de seringues avec cependant une incidence plus faible, inférieure à 1% (Jõgeda et al., 2016). La transmission du virus par transfusion sanguine à l'âge adulte varie avec la prévalence du virus dans la population générale comme chez les donneurs de sang (Osame et al., 1990). (Figure 4). Enfin, de nombreux cas de transmission ont été mis

en évidence suite à des transplantations d'organes provenant de porteurs asymptomatiques en Europe (Toro et al., 2005). Plus récemment, il a été montré que 40% des receveurs HTLV-1 négatifs devenaient infectés suite à une greffe de rein issu d'un donneur infecté (Yamauchi et al., 2019).

c. Pathologies associées à HTLV-1

HTLV-1 est l'agent étiologique de deux maladies sévères : l'ATL et la Myélopathie Associée à HTLV-1/Paraparésie Spastique Tropicale (HAM/TSP). L'association de HTLV-1 à d'autres pathologies considérées comme minoritaires comparées à l'ATL et à l'HAM-TSP de par leur degré d'association à HTLV-1 est plus discutable. Cela inclut que la dermatite infectieuse, la polymyosite ou encore une uvéite isolée ou associée aux formes myélopathiques où le degré d'association est considéré comme probable (Gessain and Cassar, 2012). De plus, il existe une corrélation entre le développement de l'ATL ou de l'HAM/TSP et le développement de dermatites infectieuses et également entre l'HAM/TSP et l'uvéite (pour revue, Goncalves et al. 2010).

L'ATL est un cancer lymphoprolifératif agressif des cellules T périphériques, dont environ 1000 nouveaux cas par an au Japon sont identifiés. L'ATL survient en général 20 à 30 ans après la primo-infection et est généralement associé à une transmission du virus durant l'allaitement prolongé (Fujino and Nagata, 2000) (*Figure 4*). La pathogenèse de l'ATL sera détaillée dans la partie suivante du manuscrit.

L'ATL présente quatre sous-types cliniques définis comme des leucémies ou des lymphomes. Les leucémies sont de manière générale caractérisées par une prolifération accrue des cellules de la moelle osseuse associée à la présence de lymphocytes anormaux dans le sang périphérique étant définis comme des lymphocytes ayant un noyau pluri-lobulé dits « en fleurs » (Matsuoka, 2005) ainsi que des lymphocytes T petits et matures avec un noyau lobulé (Shimoyama, 1991). Les lymphomes sont caractérisés par une prolifération cellulaire accrue au niveau des organes lymphoïdes secondaires et l'absence de lymphocytes anormaux dans le sang (Shimoyama, 1991). Les quatre sous-types d'ATL sont les suivants :

- ATL indolent (ou lancinant) : caractérisé par un nombre total de lymphocytes normal, mais avec plus de 5% de lymphocytes anormaux dans le sang périphérique.

- ATL chronique : caractérisé par une hyperlymphocytose (nombre anormalement élevé de lymphocytes dans le sang périphérique) et plus de 5% de lymphocytes anormaux dans le sang périphérique.
- ATL lymphomateux : caractérisé par une lymphadénopathie (atteinte des ganglions lymphatiques), avec moins de 1% de lymphocytes anormaux dans le sang périphérique.
- ATL aigu : caractérisé par une hyperlymphocytose associée à une lymphadénopathie, et plus de 5% de lymphocytes anormaux dans le sang périphérique.

Les formes leucémiques (ATL aigu et lymphomateux) présentent également des lésions cutanées et des atteintes hépatiques et spléniques fréquentes, aggravant ainsi le pronostic vital avec une médiane de survie en absence de traitement de 6 mois pour la forme aiguë et 10 mois pour la forme lymphomateuse, contre 24 mois pour la forme chronique.

A ce jour, il n'existe aucun traitement optimal de l'ATL, l'efficacité d'une thérapie sur le long terme étant limitée. Les stratégies de traitements sont basées en première intention sur le type d'ATL. Les ATL chroniques et indolents sont traités par thérapie antivirale Zidovudine et interféron- α . Les ATL aigus et lymphomateux sont traités préférentiellement avec cette thérapie antivirale en combinaison à de la chimiothérapie. Etant donné que les traitements actuels sont peu efficaces sur le long terme, il est tout de même recommandé aux patients de manière générale d'intégrer une étude clinique. Les thérapies à base d'anticorps monoclonaux anti-CCR4 (C-C Chemokine Receptor 4 ; Mogamulizumab), les allogreffes de cellules souches hématopoïétiques, ou encore les thérapies vaccinales (ciblant notamment Tax) offrent de nouvelles perspectives de traitement contre l'ATL (pour revue, Hermine, Ramos, et Tobinai 2018).

L'HAM/TSP est une méningomyélite chronique associée à une dégénérescence axonale et une démyélinisation périvasculaire. Le développement de l'HAM/TSP est généralement associée à la transmission du virus par transfusion sanguine de produits sanguins infectés par HTLV-1 (Osame et al., 1990).

L'incidence de l'HAM/TSP serait plus faible que celle de l'ATL et a été bien étudiée en Martinique où elle atteindrait 2 à 4% des personnes infectées.

Les premiers symptômes de l'HAM/TSP apparaissent à l'âge adulte, de quelques mois à quelques années après la primo-infection, vers 40-50 ans, et sont caractérisés par des

lombalgies et des sensations de raideur et de faiblesse dans les membres inférieurs. La progression de la maladie peut être variable d'un patient à un autre. Cependant, après dix ans d'évolution, 50% des patients sont grabataires avec une paraplégie spastique marquée au niveau des membres inférieurs et des troubles sphinctériens fréquents.

Malgré de nombreuses études, la physiopathologie de l'HAM/TSP reste à ce jour peu connue. Deux hypothèses ont été soulevées pour expliquer les lésions inflammatoires observées. La première hypothèse consiste en la destruction des lymphocytes T CD4+ infectés par HTLV-1 par des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiques présents dans les infiltrats du système nerveux central. Cela mènerait à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF α (Tumor Necrosis Factor) et l'IFN γ (Interféron γ) qui altèreraient ensuite les cellules du système nerveux central (Kuroda and Matsui, 1993; Lehky et al., 1995; Nakamura et al., 1993). La seconde hypothèse repose sur des mécanismes auto-immuns avec présence de lymphocytes T auto-réactifs dirigés contre les antigènes du système nerveux central (Muller et al., 1995). Plus précisément, les lymphocytes T auto-réactifs sont dirigés au départ contre la protéine virale Tax. Ce mécanisme s'explique par mimétisme moléculaire entre la protéine neuronale hnRNP A1 et les épitopes de Tax (Levin et al., 2002).

Le traitement de l'HAM/TSP reste insatisfaisant malgré de nombreux essais utilisant de la méthyl-prednisolone (corticothérapie), de vitamine C, de valproate, d'interférons α et β , d'anticorps monoclonaux spécifiques du récepteur à l'IL-2 ou d'antiviraux (lamivudine et/ou zidovudine) (Bangham et al., 2015; Croda et al., 2008).

Nous allons maintenant nous intéresser à la structure et au cycle viral d'HTLV-1.

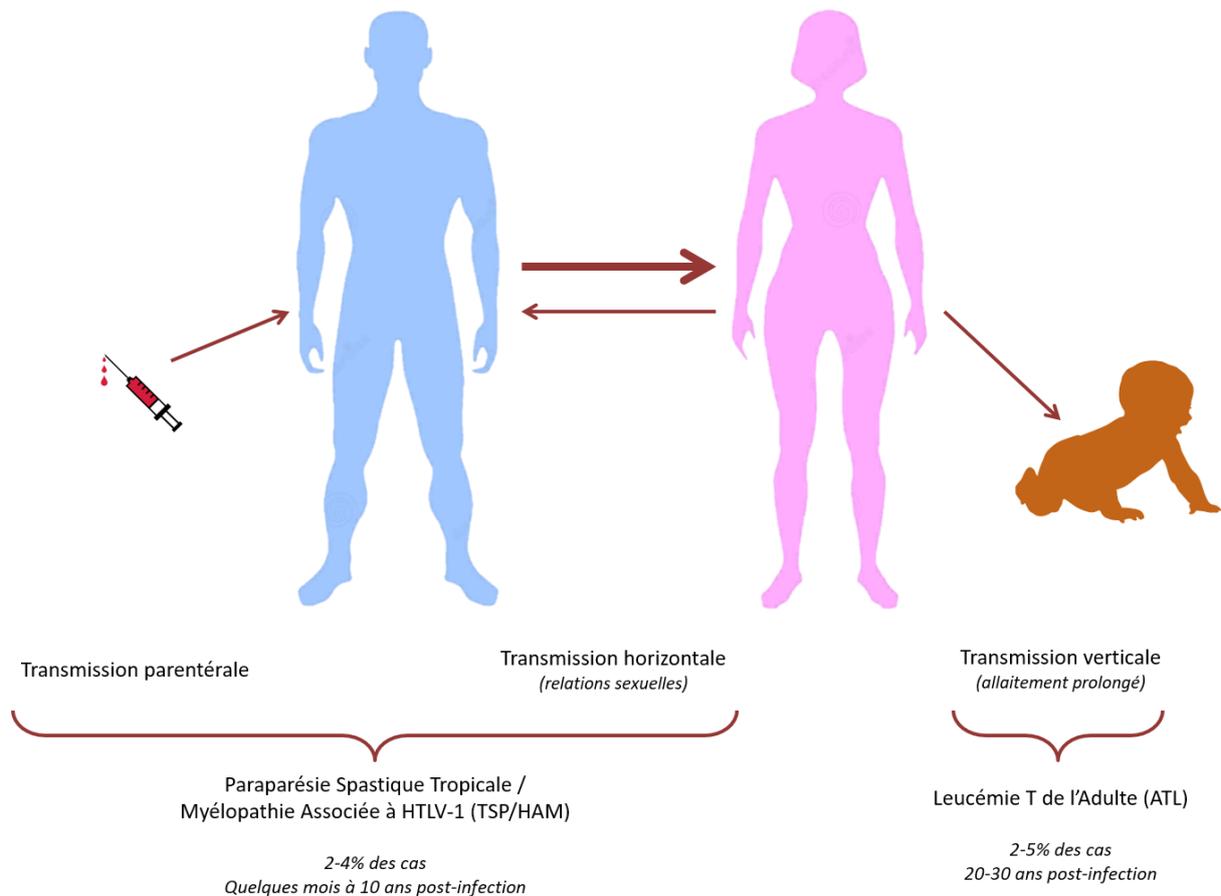


Figure 4. Modes de transmission associés à HTLV-1. La transmission du virus HTLV-1 peut se faire selon trois modes associés au développement préférentiel de l'HAM/TSP ou de l'ATL. La transmission parentérale et horizontale à l'âge adulte peut mener au développement de l'HAM/TSP tandis que la transmission verticale peut mener au développement de l'ATL.

2. Le virus HTLV-1 à l'échelle cellulaire et moléculaire

a. La particule virale

Le virion mature possède une enveloppe constituée d'une bicouche lipidique d'origine cellulaire (contenant des protéines cellulaires telles que CD55 et CD59 impliqués respectivement dans la reconnaissance et l'inhibition du complément et le récepteur à l'IL2 ; (Lando et al., 1983; Spear et al., 1995) dans laquelle sont enchâssées les glycoprotéines virales composées d'une sous-unité transmembranaire (TM, aussi connue sous le nom de gp21) et d'une sous-unité de surface (SU, aussi connue sous le nom de gp46). Cette enveloppe entoure la matrice constituée d'une protéine capable de s'homodimériser (MA, ou p19) (Rayne et al.,

2004). La matrice établit le lien entre l'enveloppe et la capside icosaédrique constituée de protéines CA (autrement appelées p24). Cette capside contient le complexe ribonucléoprotéique constitué des protéines de la nucléocapside (NC, ou p15) entourant deux molécules d'ARN simple brin de polarité positive de 8,5kb chacune, et des enzymes virales que sont l'intégrase (IN), la protéase (Pro) et la transcriptase inverse (RT) (*Figure 5*).

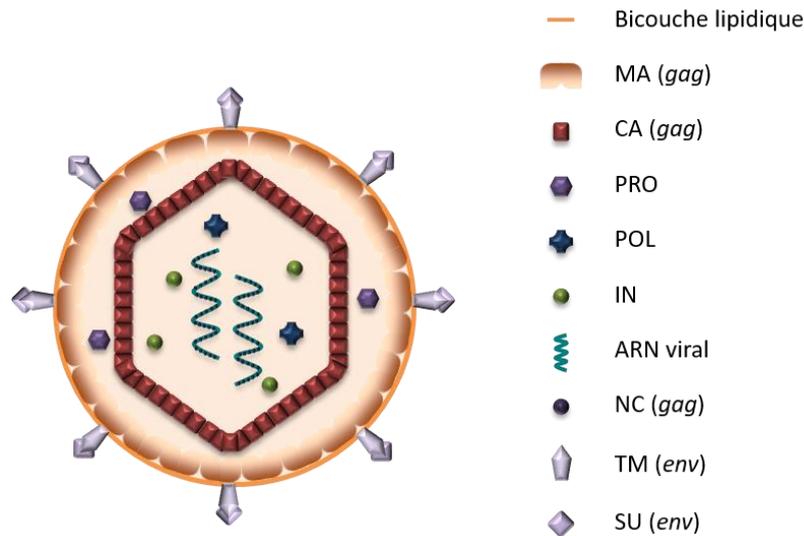


Figure 5. Particule virale mature d'HTLV-1. En italique sont indiquées les polyprotéines précurseurs des protéines correspondantes : Gag est le précurseur des protéines MA, Ca et NC tandis que Env est le précurseur des protéines SU et TM.

b. Le génome proviral

Après l'entrée dans la cellule cible, le génome viral subit une transcription inverse permettant son intégration dans le génome cellulaire sous forme de génome dit « proviral » (*Figure 6*). Dans le génome proviral, la molécule d'ADN est encadrée par des LTR (Long Terminal Repeat) en 5' et en 3'. Ces LTR possèdent des régions nécessaires à la transcription du génome proviral (Arpin-André et al., 2014).

La séquence du génome d'HTLV-1 présente plusieurs cadres de lecture (ORF, Open Reading Frame) codant pour les protéines structurales (Gag et Env) et enzymatiques (Pro et Pol) (*Figure 6*). Le génome d'HTLV-1 comprend également une région particulière située en 3', la région pX, contenant des ORF codant pour les protéines régulatrices et auxiliaires (*Figure 6*). Tax, Rex,

p21, p12, p13, p30 sont codées par le brin sens et HBZ (HTLV-1 bZIP factor) par le brin anti-sens.

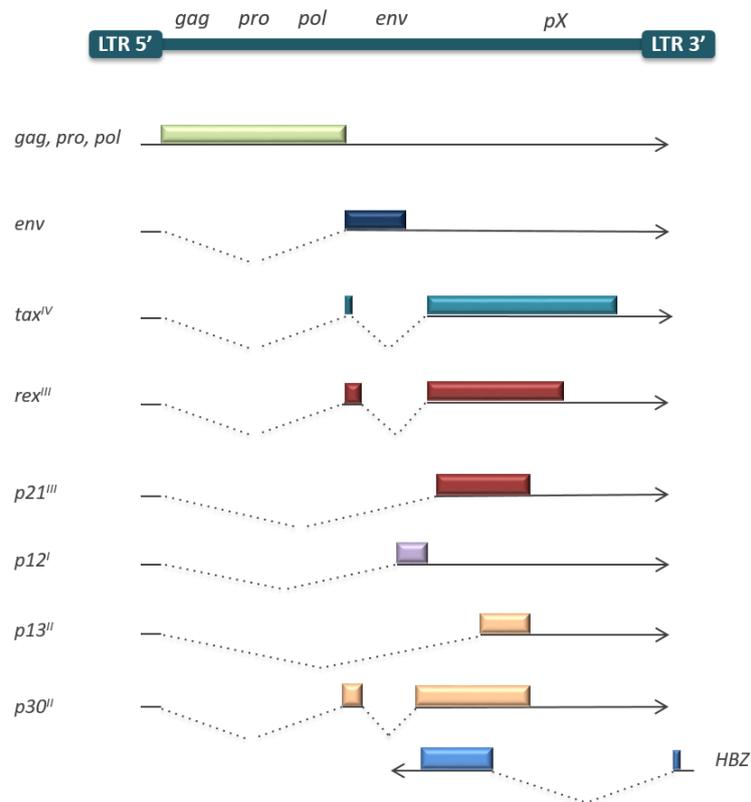


Figure 6. Génome proviral d'HTLV-1. L'ADN proviral intégré d'HTLV-1 est encadré par deux LTR en 5' et en 3' nécessaires à son expression. Ici sont représentés les différents gènes structuraux et enzymatiques (*gag*, *pro*, *pol* et *env*) et gènes régulateurs et auxiliaires de la région *pX* (*Tax*, *Rex*, *p21*, *p12*, *p13*, *p30* et *HBZ*) codés par HTLV-1. Tous les gènes sont codés par le brin sens, à l'exception de *HBZ* qui est codé par le brin anti-sens. Inspiré de (Matsuoka and Jeang, 2007).

c. Les cellules cibles

In vivo, HTLV-1 infecte préférentiellement les lymphocytes T CD4⁺ activés (exprimant le récepteur à l'IL-2, CD25). En effet, chez les patients infectés par HTLV-1 ayant développé une ATL ou une HAM/TSP, près de 90% de l'ADN proviral est détecté dans les lymphocytes T CD4⁺ (Yamano et al., 2004).

Les lymphocytes T CD8⁺ spécifiques des antigènes d'HTLV-1 sont également infectés *in vivo*, et représentent environ 5% de la charge provirale des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) isolés de patients infectés asymptomatiques et HAM/TSP (Hanon et al., 2000).

De plus, HTLV-1 infecte *in vivo* d'autres cellules immunitaires dites « non T » (Koyanagi et al., 1993) telles que les lymphocytes B (Longo et al., 1984), les monocytes (de Castro-Amarante et al., 2016), les cellules dendritiques myéloïdes et plasmacytoïdes (Hishizawa et al., 2004; Macatonia et al., 1992) et les lymphocytes T Natural Killer invariants (Azakami et al., 2009). HTLV-1 infecte également les astrocytes du système nerveux central (Lehky et al., 1995) favorisant ainsi l'inflammation chronique caractéristique de l'HAM/TSP (Ando et al., 2013).

De manière intéressante, Jones et al. (2008) ont montré que des cellules dendritiques infectées étaient capable de transmettre le virus à des lymphocytes T CD4+ menant ainsi à leur transformation *in vitro*. De même, il a été montré *in vitro* que des cellules dendritiques dérivées de monocytes infectées par HTLV-1 étaient capables de transmettre le virus aux lymphocytes T (Alais et al., 2015). Ces données suggèrent ainsi que l'infection des cellules dendritiques constituerait une étape clé durant la primo-infection *in vivo* pour la transmission et la transformation cellulaire des lymphocytes T.

Plus récemment, il a été montré que HTLV-1 infecte également les cellules souches hématopoïétiques et les progéniteurs hématopoïétiques tels que les thymocytes, ce qui expliquerait que le provirus soit retrouvé dans différents types cellulaires (Banerjee et al., 2010; Furuta et al., 2017; Wencker et al., 2007). Des analyses de la moelle osseuse de patients HAM/TSP et porteurs asymptomatiques du virus ont mis en évidence que la majorité des progéniteurs hématopoïétiques de la moelle osseuse étaient infectées par HTLV-1 (Grant et al., 2002).

Enfin, en plus des cellules du système immunitaire, HTLV-1 infecte également des cellules endothéliales humaines de la barrière hémato-encéphalique *in vitro* (Afonso et al., 2008; Carvalho Barros et al., 2017). De même, il a été récemment montré qu'HTLV-1 infectait les cellules épithéliales des glandes salivaires via la formation de biofilm viral (cf. cycle viral pour plus de détails) et les cellules épithéliales thymiques *in vitro* (Carvalho Barros et al. 2017; Nakamura et al. 2019). Cependant, l'infection des cellules épithéliales par HTLV-1 n'a pas encore été démontrée *in vivo*.

d. Le cycle viral d'HTLV-1

Le cycle viral peut être divisé en deux phases : la phase précoce comprenant les étapes allant de l'entrée du virus à l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire sous forme de provirus ; et la phase tardive, comprenant les étapes allant de la transcription des ARN messagers et génomiques jusqu'à la production de particules virales matures (*Figure 7*).

i. Les phases précoces

- Attachement et fusion

Ces récepteurs sont les Héparane Sulfate Protéoglycanes (HSPG) (Jones et al., 2005), la Neuropiline 1 (NRP-1) (Ghez et al., 2006) et le transporteur de glucose GLUT1 (Manel et al., 2003). La sous-unité de surface SU de la glycoprotéine d'enveloppe se fixe aux HSPG puis à NRP-1. GLUT1 s'associe ensuite au complexe pour compléter le processus de fusion en interagissant avec la glycoprotéine de membrane TM, ce qui permet à l'ARN viral encapsidé d'être libéré dans le cytoplasme de la cellule nouvellement infectée. La présence de ces récepteurs cellulaires à la surface de nombreux types cellulaires est à l'origine de la variété des cellules cibles.

- Transcription inverse, transport nucléaire et intégration

A ce stade, la capsidie contient le génome viral ainsi que les protéines nécessaires à sa transcription inverse (la reverse transcriptase, RT), à sa future intégration dans le génome cellulaire (l'intégrase, IN) et au clivage des polyprotéines (la protéase virale, PR). La transcription inverse de l'ARN viral en ADN double brin reste à ce jour peu étudiée. Le fait que la transcription inverse corrèle temporellement avec la décapsidation reste ambigu (Martin et al., 2016).

L'ADN obtenu interagit avec les protéines de la nucléocapsidie formant ainsi le complexe de pré-intégration. Ce complexe transloque dans le noyau et l'ADN viral est alors intégré au génome cellulaire grâce à l'intégrase virale pour former le provirus, sans préférence de sites d'intégration. Cependant, il a été démontré que chez les patients asymptomatiques, l'ADN viral était préférentiellement intégré dans les régions transcriptionnellement actives (Niederer et al., 2014). L'intégration virale dans ces régions permettrait une transcription

basale plus active du provirus et favoriserait ainsi l'expression des protéines telles que Tax pour la prolifération cellulaire nécessaire au développement de l'ATL ou de l'HAM/TSP.

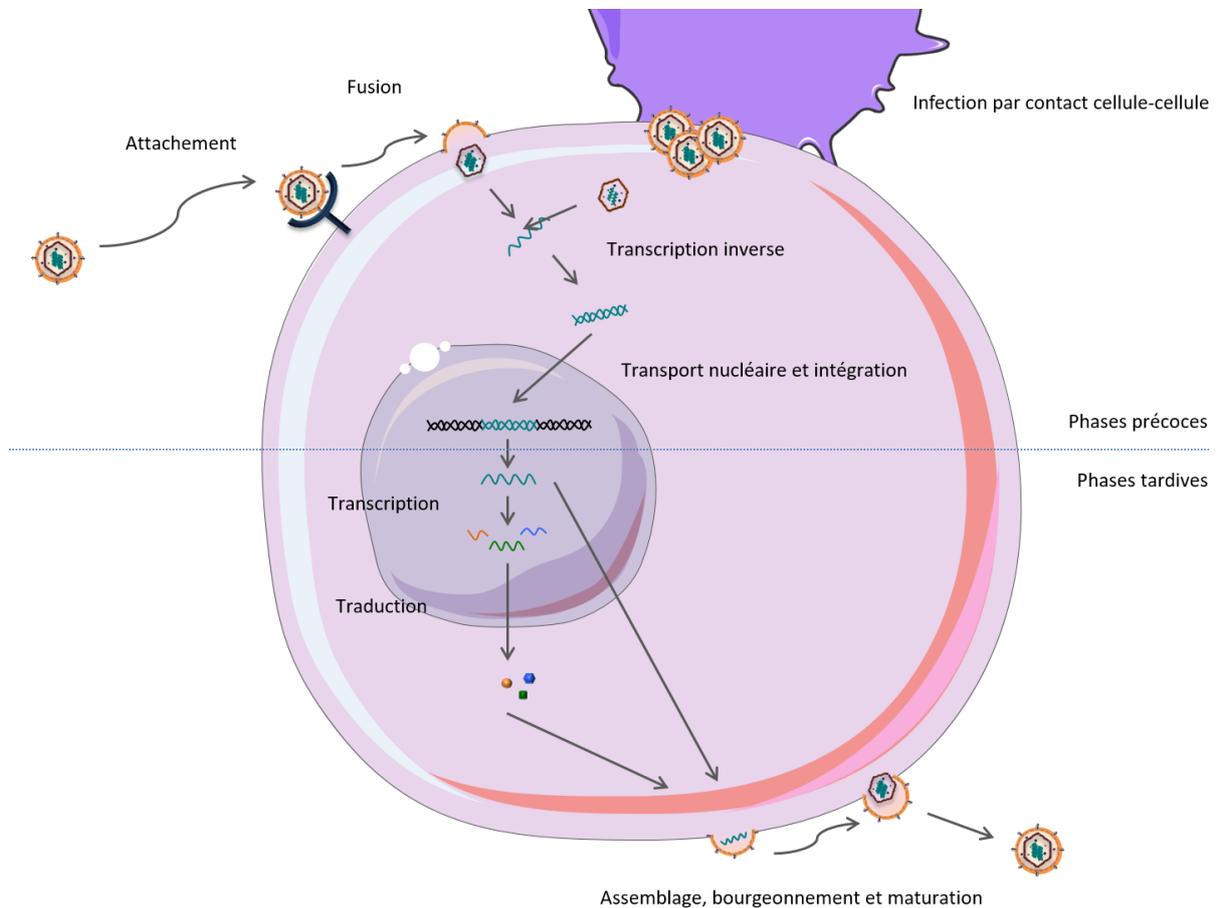


Figure 7. Cycle viral d'HTLV-1. Le cycle viral est divisé en phases précoces (de l'attachement aux récepteurs jusqu'à l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire) et tardives (de la transcription jusqu'au bourgeonnement et à la maturation des particules virales). HTLV-1 reconnaît des récepteurs spécifiques à la surface de la cellule grâce aux glycoprotéines virales présentes à la surface du virus. Après attachement, l'enveloppe virale fusionne avec l'enveloppe cellulaire. Après la décapsidation, s'ensuit la transcription inverse puis le transport nucléaire et de l'intégration de l'ADN viral dans le génome cellulaire. A ce stade, nous parlons de génome proviral. La transcription permet à la fois la production des ARN messagers viraux codant pour des protéines structurales et non-structurales et la production de l'ARN génomique viral. L'assemblage des particules virales se fait au niveau de la membrane plasmique. Après le bourgeonnement, la maturation a lieu dans la particule virale. HTLV-1 peut être transmis sous forme de particules virales libres mais est principalement transmis par contact cellule-cellule. Pour faciliter la lecture de la figure, l'échelle n'a pas été respectée.

ii. Les phases tardives

- Transcription du génome proviral

HTLV-1 exploite la machinerie cellulaire pour transcrire son génome proviral et produire les ARN messagers. Les LTR situés en 5' et 3' du génome proviral contiennent les éléments essentiels initiant une transcription basale via le recrutement de facteurs cellulaires. Les facteurs cellulaires Sp1, SRF, XBP-1 et Elk1 sont capables d'activer la transcription basale à partir du LTR viral (Ku et al., 2008; Livengood and Nyborg, 2004; Winter and Marriott, 2007). Ainsi, Tax peut être exprimée grâce au mécanisme de transcription basale. Une fois exprimée, Tax active la transcription selon une boucle de rétroaction positive.

En effet, le LTR 5' contient plusieurs éléments de réponse à la protéine virale Tax (TRE) faisant de cette dernière le transactivateur du génome proviral. Tax forme un complexe avec CREB (C-AMP Response Element-binding protein) qui recrute les cofacteurs cellulaires CBP (CREB binding protein)/p300 et PCAF au niveau du LTR 5'. Ainsi, Tax active fortement la transcription des gènes viraux étant sous le contrôle du LTR 5'. Contrairement au LTR 5', le LTR 3' ne contient pas de TRE ni de séquence TATA nécessaire à l'initiation de la transcription virale (Ching et al., 2004). La transcription du seul gène sous contrôle du LTR 3', HBZ, serait donc moins efficace que celle sous contrôle du LTR 5'.

Des facteurs cellulaires inhibant directement avec la transcription virale ont été identifiés. Les facteurs de transcription TCF1 (Transcription factor 1) et LEF1 (Lymphoid enhancer-binding factor 1), spécifiquement exprimés dans les lymphocytes T, régulent négativement la transcription virale en s'associant à Tax (Ma et al., 2015). De même, la désacétylase SIRT1 (NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-1) régule négativement la transcription virale dépendante de Tax en interagissant avec Tax, qui ne peut alors plus recruter CREB au niveau du LTR d'HTLV-1 (Tang et al., 2015).

De plus, les protéines auxiliaires p12, p13 et p30 jouent un rôle important dans la persistance virale *in vivo* (Edwards et al., 2011).

- Traduction des ARN messagers viraux en protéines

De manière concomitante à la transcription, les ARN pré-messagers en cours de synthèse sont différenciellement épissés par la machinerie cellulaire d'épissage. Les ARN messagers doublement épissés sont exportés directement dans le cytoplasme par la machinerie

cellulaire, ce qui permet notamment aux protéines Tax et Rex d'être rapidement et fortement produites. Rex agit au niveau post-transcriptionnel en induisant l'export des ARN messagers viraux non épissés et simplement épissés, évitant ainsi leur épissage complet. Pour cela, Rex se fixe à un élément de réponse à Rex (RxRe) situé à l'extrémité 3' de ces ARN messagers et interagit avec l'exportine CRM1 (Chromosome Region Maintenance 1) (Hakata 1998). En plus de sa capacité à faciliter l'export des ARN messagers non complètement épissés, Rex augmente leur stabilité et facilite leur traduction (Grone 1996).

Les ARN messagers non-épissés sont traduits en protéines structurales et enzymatiques Gag, Pro et Pol. Les ARN messagers simplement épissés sont traduits en protéine Env et p21. La protéine p21 correspond à une forme tronquée de Rex. Cependant, sa fonction reste assez peu claire (Younis and Green, 2005). Les ARN messagers doublement épissés sont traduits en protéines régulatrices Tax, p12, p13, p30 et Rex. Comme nous allons le voir dans la partie suivante, Tax initie la transformation cellulaire via la dérégulation de nombreuses fonctions cellulaires. La protéine auxiliaire p12 interagit avec le récepteur à l'IL-2, ce qui induit une augmentation de la transcription du facteur de transcription STAT5 aboutissant à l'expression de gènes prolifératifs (Nicot et al., 2001). Ainsi, p12 joue également un rôle dans la transformation cellulaire médiée par HTLV-1. La protéine auxiliaire p13 codée par le virus est localisée dans le noyau suite à son ubiquitination induite par Tax. La forme nucléaire de p13 interagit avec Tax et l'empêche d'interagir avec CBP/p300, menant ainsi à réduire l'activation de la transcription médiée par Tax (Andresen et al., 2011). p30 exerce une activité inhibitrice sur l'expression du génome proviral puisqu'elle séquestre Tax et Rex dans le noyau (Clerc et al., 2008). L'ARN messager anti-sens codant pour la protéine HBZ existe sous formes épissée et non-épissée. Comme p30, HBZ exerce une activité inhibitrice sur l'expression du génome en inhibant l'action de Tax sur le provirus (Nicot et al., 2004). Cela met en évidence l'existence d'un mécanisme de contrôle par Tax pour réguler sa propre expression.

- Assemblage, bourgeonnement, maturation des particules virales et transmission cellule-cellule

Une fois l'ARN génomique transcrit et les protéines structurales et enzymatiques traduites, les protéines de nucléocapside NC et de matrice MA se lient à l'ARN génomique. Les interactions de gag avec elle-même (dimérisation), la membrane cellulaire et l'ARN génomique viral sont nécessaires à l'assemblage et au bourgeonnement des particules virales immatures. La

protéase virale PR clive ensuite les polyprotéines Gag et Pol peu de temps après le relargage des particules virales, permettant ainsi leur maturation et la réorganisation structurale des protéines virales (Martin et al., 2016).

HTLV-1 se transmet très peu sous forme de particule virale libre. La transmission intercellulaire se réalise préférentiellement par le contact d'une cellule infectée et d'une cellule non-infectée, sous la forme de diverses structures : la formation d'une synapse virologique au contact entre les deux cellules, la formation d'un biofilm viral sur la cellule infectée qui se retrouve au contact de la cellule saine, et la formation de conduits cellulaires « longue distance » permettant le transfert des protéines virales de la cellule infectée à la cellule saine (pour revue, Gross and Thoma-Kress, 2016). L'expression de la fascine, protéine cellulaire impliquée dans l'assemblage de l'actine, est fortement induite par Tax et est retrouvée au niveau de ces conduits en association avec Gag (Gross et al., 2016; Teruel et al., 2017). De plus, la forme tronquée de p12, la protéine p8, est impliquée dans la formation des conduits cellulaires et est ensuite transférée dans la cellule non-infectée (Van Prooyen et al., 2010). Cependant, les mécanismes moléculaires exacts par lesquels p8 favorise la transmission cellulaire, à savoir notamment si l'action de p8 dépend de la fascine, restent à déterminer. L'expression du virus est modulée par la réponse immunitaire de l'hôte, ce qui pourrait expliquer la longue phase asymptomatique après l'infection par HTLV-1 avant le développement de pathologies telles que l'ATL, dont nous allons détailler la pathogenèse dans la partie suivante.

3. *Modèle du développement de l'ATL*

La transformation cellulaire est la phase finale du développement de l'ATL. La transformation cellulaire médiée par HTLV-1 est la conséquence de la dérégulation de nombreux processus cellulaires impliquant la prolifération cellulaire incontrôlée associée à l'accumulation de mutations génétiques et la résistance aux processus de mort cellulaire.

Durant la phase asymptomatique, la prolifération cellulaire est promue par Tax, p12 et HBZ (*Figure 8*). Une prolifération cellulaire incontrôlée combinée à l'induction de l'instabilité génomique induite par Tax (sur laquelle nous reviendrons dans le chapitre 3) mènent à l'accumulation de mutations somatiques et modifications épigénétiques dans les gènes viraux et cellulaires. Ces mutations génétiques et modifications épigénétiques accumulées

contribuent à l'émergence de clones de lymphocytes T CD4+ infectés transformés menant à l'ATL (Kataoka et al., 2015) (*Figure 8*). Les mutations somatiques fixées notamment dans les gènes impliqués dans la surveillance immunitaire, la signalisation du TCR ou encore dans la prolifération cellulaire permettent aux clones infectés de contourner la surveillance immunitaire de l'hôte et de ne plus requérir l'expression virale pour la survie et la prolifération cellulaire. A ce stade, l'expression des gènes sens (dont Tax) est perdue par la délétion fréquente du LTR 5'. Cependant, il a été récemment montré que l'expression du brin sens (dont Tax) était réactivée dans des lymphocytes T infectés sous forme de burst d'expression, ce qui pourrait permettre la persistance des cellules transformées (Billman et al., 2017). Malgré cela, l'expression du gène anti-sens (ie. HBZ) persiste. Il est communément admis que HBZ, en l'absence de Tax, favorise le maintien du phénotype transformé des cellules ATL en favorisant notamment la prolifération cellulaire et le maintien de l'instabilité génomique (Vernin et al., 2014; Mitobe et al., 2015) (*Figure 8*).

20-30 ans après la primo-infection

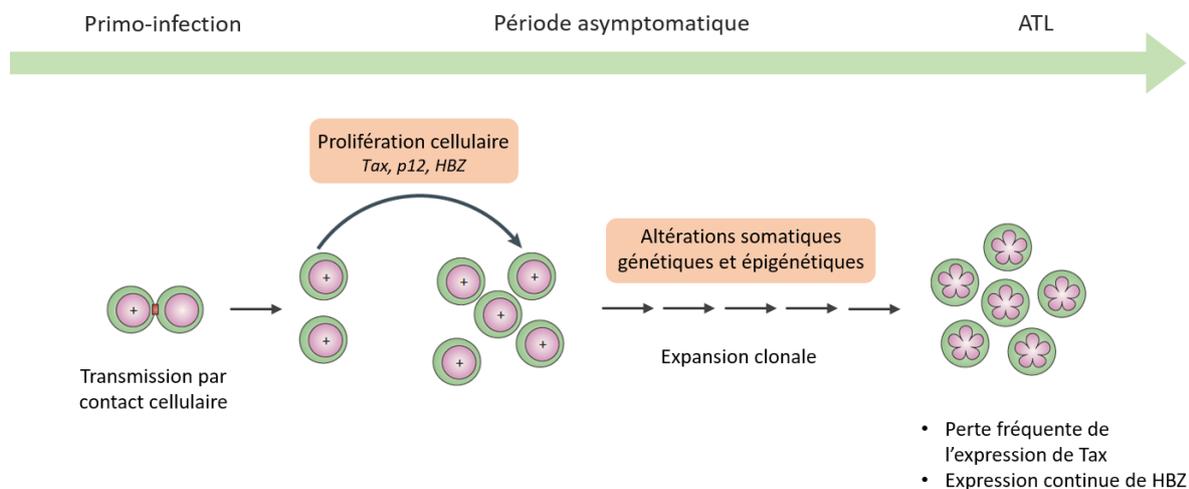


Figure 8. Pathogenèse ATL. La transmission du virus HTLV-1 se déroule par contact cellulaire entre une cellule infectée et une cellule non-infectée au cours de la primo-infection. Durant la phase asymptomatique, les facteurs viraux Tax, p12 et HBZ favorisent une prolifération cellulaire des cellules infectées (amplification clonale) incontrôlée menant à l'accumulation d'altérations somatiques génétiques et épigénétiques. Lors de la phase finale ATL, les cellules infectées « en fleur » présentent une perte de l'expression de Tax et une expression continue de HBZ.

Nous allons maintenant nous intéresser plus particulièrement aux rôles de Tax menant à la transformation des cellules infectées par HTLV-1.

II. Rôles de la protéine Tax dans la transformation cellulaire induite par HTLV-1

1. Structure protéique et localisation cellulaire de Tax en lien avec ses modifications post-traductionnelles

- a. La structure protéique de Tax est à l'origine de sa localisation subcellulaire et de ses fonctions

La protéine virale Tax de HTLV-1 est une protéine de 353 acides aminés composée de différents domaines fonctionnels (*Figure 9*). Tax possède un signal de localisation nucléaire (Nuclear Localization Signal, NLS), un signal d'export nucléaire (Nuclear Export Signal, NES) ainsi qu'un motif de liaison à l'ADN. Tax entre dans le noyau grâce à des interactions avec des protéines du pore nucléaire (Tsuji et al., 2007). Des expériences utilisant le NES de Tax fusionné à la GFP ont montré que la localisation dans le cytoplasme était dépendante de la protéine CRM-1, ce qui n'est pas le cas lorsque la protéine entière est exprimée, cette dernière restant dans le cytoplasme après traitement à la leptomycine B qui inhibe l'export nucléaire CRM-1-dépendant (Alefantis et al., 2003). Cela suggère que le NES de Tax n'est pas constitutivement exposé à la machinerie cellulaire d'export nucléaire et que ceci est peut-être dû à sa conformation tridimensionnelle ou à son interaction avec des protéines masquant son NES. Cela peut également suggérer que l'export nucléaire de Tax est favorisé par ses modifications post-traductionnelles que nous allons détailler dans la partie suivante.

Tax possède également deux domaines d'activation du facteur CREB et deux domaines considérés comme importants pour l'activation de la voie NF- κ B. Un autre élément structural de Tax est important pour sa localisation et ses fonctions : le domaine de dimérisation. Ce domaine découpé en trois parties est localisé dans la région centrale de Tax. A l'aide de mutants perte-de-fonction de Tax, des études de complémentation génétique ont montré que la dimérisation de Tax était nécessaire à sa fonction de transactivateur viral (Jin 1997). Enfin, Tax possède un motif de liaison aux domaines PDZ (post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), and zonula occludens-1 protein (zo-1)) appelé PBM (PDZ-Binding Motif).

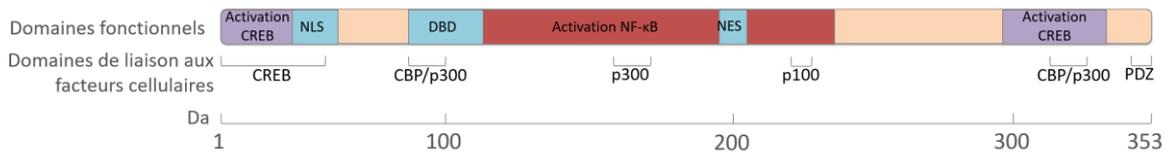


Figure 9. Principaux domaines fonctionnels de Tax.

- b. Tax subit des modifications post-traductionnelles qui modulent dynamiquement sa localisation subcellulaire et ses fonctions

En plus des domaines fonctionnels, Tax subit diverses modifications post-traductionnelles participant à sa localisation cellulaire qui sont directement liées à la régulation et diversité de ses fonctions. A l'heure actuelle, quatre modifications post-traductionnelles ont été décrites pour Tax : la phosphorylation, l'acétylation, l'ubiquitination et la SUMOylation (Figure 10).

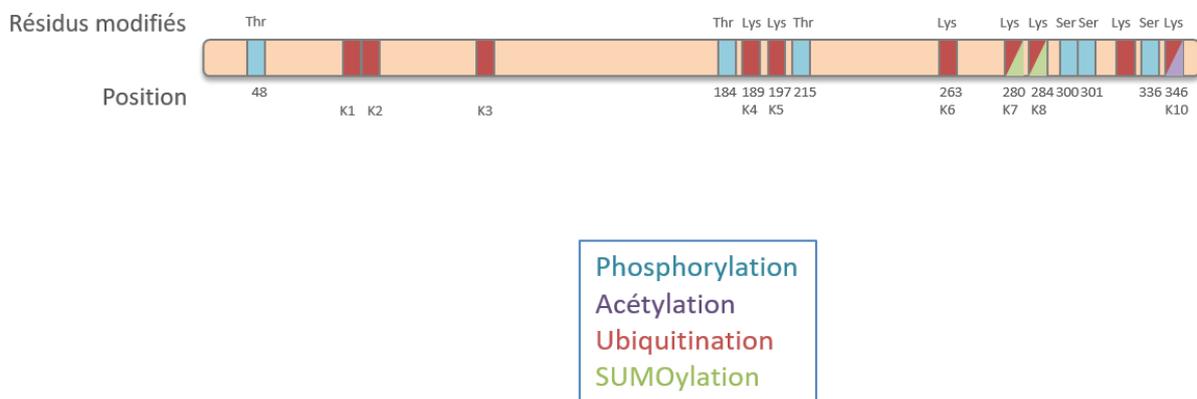


Figure 10. Les modifications post-traductionnelles de Tax.

Tax peut être phosphorylée sur quatre résidus modulant sa localisation nucléaire et sa fonction transcriptionnelle, bien que les kinases et phosphatases impliquées n'aient pas encore été clairement identifiées. Seule une étude a mis en évidence la phosphorylation de Tax *in vitro* par la kinase CK2 sur les sérines 344 et 346 et la thréonine 351, sans pour autant

analyser le lien de ces phosphorylations avec la modulation des fonctions de Tax (Bidoia et al., 2010).

L'acétylation de Tax reste à ce jour très peu décrite. A l'aide de mutants de Tax sur diverses lysines, Lodewick et al. (2009) ont montré que l'acétylation de Tax s'effectuait sur la lysine 346 de Tax par l'histone acétyltransférase p300 et serait impliquée dans sa localisation nucléaire pour l'activation de la transcription NF- κ B-dépendante.

Comme nous le détaillerons plus tard, la phosphorylation et l'acétylation de Tax participent à son activité de transactivateur du génome en lien avec sa localisation nucléaire.

L'ubiquitination consiste en la conjugaison covalente d'une ou plusieurs protéines ubiquitines aux résidus lysine de protéines substrats. Pour pouvoir être fixées sur les résidus cibles, les ubiquitines passent par trois étapes successives. La première consiste en leur activation par l'adénylation de leur domaine C-terminal par une enzyme d'activation E1. La seconde étape consiste au transfert de l'ubiquitine sur l'enzyme de conjugaison E2. Enfin, lors de la troisième étape, l'ubiquitine est conjuguée à la protéine substrat grâce à une ubiquitine ligase E3. L'ubiquitination est réversible dans le sens où il existe des déubiquitylases clivant l'ubiquitine des protéines substrats. Différents types d'ubiquitination peuvent avoir lieu. La mono-ubiquitination consiste en la liaison d'une ubiquitine sur une lysine cible. La poly-ubiquitination est plus fréquente (pour revue, Komander et Rape 2012). Elle consiste en la fixation de plusieurs ubiquitines sur un résidu lysine et implique plusieurs sortes de liaisons entre les ubiquitines (pour revue, Yau and Rape, 2016). L'ubiquitine contient en effet sept résidus lysine et chacun de ces résidus peut servir d'accepteur pour la liaison aux autres ubiquitines. Le rôle que joue l'ubiquitination sur une protéine dépend de la lysine de l'ubiquitine impliquée dans la liaison à l'ubiquitine suivante. Parmi ces résidus, la poly-ubiquitination en lysine 48 de l'ubiquitine sert de signal pour la dégradation des protéines par le protéasome. La poly-ubiquitination en lysine 63 de l'ubiquitine module l'activité de certaines protéines impliquées la signalisation cellulaire et la réparation de l'ADN (pour revue, Yau and Rape, 2016). La poly-ubiquitination de Tax sur les résidus lysine 263, 280 et 284 influence sa localisation subcellulaire mais également ses interactions avec ses partenaires cellulaires et donc ses fonctions notamment dans l'activation de la voie NF- κ B que nous détaillerons par la suite.

Comme pour le processus d'ubiquitination, la SUMOylation est une modification post-traductionnelle au cours de laquelle des protéines SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) sont liées de façon covalente à des résidus lysine présents sur les protéines cellulaires. Quatre protéines SUMO ont été décrites chez l'Homme, dont les séquences sont très proches. Ceci sous-entend un possible mécanisme de redondance. Le processus de SUMOylation se rapproche très fortement du processus d'ubiquitination en impliquant également des enzymes d'activation E1, de conjugaison E2 et des ligases E3. A ce jour, la seule enzyme de conjugaison E2 identifiée est Ubc9 (Ubiquitin carrier protein). De même que pour l'ubiquitination, la SUMOylation est un processus réversible contrôlé par des protéases SENP pouvant cliver les protéines SUMO (pour revue, Wilson, 2017). Les lysines en position 280 et 284 de Tax sont des résidus partagés pour son ubiquitination et sa SUMOylation non-concomitantes. La régulation dynamique spatiale de Tax entre le noyau et le cytoplasme par ces deux modifications post-traductionnelles a été mise en évidence grâce à l'utilisation de fluorophores photoconvertibles (Kfoury et al. 2011). Cependant, malgré les nombreuses études traitant de l'ubiquitination et de la SUMOylation de Tax et des fonctions liées à cette dernière, nous ne connaissons pas à ce jour la régulation temporelle de ces deux modifications post-traductionnelles.

La modulation dynamique de ces modifications post-traductionnelles par les acteurs cellulaires impliqués pourrait être à l'origine des diverses localisations de Tax et par conséquent de la modulation de ses fonctions.

c. Localisation subcellulaire de Tax

Comme nous venons de l'évoquer, Tax est localisée à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme, ce que nous allons décrire ici plus en détails (*Figure 11*).

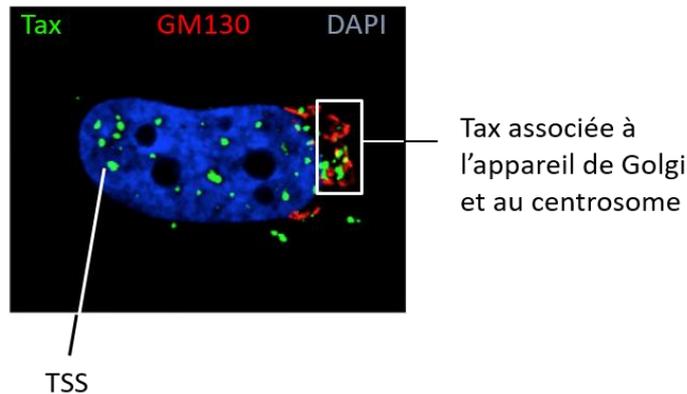


Figure 11. Localisation intracellulaire de Tax. Image personnelle. Tax est exprimée de façon transitoire en cellules HeLa. Tax est ici visualisée en vert. L'appareil de Golgi est visualisé en rouge grâce au marquage de la protéine golgienne GM130. Le noyau est contre-coloré au DAPI. TSS = Tax-Speckled Structures.

Les premières études liant les fonctions de Tax, et notamment son rôle d'activateur transcriptionnel, à sa localisation ont identifié Tax par microscopie confocale et expériences d'immunoprécipitation comme une protéine essentiellement nucléaire concentrée sous forme de foyers bien marqués, les TSS (Tax-Speckled Structures) (Semmes and Jeang, 1996). L'enzyme de conjugaison à SUMO Ubc9 et la protéine SUMO1 de la machinerie de SUMOylation ont été mises en évidence dans les TSS (Kfoury et al., 2011). De plus, la phosphorylation de Tax sur les résidus sérines 300/301 serait un prérequis pour l'acétylation de Tax et donc sa localisation nucléaire (Lodewick et al., 2009).

Plusieurs structures de Tax au niveau du cytoplasme ont été décrites. Tax est localisée dans le cytoplasme de manière diffuse mais aussi concentrée en périphérie du noyau, notamment au niveau de deux organelles localisés à proximité l'un de l'autre, l'appareil de Golgi et le centrosome.

Très peu d'études ont analysé de façon systématique la localisation de Tax et ses fonctions suivant le type cellulaire dans lequel elle est exprimée, sachant que les lymphocytes T sont la cible principale de l'infection par HTLV-1. On peut cependant noter une différence de la localisation de Tax entre les cellules HeLa et la lignée lymphocytaire T Jurkat d'une part, où elle est localisée préférentiellement dans le noyau, et les cellules 293T, où elle serait localisée de manière équivalente dans le noyau et le cytoplasme (Ching et al., 2006; Nejmeddine et al., 2009; Takahashi et al., 2013). Dans les lignées cellulaires C8166 et MT4, Tax est préférentiellement localisée dans le noyau tandis qu'elle est préférentiellement localisée dans le cytoplasme dans la lignée cellulaire Hut102 (Varrin-Doyer et al., 2012). La localisation préférentielle de Tax dans le noyau ou dans le cytoplasme des lignées cellulaires chroniquement infectées par HTLV-1 ne semble pas dépendre de son niveau d'expression puisque le niveau d'expression de Tax est plus faible dans les Hut102 et les MT4 que dans les C8166.

2. Tax dérégule la transcription de certains gènes cellulaires

De nombreuses études ont par la suite identifié d'autres composants des TSS, dont des éléments de la machinerie de réplication tels que les hélicases MCM2/7, ou de la machinerie de transcription tels que l'ARN polymérase II et les facteurs de transcriptions CBP/p300, RelA/p50, CREB et TBP (TATA-binding protein) (Bex et al. 1997; Semmes et Jeang 1996; Baydoun et al. 2007). La présence des facteurs RelA/p50 et de CREB dans ces TSS suggère que les TSS sont le lieu d'activation de la transcription des gènes cibles de NF- κ B et CREB.

La phosphorylation des résidus Ser300 et Ser301 est nécessaire pour la localisation de Tax au niveau des TSS et par conséquent pour l'activation de CREB et NF- κ B (Bex et al., 1999). En revanche, la phosphorylation de Tax sur le résidu Thr215 inhibe l'activation des deux voies alors que la phosphorylation de Thr48 a un effet inhibiteur uniquement sur la voie NF- κ B (Durkin et al., 2006). Par extrapolation de ces observations découle un modèle selon lequel (i) la forme déphosphorylée de Tax sur les Ser300/301 et phosphorylée sur Thr48/215 correspondrait à un état inactif de Tax sur la voie NF- κ B et CREB (ii) la forme phosphorylée de Tax sur les Ser300/301 et déphosphorylée sur les Thr48/215 correspondrait à un état actif de Tax sur la voie NF- κ B. Des analyses semi-quantitatives des peptides phosphorylés ont montré

que la forme active est beaucoup moins abondante que la forme inactive de Tax, ce qui signifie que la phosphorylation joue un rôle majeur sur la modulation des fonctions de Tax (Durkin et al., 2006).

La SUMOylation de Tax sur les résidus Lys280/284 est associée à sa localisation nucléaire au niveau des TSS. La présence de l'enzyme de conjugaison Ubc9 et des protéines SUMO au niveau des TSS suggère que ces derniers sont des sites actifs de SUMOylation de Tax (Kfoury et al. 2011). L'utilisation de Tax mutée sur ces deux résidus lysine a mis en évidence la forme SUMOylée de Tax au niveau des TSS par microscopie confocale qui serait associée à RelA, p300 et IKK γ pour l'activation de la transcription NF- κ B-dépendante (Lamsoul et al., 2005; Nasr, 2006). Cependant, ces expériences ne permettent pas de dissocier l'effet de la SUMOylation et de l'ubiquitination de Tax puisque ces modifications ciblent les mêmes résidus. Ces données restent controversées par deux études plus récentes. En effet, à l'aide de mutants de Tax défectifs pour la formation des TSS et d'un mutant de l'enzyme de conjugaison Ubc9 défectif pour la SUMOylation (et donc la SUMOylation de Tax) les auteurs ont pu dissocier la SUMOylation de l'ubiquitination de Tax et mettre en évidence que la SUMOylation de Tax n'est pas nécessaire pour l'activation de la voie NF- κ B par Tax (Bonnet et al., 2012; Pene et al., 2014).

L'utilisation de mutants défectifs pour la SUMOylation de Tax (mutations sur les lysines en positions 280 et 284) a montré que la SUMOylation de Tax corrèle avec son acétylation et que la forme SUMOylée de Tax colocalise avec p300 au niveau des TSS (Bex et al., 1997; Lodewick et al., 2009).

Il a également été montré au travers de nombreuses études que nous allons détailler par la suite que Tax était capable de réprimer la transcription de certains gènes cellulaires. Cependant, les mécanismes moléculaires exacts sous-jacents de cette répression (ie. au niveau du promoteur, par exemple) n'ont pas encore été investigués.

Ainsi, Tax dérégule l'expression de nombreux gènes impliqués dans les voies cellulaires qui, lorsqu'elles sont dérégulées, peuvent favoriser la transformation cellulaire que nous allons détaillés à présent dans la partie suivante du manuscrit.

3. Tax promeut la survie et la prolifération cellulaire

Comme nous avons pu le voir jusqu'à présent, l'une des stratégies employées par le rétrovirus oncogène HTLV-1 permettant la transformation cellulaire est l'expression de la protéine oncogène Tax. Tax non seulement active la transcription de nombreux gènes mais interagit avec de nombreuses protéines, ce qui lui permet d'assurer ses fonctions, notamment dans la survie et la prolifération cellulaire, la dérégulation de la progression du cycle cellulaire et l'inhibition de l'apoptose que nous allons détailler ici et qui sont nécessaires à la transformation cellulaire.

a. Activation des voies de survie et de prolifération cellulaire Akt, MAPK et NF- κ B

i. La voie Akt

La voie Akt joue un rôle essentiel dans la survie et la prolifération cellulaire mais également dans la mobilité cellulaire, l'apoptose et le métabolisme (pour revue, Nicholson and Anderson, 2002).

Cette voie est normalement activée par des facteurs de croissance tels que l'EGF (Epidermal Growth Factor), au niveau du récepteur à activité tyrosine kinase intrinsèque de ce dernier à la surface des cellules. L'activation de ces récepteurs permet le recrutement de la protéine PI3K (phosphoinositide-3-kinase). La cascade de signalisation résultant de cette activation permet l'activation d'Akt par la kinase PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1). Akt est un élément central de la voie et permet l'activation de facteurs de transcription tels que CREB et NF- κ B pour l'expression de gènes impliqués dans la survie et la prolifération cellulaire ou anti-apoptotiques tels que les gènes de la cycline D1 ou encore Bcl-2 (Cheaib et al., 2015).

La voie Akt est fréquemment dérégulée dans les cancers chez l'Homme (pour revue, Nicholson and Anderson, 2002). De façon intéressante, des lignées cellulaires chroniquement infectées par HTLV-1 présentent une activation de la voie Akt visualisée par la forme active phosphorylée d'Akt (Ikezoe et al., 2007). Des expériences de western-blot et de co-immunoprécipitation ont mis en évidence une augmentation de la forme active phosphorylée active d'Akt en présence de Tax par l'interaction de Tax avec la kinase PI3K (Peloponese and Jeang, 2006). Ainsi, ces données mettent en évidence une activation de la voie Akt par Tax.

ii. La voie des MAP kinases

La voie de signalisation des MAP kinases (MAPK ; Mitogen Activated protein Kinase) peut être activée par un stress cellulaire ou oxydatif et différents stimuli impliquant des facteurs de croissance et des cytokines pro-inflammatoires. Cette voie consiste en une cascade de phosphorylation des protéines MAPK qui sont des sérine/thréonine kinases cytosoliques. Une fois activée, la dernière MAPK phosphoryle différentes protéines cellulaires impliquées dans la prolifération, le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose ou encore la différenciation cellulaire telles que c-Jun, ATF-2, NF-ATc1 ou encore STAT3 (pour revue, Dhillon et al., 2007). La voie des MAPK fait intervenir plus de 200 protéines cellulaires regroupées en quatre cascades de signalisation principales : ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), ERK5, p38 et JNK (c-Jun N-terminal Kinase) (Keshet and Seger, 2010; Morrison, 2012).

La voie des MAPK est dérégulée au sein de nombreux cancers (pour revue, Dhillon et al., 2007). Plus précisément, des cellules exprimant Tax présentent une augmentation de la forme phosphorylée active de c-Jun. Cela est cohérent avec une activation constitutive de la voie de signalisation JNK dans les lignées cellulaires chroniquement infectées par HTLV-1 et dans les cellules ATL dérivées de patients (Arnulf, 2002). Tax active également d'autres MAPK telles que JNK1 de la voie JNK, MEKK1 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1) de la voie ERK et TAK1 de la voie p38 (Wu et Sun 2007; Yin et al. 1998; Jin et al. 1997). L'action de Tax sur les différentes voies MAPK souligne l'importance de l'induction de la prolifération cellulaire au cours de la transformation cellulaire.

iii. La voie NF- κ B

La famille NF- κ B est constituée de cinq facteurs de transcription fonctionnant en homo ou hétérodimères pour l'activation de gènes cibles : p50, p52, p65 (autrement appelé RelA), RelB et c-Rel. La voie NF- κ B permet de réguler diverses fonctions cellulaires telles que la progression du cycle cellulaire et l'apoptose. Sachant qu'il s'agit d'une des thématiques développées au sein du laboratoire, nous détaillerons d'avantage la voie NF- κ B en comparaison aux autres voies détaillées précédemment.

Deux voies de signalisation ont été identifiées : la voie canonique (classique) et la voie non-canonique (alterne).

- La voie canonique

La voie canonique peut être activée en réponse à de nombreux stimuli incluant de nombreux agents exogènes extracellulaires (virus, bactéries, parasites) reconnus par les TLR (Toll-like receptors) ou le TCR (T Cell Receptor) à la surface des lymphocytes T. Le stress oxydatif mène également à une activation de la voie canonique NF- κ B via la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF reconnu par son récepteur ou encore via la production de ROS produits en cas de dommages à l'ADN.

En réponse aux signaux d'activation, les ubiquitine E3 ligases TRAF2, 5 et 6 (TNF Receptor-Associated Factor) sont activées par auto-polyubiquitination. Ces protéines TRAF recrutent ensuite la kinase TAK1 (Transforming growth factor- β -Activated Kinase 1) qui s'associe alors à deux sous-unités régulatrices TAB1/2 pour son activation. Le complexe IKK (Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase) est également recruté par les protéines TRAF. Il est composé de deux sous-unités catalytiques IKK α et IKK β et d'une sous unité régulatrice IKK γ (autrement appelée NEMO, pour NF- κ B Essential MOdulator) (pour revue, Israël, 2010). Dans le cytoplasme, l'hétérodimère NF- κ B RelA/p50 ou c-Rel/p50 est séquestré par l'inhibiteur I κ B α . TAK1 active le complexe IKK par phosphorylation, et en retour, le complexe IKK peut alors phosphoryler l'inhibiteur I κ B α (Brockman et al., 1995). I κ B α est ensuite ubiquitiné par l'ubiquitine ligase SCF- β -TrCP en lysine 48 menant ainsi à sa dégradation protéasomale et à la libération de RelA/p50 (Chen et al., 1995). RelA/p50 transloque alors dans le noyau où il se fixe aux éléments de réponse κ B dans les promoteurs des gènes cibles.

Comme nous l'avons mentionné, la voie NF- κ B est activée par Tax au niveau des TSS. Tax active également les étapes cytoplasmiques de la voie NF- κ B. Des études antérieures ont mis en évidence une activation persistante de la voie NF- κ B découlant d'une activation chronique du complexe IKK dans les lignées cellulaires chroniquement infectées par HTLV-1 et les cellules primaires issues de patients ATL (Sun et al. 1994; Mori et al. 1999). Des expériences de co-immunoprécipitation dans des lignées cellulaires chroniquement infectées par HTLV-1 ont montré une interaction de Tax avec TAK1, TAB2 (TAK1-binding protein 2) et également avec IKK γ pour l'activation de ces dernières (Harhaj et Sun 1999; Wu et Sun 2007; Yu et al. 2008). Tax peut également se fixer à l'inhibiteur I κ B pour favoriser sa dégradation et activer la voie NF- κ B (Suzuki et al. 1995). Tax interagit directement avec et active TRAF6. Cela a pour conséquence l'ubiquitination de la protéine anti-apoptotique MCL-1 dépendante de TRAF6 résultant en la stabilisation MCL-1, soulignant ainsi son implication dans la survie cellulaire

dans les lignées cellulaires chroniquement infectées par HTLV-1 et des cellules ATL dérivées de patients (Choi and Harhaj, 2014).

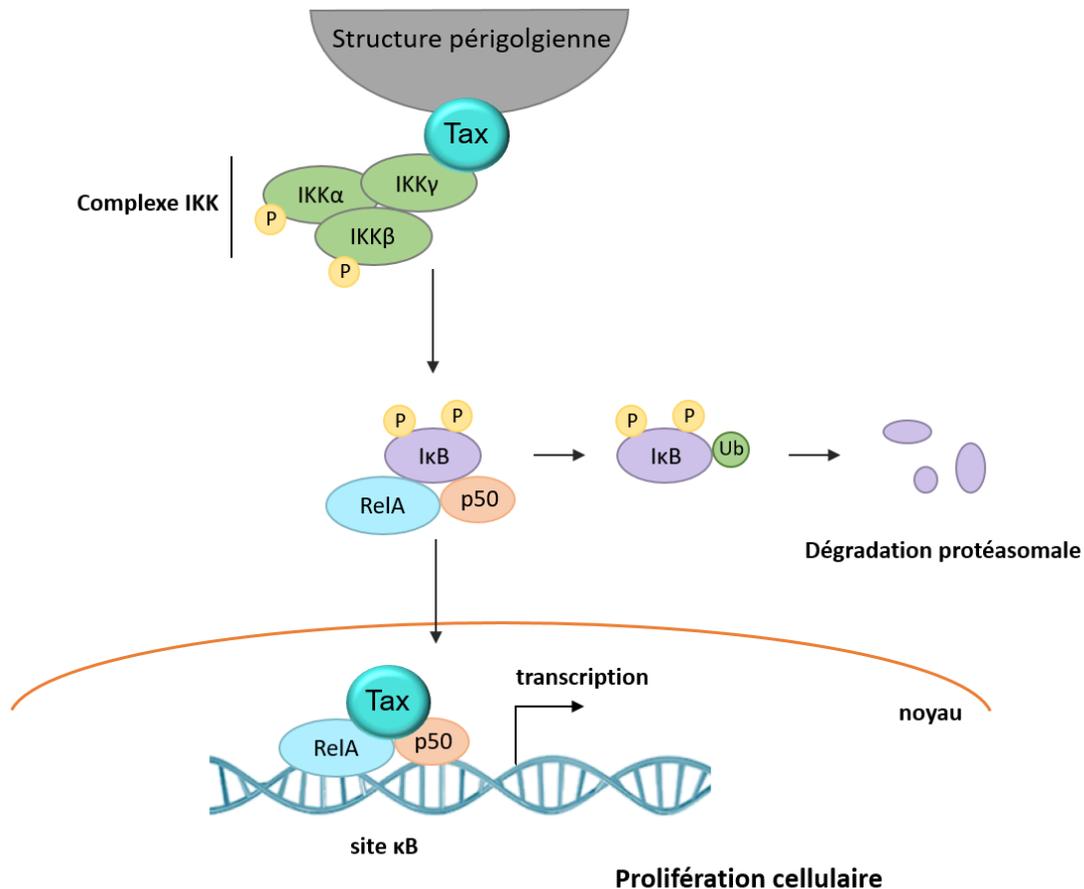


Figure 12. Tax active la voie canonique NF-κB. Tax active la voie canonique NF-κB en recrutant et en activant le complexe IKK au niveau de structures périgolgiennes. La translocation nucléaire du complexe NF-κB fait suite à la dégradation protéasomale de l'inhibiteur IκBα et active la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire.

Plusieurs études ont démontré l'importance de l'ubiquitination de Tax dans l'activation de la voie NF-κB.

En effet, l'utilisation de mutants de Tax défectifs pour l'ubiquitination a permis de montrer que la poly-ubiquitination de Tax en Lys63 est requise pour s'associer au protéasome sans pour autant que cette dernière soit dégradée, régulant ainsi sa stabilité (Chiari et al., 2004).

Des expériences de microscopie confocale dans des cellules Jurkat exprimant Tax ont montré que l'ubiquitination de Tax sur les résidus Lysine 263/280/284 est requise pour la localisation de Tax et du complexe IKK sous sa forme active au niveau de l'appareil de Golgi pour l'activation de la voie NF- κ B (Harhaj, Sun, et Harhaj 2006).

De manière intéressante, la poly-ubiquitination de Tax promeut la relocalisation d'IKK γ ainsi que son activation au niveau de rafts lipidiques associés à l'appareil de Golgi en cellules Jurkat exprimant Tax et en lignées cellulaires chroniquement infectées par HTLV-1 (Harhaj, Sun, et Harhaj 2007; Huang et al. 2009) (*Figure 12*). Kfoury et al. (2011) abordent la même notion en analysant la localisation du complexe Tax/IKK en parlant du centrosome au lieu de l'appareil de Golgi. Compte tenu de la proximité de l'appareil de Golgi et du centrosome dans la cellule, les auteurs de ces deux articles ont analysé le même processus sous un angle différent, ce qui souligne l'existence d'une seule et même fraction de Tax localisée au niveau de l'appareil de Golgi et du centrosome.

De plus, des expériences utilisant l'extinction de l'expression de l'enzyme de conjugaison Ubc13 ont mis en évidence que cette dernière est requise pour la poly-ubiquitination de Tax en Lys63 permettant ainsi le recrutement du complexe IKK pour l'activation de la voie NF- κ B (Shembade et al., 2007). De même, éteindre l'expression d'Ubc13 sous-entend une manipulation globale de la machinerie d'ubiquitination pouvant affecter la localisation et les fonctions d'autres protéines cellulaires, ce qui peut potentiellement altérer les interactions que Tax met en place dans la cellule dans le cadre de ses fonctions.

Ainsi, l'utilisation de mutants de Tax défectifs pour son ubiquitination ou la manipulation de la machinerie d'ubiquitination sont deux approches complémentaires pour mettre en évidence les mécanismes moléculaires sous-jacents de l'activation de la voie NF- κ B par Tax.

Ces chaînes d'ubiquitine servent alors de plateforme pour le recrutement de protéines cellulaires telles que TAK1, OPTN (Optineurine) et IKK γ pour l'activation de la voie NF- κ B (Wu et Sun 2007; Journo et al. 2009; Kfoury et al. 2008a). Plus précisément, Tax détourne les fonctions initiales de RNF8 (Ring Finger protein 8), une ubiquitine E3 ligase, pour activer la voie NF- κ B. En effet, en présence de Tax, RNF8 assemble des chaînes de poly-ubiquitine en lysine 63 pour l'activation de TAK1 et IKK γ *in vitro* (Ho et al., 2015).

De manière intéressante, Tax peut interagir avec des déubiquitinases cellulaires clivant les chaînes de poly-ubiquitine. Notamment, la déubiquitinase CYLD (Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase) interagit avec Tax, résultant ainsi en la déubiquitination de Tax et son incapacité à

interagir avec IKK γ pour l'activation de la voie NF- κ B (Wu, Zhang, et Sun 2011). Cependant, la même étude a montré à l'aide de lignées cellulaires chroniquement infectées par HTLV-1 que CYLD était constitutivement phosphorylée, inactivant ainsi son activité catalytique. Ainsi, une régulation mutuelle de CYLD et Tax serait mise en place pour l'activation persistante de la voie NF- κ B.

- La voie non-canonique

La voie non-canonique est activée par un nombre plus restreint de stimuli dont RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand), BAFF (B-cell Activating Factor), CD40-L ou encore TWEAK (TNF-like Weak inducer of apoptosis) et serait plutôt impliquée dans la maturation des lymphocytes B (Sun 2012).

L'activation de la voie non-canonique dépend du niveau d'expression de la protéine kinase NIK (NF- κ B-Inducing Kinase) (Xiao et al., 2001). En effet, dans les cellules non-stimulées, le complexe TRAF2/3 recrute les protéines IAP1/2 qui ubiquitinent NIK menant à sa dégradation protéasomale. En réponse aux signaux d'activation, le complexe TRAF2/3 est ubiquitiné en lysine 48 et est dégradé par le protéasome, libérant ainsi la kinase NIK dont le niveau d'expression augmente dans le cytoplasme. Une fois activée par autophosphorylation, NIK phosphoryle et active des dimères d'IKK α . Les dimères d'IKK α induisent alors la phosphorylation de l'inhibiteur p100 qui est ensuite ubiquitiné par SCF- β -TrCP menant à sa dégradation partielle par le protéasome pour donner sa forme tronquée active p52. Le dimère RelB/p52 est alors libéré et transloque dans le noyau pour activer les promoteurs des gènes cibles (Sun 2012).

La voie non-canonique est fréquemment activée dans de nombreux cancers y compris dans les leucémies chroniques (Tegowski and Baldwin, 2018). Des expériences de co-immunoprécipitation en lignées cellulaires chroniquement infectées par HTLV-1 ont mis en évidence l'interaction entre Tax et l'inhibiteur p100 et son importance dans la transformation cellulaire médiée par Tax (Béraud et al., 1994; Higuchi et al., 2007) (*Figure 13*).

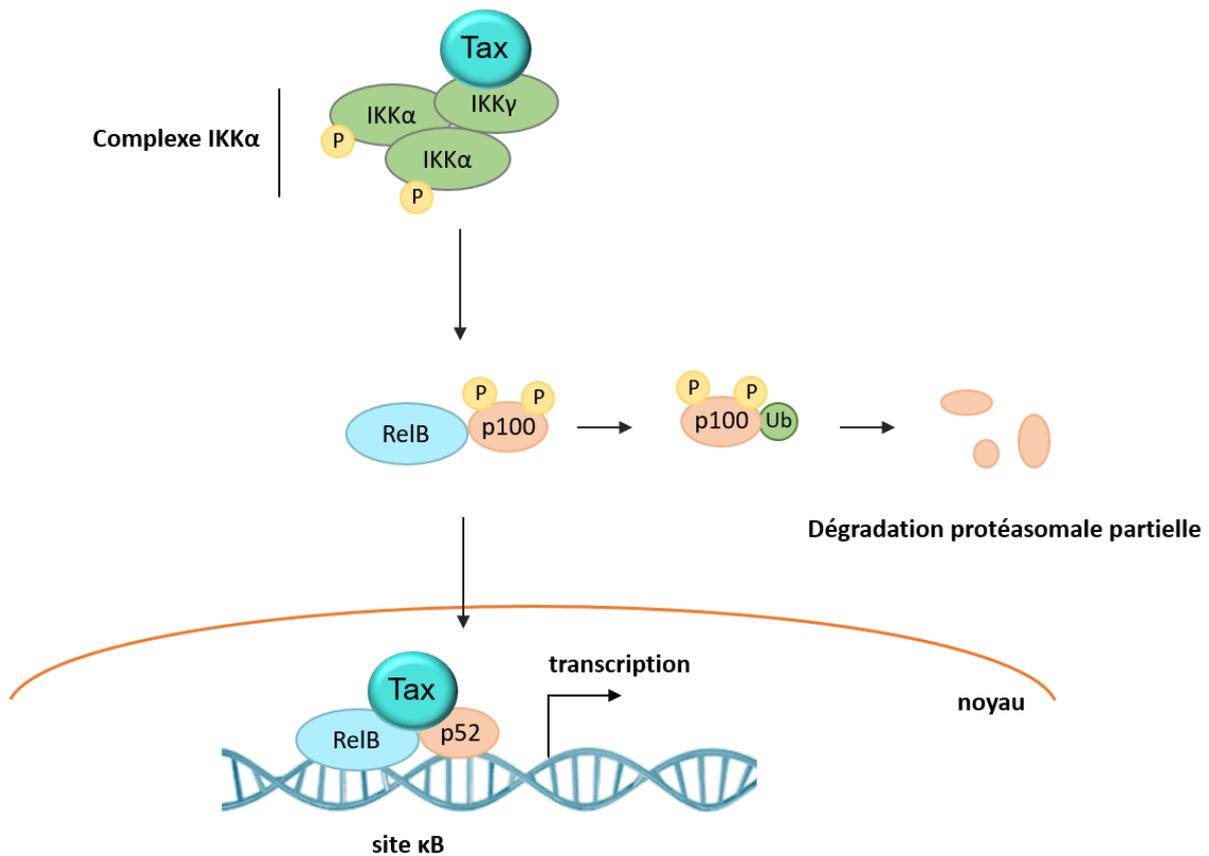


Figure 13. Tax active la voie non-canonique NF-κB.

b. Tax dérégule la progression du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases : la phase G1 (Growth phase 1), correspondant à la préparation de la cellule à la réplication de l'ADN ; la phase S (Synthesis phase), au cours de laquelle se déroule la réplication semi-conservative de l'ADN ; la phase G2 (Growth phase 2), correspondant à la préparation de la cellule à la division cellulaire ; la phase M (mitose), correspondant à la division cellulaire. La progression du cycle cellulaire est contrôlée par différents complexes Cycline/CDK (Cyclin-Dependent Kinase) (Vermeulen et al., 2003). Ces complexes exprimés différemment au cours du cycle cellulaire sont régulés par des inhibiteurs de CDK. Il existe deux familles d'inhibiteurs de CDK : la famille Ink4 spécifique des complexes Cycline D/CDK(4/6), et la famille Cip/Kip agissant sur tous les complexes Cycline/CDK. En lien avec ceci, un autre point de contrôle important est l'entrée en phase S. Durant la phase G1, pRb (Retinoblastoma protein) agit comme un régulateur négatif de la

progression du cycle cellulaire en séquestrant le facteur de transcription E2F nécessaire à l'expression de gènes impliqués la transition G1/S et pour la réplication de l'ADN durant la phase S. Dans les cellules progressant vers la phase S, pRb est phosphorylée par les complexes Cycline D/CDK(4,6) puis Cycline (E/A)/CDK2. Cette série de phosphorylations mène à son inactivation et à sa dissociation d'E2F qui est alors actif.

La protéine Tax agit à quatre niveaux de contrôle en modulant l'expression ou en interagissant avec des acteurs moléculaires favorisant ainsi l'accélération du cycle cellulaire et plus précisément la phase G1 et la transition G1/S : directement sur les complexes Cycline/CDK ; sur les inhibiteurs de CDK ; directement sur le complexe pRb/E2F ; sur des effecteurs du cycle cellulaire en aval des complexes Cycline/CDK (*Figure 14*).

Tax active l'expression des cyclines D1/2 et des CDK 4 et 6 impliqués dans la transition G1/S dans les lignées cellulaires chroniquement infectées par HTLV-1 (Santiago et al. 1999; Huang et al. 2001; Kim et al. 2010). De plus, des expériences de co-immunoprécipitation en lignées cellulaires chroniquement infectées par HTLV-1 et en lignées cellulaires exprimant uniquement Tax, combinées à des expériences de GST pull-down, ont mis en évidence une interaction directe entre Tax et CDK4, favorisant ainsi la formation du complexe Cycline D/CDK4 et induisant une hyperphosphorylation de pRb menant à son inactivation (Haller et al., 2002). Consistent avec cela, Kehn et al. ont observé de faibles niveaux de la forme active hypo-phosphorylée de pRb dans les cellules infectées par HTLV-1. Des expériences de GST pull-down ainsi que l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome ont mis en évidence une interaction directe entre Tax et pRb menant à la dégradation protéasomale de ce dernier (Kehn et al., 2005).

L'activation des CDK est amplifiée par l'aptitude de Tax à réprimer l'expression des inhibiteurs de CDK p18^{Ink4c}, p19^{Ink4d} et p27^{Kip1} (Iwanaga et al. 2001; Suzuki et al. 1999). De même, Tax interagit directement avec p15^{Ink4b} et p16^{Ink4a} *in vitro*, menant ainsi à leur inactivation (Suzuki et al. 1999).

Enfin, par essais luciférasés et RT-PCR dans des lignées cellulaires exprimant uniquement Tax et dans les lignées cellulaires chroniquement infectées par HTLV-1, Lemasson et al. (1998) ont montré que l'expression d'E2F est stimulée par Tax.

Tax promeut le passage de la métaphase à l'anaphase lors de la mitose en interagissant directement avec et en activant prématurément le complexe APC (Anaphase Promoting

Complexe) et Cdc20 (Cell division control protein) (Liu et al., 2005). Ainsi, en interagissant avec APC/C, Tax favorise une sortie précoce de la mitose pour l'entrée en phase G1.

Cependant, une étude soulève l'hypothèse d'une régulation négative de la progression du cycle cellulaire par Tax probablement impliquée dans la latence virale. En effet, De la Fuente et al. (2000) ont montré que Tax active le promoteur du CKI p21^{Waf1/Cip1} dans les lignées cellulaires chroniquement infectées par HTLV-1 et également dans des cellules de patients ATL et HAM/TSP, favorisant ainsi l'inhibition du complexe Cycline A/CDK2 en phase S. Le complexe p21/Cycline A/CDK2 empêche la phosphorylation de Rb nécessaire à la libération de E2F pour la transition G1/S. Ainsi, Tax inhiberait la transition G1/S par ce mécanisme pour probablement favoriser la latence virale en modulant ses propres fonctions.

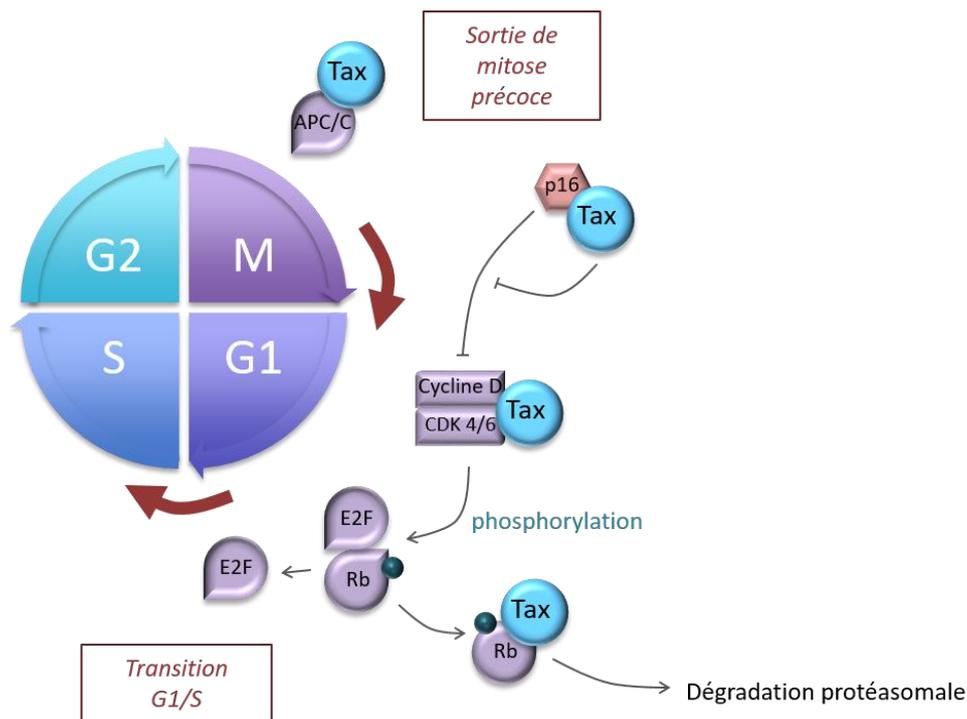


Figure 14. Tax accélère la progression du cycle cellulaire. Tax interagit avec de nombreux facteurs favorisant la progression du cycle cellulaire tels que les complexes Cycline/CDK et des complexes en aval des complexes Cycline/CDK tels que APC/C et E2F/pRb pour favoriser une sortie de mitose précoce et la transition G1/S. Tax interagit également avec des inhibiteurs de CDK pour favoriser l'entrée en phase G1.

c. Tax inhibe l'apoptose

L'apoptose est une forme de mort cellulaire programmée résultant en l'élimination efficace de cellules endommagées par exemple en cas de stress génotoxique trop important. Il existe deux voies de l'apoptose : la voie intrinsèque activée suite à un stress cellulaire, et la voie extrinsèque activée par des ligands extracellulaires se fixant sur des récepteurs de mort (pour revue, Elmore, 2007). L'inhibition de l'apoptose est souvent liée à une prolifération cellulaire anarchique permettant la progression du cancer (Pistritto et al., 2016; Plati et al., 2008).

De nombreuses études se sont intéressées à la régulation de l'apoptose dans le cadre d'HTLV-1 et notamment au rôle que pouvait jouer Tax dans l'inhibition de l'apoptose. Tax dérégule transcriptionnellement la machinerie cellulaire de l'apoptose intrinsèque et extrinsèque.

En effet, dans la voie de l'apoptose extrinsèque, Tax active l'expression des protéines anti-apoptotiques IAP (Inhibitors of Apoptosis Proteins), de Bcl-XL ou encore Bcl-3 (Mori et al., 2010; Saito et al., 2010; Waldele, 2006). A l'inverse, Tax réprime l'expression des protéines pro-apoptotiques Bax, Bim et Bid. Pour Bim et Bid, Tax réprime leur expression via une sur-expression du facteur de transcription HIF-1 connu pour réprimer l'expression de Bim et Bid (Brauweiler et al., 1997; Mühleisen et al., 2014).

De plus, la voie intrinsèque de l'apoptose fait intervenir le facteur de transcription p53. En cas de stress génotoxique tel que les dommages à l'ADN, ou une dérégulation du cycle cellulaire, p53 est activée (Vogelstein et al., 2000). De manière intéressante, les cellules chroniquement infectées par HTLV-1 présentent une inhibition de p53 (Mahieux et al., 2000). En effet, Tax exerce une répression transcriptionnelle de p53. De plus, des expériences analysant l'activité luciférase reflétant l'activité de p53 dans des lignées cellulaires déficientes pour l'expression de p65 (sous-unité du complexe NF- κ B) ont mis en évidence que l'activation de l'expression de gènes par la voie NF- κ B résultait en l'inhibition transcriptionnelle de p53 par Tax (Pise-Masison et al. 2000). Cependant, ces données sont controversées par une étude plus récente effectuée dans des souris transgéniques pour Tax, qui a montré que l'inhibition chimique de la voie NF- κ B ne restaurait pas l'expression de p53 et que par conséquent, l'inactivation transcriptionnelle de p53 par Tax ne serait pas dépendante de la voie NF- κ B (Ohsugi et al., 2013). De ces observations, les auteurs ont suggéré que l'inactivation de p53 par Tax indépendamment de l'activation de la voie NF- κ B serait la première étape dans la mise en place de l'oncogenèse dans un contexte ATL.

En dérégulant ces voies de signalisation, Tax promeut la survie cellulaire permettant la persistance des cellules infectées par HTLV-1. Tax promeut également la transformation cellulaire en induisant de l'instabilité génétique en ciblant notamment le centrosome, ce que nous détaillerons dans le chapitre 3 de l'introduction.

Cependant, HTLV-1 n'est pas le seul oncovirus à déréguler de nombreuses voies cellulaires favorisant la transformation cellulaire. En effet, les virus EBV et HPV-16 codent eux aussi pour des protéines favorisant la transformation cellulaire que nous allons détailler succinctement dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 2 : INTRODUCTION A L'ONCOGENESE MEDIEE PAR VIRUS ONCOGENES EBV et HPV

I. Le virus oncogène EBV

1. *Epidémiologie et pathologies associées*

Le virus EBV a été découvert en 1964 dans des cellules dérivées d'un lymphome de Burkitt (Burkitt, 1962; Epstein et al., 1964). Il appartient à la famille des *Herpesviridae*. Le réservoir du virus EBV est strictement humain. 90% des adultes présentent des anticorps dirigés contre EBV et hébergent le virus à l'état latent (Dowd et al., 2013). L'âge de la primo-infection varie selon des facteurs économiques et socio-culturels tels que la surpopulation et le manque d'hygiène sanitaire mais se déroule le plus souvent durant l'enfance entre 2 et 4 ans (Bouvard et al., 2009; Trottier et al., 2012). EBV est transmis au cours de l'enfance principalement par voie orale, généralement par la salive contenant des cellules épithéliales infectées, et dans une moindre mesure par transfusion sanguine, transplantation d'organes ou bien par transmission sexuelle (Papesch, 2001). Généralement, l'infection à EBV reste asymptomatique chez les sujets immunocompétents mais peut mener au développement de la mononucléose infectieuse si la primo-infection se fait à l'âge adulte, ou à la leucoplasie orale chevelue et à la maladie de Duncan chez les personnes immunodéprimées. Paradoxalement au fait qu'EBV infecte la majorité de la population, EBV est associé à plusieurs manifestations malignes. Historiquement, le pouvoir oncogène d'EBV a été associé au lymphome de Burkitt. Depuis, d'autres cancers associés à EBV ont été mis en évidence : carcinome indifférencié du nasopharynx, carcinome de l'estomac, lymphome classique de Hodgkin, lymphome T centro-facial, lymphome diffus à grandes cellules B, lymphome primaire du système nerveux central, lymphome primaire d'effusion, lymphome plasmablastique et désordres lymphoprolifératifs post-transplantation associés à EBV. Cependant, le lien de cause à effet entre EBV et ces cancers n'a pas été démontré.

2. La particule et le cycle viral d'EBV

La particule virale d'EBV présente une structure semblable à celle des autres herpèsvirus comportant une enveloppe dérivée de l'appareil de Golgi (Nanbo et al., 2018) et de glycoprotéines virales, un tégument constitué de phosphoprotéines entourant la nucléocapside et le nucléoïde constitué d'une structure appelée « core » entourant le génome d'EBV. Dans la particule virale, le génome d'EBV est composé d'un ADN double brin linéaire d'environ 172 kb (Figure 15).

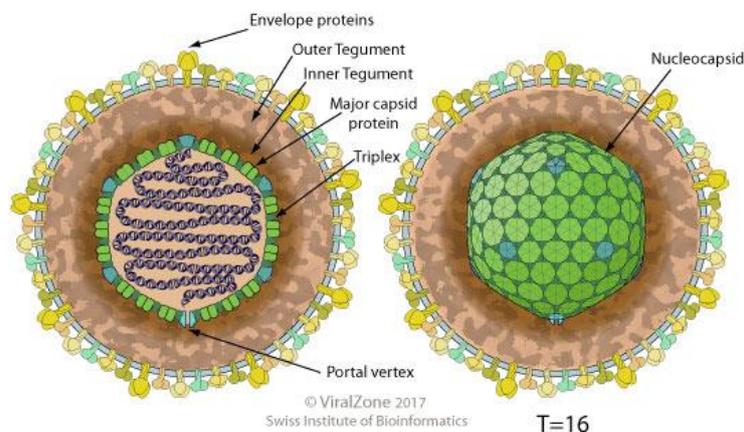


Figure 15. Particule virale d'EBV. Image tirée de ViralZone, Expasy.

Le cycle viral d'EBV présente deux grandes phases : la phase de latence et la phase lytique (dite aussi productive).

Durant la phase de latence, il n'y a pas de production de virions. Le génome viral persiste sous forme de multiples épisomes dans le noyau de la cellule hôte. Peu de gènes viraux sont exprimés durant la phase de latence : six protéines nucléaires virales (EBNA-1 et 2, EBNA-3A, B et C et EBNA-LP) et trois protéines membranaires latentes (LMP-1, LMP-2A et LMP-2B), environ 40 microARNs et 2 longs ARNs non-codants (Rowe, 1999; Santpere et al., 2014).

Durant la phase productive, les gènes lytiques sont divisés en trois catégories dont l'expression est séquentielle : gènes immédiats précoces, gènes précoces et gènes tardifs. Tout d'abord les gènes immédiats précoces codent pour deux facteurs de transcription qui permettent l'expression des gènes précoces. Ensuite, les gènes précoces permettent entre autres la

réplication de l'ADN viral. Après réplication, les gènes tardifs sont exprimés et codent pour des protéines de structure nécessaires à la formation des virions.

3. Oncogenèse liée à EBV

A ce jour, les mécanismes moléculaires sous-jacents de l'oncogenèse médiée par EBV restent encore assez mal compris. Il est généralement admis qu'EBV serait probablement un cofacteur associé à des facteurs environnementaux ou génétiques menant au développement d'un cancer. A titre d'exemple, il existe un rapport entre la distribution géographique du paludisme et du lymphome de Burkitt (Kafuko and Burkitt, 1970). De manière intéressante, une étude a établi un lien moléculaire entre le développement du paludisme et la réactivation du virus EBV. Chêne et al. (2007) ont montré que l'antigène CIDR1- α (cystein-rich inter-domain region 1 α) de *Plasmodium falciparum*, agent causal du paludisme, stimulait la production d'EBV dans des PBMCs de donneurs sains ou dérivés de patients atteints d'un lymphome de Burkitt, ce qui va en faveur de causes multifactorielles lors du développement d'un cancer associé à EBV. Cependant, la production de particules virales d'EBV n'est pas clairement associée au développement d'un cancer.

La transformation des lymphocytes B médiée par EBV *in vitro* est associée à l'expression des gènes de latence de la famille EBNA et des LMPs et à l'expression d'ARN non-codants (ncARNs) (Saha and Robertson, 2019). La combinaison des fonctions des protéines EBNA et LMPs et des ncARNs mène à la modulation de différentes voies cellulaires favorisant ainsi l'oncogenèse médiée par EBV (*Figure 16*).

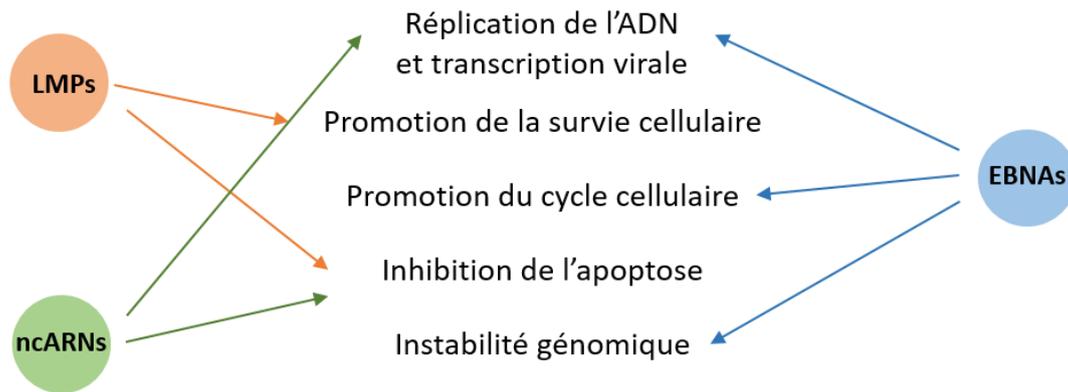


Figure 16. Les protéines virales des familles EBNA et LMP ainsi que les ARN non-codants coopèrent au cours de l'oncogénèse médiée par EBV.

Les protéines de la famille EBNA et les ncARNs favorisent la réplication de l'ADN et la transcription virale pour la persistance du virus dans les cellules infectées et les protéines LMPs et les ncARNs inhibent l'apoptose pour favoriser la survie cellulaire. A titre d'exemple, de manière similaire à Tax qui induit l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-XL ou Bcl-3, LMP-1 induit l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 pour inhiber l'apoptose (Henderson et al., 1991).

La survie cellulaire est également promue par les protéines LMPs qui, tout comme Tax, activent les voies NF- κ B et Akt. A titre d'exemple, LMP-1 n'active pas la voie NF- κ B en se liant et en activant le complexe IKK comme Tax peut le faire, mais en induisant une hyperphosphorylation de l'inhibiteur I κ B α . Cette hyperphosphorylation corrèle avec sa dégradation et l'activation de la voie NF- κ B en présence de LMP-1 (Herrero et al., 1995).

De plus, les protéines EBNA5 favorisent la progression du cycle cellulaire. De manière similaire à Tax qui réprime l'expression des inhibiteurs de CDK p18^{Ink4c}, p19^{Ink4d} et p27^{Kip1}, EBNA-3A réprime l'expression de l'inhibiteur de CDK p21^{Waf1/Cip1} pour favoriser la transition G2/M (Tursiella et al., 2014). De même, EBNA-3C augmente l'activité kinase du complexe Cycline D1/CDK6 menant ainsi à la dégradation protéasomale de pRb pour faciliter la transition G1/S (Saha et al., 2011).

Enfin, comme cela sera détaillé dans le chapitre suivant, les protéines de la famille EBNA favorisent l'instabilité génomique caractéristique de l'oncogénèse virale.

Ainsi, en modulant l'expression de facteurs cellulaires différents de ceux ciblés par Tax mais impliqués dans les mêmes voies de signalisation, les protéines virales EBNAs et LMPs agissent de manière similaire à Tax pour médier l'oncogenèse.

II. Le virus oncogène HPV

1. *Epidémiologie et pathologies associées*

Les papillomavirus humains (HPV) ont été caractérisés pour leur aptitude à induire des cancers cervicaux. L'infection à HPV est très commune mais la plupart des personnes infectées l'élimine avant de développer des symptômes cliniques. Environ 40 HPV ont été décrits pour infecter le tractus génital et ont été classifiés selon leur degré d'association au développement d'un cancer cervical lors d'une infection. A ce jour, on dénombre 15 HPV à haut-risque, 3 HPV à haut-risque probable, 12 HPV à faible-risque et 3 HPV au risque indéterminé. La prévalence des HPV à haut-risque est d'environ 28% chez les femmes de 25 ans (Kulasingam et al., 2002). Parmi les HPV à haut-risque, les HPV-16 et HPV-18 ont été caractérisés comme les papillomavirus les plus oncogéniques détectés respectivement dans approximativement 50% et 20% dans cancers cervicaux dans le monde (De Martel et al., 2012, 2012). En menant une étude sur une cohorte de femmes sexuellement actives, Woodman et al. (2001) ont montré qu'HPV-16 est le papillomavirus le plus fréquemment retrouvé dans les cancers cervicaux.

2. *La particule et le cycle viral d'HPV*

HPV est un virus non enveloppé composé d'une capsidie icosaédrique constituée des protéines virales L1 et L2 entourant le génome (*Figure 17*). Le génome d'HPV se présente sous forme d'un ADN double brin circulaire d'environ 8kb enroulé autour d'histones cellulaires.

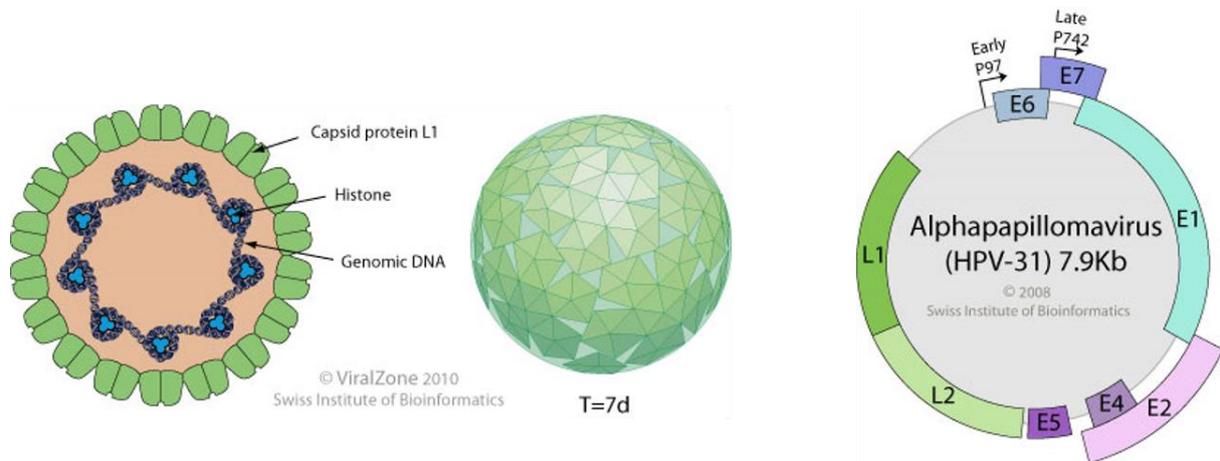


Figure 17. Particule et génome viral de HPV-16. Images tirées de ViralZone Expaty.

Le génome s'articule en huit ORF réparties en trois catégories : la « région précoce » codant pour les protéines régulatrices E1 à E7 impliquées dans la réplication et la maintenance du génome viral, la « région tardive » codant pour les protéines structurales L1 et L2 de la capside et une région non-codante appelée LCR (Long Control Region) contenant les éléments nécessaires à la réplication et la transcription de l'ADN viral.

De manière similaire à HTLV-1 et à EBV, HPV-16 code pour deux protéines oncogènes ciblant des mécanismes cellulaires communs à Tax permettant une transformation efficace des cellules infectées : E6 et E7 (Figure 18).

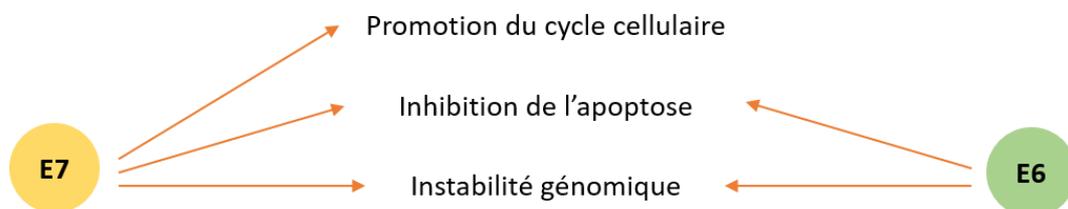


Figure 18. Les protéines virales E6 et E7 coopèrent au cours de l'oncogenèse médiée par HPV-16.

De la même manière que Tax, E7 promeut la prolifération cellulaire en formant notamment un complexe avec le facteur cellulaire pRb. En interagissant avec pRb, E7 induit la dégradation protéasomale de pRb et lève ainsi l'inhibition d'E2F qui peut alors activer la transcription de

gènes tels que celui de la cycline A pour la transition G1/S (Boyer et al., 1996). De même que pour Tax, E7 maintient l'activité de CDK2 en se liant et en inhibant l'activité de l'inhibiteur de CDK p27. De plus, de la même manière que Tax interagit avec des CDK pour favoriser la progression du cycle cellulaire, E7 s'associe directement aux complexes Cycline A/CDK2 et Cycline E/CDK2 favorisant ainsi l'entrée en phases G1 et S, respectivement (Zerfass-Thome et al. 1996; Nguyen et Münger 2008).

E6 et E7 agissent de concert pour inhiber l'apoptose. A titre d'exemple, E6 interagit avec et inhibe les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak (Vogt et al. 2006; Thomas et Banks 1998; Thomas et Banks 1999). De plus, comme Tax peut le faire, E6 et E7 agissent en synergie et induisent l'expression de la protéine anti-apoptotique cIAP2 (Yuan et al., 2005).

Enfin, comme cela sera détaillé dans le chapitre suivant, E6 et E7 coopèrent pour induire l'instabilité génomique lors de l'oncogenèse virale médiée par HPV-16.

De la même manière que pour EBV, les protéines E6 et E7 modulent l'expression ou interagissent avec des facteurs cellulaires identiques ou différents de ceux ciblés par Tax ou par les protéines oncogènes d'EBV pour modifier leurs fonctions aboutissant à l'induction ou à l'inhibition d'un processus cellulaire pour médier l'oncogenèse.

Ainsi, les virus oncogènes HTLV-1, EBV et HPV-16 agissent de la même manière sur l'altération de voies de signalisation cellulaire en ciblant différents facteurs impliqués dans ces voies.

Comme nous avons pu le mentionner, ces trois virus induisent de l'instabilité génétique favorisant la transformation cellulaire. La mise en place de l'instabilité génétique est notamment gouvernée par le centrosome, dont la structure et les fonctions liées au maintien de l'intégrité génétique sont ciblées et dérégulées par les virus oncogènes.

CHAPITRE 3 : ONCOGENESE VIRALE ET INSTABILITE GENOMIQUE : LA CONNEXION CENTR(OSOM)ALE

Ce chapitre est traité dans la revue « Oncogénèse virale et instabilité génomique : la connexion centr(osom)ale » (Elodie Teruel, Henri Gruffat, Massimo Tommasino, Chloé Journo) publiée dans la revue scientifique Virologie (Juillet 2019) : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=10.1684%2Fvir.2019.0793> ; DOI [10.1684/vir.2019.0793](https://doi.org/10.1684/vir.2019.0793).

Oncogenèse virale et instabilité génomique : la connexion centr(osome)ale

Elodie Teruel^{1,2}, Henri Gruffat³, Massimo Tommasino⁴, Chloé Journo^{1,2}

¹ Centre International de Recherche en Infectiologie, Équipe Oncogenèse rétrovirale, INSERM U1111 – Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon, Lyon, France.

² Équipe labellisée “Fondation pour la Recherche Médicale”.

³ Centre International de Recherche en Infectiologie, Équipe Herpèsvirus oncogènes, INSERM U1111 – Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon, Lyon, France.

⁴ Centre International de Recherche sur le Cancer, Groupe Biologie des infections et cancer, Lyon, France.

Correspondance : Chloé Journo

46, allée d’Italie, 69007 Lyon, France

Téléphone : 00 33 4 72 72 87 93 – E-mail : chloe.journo@ens-lyon.fr

Résumé

A l'heure actuelle, plus de 10% des cancers humains sont associés à une infection virale. L'étude des virus oncogènes a permis le développement de stratégies d'intervention clinique efficaces ainsi que l'élucidation fondamentale de processus altérés au cours de la transformation cellulaire. Cette dernière correspond à l'acquisition de caractéristiques cellulaires spécifiques incluant l'instabilité génomique, définie comme une fréquence élevée de mutations et de gains ou de pertes de chromosomes. Le centrosome est un organite qui gouverne la ségrégation des chromosomes au cours de la mitose et qui constitue une plateforme de signalisation en aval de la détection des dommages à l'ADN. Dans cette revue, nous proposons une synthèse de la littérature démontrant le rôle du centrosome dans la perte de l'intégrité génomique induite par les virus oncogènes. Nous illustrons les mécanismes par lesquels les virus oncogènes interfèrent avec le cycle de duplication du centrosome et induisent son amplification, en nous attachant à dégager les mécanismes communs à diverses familles virales. Nous discutons également de la façon dont une altération par les virus oncogènes des fonctions de signalisation du centrosome pourrait contribuer à l'instabilité génomique des cellules infectées, tout en soulignant les lacunes bibliographiques qui pourraient être comblées par les recherches à venir.

Mots clés : virus oncogène, amplification du centrosome, cycle cellulaire, dommages à l'ADN, aneuploïdie.

Introduction

En 1911, l'identification du virus du sarcome de Rous, le premier virus animal oncogène, a apporté le premier argument en faveur de l'implication d'agents infectieux dans le développement du cancer. Cette découverte a ouvert la voie à l'établissement du lien entre plusieurs infections virales et le développement du cancer chez l'homme. Ainsi, il y a plus de 50 ans, le virus d'Epstein Barr (EBV) a été identifié comme le premier virus oncogène chez l'homme, à partir d'une lignée cellulaire dérivée d'un lymphome de Burkitt [1]. Il est désormais bien établi qu'environ 12% des cancers humains sont causés par des virus oncogènes [2,3]. Sept virus oncogènes humains ont été identifiés à ce jour. Parmi les virus oncogènes à ADN, EBV (également connu sous le nom d'Herpèsvirus de type 4, HHV-4) est associé à des cancers hématologiques de type B et à des cancers épithéliaux. L'Herpèsvirus associé au sarcome de Kaposi (KSHV, également connu sous le nom d'Herpèsvirus de type 8, HHV-8) appartient également à la famille des *Herpesviridae* et a été identifié dans des sarcomes de Kaposi associés au syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) [2]. Le virus de l'hépatite B (HBV), l'un des agents étiologiques du carcinome hépatocellulaire, appartient à la famille des *Hepadnaviridae*. Environ 12 génotypes de papillomavirus humains (HPV, famille des *Papillomaviridae*) avec un tropisme pour les muqueuses épithéliales des tractus génitaux et respiratoires, appelés HPV à tropisme muqueux à haut risque cancérigène (HPV HR), ont été clairement associés à des cancers anogénitaux et à certains cancers oropharyngés. En particulier, HPV-16 et HPV-18 sont les sous-types les plus oncogènes : ils sont détectés dans près de 50% et 20% des cancers cervicaux à travers le monde, respectivement [2,3]. Le polyomavirus de Merkel (MCPyV) appartient à la famille des *Polyomaviridae* et est à ce jour le seul polyomavirus oncogène décrit chez l'homme [4].

D'autres virus oncogènes humains appartiennent à des familles de virus à ARN. C'est le cas du virus de l'hépatite C (HCV), identifié dans les années 1980 par l'analyse génétique d'échantillons issus de patients ayant développé, à la suite d'une transfusion sanguine, une hépatite virale non-A, non-B [5]. HCV appartient à la famille des *Flaviviridae* et est associé au développement de carcinomes

hépatocellulaires. Le virus humain de la leucémie T (HTLV-1) appartient à la famille des *Retroviridae* et est l'agent étiologique de la leucémie ou du lymphome T de l'adulte (ATL) [6].

Depuis la moitié du XXe siècle, les virologistes travaillant sur les virus oncogènes ont postulé que l'étude des interactions entre les virus oncogènes et les cellules infectées pourrait permettre de mieux comprendre le processus général de transformation cellulaire (pour revue, voir [7]). Les cellules cancéreuses présentent des caractéristiques spécifiques, telles qu'une progression aberrante du cycle cellulaire, une prolifération anarchique, une activation de la télomérase, une inhibition de l'apoptose, une reprogrammation métabolique et une instabilité génomique. Le centrosome, un organelle subcellulaire souvent défini comme de centre organisateur des microtubules (MTOC) dans les cellules de mammifères, permet l'assemblage du fuseau mitotique au cours de la division cellulaire, et les défauts du centrosome sont intimement liés à la promotion de l'instabilité génomique (pour une revue détaillée des fonctions du centrosome, voir [8]). L'induction de l'instabilité génomique par les virus oncogènes a été décrite en détail dans plusieurs revues (voir par exemple [9]). Ici, nous analyserons plus particulièrement le rôle du centrosome dans la perte d'intégrité génomique induite par les virus oncogènes. Nous nous intéresserons notamment à l'interférence exercée par les virus sur le cycle de duplication du centrosome et, par conséquent, sur la ségrégation des chromosomes au cours de la division cellulaire. Au cours des dix dernières années, le centrosome est également apparu comme un centre intégrateur de signaux activés en réponse à la détection de dommages à l'ADN. Nous discuterons donc également des mécanismes par lesquels les virus oncogènes pourraient altérer les fonctions du centrosome dans le contexte de la réponse aux dommages à l'ADN.

Une brève introduction à la structure et à la dynamique du centrosome

Le centrosome est composé de deux centrioles orthogonaux, de 500 nm de longueur et 250 nm de largeur, appelés respectivement centrioles père et fils. Ces centrioles sont entourés d'une matrice de protéines appelée matériel péricentriolaire (PCM, Figure 1). A l'extrémité proximale, un centriole

présente 9 triplets de microtubules organisés en cylindre. Le centriole père est une structure mature comportant des appendices distaux et sub-distaux, impliqués dans l'ancrage des microtubules, tandis que le centriole fils est une structure immature, sans appendice. La fonction de MTOC assurée par le centrosome repose sur la capacité du PCM d'initier la nucléation des microtubules sur des structures cylindriques appelées γ -TuRC (γ -tubulin ring complexes). Jusque récemment, le PCM était considéré comme une matrice protéique amorphe, mais de récentes études exploitant des techniques de microscopie super-résolutive telle que la 3D-SIM (3D-structured illumination microscopy) ont montré que le PCM est en fait une matrice organisée de protéines en interaction dynamique [10–12].

Avec les chromosomes, le centrosome est la seule structure cellulaire à être dupliquée et ségrégée de façon précise au cours du cycle cellulaire. Comme la réplication de l'ADN, la duplication du centrosome est un processus semi-conservatif qui se déroule une fois par cycle cellulaire et dont la régulation est étroitement liée à la progression du cycle cellulaire. Ainsi, une cellule qui entre en mitose présente deux centrosomes distincts, qui migrent aux pôles de la cellule et induisent la formation d'un fuseau mitotique bipolaire. Lors de la mitose, les deux centrosomes sont ségrégés de façon équitable et chaque cellule fille comporte alors un seul centrosome (Figure 2).

Le processus de duplication du centrosome est initié par la dissociation des centrioles père et fils, qui perdent leur orientation orthogonale. Cette étape appelée « désengagement des centrioles » est nécessaire à la nucléation de nouveaux pro-centrioles. L'étape de désengagement des centrioles est ainsi considérée comme un point de contrôle autorisant la duplication suivante. Le mécanisme est initié en fin de phase M / début de phase G1 par deux protéines régulatrices importantes du cycle cellulaire, la kinase mitotique PLK1 et la protéase séparase, qui contrôlent également le désassemblage du PCM mitotique (Figure 2, étape 1).

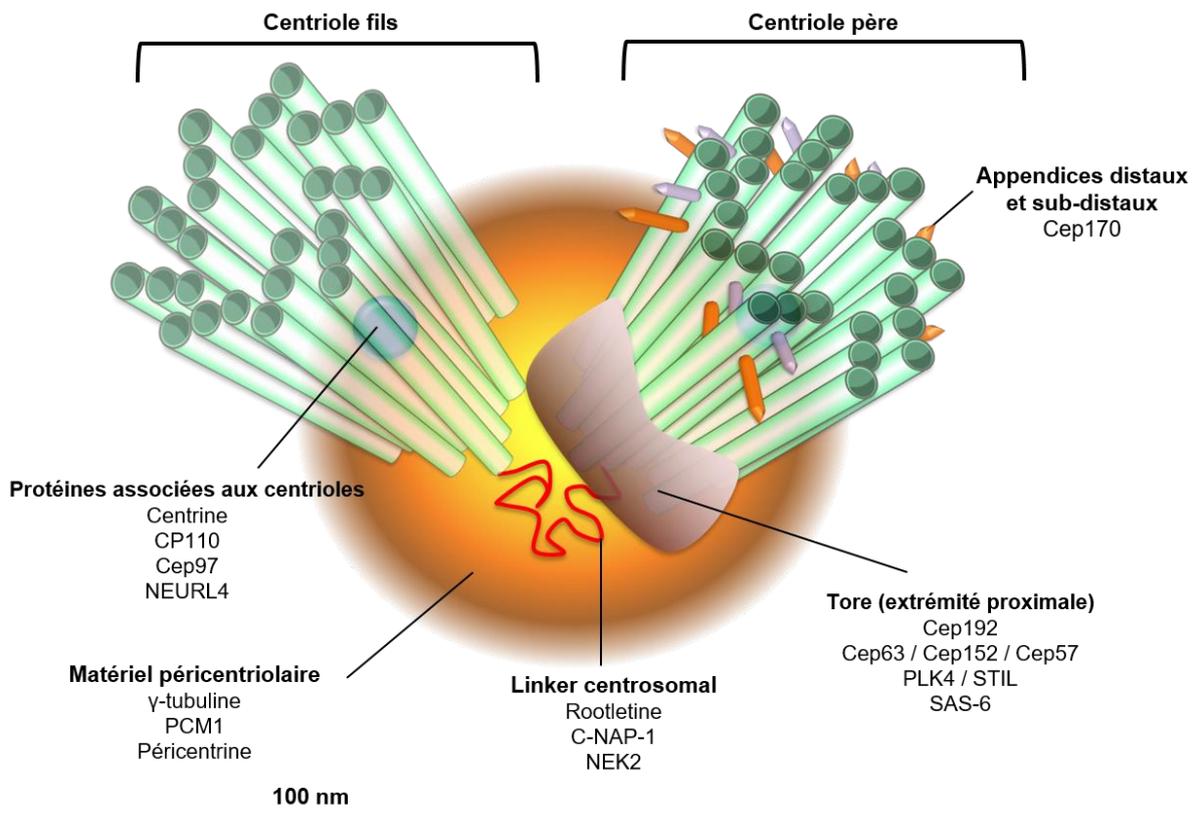


Figure 1. La structure du centrosome. Le centrosome est composé de deux centrioles orthogonaux (en vert), chacun composé de neuf triplets de microtubules. Contrairement au centriole fils (ici à gauche), le centriole père (à droite) présente des appendices à son extrémité distale qui sont impliqués dans l'ancrage des microtubules (non représentés). Les deux centrioles sont liés par un linker centrosomal (en rouge) composé de rootletine et de C-NAP-1 et régulé par NEK2, et sont entourés d'une matrice protéique bien organisée appelée matériel péri-centriolaire (gradient du jaune au marron). La nucléation des pro-centrioles repose sur l'assemblage séquentiel de Cep192, Cep63, Cep152, Cep57, PLK4, STIL et SAS-6 à l'extrémité proximale du centriole père (tore, en rouge sombre). Certaines protéines associées aux centrioles sont représentées sous forme de sphères bleues. Pour des raisons de clarté, les satellites centriolaires ont été omis.

La séparation des centrioles est également sous le contrôle de la kinase de phase G1/S CDK2, activée par les Cyclines A et E. Dans ce processus, la nucléophosmine (NPM1) a été identifiée comme un substrat de CDK2 [13], qui en retour active ROCK II, un effecteur de la petite GTPase Rho, et promeut ainsi la séparation des centrioles [14].

Après leur désengagement, les centrioles restent connectés pendant l'interphase par leur extrémité proximale, *via* un linker centrosomal composé de rootletine et de C-NAP-1. Chacun des centrioles ainsi désengagé nucléé alors un nouveau procentriole (Figure 2, étape 2). Les procentrioles sont orientés de façon orthogonale à leur centriole père et sont allongés pendant les phases S et G2, jusqu'à ce leur taille atteigne celle des centrioles pères (Figure 2, étape 3). Le contrôle de la duplication unique du centrosome à chaque cycle cellulaire implique une régulation précise des différents acteurs qui agissent séquentiellement à l'extrémité proximale des centrioles pères pour promouvoir la nucléation des procentrioles, comme Cep192, Cep63, Cep152, Cep57, PLK4, STIL et SAS-6 (représentés sous forme de tore sur la Figure 1, voir [15] pour une revue récente). Il est intéressant de noter que les niveaux d'expression de ces protéines régulatrices, et en particulier ceux de PLK4, STIL et SAS-6, sont étroitement contrôlés par le système ubiquitine / protéasome. Par exemple, le facteur SAS-6 est un substrat du complexe E3 ubiquitine ligase SCF^{FBXW5}. L'activité de SCF^{FBXW5} est inhibée par PLK4, ce qui résulte en la stabilisation de SAS-6 et à l'induction de la nucléation de procentrioles. Une fois les procentrioles nucléés, l'ubiquitination de PLK4 par le complexe E3 ubiquitine ligase SCF^{β-TrCP}, suivie par la dégradation de PLK4, lève l'inhibition de l'activité de SCF^{FBXW5} et déclenche la dégradation de SAS-6, limitant ainsi la sur-duplication des centrioles. Ces régulateurs centraux coopèrent avec une série de protéines pour assurer le cycle de duplication du centrosome et la formation de MTOC fonctionnels.

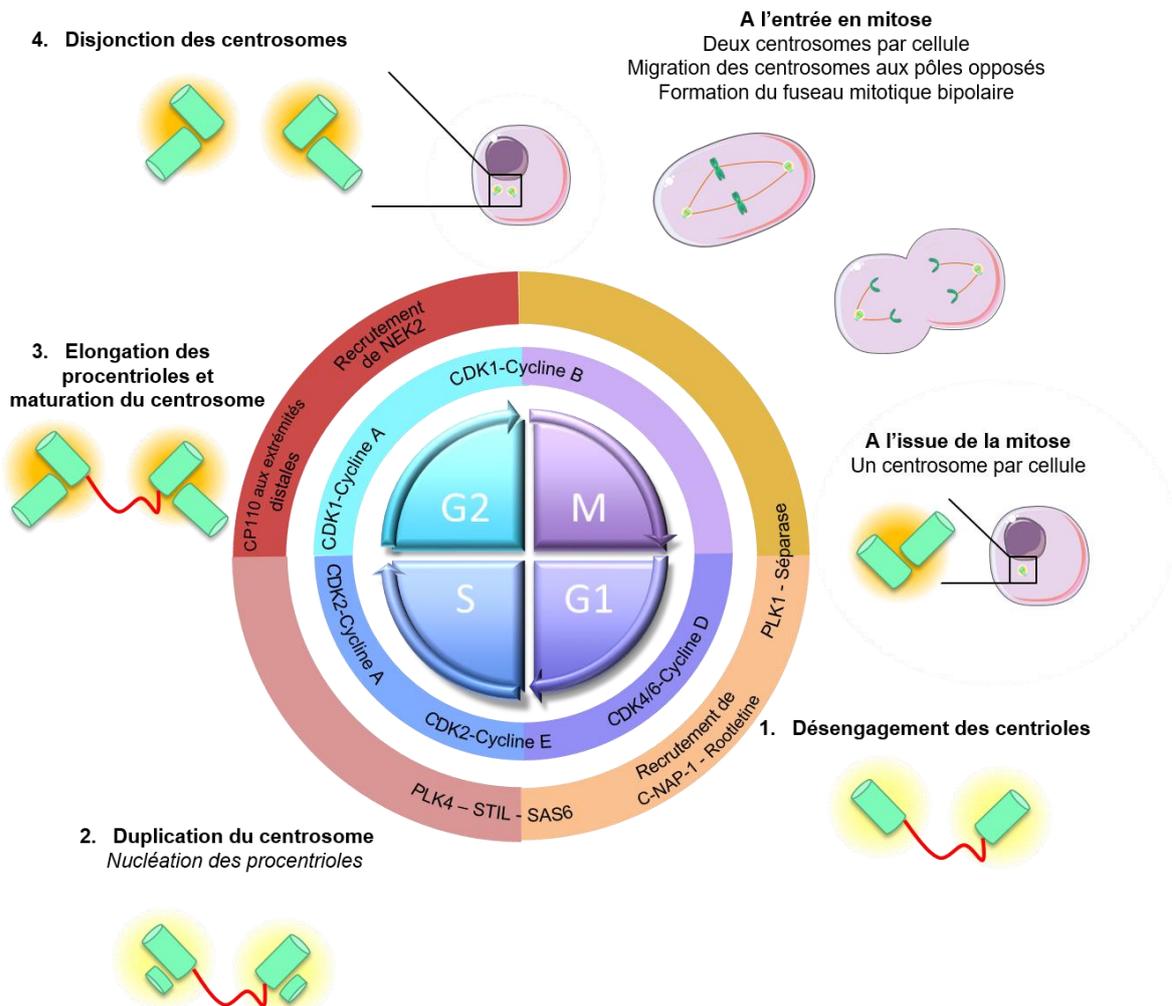


Figure 2. Le cycle de duplication du centrosome. A l'issue de la mitose, chaque cellule fille comporte un centrosome. La duplication du centrosome débute en fin de phase M / début de phase G1 par le désengagement physique des deux centrioles (étape 1), qui restent liés par le linker (en rouge). Tandis que la réplication de l'ADN se déroule au cours de la phase S, la duplication du centrosome à proprement parler commence avec la nucléation d'un procentriole à l'extrémité proximale de chaque centriole père (étape 2). L'élongation des centrioles se déroule en phase G2, tandis que la maturation des centrosomes (représentée par la coloration jaune à orange) commence en G2 et se poursuit en phase M (étape 3). En fin de phase G2, les centrosomes dupliqués subissent une disjonction (étape 4) et migrent aux pôles opposés de la cellule pour former le fuseau mitotique bipolaire en phase M (fond violet). Les principaux régulateurs moléculaires du cycle de duplication du centrosome (cercle externe) ainsi que les complexes CDK/Cycline actifs au cours de la progression du cycle cellulaire (cercle interne) sont précisés.

Par exemple, CP110, une protéine centrosomale localisée aux extrémités distales des centrioles (Figure 1), est nécessaire à l'élongation des centrioles (pour revue, voir [16]), et promeut la formation de MTOC ectopiques lorsqu'elle est sur-exprimée, ce qui peut mener à la mise en place de fuseaux mitotiques aberrants. Dans les cellules normales, l'activité de CP110 est contre-balançée par l'E3 ubiquitine ligase NEURL4 qui ubiquitine CP110 et induit ainsi sa dégradation par le protéasome [17].

Lors de la progression du cycle cellulaire vers la phase M, les centrosomes dupliqués recrutent des constituants du PCM dont le volume augmente alors considérablement. Ce processus est appelé « maturation des centrosomes » (Figure 2, étape 3) Ce PCM mitotique permettra ensuite la formation du fuseau mitotique en phase M. En fin de phase G2, la kinase NEK2 (NIMA-related kinase) promeut la disjonction des centrosomes en phosphorylant la rootletine et C-NAP-1 qui se dissocient alors des centrosomes (Figure 2, étape 4). Suite à leur disjonction, les deux centrosomes se séparent à la transition G2/M et participent à la formation du fuseau mitotique bipolaire.

Un développement récent dans la compréhension de la structure et de la dynamique du centrosome a été permis par la description détaillée des satellites centriolaires, définis comme des structures non-membranaires, denses aux électrons, de 70 à 100 nm de diamètre, localisées à proximité du centrosome (pour une revue récente, voir [18]). Le constituant principal des satellites, et le premier à avoir été décrit, est la protéine PCM1 (pericentriolar material 1), qui fonctionnerait comme un échafaudage moléculaire de ces structures. Cependant, plus d'une centaine de protéines ont maintenant été identifiées comme des protéines satellitaires. Expérimentalement, il est possible d'induire une perte de l'intégrité des satellites, comme par exemple leur disparition, leur dispersion, leur réduction ou leur accumulation, et de tels défauts ont également été associés à des situations pathologiques.

De façon intéressante, les satellites centriolaires sont impliqués dans le stockage transitoire de constituants du centrosome comme Cep63 et Cep152, et dans leur transport vers le centrosome au cours de la duplication, indiquant que les satellites centriolaires seraient des régulateurs actifs du cycle de duplication du centrosome.

L'amplification des centrosomes : un pas vers l'instabilité génomique

L'instabilité chromosomique, définie comme le gain ou la perte de chromosomes ou de fragments de chromosomes, conduit à l'aneuploïdie. Elle constitue un aspect important de l'instabilité génomique : la plupart des tumeurs solides et plus de 75% des cancers hématologiques sont aneuploïdes [19]. Il y a plus d'un siècle, Théodore Boveri a proposé l'hypothèse selon laquelle l'aneuploïdie pourrait être la conséquence de l'amplification des centrosomes [20], hypothèse qui a été validée depuis (pour une revue, voir [21]). De façon remarquable, une étude récente de Levine *et al.* a montré que l'amplification des centrosomes était suffisante pour induire l'initiation de la tumorigenèse dans un modèle murin transgénique, indépendamment de toute autre altération génétique supplémentaire [22]. Ces observations ont permis de démontrer que l'amplification des centrosomes pouvait être un moteur de la tumorigenèse chez la souris par la promotion de l'instabilité chromosomique. Une cellule qui possède plus de deux centrosomes au début de la mitose peut former un fuseau mitotique multipolaire qui conduit à la mauvaise ségrégation des chromosomes et à la production de cellules filles hautement aneuploïdes et non viables, par un processus appelé « catastrophe mitotique » (Figure 3, à gauche). Cependant, le regroupement des centrosomes surnuméraires (appelé en anglais « centrosome clustering ») peut autoriser la formation d'un fuseau dit pseudo-bipolaire, ce qui induit un taux modéré de figures mitotiques anormales, sous la forme de ponts anaphasiques ou de chromosomes retardataires (Figure 3, à droite), aboutissant à la formation de micro-noyaux dans les cellules filles. On considère que ces niveaux modérés d'instabilité chromosomique sont compatibles avec l'émergence de clones cellulaires transformés, ce qui ferait du regroupement des centrosomes

une stratégie adaptative permettant aux cellules comportant des centrosomes surnuméraires de progresser sur la voie de la transformation cellulaire (pour des revues, voir [23,24]).

Dans les cellules cancéreuses, l'amplification des centrosomes est généralement liée à la dérégulation du cycle de duplication du centrosome. Ainsi, la sur-expression de PLK4 induit une sur-duplication aberrante des centrioles dans les embryons de *Drosophila* [25]. Ceci a été confirmé *in vivo* dans des modèles murins (voir par exemple [22,26]), ainsi que dans des cellules humaines, dans lesquelles PLK4 coopère avec CDK2 et SAS-6 pour la sur-duplication des centrioles [27]. En outre, l'amplification des centrosomes peut être une conséquence du désengagement prématuré des centrioles. Par exemple, des expériences d'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M ont montré un taux élevé de désengagement des centrioles et de fragmentation des centrosomes, par un processus dépendant d'APC/C et de la séparase [28]. L'amplification des centrosomes peut également être une conséquence indirecte de défauts du cycle cellulaire comme l'échec de la cytokinèse [29], qui aboutit à des cellules polyploïdes possédant des centrosomes surnuméraires.

Il est intéressant de noter que le suppresseur de tumeur p53 limite la sur-duplication du centrosome [30,31], mais bloque également la prolifération et/ou induit l'apoptose des cellules polyploïdes ainsi que des cellules comportant des centrosomes surnuméraires [22,29,32,33], par un mécanisme dépendant du PIDosome et de la caspase-2 [34].

La perte de la fonction de p53, qui est une caractéristique commune des cellules cancéreuses, peut ainsi favoriser l'apparition et le maintien de centrosomes surnuméraires, et peut entrer en synergie avec une amplification des centrosomes (induite par exemple par la sur-expression de PLK4) pour induire la tumorigenèse [35,36]. De fait, bien que Levine *et al.* n'ont pas montré d'altération génétique de p53 au cours de la tumorigenèse induite par l'amplification des centrosomes, ils ont observé une diminution de l'expression des gènes cibles de p53, indiquant que l'altération de la voie p53 pouvait être nécessaire à la tumorigenèse induite par l'amplification des centrosomes [22].

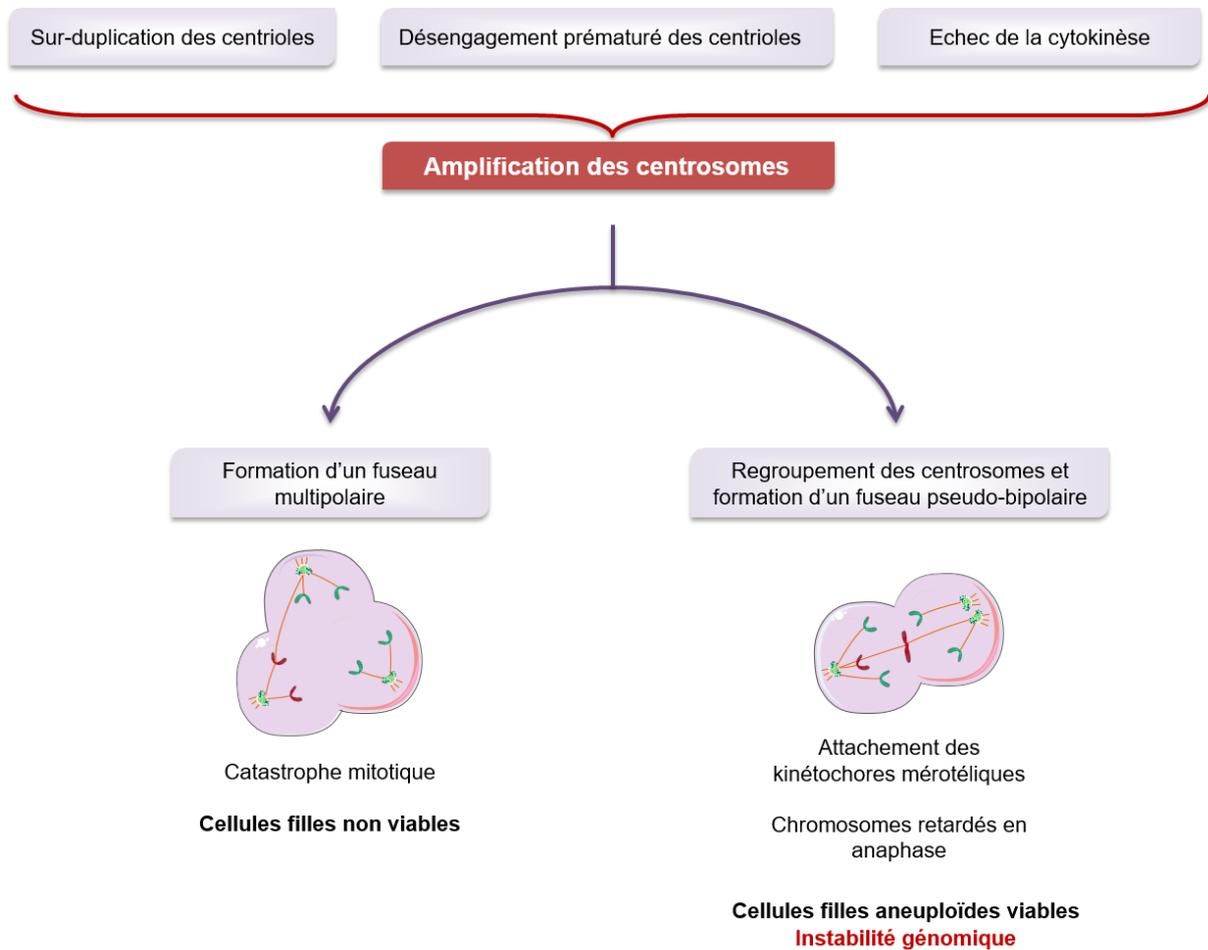


Figure 3. De l'amplification des centrosomes à l'instabilité génomique. L'amplification des centrosomes peut résulter de la sur-duplication des centrioles, du désengagement prématuré des centrioles, ou de l'échec de la cytokinèse. L'amplification des centrosomes peut conduire à des divisions multipolaires et à des catastrophes mitotiques. Le regroupement des centrosomes permet la formation de divisions pseudo-bipolaires responsables de l'induction de taux modérés d'aneuploïdie compatibles avec la viabilité cellulaire.

Les virus oncogènes et l'amplification des centrosomes

Action directe de protéines virales sur la duplication du centrosome

L'amplification des centrosomes a été associée à l'infection par plusieurs virus oncogènes. Certains virus induisent l'amplification des centrosomes en dérégulant directement la fonction de protéines impliquées dans le cycle de duplication du centrosome. Par exemple, l'expression de l'oncoprotéine E7 des HPV HR induit l'amplification des centrosomes. Une première étude a mis en évidence une amplification des centrosomes au sein de lésions cervicales pré-invasives et invasives associées à HPV, et a démontré que la protéine E7 d'HPV-16 stimule la sur-duplication des centrioles dans des kératinocytes humains normaux [37]. Une seconde analyse de lésions cervicales pré-invasives et invasives a confirmé ces données et a montré que la fréquence des cellules présentant des centrosomes surnuméraires augmentait avec la sévérité des lésions associées à HPV [38]. Les études mécanistiques ont ensuite démontré que E7 induit la sur-duplication des centrioles en activant la transcription des gènes codant la Cycline A et PLK4, et en favorisant l'activation aberrante de PLK4 par le complexe CDK2/Cycline E (Figure 4) [39–43]. On observe alors le recrutement d'un nombre aberrant de points de PLK4 au niveau des centrioles pères, ce qui autorise la nucléation de multiples procentrioles [43]. De façon remarquable, un phénotype similaire de sur-duplication des centrioles est observé lors de l'expression de l'antigène sT (small T) de MCPyV (Figure 4), qui est suffisant pour l'induction de centrosomes surnuméraires dans les cellules de la lignée NIH3T3 et dans les fibroblastes humains, et pour l'induction de l'aneuploïdie dans des souris transgéniques [44]. Cette propriété de sT repose sur l'inhibition de complexes E3 ubiquitine ligases tels que SCF^{FBXW7} et SCF^{β-TrCP} [44]. Ces E3 ligase ciblent plusieurs régulateurs clé de la duplication des centrosomes, dont la Cycline E et PLK4, vers la dégradation par le protéasome. Ainsi, HPV et MCPyV partagent la capacité d'induire la sur-duplication des centrioles en activant de façon aberrante PLK4, bien qu'ils exploitent pour ce faire des mécanismes moléculaires distincts.

Les HPV HR semblent également interférer avec le cycle de duplication du centrosome *via* le complexe HUN (HERC2, UBE3A et NEURL4) [45]. En effet, l'ubiquitine ligase UBE3A, aussi connue sous le nom de E6AP (E6-associated protein), a été identifiée initialement comme une cible des protéines E6 des HPV HR exploitée par ces virus pour induire l'ubiquitination et la dégradation de p53. L'analyse du réseau d'interaction d'UBE3A a mis en évidence plusieurs protéines centrosomales telles que CEP97, CEP170 et NEURL4 elle-même [45]. Le fait qu'HPV puisse détourner le complexe HUN pour induire l'amplification des centrosomes a été suggéré, mais cela doit encore être établi de façon claire. La protéine E6 des HPV HR pourrait en effet induire la dégradation de NEURL4 par l'intermédiaire d'UBE3A, ce qui résulterait en la stabilisation de CP110 et en la possible formation de MTOC ectopiques. Par ailleurs, E7 d'HPV-16 est physiquement associée aux centrosomes et y altère le recrutement du PCM [46], suggérant que E7 pourrait également altérer directement la structure du centrosome.

L'amplification des centrosomes par interférence directe avec le cycle de duplication est aussi une caractéristique de l'oncogenèse induite par HTLV-1 (pour une revue, voir [47]). En effet, l'expression de la protéine Tax d'HTLV-1 induit l'amplification des centrosomes [48]. Des altérations de la morphologie des centrosomes, telles qu'un aspect fragmenté de la protéine péricentrique, un constituant du PCM, sont également souvent observées dans les cellules exprimant Tax [49]. Tax active de façon constitutive CDK2 (Figure 4), suggérant que de façon similaire à E7, une activité de CDK2 dérégulée par Tax pourrait contribuer à la sur-duplication du centrosome dans les cellules infectées par HTLV-1. En outre, Tax cible la protéine centrosomale TAX1BP2, une isoforme d'épissage de la rootletine [50]. Ceci indique que Tax pourrait altérer les fonctions de TAX1BP2/rootletine pour contourner les contrôles cellulaires de la duplication du centrosome (Figure 4).

Action indirecte de protéines virales sur la signalisation en amont de la duplication du centrosome

HBV code deux oncoprotéines virales, HBx et l'antigène de surface LHBS. Ce dernier est souvent muté dans la région pré-S2 chez les patients atteints de carcinome hépatocellulaire. Deux études indépendantes ont montré que l'expression d'HBx *in vitro* résulte en une fréquence accrue de cellules présentant un nombre anormal de centrosomes, en corrélation avec la formation de fuseaux mitotiques aberrants et la mauvaise ségrégation des chromosomes, ce qui aboutit à l'augmentation du taux de cellules aneuploïdes [51,52]. Les cellules exprimant HBx présentent un cycle de duplication du centrosome dérégulé du fait de l'activation par HBx de la voie Ras-MEK-ERK qui contrôle en amont le cycle cellulaire [52]. Par ailleurs, il a été montré que l'expression de la forme de LHBS mutée dans la région pré-S2 induisait la sur-duplication du centrosome par un mécanisme dépendant de la réponse au stress du réticulum endoplasmique (RE) et de l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium [53]. Le stress du RE conduit en effet au clivage de la Cycline A par la calpaïne, et cette forme tronquée de la Cycline A, qui interagit toujours avec CDK2, induirait la sur-duplication du centrosome (Figure 4) [53]. Le rôle du stress du RE dans l'amplification du centrosome induite par d'autres stimulations oncogènes (associées ou non à des infections par des virus oncogènes), constitue une piste intrigante qui appelle à des analyses complémentaires.

Action indirecte de protéines virales sur la cytokinèse

L'amplification indirecte des centrosomes suite à l'échec de la cytokinèse a également été décrite dans le contexte des infections par des virus oncogènes. La protéine Tax d'HTLV-1 interagit avec la protéine cellulaire MAD1, qui joue un rôle dans le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique. Cette interaction de Tax avec MAD1 conduit à la perte de la fonction de MAD1 et à l'apparition de cellules multi-nucléées [54]. Parce que MAD1 pourrait faire le lien entre la mitose et la cytokinèse, l'inhibition fonctionnelle de MAD1 par Tax pourrait à la fois inhiber le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique et conduire à l'échec de la cytokinèse, qui pourrait alors contribuer à l'amplification des

centrosomes observée dans les cellules exprimant Tax. KSHV induit une instabilité chromosomique par le biais de l'expression de la protéine virale v-Cycline, un analogue viral de la Cycline D2 qui interagit avec CDK6 [55]. La v-Cycline promeut la transition G1/S et autorise la réplication de l'ADN tout en bloquant la cytokinèse (Figure 4). L'expression de la v-Cycline conduit donc à la polyploïdisation et à une amplification des centrosomes associée à une multi-nucléation. Ce processus nécessite l'expression de CDK6 et de son substrat NPM1 [32,56–58]. De façon cohérente avec ces observations réalisées dans des cellules exprimant la v-Cycline, une amplification des centrosomes associée à une multi-nucléation a été confirmée dans des cellules endothéliales primaires infectées par KSHV [58,59].

Ces exemples illustrent une question longtemps débattue dans le champ de la biologie du centrosome et du cancer : les défauts du centrosome sont-ils une cause ou une conséquence des aberrations mitotiques qui contribuent à l'instabilité génomique ? Comme illustré ici, des défauts mitotiques primaires conduisent secondairement à une amplification des centrosomes, qui peut ensuite amplifier les défauts mitotiques en générant des fuseaux mitotiques multipolaires ou pseudo-bipolaires. Comme les virus oncogènes perturbent très souvent de multiples processus qui coopèrent pour le contrôle du cycle cellulaire, il reste difficile d'établir clairement si les défauts du centrosome sont une force motrice au cours de l'oncogenèse virale, ou s'ils apparaissent de façon secondaire.

La coopération entre l'amplification du centrosome et la perte des fonctions de p53 au cours de l'infection par les virus oncogènes

Comme mentionné plus haut, la perte des fonctions de p53 entre en synergie avec l'amplification des centrosomes au cours de la tumorigenèse. De façon remarquable, c'est par son interaction avec l'oncoprotéine virale LT (large T) de SV40 que p53 a été initialement identifiée en 1979 [60,61], et les inter-relations entre les virus oncogènes et les fonctions de p53 ont maintenant été décrites en détail (pour une revue récente sur les virus oncogènes humains et p53, voir [62]).

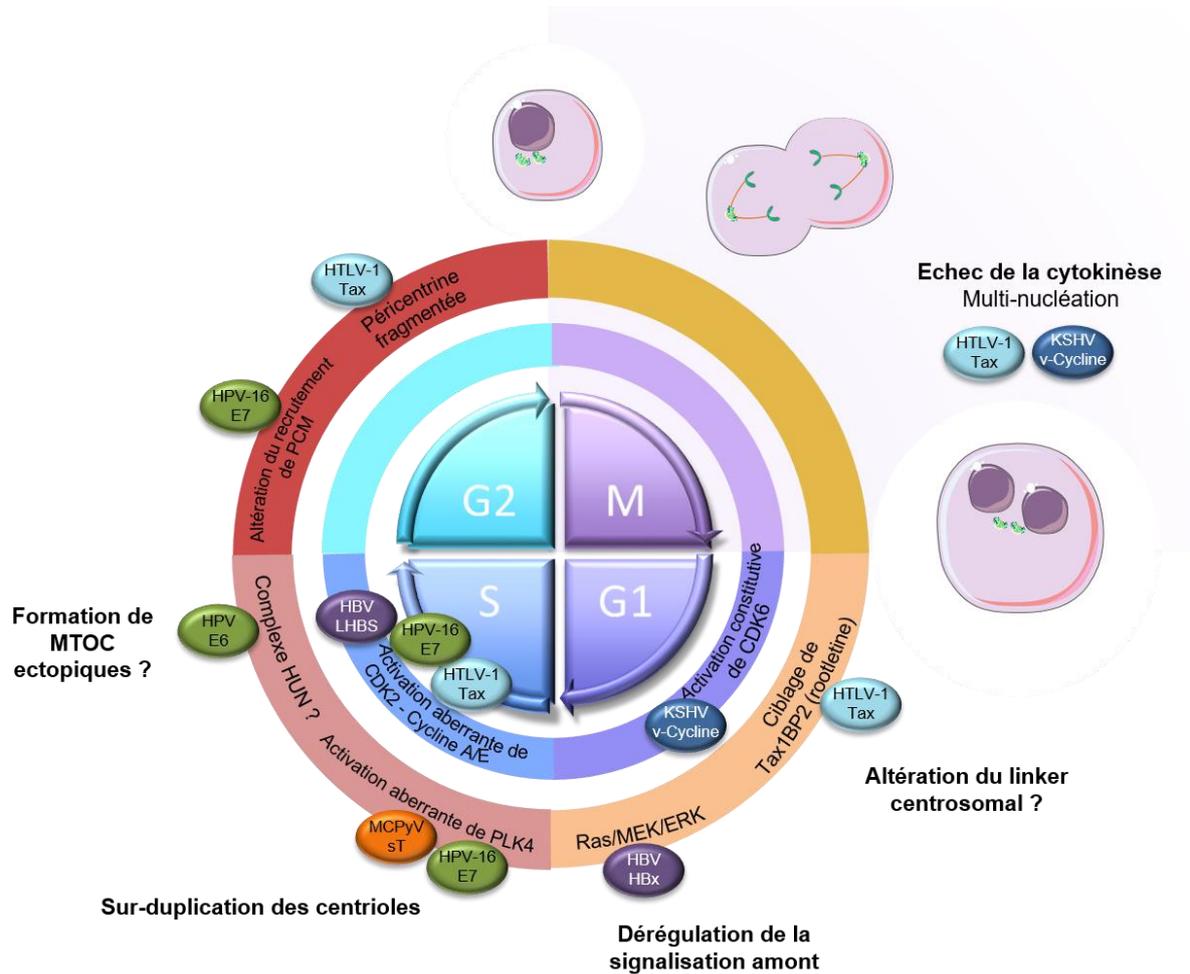


Figure 4. L'amplification des centrosomes induite par les virus oncogènes. Les virus oncogènes induisent l'amplification des centrosomes par la dérégulation directe ou indirecte des complexes CDK/Cycline de contrôle du cycle cellulaire (cercle interne) et de régulateurs du cycle de duplication du centrosome (cercle externe), ou en interférant avec la cytokinèse. Des exemples d'oncoprotéines virales induisant l'amplification des centrosomes sont inclus pour illustrer les cibles partagées et spécifiques des virus oncogènes.

Par exemple, plusieurs oncoprotéines virales partagent la capacité d'induire la dégradation de p53, comme la protéine LANA de KSHV, la protéine E6 des HPV HR, et la protéine BZLF1 d'EBV. D'autres oncoprotéines virales inhibent l'activité transcriptionnelle de p53, comme les protéines E6 et E7 des HPV HR, la protéine Tax d'HTLV-1 et la protéine HBx d'HBV. Toutefois, l'implication de la perte de fonction viro-induite de p53 dans la génération et le maintien de cellules présentant un nombre anormal de centrosomes n'a pas été analysée de façon systématique. Un des exemples les plus convaincants de la coopération entre l'amplification du centrosome et la perte des fonctions de p53 au cours de l'infection par les virus oncogènes est celui de KSHV, pour qui il a été démontré que l'amplification des centrosomes consécutive à la multi-nucléation était potentialisée par la perte de fonction de p53 [32,56–58]. L'hypothèse selon laquelle l'amplification des centrosomes dans les lésions associées aux HPV HR serait consécutive à l'inactivation fonctionnelle de p53 a également été proposée [38], mais la démonstration formelle est rendue difficile par le fait que l'inactivation de p53 et l'amplification des centrosomes constituent des propriétés chevauchantes des oncoprotéines d'HPV [63]. Bien que la capacité d'HBx d'induire des centrosomes surnuméraires a été comparée dans des cellules WT et déficientes pour p53, les résultats rapportés sont peu clairs et les expériences devraient être reproduites [51]. Ainsi, délimiter l'implication de la perte de fonction de p53 dans l'amplification des centrosomes et dans l'induction ou le maintien de l'aneuploidie induite par les virus oncogènes demeure un challenge pour la recherche à venir.

Identification de nouveaux régulateurs de l'organisation du centrosome et de sa dynamique par l'analyse des virus oncogènes

L'étude de l'impact des virus oncogènes sur l'amplification des centrosomes a aussi contribué à la compréhension des mécanismes régulateurs à l'œuvre dans les cellules non infectées. Un exemple d'une telle contribution est celui de l'identification du rôle du réseau de la GTPase Ran dans l'organisation du centrosome et dans le contrôle de sa dynamique. Il a en effet été montré que

l'oncoprotéine HBx d'HBV interférait avec la voie d'export nucléaire dépendant de Crm1/Ran en séquestrant Crm1 dans le cytoplasme. Il a ensuite été suggéré que ceci serait lié de façon causale à l'amplification des centrosomes induite par HBx, puisqu'un mutant d'HBx incapable de séquestrer Crm1 n'induisait pas d'amplification des centrosomes [51]. De façon remarquable, une fraction de Crm1 mais aussi de Ran est localisée au centrosome dans les cellules non infectées, et l'inhibition des fonctions de Crm1/Ran dans les cellules non infectées conduit à des aberrations du centrosome sous la forme de minicentrioles surnuméraires ne comportant pas de PCM, ou de centrioles anormalement allongés [51]. Ainsi, l'hypothèse a été formulée selon laquelle la voie Crm1/Ran contribuerait à limiter l'amplification des centrosomes. Parce que cette voie était connue pour son rôle dans le transport nucléo-cytoplasmique de facteurs cellulaires, certains auteurs ont suggéré que la régulation précise par Crm1/Ran du transport nucléo-cytoplasmique de certains régulateurs tels que NPM1 ou la Cycline B, pourrait être un aspect critique du contrôle de la duplication du centrosome (pour une revue, voir [64]). La centrine et la péricentrine sont aussi pris en charge par la voie Crm1/Ran [65], indiquant que cette voie pourrait également contrôler le transport nucléo-cytoplasmique de constituants majeurs du centrosome.

Par ailleurs, Ran est également impliquée dans le contrôle de la mitose, indépendamment de ses fonctions dans le transport nucléo-cytoplasmique. En effet, il a été montré que Ran contrôle la formation des asters et du fuseau mitotique en modulant les fonctions de facteurs d'assemblage du fuseau tels que TPX2 et NuMA, selon le modèle dit « en gradient ». Dans ce modèle, la forme active de Ran, associée au GTP, est générée à proximité de la chromatine et est convertie en une forme inactive, associée au GDP, en même temps qu'elle s'éloigne de la chromatine par diffusion, mettant ainsi en place un gradient de Ran-GTP qui peut constituer une information de position pour l'assemblage du fuseau autour des chromosomes (pour une revue, voir [66]). En lien avec ces fonctions de Ran, la sur-expression de RanBP1, un régulateur essentiel de Ran, a été associée à la formation de fuseaux multipolaires avec des pôles ne comportant qu'un centriole [67], résultant du désengagement précoce des centrioles en cours de mitose.

Des interactions entre Ran et des oncoprotéines virales, à savoir la protéine E7 des HPV HR, la protéine E1A de l'adénovirus et l'antigène LT de SV40, ont été décrites et associées à l'amplification des centrosomes [68]. De même, la protéine Tax d'HTLV-1 interagit avec RanBP1 au niveau des centrosomes mitotiques [49]. Ainsi, ces observations conduites dans le contexte de l'étude des virus oncogènes renforcent l'idée selon laquelle le réseau de la GTPase Ran participe au contrôle de la dynamique du centrosome et à l'organisation des centrosomes mitotiques, et serait une cible conservée de plusieurs oncoprotéines virales (pour une revue, voir [69]).

Les virus oncogènes présentant une action supposée sur l'amplification des centrosomes

L'induction de l'instabilité génétique associée à des altérations du centrosome n'a pas été analysée en profondeur pour les virus oncogènes EBV et HCV. Dans une première étude, il a été montré que l'enzyme thymidine kinase (TK) codée par EBV était localisée au centrosome, mais la signification fonctionnelle de cette observation est restée inconnue [70]. Une amplification des centrosomes a toutefois été décrite récemment *in vitro*, dans des lymphocytes B infectés par EBV, et *in vivo* dans un modèle murin d'infection par EBV [71]. Dans cette étude, la protéine structurale BNRF1 d'EBV, qui est connue pour son rôle d'inhibition des défenses cellulaires intrinsèques par le biais de son interaction avec la protéine nucléaire DAXX [72], a été observée au centrosome et a été montrée comme suffisante pour induire une amplification des centrosomes. Cependant, son mécanisme d'action n'a pas été caractérisé. Des centrosomes surnuméraires ont également été observés dans des cellules exprimant la protéine NS5A de HCV, qui subissent également un retard à la sortie de mitose, indiquant que l'amplification des centrosomes pourrait être une conséquence de l'interférence de NS5A avec la régulation mitotique [73], comme ce qui est décrit dans le cas de la protéine v-Cycline de KSHV. Cependant, comme pour la protéine BNRF1 d'EBV, le mécanisme d'action de NS5A de HCV mériterait d'être davantage analysé.

Un impact des virus oncogènes sur le regroupement des centrosomes ?

Comme décrit plus haut, le regroupement des centrosomes est un prérequis pour la prolifération viable des cellules présentant des centrosomes surnuméraires. Le regroupement des centrosomes peut être contrôlé par des paramètres physiques. En effet, il a été montré que la tension du fuseau mitotique due à l'attachement incorrect des kinétochores aux microtubules émanant d'un fuseau multipolaire induisait le repositionnement des centrosomes amplifiés et leur regroupement en deux pôles [74]. En lien avec ces observations, certaines protéines cellulaires impliquées dans le positionnement du fuseau mitotique et dans l'interaction des kinétochores avec les microtubules (dont des régulateurs du point de contrôle de l'assemblage du fuseau) sont nécessaires au regroupement des centrosomes. C'est le cas de facteurs appartenant au complexe « chromosomal passenger », au complexe d'attachement microtubules-kinétochore Ndc80, au complexe de cohésion des chromatides sœurs et au complexe augmine [75]. Les protéines associées aux microtubules, telles que la dynéine et les kinésines, ainsi que certains composants du cytosquelette d'actomyosine, sont également nécessaires au regroupement des centrosomes [76,77]. De façon étonnante, l'impact éventuel des virus oncogènes sur le regroupement des centrosomes n'a jusqu'à présent pas été analysé de façon précise. Un regroupement des centrosomes a été observé dans des cellules endothéliales primaires exprimant la protéine v-Cycline de KSHV [58], indiquant que KSHV pourrait ne pas interférer avec le regroupement des centrosomes. Cependant, cette étude n'a pas cherché à établir une éventuelle augmentation du regroupement des centrosomes par KSHV. Puisque l'interaction entre les virus oncogènes et les composants du point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique a été bien documentée [54,78–83], une interférence virale (positive ou négative) avec le regroupement des centrosomes demeure une hypothèse plausible qui devrait être analysée avec attention à l'avenir.

Le centrosome, un organelle de signalisation pour les points de contrôle du cycle cellulaire

Le contrôle de l'initiation de la mitose par le centrosome

En plus de son rôle dans la ségrégation des chromosomes au cours de la mitose, certaines études indiquent que le centrosome joue un rôle important dans le point de contrôle de l'entrée en phase M (pour une revue, voir [84]). En effet, des protéines de signalisation impliquées dans l'initiation de la mitose, comme le complexe régulateur clé CDK1/Cycline B, les phosphatases activatrices Cdc25B/C, la kinase mitotique PLK1 et Aurora A, ont toutes été décrites comme localisées au centrosome à la transition G2/M. Le recrutement du complexe CDK1/Cycline B au centrosome nécessite la protéine centrosomale Cep63 [85]. En outre, l'activation de CDK1/Cycline B par Cdc25B est réalisée spécifiquement au centrosome [86]. Le centrosome peut donc être considéré comme une plateforme de signalisation qui permet le rapprochement spatial des régulateurs de l'entrée en mitose. De façon remarquable, la protéine Tax d'HTLV-1 a été identifiée comme un interactant de Cep63 (nos résultats non publiés) et pourrait donc interférer avec le contrôle centrosomal de la transition G2/M.

L'activation au centrosome des points de contrôle du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN

Par ailleurs, le centrosome est apparu récemment comme une plateforme de signalisation au cours de la réponse aux dommages à l'ADN, qui joue également un rôle significatif dans la prévention de l'instabilité génomique. On désigne sous le terme de dommages à l'ADN les altérations de la structure de base de l'ADN qui peuvent survenir naturellement, par exemple au cours de la réplication de l'ADN, ou qui peuvent être induites par des agents exogènes. Selon la source de ces dommages, ces altérations peuvent consister en des mésappariements, des cassures simple brin (SSB, single strand breaks), des cassures double brin (DSB, double strand breaks) ou des fourches de réplication bloquées (qui résultent en la juxtaposition de segments d'ADN sous forme simple brin et double brin, perçue comme un stress réplicatif). Si les dommages à l'ADN ne sont pas correctement réparés, ils peuvent

contribuer à la perte de l'intégrité génomique. La réponse aux dommages à l'ADN (DDR, DNA damage response) désigne donc l'arsenal de stratégies qui préviennent l'accumulation des dommages. Cette réponse inclut la perception des dommages ainsi que l'orchestration du processus de réparation en lien avec le contrôle du cycle cellulaire ou l'induction de l'apoptose (pour une revue, voir [87]). La DDR peut activer l'un des trois points de contrôle suivants : le point de contrôle G1/S qui prévient la réplication de l'ADN en cas de dommages, le point de contrôle de la phase S qui interrompt la synthèse de l'ADN si des dommages surviennent en cours de réplication, et le point de contrôle G2/M qui limite l'entrée en mitose des cellules dans lesquelles les dommages n'auraient pas été réparés.

Les dommages sont perçus par une machinerie reposant sur l'activité des kinases ATM, ATR et DNA-PK, qui sont au cœur de la DDR et qui répondent principalement aux DSB pour ATM et DNA-PK, et au stress répliatif pour ATR. L'activation de ces kinases essentielles est illustrée ci-après sur l'exemple de l'activation d'ATM (Figure 5). Suite à des DSB, le complexe MRN (Mre11, Rad50 et Nbs1) est recruté directement sur le site de cassure, et permet l'autophosphorylation des dimères inactifs d'ATM sur les sérines en position 1981, menant à la dissociation des dimères en monomères actifs [88]. La forme ainsi activée d'ATM phosphoryle le variant d'histone H2AX, alors appelé γ H2AX. γ H2AX interagit avec la protéine d'échafaudage MDC1 et recrute des complexes MRN additionnels dans une boucle de rétroaction positive. En plus d'activer la machinerie de réparation, ATM active le point de contrôle G2/M par l'intermédiaire de la kinase de transduction CHK2, une protéine nucléaire (Figure 5). L'activation de CHK2 résulte en l'inhibition de l'activité phosphatase de Cdc25C, et par conséquent de la kinase mitotique CDK1, ce qui active le point de contrôle G2/M. CHK1, une kinase apparentée à CHK2, remplit des fonctions similaires mais est activée en aval d'ATR.

De façon remarquable, ATM/ATR et CHK1/CHK2 ont été observées au centrosome, indiquant que le centrosome pourrait constituer une plateforme de signalisation dans la DDR [89–91] (Figure 5). L'accumulation de CHK1 au centrosome en cas de dommages à l'ADN conduit à l'inactivation du complexe CDK1/Cycline B qui est normalement nécessaire à l'entrée en mitose [92]. La localisation

centrosomale de la forme activée de CHK2 en réponse aux dommages à l'ADN a également été rapportée [91]. De façon inattendue, la forme activée de CHK1 est également détectable au centrosome, et plus précisément au niveau du centriole père, dans des cellules normales, soumises à aucun stress [91], soulevant l'hypothèse d'une participation de CHK1 au cycle de duplication normal du centrosome, en absence de dommages à l'ADN.

Le centrosome : une cible des virus oncogènes dans la réponse aux dommages à l'ADN ?

La plupart des virus oncogènes sont connus pour leur capacité à induire une instabilité génétique par l'induction directe de dommages à l'ADN, le plus souvent par l'intermédiaire de la production de ROS, et indirectement par l'altération de la DDR. Les virus oncogènes interfèrent avec la DDR par l'inactivation des kinases senseurs et en particulier par l'inactivation d'ATM (Figure 5). Par exemple, EBV dérégule l'activité d'ATM dans le lymphome de Hodgkin. Plus précisément, la protéine virale membranaire LMP1 provoque la baisse de l'expression d'ATM [93]. La protéine Tax d'HTLV-1 interagit avec la phosphatase Wip1 et induit ainsi la déphosphorylation et l'inactivation d'ATM, de γ -H2AX et de CHK1/2 [94]. Tax forme par ailleurs des complexes avec MDC1 et DNA-PK au sein de foyers nucléaires, interférant ainsi avec leurs fonctions dans la DDR.

Les virus oncogènes interfèrent également avec les voies de signalisation en aval de la perception des dommages à l'ADN, menant à la perte de contrôle du cycle cellulaire (Figure 5). Par exemple, le point de contrôle G2/M est dérégulé dans les cellules infectées par EBV [95]. La protéine virale EBNA3C interagit avec CHK2, ce qui diminue l'activité de CHK2 et permet la progression à travers le point de contrôle G2/M. De façon similaire, le point de contrôle G2/M est dérégulé sous l'action de la protéine LANA de KSHV. L'oncoprotéine Tax d'HTLV-1 induit l'hyperphosphorylation de CHK2, ce qui résulte en la séquestration nucléaire de CHK2 et en l'inhibition de ses propriétés de signalisation [96].

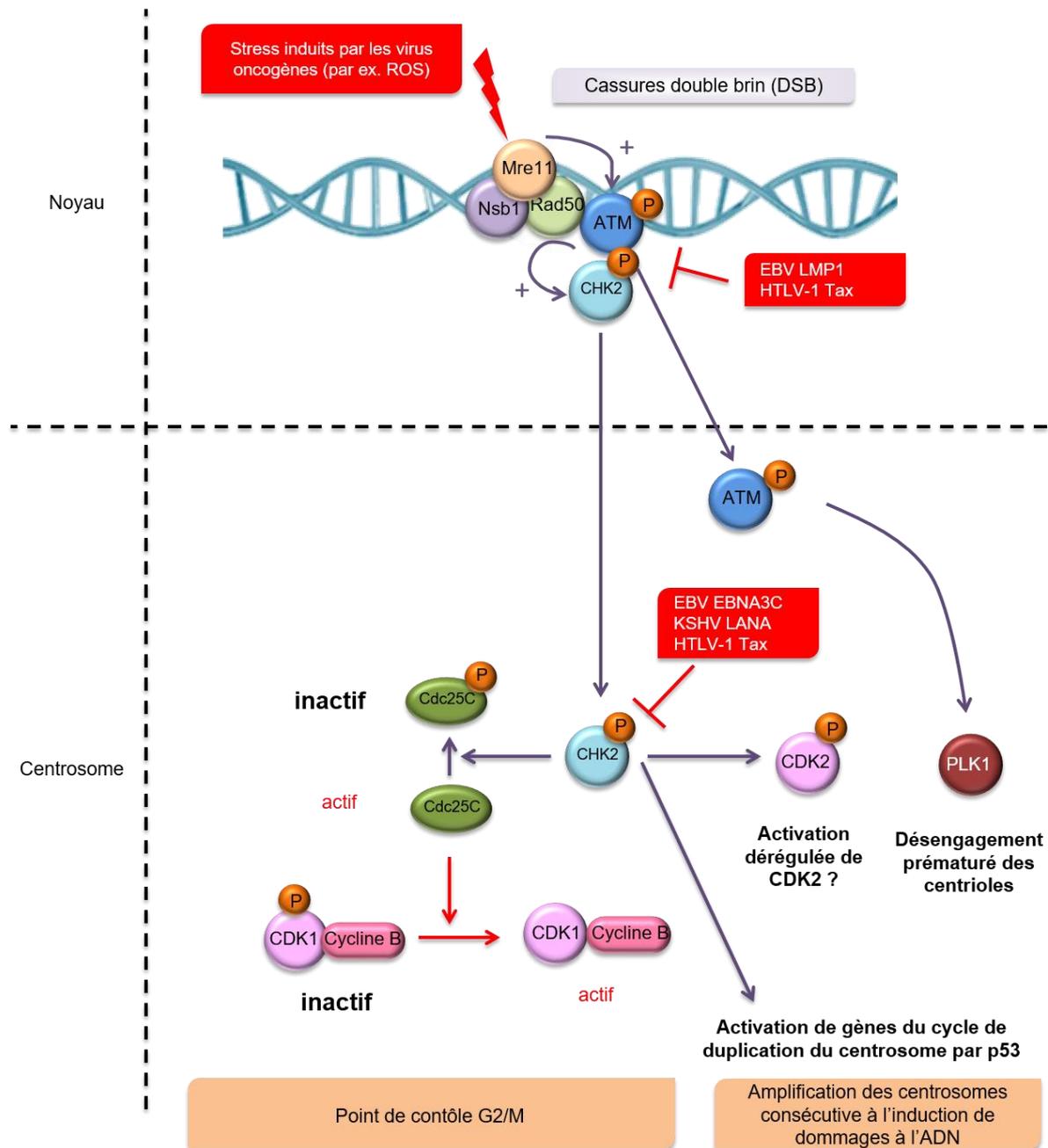


Figure 5. Le centrosome à l'interface entre le contrôle du cycle cellulaire et la réponse aux dommages à l'ADN. L'activation du point de contrôle G2/M par les cassures double brin (DSB) est illustrée. L'induction des DSB, qui peut résulter de stress induits par les virus oncogènes, conduit à l'activation d'ATM dans le noyau suite au recrutement du complexe MRN (Mre11, Rad50 et Nbs1) au site de cassure. Pour des raisons de clarté, la boucle d'amplification impliquant γ H2AX et MDC1a a été omise. L'activation d'ATM conduit à la phosphorylation de CHK2, qui inhibe à son tour la phosphatase Cdc25C. Ceci limite l'activité du complexe CDK1/Cycline B pour la transition G2/M et résulte en un arrêt du cycle cellulaire. ATM, CHK2 et certains facteurs en aval ont été observés au centrosome suite à l'induction de dommages à l'ADN. Les virus oncogènes interfèrent avec ces mécanismes principalement au niveau d'ATM et de CHK2, autorisant l'activation du complexe CDK1/Cycline B et le contournement du point de contrôle (rectangles, flèches et texte en rouge). Les mécanismes d'amplification des centrosomes consécutifs à l'induction de dommages à l'ADN sont également illustrés.

Si l'on considère le fait que le centrosome fonctionne comme une plateforme de signalisation au cours de la DDR, et le fait que certaines protéines virales connues pour interférer avec la DDR sont associées physiquement au centrosome, comme c'est le cas pour la protéine Tax d'HTLV-1, alors on peut émettre l'hypothèse que l'interférence avec la DDR exercée par ces oncoprotéines virales pourraient découler de la perturbation de la fonction de signalisation du centrosome. Cette hypothèse devrait être testée par des travaux futurs.

Vers une compréhension intégrée de la dynamique du centrosome : dialogue entre la DDR et le contrôle du nombre de centrosomes

Plusieurs études ont mis en évidence des interactions fonctionnelles entre la DDR et le processus d'amplification des centrosomes, qui sont tous deux liés à l'instabilité génétique. Ces interactions fonctionnelles ont d'abord été proposées pour expliquer les observations selon lesquelles des traitements chimiques qui induisent des dommages à l'ADN provoquent aussi une amplification des centrosomes. Par exemple, l'hydroxyurée (HU) provoque un stress répliatif qui conduit, par l'intermédiaire de l'activation de CHK1 et CHK2, à une phase S prolongée [91], mais aussi à des centrosomes surnuméraires. L'inhibition de CHK1 ou de CHK2 réduit l'amplification des centrosomes induite par ces traitements [91,97], indiquant que ces kinases sont nécessaires à l'amplification des centrosomes en réponse aux dommages à l'ADN. Puisque CDK2 est un substrat de CHK1/2, CDK2 pourrait être l'effecteur de CHK1/2 impliqué dans l'amplification des centrosomes (Figure 5). Les dommages à l'ADN induisent également une augmentation de la quantité de PCM par un mécanisme dépendant de CHK1 [98]. Cette expansion du PCM nécessite la protéine du PCM péricentrine, et est exacerbée en absence de la microcéphaline, un régulateur de CHK1 localisé au centrosome. De façon remarquable, l'inhibition de la voie ATM/CHK2 conduit à une capacité réduite de KSHV d'induire des

centrosomes surnuméraires [58], indiquant que l'amplification des centrosomes induite par KSHV pourrait en partie au moins être une conséquence de la DDR. Il serait intéressant d'examiner la situation pour les autres virus oncogènes.

Le désengagement prématuré des centrioles en G2 plutôt qu'en fin de phase M / début de phase G1, qui peut conduire à la re-duplication des centrioles avant l'entrée en mitose, a aussi été observé suite à l'induction de dommages à l'ADN. La kinase mitotique PLK1, qui contrôle le désengagement des centrioles, et qui est une cible en aval d'ATM, a été impliquée dans ce processus de désengagement précoce (Figure 5) [99]. L'extinction de l'expression de C-NAP-1 et de la rootletine, qui constituent le linker entre les centrioles, facilite le désengagement précoce consécutif à l'induction de dommages à l'ADN [100], confirmant le lien entre dommages à l'ADN et désengagement des centrioles.

Une autre observation qui corrobore l'hypothèse d'un lien entre amplification des centrosomes et DDR est celle de l'activation transcriptionnelle de plusieurs gènes codant des facteurs impliqués dans le cycle de duplication du centrosome, comme Cep152 ou NEK2, suite à l'induction de dommages à l'ADN (Figure 5) [101]. De plus, une perte de fonction de p53 conduit également à la transcription aberrante de gènes impliqués dans le cycle de duplication du centrosome [31,102]. Une fraction de p53 est en outre localisée au centrosome, ce qui indique des fonctions possibles dans la régulation de la dynamique du centrosome [103].

L'amplification des centrosomes consécutive à l'induction de dommages à l'ADN a récemment été liée à l'accumulation de satellites centriolaires [104]. Dans cette étude, une stratégie élégante basée sur l'utilisation d'une forme photo-convertible de la Centrine-2 a été mise en œuvre pour caractériser le processus à l'origine de l'amplification des centrosomes consécutive à l'induction de dommages à l'ADN, et plus précisément pour distinguer un processus de fragmentation des centrosomes d'un processus de sur-duplication des

centrioles. Dans ces conditions, aucune fragmentation des centrosomes n'a été observée. Au contraire, les auteurs ont pu mettre en évidence que l'amplification des centrosomes était davantage le résultat de l'assemblage *de novo* de la Centrine-2. Ces points de Centrine-2 surnuméraires ont en fait été attribués à des satellites centriolaires, du fait de leur mobilité et de leur morphologie dynamique. En outre, ces points étaient peu enrichis en marqueurs centrosomaux tels que la γ -tubuline, C-NAP-1, la rootletine ou SAS-6, mais étaient très enrichis en PCM1, un marqueur de satellite. Il a ensuite été montré que l'apparition de satellite surnuméraires permettait l'amplification des centrosomes par le transport de constituants centrosomaux.

L'ensemble de ces observations indique donc que l'amplification des centrosomes peut être une conséquence de l'activation de points de contrôle suite à l'induction de dommages à l'ADN. Puisque les centrosomes surnuméraires peuvent induire des mitoses multipolaires et conduire à des catastrophes mitotiques, l'amplification des centrosomes en réponse à l'induction de dommages à l'ADN peut être considérée comme un mécanisme favorisant l'élimination passive des cellules comportant des dommages à l'ADN non réparés. Cependant, des processus cellulaires permettant de limiter l'amplification des centrosomes en réponse à l'induction de dommages à l'ADN ont été décrits. Par exemple, Cep63 a été identifiée comme une cible d'ATM qui impose un délai à la progression mitotique en cas de dommages à l'ADN [105]. Plus récemment, le régulateur centrosomal TAX1BP2 a aussi été identifié comme un substrat direct d'ATM [106]. La phosphorylation par ATM protège TAX1BP2 de la dégradation par le protéasome, et augmenterait ainsi sa capacité à limiter l'amplification des centrosomes en réponse à l'induction de dommages à l'ADN.

Puisque la plupart des virus oncogènes induisent des dommages à l'ADN, comme discuté plus haut, il est très probable que leur association avec l'amplification des centrosomes soit en

partie au moins due à ces mécanismes inter-reliés. De façon remarquable, la protéine Tax d'HTLV-1 interagit avec Cep63 et TAX1BP2 (voir plus haut), suggérant que les virus oncogènes pourraient interférer avec le dialogue moléculaire mis en place entre la dynamique du centrosome et la DDR. Distinguer l'impact direct des virus oncogènes sur le cycle de duplication du centrosome de leur impact indirect *via* les dommages à l'ADN pourrait donc constituer un objectif ambitieux pour les travaux à venir.

Conclusion et perspectives

L'ensemble des données discutées dans cette revue souligne le rôle central du centrosome dans le maintien de l'intégrité génomique. L'amplification des centrosomes ainsi que l'interférence avec la DDR sont des processus partagés par de nombreux virus oncogènes. Cependant, l'articulation précise de ces deux aspects de la perte de l'intégrité génomique liés à la biologie du centrosome demeure peu caractérisée au cours de la transformation viro-induite.

A la lumière des avancées récentes dans le domaine de la biologie du centrosome, les altérations centrosomales induites par les virus oncogènes mériteraient d'être revisitées. En particulier, les aberrations structurales dans les cellules infectées ou dans les cellules exprimant certaines protéines virales devraient être décrites plus précisément, en exploitant des stratégies d'analyse par microscopie plus informatives. Les études discutées ci-dessus sont en effet pour la plupart basées sur l'utilisation de marqueurs comme la Centrine-1 (un marqueur des centrioles) ou la β -tubuline (un marqueur du PCM) pour identifier et compter les centrosomes en microscopie. Cependant, ces marqueurs utilisés individuellement ne sont probablement pas suffisants pour distinguer entre plusieurs types d'aberrations structurales qui peuvent affecter les centrosomes (par exemple, distinguer entre sur-duplication, fragmentation, ou accumulation de satellites centriolaires). L'utilisation combinatoire de plusieurs marqueurs de centrioles (par exemple des centrioles pères ou fils, ou des extrémités distales ou proximales des centrioles) et de PCM, associée à des marqueurs de satellites, devrait permettre

une description plus précise des aberrations structurales, ce qui pourrait en retour informer sur la nature des mécanismes moléculaires altérés par les virus oncogènes. Une telle description approfondie pourraient être facilitée par les nouvelles approches de microscopie semi-automatique qui facilitent l'analyse des altérations centrosomales dans de multiples échantillons [107].

En accord avec ce besoin de revisiter les altérations centrosomales induites par les virus oncogènes, les avancées méthodologiques développées récemment pour l'analyse de la structure et de la composition du centrosome pourraient être exploitées dans le cadre de l'analyse des cellules infectées ou exprimant certaines protéines virales. Ces avancées incluent la microscopie super-résolutive [12] ainsi que des approches de protéomique innovantes telles que l'identification par biotinylation de proximité (BioID) [108]. L'exploitation de ces approches pour la comparaison systématique des aberrations centrosomales induites par des virus oncogènes distincts devrait permettre d'identifier des cibles partagées par plusieurs virus oncogènes. Ceci pourrait nous informer sur les facteurs ou les mécanismes centrosomaux les plus vulnérables aux interférences virales, et ainsi contribuer à une meilleure caractérisation des réseaux de régulation essentiels à la perte de l'intégrité du centrosome au cours de la transformation cellulaire.

Remerciements

Nous remercions Véronique Marthiens et Karine Monier pour les discussions sur la biologie du centrosome. Nous remercions également Renaud Mahieux et Hélène Dutartre pour leur lecture critique du manuscrit, ainsi que l'ensemble de nos collègues pour les discussions enrichissantes. Ce travail est soutenu par un financement interne à l'unité U1111 (collaboration intra-CIRI) attribué à CJ et HG, et par un financement « Ligue Nationale contre le Cancer, Comité du Rhône, Projet Pluri-Equipes 2018 » attribué à CJ, HG et MT. CJ est financée par l'ENS de Lyon. ET est financée par une allocation doctorale du Ministère de la Recherche Les auteurs étant identifiés comme des membres du personnel du Centre

international de Recherche sur le Cancer/Organisation mondiale de la Santé, les opinions exprimées dans la présente publication n'engagent qu'eux-mêmes et ne représentent pas nécessairement les décisions, la politique officielle ou les opinions du Centre international de Recherche sur le Cancer/Organisation mondiale de la Santé.

Références

1. Epstein MA, Achong BG, Barr YM: Virus Particles in Cultured Lymphoblasts From Burkitt'S Lymphoma. *Lancet* 1964, 28:702–703.
2. International Agency for Research on Cancer, Weltgesundheitsorganisation (Eds): *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 100 B, biological agents: this publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 24 February - 03 March 2009*. IARC; 2012.
3. De Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, Plummer M: Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol* 2012, 13:607–615.
4. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS: Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma. *Science* 2008, 319:1096–1100.
5. Choo Q-L, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M, others: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989, 244:359–362.
6. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC: 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* 1980, 77:7415–7419.
7. Pipas JM: DNA TUMOR VIRUSES AND THEIR CONTRIBUTIONS TO MOLECULAR BIOLOGY. *J Virol* 2019, doi:10.1128/JVI.01524-18.
8. Conduit PT, Wainman A, Raff JW: Centrosome function and assembly in animal cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015, 16:611–624.
9. Yasunaga J, Jeang K-T: Viral transformation and aneuploidy. *Environ Mol Mutagen* 2009, 50:733–740.
10. Fu J, Glover DM: Structured illumination of the interface between centriole and peri-centriolar material. *Open Biol* 2012, 2:120104–120104.
11. Lawo S, Hasegan M, Gupta GD, Pelletier L: Subdiffraction imaging of centrosomes reveals higher-order organizational features of pericentriolar material. *Nat Cell Biol* 2012, 14:1148–1158.
12. Sonnen KF, Schermelleh L, Leonhardt H, Nigg EA: 3D-structured illumination microscopy provides novel insight into architecture of human centrosomes. *Biol Open* 2012, 1:965–976.
13. Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan P-K, Knudsen ES, Hofmann IA, Snyder JD, Bove KE, et al.: Nucleophosmin/B23 Is a Target of CDK2/Cyclin E in Centrosome Duplication. *Cell* 2000, 103:127–140.
14. Ma Z, Kanai M, Kawamura K, Kaibuchi K, Ye K, Fukasawa K: Interaction between ROCK II and

nucleophosmin/B23 in the regulation of centrosome duplication. *Mol Cell Biol* 2006, 26:9016–9034.

15. Gönczy P, Hatzopoulos GN: Centriole assembly at a glance. *J Cell Sci* 2019, 132:jcs228833.
16. Avidor-Reiss T, Gopalakrishnan J: Building a centriole. *Curr Opin Cell Biol* 2013, 25:72–77.
17. Li J, Kim S, Kobayashi T, Liang F-X, Korzeniewski N, Duensing S, Dynlacht BD: Neurl4, a novel daughter centriole protein, prevents formation of ectopic microtubule organizing centres. *EMBO Rep* 2012, 13:547–553.
18. Hori A, Toda T: Regulation of centriolar satellite integrity and its physiology. *Cell Mol Life Sci* 2017, 74:213–229.
19. Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer (2018). Mitelman F, Johansson B and Mertens F (Eds.), <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>. [date unknown],
20. Boveri T: Concerning the Origin of Malignant Tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *J Cell Sci* 2008, 121:1.
21. Zyss D, Gergely F: Centrosome function in cancer: guilty or innocent? *Trends Cell Biol* 2009, 19:334–346.
22. Levine MS, Bakker B, Boeckx B, Moyett J, Lu J, Vitre B, Spierings DC, Lansdorp PM, Cleveland DW, Lambrechts D, et al.: Centrosome Amplification Is Sufficient to Promote Spontaneous Tumorigenesis in Mammals. *Dev Cell* 2017, 40:313-322.e5.
23. Marthiens V, Piel M, Basto R: Never tear us apart – the importance of centrosome clustering. *J Cell Sci* 2012, 125:3281–3292.
24. Milunović-Jevtić A, Mooney P, Sulerud T, Bisht J, Gatlin J: Centrosomal clustering contributes to chromosomal instability and cancer. *Curr Opin Biotechnol* 2016, 40:113–118.
25. Cunha-Ferreira I, Rodrigues-Martins A, Bento I, Riparbelli M, Zhang W, Laue E, Callaini G, Glover DM, Bettencourt-Dias M: The SCF/Slimb Ubiquitin Ligase Limits Centrosome Amplification through Degradation of SAK/PLK4. *Curr Biol* 2009, 19:43–49.
26. Marthiens V, Rujano MA, Penetier C, Tessier S, Paul-Gilloteaux P, Basto R: Centrosome amplification causes microcephaly. *Nat Cell Biol* 2013, 15:731–740.
27. Habedanck R, Stierhof Y-D, Wilkinson CJ, Nigg EA: The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. *Nat Cell Biol* 2005, 7:1140–1146.
28. Karki M, Keyhaninejad N, Shuster CB: Precocious centriole disengagement and centrosome fragmentation induced by mitotic delay. *Nat Commun* 2017, 8:15803.
29. Meraldi P, Honda R, Nigg E: Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. *EMBO J* 2002, 21:483–492.
30. Fukasawa K, Choi T, Kuriyama R, Rulong S, Vande Woude GF: Abnormal Centrosome Amplification in the Absence of p53. *Science* 1996, 271:1744–1747.
31. Tarapore P, Horn HF, Tokuyama Y, Fukasawa K: Direct regulation of the centrosome duplication cycle by the p53-p21^{Waf1/Cip1} pathway. *Oncogene* 2001, 20:3173–3184.
32. Cuomo ME, Knebel A, Morrice N, Paterson H, Cohen P, Mittnacht S: p53-Driven apoptosis limits centrosome amplification and genomic instability downstream of NPM1 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 2008, 10:723–730.
33. Holland AJ, Fachinetti D, Zhu Q, Bauer M, Verma IM, Nigg EA, Cleveland DW: The autoregulated instability of Polo-like kinase 4 limits centrosome duplication to once per cell cycle. *Genes Dev* 2012, 26:2684–

2689.

34. Fava LL, Schuler F, Sladky V, Haschka MD, Soratroi C, Eiterer L, Demetz E, Weiss G, Geley S, Nigg EA, et al.: The PIDDosome activates p53 in response to supernumerary centrosomes. *Genes Dev* 2017, 31:34–45.
35. Coelho PA, Bury L, Shahbazi MN, Liakath-Ali K, Tate PH, Wormald S, Hindley CJ, Huch M, Archer J, Skarnes WC, et al.: Over-expression of Plk4 induces centrosome amplification, loss of primary cilia and associated tissue hyperplasia in the mouse. *Open Biol* 2015, 5:150209.
36. Serçin Ö, Larsimont J-C, Karambelas AE, Marthiens V, Moers V, Boeckx B, Le Mercier M, Lambrechts D, Basto R, Blanpain C: Transient PLK4 overexpression accelerates tumorigenesis in p53-deficient epidermis. *Nat Cell Biol* 2016, 18:100–110.
37. Duensing S, Lee LY, Duensing A, Basile J, Piboonniyom S, Gonzalez S, Crum CP, Münger K: The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:10002–10007.
38. Skyldberg B, Fujioka K, Hellström A-C, Sylvén L, Moberger B, Auer G: Human papillomavirus infection, centrosome aberration, and genetic stability in cervical lesions. *Mod Pathol* 2001, 14:279.
39. Duensing S, Duensing A, Lee DC, Edwards KM, Piboonniyom S-O, Manuel E, Skaltsounis L, Meijer L, Münger K: Cyclin-dependent kinase inhibitor indirubin-3'-oxime selectively inhibits human papillomavirus type 16 E7-induced numerical centrosome anomalies. *Oncogene* 2004, 23:8206–8215.
40. Duensing A, Liu Y, Tseng M, Malumbres M, Barbacid M, Duensing S: Cyclin-dependent kinase 2 is dispensable for normal centrosome duplication but required for oncogene-induced centrosome overduplication. *Oncogene* 2006, 25:2943.
41. Duensing A, Liu Y, Perdreau SA, Kleylein-Sohn J, Nigg EA, Duensing S: Centriole overduplication through the concurrent formation of multiple daughter centrioles at single maternal templates. *Oncogene* 2007, 26:6280–6288.
42. Duensing A, Liu Y, Spardy N, Bartoli K, Tseng M, Kwon J-A, Teng X, Duensing S: RNA polymerase II transcription is required for human papillomavirus type 16 E7- and hydroxyurea-induced centriole overduplication. *Oncogene* 2007, 26:215–223.
43. Korzeniewski N, Treat B, Duensing S: The HPV-16 E7 oncoprotein induces centriole multiplication through deregulation of Polo-like kinase 4 expression. *Mol Cancer* 2011, 10:61.
44. Kwun HJ, Wendzicki JA, Shuda Y, Moore PS, Chang Y: Merkel cell polyomavirus small T antigen induces genome instability by E3 ubiquitin ligase targeting. *Oncogene* 2017, 36:6784.
45. Martínez-Noël G, Luck K, Kühnle S, Desbuleux A, Szajner P, Galligan JT, Rodriguez D, Zheng L, Boyland K, Leclere F, et al.: Network Analysis of UBE3A/E6AP-Associated Proteins Provides Connections to Several Distinct Cellular Processes. *J Mol Biol* 2018, 430:1024–1050.
46. Nguyen CL, Eichwald C, Nibert ML, Munger K: Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein Associates with the Centrosomal Component -Tubulin. *J Virol* 2007, 81:13533–13543.
47. Afonso PV, Zamborlini A, Saïb A, Mahieux R: Centrosome and retroviruses: The dangerous liaisons. *Retrovirology* 2007, 4:27.
48. Nitta T, Kanai M, Sugihara E, Tanaka M, Sun B, Nagasawa T, Sonoda S, Saya H, Miwa M: Centrosome amplification in adult T-cell leukemia and human T-cell leukemia virus type 1 Tax-induced human T cells. *Cancer Sci* 2006, 97:836–841.

49. Peloponese J-M, Haller K, Miyazato A, Jeang K-T: Abnormal centrosome amplification in cells through the targeting of Ran-binding protein-1 by the human T cell leukemia virus type-1 Tax oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102:18974–18979.
50. Ching Y-P, Chan S-F, Jeang K-T, Jin D-Y: The retroviral oncoprotein Tax targets the coiled-coil centrosomal protein TAX1BP2 to induce centrosome overduplication. *Nat Cell Biol* 2006, 8:717–724.
51. Forgues M, Difilippantonio MJ, Linke SP, Ried T, Nagashima K, Feden J, Valerie K, Fukasawa K, Wang XW: Involvement of Crm1 in Hepatitis B Virus X Protein-Induced Aberrant Centriole Replication and Abnormal Mitotic Spindles. *Mol Cell Biol* 2003, 23:5282–5292.
52. Yun C, Cho H, Kim S-J, Lee J-H, Park SY, Chan GK, Cho H: Mitotic aberration coupled with centrosome amplification is induced by hepatitis B virus X oncoprotein via the Ras-mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein pathway. *Mol Cancer Res MCR* 2004, 2:159–169.
53. Wang LH-C, Huang W, Lai M-D, Su I-J: Aberrant cyclin A expression and centrosome overduplication induced by hepatitis B virus Pre-S2 mutants and its implication in hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 2012, 33:466–472.
54. Jin D-Y, Spencer F, Jeang K-T: Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Oncoprotein Tax Targets the Human Mitotic Checkpoint Protein MAD1. *Cell* 1998, 93:81–91.
55. Swanton C, Mann DJ, Fleckenstein B, Neipel F, Peters G, Jones N: Herpes viral cyclin/Cdk6 complexes evade inhibition by CDK inhibitor proteins. *Lett Nat* 1997, 390.
56. Verschuren EW, Klefstrom J, Evan GI, Jones N: The oncogenic potential of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus cyclin is exposed by p53 loss in vitro and in vivo. *Cancer Cell* 2002, 2:229–241.
57. Verschuren EW, Hodgson JG, Gray JW, Kogan S, Jones N, Evan GI: The role of p53 in suppression of KSHV cyclin-induced lymphomagenesis. *Cancer Res* 2004, 64:581–589.
58. Koopal S, Furuhielm JH, Järviluoma A, Jäämaa S, Pyakurel P, Pussinen C, Wirzenius M, Biberfeld P, Alitalo K, Laiho M, et al.: Viral Oncogene-Induced DNA Damage Response Is Activated in Kaposi Sarcoma Tumorigenesis. *PLOS Pathog* 2007, 3:e140.
59. Pan H, Zhou F, Gao S-J: Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Induction of Chromosome Instability in Primary Human Endothelial Cells. *Cancer Res* 2004, 64:4064–4068.
60. Lane DP, Crawford LV: T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979, 278:261–263.
61. Linzer DIH, Levine AJ: Characterization of a 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979, 17:43–52.
62. Tornesello ML, Annunziata C, Tornesello AL, Buonaguro L, Buonaguro FM: Human Oncoviruses and p53 Tumor Suppressor Pathway Deregulation at the Origin of Human Cancers. *Cancers* 2018, 10:213.
63. Riley RR, Duensing S, Brake T, Münger K, Lambert PF, Arbeit JM: Dissection of Human Papillomavirus E6 and E7 Function in Transgenic Mouse Models of Cervical Carcinogenesis. *Cancer Res* 2003, 63:4862–4871.
64. Budhu AS, Wang XW: Loading and Unloading. *Cell Cycle Georget Tex* 2005, 4:1510–1514.
65. Keryer G, Di Fiore B, Celati C, Lehtreck KF, Mogensen M, Delouvé A, Lavia P, Bornens M, Tassin A-M: Part of Ran Is Associated with AKAP450 at the Centrosome: Involvement in Microtubule-organizing Activity. *Mol Biol Cell* 2003, 14:4260–4271.
66. Ciciarello M, Mangiacasale R, Lavia P: Spatial control of mitosis by the GTPase Ran. *Cell Mol Life Sci* 2007,

64:1891–1914.

67. Di Fiore B, Ciciarello M, Mangiacasale R, Palena A, Tassin A-M, Cundari E, Lavia P: Mammalian RanBP1 regulates centrosome cohesion during mitosis. *J Cell Sci* 2003, 116:3399–3411.
68. Luca AD, Mangiacasale R, Severino A, Malquori L, Baldi A, Palena A, Mileo AM, Lavia P, Paggi MG: E1A Deregulates the Centrosome Cycle in a Ran GTPase-dependent Manner. *Cancer Res* 2003, 63:1430–1437.
69. Lavia P: The GTPase RAN regulates multiple steps of the centrosome life cycle. *Chromosome Res* 2016, 24:53–65.
70. Gill MB, Kutok JL, Fingerroth JD: Epstein-Barr Virus Thymidine Kinase Is a Centrosomal Resident Precisely Localized to the Periphery of Centrioles. *J Virol* 2007, 81:6523–6535.
71. Shumilov A, Tsai M-H, Schlosser YT, Kratz A-S, Bernhardt K, Fink S, Mizani T, Lin X, Jauch A, Mautner J, et al.: Epstein-Barr virus particles induce centrosome amplification and chromosomal instability. *Nat Commun* 2017, 8:14257.
72. Tsai K, Chan L, Gibeault R, Conn K, Dheekollu J, Domsic J, Marmorstein R, Schang LM, Lieberman PM: Viral Reprogramming of the Daxx Histone H3.3 Chaperone during Early Epstein-Barr Virus Infection. *J Virol* 2014, 88:14350–14363.
73. Baek K-H, Park H-Y, Kang C-M, Kim S-J, Jeong S-J, Hong E-K, Park J-W, Sung Y-C, Suzuki T, Kim C-M, et al.: Overexpression of Hepatitis C Virus NS5A Protein Induces Chromosome Instability via Mitotic Cell Cycle Dysregulation. *J Mol Biol* 2006, 359:22–34.
74. Kwon M, Godinho SA, Chandhok NS, Ganem NJ, Azioune A, Thery M, Pellman D: Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. *Genes Dev* 2008, 22:2189–2203.
75. Leber B, Maier B, Fuchs F, Chi J, Riffel P, Anderhub S, Wagner L, Ho AD, Salisbury JL, Boutros M, et al.: Proteins Required for Centrosome Clustering in Cancer Cells. *Sci Transl Med* 2010, 2:33ra38–33ra38.
76. Quintyne NJ, Reing JE, Hoffelder DR, Gollin SM, Saunders WS: Spindle Multipolarity Is Prevented by Centrosomal Clustering. *Science* 2005, 307:127–129.
77. Kwon M, Godinho SA, Chandhok NS, Ganem NJ, Azioune A, Thery M, Pellman D: Mechanisms to suppress multipolar divisions in cancer cells with extra centrosomes. *Genes Dev* 2008, 22:2189–2203.
78. Ying B, Wold WSM: Adenovirus ADP protein (E3-11.6K), which is required for efficient cell lysis and virus release, interacts with human MAD2B. *Virology* 2003, 313:224–234.
79. Cotsiki M, Lock RL, Cheng Y, Williams GL, Zhao J, Perera D, Freire R, Entwistle A, Golemis EA, Roberts TM, et al.: Simian virus 40 large T antigen targets the spindle assembly checkpoint protein Bub1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101:947–952.
80. Patel D, McCance DJ: Compromised spindle assembly checkpoint due to altered expression of Ubch10 and Cdc20 in human papillomavirus type 16 E6- and E7-expressing keratinocytes. *J Virol* 2010, 84:10956–10964.
81. Chae S, Ji J-H, Kwon S-H, Lee H-S, Lim JM, Kang D, Lee C-W, Cho H: HBxAP α /Rsf-1-mediated HBx-hBubR1 interactions regulate the mitotic spindle checkpoint and chromosome instability. *Carcinogenesis* 2013, 34:1680–1688.
82. Tan CL, Teissier S, Gunaratne J, Quek LS, Bellanger S: Stranglehold on the spindle assembly checkpoint: the human papillomavirus E2 protein provokes BUBR1-dependent aneuploidy. *Cell Cycle Georget Tex* 2015, 14:1459–1470.
83. Shirnekhi HK, Kelley EP, DeLuca JG, Herman JA: Spindle assembly checkpoint signaling and sister

chromatid cohesion are disrupted by HPV E6-mediated transformation. *Mol Biol Cell* 2017, 28:2035–2041.

84. Arquint C, Gabryjonczyk A-M, Nigg EA: Centrosomes as signalling centres. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2014, 369:20130464–20130464.
85. Löffler H, Fechter A, Matuszewska M, Saffrich R, Mistrik M, Marhold J, Hornung C, Westermann F, Bartek J, Kramer A: Cep63 Recruits Cdk1 to the Centrosome: Implications for Regulation of Mitotic Entry, Centrosome Amplification, and Genome Maintenance. *Cancer Res* 2011, 71:2129–2139.
86. Dutertre S: Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci* 2004, 117:2523–2531.
87. Ciccia A, Elledge SJ: The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Mol Cell* 2010, 40:179–204.
88. Bakkenist CJ, Kastan MB: DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 2003, 421:499.
89. Zhang S, Hemmerich P, Grosse F: Centrosomal localization of DNA damage checkpoint proteins. *J Cell Biochem* 2007, 101:451–465.
90. Oricchio E, Saladino C, Iacovelli S, Soddu S, Cundari E: ATM is Activated by Default in Mitosis, Localizes at Centrosomes and Monitors Mitotic Spindle Integrity. *Cell Cycle* 2006, 5:88–92.
91. Wang C-Y, Huang EY-H, Huang S -c, Chung B -c: DNA-PK/Chk2 induces centrosome amplification during prolonged replication stress. *Oncogene* 2015, 34:1263–1269.
92. Löffler H, Bochtler T, Fritz B, Tews B, Ho AD, Lukas J, Bartek J, Krämer A: DNA Damage-Induced Accumulation of Centrosomal Chk1 Contributes to its Checkpoint Function. *Cell Cycle* 2007, 6:2541–2548.
93. Dutton A, Woodman CB, Chukwuma MB, Last JIK, Wei W, Vockerodt M, Baumforth KR, Flavell JR, Rowe M, Taylor AMR, et al.: Bmi-1 is induced by the Epstein-Barr virus oncogene LMP1 and regulates the expression of viral target genes in Hodgkin lymphoma cells. *Blood* 2007, 109:2597–2603.
94. Dayaram T, Lemoine FJ, Donehower LA, Marriott SJ: Activation of WIP1 Phosphatase by HTLV-1 Tax Mitigates the Cellular Response to DNA Damage. *PLoS ONE* 2013, 8:e55989.
95. Choudhuri T, Verma SC, Lan K, Murakami M, Robertson ES: The ATM/ATR Signaling Effector Chk2 Is Targeted by Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3C To Release the G2/M Cell Cycle Block. *J Virol* 2007, 81:6718–6730.
96. Gupta SK, Guo X, Durkin SS, Fryrear KF, Ward MD, Semmes OJ: Human T-cell leukemia virus type 1 tax oncoprotein prevents DNA damage-induced chromatin egress of hyperphosphorylated Chk2. *J Biol Chem* 2007, 282:29431–29440.
97. Robinson HMR, Black EJ, Brown R, Gillespie DAF: DNA Mismatch Repair and Chk1-Dependent Centrosome Amplification in Response to DNA Alkylation Damage. *Cell Cycle* 2007, 6:982–992.
98. Antonczak AK, Mullee LI, Wang Y, Comartin D, Inoue T, Pelletier L, Morrison CG: Opposing effects of pericentrin and microcephalin on the pericentriolar material regulate CHK1 activation in the DNA damage response. *Oncogene* 2016, 35:2003.
99. Inanç B, Dodson H, Morrison CG: A Centrosome-autonomous Signal That Involves Centriole Disengagement Permits Centrosome Duplication in G2 Phase after DNA Damage. *Mol Biol Cell* 2010, 21:3866–3877.
100. Conroy PC, Saladino C, Dantas TJ, Lalor P, Dockery P, Morrison CG: C-NAP1 and rootletin restrain DNA

damage-induced centriole splitting and facilitate ciliogenesis. *Cell Cycle* 2012, 11:3769–3778.

101. Lindgren T, Stigbrand T, Johansson L, Riklund K, Eriksson D: Alterations in Gene Expression During Radiation-Induced Mitotic Catastrophe in HeLa Hep2 Cells. *Anticancer Res* 2014, 34:3875–3880.

102. Mussman JG, Horn HF, Carroll PE, Okuda M, Tarapore P, Donehower LA, Fukasawa K: Synergistic induction of centrosome hyperamplification by loss of p53 and cyclin E overexpression. *Oncogene* 2000, 19:1635–1646.

103. Shinmura K, Bennett RA, Tarapore P, Fukasawa K: Direct evidence for the role of centrosomally localized p53 in the regulation of centrosome duplication. *Oncogene* 2007, 26:2939–2944.

104. Löffler H, Fechter A, Liu FY, Poppelreuther S, Krämer A: DNA damage-induced centrosome amplification occurs via excessive formation of centriolar satellites. *Oncogene* 2013, 32:2963–2972.

105. Smith E, Dejsuphong D, Balestrini A, Hampel M, Lenz C, Takeda S, Vindigni A, Costanzo V: An ATM- and ATR-dependent checkpoint inactivates spindle assembly by targeting CEP63. *Nat Cell Biol* 2009, 11:278–285.

106. Lai WL, Hung WY, Ching YP: The tumor suppressor, TAX1BP2, is a novel substrate of ATM kinase. *Oncogene* 2014, 33:5303–5309.

107. Wang M, Knudsen BS, Nagle RB, Rogers GC, Cress AE: A method of quantifying centrosomes at the single-cell level in human normal and cancer tissue. *Mol Biol Cell* 2019, 30:811–819.

108. Firat-Karalar EN, Rauniyar N, Yates JR, Stearns T: Proximity Interactions among Centrosome Components Identify Regulators of Centriole Duplication. *Curr Biol* 2014, 24:664–670.

PROBLEMATIQUE DU TRAVAIL DE THESE

Un des objectifs de notre équipe est d'étudier les mécanismes de l'oncogenèse virale induits par l'oncoprotéine Tax du rétrovirus HTLV-1. La fraction de Tax associée à l'appareil de Golgi et au centrosome, deux organelles physiquement proches au sein de la cellule, contribue à la transformation cellulaire en provoquant entre autres une activation constitutive de la voie NF- κ B et des dysfonctions du centrosome en lien avec la perte de l'intégrité génomique, comme une amplification des centrosomes. Tax peut perturber ces deux mécanismes de manière directe en interagissant avec le signalosome IKK assemblé sur des membranes dérivées de l'appareil de Golgi dans la voie NF- κ B et en interagissant avec des protéines impliquées dans les fonctions du centrosome liées à la progression du cycle cellulaire. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces activités, notre équipe cherche à identifier et analyser fonctionnellement les partenaires cellulaires ciblés par Tax au sein de ces compartiments.

Un étude se basant sur une analyse approfondie des données de la littérature s'est intéressée à l'interactome cellulaire de Tax et a dénombré plus de 100 interactants de Tax (Boxus et al., 2008; Vandermeulen et al., 2015). De même, une analyse plus récente réalisée par crible double-hybride en levure a permis l'identification de partenaires de Tax dont les voies cellulaires dans lesquelles ils sont identifiés sont liées à la transformation cellulaire médiée par Tax (Simonis et al., 2012). En introduction, nous avons évoqué la structure complexe du centrosome et les interactions dynamiques ayant lieu au niveau du centrosome. Pour cette raison, les techniques classiques de protéomique utilisant des anticorps pour la purification de complexes ou montrant seulement des interactions binaires comme le double-hybride en levure (ie. vis-à-vis des interactions sous forme de complexes ayant lieu au centrosome) ne sont donc pas les plus pertinentes pour notre étude.

Le premier objectif de cette étude a été de développer au sein de l'équipe une approche de protéomique innovante permettant l'identification de partenaires cellulaires de Tax, adaptée à l'identification de partenaires au niveau de l'appareil de Golgi et du centrosome basée sur la biotinylation *in situ* (BioID) (dont le principe est détaillé dans la partie correspondante du Matériels et Méthodes). Parmi les partenaires de Tax détectés dans l'analyse de BioID, nous

avons identifié p62, dont nous avons analysé l'implication fonctionnelle de l'interaction dans l'activation de la voie NF- κ B.

Notre second objectif a été d'identifier spécifiquement par le biais de cette technique de nouveaux partenaires centrosomaux de Tax, puis de caractériser leur implication dans les dysfonctions oncogènes du centrosome induites par Tax.

Afin de comprendre si ces mécanismes d'altération du centrosome sont spécifiques à HTLV-1 ou sont communs à d'autres virus oncogènes exprimant des protéines localisées au centrosome, nous avons souhaité identifier les mécanismes généraux menant à des altérations du centrosome et par conséquent à la perte de l'intégrité génomique en lien avec ses fonctions. L'une des stratégies virales déployées pour induire des dysfonctions centrosomales consiste en la localisation d'oncoprotéines virales au centrosome pour altérer directement son cycle de duplication et ses fonctions par le biais d'interactions avec des protéines centrosomales.

Pour cela, nous souhaitons identifier par la technique de BioID les partenaires centrosomaux de deux autres protéines virales oncogènes, BNRF1 de EBV et E7 d'HPV-16. Dans le cas de BNRF1, Shumilov et al., (2017) ont tout d'abord montré que des lymphocytes B (*in vitro*) infectés par EBV présentaient des mitoses multipolaires visualisées par microscopie confocale signe caractéristique de l'instabilité génomique. Ils ont également montré que cela se produisait *in vivo* dans des souris immuno-déficientes infectées par EBV. Plus précisément, ces cellules présentent un nombre anormal de centrosomes. De manière intéressante, les lymphocytes B infectés par un virus EBV défectif pour l'expression de BNRF1 présentent un pourcentage de centrosomes anormaux significativement moins important que lorsqu'ils sont infectés avec le virus sauvage. Ainsi, BNRF1 semble directement impliquée dans l'amplification des centrosomes dans des lymphocytes B infectés par EBV. Cependant, les mécanismes moléculaires sous-jacents à l'amplification des centrosomes par BNRF1 restent à élucider. De même pour E7, cette dernière est localisée au niveau du centrosome (Nguyen et al., 2007). Ainsi, E7 pourrait interagir avec des protéines cellulaires et perturber leurs fonctions pour induire des altérations centrosomales à l'origine de l'aneuploïdie dans les cellules infectées. Appliquer la technologie de BioID à ces oncoprotéines virales permettra d'identifier des partenaires centrosomaux communs et spécifiques à chacune impliqués dans des mécanismes moléculaires similaires ou différents menant à des dysfonctions centrosomales.

Ce travail a été amorcé en cours de thèse dans le cadre d'une collaboration avec Henri Gruffat (laboratoire « Herpesvirus oncogènes », Centre International de Recherche en Infectiologie de Lyon) et Massimo Tommasino (groupe « Infections et biologie du cancer », Agence internationale de recherche sur le cancer à Lyon), travaillant respectivement sur EBV et HPV-16.

MATERIELS & METHODES

Dans cette partie seront uniquement détaillés les matériels et méthodes ne figurant pas dans l'article (présenté dans le chapitre 1 des Résultats).

I. Plasmides et clonages

La séquence de Tax a été préalablement clonée dans un vecteur pSG5M, avec un tag 6xhis et les mutants de Tax M22, M47 (Smith and Greene, 1990a), K1-10R et K4-8R (Chiari et al., 2004) (déficient pour l'ubiquitination, mutation lysine -> arginine), ont été générés par mutagenèse dirigée à partir de Tax. La séquence de Cep63 (isoforme c, don d'E. Nigg, Université de Basel, Suisse) a été clonée dans un vecteur pcDNA3/pT7-link-GVSV. Les mutants de tronctions de Cep63 ont été construits à partir de cette construction selon le schéma décrit dans Brown et al. (2013) correspondant à : l'extrémité N-terminale (VSV-Cep63-1 ; positions 1-135), la partie centrale (VSV-Cep63-2 ; positions 135-378), l'extrémité C-terminale (VSV-Cep63-3 ; positions 378-495), l'extrémité N-terminale/partie centrale (VSV-Cep63-4 ; positions 1-378) et la partie centrale/C-terminale (VSV-Cep63-5 ; positions 135-495). Les siARNs ciblant Cep63 (ON-TARGET plus SMART pool #L-016516-01, Thermo Scientific Dharmacon) et les siARNs contrôles (ON-TARGET plus Control pool D-001810-10-05, Thermo Scientific Dharmacon) ont été utilisés pour les expériences fonctionnelles. Les siARN dirigés contre Cep63 ciblent les quatre isoformes de cette dernière.

Pour les expériences de BioID, Tax a été clonée dans le vecteur commercial myc-BioID2-MCS (MCS, pour Multiple Cloning Site ; #74223 ; Addgene) entre les sites de restriction EcoRI et HindIII en N-terminal de la séquence codant BirA* selon le schéma suivant :



BNRF1 (EBV) et E7 (HPV-16) ont été clonées par nos collaborateurs selon le même schéma que Tax dans le vecteur myc-BioID2-MCS.

II. Culture cellulaire et transfections

Des cellules 293T (cellules adhérentes embryonnaires de rein humain exprimant l'antigène T du virus SV40, American Type Culture Collection), des cellules épithéliales U2OS (cellules adhérentes d'un ostéosarcome humain ; CelluloNet, SFR Biosciences) et des cellules U2OS C1G (cellules U2OS exprimant de façon stable la centrine1-GFP ; Dr Bornens, Paris ; (Piel et al., 2000)) ont été cultivées en milieu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplémenté avec du sérum de veau fœtal (10%) et des antibiotiques (pénicilline 100U/mL, streptomycine 100µg/mL).

La lignée cellulaire Jurkat est une lignée lymphocytaire T immortalisée non-infectée dérivée de sang périphérique humain. Les lignées cellulaires C8166 et Hut102 sont des lignées lymphocytaires T chroniquement infectées par HTLV-1 issues de patients ATL (Dr Gessain, Paris). Ces lignées sont cultivées en milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) supplémenté avec du sérum de veau fœtal (10%) et des antibiotiques (pénicilline 100U/mL, streptomycine 100µg/mL) et du GlutaMAX™.

Toutes les lignées cellulaires ont été maintenues à 37°C avec 5% de CO₂.

Les cellules 293T ont été transfectées avec du Polyfect (301107 ; Qiagen) Les cellules U2OS et U2OS C1G ont été transfectées avec de la Lipofectamine 2000 (Life Technologies). Les cellules Jurkat ont été transfectées avec le kit Neon electroporation system (Thermo Fisher).

Pour certaines expériences, les cellules ont été traitées avec de la biotine (50µM ; B4501 ; Sigma), du nocodazole (5µg/ml ; M1404 ; Sigma) ou de la cytochalasine B (5µg/ml ; C6762 ; Sigma).

III. Anticorps

Les anticorps commerciaux anti-his (souris ; ab18184 ; Abcam), anti-his (lapin ; sc804 ; Santa Cruz), anti-his (chèvre ; ab9136 ; Abcam), anti-myc (souris ; clone 4A6 ; 05-724 ; EMD Millipore), anti-VSV (souris ; V5507 ; Sigma), anti-Tax1 (souris ; Tab172 ; NIH), anti-Cep63 (lapin ; 06-1292 ; Millipore), anti-GM130 (souris ; 610823 ; BD Biosciences), anti-Cep152 (lapin ; HPA039408 ; Sigma), anti-ubiquitine (souris ; clone P4D1 ; A2312 ; Santa Cruz), anti-β-actine (souris ; A2228 ; Sigma), anti-α-tubuline (souris ; T5168 ; Sigma), anti-γ-tubuline (souris ; clone GTU88 ; T5326 ; Sigma), anti-Lamine B1 (lapin ; ab-16048 ; Abcam), IgG contrôles (lapin ;

sc-2027; Santa Cruz) et la streptavidine-HRP (RAB-HRP3-600 ; Sigma) ont été utilisés pour les expériences d'immunofluorescence, co-immunoprécipitation et/ou western-blot.

Les anticorps secondaires Alexafluor® 647 (anti-souris ; 715-605-150 ; Jackson), Alexafluor® 555 (anti-lapin ; ab150074 ; Abcam), Alexafluor® A568 (anti-lapin ; ab175693 ; Abcam), Alexafluor® 488 (anti-chèvre ; ab150119; Abcam) et la Streptavidine-Alexafluor®647 (S21374 ; Invitrogen) ont été utilisés pour les expériences d'immunofluorescence. Les anticorps secondaires anti-souris (NA9310-1ML ; VWR) et anti-lapin (NA9340-1ML ; VWR) ont été utilisés pour les expériences de western-blot.

IV. Immunofluorescence

Les lamelles ont été pré-traitées avec de la poly-L-lysine (P4832 ; Sigma) avant la fixation des cellules 293T, Jurkat et des lignées cellulaires chroniquement infectées par HTLV-1. Les cellules ont été fixées 24h ou 72h après transfection, ou directement pour les lignées cellulaires chroniquement infectées par HTLV-1 avec du méthanol froid à -20°C pendant 10min. Après plusieurs lavages, les cellules ont été perméabilisées avec du PBS-Triton X-100 0,1% pendant 5min puis saturées avec du PBS-Tween 0,2%-Lait 5% pendant au moins 30min. Les lamelles ont été incubées avec les anticorps primaires indiqués dilués en PBS-Tween 0,2%-Lait 5% pendant 45min à température ambiante à l'obscurité en chambre humide. Les lamelles ont été lavées puis incubées avec les anticorps secondaires anti-espèces correspondants pendant 45min à température ambiante à l'obscurité en chambre humide. Les lamelles ont été montées en Fluoromount-G contenant du DAPI (0100-20; CliniSciences).

Pour certaines expériences, les cellules ont été traitées au nocodazole (5µg/mL) pendant 1h à 37°C avant la fixation au méthanol.

L'acquisition des images a été réalisée en utilisant l'objectif Plan Apochromat 63x/1.4 oil DIC (440762; wd 0.18 mm) sur le microscope AxioImager.Z1 (ZEISS). Les images ont été acquises en utilisant une caméra Coolsnap HQ monochrome CCD (Zeiss; 1392x1040 – 6.45µm pixel; 12bit) à l'aide du logiciel MetaMorph® (Molecular Devices LLC). L'acquisition des images p.129 a été réalisée en utilisant l'objectif 63x/1.4 sur le microscope confocal LSM800 (ZEISS) à l'aide du logiciel ZEN (ZEISS). Les séries d'acquisition en Z ont été effectuées avec 0.2µm d'intervalle entre chaque acquisition. Les coupes en Z montrant un centrosome net ont été utilisées pour les montages des images à l'aide du logiciel ImageJ (Schneider et al., 2012). Les intensités de

fluorescence ont été mesurées à l'aide du logiciel ImageJ sur une sélection linéaire des régions d'intérêt de 1,5µm (*Figure 41*, p.175).

V. Immunoprécipitation et purification d'affinité (Ni-NTA)

Vingt-quatre heures après transfection, les cellules ont été lysées en (Tris-HCl pH 8 50mM, NaCl 200mM, EDTA 0,1mM, NP-40 0,5%, Na₃VO₄ 2mM, NaF 100mM) en présence d'inhibiteurs de protéases (Complete, Boehringer) et incubées 20min sur glace. Après élimination des débris cellulaires par centrifugation, la concentration en protéines dans les lysats cellulaires a été déterminée par méthode Bradford (BioRad).

Pour les immunoprécipitations, 400µg de protéines ont été incubées avec des billes de pAG (04631; Ademtech) pour l'étape de pre-clearing pendant 1h à +4°C. Ensuite, l'immunoprécipitation a été menée avec 2µg d'anticorps anti-Cep63 ou IgG contrôles ou 2µl d'anticorps anti-Tax sur la nuit à +4°C. Après ajout des billes de pAG pendant 1h à +4°C, les immunoprécipitats ont été lavés (Tris-HCl pH 8 50mM, NaCl 500mM, EDTA 0,1mM, NP-40 0.5%, Na₃VO₄ 2mM, NaF 100mM) et élués.

L'expérience de Ni-NTA a été menée en utilisant des billes de Nickel (H0537; Sigma) ajoutées sur 400µg de protéines sur la nuit à +4°C en présence d'Imidazole 10mM. Ensuite, les complexes ont été lavés (Tris-HCl pH 8 50mM, NaCl 500mM, EDTA 0,1mM, NP-40 0.5%, Na₃VO₄ 2mM, NaF 100mM and Imidazole 10mM) et élués.

Les échantillons ont été déposés sur des gels Bis-Tris 10% (BioRad) ou gels TGX Stain-free (BioRad), soumis à électrophorèse et transférés sur membrane PVDF (polyvinylidene fluoride ; Immobilon-P, Millipore). Les membranes ont été saturées à l'aide de Tris-Buffered Saline Tween20 – Lait 5% au minimum 30min et incubées avec les anticorps indiqués sur la nuit à +4°C. Les membranes ont ensuite été incubées avec les anticorps secondaires anti-espèce correspondants pour 45min. Les membranes ont été révélées avec de l'ECL Prime (RPN2232; GE Healthcare) ou de l'ECL Femto (34095; Perbio) à l'aide de films (Fuji Medical X-Ray Films ; 47410 ; Fujifilm) ou du système d'imagerie ChemiDoc™ (12003263 ; BioRad).

VI. Essais d'ubiquitination

Les inputs (1/5 des cellules) ont été obtenus en lysant les cellules en tampon RIPA (Tris pH7.4 50mM, NaCl 150mM, NP-40 1%, Na-DOC 0.25%, inhibiteurs de protéases (Roche)) pendant 20min sur glace. Le restant des cellules (ie. 4/5) ont été lysées avec un tampon contenant : Guanidine 6M, NaH₂PO₄ 100mM, Imidazole 10mM ; pendant 20min à température ambiante, soniquées deux fois et centrifugées pour éliminer les débris. L'expérience de Ni-NTA a été menée comme préalablement décrite (cf. partie des méthodes concernée). Ensuite, les complexes ont été lavés en tampon de lyse, en tampon de lyse ¼ (dilué en Tris-HCl) et en (Tris-HCl 25mM, Imidazole 10mM) puis élués. Les échantillons ont été analysés par western-blot, comme décrit dans la partie des Résultats concernée.

VII. Fractionnement cellulaire

Le lysat cellulaire total (L) a été obtenu après lyse des cellules en (Tris pH7.4 50mM, NaCl 150mM, NP-40 1%, Na-DOC 0.25% et inhibiteurs de protéases (Roche)) pendant 20min sur glace.

Pour le fractionnement cellulaire, les cellules ont été pré-traitées avec du nocodazole (5µg/ml) et de la cytochalasine B (5µg/ml) pendant 1h à 37°C. Les cellules ont été lysées sur glace dans le tampon suivant : 10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM KCL, 1.5 mM MgCl₂, 1mM DTT, et inhibiteurs de protéases (Roche) ; pendant 10min. La fraction cytoplasmique a été obtenue en centrifugeant les cellules 10min à 400g. La fraction intermédiaire (I ; contenant l'appareil en Golgi et le centrosome) a été obtenue en lavant le culot trois fois avec un tampon contenant : 20 mM Tris pH 7.4, 100 mM NaCl, 1% Triton, 0.5% sodium deoxycholate, 0.05% sodium dodecyl sulfate (SDS), inhibiteurs de protéases (Roche) ; et en récupérant à chaque fois le surnageant après centrifugation de 10min à 400g. Enfin, le culot restant a été lysé sur glace avec un tampon contenant : 50 mM Tris pH7.5, 150 mM NaCl, 0.5% NP-40, 0.5% triton, inhibiteurs de protéases (Roche) ; pendant 30min afin de récupérer la fraction nucléaire (N). Toutes les fractions ont été éliminées de leurs débris après centrifugation. La quantité de protéines contenue dans chaque échantillon a été évaluée par méthode Bradford (23246 ; ThermoFisher Scientific) et 10µg de chaque échantillon ont été utilisés pour l'analyse en western-blot.

VIII. Principe de la technique de BioID

La biotinylation est une modification post-traductionnelle mettant en jeu la fixation d'une biotine sur des protéines ou des acides nucléiques. La réaction biochimique est catalysée par des biotine holoenzymes synthétases exprimées dans tous les organismes dont *Escherichia coli*. Chez *E. coli*, cette enzyme appelée BirA catalyse la réaction en deux étapes : activation de la biotine et transfert de la biotine sur un résidu lysine sur son substrat endogène, la BCCP (Biotin Carboxyl Carrier Protein). Ainsi, la biotinylation BirA-dépendente présente une sélectivité de substrats très stricte. L'intérêt porté pour tirer pleinement profit de cette réaction biochimique pour l'identification de partenaires protéiques a permis le développement d'un mutant ponctuel de BirA (mutation R118G) appelé BirA* (Kwon and Beckett, 2000). BirA* est incapable de se lier à son substrat pour le biotinyler et catalyse précocement l'activation de la biotine, résultant en une biotinylation de proximité de protéines se trouvant dans un rayon de 10nm (Cronan, 2005). Il est important de noter ici que dans la technique de BioID, la biotinylation est une marque de proximité et non une évidence d'interactions physiques.

La technologie de BioID tire avantage de cette réaction pour la purification et l'identification de protéines interagissant ou se trouvant à proximité d'une protéine d'intérêt (Roux et al., 2012). La protéine d'intérêt (ici, Tax, BNRF1 ou E7) est fusionnée à BirA*. La protéine fusion est exprimée en cellules et interagit avec ou se trouve à proximité de protéines cellulaires (*Figure 19*). En présence de biotine, BirA* (au sein de la protéine fusion) induit une biotinylation de proximité et biotinyler donc les potentiels partenaires de proximité de la protéine d'intérêt. Les cellules sont ensuite lysées dans un tampon permettant la solubilisation des complexes. Les protéines biotinylées sont ensuite purifiées sur une résine de streptavidine puis identifiées par spectrométrie de masse.

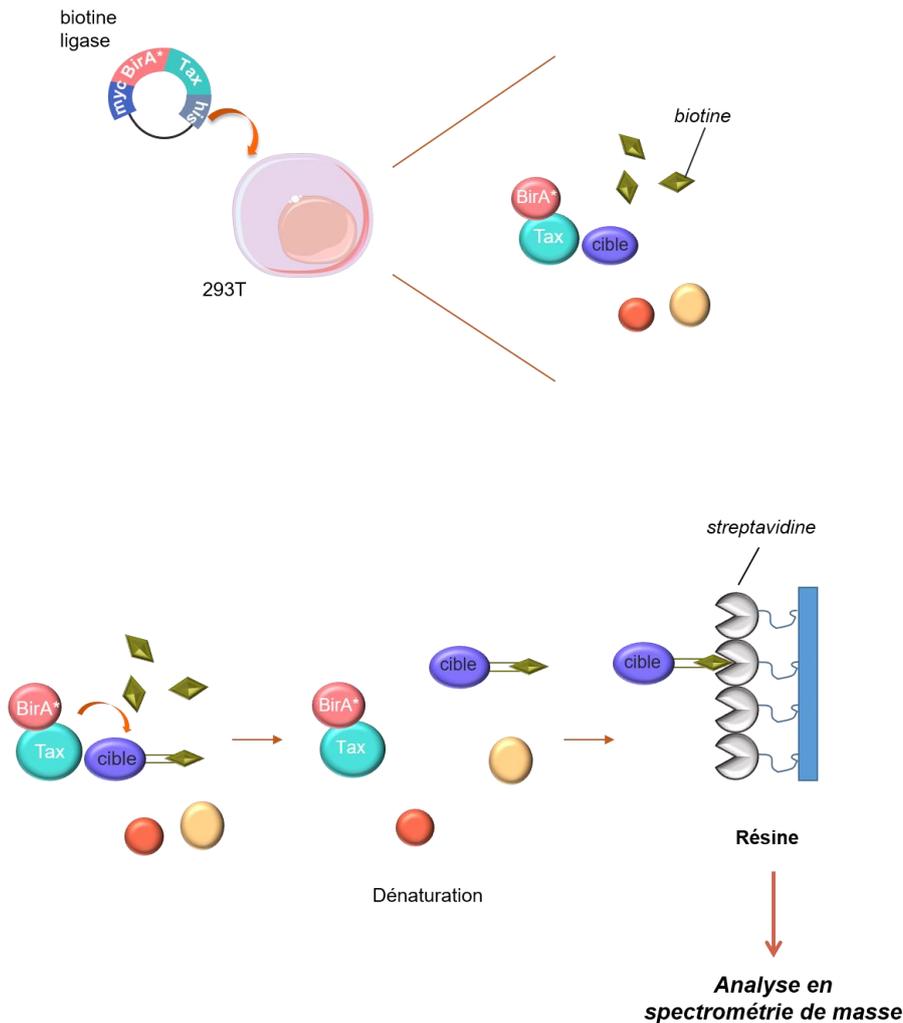


Figure 19. Principe de la technique de BioID. Dans les cellules 293T, la protéine fusion d'intérêt BirA*-Tax interagit avec ses partenaires. En présence de biotine dans le milieu de culture, la biotine ligase BirA* va pouvoir biotinyler les protéines cellulaires dans un rayon de 10nm de diamètre. Les protéines biotinylées, qui sont donc de potentiels partenaires de Tax, sont purifiées sur une résine de streptavidine puis analysées en spectrométrie de masse. Pour des soucis de clarté, nous choisissons d'illustrer uniquement l'exemple de Tax.

IX. Purification des protéines biotinylées : protocole initial issu de (Firat-Karalar and Stearns, 2015)

Pour les premières expériences de BioID, cinq boîtes de 15cm de diamètre de cellules 293T ont été transfectées (par condition) avec les différentes constructions indiquées. Vingt-quatre heures après transfection (70-80% de confluence), les cellules ont été traitées avec de la biotine 50µM (B4501 ; Sigma) pendant 18h à 37°C. Les cellules ont ensuite été lysées en (Tris pH 7.4 50mM, NaCl 500mM, SDS 0.4%, EDTA 5mM, Triton X-100 2%, DTT 1mM, PMSF 1mM, 10µg/µl de pepstatine, leupeptine et aprotinine 10mM) et soniquées deux fois à amplitude

30% (1min ; 15s on, 45s off) et deux fois à amplitude 40% (1min ; 15s on, 45s off). Un volume égal de Tris-HCl pH7.4 50mM froid est ajouté aux extraits cellulaires afin d'éliminer la possible interférence de composés du tampon de lyse avec la fixation des protéines biotinylées sur les billes lors de la purification. Les débris cellulaires ont été éliminés par centrifugation 10min à 15000rpm. Les lysats cellulaires ainsi préparés ont été incubés avec 60µl de billes de streptavidine par boîte (Dynabeads MyOne Streptavidin C1 ; 65001 ; ThermoFisher Scientifics) sur la nuit à +4°C sous agitation. Après incubation, la fraction de protéines non-fixées aux billes (ie. flow-through, FT) a été récupérée et les billes ont été lavées une fois en tampon de lavage 1 (2% SDS en dH₂O), une fois en tampon de lavage 2 (0.2% deoxycholate, 1% Triton X-100, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 50 mM Hepes, pH 7.5), une fois en tampon de lavage 3 (250 mM LiCl, 0.5% NP-40, 0.5% deoxycholate, 1% Triton X-100, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA and 10 mM Tris, pH 8.1) et une fois en tampon de lavage 4 (50 mM Tris, pH 7.4, and 50 mM NaCl) pendant 10min à température ambiante sous agitation. Les billes ont ensuite été resuspendues dans 100µl d'ammonium bicarbonate 50mM. 10% de chaque échantillon ont été utilisés pour l'analyse en western-blot et la validation des contrôles (expression et purification des protéines biotinylées) et 90% ont été utilisés pour l'analyse en spectrométrie de masse.

X. Purification des protéines biotinylées : protocole final optimisé

Pour les expériences de BioID optimisées, deux boîtes de 10cm de diamètre de cellules 293T (soit 6.10^6 cellules plaquées initialement) ont été transfectées (par condition) avec les différentes constructions indiquées. Vingt-quatre heures après transfection, les cellules ont été traitées puis lysées comme décrit dans l'article de référence (Firat-Karalar and Stearns, 2015). Les cellules ont été soniquées deux fois à amplitude 40% (1min ; 30s on, 30s off) et deux fois à amplitude 60% (1 min ; 30s on, 30s off). Les lysats cellulaires ont ensuite été préparés de la même manière que dans le protocole initial. Les lysats cellulaires ont été incubés avec 180µl de billes de streptavidine par boîte (Dynabeads MyOne Streptavidin C1 ; 65001 ; ThermoFisher Scientifics) sur la nuit à +4°C sous agitation. Après purification, la fraction de protéines non-fixées aux billes (ie. flow-through, FT) a été récupérée et les billes ont été lavées selon le protocole initial, à l'exception du lavage 4 (50 mM Tris, pH 7.4, and 50 mM NaCl) qui a été réalisé trois fois afin d'éliminer les détergents pouvant interférer avec l'analyse en spectrométrie de masse. Les billes ont ensuite été resuspendues dans 200µl

d'ammonium bicarbonate 50mM. 10% de chaque échantillon ont servi pour l'analyse en western-blot et la validation des contrôles (expression et purification des protéines biotinylées) et 90% ont été utilisés pour l'analyse en spectrométrie de masse.

XI. Analyse qualitative en spectrométrie de masse

L'analyse a été réalisée par la plateforme de protéomique Protein Science Facility de l'IBCP (Institut de Bio-Chimie des Protéines) à Lyon.

Le protocole est décrit dans les méthodes du chapitre 1, relatives à l'article.

XII. Analyse quantitative en spectrométrie de masse

L'analyse a été réalisée par la plateforme de protéomique Protein Science Facility de l'IBCP (Institut de Bio-Chimie des Protéines) à Lyon.

Après les étapes de lavages, les billes ont été lavées en NH_4CO_3 50mM. Les protéines fixées aux billes ont été réduites à l'aide de DTT 200mM et alkylées avec 200mM de Iodoacétamide. La digestion a été faite avec de la trypsine (1/100 ; Promega) sur la nuit à 37°C. Après dessalage sur cartouche C18 (appareil Harvard), les échantillons ont été analysés par stratégie quantitative sans étiquetage à l'aide d'un Ultimate 3000 nano-RSLC (Thermo Scientific, San Jose California) couplé avec un spectromètre de masse Q Exactive HF via une source d'ionisation nano-electrospray (Thermo Scientific, San Jose California).

Les échantillons ont été injectés puis déposés sur une colonne trap C18 Acclaim PepMap100 75 μm ID x 2 cm, 3 μm , 100Å, (Thermo Scientific) pendant 3min à 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ avec % ACN, 0.05% TFA et ensuite séparés sur une colonne nano a C18 Acclaim Pepmap100 50 cm x 75 μm i.d, 2 μm , 100 Å (Thermo Scientific) sur un gradient linéaire de 3.2% à 40% de tampon (100% ACN, 0.1% FA) pendant une heure puis sur un gradient linéaire de 40% à 90% de tampon (100% ACN, 0.1% FA) pendant 2min, maintenus pendant 10min puis ensuite retournés aux conditions initiales en une minute pour 14min. La durée totale a été fixée à 90min à raison de 300nL/min. La température a été maintenue à 40°C.

Les échantillons ont été analysés en triplicats par méthode TOP20 HCD : les données de spectrométrie de masse ont été acquises par stratégie dépendante des données sélectionnant les éléments de fragmentation basés sur les 20 ions précurseurs les plus abondants dans

l'analyse de sondage par balayage (350-1600Th). La résolution du scan a été de 60000 à m/z de 200Th et pour le scan MS/MS de 15000 à m/z 200Th. La valeur cible de l'ion précurseur pour le scan dans l'Orbitrap et le scan MS/MS ont été respectivement fixés à $3 \cdot 10^6$ et $1 \cdot 10^5$ et le temps maximum d'injection a été fixé à 60ms pour les scans MS et MS/MS. Les paramètres d'acquisition du spectre HCD MS/MS sont les suivants : une énergie de collision de 27 et la profondeur d'isolation de 2 m/z. Les précurseurs avec un état de charge inconnu, de 1, de 8 ou supérieur à 8 ont été exclus. Les peptides sélectionnés pour l'acquisition MS/MS ont ensuite été placés sur une liste d'exclusion pendant 30s en utilisant le mode d'exclusion dynamique pour limiter les duplications de spectre. Les données obtenues ont été analysées à l'aide de Proteome Discover 2.2 en utilisant l'algorithme SEQUEST HT contre la base de donnée humain Swissprot (version 2018-09, 20332 séquences) complétée avec la base de données HTLV Uniprot (version 2018-09, 3298 séquences) et les séquences de BirA* et de la streptavidine. La tolérance de masse de l'ion précurseur a été fixée à 10ppm et la tolérance de masse des fragments à 0.02 Da, et jusqu'à deux clivages non réalisés ont été autorisés. L'oxydation (M), l'acétylation (extrémité N-terminale des protéines) ont été fixées comme modifications variables et la carbamidométhylation (C) comme modification fixe. Les peptides et protéines ont été filtrés avec un taux de faux positifs (False Discovery Rate, FDR) à 1% à l'aide d'un percolateur. La quantification des protéines a été faite par LFQ (Label Free Quantification, Quantification sans étiquetage) et les valeurs d'abondance LFQ ont été obtenues pour chaque échantillon, et normalisées par rapport à la quantité totale de peptides. Le ratio d'abondance BirA*-Tax/BirA* a été calculé.

RESULTATS

Le premier chapitre portera sur l'identification par BioID et la confirmation de l'interaction entre Tax et p62 dans l'activation de la voie NF- κ B. Le second chapitre est consacré à l'adaptation de la technologie de biotinylation *in situ* pour l'identification de nouveaux partenaires de Tax localisés au centrosome. Dans le troisième chapitre, nous nous intéresserons particulièrement à la caractérisation préliminaire de l'interaction entre Tax et la protéine centrosomale Cep63 identifiée par BioID. Enfin, dans le contexte plus général de l'oncogenèse virale, nous aborderons dans le quatrième chapitre l'application de la technique de BioID aux protéines BNRF1 d'EBV et E7 d'HPV-16

CHAPITRE 1 : IDENTIFICATION PAR BioID DE P62 COMME PARTENAIRE DE TAX DANS L'ACTIVATION DE LA VOIE NF- κ B

Résultats principaux de l'étude

L'adaptation de l'expérience de BioID à Tax pour l'identification spécifique de partenaires de Tax dans la voie NF- κ B a nécessité la validation de la construction BirA*-Tax que j'ai pris en charge préalablement à l'expérience de BioID.

L'expression de la construction BirA*-Tax a été vérifiée. L'ubiquitination de BirA*-Tax a été validée par Ni-NTA dénaturant. L'activation de la voie NF- κ B par BirA*-Tax a été validée par essai luciférase. Enfin, la capacité de BirA*-Tax à induire une biotinylation de proximité a été confirmée par western-blot et immunofluorescence.

L'expérience de BioID nous a permis d'identifier p62, une protéine connue pour être un récepteur cargo de la macro-autophagie sélective (Svenning and Johansen, 2013) et pour être impliquée dans l'activation de la voie NF- κ B en aval d'une stimulation par le TNF α et l'IL-1 (Interleukine 1) (Zotti et al., 2014), comme un potentiel partenaire de Tax. J'ai pris en charge la validation de l'interaction entre p62 et Tax par co-immunoprécipitation en lignées cellulaires chroniquement infectées par HTLV-1. La caractérisation de l'interaction et son analyse fonctionnelle ont été menées par Aurélien Schwob. Ce travail conjoint a fait l'objet de l'article en révision à Scientific Reports.

Nous avons démontré que p62 était requise pour une activation efficace de la voie NF- κ B par Tax et que p62 était associée au signalosome Tax/IKK dans les cellules infectées par HTLV-1. De plus, nous avons montré que le domaine 170-206 de p62 est nécessaire et suffisant pour

son interaction avec Tax *in vitro*. Cependant, nous avons observé que ce domaine n'est pas nécessaire pour l'activité potentiatrice de p62 sur Tax. Le mutant Δ UBA de p62 défectif pour lier les chaînes d'ubiquitine ne potentialise lui pas l'activité de Tax, ce qui indique que p62 pourrait potentialiser l'activité de Tax en favorisant l'association de chaînes d'ubiquitine avec le signalosome Tax/IKK. Ces résultats mettent en évidence le rôle modulateur de p62 de l'activation ubiquitine-dépendante de la voie NF- κ B par Tax au niveau de l'appareil de Golgi soulignant ainsi l'importance de l'ubiquitine dans l'activité de signalisation de Tax et suggérant son rôle dans la transformation cellulaire médiée par Tax.

Pour faciliter la lecture du manuscrit, l'article est disponible dans la partie Publications en fin de manuscrit.

CHAPITRE 2 : IDENTIFICATION PAR BioID DES PARTENAIRES CENTROSOMAux DE L'ONCOPROTEINE VIRALE TAX D'HTLV-1

I. Caractérisation phénotypique des altérations centrosomales induites par Tax

1. Tax est une protéine associée au centrosome

Dans la littérature, Tax est décrite comme une protéine localisée au centrosome (Ching et al., 2006; Nitta et al., 2006; Peloponese et al., 2005). Comme mentionné en introduction, le centrosome est un organelle dynamique servant de plateforme de signalisation notamment pour l'initiation de la réponse aux dommages à l'ADN (pour revue, Mullee et Morrison 2016) mais fonctionnant également comme centre organisateur des microtubules. Par conséquent, pour mener à bien ses fonctions, le centrosome est le siège de nombreuses interactions transitoires entre protéines centrosomales et autres protéines cellulaires apportées au niveau du centrosome via le réseau de microtubules. Ainsi, ces protéines-là sont parfois localisées à proximité du centrosome et il se peut qu'il en soit de même pour Tax. Il a donc été important de vérifier que la construction de Tax dont nous disposons était bien localisée au centrosome (et non sur les microtubules à proximité).

Pour cela, le réseau de microtubules est dépolymérisé par un traitement au Nocodazole de courte durée et la localisation de Tax est analysée en cellules U2OS exprimant de façon stable la centrine1-GFP (appelées par la suite U2OS C1G) par immunofluorescence (*Figure 20*). Tax est révélée avec un anticorps anti-his. L'anticorps anti- α Tubuline et la centrine1-GFP mettent en évidence le réseau de microtubules et le centrosome respectivement. La coloration au DAPI met en évidence les noyaux.

En absence de traitement au Nocodazole, l' α Tubuline met en évidence le réseau structuré des microtubules au sein de la cellule (*Figure 20*, ligne 1). Ici, Tax est principalement localisée dans le noyau. De plus, nous observons une colocalisation de Tax avec la centrine1-GFP, ce qui montre une localisation de Tax au niveau du centrosome. Il est important de noter ici que cette localisation est représentative d'une partie de la population cellulaire seulement. L'efficacité du traitement au Nocodazole sur la dépolymérisation des microtubules est visualisée par un réseau déstructuré des microtubules et un aspect granuleux de l' α Tubuline dans les cellules (*Figure 20*, ligne 2). Après traitement, nous observons un maintien de la

colocalisation de Tax avec la centrine1-GFP. Ici Tax est localisée au niveau du centrosome, même après dépolymérisation du réseau de microtubules. La localisation de Tax au centrosome est donc indépendante du réseau de microtubules.

Ainsi, la construction de Tax dont nous disposons code bien pour une protéine Tax adressée en partie au centrosome.

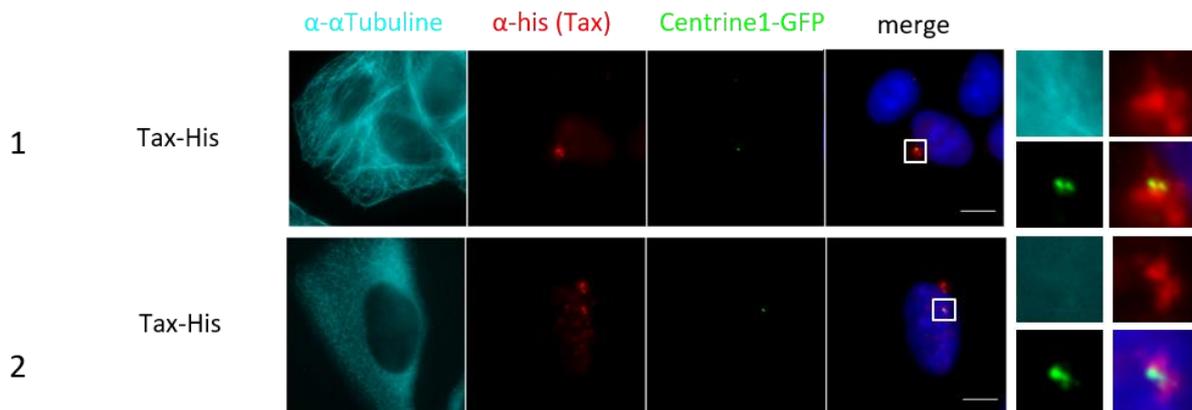


Figure 20. Tax est une protéine associée au centrosome. *Tax-his a été transfectée en cellules U2OS exprimant constitutivement la centrine1-GFP et exprimées durant 24h. Les cellules ont été traitées ou non au nocodazole (5μg/ml) pendant 1h à 37°C. Les cellules ont ensuite été fixées au méthanol froid et marquées à l'aide d'anticorps α-α-tubuline (cyan) et α-His (Tax, rouge). Les centrosomes sont détectés par fluorescence directe de la centrine1-GFP (vert). L'ADN est contre-coloré au DAPI (bleu). Echelle = 10μm.*

2. Tax altère l'aspect de la centrine1 au centrosome

Préalablement aux expériences de BioID qui nous permettent de mieux comprendre comment Tax induit des altérations du centrosome en interagissant avec des protéines centrosomales, nous avons souhaité vérifier que la construction de Tax dont nous disposons était capable d'induire des altérations du centrosome.

Nous avons donc choisi d'analyser l'aspect de trois marqueurs centrosomaux : la centrine1, protéine localisée à l'extrémité distale des centrioles, Cep152, protéine du matériel péricentriolaire située à l'extrémité proximale des centrioles et la γ-tubuline, protéine du matériel péricentriolaire (Sir et al., 2011).

Pour cela, Tax a tout d'abord été clonée dans un vecteur d'expression contenant une courte étiquette de six histidines. Tax-his (nommée par la suite Tax dans le texte pour faciliter la

lecture) a été exprimée en cellules U2OS C1G durant 72h et l'aspect de la centrine1-GFP, de Cep152 et de la γ -tubuline a été analysé par immunofluorescence (*Figure 21*). Nous choisissons de nous placer dans une cinétique de 72h d'expression compte tenu du fait que les études analysant les altérations du centrosome en présence de Tax se placent à 72h post-transfection de Tax.

Sur le panel du haut, en absence de Tax, nous observons deux points de γ -tubuline colocalisant avec deux points de centrine1-GFP (cellule représentative au sein de la population cellulaire). Il s'agit ici d'un centrosome normal. En revanche, en présence de Tax, nous observons de multiples points de centrine1-GFP et deux points de γ -tubuline colocalisant avec deux points seulement de centrine1-GFP.

Nous obtenons des résultats similaires avec le marquage Cep152. En effet, sur le panel du bas, en absence de Tax, nous observons deux points de Cep152 colocalisant avec deux points de centrine1-GFP. En présence de Tax, nous observons de multiples points de centrine1-GFP et deux points de Cep152 colocalisant avec deux points seulement de centrine1-GFP.

Contrairement à la centrine1-GFP, les marqueurs centrosomaux γ -tubuline et Cep152 ne sont donc pas altérés en présence de Tax. Ainsi, la construction de Tax dont nous disposons induit des altérations centrosomales. Par la suite, la centrine1-GFP sera utilisée comme marqueur pour suivre les altérations centrosomales induites par Tax.

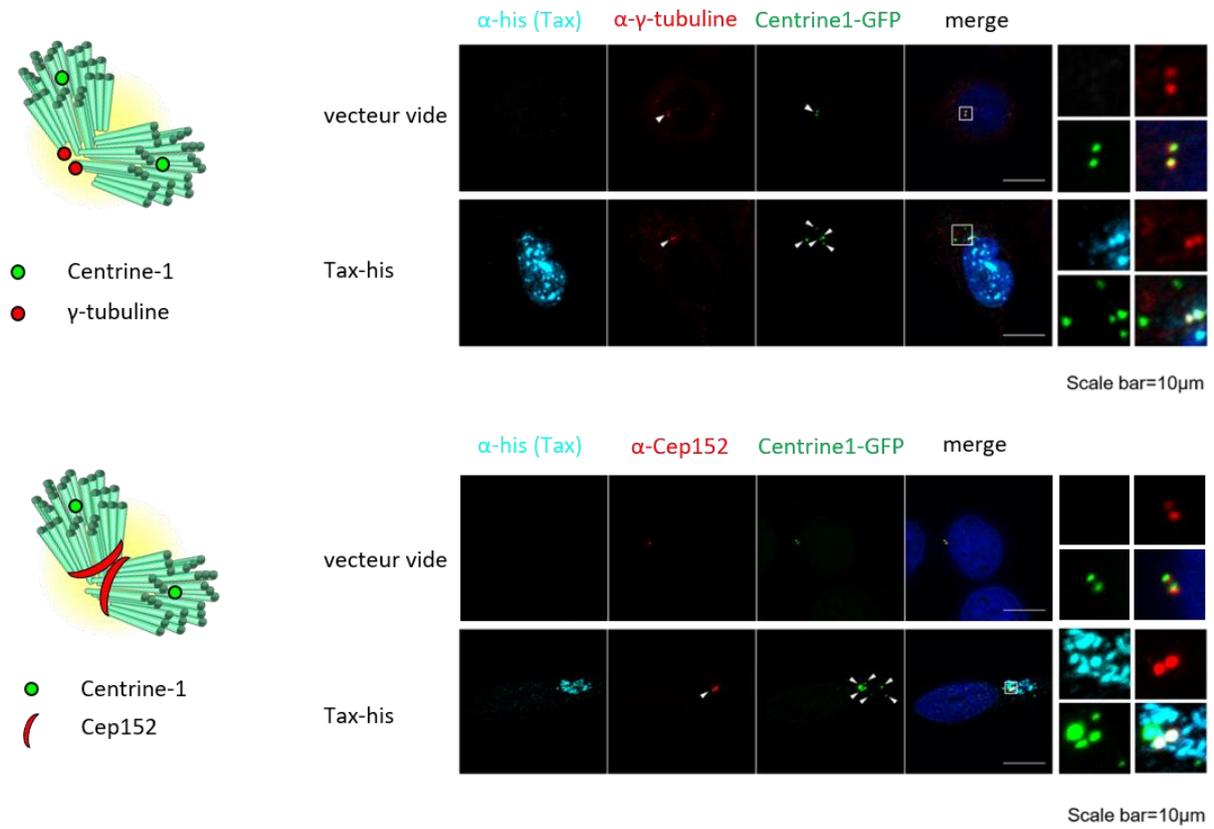


Figure 21. Tax altère l'aspect de la centrine1 au centrosome. Les différentes constructions ont été exprimées en cellules U2OS C1G pendant 72h. Les cellules ont ensuite été fixées au méthanol froid et marquées à l'aide d'un anticorps α -his (Tax, cyan), α - γ -tubuline (rouge, panel du haut) marquant le matériel péri-centriolaire et α -Cep152 (rouge, panel du bas) marquant l'extrémité proximale des centrioles. La centrine1-GFP permet une détection directe de l'extrémité distale des centrioles (vert). Les noyaux sont contre-colorés au DAPI (bleu). Echelle = 10 μ m.

II. Validation de la construction BirA*-Tax pour l'identification de partenaires centrosomaux de Tax

L'identification de nouveaux partenaires de Tax au centrosome par la technique de BioID a requis dans un premier temps la validation de la construction myc-BirA*-Tax-his (nommée par la suite BirA*-Tax dans le texte pour faciliter la lecture) pour l'identification spécifique de partenaires centrosomaux de Tax. Nous avons donc analysé la localisation subcellulaire de BirA*-Tax en nous intéressant particulièrement à sa localisation centrosomale ainsi que sa capacité à induire une altération des centrosomes.

1. BirA*-Tax présente une distribution de sa localisation cellulaire similaire à Tax

a. BirA*-Tax présente une localisation cellulaire similaire à Tax

Vérifier que BirA*-Tax présente une localisation centrosomale similaire à celle de Tax est crucial pour l'identification pertinente de nouveaux partenaires centrosomaux de Tax.

Pour comparer la localisation cellulaire des deux protéines, Tax et BirA*-Tax ont été exprimées durant 24h en cellules U2OS C1G ou en cellules 293T et la localisation des deux protéines a été analysée par immunofluorescence. Les cellules U2OS C1G sont classiquement utilisées pour les analyses en microscopie du centrosome, de par leur aspect relativement « plat » et le fait que l'expression de p53 ne soit pas altérée dans ces cellules (pas d'altérations indirectes du centrosome dues à p53). Les cellules 293T sont ici utilisées comme contrôle puisqu'elles seront utilisées pour l'expérience de BioID. Les protéines virales ont été révélées à l'aide d'un anticorps anti-his. L'anticorps anti-GM130 (130 kDa cis-Golgi matrix protein) révèle le cis-Golgi et la centrine1-GFP (dans les U2OS C1G) ou la γ -tubuline (dans les 293T) révèlent respectivement les centrioles et le matériel péricentriolaire et donc de manière plus générale le centrosome. La coloration au DAPI met en évidence les noyaux.

Dans les cellules U2OS C1G, les cellules exprimant Tax peuvent être classées en quatre catégories (*Figure 22*). Dans certaines cellules, Tax colocalise avec les protéines GM130 et la centrine1-GFP et n'est pas exprimée dans les autres compartiments cellulaires (ligne 1). Dans ces cellules Tax est strictement localisée au niveau de l'appareil de Golgi et du centrosome, ce qui concorde avec les données de la littérature (Journo et al., 2009; Kfoury et al., 2008b, 2011).

Dans d'autres cellules, cette localisation est parfois associée à une localisation nucléaire (ligne 3) ou en périphérie du noyau (dite « périnucléaire », ligne 5). Dans le noyau, Tax présente un aspect ponctiforme. Il s'agit ici des *nuclear speckles* de Tax décrits dans la littérature qui sont le signe de la transactivation du génome cellulaire (Semmes and Jeang, 1996). Enfin, dans certaines cellules, Tax ne colocalise pas avec la centrine1-GFP et n'est donc pas retrouvée spécifiquement au niveau du centrosome mais dans tous les compartiments cellulaires : dans le noyau, en périphérie du noyau, et dans le cytoplasme.

De façon intéressante, la localisation de Tax dans la cellule semble s'accorder avec son niveau d'expression. Les cellules exprimant très peu Tax présentent une localisation de cette dernière strictement au niveau de l'appareil de Golgi et du centrosome. Les cellules exprimant plus Tax, présentent une localisation au niveau de l'appareil de Golgi et du centrosome et dans le noyau ou en périphérie du noyau. Enfin, dans les cellules où le niveau d'expression de Tax est le plus élevé, Tax présente une localisation dans le noyau, en périphérie du noyau et dans le cytoplasme sans que la protéine soit localisée au niveau de l'appareil de Golgi et du centrosome.

Lorsque nous comparons la localisation de BirA*-Tax à celle de Tax, nous pouvons à nouveau observer ces quatre types de localisation corrélant également avec le niveau d'expression de la protéine (lignes 2, 4, 6 et 8). Cependant, une différence est à noter : l'aspect de la localisation de BirA*-Tax dans le noyau (lignes 4 et 8). En effet, contrairement à Tax, BirA*-Tax présente non pas un aspect ponctiforme mais plus diffus dans le noyau. Les *nuclear speckles* sont plus petits et beaucoup moins fréquents. Comme nous nous intéressons à la fraction de Tax localisée au niveau du centrosome, nous pouvons tout de même mener à bien le projet. Les localisations cellulaires de Tax et BirA*-Tax ont également été comparées en cellules 293T (*Figure 23* et *Figure 24*). Ici, les quatre catégories de localisation sont retrouvées pour les deux protéines : « Appareil de Golgi/centrosome » (lignes 1 et 2 ; *Figure 23* et *Figure 24*), « Appareil de Golgi/centrosome et nucléaire » (lignes 3 et 4 ; *Figure 23* et *Figure 24*), « Appareil de Golgi/centrosome et périnucléaire » (lignes 5 et 6 ; *Figure 23* et *Figure 24*) et « Nucléaire, périnucléaire et cytoplasmique » (lignes 7 et 8 ; *Figure 23*). De même, la localisation semble s'accorder avec le niveau d'expression de la protéine.

Ainsi, BirA*-Tax présente une diversité de sa localisation cellulaire similaire à celle de Tax, en particulier au niveau du centrosome.

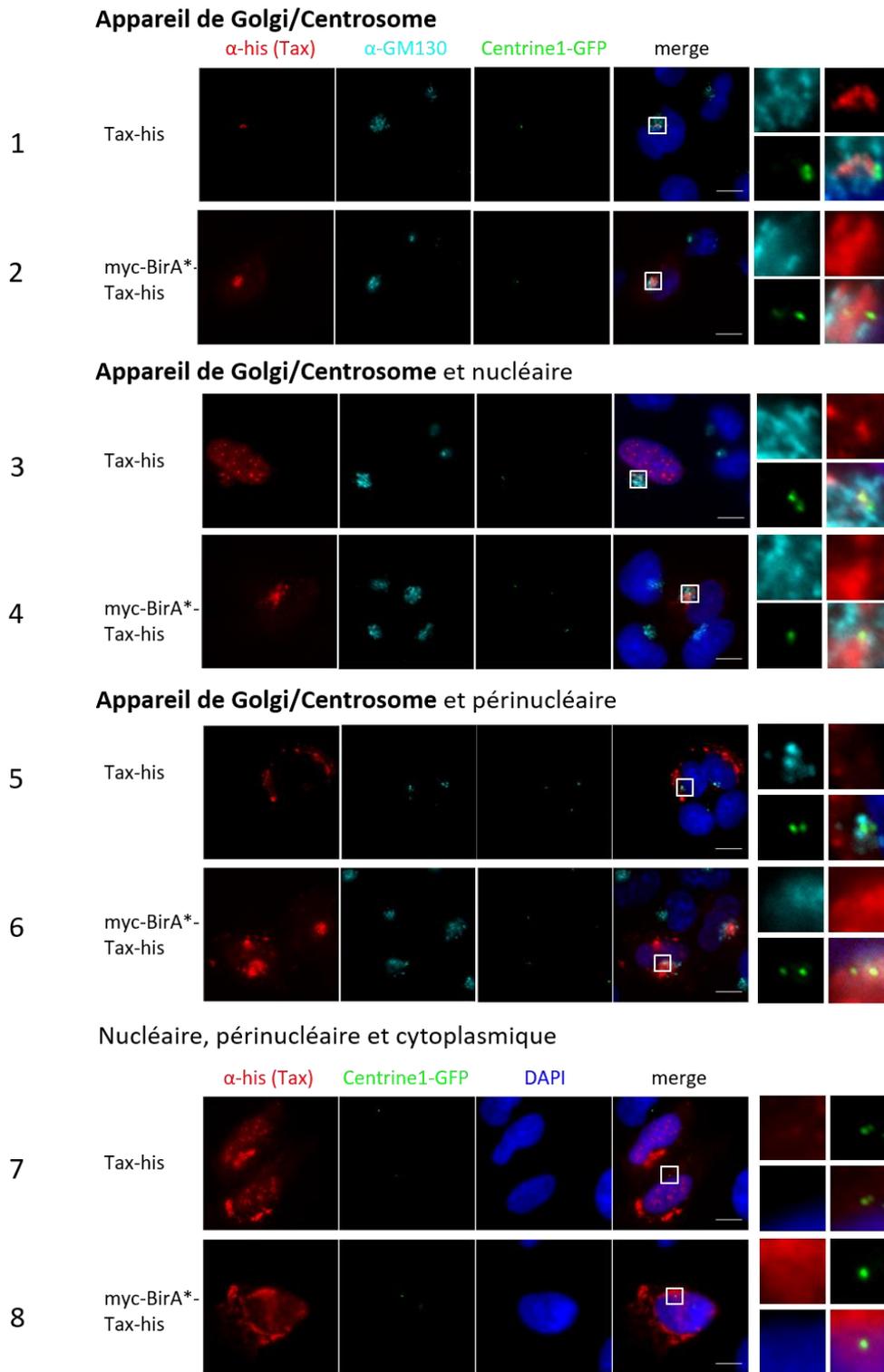


Figure 22. BirA*-Tax présente une localisation cellulaire similaire à Tax en cellules U2OS C1G. Les différentes constructions ont été transfectées en cellules U2OS exprimant constitutivement la centrine1-GFP et exprimées durant 24h. Les cellules ont ensuite été fixées au méthanol froid et marquées à l'aide d'anticorps α -his (Tax, rouge) et α -GM130 (cyan). Les centrosomes sont détectés par fluorescence directe de la centrine1-GFP (vert). L'ADN est contre-coloré au DAPI (bleu). Echelle = 10 μ m. Des cellules représentatives de chaque type de localisation sont représentées.

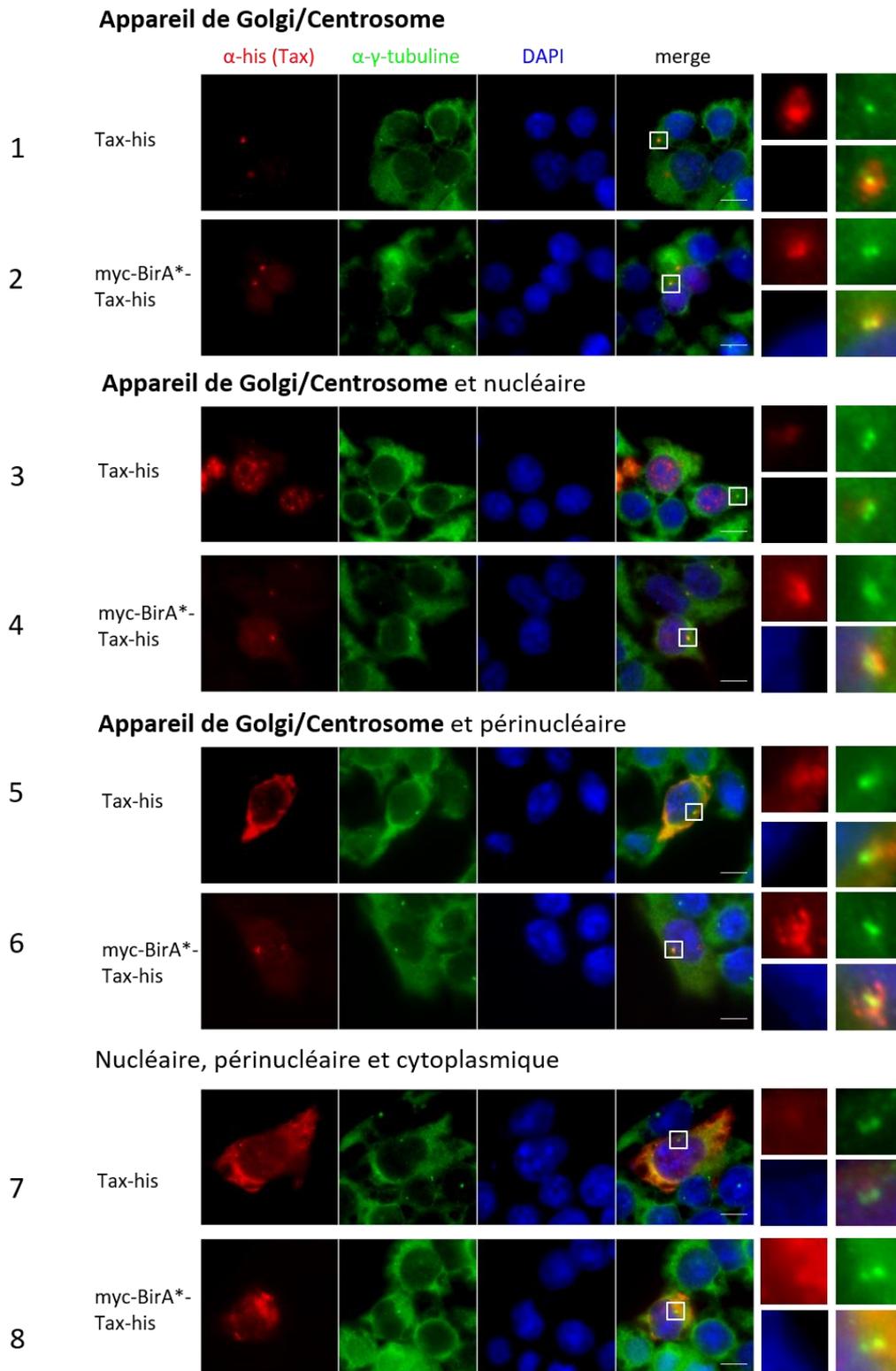


Figure 23. BirA*-Tax présente une localisation cellulaire similaire à Tax en cellules 293T – Marquage du centrosome. Les différentes constructions ont été transfectées en cellules 293T et exprimées durant 24h. Les cellules ont été fixées au méthanol froid et marquées à l'aide d'anticorps α -his (Tax, rouge) et α - γ -tubuline (vert). L'ADN est contre-coloré au DAPI (bleu). Echelle = 10 μ m. Des cellules représentatives de chaque type de localisation sont représentées.

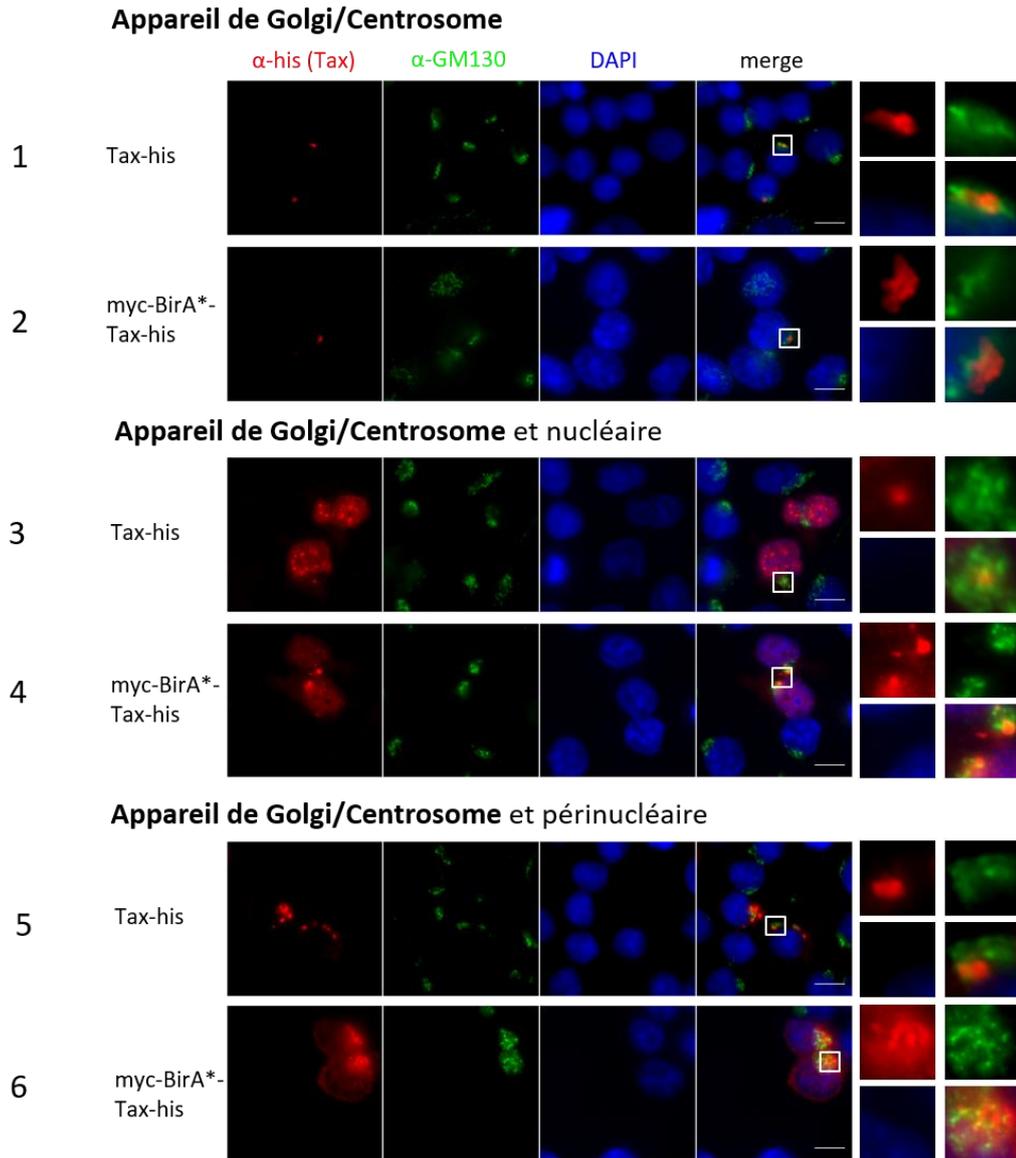


Figure 24. BirA*-Tax présente une localisation cellulaire similaire à Tax en cellules 293T – Marquage de l'appareil de Golgi. Les différentes constructions ont été transfectées en cellules 293T et exprimées durant 24h. Les cellules ont été fixées au méthanol froid et marquées à l'aide d'anticorps α -his (Tax, rouge) et α -GM130 (vert). L'ADN est contre-coloré au DAPI (bleu). Echelle = 10 μ m. Des cellules représentatives de chaque type de localisation sont représentées.

- b. La distribution de la localisation subcellulaire de Tax et BirA*-Tax est similaire au sein d'une population cellulaire

Nous nous sommes par la suite demandé en quelles proportions les différentes localisations de Tax décrites ci-dessus étaient représentées au sein d'une population cellulaire (*Figure 25*). Pour cela, les constructions Tax et BirA*-Tax ont été exprimées en cellules U2OS C1G durant 24h et le pourcentage de cellules présentant un des types de localisation identifiés préalablement a été évalué par immunofluorescence. Au minimum cent cellules ont été comptées par condition.

La distribution de la localisation de BirA*-Tax au sein de la population cellulaire est similaire à celle de Tax pour les localisations « Appareil de Golgi/Centrosome » et « Appareil de Golgi/Centrosome et nucléaire ». En effet, respectivement 11% et 8% des cellules présentent une localisation « Appareil de Golgi/Centrosome » en présence de Tax et BirA*-Tax. De même, respectivement 46% et 44% des cellules présentent une localisation « Appareil de Golgi/Centrosome ». Cependant on peut noter un léger déplacement de population pour la localisation « Nucléaire, périnucléaire et cytoplasmique » en faveur d'une localisation « Appareil de Golgi/Centrosome et périnucléaire » pour la condition BirA*-Tax. En effet, 2% des cellules présentent une localisation « Appareil de Golgi/Centrosome et périnucléaire » en présence de Tax. Ce pourcentage passe à 23% en présence de BirA*-Tax. De même, 41% des cellules présentent une localisation « Nucléaire, périnucléaire et cytoplasmique » et présence de Tax, et ce pourcentage passe à 25% en présence de BirA*-Tax. Il est important de noter ici que quelle que soit la construction (Tax ou BirA*-Tax) plus de la moitié de la population cellulaire présente une localisation de Tax au niveau de l'appareil de Golgi et du centrosome, avec respectivement 59% et 75% des cellules présentant une localisation en partie au niveau de l'appareil de Golgi/Centrosome en présence de Tax et BirA*-Tax.

Ainsi, de par sa localisation similaire à Tax, BirA*-Tax est pertinente pour identifier des partenaires cellulaires de Tax, et notamment des partenaires de Tax localisés au niveau de l'appareil de Golgi et du centrosome.

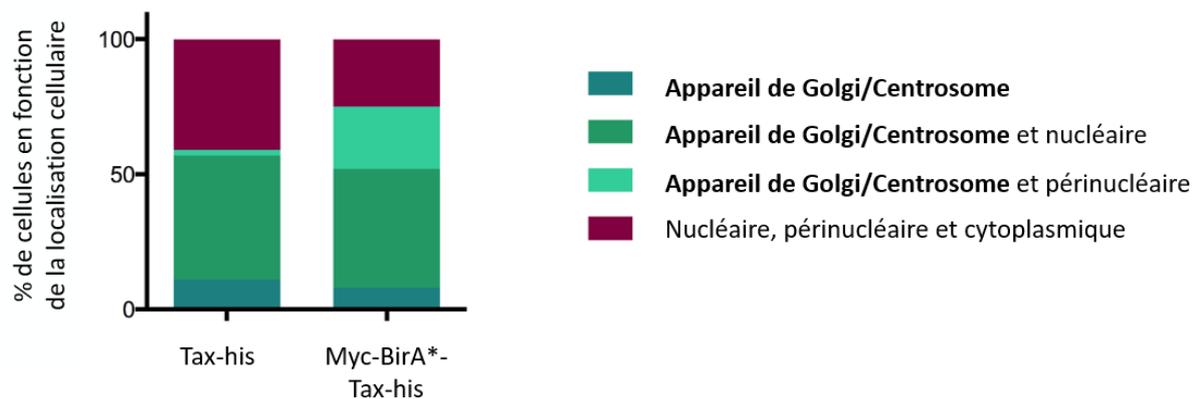


Figure 25. BirA*-Tax présente une localisation similaire à Tax au sein d'une population cellulaire. Les différentes constructions ont été transfectées en cellules U2OS exprimant constitutivement la centrine1-GFP et exprimées durant 24h. Les cellules ont ensuite été fixées au méthanol froid et marquées à l'aide d'anticorps α -GM130 (cyan) et α -his (Tax, rouge). Les centrosomes sont détectés par fluorescence directe de la centrine1-GFP (vert). L'ADN est contre-coloré au DAPI (bleu). Echelle = 10 μ m. Le pourcentage de cellules a été évalué en fonction de leur localisation cellulaire : « Appareil de Golgi/Centrosome », « Appareil de Golgi/Centrosome et nucléaire », « Appareil de Golgi/Centrosome et périnucléaire » et « Nucléaire, périnucléaire et cytoplasmique ». Au minimum, 100 cellules ont été comptées pour chaque condition.

2. BirA*-Tax induit des altérations centrosomales numériques de manière similaire à Tax

Toujours dans l'objectif de valider la construction BirA*-Tax pour la recherche de nouveaux partenaires impliqués dans les altérations centrosomales induites par Tax, nous avons comparé la capacité de BirA*-Tax à induire des altérations du centrosome de manière aussi efficace que Tax. Pour cela, les constructions Tax et BirA*-Tax ont été exprimées durant 72h en cellules U2OS C1G.

Pour caractériser les altérations du centrosome, nous avons visualisé l'aspect de la centrine 1-GFP, dans ces cellules (Figure 26A, cf. partie I p.126). Sur le panel A présentant l'aspect du centrosome majoritairement observé (première ligne), lorsque le vecteur vide est exprimé, nous observons seulement deux points de centrine1-GFP, correspondant aux deux centrioles d'un « centrosome normal ». En revanche, dans les cellules exprimant Tax ou BirA*-Tax, nous observons plus de quatre points de centrine1-GFP dans une seule cellule (panel A, lignes 2 à 5), considérés comme des « centrosomes anormaux ». Nous avons par la suite évalué le

pourcentage de cellules présentant des centrosomes anormaux en comparant les trois conditions de transfection (vecteur vide, Tax ou BirA*-Tax ; *Figure 26B*). Dans les conditions Tax et BirA*-Tax, l'aspect du centrosome est évalué uniquement dans les cellules exprimant ces protéines. Ici, nous observons une augmentation significative de la proportion de cellules présentant des centrosomes anormaux par rapport au contrôle négatif (vecteur vide) en présence de Tax. En effet ce pourcentage passe de 15% à 44% (médiane des cinq expériences) de cellules présentant des centrosomes anormaux en présence de Tax. Si l'on compare BirA*-Tax à Tax, nous n'observons aucune différence significative du pourcentage de cellules présentant des altérations centrosomales avec 35% des cellules présentant des centrosomes anormaux en présence de BirA*-Tax.

Ces résultats montrent que la fréquence des cellules présentant des altérations centrosomales en présence BirA*-Tax est similaire à Tax. Ainsi, BirA*-Tax est pertinente pour identifier par BioID des partenaires cellulaires de Tax, et notamment des partenaires de Tax localisés au niveau du centrosome.

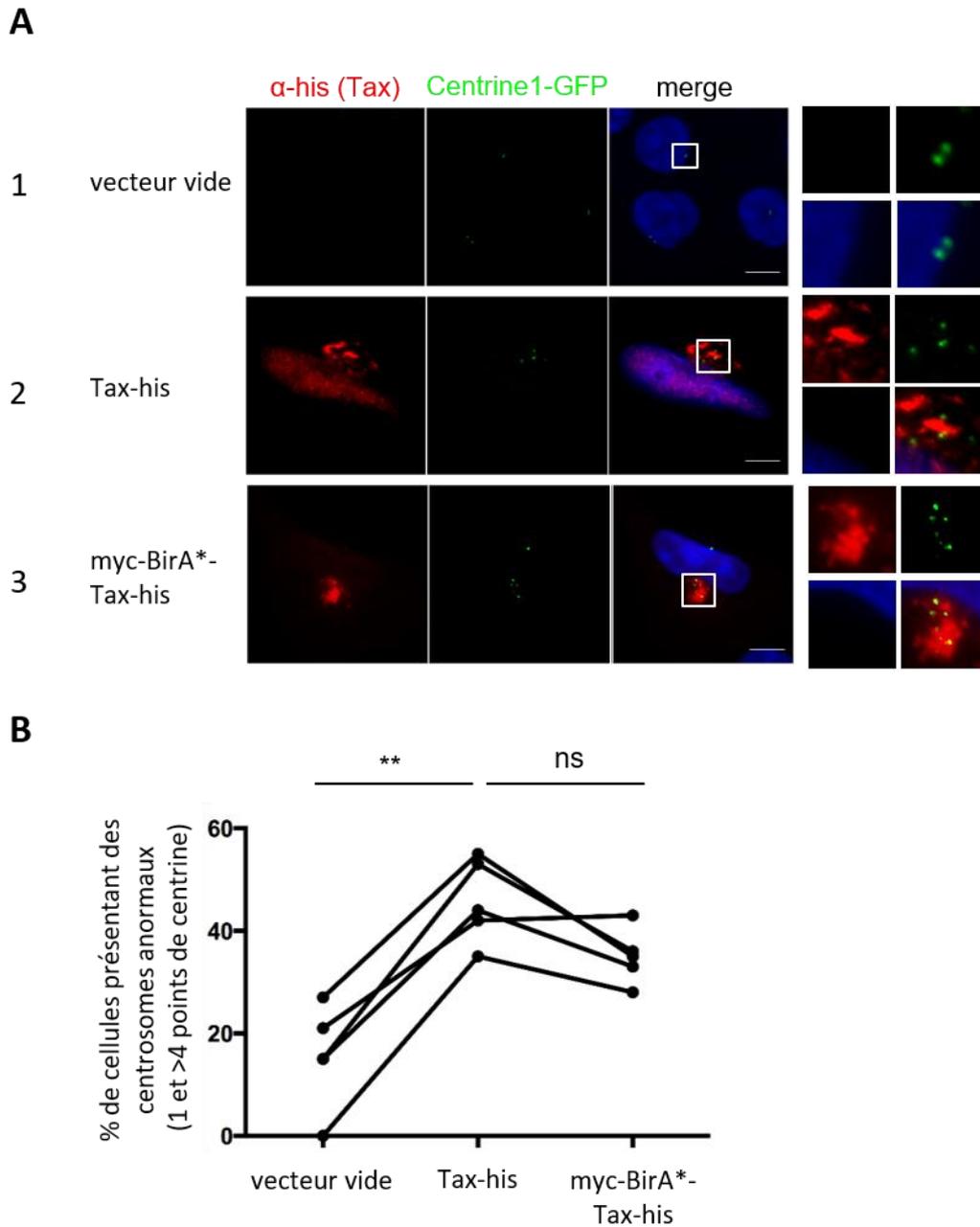


Figure 26. BirA*-Tax induit une altération des centrosomes similaire à Tax. (A, B) Les différentes constructions ont été transfectées en cellules U2OS exprimant constitutivement la centrine1-GFP et exprimées durant 72h. Les cellules ont ensuite été fixées au méthanol froid et marquées à l'aide d'anticorps α -His (Tax, rouge). Les centrosomes sont détectés par fluorescence directe de la centrine1-GFP (vert). L'ADN est contre-coloré au DAPI (bleu). (A) Deux cellules représentatives pour chacune des conditions sont représentées avec une altération des centrosomes (1 et > 4 points de centrine1-GFP). Echelle = 10 μ m. (B) Les cellules présentant un nombre anormal de centrosomes (1 et > 4 points de centrine1-GFP) ont été dénombrées parmi la population totale (vecteur vide) ou parmi les cellules Tax-positives (Tax-his et myc-BirA*-Tax-his). Au minimum, 100 cellules ont été comptées pour chaque condition. Chaque ligne représente une expérience indépendante. Test statistique de Kruskal-Wallis ; ns = non significatif ; ** : <0.001.

III. L'analyse des données de BioID permet l'identification de potentiels partenaires centrosomaux de Tax

1. Purification des protéines biotinylées

L'analyse des échantillons par spectrométrie de masse nécessite une ultime condition : obtenir une quantité de protéine suffisamment importante pour permettre l'analyse par spectrométrie de masse.

Pour cela, nous avons conservé le protocole optimisé et doublé la quantité initiale de cellules par condition de transfection en conservant le même ratio « billes/quantité initiale de protéines » (*Figure 27* ; optimisations détaillées dans l'annexe n°1).

Chaque condition de transfection a été réalisée en double : une pour la validation des contrôles (biotinylation, purification et quantité de protéines biotinylées) et une pour analyse en spectrométrie de masse. Pour que les contrôles soient valides pour l'analyse en spectrométrie de masse, il est nécessaire de détecter par western-blot la présence de protéines biotinylées après traitement à la biotine lorsque BirA* est exprimé dans les lysats totaux mais surtout après purification sur billes de streptavidine. Il est également nécessaire de détecter des protéines après migration des protéines sur gel (lysats totaux et fractions purifiées) et coloration au bleu de Coomassie. Comme précédemment, 1/100 du lysat total pour les inputs et 1/10 du volume après élution sont déposés pour l'analyse en western-blot. Les intensités des bandes sont donc dix fois plus faibles dans les inputs et les flow-throughs que ce qu'elles devraient être comparées aux éluions. De même, 1/100 et 9/10 du volume ont été déposés respectivement pour les inputs et flow-throughs et après élution pour la coloration au bleu de Coomassie. Ramenées à la même quantité de protéines déposées, les intensités de bandes sont donc environ quatre-vingt-dix fois plus faibles dans les inputs comparées aux éluions.

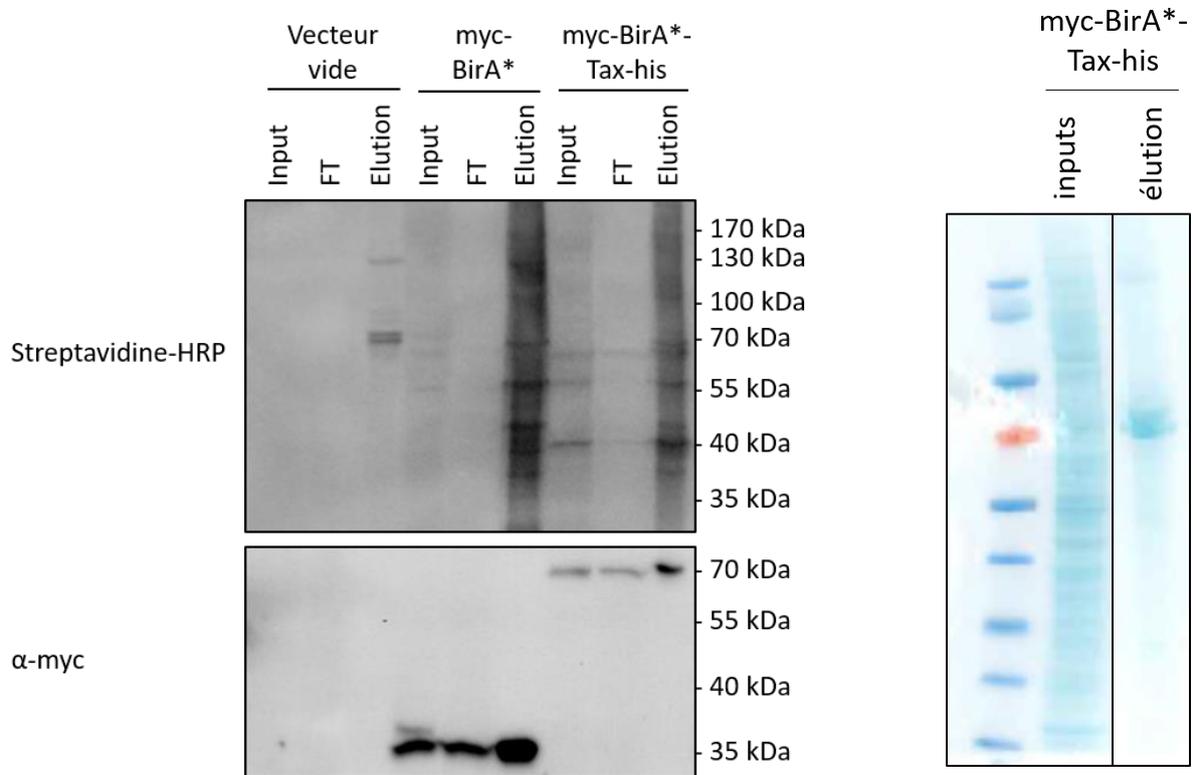


Figure 27. Purification des protéines biotinylées : premier envoi des échantillons pour analyse en spectrométrie de masse. Les différentes constructions ont été transfectées en cellules 293T et exprimées durant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées avec de la biotine (50µM) pendant 18h. Après le traitement, les cellules ont été lysées et les protéines biotinylées purifiées sur une résine de streptavidine pendant 4h à +4°C sous agitation. La présence de protéines biotinylées est mise en évidence par western-blot à l'aide de la streptavidine-HRP dans les lysats totaux (inputs), les FT et après élution. 1/10 du volume pour chaque élution et 1/100 du volume pour les inputs et FT ont été déposés pour l'analyse en WB. 9/10 du volume pour chaque élution et 1/100 du volume pour les inputs et FT ont été déposés sur gel suivi d'une coloration au bleu de Coomassie.

2. Tri initial des données brutes

Nous présentons ici les résultats couplés de la première analyse qualitative réalisée aux deux analyses quantitatives qui ont suivi.

L'analyse qualitative en spectrométrie de masse permet de savoir si les protéines identifiées sont présentes ou absentes d'un échantillon, sans qu'un quelconque ratio d'abondance entre les conditions BirA* et BirA*-Tax soit calculé. Ici, nous nous intéressons aux protéines spécifiquement biotinylées dans la condition BirA*-Tax. L'analyse quantitative nous permet quant à elle de savoir en plus qu'elles sont les protéines qui sont surreprésentées dans la condition BirA*-Tax par rapport à la condition BirA* selon la valeur du ratio d'abondance et la p-value associée.

La valeur du ratio d'abondance est calculée pour chacune des protéines identifiées. Pour chaque protéine, l'abondance est calculé en fonction de la somme des intensités de chaque pic obtenu pour chacun des peptides permettant l'identification de la protéine, et ce dans chacun des échantillons. Ici, le ratio d'abondance calculé pour chacune des protéines identifiées est le rapport de l'abondance en présence de BirA*-Tax sur l'abondance en présence de BirA* (la condition contrôle contre laquelle nous comparons l'échantillon). Il est admis par défaut qu'une protéine est surreprésentée dans l'échantillon lorsque le ratio d'abondance est supérieur à deux (ie. ici, protéine deux fois plus représentée dans l'échantillon BirA*-Tax comparé au contrôle BirA*). Parmi ces protéines surreprésentées, nous considérons uniquement celles dont la p-value associée au calcul du ratio d'abondance est significative (<0.05 ; évènement statistiquement représentatif). Le tri initial des protéines sur ces critères permet de conserver les protéines significativement surreprésentées dans la condition BirA*-Tax.

Pour les analyses quantitatives, nous choisissons de représenter les $\log_2(\text{ratio d'abondance})$ entre BirA* et BirA*-Tax en fonction du $\log_{10}(\text{p-value})$ sous forme de volcano plot pour toutes les protéines identifiées de la première analyse quantitative représentative des deux analyses réalisées (*Figure 29*).

De même que pour l'analyse qualitative, certaines protéines sont identifiées uniquement dans la condition BirA*-Tax. Le ratio d'abondance de ces protéines a été fixé de façon arbitraire par la plateforme de protéomique à 1 et la p-value associée est fixée à 0,05.

Parmi toutes les protéines identifiées dans l'analyse qualitative et les analyses quantitatives, nous nous sommes donc intéressés aux protéines identifiées spécifiquement dans la condition BirA*-Tax ainsi qu'aux protéines significativement surreprésentées dans cette condition (Figure 28).

L'analyse qualitative a permis d'identifier au total 881 protéines présentes dans l'un ou l'autre des échantillons (ie. BirA* ou BirA*-Tax). Les deux analyses quantitatives ont permis d'identifier respectivement 1192 et 1560 protéines présentes dans l'un ou l'autre des échantillons (ie. BirA* ou BirA*-Tax) ou dans les deux, en triplicats techniques.

Pour l'analyse qualitative, cent cinquante-sept des huit cent quatre-vingt unes protéines identifiées sont représentées spécifiquement dans l'échantillon BirA*-Tax. Pour les analyses quantitatives, deux-cent soixante-douze sur mille cent quatre-vingt-douze et cent cinquante-cinq sur mille cinq cent soixante sont protéines représentées spécifiquement ou surreprésentées dans la condition BirA*-Tax (cf. Annexe n°3). Parmi celles-ci, et afin de valider l'analyse, nous nous sommes demandé quels étaient les partenaires déjà connus de Tax. Une analyse préalable de la littérature nous a permis d'établir une liste de 134 partenaires connus de Tax (cf. Annexe n°2), dont 13 sont ressortis dans les analyses. Cela nous a permis d'une part de valider l'analyse faite en spectrométrie de masse et d'autre part d'identifier 414 protéines comme étant de nouveaux potentiels partenaires de Tax.

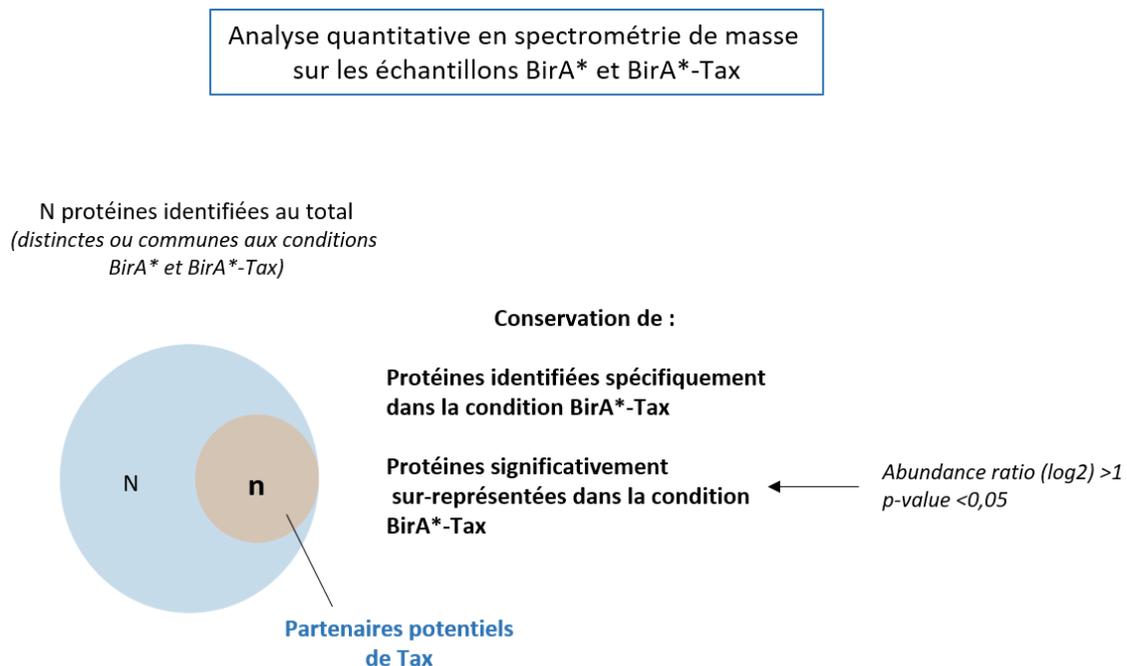


Figure 28. Schéma explicatif du tri des données brutes issues de l'analyse quantitative en spectrométrie de masse.

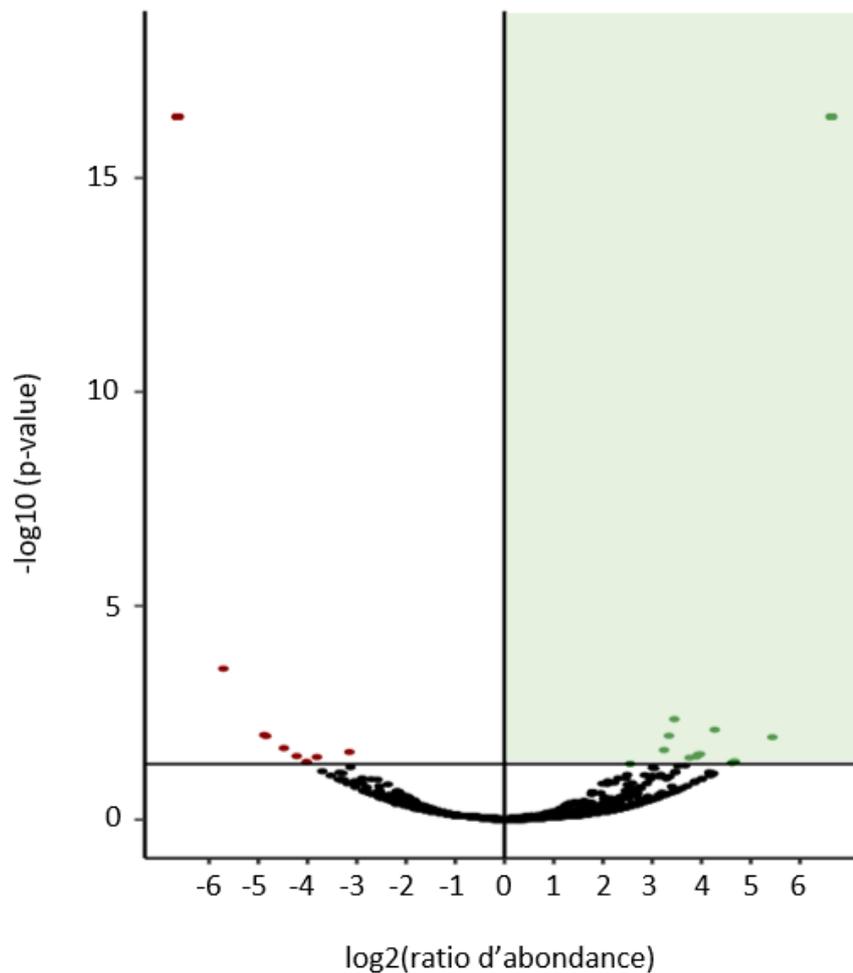
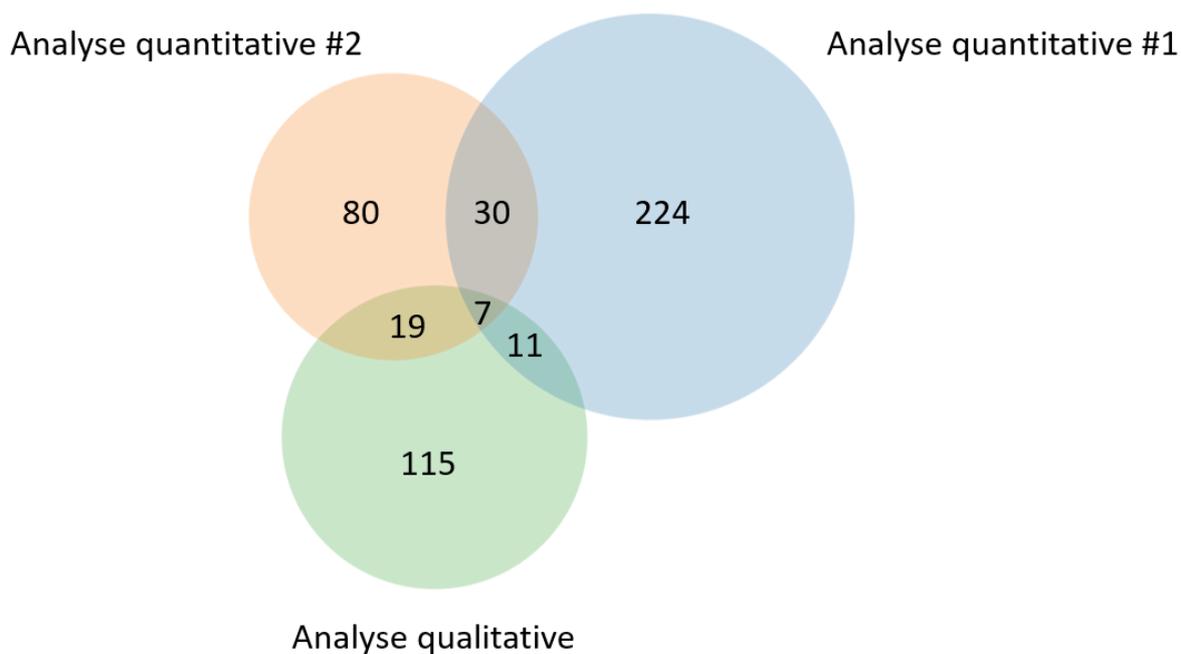


Figure 29. Volcano plot représentatif de la première expérience quantitative de spectrométrie de masse. Ici sont représentées les protéines identifiées en fonction de leur $\log_2(\text{ratio d'abondance})$ et de leur $-\log_{10}(\text{p-value})$ associées. Les points rouges représentent les protéines significativement sous représentées et les points verts les protéines significativement surreprésentées auxquelles nous nous intéressons (zone colorée en vert).

L'analyse couplée des trois analyses a permis d'identifier des protéines présentes dans deux des expériences indépendantes ou dans les trois, ce qui renforce d'autant plus les résultats obtenus (Figure 30).



Partenaires potentiels de Tax communs aux 3 analyses	
Accession	Description
Q13501	Sequestosome-1 (SQSTM1 ; p62)
O00762	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C (UBE2C)
P05412	Transcription factor AP-1 (JUN)
P31689	DnaJ homolog subfamily A member 1 (DNAJA1)
P51970	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8 (NDUFA8)
Q8N9N5	Protein BANP
Q9UI30	Multifunctional methyltransferase subunit TRM112-like protein (TRMT112)

Figure 30. Diagramme de Venn représentant le nombre de protéines identifiées dans chacune des trois expériences indépendantes de BiID. Liste des protéines identifiées communes aux trois expériences. Ces protéines ne sont pas connues pour être des partenaires de Tax dans la littérature.

3. Voies cellulaires représentatives des protéines identifiées par le BioID

Afin d'exploiter les données issues de l'analyse de spectrométrie de masse, nous nous sommes demandé dans un premier temps dans quelles voies cellulaires les protéines identifiées étaient impliquées.

Pour cela, nous avons soumis notre liste de protéines à la base de données PANTHER (Mi et al., 2019) qui nous a permis d'identifier les différentes voies cellulaires (Reactome pathways ; (Fabregat et al., 2017, 2018) dans lesquelles les protéines identifiées par spectrométrie de masse sont impliquées. Nous représentons ici les premiers embranchements de voies cellulaires en fonction de leur enrichissement significatif (ie. calculé par rapport à la base de données *Homo sapiens* de PANTHER, p-value <0.05) ainsi que le nombre de protéines identifiées dans chacun de ces embranchements ([Figure 31](#)). Nous identifions et représentons dix embranchements principaux : Réplication de l'ADN, Cycle cellulaire, Métabolisme des ARN, Réponses cellulaires aux stimuli externes, Biogenèse et maintenance des organelles, Réparation de l'ADN, Expression des gènes (transcription), Pathologies, Transport médié par les vésicules et Métabolisme des protéines.

Ainsi, cela suggère que Tax, en interagissant potentiellement avec des protéines identifiées dans ces différentes voies cellulaires, module ces dernières au sein de ses fonctions cellulaires.

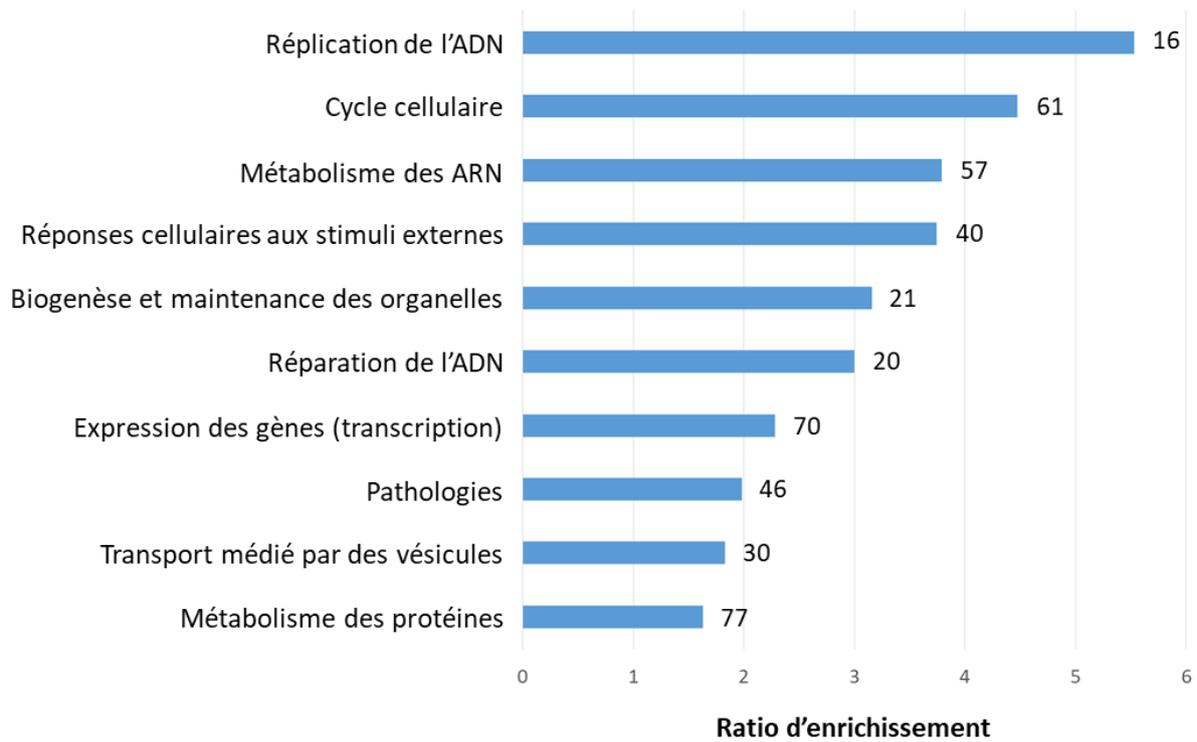


Figure 31. Voies cellulaires dans lesquelles sont impliquées les protéines identifiées dans au moins une des trois analyses. Le ratio d'enrichissement représente l'enrichissement de la voie cellulaire par rapport à la base de données *Homo sapiens* de PANTHER. Les nombres indiqués à côté de chaque voie cellulaire représentent le nombre de protéines identifiées dans notre analyse dans cette voie.

4. Protéines centrosomales identifiées par BiOLD

Parmi les protéines identifiées, nous nous sommes demandé lesquelles étaient des protéines centrosomales. Dans un premier temps, nous avons soumis notre liste de protéines à la base de données CentrosomeDB (Alves-Cruzeiro et al., 2014) afin de connaître le nombre de protéines centrosomales identifiées dans l'analyse. Nous en identifions au total 45, dont 4 étant identifiées dans n=2/3 des expériences : IKK γ , ENTR1, la cycline B2 et HAUS8 ([Tableau 1](#)). IKK γ est la sous-unité régulatrice du complexe IKK permettant l'activation de la voie NF- κ B. De plus, IKK γ est déjà connue pour être un partenaire de Tax au centrosome (Kfoury et al., 2008b) et au niveau de l'appareil de Golgi (Harhaj et al., 2007). Enfin, IKK γ est recrutée par Tax au niveau de structures péri-golgiennes pour une activation efficace de la voie NF- κ B (Huang et al., 2009). ENTR1 est impliqué dans la régulation de l'étape mitotique de cytokinèse en interagissant notamment avec la protéine tyrosine phosphatase PTPN13 (Hagemann et al., 2013). ENTR1 est également impliquée dans la régulation de la ciliogenèse en étant nécessaire à la localisation de protéines cargo au niveau du cil primaire (Yu et al., 2016). La cycline B2 contrôle la séparation des centrosomes. En effet, Nam et van Deursen (2014) ont montré qu'une surexpression de la cycline B2 résultait en l'hyperactivation de PLK1 médiée par AURKA. Cela a pour conséquence l'accélération de la séparation des centrosomes et à l'émergence de chromosomes retardataires à l'origine de l'aneuploïdie. Le complexe HAUS est composé de huit sous-unités (HAUS-1 à 8) et a été récemment identifié chez l'humain par homologie avec l'augmine chez la drosophile. HAUS8 régule l'intégrité du centrosome (Lawo et al., 2009) et du fuseau mitotique (Uehara et al., 2009; Wu et al., 2008).

Protéines centrosomales		Log2(ratio d'abondance)	p-value	Protéine retrouvée dans <i>n</i> expériences
Accession	Description			
Q96C92	Endosome-associated-trafficking regulator 1 (ENTR1)	Spécifique de BirA*-Tax		2
O95067	G2/mitotic-specific cyclin-B2 (CCNB2)	Spécifique de BirA*-Tax		2
Q9BT25	HAUS augmin-like complex subunit 8 (HAUS8)	Spécifique de BirA*-Tax		2
Q9Y6K9	NF-kappa-B essential modulator (IKBKG)	Spécifique de BirA*-Tax		2
Q9Y3A5	Ribosome maturation protein (SBDS)	Spécifique de BirA*-Tax		1
Q8N0Z3	Spindle and centriole-associated protein 1 (SPICE1)	Spécifique de BirA*-Tax		1
Q8IYA6	Cytoskeleton-associated protein 2-like (CKAP2L)	Spécifique de BirA*-Tax		1
P61163	Alpha-centractin (ACTR1A)	Spécifique de BirA*-Tax		1
Q13363	C-terminal-binding protein 1 (CtBP1)	Spécifique de BirA*-Tax		1
A2RUB6	Coiled-coil domain-containing protein 66 (CCDC66)	Spécifique de BirA*-Tax		1
Q96M11	Hydrolethalus syndrome protein 1 (HYLS1)	Spécifique de BirA*-Tax		1
Q9H7T9	Aurora kinase A and ninein-interacting protein (AIBp)	Spécifique de BirA*-Tax		1
O95613	Pericentrin (PCNT)	Spécifique de BirA*-Tax		1
Q96MT8	Centrosomal protein of 63 kDa (Cep63)	Spécifique de BirA*-Tax		1
Q5BJF6	Outer dense fiber protein 2 (Cenexin, Odf2)	Spécifique de BirA*-Tax		1
Q8IW35	Centrosomal protein of 97 kDa (Cep97)	Spécifique de BirA*-Tax		1
Q9HC77	Centromere protein J (CENP-J)	Spécifique de BirA*-Tax		1
Q13547	Histone deacetylase 1 (HDAC1)	Spécifique de BirA*-Tax		1
P38398	Breast cancer type 1 susceptibility protein (BRCA1)	Spécifique de BirA*-Tax		1
Q9H9H4	Vacuolar protein sorting-associated protein 37B (VPS37B)	Spécifique de BirA*-Tax		1
P48730	Casein kinase I isoform delta (CKI-delta, CSNK1D)	Spécifique de BirA*-Tax		1
Q9NP97	Dynein light chain roadblock-type 1 (BLP, DYNLRB1)	Spécifique de BirA*-Tax		1
P24941	Cyclin-dependent kinase 2 (cdk2)	Spécifique de BirA*-Tax		1
P41134	DNA-binding protein inhibitor (ID1)	Spécifique de BirA*-Tax		1
Q6NZ67	Mitotic-spindle organizing protein 2B (MZT2B)	Spécifique de BirA*-Tax		1
Q9UJX3	Anaphase-promoting complex subunit 7 (ANAPC7)	Spécifique de BirA*-Tax		1
P20248	Cyclin-A2 (CCNA2)	Spécifique de BirA*-Tax		1
P63167	Dynein light chain 1, cytoplasmic (DYNLL1)	Spécifique de BirA*-Tax		1

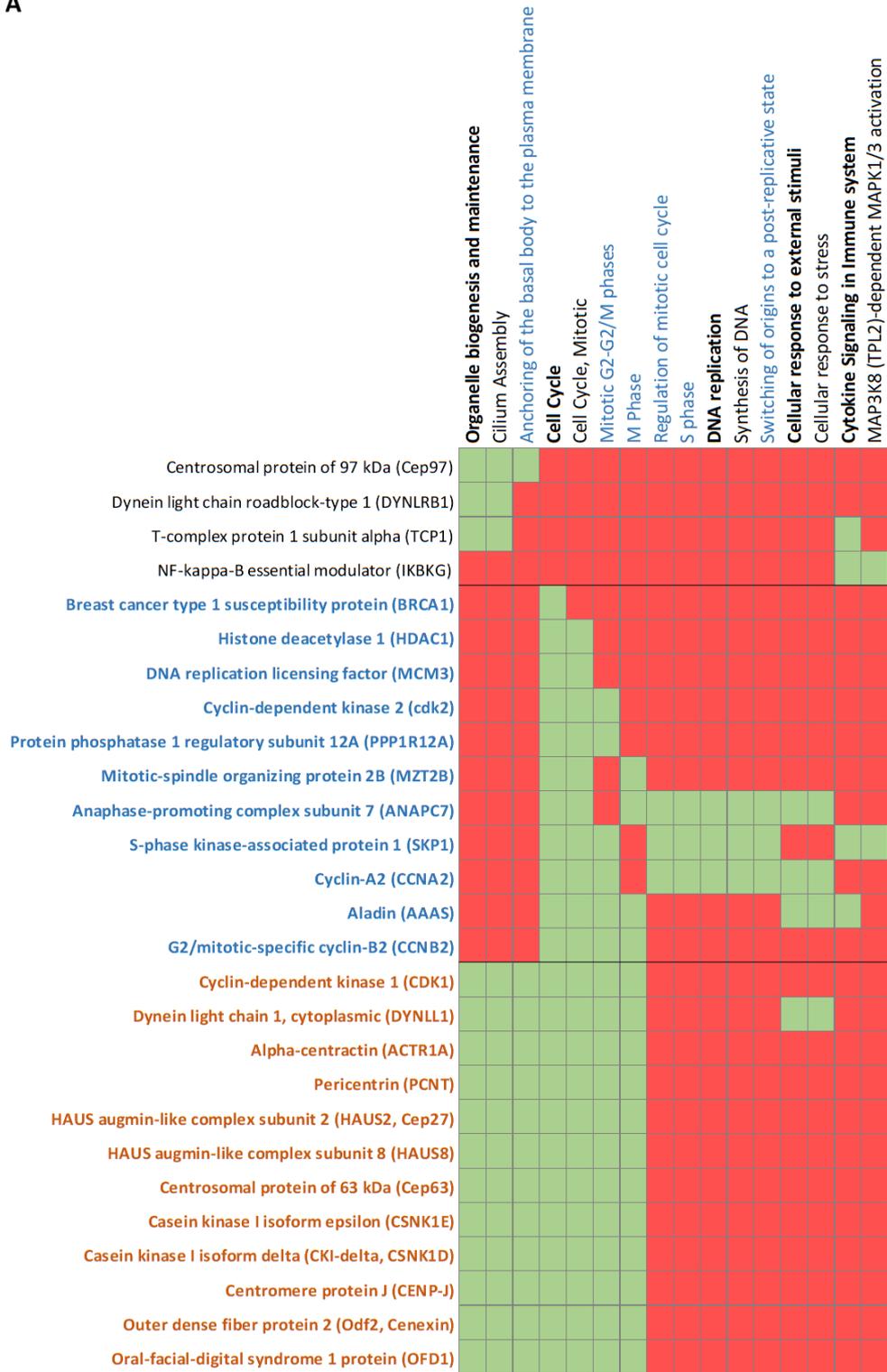
Tableau 1. Liste des 45 protéines centrosomales identifiées.

Protéines centrosomales		Log2(ratio d'abondance)	p-value	Protéine retrouvée dans <i>n</i> expériences
Accession	Description			
Q9UBP0	Spastin (SPAST)	Spécifique de BirA*-Tax		1
P63208	S-phase kinase-associated protein 1 (SKP1)	Spécifique de BirA*-Tax		1
O75665	Oral-facial-digital syndrome 1 protein (OFD1)	Spécifique de BirA*-Tax		1
Q9NRG9	Aladin (AAAS)	Spécifique de BirA*-Tax		1
P25205	DNA replication licensing factor (MCM3)	Spécifique de BirA*-Tax		1
P49674	Casein kinase I isoform epsilon (CSNK1E)	Spécifique de BirA*-Tax		1
P06493	Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)	Spécifique de BirA*-Tax		1
Q6P2H3	Centrosomal protein of 85 kDa(CEP85)	Spécifique de BirA*-Tax		1
O60716	Catenin delta-1 (CTNND1)	Spécifique de BirA*-Tax		1
P33981	Dual specificity protein kinase TTK (TTK)	Spécifique de BirA*-Tax		1
P52292	Importin subunit alpha-1 (KPNA2)	Spécifique de BirA*-Tax		1
Q9UPQ9	Trinucleotide repeat-containing gene 6B protein (TNRC6B)	Spécifique de BirA*-Tax		1
O14530	Thioredoxin domain-containing protein 9 (TXNDC9)	Spécifique de BirA*-Tax		1
Q5VT06	Centrosome-associated protein 350 (CEP350)	Spécifique de BirA*-Tax		1
Q9NVX0	HAUS augmin-like complex subunit 2 (HAUS2, Cep27)	3,24	0,024	1
P17987	T-complex protein 1 subunit alpha (TCP1)	3,38	0,019	1
O14974	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A (PPP1R12A)	3,00	0,045	1

Tableau 1 (suite). Liste des 45 protéines centrosomales identifiées.

Nous avons souhaité par la suite identifier dans quels processus biologiques ces partenaires de Tax au centrosome étaient précisément impliqués (*Figure 32A*). Parmi les 45 partenaires potentiels, 27 sont annotées dans les bases de données et sont attribuées à une ou plusieurs voies cellulaires. Il apparaît trois groupes de protéines en fonctions des voies cellulaires auxquelles elles sont associées. Les quatre protéines du premier groupe (identifiées en noir ; (*Figure 32A*) sont impliquées dans la biogenèse et la maintenance des organelles, plus spécifiquement dans l'assemblage du cil (mis à part IKKy). Les onze protéines du second groupe (identifiées en bleu) ont des fonctions liées aux phases de division cellulaire (transition G2/M et M) et à la régulation du cycle cellulaire. Enfin, les douze protéines du troisième groupe (identifiées en orange) sont toutes impliquées dans la biogenèse et la maintenance des organelles et dans les phases de division cellulaire (transition G2/M et M). De façon intéressante, ces protéines sont toutes impliquées dans la maturation du centrosome et ses fonctions durant la transition G2/M et en début de mitose (*Figure 32B*). Ceci suggère fortement que ces protéines agissent de concert pour assurer leurs fonctions au niveau du centrosome lors de la division cellulaire mais également leurs fonctions associées au cycle de duplication du centrosome.

A



B

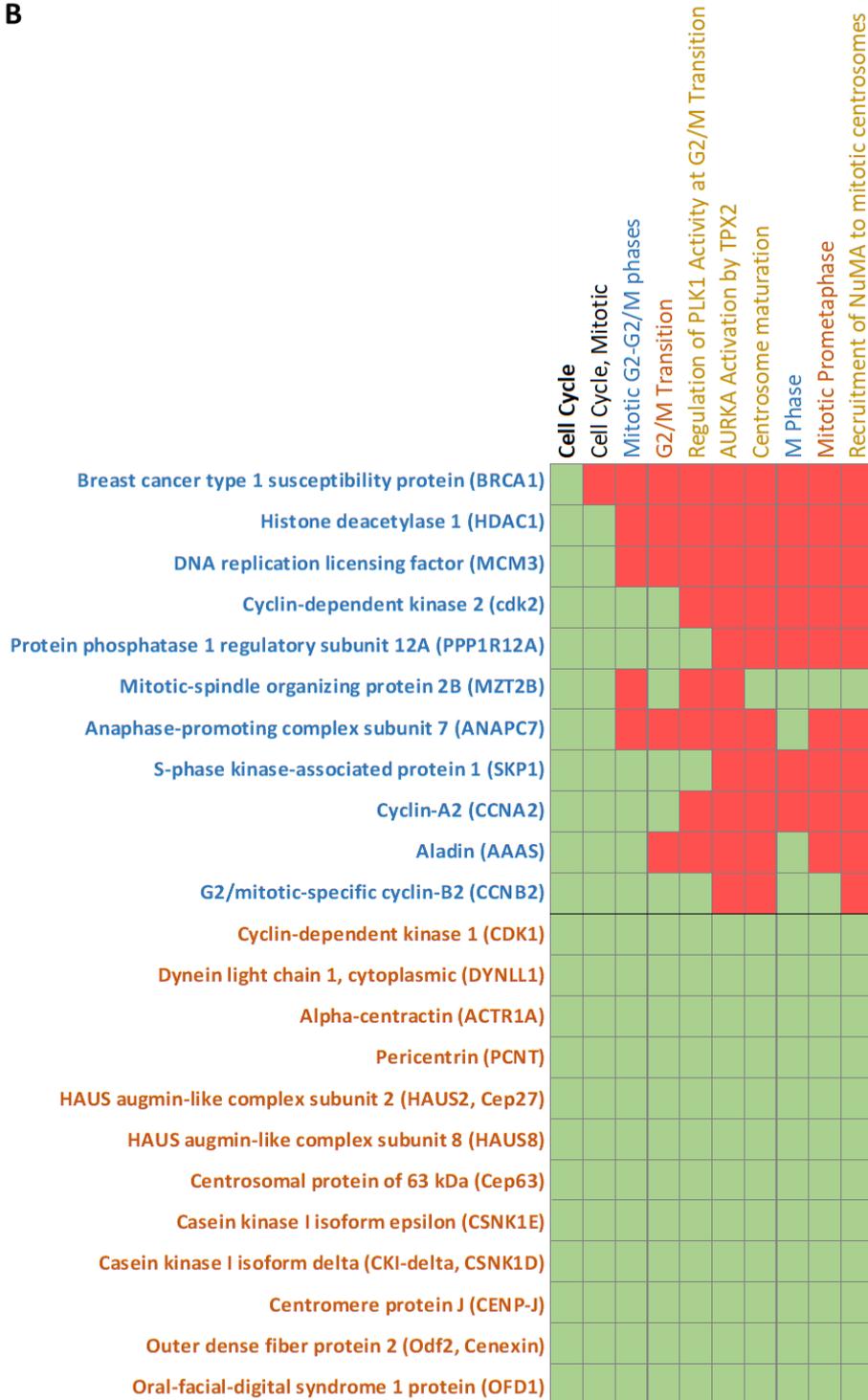


Figure 32. Représentation des protéines centrosomales et des voies cellulaires associées. En ligne sont nommées les protéines centrosomales pour lesquelles les voies cellulaires ont été annotées (base de données Reactome Pathways). En colonne sont nommées les voies cellulaires dans lesquelles les protéines centrosomales sont impliquées (en vert) ou non (en rouge). Les voies cellulaires sont représentées en fonction de leur niveau hiérarchique. (A et B) En noir et gras pour le premier niveau, en noir et en bleu pour les second et troisième niveaux. (B) En orange et jaune respectivement pour les quatrième et cinquième niveaux identifiés dans la voie Cycle cellulaire.

Puisque ces protéines sont impliquées dans les mêmes voies cellulaires, nous avons cherché à visualiser les interactions connues entre ces protéines. Pour cela, nous avons soumis la liste des 27 protéines centrosomales dont les fonctions sont annotées à la base de données STRING permettant notamment de visualiser les interactions connues directes (physiques) et indirectes (fonctionnelles) (*Figure 33*).

Nous retrouvons très clairement deux groupes formés correspondant aux deux groupes des protéines dont les fonctions sont impliquées dans le cycle cellulaire (ie. identifiés grâce à l'analyse des voies cellulaires) comme étant deux clusters d'interactions non-indépendants car liés par la protéine CDK1, jouant probablement un rôle central entre la division cellulaire et la régulation du cycle cellulaire.

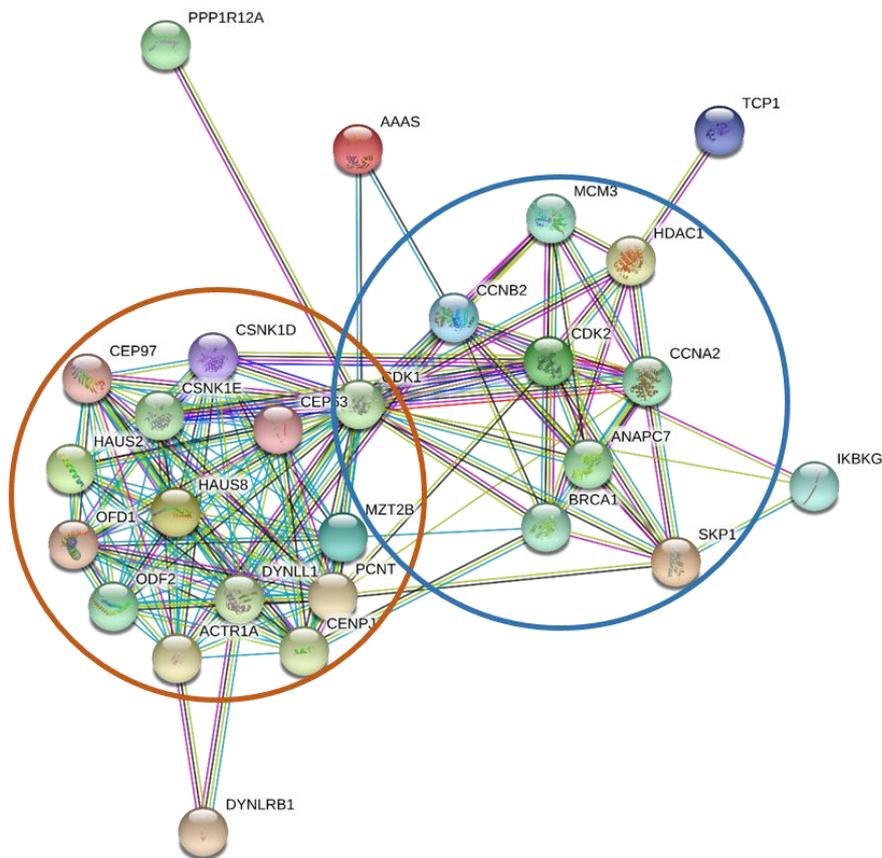


Figure 33. Interactions connues entre les 27 protéines centrosomales identifiées comme partenaires potentiels de Tax. Les cercles orange et bleu mettent en évidence les clusters identifiés par l'analyse des voies cellulaires. Ici, les deux cercles sont positionnés un peu différemment que le code couleur de la figure précédente, afin de souligner l'importance du rôle central de CDK1.

De manière générale, ces résultats mettent en évidence le rôle de Tax au niveau du centrosome en interagissant potentiellement avec ces protéines centrosomales pour perturber les fonctions du centrosome.

CHAPITRE 3 : IDENTIFICATION PAR BioID DE CEP63 : INTERACTION ENTRE TAX ET CEP63

Parmi les 45 protéines centrosomales identifiées par BioID, Cep63 joue un rôle crucial dans le cycle de duplication du centrosome mais est également associée à la progression du cycle cellulaire (détails dans le chapitre 3 de l'introduction). De plus, Cep63 a préalablement été identifiée comme potentiel partenaire de Tax par crible double-hybride en levure (résultats non-publiés de l'équipe). La combinaison de différentes approches identifiant Cep63 comme potentiel partenaire de Tax fait de Cep63 un partenaire intéressant à caractériser. Nous développons dans ce chapitre les travaux préliminaires réalisés sur l'interaction de Tax et Cep63.

I. Confirmation de l'interaction physique de Tax avec Cep63

Comme mentionné dans la partie Méthodes, la technique de BioID permet d'identifier des partenaires de proximité et ne met donc pas en évidence des interactions physiques. Par conséquent, nous avons souhaité dans un premier temps évaluer l'interaction entre Tax et Cep63.

1. Tax interagit avec la protéine centrosomale Cep63

Nous avons cherché dans un premier temps à confirmer l'interaction entre Tax et Cep63 exprimées de manière ectopique. Pour cela, les constructions Tax-his et VSV-Cep63 ont été exprimées en cellules 293T durant 24h. Ensuite, Tax a été précipité à l'aide de billes de nickel (Ni-NTA) ciblant l'étiquette his et Tax et Cep63 ont été révélées par western-blot à l'aide d'anticorps α -his et α -VSV ciblant respectivement les étiquettes de Tax et Cep63 (*Figure 34A*). Dans les inputs, les deux protéines sont bien exprimées (pistes 1 et 3 pour VSV-Cep63 ; pistes 2 et 3 pour Tax-his). Lorsque l'une ou l'autre des protéines est exprimée seule, nous ne détectons pas Cep63 après précipitation de Tax (pistes 1 et 2). En revanche, lorsqu'elles sont toutes deux exprimées, nous détectons Cep63 (via le tag VSV) après précipitation de Tax (piste 3). Ainsi, Tax et Cep63 interagissent ensemble lorsqu'elles sont toutes deux exprimées de manière ectopique.

Dans un second temps, nous avons voulu confirmer cette interaction avec la forme endogène de Cep63. Pour cela, Tax a été exprimée en cellules U2OS durant 24h. Ici, les cellules U2OS ont été utilisées par soucis d'homogénéité avec les expériences suivantes d'immunofluorescence réalisées dans ces cellules. Cep63 a été immunoprécipité à l'aide d'un anticorps α -Cep63. Les protéines ont ensuite été révélées par western-blot à l'aide d'anticorps α -his (pour la révélation de Tax) et α -Cep63 (*Figure 34B*). Dans les inputs, les deux protéines sont bien exprimées (pistes 5 et 6). Pour Cep63, nous pouvons distinguer quatre bandes correspondant aux quatre isoformes de la protéine (pistes 5 et 6). Les immunoprécipitations contrôles ont été réalisées avec des IgG ne ciblant aucune protéine. La révélation à l'aide d'anticorps anti-his et anti-Cep63 dans ces conditions ne met en évidence aucune bande, ce qui signifie que l'immunoprécipitation de Cep63 est bien spécifique (pistes 2 et 4). Lorsque Tax est exprimée, nous pouvons détecter cette dernière après immunoprécipitation de Cep63 (piste 3, comparée à la piste 1).

L'expérience miroir a été réalisée avec la précipitation de Tax à l'aide de billes de nickel (*Figure 34C*). De même que précédemment, les deux protéines sont bien exprimées (pistes 1 et 2 ; inputs). Lorsque Tax est exprimée et précipitée, nous pouvons détecter plusieurs bandes correspondant aux isoformes de Cep63 (piste 2 comparée à la piste 1 ; Ni-NTA). Ces deux expériences miroirs mettent en évidence une interaction entre Tax et la forme endogène de Cep63.

Ici, ces résultats (*Figure 34*) confirment donc les résultats obtenus avec le BioID et constituent la première étape de validation de l'interaction entre Tax exprimée de manière ectopique et la forme endogène de Cep63.

Afin de se rapprocher du niveau d'expression physiologique de Tax, nous avons souhaité dans un dernier temps savoir si cette interaction avait lieu en lignées lymphocytaires T infectées par HTLV-1. Pour répondre à cette question, nous disposons au laboratoire de différentes lignées lymphocytaires chroniquement infectées par HTLV-1. Ici, nous avons choisi d'utiliser les lignées Hut102 et C8166, pour leur niveau d'expression de Tax facilement détectables. Les protéines Tax et Cep63 sont donc toutes deux exprimées de manière endogène. Nous avons immunoprécipité Tax ou Cep63 respectivement à l'aide d'anticorps α -Tax ou α -Cep63 et choisi comme contrôle négatif les cellules Jurkat non-infectées par HTLV-1 (n'exprimant pas Tax) (*Figure 34D*). Dans les inputs, les deux protéines sont bien détectées (pistes 10, 11 et 12). Les immunoprécipitations contrôles ont été réalisées avec des IgG ne ciblant aucune protéine. La

révélation à l'aide d'anticorps anti-Tax et anti-Cep63 dans ces conditions ne met en évidence aucune bande, ce qui signifie que l'immunoprécipitation de Cep63 (pistes 1, 3 et 5) est bien spécifique.

Après immunoprécipitation de Cep63, nous pouvons détecter une faible bande après révélation de Tax uniquement dans les cellules C8166 (piste 6, flèche rouge, comparée aux pistes 2 et 4). Nous observons le même résultat dans l'expérience miroir ; après immunoprécipitation de Tax, nous observons une faible bande après révélation de Cep63 dans les cellules C8166 uniquement (piste 9, flèche rouge, comparée aux pistes 7 et 8).

Ainsi, Tax interagit avec Cep63 lorsqu'elles sont toutes deux exprimées à des niveaux physiologiques dans la lignée cellulaire C8166 chroniquement infectée par HTLV-1. Cependant, cette interaction n'est visible que dans la lignée cellulaire C8166 et non pas dans la lignée Hut102. Cela soulève deux hypothèses : soit l'interaction est tellement faible en cellules Hut102 que la limite de détection des protéines en western-blot ne permet pas de la voir ; soit Tax interagit avec une isoforme bien spécifique de Cep63 et cette dernière n'est pas exprimée ou très faiblement exprimée en cellules Hut102.

Ainsi, ces résultats montrent une interaction entre Tax et Cep63 dans la lignée cellulaire C8166 chroniquement infectée par HTLV-1.

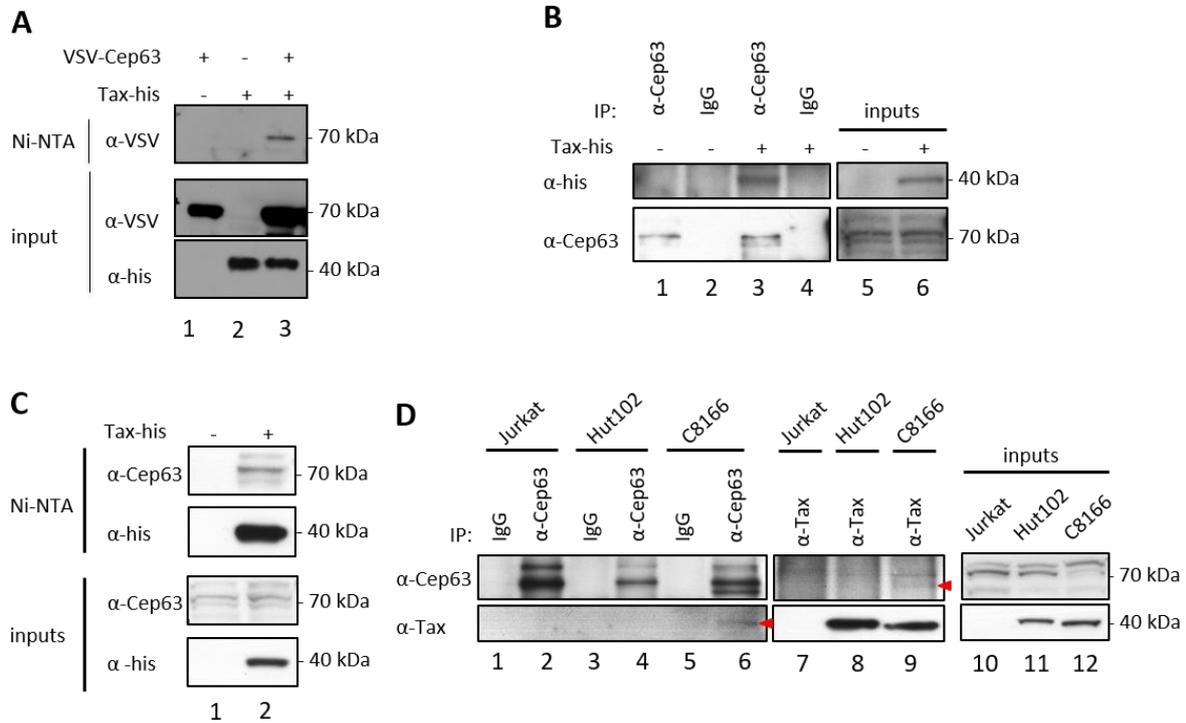


Figure 34. Tax interagit avec Cep63. (A) Des cellules 293T ont été transfectées par des plasmides codant Tax-his et VSV-Cep63. Tax-his a été précipitée à l'aide de billes Ni-NTA. Les protéines ont été révélées par western-blot à l'aide d'anticorps α-his (Tax) et α-VSV (Cep63). (B, C) Des cellules U2OS ont été transfectées par un plasmide codant Tax-his. (B) Une immunoprécipitation (IP) à l'aide d'anticorps α-Cep63 ou d'IgG contrôle a été réalisée. Les protéines ont été révélées à l'aide d'anticorps α-his (Tax) et α-Cep63. (C) Tax-his a été précipitée à l'aide de billes Ni-NTA. Les protéines ont été révélées à l'aide d'anticorps α-his (Tax) ou α-Cep63. (D) Dans les lymphocytes T non-infectés (Jurkat, contrôle) et dans les lignées lymphocytaires Hut102 et C8166 chroniquement infectées par HTLV-1, une IP à l'aide d'anticorps α-Cep63, IgG contrôle ou α-Tax a été réalisée. Les protéines ont été révélées à l'aide d'anticorps α-Tax et α-Cep63. Les flèches rouges indiquent Tax et Cep63 co-précipitant respectivement avec Cep63 et Tax. Dans toutes les expériences, les inputs ont été révélés à l'aide des mêmes anticorps.

2. *L'interaction entre Tax et Cep63 requiert la partie N-terminale de Cep63 et l'ubiquitination de Tax*

- a. Tax interagit avec la partie N-terminale de Cep63 (expériences réalisées par Emilie Martin)

Cep63 est décrite comme contenant trois domaines : le domaine N-terminal (positions 1-135 des acides aminés), le domaine central (positions 136-424 ; 135-378 dans notre construction) et le domaine C-terminal (positions 425-541 ; 378-495 dans notre construction) (Brown et al., 2013). Il est important de noter que ces domaines ont été décrits de façon arbitraire et ne correspondent pas à un domaine structural de la protéine en particulier.

Afin de caractériser plus finement l'interaction entre Tax et Cep63, nous avons construit des mutants de troncation de VSV-Cep63 (Brown et al. 2013). Les mutants 1, 2 et 3 correspondent respectivement à la partie N-terminale, au domaine central et à la partie C-terminale de Cep63. Le mutant 4 correspond à la partie N-terminale et au domaine central (1-424). Le mutant 5 correspond au domaine central et à la partie C-terminale (136-541). Nous avons utilisé ces mutants dans les expériences de Ni-NTA pour d'identifier le domaine de Cep63 impliqué dans son interaction avec Tax (*Figure 35A*).

Les formes sauvage et mutantes de VSV-Cep63 et Tax ont été exprimées en cellules U2OS durant 24h. Tax a ensuite été précipitée à l'aide de billes de nickel (Ni-NTA) (*Figure 35B*). Les diverses formes de Cep63 et Tax ont été révélées respectivement à l'aide d'anticorps α -VSV et α -his. Dans les inputs, toutes les protéines sont bien exprimées (pistes 1 à 8, inputs). Après précipitation de Tax, nous détectons VSV-Cep63 uniquement lorsqu'elle est exprimée sous sa forme sauvage et avec les mutants de troncation 1 et 4. Ces mutants ont la particularité de conserver la partie N-terminale de Cep63 ; en particulier le mutant 1 qui est considéré comme la partie N-terminale de Cep63. Les mutants 2, 3 et 5 délévés de la partie N-terminale de Cep63 n'interagissent plus avec Tax. Cela montre donc que la partie N-terminale de Cep63 est nécessaire et suffisante pour son interaction avec Tax.

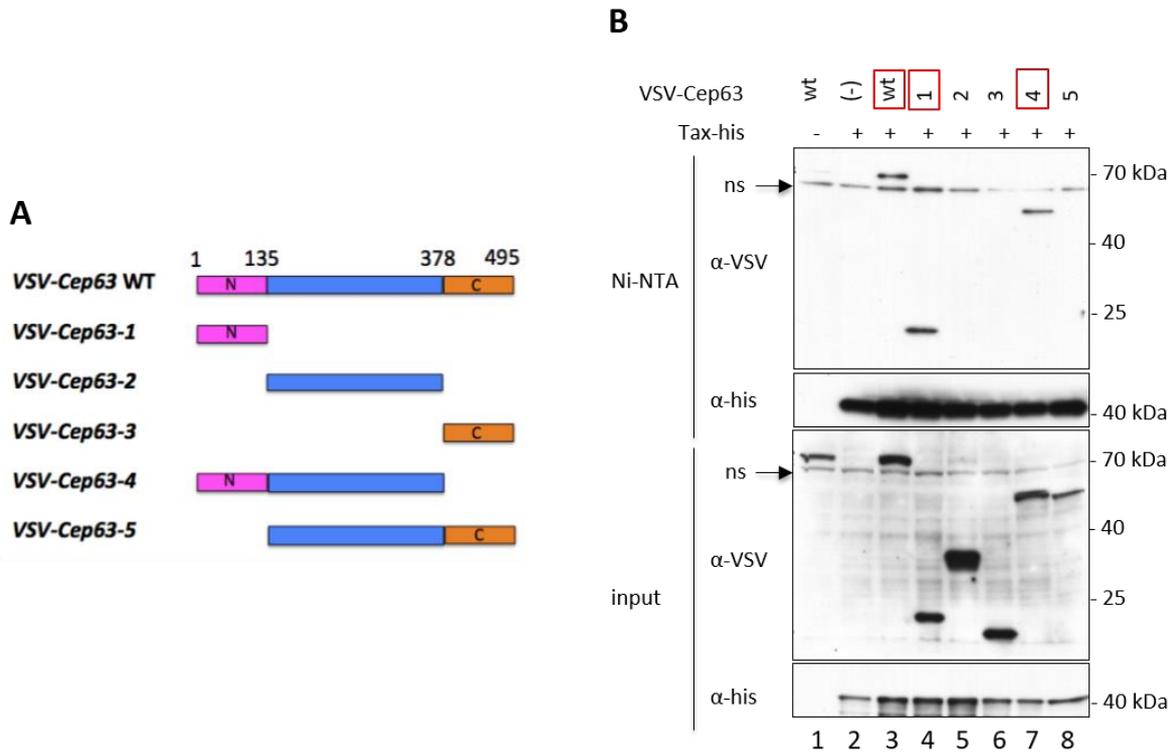


Figure 35. Tax interagit avec la partie N-terminale de Cep63. (A) Mutants de troncation de Cep63 utilisés en (B). (B) Des cellules U2OS ont été transfectées par des plasmides codant Tax-his et des mutants de troncation de VSV-Cep63. Tax-his a été précipitée à l'aide de billes Ni-NTA, suivi d'un immunoblot α -his (Tax) et α -VSV (Cep63). ns : non spécifique.

b. L'interaction entre Tax et Cep63 requiert l'ubiquitination de Tax

Sachant que les modifications post-traductionnelles de Tax jouent un rôle important quant à sa localisation et ses fonctions, nous avons souhaité savoir si l'interaction entre Tax et Cep63 dépendait d'une ou plusieurs modifications post-traductionnelles de Tax. Pour cela, nous disposons au laboratoire de mutants de Tax précédemment décrits dans la littérature, les mutants M22 et M47 (Smith and Greene, 1990a). Le mutant M22 est déficient pour l'activation de la voie NF- κ B (Smith and Greene, 1990a), est dans l'incapacité d'être ubiquitiné (Chiari et al., 2004) et a la particularité de ne pas être localisé au centrosome (Kfoury et al., 2008b; Nasr, 2006). L'utilisation de ce mutant nous permettra de savoir si l'interaction entre Tax et Cep63 requiert l'ubiquitination de Tax et si elle se déroule exclusivement au niveau du centrosome. Le mutant M47 est déficient pour l'activation du LTR d'HTLV-1 via CREB conserve sa capacité à être ubiquitiné et à activer la voie NF- κ B via le recrutement de IKK γ au centrosome (Smith and Greene, 1990a ; Kfoury et al., 2008b). De plus, le mutant M47 présente une localisation majoritairement nucléaire et centrosomale (Kfoury et al., 2008b). Ce mutant conserve les fonctions perdues par le mutant M22 et est donc utilisé en complémentarité de ce dernier.

Nous disposons également de mutants d'ubiquitination : K4-8R et K1-10R. Le mutant K4-8R est muté sur les lysines 4 à 8 (en arginine), résidus cibles de l'ubiquitination de Tax connus pour être impliqués dans l'activation de la voie NF- κ B. Les lysines 7 et 8 sont également les cibles de la SUMOylation de Tax. Ce mutant ne peut donc être seulement phosphorylé ou acétylé et nous permettra de savoir par rapport au mutant M22 notamment, si la SUMOylation de Tax et si l'ubiquitination de Tax sur les résidus lysine 4 à 8 sont impliquées dans l'interaction avec Cep63. Le mutant K1-10R est muté sur toutes les lysines (1 à 10) pouvant être ubiquitinées. La lysine 10 est la cible de l'acétylation de Tax. Ce mutant de Tax ne peut donc être ni ubiquitiné, ni SUMOylé, ni acétylé. Par rapport au mutant K4-8R, ce mutant nous permettra de savoir si l'acétylation de Tax est impliquée dans l'interaction avec Cep63.

De façon générale, l'utilisation des mutants M22, K4-8R et K1-10R, nous permettra par différentes approches de savoir si l'ubiquitination de Tax est requise pour son interaction avec Cep63.

Tous ces mutants possèdent, comme la forme sauvage de Tax dont nous disposons, une étiquette his utile à leur révélation. Nous avons donc voulu tester l'interaction de ces mutants

de Tax avec la forme endogène de Cep63. Pour cela, la forme sauvage et les divers mutants ont été exprimés en cellules U2OS durant 24h. Tax a ensuite été précipitée à l'aide de billes de nickel (*Figure 36*). Cep63 et les diverses formes de Tax ont été révélées par western-blot respectivement à l'aide d'anticorps α -Cep63 et α -his (forme sauvage et mutants de Tax). Dans les inputs, toutes les protéines sont bien exprimées. Après précipitation de Tax, nous détectons Cep63 uniquement lorsque la forme sauvage de Tax ou le mutant M47 sont exprimés. Cep63 interagit donc avec ces formes-là de Tax. Le fait de ne pas interagir avec le mutant M22 et des mutants d'ubiquitination suggère que l'interaction requiert l'ubiquitination de Tax.

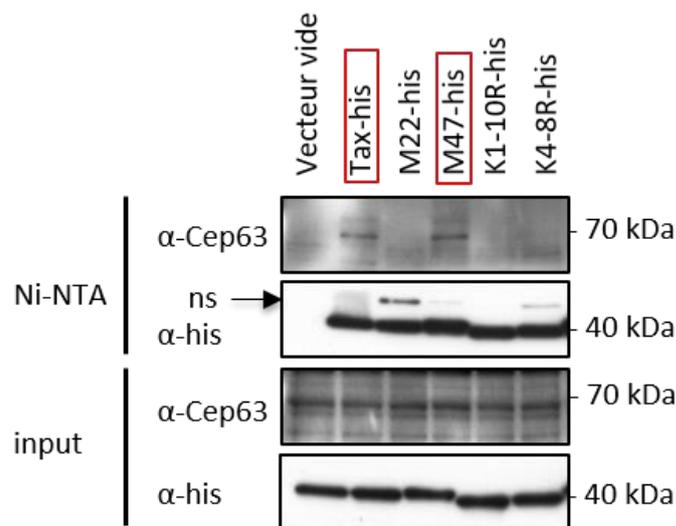


Figure 36. Les mutants de Tax défectifs pour l'ubiquitination n'interagissent plus avec Cep63. Des cellules U2OS ont été transfectées par des plasmides codant pour la forme sauvage de Tax ou des mutants de Tax conservant leur potentiel d'ubiquitination (M47) ou non (M22, K1-10R et K4-8R). Tax (forme sauvage et mutants) a été précipitée à l'aide de billes Ni-NTA, suivi d'un immunoblot α -his (Tax) ou α -Cep63. ns = non-spécifique.

II. Tax colocalise avec Cep63 au centrosome et altère son organisation spatiale

Les résultats précédents indiquent une interaction entre Tax et la protéine centrosomale Cep63. Afin d'induire des altérations centrosomales, Tax peut altérer la localisation et donc les fonctions de certaines protéines centrosomales. De ce fait, il se peut que Tax, en interagissant avec Cep63, perturbe la localisation de cette dernière et par conséquent altérer ses fonctions. Avant d'analyser l'aspect fonctionnel de cette interaction, il est donc intéressant d'analyser la localisation de Cep63 au centrosome en présence de Tax.

Afin de confirmer ou non notre hypothèse, nous avons voulu observer l'impact de Tax sur la localisation de Cep63 en cellules par immunofluorescence (*Figure 37A*). Dans un premier temps, Tax est exprimée en cellules U2OS C1G durant 72h (ie. temps nécessaire pour que les cellules puissent se diviser et que les altérations centrosomales induites par Tax soient visibles au sein d'une population cellulaire). Tax et la forme endogène de Cep63 sont révélées par immunofluorescence respectivement à l'aide d'anticorps α -his et α -Cep63. La centrine1-GFP marque directement les centrosomes. Les cellules Tax-négatives présentent deux points distincts de centrine1-GFP colocalisant avec deux points de Cep63. Cela confirme les données de la littérature montrant une localisation centrosomale de Cep63 (Andersen et al., 2003).

Dans les cellules Tax-positives, nous observons de multiples points distincts de centrine1-GFP correspondant à l'altération des centrosomes en comparaison aux cellules Tax-négatives, ce qui est similaire à nos observations précédentes. Ces points de centrine1-GFP colocalisent strictement avec de multiples points de Cep63 et avec Tax. Ces résultats montrent que les points de centrine1-GFP surnuméraires induits par Tax contiennent Cep63. Ainsi, Tax génère des points surnuméraires de Cep63

Afin de se rapprocher du niveau d'expression physiologique de Tax, nous avons voulu voir dans un second temps si cette altération spatiale de Cep63 avait également lieu en lignée lymphocytaire T chroniquement infectée par HTLV-1 (*Figure 37B*). Pour cela, nous avons analysé l'aspect de Cep63 au centrosome dans la lignée cellulaire contrôle Jurkat non-infectée (en absence de Tax) et dans la lignée cellulaire C8166 chroniquement infectée par HTLV-1 dans laquelle a été détectée l'interaction (en présence de Tax). Les formes endogènes de Tax et Cep63 sont révélées par immunofluorescence respectivement à l'aide d'anticorps α -Tax et α -Cep63. Le centrosome est mis en évidence à l'aide d'un anticorps α - γ -tubuline (cf. Introduction Chapitre 3). Dans les cellules Jurkat, nous observons deux points de γ -tubuline

(centrosome « normal ») colocalisant avec deux points de Cep63. En revanche, dans les cellules C8166, nous observons de multiples points de γ -tubuline colocalisant avec de multiples points de Cep63. Tax altère la localisation spatiale de Cep63 en lignée cellulaire chroniquement infectée par HTLV-1.

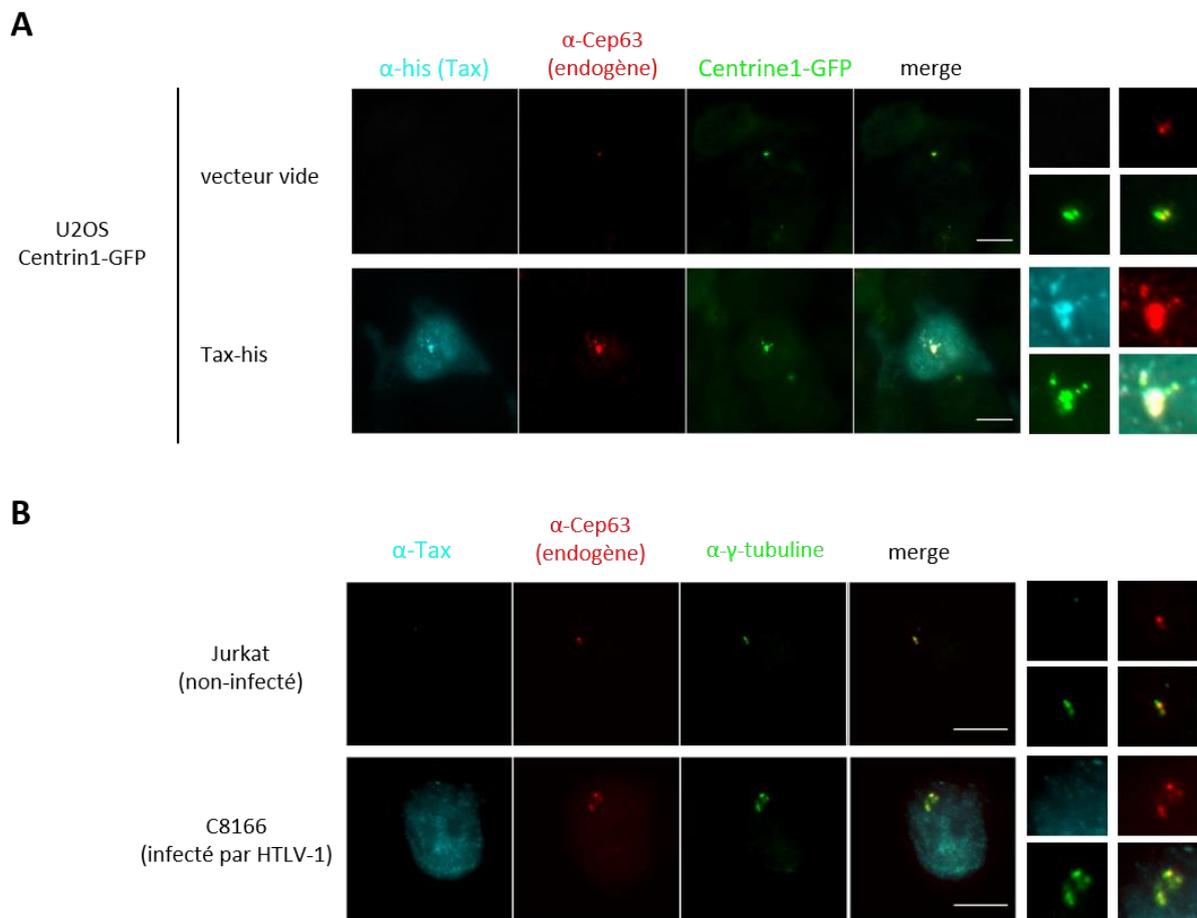


Figure 37. Tax altère l'organisation spatiale de Cep63 au centrosome. (A) Des cellules U2OS exprimant de façon stable la Centrine-1-GFP ont été transfectées par un plasmide codant Tax-His pendant 72h. Les cellules ont été marquées à l'aide d'anticorps α -His (Tax, cyan) et α -Cep63 (rouge). Les centrosomes sont détectés par fluorescence directe de la Centrine-1-GFP (vert). (B) Les lymphocytes T non-infectés (Jurkat, contrôle) ou les lymphocytes C8166 chroniquement infectés par HTLV-1 ont été marqués à l'aide d'anticorps α -Tax (cyan), α -Cep63 (rouge) et α - γ -tubuline (vert). Echelle = 10 μ m.

III. Données préliminaires - Aspect fonctionnel de l'interaction entre Tax et Cep63 : Cep63 ne semble pas être directement impliquée dans les altérations centrosomales induites par Tax

Les effets sur le centrosome d'une sous ou sur-expression de Cep63 ont été récemment mis en évidence. Une déficience de Cep63 cause le développement du Syndrome de Seckel (microcéphalie associée au nanisme) en favorisant la formation de fuseaux mitotiques monopolaires ou bipolaires asymétriques dus à un défaut de duplication des centrioles, une délocalisation de la protéine Cep152 requise pour la duplication et des défauts structuraux du matériel péricentriolaire (Marjanović et al., 2015; Sir et al., 2011). A l'inverse, une surexpression de Cep63 induit une amplification *de novo* des centrosomes (Brown et al., 2013; Loffler et al., 2011). De plus, en conditions physiologiques, le nombre de centrosome dans la cellule est régulé par la dégradation autophagique de Cep63 (Watanabe et al., 2016a).

Nous nous sommes demandé si Cep63 était requise pour que Tax puisse induire des altérations du centrosome. Si Cep63 est bien nécessaire dans les altérations du centrosome induites par Tax, nous pouvons nous attendre à une diminution du pourcentage de cellules présentant des altérations centrosomales en présence de Tax lorsque l'expression de Cep63 est éteinte. Pour cela, nous avons choisi d'éteindre l'expression de Cep63 à l'aide d'ARN interférents (pool de siARNs dirigés contre les quatre isoformes) avant de transfecter Tax en cellules U2OS C1G. L'extinction de Cep63 a été validée par immunofluorescence dans des cellules U2OS C1G n'exprimant pas Tax (*Figure 38A*). Chaque point représente l'intensité de fluorescence relative de Cep63 dans une cellule dans la condition contrôle et dans la condition où l'expression de Cep63 est éteinte à l'aide d'ARN interférents (siCep63). Toutes les mesures d'intensité sont normalisées par rapport à la moyenne des intensités dans la condition siCtrl. Ici, nous observons une diminution significative des moyennes d'intensité de Cep63 lorsque l'expression de cette dernière est éteinte, avec une moyenne de 1 dans la condition siCtrl et une moyenne de 0,4 dans la condition siCep63. Il est important de noter que l'extinction n'est pas complète puisque malgré l'utilisation d'un ARN interférent dirigé contre Cep63, l'intensité de fluorescence est semblable à celle observée dans la condition contrôle pour certaines cellules.

Nous avons par la suite évalué le pourcentage de cellules présentant un nombre anormal de centrosomes en présence ou en absence de Tax (*Figure 38B*). En l'absence de Tax, en moyenne 18% des cellules présentent un nombre anormal de centrosomes, ce qui est similaire à ce qui

a été observé dans le chapitre 2 lors du comptage des centrosomes en présence de Tax et BirA*-Tax (*Figure 26*, p.138). En présence de Tax, nous observons une augmentation significative du pourcentage de cellules présentant des altérations centrosomales par rapport à la condition contrôle avec en moyenne 47% de cellules présentant des centrosomes anormaux. Cependant, nous n'observons pas de différence significative dans le pourcentage de cellules présentant des centrosomes anormaux lorsque l'expression de Cep63 est éteinte, celui-ci atteignant 56% en moyenne. Il est important de noter que le comptage des centrosomes a été réalisé sur des cellules exprimant Tax et au regard de la validation de l'extinction de Cep63, il se peut que l'extinction de cette dernière ne soit pas complète dans les cellules où le comptage des centrosomes a été effectué. Ceci a donc pu biaiser les résultats obtenus. L'optimisation d'une extinction efficace de Cep63 sera donc nécessaire pour confirmer ou non les résultats obtenus.

Ainsi, ces résultats suggèrent que Cep63 ne serait pas directement requise par Tax pour induire des centrosomes anormaux.

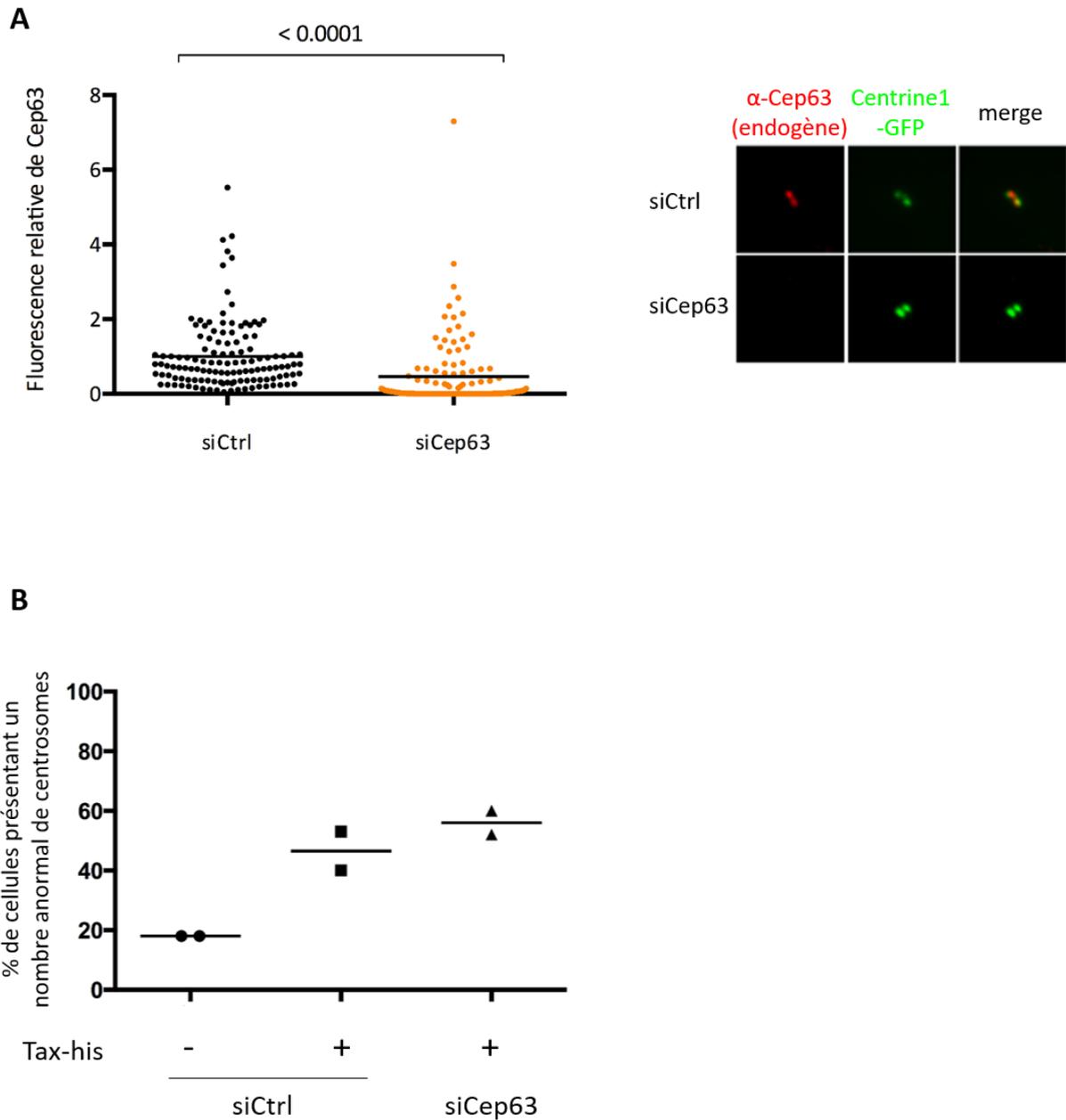


Figure 38. L’extinction de Cep63 n’a pas d’effet sur les altérations centrosomales induites par Tax. Des cellules U2OS exprimant de façon stable la Centrine-1-GFP ont été transfectées avec des siARN contrôle (siCtrl) ou ciblant Cep63 (siCep63) puis avec un plasmide codant Tax-His pendant 72h. Les cellules ont été marquées à l’aide d’anticorps α -Cep63 (A) ou α -his (B). Les centrosomes sont détectés par fluorescence directe de la Centrine-1-GFP. (A) L’intensité du signal de Cep63 au centrosome a été mesurée dans environ 100 cellules pour chaque condition. Toutes les mesures d’intensité ont été normalisées à la moyenne de la population contrôle. La moyenne et la p-value (test de Mann-Whitney) sont indiquées. La médiane de deux expériences indépendantes est indiquée. (B) Les cellules présentant un nombre anormal de centrosomes ont été dénombrées. Au minimum, 50 cellules ont été comptées pour chaque condition. Les moyennes de deux expériences indépendantes sont indiquées.

CHAPITRE 4 : APPLICATION DE LA TECHNIQUE DE BioID AUX PROTEINES BNRF1 D'EBV ET E7 D'HPV-16 – DONNEES PRELIMINAIRES

Dans le cadre de l'oncogenèse virale, nous souhaitons identifier les mécanismes généraux menant à des altérations du centrosome.

Pour cela, nous nous sommes intéressés précisément aux protéines virales BNRF1 (EBV) et E7 (HPV-16), connues pour être localisées en partie au centrosome et induire des altérations centrosomales (Korzeniewski et al., 2011; Shumilov et al., 2017).

Les constructions myc-BirA*-BNRF1 et myc-BirA*-E7 (nommées par la suite respectivement BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 dans le texte pour faciliter la lecture) ont été établies par nos collaborateurs.

Comme pour Tax, nous avons cherché à valider les constructions avant l'expérience de BioID en elle-même et notamment leur expression, leur capacité à biotinyler des protéines cellulaires et leur localisation au centrosome.

I. BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 s'expriment en cellules 293T

Nous avons voulu dans un premier temps valider l'expression de BirA*-BNRF1 et BirA*-E7. Pour cela, BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 ont été exprimées en cellules 293T (différentes doses) et leur expression a été analysée par western-blot à l'aide d'un anticorps anti-myc (*Figure 39*). Ici, l'utilisation de différentes doses de plasmides permettra de choisir a posteriori la dose optimale à transfecter pour chacune des conditions afin que les niveaux d'expression des différentes protéines virales soient similaires. Ici, BirA*-Tax (piste 2) et myc-BirA* (nommée par la suite BirA* dans le texte pour faciliter la lecture ; pistes 3 à 6) ont été utilisés comme contrôle d'expression. La présence d'une bande à 170 kDa (pistes 7 à 9) et à 50 kDa (pistes 10 à 12) indique que BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 sont bien exprimées en cellules 293T.

Dans cette expérience, pour les mêmes doses transfectées de BirA*-Tax (piste 2), BirA* (piste 3), BirA*-BNRF1 (piste 7) et BirA*-E7 (piste 10), BirA* s'exprime plus que les autres constructions. BirA*-BNRF1 s'exprime également plus que BirA*-Tax et BirA*-E7 qui s'expriment à des niveaux similaires. Il sera donc important d'ajuster les doses transfectées de chacun des plasmides afin d'avoir une expression similaire de chacune des protéines. Etant

donné que le niveau d'expression d'une protéine joue sur ses interactions, ceci est important pour comparer les résultats obtenus lors des analyses en spectrométrie de masse, notamment en comparaison à la condition contrôle BirA*, afin de ne pas exclure des protéines non-significativement représentées dans les échantillons d'intérêt pouvant être de potentiels partenaires cellulaires. Se placer dans les mêmes conditions d'expression permettra ainsi de réduire le biais induit par les niveaux d'expressions protéiques de chacune des constructions.

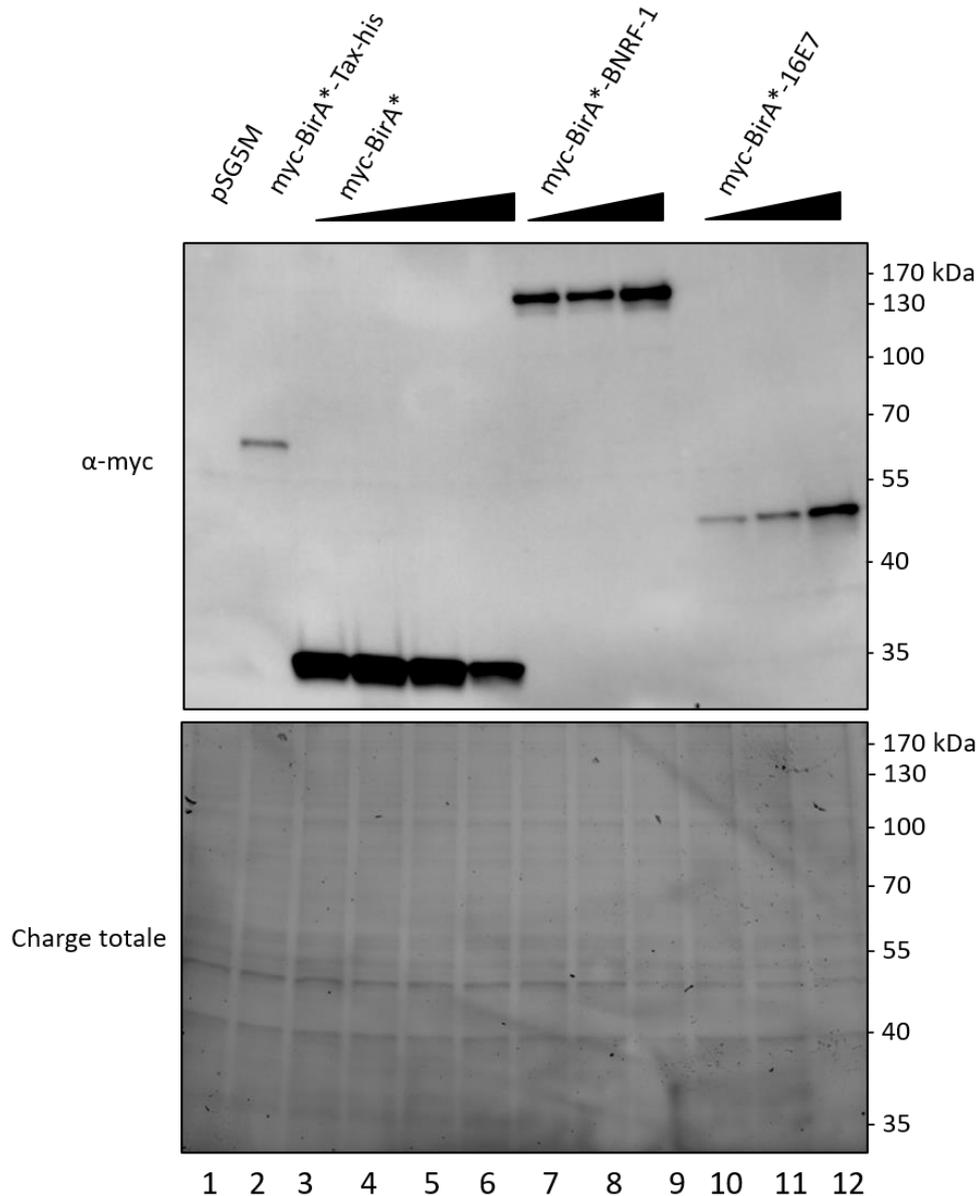


Figure 39. BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 sont exprimées en cellules 293T. Les différentes constructions ont été transfectées en cellules 293T et exprimées durant 24h. Les inputs ont été révélés à l'aide d'un anticorps α-myc. La charge totale a été obtenue en révélant les protéines totales dans chaque piste par activation du gel (TGX-Stain free) aux UV permettant la révélation des tryptophanes des protéines.

II. BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 biotinylent des protéines cellulaires

Dans un second temps, nous nous sommes demandés si BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 étaient capables de biotinyler des protéines cellulaires en présence de biotine.

Pour cela, BirA*-Tax (utilisé comme contrôle positif dans cette expérience), BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 ont été transfectées en cellules 293T et exprimées durant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec de la biotine. La présence de protéines biotinylées a été mise en évidence par western-blot à l'aide de la streptavidine-HRP (*Figure 40*). Les niveaux d'expression des protéines ont été révélés à l'aide d'un anticorps anti-myc (BirA*). Ici, les protéines sont bien exprimées. Cependant, la révélation à l'aide de l'anticorps anti-myc montre que BirA*-Tax s'exprime moins bien que BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 (piste 2 comparée aux pistes 3 et 4) et BirA*-BNRF1 s'exprime légèrement mieux que BirA*-E7 (piste 3 comparée à la piste 4).

Après traitement à la biotine, la révélation à l'aide de la streptavidine-HRP met en évidence de multiples bandes correspondant aux protéines cellulaires biotinylées lorsque les trois constructions sont exprimées en comparaison au vecteur vide ne contenant pas BirA* (pistes 2, 3 et 4 comparées à la piste 1). De plus, il est intéressant de noter que les bandes révélées à l'aide de la streptavidine-HRP sont de plus faible intensité dans la condition BirA*-BNRF1 en comparaison à BirA*-Tax et BirA*-E7 malgré le fait qu'elle soit plus exprimée (piste 3 comparée aux pistes 2 et 4). Cela sous-entend que BirA*-BNRF1 est moins efficace que BirA*-Tax et BirA*-E7 pour biotinyler des protéines cellulaires.

Pour la purification de protéines biotinylées et les analyses en spectrométrie de masse comparant les trois protéines, il sera donc nécessaire que les niveaux d'expression de ces dernières soient similaires afin de pouvoir comparer les résultats obtenus.

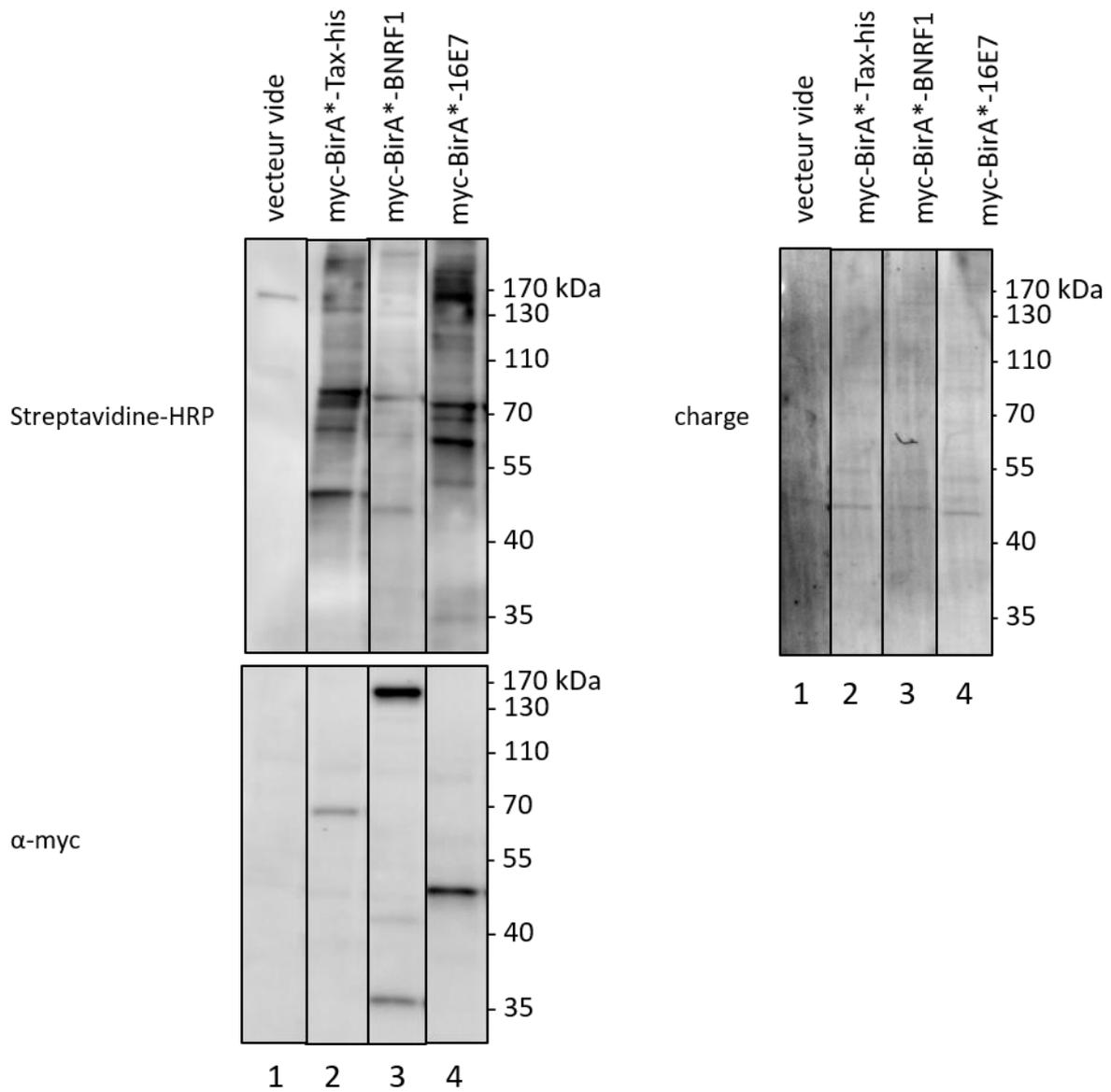


Figure 40. BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 biotinylent des protéines cellulaires après traitement à la biotine. Les différentes constructions ont été transfectées en cellules 293T et exprimées durant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées avec de la biotine (50µM) pendant 18h. Après le traitement, les cellules ont été lysées et la présence de protéines biotinylées a été mise en évidence à l'aide de la streptavidine-HRP et les constructions ont été révélées à l'aide d'un anticorps α-myc (BirA*). Le panel de droite montre la charge totale pour chacune des conditions.

III. BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 sont localisés dans une fraction cellulaire contenant le centrosome

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés à la localisation centrosomale de BirA*-BNRF1 et BirA*-E7, en comparaison à celle décrite dans la littérature. BNRF1 a été initialement décrite pour être localisée au niveau des corps PML de par son interaction avec Daxx (Tsai et al., 2011). Cette étude montre par immunofluorescence une colocalisation stricte de BNRF1 et Daxx au niveau des corps PML dans des cellules Hep2. De plus, des expériences de fractionnement cellulaires ont montré que BNRF1 était localisée au niveau du centrosome (Shumilov et al., 2017). La localisation nucléaire de E7 semble la mieux décrite et va en faveur de son interaction avec la protéine pRb dans le noyau (Barbosa et al., 1990) et une localisation diffuse d'E7 dans le cytoplasme est régulièrement observée lorsque E7 est exprimée ectopiquement (Gammoh et al., 2009; Nguyen et al., 2007). E7 est observée au niveau du centrosome dans les cellules mitotiques et en interphase par immunofluorescence et est retrouvée dans des fractions cellulaires contenant le centrosome après fractionnement (Nguyen et al., 2007).

Il est important de noter ici que nous n'avons pas eu accès aux constructions correspondantes ne comportant pas BirA*. De ce fait, l'analyse de la localisation s'est faite par comparaison aux données de la littérature.

1. *BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 ne semblent pas enrichies au niveau du centrosome dans les cellules U2OS C1G*

BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 ont été exprimées en cellules U2OS C1G et leur localisation a été analysée par immunofluorescence à l'aide d'un anticorps α -myc (*Figure 41*). Dans cette expérience, nous avons utilisés BirA* et BirA*-Tax comme contrôles de localisation. Nous retrouvons une localisation connue pour BirA*-Tax dans le noyau et au niveau de l'appareil de Golgi/centrosome (ligne 1), validant ainsi notre approche pour les deux autres protéines virales au sein de cette expérience. Cependant, la localisation cellulaire de BirA*-BNRF1 (ligne 3) et BirA*-E7 (ligne 4) ressemble à celle de BirA* (ligne 2), homogène et diffuse dans toute la cellule, et diffère de celle décrite dans la littérature pour chacune des deux protéines virales non-fusionnées à BirA*. Les analyses de colocalisation montrant les intensités de fluorescence

pour les protéines BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 (myc, en rouge) et le centrosome (C1G, en vert) ont été effectuées. Les intensités de fluorescence pour chacune des protéines n'augmentent pas au niveau du centrosome, ce qui signifie qu'il n'y pas d'enrichissement des protéines au niveau du centrosome.

Ces résultats ne permettent donc pas de déterminer une localisation centrosomale de BirA*-BNRF1 et BirA*-E7.

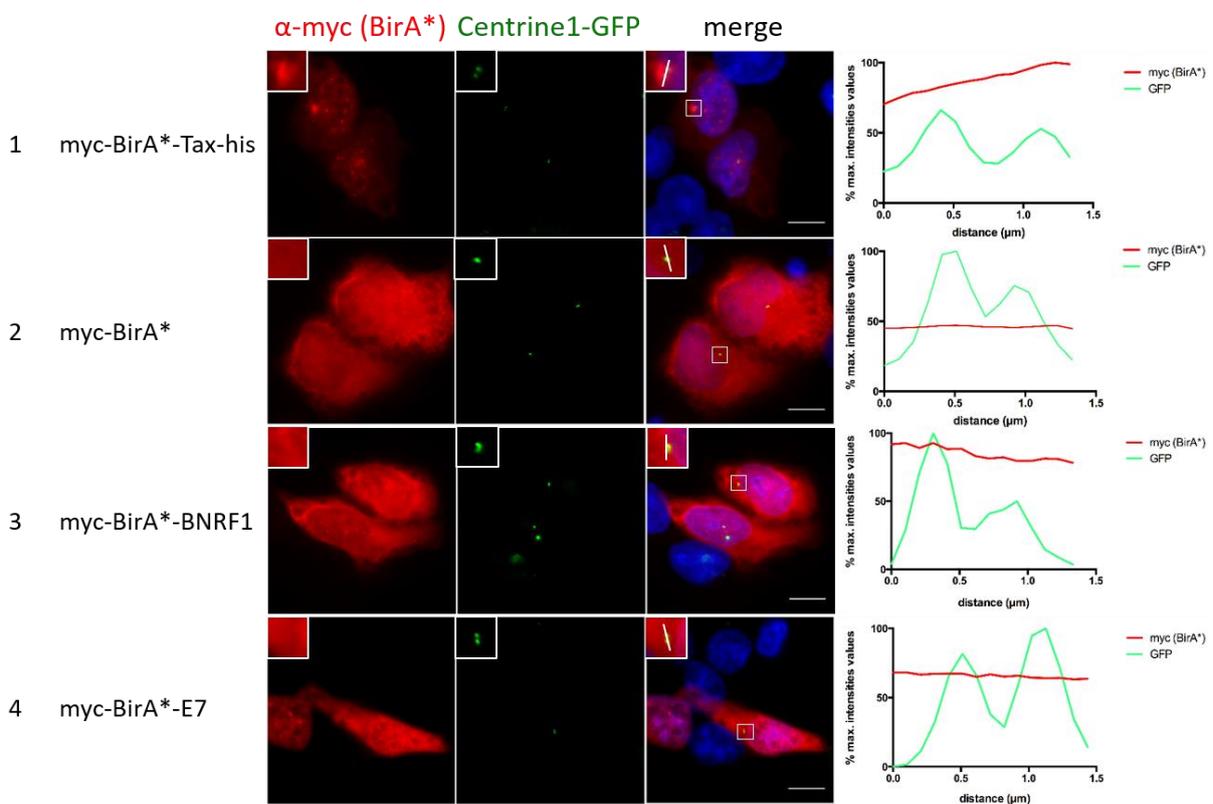


Figure 41. BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 ne sont pas enrichies au niveau du centrosome. Les différentes constructions ont été exprimées en cellules U2OS C1G pendant 24h. Les cellules ont ensuite été fixées au méthanol froid et marquées à l'aide d'un anticorps α -myc (rouge). Les centrosomes sont détectés par fluorescence directe de la Centrine-1-GFP (vert). Les noyaux sont contre-colorés au DAPI (bleu). Echelle = 10 μ m. Les histogrammes (à droite) représentent les pourcentages des intensités de fluorescence mesurées pour le signal myc (BirA*, en rouge) et pour la GFP (centrine1, en vert).

2. *BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 sont détectables dans une fraction cellulaire contenant le centrosome*

Les expériences d'immunofluorescence n'ayant pas permis de conclure sur la localisation centrosomale de BirA*-BNRF1 et BirA*-E7, nous avons choisi d'analyser leur localisation indirectement par fractionnement cellulaire. Pour cela, BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 ont été exprimées en cellules 293T pendant 24h. De plus, les cellules ont été traitées à la biotine, ce qui nous permettra d'évaluer la biotinylation liée à l'expression de BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 dans les fractions spécifiques. Comme pour les expériences d'immunofluorescence précédentes, BirA*-Tax est utilisé comme contrôle d'expression, de localisation et de biotinylation au centrosome. A l'issue du fractionnement, nous obtenons trois fractions : la fraction cytoplasmique (C), la fraction intermédiaire (I ; contenant l'appareil de Golgi et le centrosome ; Kfoury et al., 2008b) et la fraction nucléaire (N), que nous comparons avec le lysat total (L). La présence de BirA*-BNRF1, BirA*-E7 et des protéines biotinylées est mise en évidence dans les différentes fractions et le lysat total par western-blot (*Figure 42*).

Le fractionnement cellulaire a été validé à l'aide de marqueurs pour chacune des fractions : l' α -tubuline pour la fraction cytoplasmique, la γ -tubuline pour la fraction intermédiaire et la lamine B1 pour la fraction nucléaire. La γ -tubuline est détectée dans toutes les fractions avec cependant un léger enrichissement dans les fractions intermédiaires pour chaque condition (pistes 3, 7, 11 et 15). La γ -tubuline est connue pour être localisée au niveau de centrosome mais présente également une forme cytoplasmique. En revanche, la présence de la γ -tubuline dans les fractions nucléaires (pistes 4, 8, 12 et 16) suggère que la séparation du centrosome physiquement lié au noyau n'est pas été totalement efficace. Comme attendu, l' α -tubuline est détectée dans les lysats totaux et dans les fractions cytoplasmiques dans chacune des conditions (L et C pour chaque condition ; pistes 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13 et 14). La lamine B1 est retrouvée dans les lysats totaux et enrichie dans la fraction nucléaire (L et N ; pistes 1, 4, 5, 8, 9, 12, 13 et 16), comme attendu. L'intérêt de ce fractionnement est d'enrichir les fractions intermédiaires en centrosomes et d'exclure de ces fractions les autres composants cellulaires (ie. protéines cytoplasmiques ou nucléaires). La fraction intermédiaire étant appauvrie en protéines cytoplasmiques (α Tubuline) et nucléaires (lamine B1), cela peut donc nous être utile. Les différentes constructions sont exprimées dans chacune des fractions ce qui indique qu'elles seraient en partie localisées dans la fraction intermédiaire contenant le centrosome.

De plus, lorsque les constructions sont exprimées, nous pouvons détecter la présence de protéines cellulaires biotinylées dans chaque fraction. Ces résultats montrent que BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 sont localisées et biotinylent les protéines cellulaires dans une fraction cellulaire contenant le centrosome.

En résumé de ces données préliminaires concernant l'application de la technique de BioID aux protéines BNRF1 d'EBV et E7 d'HPV-16, l'expression des constructions et la biotinylation des constructions BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 ont été validés. De plus, BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 sont localisées dans des fractions cellulaires contenant le centrosome. L'amplification des centrosomes induite par ces constructions sera par la suite vérifiée.

Ainsi, ces résultats ont permis de valider les constructions BirA*-BNRF1 pour et BirA*-E7 pour l'identification respective de potentiels partenaires cellulaires de BNRF1 et E7 localisés au niveau du centrosome. Par la suite, les analyses de spectrométrie de masse seront réalisées et nous permettront d'identifier les partenaires centrosomaux de BNRF1 et E7.

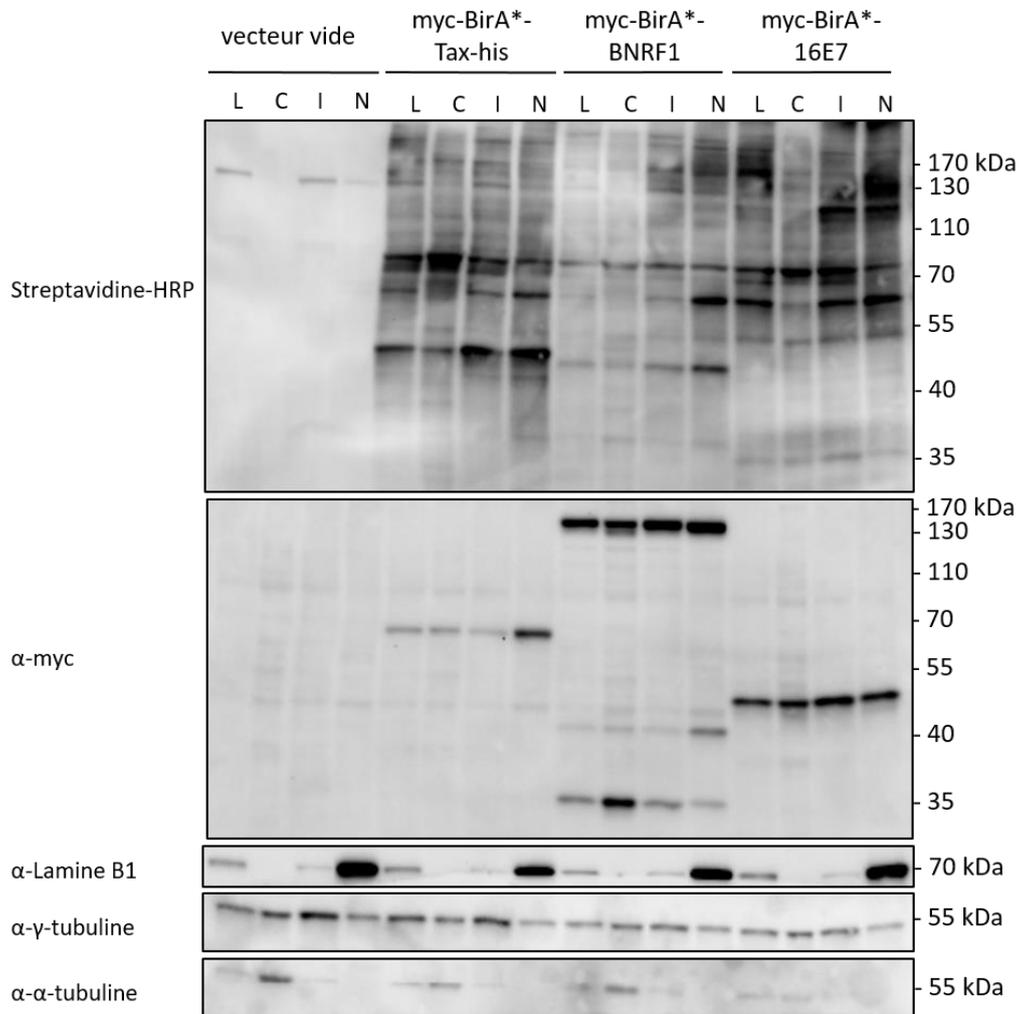


Figure 42. BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 sont détectables dans une fraction cellulaire contenant le centrosome. Les différentes constructions ont été exprimées en cellules 293T pendant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées avec de la biotine (50µM) pendant 18h. Après lyse et fractionnement cellulaire, les différentes fractions cytoplasmique (C), intermédiaire (I) et nucléaire (N) ainsi que les lysats totaux (L) sont analysées par western-blot à l'aide d'anticorps validant le fractionnement cellulaire (α-α-tubuline (C), α-γ-tubuline (I) et α-Lamine B1 (N)) et α-myc pour l'expression des constructions. Les protéines biotinylées sont mises en évidence à l'aide de la streptavidine-HRP.

DISCUSSION

Un des objectifs de l'équipe est d'étudier les mécanismes moléculaires de l'oncogenèse virale par l'identification d'interactions de protéines cellulaires avec l'oncoprotéine virale Tax du rétrovirus HTLV-1. Nous nous intéressons notamment aux rôles de Tax dans l'activation de la voie NF- κ B pour la survie cellulaire et dans les dysfonctions du centrosome pouvant contribuer à l'aneuploïdie caractéristique des cellules transformées.

La stratégie développée au cours de la thèse a consisté à adapter à Tax une technique innovante de criblage protéomique basée sur la biotinylation de proximité, appelée BioID. Ainsi, nous avons pu identifier de nombreux partenaires potentiels de Tax et intervenant notamment dans la signalisation NF- κ B ainsi que dans le cycle de duplication et les fonctions du centrosome.

Au sein de la voie de signalisation NF- κ B, nous avons identifié la protéine p62. J'ai pris en charge la confirmation de l'interaction entre Tax et p62, et Aurélien Schwob (doctorant dans l'équipe) a réalisé l'analyse des conséquences fonctionnelles de cette interaction. Ces données font l'objet de l'article présenté dans le chapitre 1 des résultats, actuellement en révision à *Scientific Reports*. Cette partie ne sera pas discutée en détail ici.

Les résultats exposés dans ce manuscrit concernent l'identification de partenaires centrosomaux de Tax. Ainsi, nous avons pu montrer que les partenaires de proximité de Tax au centrosome identifiés par la technique de BioID se répartissent en deux clusters d'interaction interdépendants, intervenant dans la transition G2/M du cycle cellulaire et dans le cycle de duplication et la maturation du centrosome. Parmi, ces protéines, nous avons choisi de nous intéresser plus en détail à la protéine Cep63 pour son rôle clé dans le cycle de duplication du centrosome et la progression du cycle cellulaire. L'interaction entre Tax et Cep63 a été validée par co-immunoprécipitation puis caractérisée à l'aide de mutants de l'une ou l'autre des protéines. Les résultats montrent la nécessité de la partie N-terminale de Cep63 dans l'interaction avec Tax et également la nécessité de l'ubiquitination de Tax dans son interaction avec Cep63. L'analyse fonctionnelle de cette interaction a été amorcée et devra être poursuivie par des expériences complémentaires.

Enfin, nous avons amorcé l'adaptation de la technique de BioID aux protéines oncogènes BNRF1 et E7 de EBV et HPV-16 en commençant par la validation des deux constructions utilisées, BirA*-BNRF1 et BirA*-E7.

I. Caractérisation phénotypique des altérations du centrosome induites par Tax

1. Quelles sont les altérations du centrosome induites par Tax ?

Nous avons caractérisé phénotypiquement les altérations du centrosome induites par Tax en analysant par immunofluorescence, dans les cellules U2OS, l'aspect de trois protéines centrosomales marquant différentes parties du centrosome : la centrine1 pour l'extrémité distale des centrioles, Cep152 pour l'extrémité proximale des centrioles et la γ -tubuline pour le matériel péricentriolaire. Nos résultats montrent que seul l'aspect de la centrine1-GFP est altéré en présence de Tax. En effet, seuls deux points de Cep152 et de γ -tubuline (correspondant à un centrosome normal) sont observés en présence de Tax alors que de multiples points sont observés pour la centrine1-GFP (ce qui diffère des deux points attendus pour un centrosome normal). Le fait que la γ -tubuline colocalise avec seulement deux points de centrine1-GFP en présence de Tax laisse penser qu'il pourrait s'agir d'un centrosome normal entouré de satellites contenant la centrine1-GFP mais pas la γ -tubuline. En effet, les satellites centriolaires sont de petites structures à proximité du centrosome impliquées dans le renouvellement de protéines centrosomales ayant un rôle dans la duplication du centrosome et sa stabilité. De nombreuses protéines ont été identifiées au niveau des satellites centriolaires dont la centrine1 (Tollenaere et al., 2015).

De façon remarquable, Löffler et al. (2013) observent le même phénotype que celui observé dans nos expériences pour la γ -tubuline et la centrine dans des cellules A549 exprimant de façon stable la centrine2-Dendra2 après induction de dommages à l'ADN par irradiation des cellules. Ces auteurs ont montré que l'amplification des centrosomes induite par des dommages à l'ADN s'effectuait par la formation excessive de satellites centriolaires observés par microscopie électronique immunogold. Tax étant connue pour induire des dommages à l'ADN via la production de ROS (Kinjo et al., 2010), ceci pourrait donc être le cas en présence de Tax. Tax pourrait ainsi mettre à contribution les satellites centriolaires excessifs induits par les dommages à l'ADN comme plateforme de stockage des protéines centrosomales pour l'amplification des centrosomes.

L'hypothèse d'une formation excessive de satellites centriolaires sous l'action de Tax pourrait être testée par immunofluorescence en marquant d'autres protéines des satellites centriolaires telles que PCM1, la péricentrine ou encore Cep131 (Tollenaere et al., 2015).

De plus, les observations de l'aspect de Cep152 et de la centrine1 pourraient également résulter d'un arrêt du cycle cellulaire en phase S. (Cizmecioglu et al., 2010) observent de multiples points de centrine et deux points de Cep152 dans les cellules arrêtées en phase S par traitement à l'aphidicoline. Pour les auteurs, ce phénotype est indicateur d'une surduplication des centrioles lors de la phase S. Tax étant connue pour induire un délai de la phase S (Kim et al., 2010), il est possible que ce phénotype soit une conséquence indirecte de la dérégulation du cycle cellulaire par Tax. Une autre manière de voir le processus serait que les multiples points de centrine observés par les auteurs soient en réalité une accumulation de la centrine au niveau des satellites centriolaires nécessaire à sa localisation au niveau du centrosome mature induits par l'arrêt en phase S.

De manière intéressante, Peloponese et al. (2005) ont montré une augmentation des points de péricentrine, protéine du PCM mais également localisée au niveau des satellites, en présence de Tax. Dans cette étude, les auteurs ont montré une interaction entre Tax et RanBP1 à l'origine de cet aspect de la péricentrine dans des fibroblastes embryonnaires de souris. De ces observations, les auteurs abordent la notion d'une fragmentation du centrosome induite par Tax, compte tenu de la fonction de RanBP1 sur le désengagement des centrioles (Di Fiore, 2003). Cependant, leur analyse pourrait être complétée par l'analyse de l'aspect de marqueurs du centriole en présence de Tax permettant de confirmer ou non l'hypothèse d'une fragmentation du centrosome en présence de Tax. Le fait que la péricentrine soit une protéine des satellites centriolaires va en faveur d'une formation excessive de satellites centriolaires en présence de Tax.

Löffler et al. (2013) ont analysé l'amplification des centrosomes induite suite à l'induction de dommages à l'ADN dans des cellules A549 et U2OS. Dans cette étude, ils observent une augmentation du nombre de points de centrine avant d'observer une augmentation du nombre de points de points de la γ -tubuline (commençant à 72h post-transfection). Ils concluent que l'accumulation de satellites centriolaires précède l'amplification des centrosomes en réponse aux dommages à l'ADN.

Consistant avec ces travaux, Ching et al. (2006) observent une surduplication des centrioles visualisée par une augmentation du nombre de points de points de la γ -tubuline après arrêt des cellules en phase G1/S (essai classiquement utilisé pour la surduplication des centrioles). Les auteurs observent également cette surduplication des centrioles en présence de Tax dans les cellules MT4 chroniquement infectées par HTLV-1 et JPX-9 caractérisée par une

augmentation du nombre de point de la γ -tubuline en présence de Tax. Cette étude montre l'action antagoniste de Tax sur la fonction d'inhibition de la duplication des centrioles de la protéine Tax1BP2. Ainsi, cela irait plus en faveur d'une surduplication des centrioles. De plus, cette étude se place dans un système d'expression de Tax plus physiologique que sont les lignées cellulaires chroniquement infectées par HTLV-1. Nitta et al. (2006) observent également une augmentation du nombre de points de γ -tubuline dans des cellules JPX-9 et dans des cellules de patients ATL.

Si l'on se replace dans le contexte de nos travaux, nos observations vont en faveur d'une formation excessive de satellites centriolaires lorsque Tax est exprimée durant 72h. Il serait par la suite intéressant de se placer dans une cinétique d'expression de Tax plus longue afin de voir si l'aspect de la γ -tubuline est altéré. Si tel est le cas, cela irait en faveur d'un modèle dans lequel Tax favorise l'accumulation de protéines centrosomales au niveau des satellites centriolaires pour leur assemblage plus tardif au niveau du centrosome afin de favoriser l'amplification des centrosomes. L'altération de l'aspect de la γ -tubuline a été observée dans nos expériences dans la lignée cellulaire C8166 chroniquement infectée par HTLV-1, ce qui est cohérent avec l'hypothèse d'une cinétique de l'induction des altérations différente entre les U2OS C1G et les lignées cellulaires chroniquement infectées par HTLV-1 ainsi que la mise en place de satellites centriolaires avant l'amplification des centrosomes. Il serait également intéressant d'observer l'aspect de la γ -tubuline dans des lymphocytes T exprimant uniquement Tax (lignée cellulaire Jurkat inductible pour l'expression de Tax, par exemple) pour se replacer dans un contexte proche de notre système actuel et où l'expression de Tax plus physiologique.

Dans nos travaux, nous utilisons des cellules exprimant de façon stable la centrine1-GFP. Dans ce système, la centrine1-GFP est surexprimée, ce qui peut représenter un biais dans les interactions entre la centrine1 et les autres protéines centrosomales et cellulaires. Une surexpression de la centrine1 pourrait favoriser le recrutement d'autres protéines au niveau du centrosome dans une plus grande mesure que lorsqu'elle est exprimée à des niveaux endogènes. Il serait intéressant de se placer à un niveau d'expression endogène de la centrine1, en générant par exemple une fusion centrine1-GFP par technique CRISPR-Cas9 dans les cellules U2OS. Cela permettrait de se rapprocher au plus près de la physiologie des

interactions au centrosome tout en pouvant suivre facilement les altérations du centrosome grâce à la présence de la GFP.

2. *Apport de la microscopie super-résolutive pour la caractérisation des altérations centrosomales*

Il serait également intéressant d'analyser d'autres marqueurs permettant une caractérisation plus fine des altérations centrosomales induites par Tax. Ainsi, utiliser des marqueurs des extrémités distale ou proximale des centrioles en combinaison avec des marqueurs du matériel péricentriolaire et des satellites centriolaires semble être la stratégie la plus judicieuse à adopter.

La microscopie à fluorescence classique est utilisée depuis longtemps pour déterminer la localisation approximative des protéines centrosomales. Cependant, les dimensions des centrioles sont proches de celles de la résolution optique, ce qui ne permet pas de déterminer une localisation précise des protéines centrosomales. Le développement récent des techniques de microscopie à fluorescence super-résolutive comme l'illumination structurée (SIM) ou les approches de localisation de molécules uniques telles que la microscopie à reconstruction optique stochastique (STORM) ont permis une analyse fine de la localisation des protéines et de leurs connections sous forme de complexes dynamiques au sein du centrosome. Par exemple, l'utilisation de l'illumination structurée a permis de redéfinir le PCM, qui était préalablement vu comme une matrice protéique amorphe, comme une matrice organisée composée de protéines interagissant de façon dynamique (Fu and Glover, 2012; Lawo et al., 2012; Sonnen et al., 2012). Mettre à profit la puissance de cette technologie et l'appliquer à l'analyse des altérations centrosomales induites par Tax serait un atout majeur quant à une meilleure compréhension de ce processus.

II. Quelles informations les données obtenues par la technique de BioID nous apportent-elles sur l'interactome de Tax ?

1. *Tax interagit avec des clusters d'interactions de protéines centrosomales*

L'analyse spécifique des potentiels partenaires de Tax identifiés par BioID et annotés comme centrosomaux dans la base de données CentrosomeDB a mis en évidence deux clusters d'interactions interdépendants. Le cluster 1 (en orange dans la partie Résultats) regroupe des protéines décrites pour leur rôle dans le cycle de duplication du centrosome telle que Cep63, en particulier dans sa maturation en phase G2/M telle qu'ODF1. Ces protéines sont également impliquées dans le recrutement d'autres protéines au niveau du centrosome lors de la mitose pour que celui-ci puisse assurer ses fonctions liées à la progression du cycle cellulaire telle que CDK1 impliqué dans la transition G2/M, le complexe HAUS important pour la stabilité du fuseau mitotique ou encore ODF2 nécessaire à la localisation centrosomale de PLK1, de la ninéine et de la centrine (Song et al., 2006). Le cluster 2 (en bleu dans la partie Résultats) regroupe des protéines qui ne sont pas directement impliquées dans la biogenèse et le cycle de duplication du centrosome, mais qui y participent indirectement en contrôlant la progression du cycle cellulaire lors de la mitose telle que CDK2 ou les cyclines A2 et B2. La protéine CDK1, requise pour la transition G2/M en formant un complexe avec la cycline B, relie ces deux clusters. Cela rend compte du rôle central de CDK1 pour coordonner ces deux clusters, probablement de manière spatio-temporelle, dans la biologie du centrosome et ses fonctions mitotiques.

La mise en évidence de ces clusters dans notre analyse de BioID suggère que Tax pourrait jouer sur ces deux aspects du contrôle du cycle cellulaire, à savoir la biogenèse et le cycle de duplication du centrosome ainsi que ses fonctions mitotiques, et la progression du cycle cellulaire, pour induire une instabilité génomique.

L'identification de ces protéines centrosomales fournit une banque de potentiels interactants de Tax dont l'analyse devra se faire en deux temps : confirmation des interactions par une autre approche, comme par co-immunoprécipitation et/ou par microscopie super-résolutive ; et analyse fonctionnelle de ces interactions. L'analyse fonctionnelle se fera en surexprimant ou en éteignant l'expression de ces protéines en présence de Tax pour caractériser leur impact non seulement sur le cycle de duplication du centrosome, à l'aide de marqueurs spécifiques

des différentes parties du centrosome (ie. extrémités distales/proximales, PCM) dans des cellules synchronisées, mais également sur ses fonctions en lien avec la mise en place de l'instabilité génomique, c'est-à-dire dans le cycle cellulaire, par la mise en évidence de fuseaux pseudobipolaires, ou encore le recrutement de protéines nécessaire à la progression du cycle cellulaire, par exemple.

Pour illustrer nos propos, nous choisissons ici de discuter l'exemple de protéines dont les fonctions sont liées aux fonctions mitotiques du centrosome, HAUS2/8 et Aladin, ou à la maturation du centrosome, OFD1.

- a. Partenaires impliqués dans la nucléation des microtubules et le regroupement de centrosomes lors de la division cellulaire : HAUS2/8 et Aladin

Nous avons identifié les protéines HAUS 2 (aussi appelée Cep27) et HAUS8 (identifiée dans n=2/3 des expériences). Ces protéines font partie du complexe augmine/HAUS, initialement décrit chez la drosophile pour la nucléation de microtubules indépendante du centrosome (Goshima et al., 2008) et comprenant huit sous-unités. Elles ont été décrites ensuite chez l'humain comme s'associant préférentiellement au complexe γ -TuRC durant la mitose. Cette interaction est nécessaire pour la génération des microtubules du fuseau mitotique (Habermann and Lange, 2012; Uehara et al., 2009). Plus précisément, les sous-unités du complexe HAUS ne sont pas directement requises pour la nucléation des microtubules mais joueraient plutôt un rôle dans la stabilisation de l'ancrage des microtubules aux kinétochores pour la formation d'un fuseau bipolaire robuste (Uehara et al., 2009).

En plus de son rôle dans la stabilité du fuseau mitotique, HAUS8 est requise pour le maintien de l'intégrité du centrosome lors de la mitose (Lawo et al., 2009). Plus précisément, suite à une déplétion de la sous-unité HAUS8, Wu et al. (2008) ont observé une amplification des centrosomes visualisée par une altération de la localisation de la γ -tubuline et la formation de fuseaux mitotiques pseudobipolaires sous-entendant un regroupement des centrosomes. De manière intéressante, un criblage des protéines du centrosome a mis en évidence qu'une déplétion des sous-unités 1, 3 et 6 du complexe HAUS empêchait le mécanisme de regroupement des centrosomes et menait à la formation de fuseaux mitotiques multipolaires. Ainsi, la stabilité du fuseau dépendant du complexe HAUS, et par extension les forces de

tension des microtubules, sont requises pour le regroupement des centrosomes (Leber et al., 2010).

Plusieurs hypothèses sur l'interaction possible entre les protéines HAUS 2 et 8 et Tax peuvent être soulevées. Premièrement, Tax pourrait interagir avec ces deux protéines pour maintenir leur localisation au niveau du centrosome, ce qui permettrait le maintien de la stabilité du fuseau et forcerait la progression de la mitose malgré la présence de dommages à l'ADN que Tax génère. De cette manière, Tax pourrait maintenir l'instabilité génétique au cours de la division cellulaire.

Deuxièmement, Tax pourrait indirectement favoriser le regroupement des centrosomes en interagissant avec le complexe HAUS, ce qui permettrait la mise en place de fuseaux pseudobipolaires (plutôt que multipolaires, non viables) pour maintenir l'instabilité génomique à l'issue de la division cellulaire. Troisièmement, en interagissant avec le complexe HAUS, Tax pourrait favoriser sa délocalisation des microtubules du fuseau mitotique avant l'anaphase : dans ce contexte-là, les forces de tension et la nucléation de microtubules se faisant à l'anaphase pour la mise en place du fuseau central au niveau des kinétochores se ferait dans une moindre mesure et pourrait entraîner une mauvaise ségrégation des chromosomes. Quatrièmement, il a été montré que les microtubules nucléés lors de l'anaphase par le complexe HAUS sont nécessaires pour l'achèvement de la cytokinèse (Uehara et al., 2016). Sachant que l'amplification des centrosomes peut être due à un défaut de cytokinèse, une altération des fonctions du complexe HAUS par Tax lors de l'anaphase pourrait mener à un échec de l'achèvement de la cytokinèse. Une analyse de l'achèvement de la cytokinèse en présence de Tax après déplétion respective de HAUS 2 ou HAUS 8 permettrait de caractériser la contribution relative de l'une ou l'autre des protéines dans les altérations induites par Tax.

Dans ces quatre hypothèses, Tax pourrait exercer différentes actions qui favoriseraient l'instabilité génomique au cours du cycle cellulaire.

Une autre protéine impliquée dans la stabilité des microtubules et le regroupement de centrosomes est la protéine Aladin. Cette dernière est requise pour la localisation centrosomale de AURKA impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et NuMA, impliquée dans le maintien de l'intégrité du fuseau mitotique, pour la formation fuseau mitotique (Carvalho et al., 2015). Plus précisément, une déplétion de la protéine Aladin entraîne une

absence de localisation d'AURKA et NuMA au niveau des centrosomes lors de la mitose et perturbe la stabilité des microtubules du fuseau et leur ancrage au niveau des kinétochores. Cette même étude a montré qu'Aladin se liait à la forme active d'AURKA au niveau des pôles mitotiques. De plus, une inhibition de AURKA induit la formation de fuseaux multipolaires (Asteriti et al., 2014), ce qui pourrait probablement être dû à une amplification des centrosomes. En interagissant avec Aladin, Tax pourrait empêcher le recrutement d'AURKA au niveau du centrosome et favoriser la formation de fuseaux multipolaires.

b. Partenaire impliqué dans le contrôle de la longueur des centrioles : OFD1

La protéine OFD1 a également été identifiée dans notre crible comme un potentiel partenaire de Tax. OFD1 est impliquée dans le contrôle de la longueur des centrioles ainsi que dans l'assemblage des appendices distaux et subdistaux. Il a été montré qu'une élongation excessive des centrioles induite par une surexpression de la protéine CPAP résulte en la nucléation de nouveaux pro-centrioles et par conséquent à la formation de fuseaux mitotiques multipolaires (Kohlmaier et al., 2009). CP110 est également impliquée dans le contrôle de la longueur des centrioles mais exerce une action antagoniste à celle de CPAP ; une sous-expression de CP110 étant à l'origine de l'élongation des centrioles (Schmidt et al., 2009).

Plus précisément, une déplétion de OFD1 provoque une hyper-élongation des centrioles et altère le recrutement de protéines des appendices du centriole père (Singla et al., 2010; Wang et al., 2018). De plus, Thauvin-Robinet et al., (2014) ont mis en évidence une interaction entre OFD1 et C2CD3, dont la déplétion conduit à la formation de centrioles plus courts et à la perte des appendices distaux et subdistaux. De ces observations, les auteurs ont proposé un modèle dans lequel C2CD3 favorise l'élongation des centrioles où OFD1 agit en tant que régulateur négatif de C2CD3 pour le contrôle de la longueur des centrioles. Sachant que les appendices subdistaux sont impliqués dans la nucléation des microtubules au niveau du centrosome (Uzbekov and Alieva, 2018), l'altération de l'assemblage des appendices du centriole père observée suite à la déplétion d'OFD1 pourrait résulter en des défauts de formation du fuseau mitotique.

Ainsi, en interagissant avec OFD1, Tax pourrait induire des altérations structurales des centrosomes. Si tel est le cas, il serait par la suite intéressant de voir si une altération de la longueur des centrioles impacte la formation du fuseau mitotique en présence de Tax.

2. *Tax interagit avec des protéines cellulaires non-centrosomales*

a. Signification des voies cellulaires identifiées par le BioID

L'analyse par spectrométrie de masse réalisée lors du BioID sur lysats cellulaires totaux a permis l'identification de plus de 300 partenaires potentiels de Tax intervenant dans diverses voies cellulaires identifiées par analyse « Reactome pathways » de type GO (Gene Ontology) : « Réplication de l'ADN », « Réparation de l'ADN », « Expression des gènes (transcription) », « Métabolisme des ARN », « Métabolisme des protéines », « Transport médié par les vésicules », « Cycle cellulaire », « Réponses cellulaires aux stimuli externes », « Biogenèse et maintien des organelles » et « Pathologies ».

L'identification de ces différentes voies cellulaires ainsi que l'abondance de protéines retrouvées dans ces voies reflètent les rôles diversifiés connus de Tax au sein de la cellule. Au niveau des TSS, Tax interagit avec des facteurs d'épissage, ce qui est cohérent avec un rôle dans la voie « Métabolisme des ARNs » (Semmes and Jeang, 1996). Le délai de la phase S induit par Tax indique une possible implication de Tax non seulement dans la voie « Cycle cellulaire » mais également dans la voie « Réplication de l'ADN ». (Kim et al., 2010). De même, de nombreuses interactions de Tax avec des protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire ou dans les diverses voies de réparation de l'ADN justifient l'identification de ces voies cellulaires dans notre analyse (Baydoun et al., 2012; Belgnaoui et al., 2010; Ducu et al., 2011; Jeang et al., 1990; Kao and Marriott, 1999; Majone and Jeang, 2012; Majone et al., 2005). Par le biais de la production de ROS, Tax induit un stress génotoxique et elle interagit elle-même avec des protéines activées en cas de stress génotoxiques telles que MDC1 dans la réponse aux dommages à l'ADN par exemple, ce qui est cohérent avec une implication dans la voie « Réparation de l'ADN » (Belgnaoui et al., 2010).

De même, Tax étant connue pour son rôle de transactivateur, il est cohérent d'identifier de nombreux partenaires potentiels intervenant dans l'expression des gènes. Cependant, compte tenu de son rôle important dans l'activation de la transcription de certains gènes, le ratio d'enrichissement de la voie cellulaire « Expression des gènes » semble peu élevé malgré le nombre important de partenaires identifiés dans cette voie (70). Cela peut s'expliquer par l'incapacité de BirA*-Tax à transactiver le LTR d'HTLV-1 (données non montrées discutées

dans le paragraphe suivant) et, par extension, très probablement son incapacité à transactiver certains gènes cellulaires en comparaison de Tax.

Il a été suggéré que Tax pouvait agir directement en tant qu'E3 ligase ou indirectement en interagissant avec des enzymes de conjugaison à l'ubiquitine pour l'ubiquitination de ses cibles menant à leur activation ou à leur dégradation protéasomale, jouant donc un rôle dans la voie « Métabolisme des protéines » (Ho et al., 2015; Wang et al., 2016). Il a également été montré que les cellules infectées sécrétaient Tax sous forme soluble mais également contenue dans des exosomes (Jaworski et al., 2014). Il est donc attendu que Tax interagisse avec des protéines intervenant dans la voie « Transport médié par des vésicules ».

Ainsi, les voies cellulaires identifiées suite à l'analyse de spectrométrie de masse semblent cohérentes avec les fonctions connues de Tax. L'identification de nouveaux partenaires dans ces voies peut mener à une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires dérégulés par Tax dans le contexte de l'oncogenèse induite par HTLV-1.

b. Considération sur la conservation des fonctions de Tax au sein de la fusion
BirA*-Tax

Cependant, la signification biologique de l'identification de ces voies cellulaires est discutable. Préalablement à l'expérience de BioID, nous avons validé à différents niveaux la construction BirA*-Tax pour l'identification de ses partenaires cellulaires. Les résultats obtenus montrent notamment que contrairement à ce qui est connu de Tax dans la littérature et à la construction Tax, BirA*-Tax ne conserve pas la capacité à activer la transcription à partir du LTR d'HTLV-1 (données non montrées ; Green et Chen 1990). Ceci corrèle avec l'analyse de la localisation de la construction puisque celle-ci forme très peu de speckles nucléaires caractéristiques de la transactivation du génome. La conformation d'une protéine conditionne sa localisation, son interaction avec ses partenaires et par conséquent ses fonctions. Tax a un poids moléculaire de 40 kDa et BirA* de 35 kDa. Il est donc plausible que la fusion traductionnelle de Tax et de BirA* induise une modification de la conformation de Tax, qui affecterait de façon spécifique certaines fonctions de Tax.

La construction BirA*-Tax comporte 15 acides aminés entre la séquence de BirA* et celle de Tax, pouvant être considéré comme un linker entre les deux protéines. De manière générale, les propriétés d'un bon linker incluent sa longueur, sa composition en acides aminés, sa

flexibilité et sa structure secondaire (Chen et al., 2013), n'ayant pas été analysées dans le cadre de notre étude. Il se peut donc que malgré la présence de ces 15 acides aminés, la composition et la flexibilité de la séquence n'en font pas un bon linker et ne permet pas le bon repliement de BirA* et Tax respectivement, ce qui serait compatible avec l'hypothèse d'un changement de conformation tridimensionnelle de BirA*-Tax.

Malgré la possible modification de conformation de Tax au sein de la fusion BirA*-Tax, sa distribution nucléaire et cytoplasmique n'est pas altérée, ce qui suggère que le NES de Tax ne serait pas impacté par la modification de conformation et que son démasquage reste intact pour sa reconnaissance par l'exportine CRM-1 et son export nucléaire. Cependant, l'absence d'activation du LTR d'HTLV-1 suggère que la modification de conformation de Tax au sein de la fusion BirA*-Tax pourrait empêcher l'interaction avec CREB nécessaire pour l'activation du LTR. Consistant avec cela, CREB n'est pas retrouvé dans nos analyses de BioID, ce qui va en faveur d'un changement de conformation tridimensionnelle à l'origine d'une perte de l'interaction.

La modification de conformation pourrait par ailleurs empêcher la dimérisation de Tax nécessaire à son activité de transactivateur viral (Jin, 1997). Il serait donc intéressant d'analyser par complémentation génétique (à l'aide de deux mutants perte-de-fonction de BirA*-Tax) la capacité de BirA*-Tax à dimériser.

Cette possible modification de conformation peut induire un biais dans les résultats obtenus par BioID. En effet, si la modification de conformation perturbe les interactions normales de Tax, soit par la perte d'une interaction, soit par le gain d'une interaction inexistante dans le cas d'une protéine Tax non étiquetée, cela peut mener à l'obtention par BioID de faux-négatifs ou faux-positifs, et donc à l'identification ou à la non-identification de voies cellulaires ciblées par Tax dans un contexte physiologique respectivement.

c. Signification des potentiels partenaires retrouvés dans les trois expériences de BioID

En plus de p62, six protéines ont été retrouvées systématiquement dans les trois analyses réalisées dont nous détaillerons les fonctions dans les prochains paragraphes : c-Jun, DNAJA1, UBE2C, TRMT112, BANP et NDUFA8. Ces protéines n'ont pas été décrites dans la littérature comme étant des partenaires de Tax avant notre étude. Ceci est d'autant plus intéressant car,

comme cela sera détaillé par la suite, ces protéines sont impliquées dans des fonctions cellulaires dérégulées par Tax pour promouvoir la transformation cellulaire.

i. Partenaire impliqué dans la réparation de l'ADN : TRMT112

TRMT112 est une méthyltransférase ciblant les histones mais également les ARN de transfert. En formant un hétérodimère avec la protéine ABH8, protéine impliquée dans la réparation de l'ADN, elle catalyse la méthylation des ARN de transfert (Fu et al., 2010). Chez la levure, la méthylation des ARN de transfert joue un rôle dans la régulation de la traduction de protéines impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN (Begley et al., 2007). De cette constatation, Fu et al. (2010) ont montré qu'une déplétion de ce complexe, et donc une absence de modification des ARN de transfert, induit une diminution de la survie cellulaire suite à l'induction de dommages à l'ADN (bléomycine et methyl methanesulfonate). Ces données confèrent indirectement un rôle de TRMT112 dans la réponse aux dommages à l'ADN en lien avec la méthylation des ARN de transfert. Tax est déjà connue pour interagir avec des histones méthyltransférases impliquées dans le remodelage de la chromatine pour moduler l'expression des gènes telles que SMYD3 et SUV39H1 (Kamoi et al., 2006; Yamamoto et al., 2011). Il est donc possible que Tax interagisse avec d'autres méthyltransférases et notamment avec TRMT112, pour favoriser la survie cellulaire malgré une présence de dommages à l'ADN, qui devraient normalement mener à l'apoptose de la cellule lorsqu'ils sont trop importants.

ii. Partenaires impliqués dans l'inhibition de l'apoptose : c-Jun, DNAJA1 et NDUFA8

La famille AP-1 est composée de 18 facteurs de transcription répartis en quatre sous-familles (Jun, Fos, ATF/CREB et Maf) dont l'activité transcriptionnelle est régulée par des stimuli tels que les facteurs de croissance, infections virales ou bactériennes, ou un stress cellulaire, par exemple. Ces facteurs de transcription sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires dont l'apoptose et la prolifération cellulaire.

Des études ont montré une phosphorylation constitutive de c-Jun médiée par Tax dans les lignées cellulaires chroniquement infectées par HTLV-1 (Arnulf, 2002). La phosphorylation de c-Jun est impliquée dans le maintien de la prolifération cellulaire et l'inhibition l'apoptose

(Stark et al., 2014; Wisdom et al., 1999). Ainsi, Tax pourrait interagir avec c-Jun pour maintenir cette dernière sous sa forme active et favoriser ainsi la prolifération cellulaire et inhiber l'apoptose.

Les protéines DNAJ sont des co-chaperonnes des protéines Hsp (Heat shock proteins) impliquées dans le métabolisme des protéines (traduction, repliement et dépliement, translocation, dégradation). Outre ce rôle attribué aux protéines DNAJ, la protéine DNAJA1 est également impliquée dans l'inhibition de l'apoptose via son rôle dans le transport de protéines à l'intérieur de la mitochondrie. Sachant que Tax inhibe l'apoptose, nous pouvons donc penser qu'une interaction avec DNAJA1 pourrait être impliquée dans ses fonctions anti-apoptotiques. DNAJA1 interagit avec la protéine pro-apoptotique Bax et régule négativement sa translocation du cytosol vers la mitochondrie en réponse à un stress cellulaire (Gotoh et al., 2004). Ainsi, DNAJA1 protégerait la cellule de l'apoptose. Cependant, une étude plus récente basée sur des analyses de biochimie structurale et des prédictions bioinformatiques a montré que DNAJA1 pouvait interagir avec la protéine chaperonne DNAK (Hsp70) et promouvoir l'apoptose en cas de stress environnemental tel qu'un traitement des cellules aux rayons ultraviolets (Stark et al., 2014). De manière intéressante, la formation du complexe DNAJA1/DNAK bloque l'hyperphosphorylation de c-Jun impliquée dans l'inhibition de l'apoptose et la prolifération cellulaire, ce qui est cohérent avec les données de la littérature évoquées dans le paragraphe précédent. Une sous-expression de DNAJA1 a été observée dans les cancers pancréatiques, ce qui suggère un mécanisme impliquant DNAJA1 dans lequel l'hyperphosphorylation de c-Jun en absence de DNAJA1 maintiendrait l'inhibition de l'apoptose pour la survie cellulaire.

Que la protéine DNAJA1 soit une protéine pro- ou anti-apoptotique, Tax pourrait interagir avec elle et déréguler ses fonctions. Par exemple, Tax pourrait interagir avec DNAJA1 pour empêcher la formation des complexes DNAJA1/DNAK. Dans ce cas précis, cela lèverait l'inhibition de l'hyperphosphorylation de c-Jun qui pourrait alors exercer ses fonctions anti-apoptotiques. Ainsi la potentielle interaction entre Tax et DNAJA1 sous-entend un duo fonctionnel avec c-Jun dans l'inhibition de l'apoptose et la promotion de la survie cellulaire.

Une autre protéine pouvant intervenir dans l'inhibition de l'apoptose médiée par Tax est la protéine NDUFA8. La protéine NDUFA8 est impliquée dans la chaîne respiratoire

mitochondriale faisant intervenir le cytochrome C (pour revue, Castanier et Arnoult 2010). Même si un lien direct entre la chaîne respiratoire mitochondriale et l'apoptose n'a pas été encore documenté, Formigli et al. (2000) ont mis en évidence l'implication de la chaîne respiratoire mitochondriale dans une forme de mort cellulaire partageant des mécanismes et aspects morphologiques communs à l'apoptose et à la nécrose. De manière intéressante, l'apoptose intrinsèque implique une libération du cytochrome C (Castanier and Arnoult, 2010). De plus, Tax est connue pour protéger les cellules contre l'apoptose intrinsèque (Saggiaro et al., 2001). Bien que la localisation de Tax au niveau des mitochondries n'ait pas encore été documentée, Tax pourrait très bien interagir avec NDUFA8 en cas de stress pro-apoptotique pour empêcher le relargage du cytochrome C et ainsi empêcher l'apoptose des cellules.

iii. Partenaires impliqués dans la promotion du cycle cellulaire : UBE2C et BANP

Tax est connue pour interagir avec des protéines de la machinerie d'ubiquitination pour moduler ses fonctions. Notamment, Tax interagit avec les E3 ubiquitine ligases RNF4 et RNF8 pour l'activation de la voie NF- κ B (Fryrear et al., 2012; Ho et al., 2015). Tax interagit également avec l'enzyme de conjugaison à l'ubiquitine E2 Ubc13 pour sa propre ubiquitination nécessaire au recrutement du complexe IKK dans l'activation de la voie NF- κ B (Shembade et al., 2007). Pour ces raisons-là, il est possible que Tax interagisse avec d'autres enzymes impliquées dans le processus d'ubiquitination, que ce soit pour réguler ses propres fonctions ou moduler les fonctions de protéines cellulaires. UBE2C est une enzyme de conjugaison à l'ubiquitine E2 impliquée dans la modulation des fonctions de l'E3 ligase APC/C lors de la mitose. UBE2C forme des chaînes de polyubiquitine en Lys11 sur les substrats du complexe APC/C tels que la cycline B1, ce qui mène à leur dégradation protéasomale et à la sortie de la mitose (Garnett et al., 2009; Williamson et al., 2009). De manière intéressante, Tax promeut des aberrations mitotiques en interagissant avec le complexe APC/C et l'activant de façon prématurée (Liu et al., 2005). APC/C est également un régulateur du regroupement des centrosomes (Drosopoulos et al., 2014). Plus précisément, la kinésine Eg5 est un substrat d'APC/C. Une inhibition d'APC résulte en la stabilisation d'Eg5 et l'augmentation de son niveau protéique dans la cellule. Une telle augmentation résulte en une perturbation de la balance des forces

de tension au niveau du fuseau mitotique et empêche le regroupement de centrosome. En activant APC/C, Tax pourrait directement induire une diminution des niveaux protéiques d'Eg5 et favoriser ainsi le regroupement des centrosomes pour favoriser l'aneuploïdie. Une autre manière de favoriser le regroupement des centrosomes serait une interaction entre Tax et UBE2C. L'interaction permettrait une augmentation de l'activité de UBE2C pour l'ubiquitination des substrats du complexes APC/C, dont Eg5 et favoriser sa dégradation protéosomale. Cela mènerait donc à une diminution du niveau protéique d'Eg5 favorable au regroupement de centrosomes.

Outre son rôle dans le contrôle de la recombinaison V(D)J au cours du développement des lymphocytes T, la protéine BANP (aussi appelée SMAR1, pour Scaffold/Matrix-Associated Region 1 binding protein) réprime l'expression de la cycline D1 en recrutant HDAC1 sur son promoteur (Rampalli et al., 2005). De manière intéressante, Tax est connue pour interagir avec HDAC1, protéine également retrouvée dans nos analyses, pour lever l'inhibition de la transcription virale médiée par HDAC1 (Ego et al., 2002; Lu et al., 2004). De plus, Tax active la transcription de la cycline D1 en recrutant CREB, p300 et TORC2 (Kim et al., 2010). Ainsi, en séquestrant BANP, Tax pourrait empêcher le recrutement de HDAC1 et favoriser celui de CREB et p300 et TORC2 sur le promoteur de la cycline D1 pour activer sa transcription. De plus, Tax interagit avec CDK4 pour favoriser la formation du complexe Cycline D/CDK4 lors de la transition G1/S (Haller et al., 2002). Ainsi, Tax pourrait favoriser la transition G1/S par deux voies différentes : en agissant directement sur CDK4, et en induisant l'expression de la cycline D1 ; toutes deux favorisant la formation d'un plus grand nombre de complexes Cycline D/CDK4 pour la transition G1/S.

Ainsi, l'identification de ces protéines non-centrosomales dans les trois expériences de BioID renforce la notion d'une dérégulation de fonctions cellulaires dans la transformation cellulaire médiée par Tax.

III. Tax interagit avec la protéine centrosomale Cep63 : Quelle signification biologique ?

1. Modalités de l'interaction physique entre Tax et Cep63 : quelle signification ?

Parmi ces protéines identifiées par la technique de BioID, nous avons identifié Cep63, dont l'interaction avec Tax a été validée et l'analyse fonctionnelle amorcée.

Les résultats obtenus sur la validation de l'interaction entre Tax et Cep63 en lignées cellulaires chroniquement infectées par HTLV-1 mettent en évidence une interaction entre les deux protéines exprimées de façon endogène dans la lignée cellulaire C8166 et non dans la lignée Hut102. Deux hypothèses peuvent être formulées : l'affinité de l'interaction entre Tax et Cep63 diffère dans les deux lignées et est plus faible dans les Hut102, ce qui ne permet pas sa détection en western-blot ; Tax interagit spécifiquement avec une isoforme de Cep63 qui est exprimée dans les C8166 et absente ou très faiblement exprimée dans les Hut102. La première hypothèse relève de la sensibilité de détection des protéines en western-blot et pourrait être évaluée par PLA (Proximity Ligation Assay) utile pour la détection d'interactions faibles, ou par microscopie super-résolutive, une colocalisation des protéines visualisée à haute résolution allant en faveur d'une interaction. La seconde hypothèse serait la plus probable compte tenu de l'aspect de Cep63 dans les inputs des western-blot effectués: les quatre isoformes sont présentes dans les cellules C8166 alors que seulement trois le sont dans les cellules Hut102. Compte tenu des poids moléculaires connus des quatre isoformes (isoforme 1 de 81 kDa, isoforme 2 de 63 kDa, isoforme 3 de 58 kDa et isoforme 4 de 56 kDa ; alignement des séquences protéiques des isoformes annexe n°4), il semblerait au regard du profil d'expression de Cep63 dans les cellules Hut102 en comparaison aux cellules C8166 que l'isoforme 3 serait absente ou très faiblement exprimée dans les cellules Hut102, ce qui pourrait être testé par RT-PCR, par exemple. L'hypothèse d'une interaction spécifique de Tax avec l'isoforme 3 de Cep63 peut être testée en éteignant de façon sélective l'expression de chacune des isoformes séparément, ou en surexprimant chaque isoforme séparément dans des cellules n'exprimant plus la forme endogène de Cep63, puis en testant le maintien ou la perte de l'interaction.

Nous nous sommes intéressés aux modalités de l'interaction entre Tax et Cep63 en utilisant des mutants de l'une ou l'autre des protéines : domaine protéique de Cep63 requis pour

l'interaction et modification post-traductionnelle de Tax nécessaire à l'interaction. L'utilisation de mutants de Cep63 a révélé la nécessité de son extrémité N-terminale dans l'interaction. De façon intéressante, Brown et al., (2013) ont montré que la partie N-terminale de Cep63 était requise pour sa localisation centrosomale et son interaction avec Cep152. La partie N-terminale de Cep63 pourrait donc ne pas être impliquée directement dans l'interaction avec Tax mais serait nécessaire pour que Cep63 soit localisée au centrosome, condition nécessaire et suffisante pour interagir avec Tax. Il serait intéressant de générer par mutagenèse dirigée différents mutants de la partie N-terminale de Cep63 qui conserveraient leur localisation au centrosome et d'analyser le maintien ou la perte de l'interaction avec Tax.

Nos travaux ont également montré que l'interaction entre Tax et Cep63 requiert l'ubiquitination de Tax. Pour rappel, le mutant M22 est dans l'incapacité d'être ubiquitiné (Chiari et al., 2004; Kfoury et al., 2008b; Nasr, 2006; Smith and Greene, 1990b). Le mutant M47 présente une localisation majoritairement nucléaire et centrosomale et est ubiquitiné comme la forme sauvage de Tax (Kfoury et al., 2008b). Ce mutant conservant les fonctions perdues par le mutant M22 a été utilisé en contrôle de ce dernier. L'utilisation des mutants dont les lysines impliquées directement dans l'ubiquitination de Tax sont mutées (K4-8R et K1-10R) permet de confirmer l'implication de l'ubiquitination dans l'interaction. L'interaction de Cep63 avec uniquement la forme sauvage ou le mutant M47 de Tax souligne la nécessité de l'ubiquitination de Tax pour son interaction avec Cep63 et par extension l'importance des modifications post-traductionnelles de Tax dans ses interactions protéiques.

De manière intéressante, les mutants de Tax déficients pour l'ubiquitination dont le M22, K4-8R et K1-10R ne sont pas localisés au niveau du centrosome (Chiari et al., 2004; Kfoury et al., 2008b; Nasr, 2006; Smith and Greene, 1990b). Ceci suggère donc que l'ubiquitination de Tax n'est pas nécessairement impliquée directement dans l'interaction avec Cep63, mais qu'elle serait nécessaire pour la localisation au centrosome de Tax, qui elle, serait nécessaire à son interaction avec Cep63. Afin de savoir si l'ubiquitination de Tax est nécessaire à son interaction avec Cep63, il serait intéressant d'utiliser un mutant de Tax déficient pour son ubiquitination et d'analyser le maintien ou la perte de l'interaction *in vitro*, la perte d'une interaction avec ce dernier allant en faveur de l'implication directe de l'ubiquitination de Tax dans l'interaction.

2. Tax induit des points surnuméraires de Cep63 : quelles sont ces structures ?

Les résultats obtenus concernant l'aspect phénotypique de Cep63 au centrosome en présence de Tax montrent un défaut dans l'organisation spatiale de Cep63 au niveau du centrosome. En effet, cela a été visualisé par de multiples points de Cep63 colocalisant systématiquement avec de multiples points de centrine1-GFP en présence de Tax. Comme nous l'avons évoqué précédemment, les multiples points de centrine1-GFP pourraient être des satellites centriolaires induits par Tax. De façon intéressante, Cep63 a été récemment identifiée au niveau des satellites centriolaires comme interagissant avec Cep152 et Cep90 (Brown et al., 2013; Firat-Karalar et al., 2014; Kodani et al., 2015; Tollenaere et al., 2015). Il se pourrait donc que Tax induise la formation de satellites centriolaires excessifs contenant Cep63, ce qui favoriserait l'amplification des centrosomes. Comme évoqué précédemment, cette hypothèse pourrait être investiguée par immunofluorescence en marquant d'autres protéines des satellites centriolaires.

3. Quelles sont les fonctions de Cep63 manipulées par Tax ?

Nous pouvons nous poser la question de la pertinence biologique de cette interaction et ce sur trois des fonctions connues et liées de Cep63 : dans l'amplification des centrosomes, dans la progression du cycle cellulaire, dans la réponse aux dommages à l'ADN.

a. Un rôle dans l'amplification des centrosomes ?

Au cours de nos expériences préliminaires concernant l'aspect fonctionnel de l'interaction entre Tax et Cep63, nous n'avons pas observé une diminution du pourcentage de cellules présentant nombre anormal de centrosomes lorsque l'expression de Cep63 était éteinte, ce qui élimine l'hypothèse d'une implication directe de Cep63 dans l'induction d'un nombre anormal de points de centrine1-GFP par Tax. En revanche, nous avons observé une faible diminution du pourcentage de cellules présentant un nombre anormal de centrosomes après inhibition de CDK1 avec de la roscovitine (données non montrées). Pour rappel, Cep63 interagit avec CDK1 pour favoriser l'entrée en mitose (Loffler et al., 2011). Ceci suggère une

possible implication indirecte de l'interaction sur CDK1 pour l'induction de centrosomes anormaux.

Il a été récemment montré que l'autophagie contrôlait le nombre de centrosome en dégradant Cep63 (Watanabe et al., 2016b). Plus précisément, Cep63 est ciblée vers la dégradation autophagique par p62, récepteur cargo de l'autophagie préalablement identifié dans l'équipe comme partenaire de Tax (cf. Chapitre 1 des Résultats pour plus de détails), ce qui aboutit à un maintien d'un nombre normal de centrosome. En bloquant l'autophagie et en utilisant des cellules déficientes pour l'autophagie, les auteurs ont montré une accumulation de Cep63 alors que la γ -tubuline conserve son aspect habituel de deux points correspondant à un centrosome normal. Or, Tax inhibe l'autophagie (Ren et al., 2015) et interagit avec p62. On peut donc se demander si l'inhibition de l'autophagie par Tax et l'interaction entre Tax et p62 ont un impact sur la dégradation autophagique de Cep63 et l'amplification des centrosomes. Tax pourrait ainsi limiter l'interaction entre Cep63 et p62, et/ou inhiber le flux autophagique en aval de l'interaction. Le maintien ou la perte de l'interaction entre Cep63 et p62 en présence de Tax peut être testé par co-immunoprécipitation. Afin de savoir si le flux autophagique est directement impliqué dans l'amplification des centrosomes induite par Tax, nous pouvons quantifier relativement le nombre de cellules présentant une amplification en absence et en présence de Tax dans des cellules déficientes pour l'activation de l'autophagie (cellules Atg5 $-/-$ ou Atg7 $-/-$, par exemple). Dans le cas où l'on observe un effet cumulatif de l'inactivation de l'autophagie et de Tax sur le nombre de cellules présentant un nombre anormal de centrosomes, cela signifierait que les mécanismes moléculaires dérégulés par Tax pour induire une amplification des centrosomes ne sont pas dépendants du processus autophagique. De plus, sachant que Cep63 est une protéine constitutive des satellites centriolaires, il se pourrait donc que l'autophagie contrôle bien les niveaux protéiques de Cep63 et par extension son stockage au niveau des satellites mais pas le nombre de centrosomes à proprement dit étant donné que la γ -tubuline conserve son aspect visualisé dans le cas d'un centrosome normal (Watanabe et al., 2016b).

Par extension, il serait intéressant d'analyser l'implication de la dégradation autophagique de protéines centrosomales ciblées par Tax dans le maintien du nombre de centrosome. Cela serait un moyen d'évaluer l'importance des interactions de Tax avec des protéines centrosomales pour la dérégulation du nombre de centrosomes.

b. Un rôle dans la progression du cycle cellulaire ?

Cep63 est connue pour interagir avec CDK1 au centrosome nécessaire à l'entrée en mitose (Loffler et al., 2011). Pour rappel, Tax induit des dommages à l'ADN via la production de ROS et atténue la réponse ATM au niveau des sites de cassure (Belgnaoui et al., 2010; Eliezer et al., 2014; Kinjo et al., 2010). De plus, (Liu et al., 2005) ont montré par cytométrie en flux sur des lignées cellulaires chroniquement infectées par HTLV-1 synchronisées que la progression du cycle cellulaire au travers des phases G2/M était retardée. Les auteurs ont montré que cela corrélait avec des niveaux moins élevés de cycline B1 avant la transition G2/M en comparaison à la condition contrôle (cellules Jurkat n'exprimant pas Tax 8h après la levée du blocage du cycle cellulaire). Les auteurs ont également observés des niveaux plus élevés de cycline B1 dans les cellules chroniquement infectées en comparaison aux cellules contrôles ayant déjà effectué leur sortie de mitose (12h après la levée du blocage du cycle cellulaire). Cette même étude a montré que Tax induisait la polyubiquitination de la cycline B1 menant à sa dégradation protéasomale. Suite à ces observations, les auteurs ont émis l'hypothèse que la déficience des régulateurs mitotiques du cycle cellulaire (cycline B, mais également cycline A) pourrait être à l'origine de l'aneuploidie émergente dans les cellules transformées par HTLV-1 en observant le karyotype de lymphocytes T transformés par HTLV-1.

Sachant que Tax agit directement sur les complexes cycline/CDK pour accélérer la progression du cycle cellulaire (par exemple, (Haller et al., 2002), il se peut que Tax, en interagissant avec Cep63, empêche le recrutement de CDK1 nécessaire à l'entrée en mitose. Ainsi, en agissant à la fois sur les niveaux protéiques de la cycline B1 et en empêchant le recrutement de CDK1 par Cep63, Tax favoriserait le délai de la phase G2/M pour la mise en place de l'aneuploidie. Pour valider ou non cette hypothèse, il serait intéressant de suivre l'interaction entre Cep63 et CDK1 en absence et en présence de Tax dans une population cellulaire synchronisée, l'observation d'une perte de l'interaction entre Cep63 et CDK1 au profit d'une interaction entre Cep63 et Tax allant en faveur de cette hypothèse.

c. Un rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN ?

Cep63 est également connue pour être une cible des protéines kinases ATM et ATR en cas de cassures double-brins de l'ADN dans des cellules somatiques de Xénope (Smith et al., 2009).

En cas de dommages à l'ADN, ATM et ATR phosphorylent Cep63, ce qui promeut sa délocalisation du centrosome. Par conséquent, cela empêche le recrutement de CDK1 par Cep63 au centrosome et l'entrée en mitose (Loffler et al., 2011). Nous pouvons donc nous demander si, en présence de Tax, Cep63 reste toujours une cible d'ATM et ATR. Pour tester cela, nous pouvons analyser la phosphorylation de Cep63 par ATM et ATR, en induisant des cassures double-brins (par irradiations, par exemple). En présence de Tax, nous pouvons vérifier la présence de la forme phosphorylée d'ATM, signe de son activation, la présence de substrats phosphorylés par ATM et l'état de phosphorylation de Cep63. Ainsi, si Cep63 n'est plus phosphorylée en présence de Tax, cela irait en faveur d'un rôle de cette interaction dans la réponse aux dommages à l'ADN en lien avec la progression du cycle cellulaire : Cep63 pourrait recruter CDK1 au niveau du centrosome et autoriser l'entrée en mitose malgré la présence de dommages à l'ADN. De cette manière, Tax pourrait ainsi promouvoir l'instabilité génétique.

IV. Validation des constructions BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 : Vers la mise en place du BioID pour l'étude des interactions centrosomales de ces protéines

Au cours de nos travaux, nous avons cherché à étendre la technologie du BioID à l'étude des protéines BNRF1 d'EBV et E7 d'HPV-16 dans l'objectif d'une meilleure compréhension globale des altérations centrosomales au cours de l'oncogenèse virale. Nous avons amorcé la validation des protéines fusion BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 en cherchant à confirmer leur localisation centrosomale par immunofluorescence et par fractionnement cellulaire, comme cela est décrit dans la littérature. BNRF1 a été initialement décrite dans les corps PML, de par son interaction avec Daxx dans des cellules Hep2 (Tsai et al., 2011). La localisation nucléaire de E7 semble la mieux décrite et est cohérente avec son interaction avec la protéine pRb dans le noyau (Barbosa et al., 1990). Une localisation diffuse d'E7 dans le cytoplasme comme celle que nous observons est régulièrement observée lorsque E7 est exprimée de façon ectopique (Gammoh et al., 2009; Nguyen et al., 2007). La localisation de BNRF1 et d'E7 au niveau du centrosome a été mise en évidence par fractionnement cellulaire (Nguyen et al., 2007; Shumilov et al., 2017).

Nous tirons deux conclusions de l'analyse de la localisation par immunofluorescence : la distribution subcellulaire de ces deux protéines fusions est diffuse à travers le noyau et le

cytoplasme, et ne correspond donc pas à ce qui est décrit dans la littérature ; il n'y a pas d'enrichissement particulier des protéines virales au niveau du centrosome.

Pour mieux contrôler nos résultats, il serait judicieux d'utiliser en complément des constructions des deux protéines virales sans fusion à BirA*, comme nous l'avons fait pour Tax, et de comparer la distribution subcellulaire des protéines virales étiquetées ou non par BirA*, dont leur localisation au niveau du centrosome

Compte tenu de la description de leur localisation centrosomale par fractionnement cellulaire dans la littérature, nous avons choisi de caractériser la localisation de BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 indirectement par fractionnement cellulaire. Nos résultats montrent une détection des deux protéines fusions dans les différents compartiments cellulaires (pour rappel, fraction cytoplasmique, fraction intermédiaire contenant l'appareil de Golgi et le centrosome et fraction nucléaire) sans qu'il n'y ait pour autant un enrichissement des protéines dans la fraction contenant l'appareil de Golgi et le centrosome par rapport aux fractions cytoplasmiques et nucléaires. Ceci est attendu au vu de la localisation diffuse au travers de la cellule visualisée en immunofluorescence. Malgré l'aspect diffus de BirA*-BNRF1 et BirA*-E7, ceci signifie donc que ces dernières ne sont pas exclues du centrosome. Ceci nous conforte dans l'idée de leur localisation centrosomales préalablement décrites dans la littérature (Nguyen et al., 2007; Shumilov et al., 2017).

La localisation partielle de BirA*-BNRF1 et BirA*-E7 au niveau du centrosome sous-entend l'identification possible de protéines centrosomales comme potentiels partenaires par BioID. Sachant que ces protéines induisent des altérations centrosomales tout comme Tax peut le faire, il est donc possible qu'on identifie des partenaires centrosomaux déjà identifiés avec Tax. Cela mettrait en évidence des stratégies communes à ces trois protéines virales pour induire des altérations centrosomales. Pour rappel, Tax, BNRF1 et E7 exercent des fonctions similaires dans la cellule par le biais de la modulation de l'expression et/ou de l'interaction directe avec différentes protéines cellulaires. Il est également possible qu'on identifie des partenaires distincts, spécifiques à BNRF1 ou à E7. Dans ce cas-là, cela soulignerait des mécanismes viro-induits spécifiques à l'une ou l'autre des protéines pour l'induction d'altérations centrosomales.

L'identification des interactants communs ou distincts entre Tax, BNRF1 et E7 constituerait ainsi une avancée majeure des connaissances sur les altérations centrosomales induites par

les virus oncogènes, et plus particulièrement sur les actions directes de protéines virales localisées au centrosome.

V. Repousser les limites du BioID ?

Malgré les avantages que présente le BioID, cette technique est associée à quelques inconvénients. Tout d'abord, le BioID nécessite la présence de résidus lysine accessibles sur les protéines pour permettre leur biotinylation par BirA*, ce qui peut mener à certains résultats faux-négatifs. Par ailleurs, comme nous l'avons mentionné dans nos travaux, la protéine BirA* a un poids moléculaire de 35 kDa, ce qui représente une taille relativement importante pouvant altérer la structure de la protéine d'intérêt ou en modifier son activité et ses interactants. De plus, le temps nécessaire à la biotinylation avec la deuxième génération de BirA que nous avons utilisée dans nos travaux (BirA*) est relativement long. Par conséquent, cela ne permet pas d'identifier des interactions à un temps précis mais fournit plutôt une liste des interactions ayant eu lieu durant la durée du traitement. De plus, de par son large spectre de biotinylation (ie. biotinylation des lysines très fréquemment présentes dans la séquence des protéines), le BioID permet la détection d'interactions stochastiques, contribuant ainsi au bruit de fond non-spécifique augmentant au cours de la longue durée de traitement.

En réponse à ces limitations, des biotine ligases de taille plus réduite et à activité enzymatique plus importante ainsi que des techniques dérivées du BioID initial ont été développées très récemment. C'est notamment le cas des techniques TurboID, miniTurbo et APEX. La technique de TurboID tire profit de mutations générées sur la séquence de BirA*, qui accélèrent la réaction et permettent de biotinyler suffisamment de matériel pour une analyse en spectrométrie de masse après seulement 10min de traitement à la biotine, ce qui permet de réduire le bruit de fond associé au temps de traitement avec le BioID (Branon et al., 2018). La méthode APEX (marquage par l'ascorbate peroxydase) repose sur le même principe que le BioID et peut être utilisée pour l'identification de complexes protéiques insolubles. Dans le cas de l'APEX, l'enzyme n'est non pas une biotine ligase mais une ascorbate peroxydase monomérique de 28 kDa capable de catalyser l'oxydation d'une biotine modifiée présentant un groupement phénol pour l'activer seulement en présence de peroxyde d'hydrogène durant un temps de traitement très court (1min). Dans le cas du miniTurbo, la taille de l'enzyme est

plus petite que BirA* (28 kDa versus 35 kDa), il y a donc moins de probabilité que la fusion de l'enzyme à la protéine d'intérêt engendre un défaut de conformation altérant les fonctions de cette dernière. Même si la génération d'une protéine plus petite à son intérêt, l'utilisation de peroxyde d'hydrogène dans le cadre de l'APEX pour activer l'enzyme induit un stress cellulaire pouvant altérer les interactions protéiques que l'on souhaite observer dans des conditions physiologiques (Béganton et al., 2019; Li et al., 2017; Trinkle-Mulcahy, 2019).

De plus, la présence de carboxylases liant naturellement la biotine peut mener à leur détection sans pour autant qu'elles interagissent avec la protéine d'intérêt (faux-positifs ; Tytgat et al., 2015). Cela nécessite l'utilisation de contrôles appropriés (ie. BirA* seul versus BirA*-protéine d'intérêt) et le filtrage des données obtenues par l'analyse en spectrométrie de masse pour pouvoir prendre en compte les interactions présentant un intérêt biologique vis-à-vis de la protéine étudiée. Une récente étude a contourné cet obstacle en établissant une nouvelle technique basée sur le BioID, le BioID à deux composants (2C-BioID) (Chojnowski et al., 2018). Dans le 2C-BioID, la protéine d'intérêt et la biotine ligase sont maintenues séparées puis associées grâce à un agent dimérisant. L'utilisation d'une biotine ligase constitutivement active en absence de l'agent dimérisant peut alors être utilisée comme un contrôle interne efficace pour identifier les interactants non-spécifiques associés au bruit de fond. Cette étude a en effet montré une réduction du nombre de faux-positifs en comparant cette technique à la technique classique de BioID sur l'identification de protéines partenaires de la Lamine A et de la Lamine C.

Une autre technique dérivée du BioID, le split-BioID, peut être utilisée pour l'étude d'interactions mises en jeu de façon spécifique par une protéine lorsqu'elle est associée à un partenaire sous forme d'homo- ou d'hétérodimère. De Munter et al., (2017) ont mis au point cette technique en fusionnant deux moitiés inactives de BirA* respectivement à la sous-unité catalytique et à la sous-unité régulatrice de la phosphatase PP1. Cette approche de complémentarité permet d'identifier les interactions mises en place spécifiquement une fois la phosphatase reconstituée. Dans le contexte de nos travaux, nous rappelons que Tax est une protéine pouvant exister sous forme dimérique. Exploiter deux constructions de Tax fusionnées à l'une ou l'autre des moitiés de BirA* pourrait permettre d'identifier des interactants de Tax seulement lorsque cette dernière est dimérisée, ce qui pourrait donc apporter plus d'informations sur certaines de ses fonctions, notamment dans sa fonction de transactivateur viral.

De par la longue durée de traitement, le BioID fournit une liste des interactions ayant eu lieu durant la durée du traitement. Si l'on applique cette notion à l'étude des interactions centrosomales, nous ne pouvons pas dans notre étude identifier des interactions ayant lieu à un évènement très précis du cycle de duplication du centrosome, par exemple, lors de la formation des procentrioles en phase S du cycle cellulaire. Pour contourner cet obstacle, cela nécessiterait la synchronisation préalable des cellules avant l'induction de la biotinylation. Utiliser en complément de la synchronisation une technique de protéomique telle que celle que nous venons d'aborder présentant un temps plus court de traitement permettra également de contourner cet obstacle et observer les interactions ayant eu lieu dans une durée très courte de traitement.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

Comme nous avons pu le voir, le centrosome est un organelle impliqué notamment dans la progression du cycle cellulaire, une perturbation de ses fonctions favorisant donc la mise en place de l'instabilité génomique. Un des objectifs de notre équipe est d'étudier les mécanismes de l'oncogenèse virale induits par l'oncoprotéine Tax du rétrovirus HTLV-1. Tax peut perturber le cycle de duplication du centrosome et ses fonctions en interagissant directement avec des protéines centrosomales. Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents, nous avons cherché à identifier les partenaires centrosomaux ciblés par Tax.

C'est dans ce contexte-là que nous avons adapté la technologie de BioID à l'étude des interactants de Tax. La mise en évidence de deux clusters d'interaction ciblant à la fois le cycle de duplication du centrosome ainsi que ses fonctions au cours de la mitose suggère l'induction de dysfonctions centrosomales médiée par Tax dans la mise en place de l'instabilité génomique. Par la suite, il serait intéressant de confirmer ce réseau d'interaction entre Tax et les partenaires centrosomaux en lymphocytes T primaires transduits avec BirA*-Tax, afin de se placer dans un contexte se rapprochant au plus de la physiologie du virus HTLV-1. Ceci permettrait d'identifier les interactants de Tax au niveau du centrosome dans les étapes en amont de la transformation médiée par HTLV-1 dans ce contexte mimant une primo-infection. Ici, nous nous sommes focalisés sur l'action directe de Tax sur l'induction des altérations centrosomales par le biais d'interaction avec des protéines centrosomales. Compte tenu du rôle de transactivateur viral de Tax, il serait judicieux d'explorer son rôle indirect dans la mise en place des altérations du centrosome, c'est-à-dire savoir si Tax altère l'expression de certaines protéines centrosomales. Cela pourrait avoir pour conséquence la perte de leurs fonctions initiales (dans le cas d'une sous-expression) ou être d'avantage recrutées au niveau du centrosome (dans le cas d'une surexpression). Ceci peut être investigué en ré-analysant les jeux de données de RNASeq obtenues dans des lignées cellulaires ATL et des lignées de cellules Jurkat inductibles pour l'expression de Tax obtenues par Naito et al. (2018), afin de savoir comment est régulée l'expression des gènes des protéines centrosomales dans ces différents contextes.

De manière intéressante, Tax possède des fonctions au niveau de l'appareil de Golgi et du centrosome. De nombreuses études se sont intéressées aux fonctions de Tax au niveau de ces deux organelles indépendamment l'un de l'autre. Compte tenu de leur proximité physique au sein de la cellule, il se pourrait que les auteurs se soient en réalité intéressés à une même

Conclusion générale

fraction de Tax, localisée au niveau de ces deux organelles, ou bien à deux fractions de Tax indépendantes l'une de l'autre, l'une précisément au centrosome, et l'autre précisément au niveau de l'appareil de Golgi. Nos travaux démontrent l'importance de l'ubiquitination de Tax à la fois pour l'activation de la voie NF- κ B au niveau de l'appareil de Golgi et pour son interaction avec Cep63 au centrosome. Compte tenu de l'importance des modifications post-traductionnelles dans la localisation subcellulaire de Tax, il serait intéressant de savoir si elles régissent sa localisation au niveau de l'un ou l'autre des organelles en analysant l'interaction de mutants de Tax défectifs pour chaque modification post-traductionnelles avec des protéines core spécifiques à chacun des deux organelles.

Nos travaux démontrent une interaction entre Tax et p62 au niveau de l'appareil de Golgi et entre Tax et Cep63 au niveau du centrosome. L'interaction décrite entre Cep63 et p62 va en faveur d'une action de Tax à l'interface de l'appareil de Golgi et du centrosome (Watanabe et al., 2016b). Ceci soulève donc l'hypothèse d'une action de Tax sur l'interrelation connue entre ces deux organelles. De récentes études ont mis en évidence un lien fonctionnel entre l'appareil de Golgi et le centrosome. La proximité physique de l'appareil de Golgi et du centrosome suggère de potentiels échanges dynamiques de protéines et un partage de fonctions (Sütterlin and Colanzi, 2010). Cette relation fonctionnelle entre les deux organelles semble être bidirectionnelle. En effet, des protéines de l'appareil de Golgi sont nécessaires au maintien de l'intégrité du centrosome et les microtubules nucléés par le centrosome sont nécessaires à la localisation péricentriolaire de l'appareil de Golgi (Cole et al., 1996; Kodani and Sütterlin, 2008; Sütterlin et al., 2005). En plus de cette action concertée de l'appareil de Golgi et du centrosome sur le maintien de l'intégrité de la structure du centrosome et de ses fonctions au cours du cycle cellulaire, les deux organelles semblent être liés par l'activation de la voie NF- κ B par Tax au niveau de l'appareil de Golgi qui a pour conséquence fonctionnelle la déstabilisation des microtubules du fuseau mitotique à l'origine d'aberrations chromosomiques (Malu et al., 2019).

De manière plus générale, la proximité physique de l'appareil de Golgi et du centrosome pourrait donc faciliter l'échange dynamique de protéines entre les deux organelles pour contrôler de façon concertée leurs fonctions respectives.

Si l'on se replace dans le contexte de nos travaux, il est possible que Tax interfère avec les fonctions de protéines situées à l'interface de leurs fonctions. Il serait donc judicieux de

Conclusion générale

s'intéresser à ces protéines-là, à savoir si elles interagissent avec Tax et si oui, quelles en sont les conséquences fonctionnelles sur les fonctions de l'appareil de Golgi et du centrosome.

En élargissant à l'oncogenèse virale de manière générale, nous souhaitons appliquer la technique de BioID aux virus oncogènes EBV et HPV-16. L'identification des interactants communs ou distincts entre Tax (HTLV-1), BNRF1 (EBV) et E7 (HPV-16) constituerait ainsi une avancée majeure des connaissances sur les altérations centrosomales induites par les virus oncogènes, et plus particulièrement sur les actions directes de protéines virales localisées au centrosome.

REFERENCES

Références

- Afonso, P.V., Ozden, S., Cumont, M.-C., Seilhean, D., Cartier, L., Rezaie, P., Mason, S., Lambert, S., Huerre, M., Gessain, A., et al. (2008). Alteration of Blood–Brain Barrier Integrity by Retroviral Infection. *PLoS Pathog* 4.
- Alais, S., Mahieux, R., and Dutartre, H. (2015). Viral Source-Independent High Susceptibility of Dendritic Cells to Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infection Compared to That of T Lymphocytes. *J Virol* 89, 10580–10590.
- Alefantis, T., Barmak, K., Harhaj, E.W., Grant, C., and Wigdahl, B. (2003). Characterization of a Nuclear Export Signal within the Human T Cell Leukemia Virus Type I Transactivator Protein Tax. *Journal of Biological Chemistry* 278, 21814–21822.
- Alves-Cruzeiro, J.M. da C., Nogales-Cadenas, R., and Pascual-Montano, A.D. (2014). CentrosomeDB: a new generation of the centrosomal proteins database for Human and *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* 42, D430–D436.
- Andersen, J.S., Wilkinson, C.J., Mayor, T., Mortensen, P., Nigg, E.A., and Mann, M. (2003). Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* 426, 570–574.
- Ando, H., Sato, T., Tomaru, U., Yoshida, M., Utsunomiya, A., Yamauchi, J., Araya, N., Yagishita, N., Coler-Reilly, A., Shimizu, Y., et al. (2013). Positive feedback loop via astrocytes causes chronic inflammation in virus-associated myelopathy. *Brain* 136, 2876–2887.
- Andresen, V., Pise-Masison, C.A., Sinha-Datta, U., Bellon, M., Valeri, V., Washington Parks, R., Cecchinato, V., Fukumoto, R., Nicot, C., and Franchini, G. (2011). Suppression of HTLV-1 replication by Tax-mediated rerouting of the p13 viral protein to nuclear speckles. *Blood* 118, 1549–1559.
- Arnulf, B. (2002). Human T-cell lymphotropic virus oncoprotein Tax represses TGF-beta 1 signaling in human T cells via c-Jun activation: a potential mechanism of HTLV-I leukemogenesis. *Blood* 100, 4129–4138.
- Arpin-André, C., Laverdure, S., Barbeau, B., Gross, A., and Mesnard, J.-M. (2014). Construction of a reporter vector for analysis of bidirectional transcriptional activity of retrovirus LTR. *Plasmid* 74, 45–51.
- Asteriti, I.A., Cesare, E.D., Mattia, F.D., Hilsenstein, V., Neumann, B., Cundari, E., Lavia, P., and Guarguaglini, G. (2014). The Aurora-A inhibitor MLN8237 affects multiple mitotic processes and induces dose-dependent mitotic abnormalities and aneuploidy. *Oncotarget* 5, 6229–6242.
- Azakami, K., Sato, T., Araya, N., Utsunomiya, A., Kubota, R., Suzuki, K., Hasegawa, D., Izumi, T., Fujita, H., Aratani, S., et al. (2009). Severe loss of invariant NKT cells exhibiting anti-HTLV-1 activity in patients with HTLV-1-associated disorders. *Blood* 114, 3208–3215.
- Banerjee, P., Crawford, L., Samuelson, E., and Feuer, G. (2010). Hematopoietic stem cells and retroviral infection. *Retrovirology* 7, 8.
- Bangham, C.R.M., Araujo, A., Yamano, Y., and Taylor, G.P. (2015). HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *Nature Reviews Disease Primers* 1.
- Barbosa, M.S., Edmonds, C., Fisher, C., Schiller, J.T., Lowy, D.R., and Vousden, K.H. (1990). The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J* 9, 153–160.
- Baydoun, H., Duc-Dodon, M., Lebrun, S., Gazzolo, L., and Bex, F. (2007). Regulation of the human T-cell leukemia virus gene expression depends on the localization of regulatory proteins Tax, Rex and p30II in specific nuclear subdomains. *Gene* 386, 191–201.
- Baydoun, H.H., Bai, X.T., Shelton, S., and Nicot, C. (2012). HTLV-I Tax Increases Genetic Instability by Inducing DNA Double Strand Breaks during DNA Replication and Switching Repair to NHEJ. *PLoS ONE* 7, e42226.

Références

- Béganton, B., Coyaud, E., Mangé, A., and Solassol, J. (2019). Approches nouvelles pour l'étude des interactions protéine-protéine. *médecine/sciences* 35, 223–231.
- Begley, U., Dyavaiah, M., Patil, A., Rooney, J.P., DiRenzo, D., Young, C.M., Conklin, D.S., Zitomer, R.S., and Begley, T.J. (2007). Trm9 Catalyzed tRNA Modifications Link Translation to the DNA Damage Response. *Mol Cell* 28, 860–870.
- Belgnaoui, S.M., Fryrear, K.A., Nyalwidhe, J.O., Guo, X., and Semmes, O.J. (2010). The Viral Oncoprotein Tax Sequesters DNA Damage Response Factors by Tethering MDC1 to Chromatin. *Journal of Biological Chemistry* 285, 32897–32905.
- Béraud, C., Sun, S.C., Ganchi, P., Ballard, D.W., and Greene, W.C. (1994). Human T-cell leukemia virus type I Tax associates with and is negatively regulated by the NF-kappa B2 p100 gene product: implications for viral latency. *Mol Cell Biol* 14, 1374–1382.
- Bex, F., McDowall, A., Burny, A., and Gaynor, R. (1997). The human T-cell leukemia virus type 1 transactivator protein Tax colocalizes in unique nuclear structures with NF-kappaB proteins. *J Virol* 71, 3484–3497.
- Bex, F., Murphy, K., Wattiez, R., Burny, A., and Gaynor, R.B. (1999). Phosphorylation of the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Transactivator Tax on Adjacent Serine Residues Is Critical for Tax Activation. *J Virol* 73, 738–745.
- Bidoia, C., Mazzorana, M., Pagano, M.A., Arrigoni, G., Meggio, F., Pinna, L.A., and Bertazzoni, U. (2010). The pleiotropic protein kinase CK2 phosphorylates HTLV-1 Tax protein in vitro, targeting its PDZ-binding motif. *Virus Genes* 41, 149–157.
- Billman, M.R., Rueda, D., and Bangham, C.R.M. (2017). Single-cell heterogeneity and cell-cycle-related viral gene bursts in the human leukaemia virus HTLV-1. *Wellcome Open Res* 2.
- Bonnet, A., Randrianarison-Huetz, V., Nzounza, P., Nedelec, M., Chazal, M., Waast, L., Pene, S., Bazarbachi, A., Mahieux, R., Bénit, L., et al. (2012). Low nuclear body formation and tax SUMOylation do not prevent NF-kappaB promoter activation. *Retrovirology* 9, 77.
- Bouvard, V., Baan, R., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B., Ghissassi, F.E., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Freeman, C., Galichet, L., et al. (2009). A review of human carcinogens—Part B: biological agents. *The Lancet Oncology* 10, 321–322.
- Boxus, M., Twizere, J.-C., Legros, S., Dewulf, J.-F., Kettmann, R., and Willems, L. (2008). The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology* 5, 76.
- Boyer, S.N., Wazer, D.E., and Band, V. (1996). E7 Protein of Human Papilloma Virus-16 Induces Degradation of Retinoblastoma. 6.
- Branon, T.C., Bosch, J.A., Sanchez, A.D., Udeshi, N.D., Svinkina, T., Carr, S.A., Feldman, J.L., Perrimon, N., and Ting, A.Y. (2018). Efficient proximity labeling in living cells and organisms with TurboID. *Nature Biotechnology* 36, 880–887.
- Brauweiler, A., Garrus, J.E., Reed, J.C., and Nyborg, J.K. (1997). Repression of Bax Gene Expression by the HTLV-I Tax Protein: Implications for Suppression of Apoptosis in Virally Infected Cells. *Virology* 231, 135–140.
- Brockman, J.A., Scherer, D.C., McKinsey, T.A., Hall, S.M., Qi, X., Lee, W.Y., and Ballard, D.W. (1995). Coupling of a signal response domain in I kappa B alpha to multiple pathways for NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol* 15, 2809–2818.
- Brown, N.J., Marjanović, M., Lüders, J., Stracker, T.H., and Costanzo, V. (2013). Cep63 and Cep152 Cooperate to Ensure Centriole Duplication. *PLoS ONE* 8, e69986.

Références

- Burkitt, D. (1958). A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg* *46*, 218–223.
- Burkitt, D. (1962). A Tumour Syndrome Affecting Children in Tropical Africa. *Postgrad Med J* *38*, 71–79.
- Carvalho, S., Ribeiro, S.A., Arocena, M., Kasciukovic, T., Temme, A., Koehler, K., Huebner, A., and Griffis, E.R. (2015). The nucleoporin ALADIN regulates Aurora A localization to ensure robust mitotic spindle formation. *Mol. Biol. Cell* *26*, 3424–3438.
- Carvalho Barros, L.R., Linhares-Lacerda, L., Moreira-Ramos, K., Ribeiro-Alves, M., Machado Motta, M.C., Bou-Habib, D.C., and Savino, W. (2017). HTLV-1-infected thymic epithelial cells convey the virus to CD4 + T lymphocytes. *Immunobiology* *222*, 1053–1063.
- Castanier, C., and Arnoult, D. (2010). La dynamique mitochondriale au cours de l'apoptose. *médecine/sciences* *26*, 830–835.
- de Castro-Amarante, M.F., Pise-Masison, C.A., McKinnon, K., Washington Parks, R., Galli, V., Omsland, M., Andresen, V., Massoud, R., Brunetto, G., Caruso, B., et al. (2016). Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Infection of the Three Monocyte Subsets Contributes to Viral Burden in Humans. *J Virol* *90*, 2195–2207.
- Cheaib, B., Auguste, A., and Leary, A. (2015). The PI3K/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer: therapeutic opportunities and challenges. *Chin J Cancer* *34*, 4–16.
- Chen, X., Zaro, J., and Shen, W.-C. (2013). Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality. *Adv Drug Deliv Rev* *65*, 1357–1369.
- Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V.J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D., and Maniatis, T. (1995). Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* *9*, 1586–1597.
- Chêne, A., Donati, D., Guerreiro-Cacais, A.O., Levitsky, V., Chen, Q., Falk, K.I., Orem, J., Kironde, F., Wahlgren, M., and Bejarano, M.T. (2007). A Molecular Link between Malaria and Epstein–Barr Virus Reactivation. *PLoS Pathog* *3*.
- Chiari, E., Lamsoul, I., Lodewick, J., Chopin, C., Bex, F., and Pique, C. (2004). Stable Ubiquitination of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Is Required for Proteasome Binding. *J Virol* *78*, 11823–11832.
- Ching, Y.-P., Chun, A.C., Chin, K.-T., Zhang, Z.-Q., Jeang, K.-T., and Jin, D.-Y. (2004). Specific TATAA and bZIP requirements suggest that HTLV-I Tax has transcriptional activity subsequent to the assembly of an initiation complex. *Retrovirology* *1*, 18.
- Ching, Y.-P., Chan, S.-F., Jeang, K.-T., and Jin, D.-Y. (2006). The retroviral oncoprotein Tax targets the coiled-coil centrosomal protein TAX1BP2 to induce centrosome overduplication. *Nature Cell Biology* *8*, 717–724.
- Choi, Y.B., and Harhaj, E.W. (2014). HTLV-1 Tax Stabilizes MCL-1 via TRAF6-Dependent K63-Linked Polyubiquitination to Promote Cell Survival and Transformation. *PLoS Pathog* *10*.
- Chojnowski, A., Sobota, R.M., Ong, P.F., Xie, W., Wong, X., Dreesen, O., Burke, B., and Stewart, C.L. (2018). 2C-BioID: An Advanced Two Component BioID System for Precision Mapping of Protein Interactomes. *IScience* *10*, 40–52.
- Choo, Q.-L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., Houghton, M., and others (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* *244*, 359–362.
- Cizmecioglu, O., Arnold, M., Bahtz, R., Settele, F., Ehret, L., Haselmann-Weiß, U., Antony, C., and Hoffmann, I. (2010). Cep152 acts as a scaffold for recruitment of Plk4 and CPAP to the centrosome. *The Journal of Cell Biology* *191*, 731–739.

Références

- Clerc, I., Polakowski, N., André-Arpin, C., Cook, P., Barbeau, B., Mesnard, J.-M., and Lemasson, I. (2008). An Interaction between the Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Basic Leucine Zipper Factor (HBZ) and the KIX Domain of p300/CBP Contributes to the Down-regulation of Tax-dependent Viral Transcription by HBZ. *J Biol Chem* *283*, 23903–23913.
- Cole, N.B., Sciaky, N., Marotta, A., Song, J., and Lippincott-Schwartz, J. (1996). Golgi dispersal during microtubule disruption: regeneration of Golgi stacks at peripheral endoplasmic reticulum exit sites. *Mol Biol Cell* *7*, 631–650.
- Croda, M.G., de Oliveira, A.C.P., Vergara, M.P.P., Bonasser, F., Smid, J., Duarte, A.J. da S., and Casseb, J. (2008). Corticosteroid therapy in TSP/HAM patients: The results from a 10 years open cohort. *Journal of the Neurological Sciences* *269*, 133–137.
- Cronan, J.E. (2005). Targeted and proximity-dependent promiscuous protein biotinylation by a mutant *Escherichia coli* biotin protein ligase. *The Journal of Nutritional Biochemistry* *16*, 416–418.
- De Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D., and Plummer, M. (2012). Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *The Lancet Oncology* *13*, 607–615.
- De Munter, S., Görnemann, J., Derua, R., Lesage, B., Qian, J., Heroes, E., Waelkens, E., Van Eynde, A., Beullens, M., and Bollen, M. (2017). Split-BioID: a proximity biotinylation assay for dimerization-dependent protein interactions. *FEBS Letters* *591*, 415–424.
- Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., and Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* *26*, 3279–3290.
- Di Fiore, B. (2003). Mammalian RanBP1 regulates centrosome cohesion during mitosis. *Journal of Cell Science* *116*, 3399–3411.
- Dowd, J.B., Palermo, T., Brite, J., McDade, T.W., and Aiello, A. (2013). Seroprevalence of Epstein-Barr Virus Infection in U.S. Children Ages 6-19, 2003-2010. *PLoS One* *8*.
- Draviam, V.M., Orrechia, S., Lowe, M., Pardi, R., and Pines, J. (2001). The Localization of Human Cyclins B1 and B2 Determines Cdk1 Substrate Specificity and Neither Enzyme Requires Mek to Disassemble the Golgi Apparatus. *J Cell Biol* *152*, 945–958.
- Drosopoulos, K., Tang, C., Chao, W.C.H., and Linardopoulos, S. (2014). APC/C is an essential regulator of centrosome clustering. *Nature Communications* *5*, 3686.
- Ducu, R.I., Dayaram, T., and Marriott, S.J. (2011). The HTLV-1 Tax oncoprotein represses Ku80 gene expression. *Virology* *416*, 1–8.
- Durkin, S.S., Ward, M.D., Fryrear, K.A., and Semmes, O.J. (2006). Site-specific Phosphorylation Differentiates Active from Inactive Forms of the Human T-cell Leukemia Virus Type 1 Tax Oncoprotein. *Journal of Biological Chemistry* *281*, 31705–31712.
- Edwards, D., Fenizia, C., Gold, H., de Castro-Amarante, M.F., Buchmann, C., Pise-Masison, C.A., and Franchini, G. (2011). Orf-I and Orf-II-Encoded Proteins in HTLV-1 Infection and Persistence. *Viruses* *3*, 861–885.
- Ego, T., Ariumi, Y., and Shimotohno, K. (2002). The interaction of HTLV-1 Tax with HDAC1 negatively regulates the viral gene expression. *Oncogene* *21*, 7241–7246.
- Eliezer, Y., Argaman, L., Kornowski, M., Roniger, M., and Goldberg, M. (2014). Interplay between the DNA Damage Proteins MDC1 and ATM in the Regulation of the Spindle Assembly Checkpoint. *Journal of Biological Chemistry* *289*, 8182–8193.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* *35*, 495–516.

Références

- Epstein, M.A., Achong, B.G., and Barr, Y.M. (1964). VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *Lancet* *1*, 702–703.
- Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Viteri, G., Forner, O., Marin-Garcia, P., Arnau, V., D'Eustachio, P., Stein, L., and Hermjakob, H. (2017). Reactome pathway analysis: a high-performance in-memory approach. *BMC Bioinformatics* *18*.
- Fabregat, A., Jupe, S., Matthews, L., Sidiropoulos, K., Gillespie, M., Garapati, P., Haw, R., Jassal, B., Korninger, F., May, B., et al. (2018). The Reactome Pathway Knowledgebase. *Nucleic Acids Res* *46*, D649–D655.
- Feng, H., Shuda, M., Chang, Y., and Moore, P.S. (2008). Clonal Integration of a Polyomavirus in Human Merkel Cell Carcinoma. *Science* *319*, 1096–1100.
- Firat-Karalar, E.N., and Stearns, T. (2015). Probing mammalian centrosome structure using BioID proximity-dependent biotinylation. In *Methods in Cell Biology*, (Elsevier), pp. 153–170.
- Firat-Karalar, E.N., Rauniyar, N., Yates, J.R., and Stearns, T. (2014). Proximity Interactions among Centrosome Components Identify Regulators of Centriole Duplication. *Current Biology* *24*, 664–670.
- Formigli, L., Papucci, L., Tani, A., Schiavone, N., Tempestini, A., Orlandini, G.E., Capaccioli, S., and Orlandini, S.Z. (2000). Aponecrosis: Morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *Journal of Cellular Physiology* *182*, 41–49.
- Fryrear, K.A., Guo, X., Kerscher, O., and Semmes, O.J. (2012). The Sumo-targeted ubiquitin ligase RNF4 regulates the localization and function of the HTLV-1 oncoprotein Tax. *Blood* *119*, 1173–1181.
- Fu, J., and Glover, D.M. (2012). Structured illumination of the interface between centriole and peri-centriolar material. *Open Biology* *2*, 120104–120104.
- Fu, D., Brophy, J.A.N., Chan, C.T.Y., Atmore, K.A., Begley, U., Paules, R.S., Dedon, P.C., Begley, T.J., and Samson, L.D. (2010). Human AlkB Homolog ABH8 Is a tRNA Methyltransferase Required for Wobble Uridine Modification and DNA Damage Survival. *Mol Cell Biol* *30*, 2449–2459.
- Fujino, T., and Nagata, Y. (2000). HTLV-I transmission from mother to child. *Journal of Reproductive Immunology* *47*, 197–206.
- Furuta, R., Yasunaga, J., Miura, M., Sugata, K., Saito, A., Akari, H., Ueno, T., Takenouchi, N., Fujisawa, J., Koh, K.-R., et al. (2017). Human T-cell leukemia virus type 1 infects multiple lineage hematopoietic cells in vivo. *PLoS Pathog* *13*.
- Gammoh, N., Isaacson, E., Tomaić, V., Jackson, D.J., Doorbar, J., and Banks, L. (2009). Inhibition of HPV-16 E7 oncogenic activity by HPV-16 E2. *Oncogene* *28*, 2299–2304.
- Garnett, M.J., Mansfeld, J., Godwin, C., Matsusaka, T., Wu, J., Russell, P., Pines, J., and Venkitaraman, A.R. (2009). UBE2S elongates ubiquitin chains on APC/C substrates to promote mitotic exit. *Nat Cell Biol* *11*, 1363–1369.
- Gessain, A., and Cassar, O. (2012). Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Frontiers in Microbiology* *3*.
- Ghez, D., Lepelletier, Y., Lambert, S., Fourneau, J.-M., Blot, V., Janvier, S., Arnulf, B., van Endert, P.M., Heveker, N., Pique, C., et al. (2006). Neuropilin-1 Is Involved in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Entry. *J Virol* *80*, 6844–6854.
- Goncalves, D.U., Proietti, F.A., Ribas, J.G.R., Araujo, M.G., Pinheiro, S.R., Guedes, A.C., and Carneiro-Proietti, A.B.F. (2010). Epidemiology, Treatment, and Prevention of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Associated Diseases. *Clinical Microbiology Reviews* *23*, 577–589.

Références

- Goshima, G., Mayer, M., Zhang, N., Stuurman, N., and Vale, R.D. (2008). Augmin: a protein complex required for centrosome-independent microtubule generation within the spindle. *J Cell Biol* *181*, 421–429.
- Gotoh, T., Terada, K., Oyadomari, S., and Mori, M. (2004). hsp70-DnaJ chaperone pair prevents nitric oxide- and CHOP-induced apoptosis by inhibiting translocation of Bax to mitochondria. *Cell Death & Differentiation* *11*, 390–402.
- Grant, C., Barmak, K., Alefantis, T., Yao, J., Jacobson, S., and Wigdahl, B. (2002). Human T cell leukemia virus type I and neurologic disease: Events in bone marrow, peripheral blood, and central nervous system during normal immune surveillance and neuroinflammation. *Journal of Cellular Physiology* *190*, 133–159.
- Green, P.L., and Chen, I.S. (1990). Regulation of human T cell leukemia virus expression. *The FASEB Journal* *4*, 169–175.
- Gross, C., and Thoma-Kress, A. (2016). Molecular Mechanisms of HTLV-1 Cell-to-Cell Transmission. *Viruses* *8*, 74.
- Gross, C., Wiesmann, V., Millen, S., Kalmer, M., Wittenberg, T., Gettemans, J., and Thoma-Kress, A.K. (2016). The Tax-Inducible Actin-Bundling Protein Fascin Is Crucial for Release and Cell-to-Cell Transmission of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1). *PLOS Pathogens* *12*, e1005916.
- Habermann, K., and Lange, B.M. (2012). New insights into subcomplex assembly and modifications of centrosomal proteins. *Cell Div* *7*, 17.
- Hagemann, N., Ackermann, N., Christmann, J., Brier, S., Yu, F., and Erdmann, K.S. (2013). The serologically defined colon cancer antigen-3 interacts with the protein tyrosine phosphatase PTPN13 and is involved in the regulation of cytokinesis. *Oncogene* *32*, 4602–4613.
- Haller, K., Wu, Y., Derow, E., Schmitt, I., Jeang, K.-T., and Grassmann, R. (2002). Physical Interaction of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax with Cyclin-Dependent Kinase 4 Stimulates the Phosphorylation of Retinoblastoma Protein. *Mol Cell Biol* *22*, 3327–3338.
- Hanon, E., Stinchcombe, J.C., Saito, M., Asquith, B.E., Taylor, G.P., Tanaka, Y., Weber, J.N., Griffiths, G.M., and Bangham, C.R.M. (2000). Fratricide among CD8+ T Lymphocytes Naturally Infected with Human T Cell Lymphotropic Virus Type I. *Immunity* *13*, 657–664.
- Harhaj, E.W., and Sun, S.-C. (1999). IKK γ Serves as a Docking Subunit of the I κ B Kinase (IKK) and Mediates Interaction of IKK with the Human T-cell Leukemia Virus Tax Protein. *J Biol Chem* *274*, 11111–11115.
- Harhaj, N.S., Sun, S.-C., and Harhaj, E.W. (2006). Activation of NF- κ B by the Human T Cell Leukemia Virus Type I Tax Oncoprotein Is Associated with Ubiquitin-dependent Relocalization of I κ B Kinase. *Journal of Biological Chemistry* *282*, 4185–4192.
- Harhaj, N.S., Sun, S.-C., and Harhaj, E.W. (2007). Activation of NF- κ B by the Human T Cell Leukemia Virus Type I Tax Oncoprotein Is Associated with Ubiquitin-dependent Relocalization of I κ B Kinase. *J. Biol. Chem.* *282*, 4185–4192.
- Henderson, S., Rowe, M., Gregory, C., Croom-Carter, D., Wang, F., Longnecker, R., Kieff, E., and Rickinson, A. (1991). Induction of bcl-2 expression by epstein-barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* *65*, 1107–1115.
- Hermine, O., Ramos, J.C., and Tobinai, K. (2018). A Review of New Findings in Adult T-cell Leukemia–Lymphoma: A Focus on Current and Emerging Treatment Strategies. *Adv Ther* *35*, 135–152.
- Herrero, J.A., Mathew, P., and Paya, C.V. (1995). LMP-1 activates NF-kappa B by targeting the inhibitory molecule I kappa B alpha. *J Virol* *69*, 2168–2174.

Références

- Higuchi, M., Tsubata, C., Kondo, R., Yoshida, S., Takahashi, M., Oie, M., Tanaka, Y., Mahieux, R., Matsuoka, M., and Fujii, M. (2007). Cooperation of NF- κ B2/p100 Activation and the PDZ Domain Binding Motif Signal in Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) Tax1 but Not HTLV-2 Tax2 Is Crucial for Interleukin-2-Independent Growth Transformation of a T-Cell Line. *J Virol* *81*, 11900–11907.
- Hino, S. (2011). Establishment of the milk-borne transmission as a key factor for the peculiar endemicity of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1): the ATL Prevention Program Nagasaki. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci.* *87*, 152–166.
- Hishizawa, M., Imada, K., Kitawaki, T., Ueda, M., Kadowaki, N., and Uchiyama, T. (2004). Depletion and impaired interferon- α -producing capacity of blood plasmacytoid dendritic cells in human T-cell leukaemia virus type I-infected individuals. *British Journal of Haematology* *125*, 568–575.
- Ho, Y.-K., Zhi, H., Bowlin, T., Dorjbal, B., Philip, S., Zahoor, M.A., Shih, H.-M., Semmes, O.J., Schaefer, B., Glover, J.N.M., et al. (2015). HTLV-1 Tax Stimulates Ubiquitin E3 Ligase, Ring Finger Protein 8, to Assemble Lysine 63-Linked Polyubiquitin Chains for TAK1 and IKK Activation. *PLOS Pathogens* *11*, e1005102.
- Huang, J., Ren, T., Guan, H., Jiang, Y., and Cheng, H. (2009). HTLV-1 Tax Is a Critical Lipid Raft Modulator That Hijacks I κ B Kinases to the Microdomains for Persistent Activation of NF- κ B. *J. Biol. Chem.* *284*, 6208–6217.
- Huang, Y., Ohtani, K., Iwanaga, R., Matsumura, Y., and Nakamura, M. (2001). Direct trans-activation of the human cyclin D2 gene by the oncogene product Tax of human T-cell leukemia virus type I. *Oncogene* *20*, 1094–1102.
- Ikezoe, T., Nishioka, C., Bandobashi, K., Yang, Y., Kuwayama, Y., Adachi, Y., Takeuchi, T., Koeffler, H.P., and Taguchi, H. (2007). Longitudinal inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling by LY294002 and rapamycin induces growth arrest of adult T-cell leukemia cells. *Leukemia Research* *31*, 673–682.
- Inaba, S., Okochi, K., Sato, H., Fukada, K., Kinukawa, N., Nakata, H., Kinjyo, K., Fujii, F., and Maeda, Y. (1999). Efficacy of donor screening for HTLV-I and the natural history of transfusion-transmitted infection. *Transfusion* *39*, 1104–1110.
- Israël, A. (2010). The IKK Complex, a Central Regulator of NF- κ B Activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*.
- Iwanaga, R., Ohtani, K., Hayashi, T., and Nakamura, M. (2001). Molecular mechanism of cell cycle progression induced by the oncogene product Tax of human T-cell leukemia virus type I. *Oncogene* *20*, 2055–2067.
- Jackman, M., Firth, M., and Pines, J. (1995). Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus. *EMBO J* *14*, 1646–1654.
- Jaworski, E., Narayanan, A., Van Duyne, R., Shabbeer-Meyering, S., Iordanskiy, S., Saifuddin, M., Das, R., Afonso, P.V., Sampey, G.C., Chung, M., et al. (2014). Human T-lymphotropic Virus Type 1-infected Cells Secrete Exosomes That Contain Tax Protein. *J Biol Chem* *289*, 22284–22305.
- Jeang, K.-T., Widen, S.G., Iv, O.J.S., and Wilson, S.H. (1990). HTLV-I Trans-Activator Protein, Tax, Is a Trans-Repressor of the Human I8-Polymerase Gene. *247*, 4.
- Jin, D. (1997). HTLV-I Tax self-association in optimal trans-activation function. *Nucleic Acids Research* *25*, 379–387.
- Jin, D.-Y., Teramoto, H., Giam, C.-Z., Chun, R.F., Gutkind, J.S., and Jeang, K.-T. (1997). A Human Suppressor of c-Jun N-terminal Kinase 1 Activation by Tumor Necrosis Factor α . *9*.
- Jögeda, E.-L., Avi, R., Pauskar, M., Kallas, E., Karki, T., Des Jarlais, D., Uusküla, A., Lutsar, I., and Huik, K. (2016). Human T-lymphotropic virus types 1 and 2 are rare among intravenous drug users in Eastern Europe. *Infection, Genetics and Evolution* *43*, 83–85.

Références

- Jones, K.S., Petrow-Sadowski, C., Bertolette, D.C., Huang, Y., and Ruscetti, F.W. (2005). Heparan Sulfate Proteoglycans Mediate Attachment and Entry of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Virions into CD4+ T Cells. *J Virol* 79, 12692–12702.
- Jones, K.S., Petrow-Sadowski, C., Huang, Y.K., Bertolette, D.C., and Ruscetti, F.W. (2008). Cell-free HTLV-1 infects dendritic cells leading to transmission and transformation of CD4+ T cells. *Nature Medicine* 14, 429–436.
- Journo, C., Filipe, J., About, F., Chevalier, S.A., Afonso, P.V., Brady, J.N., Flynn, D., Tangy, F., Israël, A., Vidalain, P.-O., et al. (2009). NRP/Optineurin Cooperates with TAX1BP1 to Potentiate the Activation of NF- κ B by Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Tax Protein. *PLoS Pathog* 5.
- Kafuko, G.W., and Burkitt, D.P. (1970). Burkitt's lymphoma and malaria. *International Journal of Cancer* 6, 1–9.
- Kamoi, K., Yamamoto, K., Misawa, A., Miyake, A., Ishida, T., Tanaka, Y., Mochizuki, M., and Watanabe, T. (2006). SUV39H1 interacts with HTLV-1 Tax and abrogates Tax transactivation of HTLV-1 LTR. *Retrovirology* 3, 5.
- Kao, S.-Y., and Marriotti, S.J. (1999). Disruption of Nucleotide Excision Repair by the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Protein. *J Virol* 73, 4299–4304.
- Kataoka, K., Nagata, Y., Kitanaka, A., Shiraishi, Y., Shimamura, T., Yasunaga, J., Totoki, Y., Chiba, K., Sato-Otsubo, A., Nagae, G., et al. (2015). Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nature Genetics* 47, 1304–1315.
- Kehn, K., Fuente, C. de la, Strouss, K., Berro, R., Jiang, H., Brady, J., Mahieux, R., Pumfery, A., Bottazzi, M.E., and Kashanchi, F. (2005). The HTLV-I Tax oncoprotein targets the retinoblastoma protein for proteasomal degradation. *Oncogene* 24, 525–540.
- Keshet, Y., and Seger, R. (2010). The MAP Kinase Signaling Cascades: A System of Hundreds of Components Regulates a Diverse Array of Physiological Functions. In *MAP Kinase Signaling Protocols*, R. Seger, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 3–38.
- Kfoury, Y., Nasr, R., Favre-Bonvin, A., El-Sabban, M., Renault, N., Giron, M.L., Setterblad, N., El Hajj, H., Chiari, E., and Mikati, A.G. (2008a). Ubiquitylated Tax targets and binds the IKK signalosome at the centrosome. *Oncogene* 27, 1665.
- Kfoury, Y., Nasr, R., Favre-Bonvin, A., El-Sabban, M., Renault, N., Giron, M.L., Setterblad, N., El Hajj, H., Chiari, E., and Mikati, A.G. (2008b). Ubiquitylated Tax targets and binds the IKK signalosome at the centrosome. *Oncogene* 27, 1665.
- Kfoury, Y., Setterblad, N., El-Sabban, M., Zamborlini, A., Dassouki, Z., El Hajj, H., Hermine, O., Pique, C., Saïb, A., Bazarbachi, A., et al. (2011). Tax ubiquitylation and SUMOylation control the dynamic shuttling of Tax and NEMO between Ubc9 nuclear bodies and the centrosome. *Blood* 117, 190–199.
- Kim, Y.-M., Geiger, T.R., Egan, D., Sharma, N., and Nyborg, J.K. (2010). The HTLV-1 Tax Protein Cooperates with Phosphorylated CREB, TORC2, and p300 to Activate CRE-Dependent Cyclin D1 Transcription. *Oncogene* 29, 2142–2152.
- Kinjo, T., Ham-Terhune, J., Peloponese, J.M., and Jeang, K.T. (2010). Induction of Reactive Oxygen Species by Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Correlates with DNA Damage and Expression of Cellular Senescence Marker. *Journal of Virology* 84, 5431–5437.
- Kodani, A., and Sütterlin, C. (2008). The Golgi Protein GM130 Regulates Centrosome Morphology and Function. *Mol Biol Cell* 19, 745–753.
- Kodani, A., Yu, T.W., Johnson, J.R., Jayaraman, D., Johnson, T.L., Al-Gazali, L., Sztriha, L., Partlow, J.N., Kim, H., Krup, A.L., et al. (2015). Centriolar satellites assemble centrosomal microcephaly proteins to recruit CDK2 and promote centriole duplication. *ELife* 4.

Références

- Kohlmaier, G., Lončarek, J., Meng, X., McEwen, B.F., Mogensen, M., Spektor, A., Dynlacht, B.D., Khodjakov, A., and Gönczy, P. (2009). Overly long centrioles and defective cell division upon excess of the SAS-4-related protein CPAP. *Curr Biol* 19, 1012–1018.
- Komander, D., and Rape, M. (2012). The Ubiquitin Code. *Annual Review of Biochemistry* 81, 203–229.
- Korzeniewski, N., Treat, B., and Duensing, S. (2011). The HPV-16 E7 oncoprotein induces centriole multiplication through deregulation of Polo-like kinase 4 expression. *Molecular Cancer* 10, 61.
- Koyanagi, Y., Itoyama, Y., Nakamura, N., Takamatsu, K., Kira, J.-I., Iwamasa, T., Goto, I., and Yamamoto, N. (1993). In Vivo Infection of Human T-Cell Leukemia Virus Type I in Non-T Cells. *Virology* 196, 25–33.
- Ku, S.C.Y., Lee, J., Lau, J., Gurumurthy, M., Ng, R., Lwa, S.H., Lee, J., Klase, Z., Kashanchi, F., and Chao, S.-H. (2008). XBP-1, a Novel Human T-Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) Tax Binding Protein, Activates HTLV-1 Basal and Tax-Activated Transcription. *J Virol* 82, 4343–4353.
- Kulasingam, S.L., Hughes, J.P., Kiviat, N.B., Mao, C., Weiss, N.S., Kuypers, J.M., and Koutsky, L.A. (2002). Evaluation of Human Papillomavirus Testing in Primary Screening for Cervical Abnormalities. 9.
- Kuroda, Y., and Matsui, M. (1993). Cerebrospinal fluid interferon-gamma is increased in HTLV-I-associated myelopathy. *Journal of Neuroimmunology* 42, 223–226.
- Kwon, K., and Beckett, D. (2000). Function of a conserved sequence motif in biotin holoenzyme synthetases. *Protein Sci* 9, 1530–1539.
- Lamsoul, I., Lodewick, J., Lebrun, S., Brasseur, R., Burny, A., Gaynor, R.B., and Bex, F. (2005). Exclusive Ubiquitination and Sumoylation on Overlapping Lysine Residues Mediate NF- κ B Activation by the Human T-Cell Leukemia Virus Tax Oncoprotein. *Mol Cell Biol* 25, 10391–10406.
- Lando, Z., Sarin, P., Megson, M., Greene, W.C., Waldman, T.A., Gallo, R.C., and Broder, S. (1983). Association of human T-cell leukaemia/lymphoma virus with the Tac antigen marker for the human T-cell growth factor receptor. *Nature* 305, 733–736.
- Lawo, S., Bashkurov, M., Mullin, M., Ferreria, M.G., Kittler, R., Habermann, B., Tagliaferro, A., Poser, I., Hutchins, J.R.A., Hegemann, B., et al. (2009). HAUS, the 8-Subunit Human Augmin Complex, Regulates Centrosome and Spindle Integrity. *Current Biology* 19, 816–826.
- Lawo, S., Hasegan, M., Gupta, G.D., and Pelletier, L. (2012). Subdiffraction imaging of centrosomes reveals higher-order organizational features of pericentriolar material. *Nature Cell Biology* 14, 1148–1158.
- Leber, B., Maier, B., Fuchs, F., Chi, J., Riffel, P., Anderhub, S., Wagner, L., Ho, A.D., Salisbury, J.L., Boutros, M., et al. (2010). Proteins Required for Centrosome Clustering in Cancer Cells. *Science Translational Medicine* 2, 33ra38–33ra38.
- Lehky, T.J., Levin, M.C., Flerlage, N., Jacobson, S., Fox, C.H., Koenig, S., Izumo, S., Sato, E., Osame, M., and Raine, C.S. (1995). Detection of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax RNA in the central nervous system of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by in situ hybridization. *Annals of Neurology* 37, 167–175.
- Lemasson, I., Thébault, S., Sardet, C., Devaux, C., and Mesnard, J.-M. (1998). Activation of E2F-mediated Transcription by Human T-cell Leukemia Virus Type I Tax Protein in a p16^{INK4A}-negative T-cell Line. *Journal of Biological Chemistry* 273, 23598–23604.
- Levin, M.C., Lee, S.M., Morcos, Y., Brady, J., and Stuart, J. (2002). Cross-Reactivity between Immunodominant Human T Lymphotropic Virus Type I tax and Neurons: Implications for Molecular Mimicry. *J Infect Dis* 186, 1514–1517.

Références

- Li, P., Li, J., Wang, L., and Di, L.-J. (2017). Proximity Labeling of Interacting Proteins: Application of BioID as a Discovery Tool.
- Liu, B., Hong, S., Tang, Z., Yu, H., and Giam, C.-Z. (2005). HTLV-I Tax directly binds the Cdc20-associated anaphase-promoting complex and activates it ahead of schedule. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *102*, 63–68.
- Livengood, J.A., and Nyborg, J.K. (2004). The high-affinity Sp1 binding site in the HTLV-1 promoter contributes to Tax-independent basal expression. *Nucleic Acids Res* *32*, 2829–2837.
- Lodewick, J., Lamsoul, I., Polania, A., Lebrun, S., Burny, A., Ratner, L., and Bex, F. (2009). Acetylation of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein by p300 promotes activation of the NF- κ B pathway. *Virology* *386*, 68–78.
- Löffler, H., Fechter, A., Matuszewska, M., Saffrich, R., Mistrik, M., Marhold, J., Hornung, C., Westermann, F., Bartek, J., and Kramer, A. (2011). Cep63 Recruits Cdk1 to the Centrosome: Implications for Regulation of Mitotic Entry, Centrosome Amplification, and Genome Maintenance. *Cancer Research* *71*, 2129–2139.
- Löffler, H., Fechter, A., Liu, F.Y., Poppelreuther, S., and Krämer, A. (2013). DNA damage-induced centrosome amplification occurs via excessive formation of centriolar satellites. *Oncogene* *32*, 2963–2972.
- Longo, D.L., Gelmann, E.P., Cossman, J., Young, R.A., Gallo, R.C., O'Brien, S.J., and Matis, L.A. (1984). Isolation of HTLV-transformed B-lymphocyte clone from a patient with HTLV-associated adult T-cell leukaemia. *Nature* *310*, 505–506.
- Lu, H., Pise-Masison, C.A., Linton, R., Park, H.U., Schiltz, R.L., Sartorelli, V., and Brady, J.N. (2004). Tax Relieves Transcriptional Repression by Promoting Histone Deacetylase 1 Release from the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Long Terminal Repeat. *J Virol* *78*, 6735–6743.
- Ma, G., Yasunaga, J., Akari, H., and Matsuoka, M. (2015). TCF1 and LEF1 act as T-cell intrinsic HTLV-1 antagonists by targeting Tax. *Proc Natl Acad Sci U S A* *112*, 2216–2221.
- Macatonia, S.E., Cruickshank, J. k., Rudge, P., and Knight, S.C. (1992). Dendritic Cells from Patients with Tropical Spastic Paraparesis Are Infected with HTLV-1 and Stimulate Autologous Lymphocyte Proliferation. *AIDS Research and Human Retroviruses* *8*, 1699–1706.
- Mahieux, R., Pise-Masison, C.A., Lambert, P.F., Nicot, C., De Marchis, L., Gessain, A., Green, P., Hall, W., and Brady, J.N. (2000). Differences in the Ability of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 Tax To Inhibit p53 Function. *J Virol* *74*, 6866–6874.
- Majone, F., and Jeang, K.-T. (2012). Unstabilized DNA breaks in HTLV-1 Tax expressing cells correlate with functional targeting of Ku80, not PKcs, XRCC4, or H2AX. *Cell & Bioscience* *2*, 15.
- Majone, F., Luisetto, R., Zamboni, D., Iwanaga, Y., and Jeang, K.-T. (2005). Ku protein as a potential human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax target in clastogenic chromosomal instability of mammalian cells. *Retrovirology* *2*, 45.
- Malu, A., Hutchison, T., Yapindi, L., Smith, K., Nelson, K., Bergeson, R., Pope, J., Romeo, M., Harrod, C., Ratner, L., et al. (2019). The human T-cell leukemia virus type-1 tax oncoprotein dissociates NF- κ B p65RelA-Stathmin complexes and causes catastrophic mitotic spindle damage and genomic instability. *Virology* *535*, 83–101.
- Manel, N., Kim, F.J., Kinet, S., Taylor, N., Sitbon, M., and Battini, J.-L. (2003). The Ubiquitous Glucose Transporter GLUT-1 Is a Receptor for HTLV. *Cell* *115*, 449–459.
- Marjanović, M., Sánchez-Huertas, C., Terré, B., Gómez, R., Scheel, J.F., Pacheco, S., Knobel, P.A., Martínez-Marchal, A., Aivio, S., Palenzuela, L., et al. (2015). CEP63 deficiency promotes p53-dependent microcephaly and reveals a role for the centrosome in meiotic recombination. *Nature Communications* *6*, 7676.

Références

- Martin, J., Maldonado, J., Mueller, J., Zhang, W., and Mansky, L. (2016). Molecular Studies of HTLV-1 Replication: An Update. *Viruses* 8, 31.
- Matsuoka, M. (2005). Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-I) infection and the onset of adult T-cell leukemia (ATL). *Retrovirology* 2, 27.
- Matsuoka, M., and Jeang, K.-T. (2007). Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nature Reviews Cancer* 7, 270–280.
- Mi, H., Muruganujan, A., Ebert, D., Huang, X., and Thomas, P.D. (2019). PANTHER version 14: more genomes, a new PANTHER GO-slim and improvements in enrichment analysis tools. *Nucleic Acids Res* 47, D419–D426.
- Mori, N., Fujii, M., Ikeda, S., Yamada, Y., Tomonaga, M., Ballard, D.W., and Yamamoto, N. (1999). Constitutive Activation of NF- κ B in Primary Adult T-Cell Leukemia Cells. 10.
- Mori, N., Fujii, M., Cheng, G., Ikeda, S., Yamasaki, Y., Yamada, Y., Tomonaga, M., and Yamamoto, N. (2010). Human T-Cell Leukemia Virus Type I Tax Protein Induces the Expression of Anti-Apoptotic Gene Bcl-xL in Human T-Cells through Nuclear Factor- κ B and c-AMP Responsive Element Binding Protein Pathways. 9.
- Morrison, D.K. (2012). MAP Kinase Pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
- Mühleisen, A., Giaisi, M., Köhler, R., Krammer, P.H., and Li-Weber, M. (2014). Tax contributes apoptosis resistance to HTLV-1-infected T cells via suppression of Bid and Bim expression. *Cell Death and Disease* 5, e1575.
- Mullee, L.I., and Morrison, C.G. (2016). Centrosomes in the DNA damage response—the hub outside the centre. *Chromosome Research* 24, 35–51.
- Muller, S., Boire, G., Ossondo, M., Ricchiuti, V., Smadja, D., Vernant, J.-C., and Ozden, S. (1995). IgG Autoantibody Response in HTLV-I-Infected Patients. *Clinical Immunology and Immunopathology* 77, 282–290.
- Naito, T., Yasunaga, J., Mitobe, Y., Shirai, K., Sejima, H., Ushirogawa, H., Tanaka, Y., Nakamura, T., Hanada, K., Fujii, M., et al. (2018). Distinct gene expression signatures induced by viral transactivators of different HTLV-1 subgroups that confer a different risk of HAM/TSP. *Retrovirology* 15.
- Nakamura, H., Shimizu, T., Takatani, A., Suematsu, T., Nakamura, T., and Kawakami, A. (2019). Initial human T-cell leukemia virus type 1 infection of the salivary gland epithelial cells requires a biofilm-like structure. *Virus Research* 269, 197643.
- Nakamura, S., Nagano, I., Yoshioka, M., Shimazaki, S., Onodera, J., and Kogure, K. (1993). Detection of tumor necrosis factor- α -positive cells in cerebrospinal fluid of patients with HTLV-I-associated myelopathy. *Journal of Neuroimmunology* 42, 127–130.
- Nam, H.-J., and van Deursen, J.M. (2014). Cyclin B2 and p53 control proper timing of centrosome separation. *Nature Cell Biology* 16, 535–546.
- Nanbo, A., Noda, T., and Ohba, Y. (2018). Epstein–Barr Virus Acquires Its Final Envelope on Intracellular Compartments With Golgi Markers. *Front Microbiol* 9.
- Nasr, R. (2006). Tax ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of NF- κ B activation. *Blood* 107, 4021–4029.
- Nejmeddine, M., Negi, V.S., Mukherjee, S., Tanaka, Y., Orth, K., Taylor, G.P., and Bangham, C.R. (2009). HTLV-1–Tax and ICAM-1 act on T-cell signal pathways to polarize the microtubule-organizing center at the virological synapse. *Blood* 114, 1016–1025.
- Nguyen, C.L., and Münger, K. (2008). Direct association of the HPV16 E7 oncoprotein with cyclin A/CDK2 and cyclin E/CDK2 complexes. *Virology* 380, 21–25.

Références

- Nguyen, C.L., Eichwald, C., Nibert, M.L., and Munger, K. (2007). Human Papillomavirus Type 16 E7 Oncoprotein Associates with the Centrosomal Component -Tubulin. *Journal of Virology* *81*, 13533–13543.
- Nicholson, K.M., and Anderson, N.G. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling* *14*, 381–395.
- Nicot, C., Dunder, M., Johnson, J.M., Fullen, J.R., Alonzo, N., Fukumoto, R., Princler, G.L., Derse, D., Misteli, T., and Franchini, G. (2004). HTLV-1-encoded p30II is a post-transcriptional negative regulator of viral replication. *Nature Medicine* *10*, 197–201.
- Niederer, H.A., Laydon, D.J., Melamed, A., Elemans, M., Asquith, B., Matsuoka, M., and Bangham, C.R. (2014). HTLV-1 proviral integration sites differ between asymptomatic carriers and patients with HAM/TSP. *Virology* *11*.
- Nitta, T., Kanai, M., Sugihara, E., Tanaka, M., Sun, B., Nagasawa, T., Sonoda, S., Saya, H., and Miwa, M. (2006). Centrosome amplification in adult T-cell leukemia and human T-cell leukemia virus type 1 Tax-induced human T cells. *Cancer Science* *97*, 836–841.
- Ohsugi, T., Ishida, T., Shimasaki, T., Okada, S., and Umezawa, K. (2013). p53 dysfunction precedes the activation of nuclear factor- κ B during disease progression in mice expressing Tax, a human T-cell leukemia virus type 1 oncoprotein. *Carcinogenesis* *34*, 2129–2136.
- Okochi, K., Sato, H., and Hinuma, Y. (1984). A Retrospective Study on Transmission of Adult T Cell Leukemia Virus by Blood Transfusion: Seroconversion in Recipients. *Vox Sanguinis* *46*, 245–253.
- Osame, M., Janssen, R., Kubota, H., Nishitani, H., Igata, A., Nagataki, S., Mori, M., Goto, I., Shimabukuro, H., Khabbaz, R., et al. (1990). Nationwide survey of HTLV-I-associated myelopathy in Japan: Association with blood transfusion. *Annals of Neurology* *28*, 50–56.
- Papesch (2001). Epstein-Barr virus infectious mononucleosis.
- Parent, L.J. (2012). Rous Sarcoma Virus: Contributions of a Chicken Virus to Tumor Biology, Human Cancer Therapeutics, and Retrovirology. In *Cancer Associated Viruses*, E.S. Robertson, ed. (Boston, MA: Springer US), pp. 705–737.
- Peloponese, J.-M., and Jeang, K.-T. (2006). Role for Akt/Protein Kinase B and Activator Protein-1 in Cellular Proliferation Induced by the Human T-cell Leukemia Virus Type 1 Tax Oncoprotein. *Journal of Biological Chemistry* *281*, 8927–8938.
- Peloponese, J.-M., Haller, K., Miyazato, A., and Jeang, K.-T. (2005). Abnormal centrosome amplification in cells through the targeting of Ran-binding protein-1 by the human T cell leukemia virus type-1 Tax oncoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *102*, 18974–18979.
- Pene, S., Waast, L., Bonnet, A., Benit, L., and Pique, C. (2014). A Non-SUMOylated Tax Protein Is Still Functional for NF- κ B Pathway Activation. *Journal of Virology* *88*, 10655–10661.
- Piel, M., Meyer, P., Khodjakov, A., Rieder, C.L., and Bornens, M. (2000). The Respective Contributions of the Mother and Daughter Centrioles to Centrosome Activity and Behavior in Vertebrate Cells. *J Cell Biol* *149*, 317–330.
- Pise-Masison, C.A., Mahieux, R., Jiang, H., Ashcroft, M., Radonovich, M., Duvall, J., Guillermin, C., and Brady, J.N. (2000). Inactivation of p53 by Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Tax Requires Activation of the NF- κ B Pathway and Is Dependent on p53 Phosphorylation. *Mol Cell Biol* *20*, 3377–3386.
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., and D’Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)* *8*, 603–619.

Références

- Plati, J., Bucur, O., and Khosravi-Far, R. (2008). Dysregulation of Apoptotic Signaling in Cancer: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *J Cell Biochem* 104, 1124–1149.
- Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D., and Gallo, R.C. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77, 7415–7419.
- Rampalli, S., Pavithra, L., Bhatt, A., Kundu, T.K., and Chattopadhyay, S. (2005). Tumor Suppressor SMAR1 Mediates Cyclin D1 Repression by Recruitment of the SIN3/Histone Deacetylase 1 Complex. *Mol Cell Biol* 25, 8415–8429.
- Rayne, F., Kajava, A.V., Lalanne, J., and Mamoun, R.Z. (2004). In Vivo Homodimerisation of HTLV-1 Gag and MA Gives Clues to the Retroviral Capsid and TM Envelope Protein Arrangement. *Journal of Molecular Biology* 343, 903–916.
- Ren, T., Takahashi, Y., Liu, X., Loughran, T.P., Sun, S.-C., Wang, H.-G., and Cheng, H. (2015). HTLV-1 Tax deregulates autophagy by recruiting autophagic molecules into lipid raft microdomains. *Oncogene* 34, 334–345.
- Roucoux, D.F., Wang, B., Smith, D., Nass, C.C., Smith, J., Hutching, S.T., Newman, B., Lee, T., Chafets, D.M., Murphy, E.L., et al. (2005). A Prospective Study of Sexual Transmission of Human T Lymphotropic Virus (HTLV)-I and HTLV-II. *The Journal of Infectious Diseases* 191, 1490–1497.
- Rous, P. (1911). A SARCOMA OF THE FOWL TRANSMISSIBLE BY AN AGENT SEPARABLE FROM THE TUMOR CELLS. *J Exp Med* 13, 397–411.
- Roux, K.J., Kim, D.I., Raida, M., and Burke, B. (2012). A promiscuous biotin ligase fusion protein identifies proximal and interacting proteins in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology* 196, 801–810.
- Rowe, D.T. (1999). EPSTEIN-BARR VIRUS IMMORTALIZATION AND LATENCY. 26.
- Saggiaro, D., Barp, S., and Chieco-Bianchi, L. (2001). Block of a Mitochondrial-Mediated Apoptotic Pathway in Tax-Expressing Murine Fibroblasts. *Experimental Cell Research* 269, 245–255.
- Saha, A., and Robertson, E.S. (2019). Mechanisms of B-Cell Oncogenesis Induced by Epstein-Barr Virus. *J Virol* 93.
- Saha, A., Halder, S., Upadhyay, S.K., Lu, J., Kumar, P., Murakami, M., Cai, Q., and Robertson, E.S. (2011). Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3C Facilitates G1-S Transition by Stabilizing and Enhancing the Function of Cyclin D1. *PLoS Pathog* 7.
- Saito, K., Saito, M., Taniura, N., Okuwa, T., and Ohara, Y. (2010). Activation of the PI3K–Akt pathway by human T cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) oncoprotein Tax increases Bcl3 expression, which is associated with enhanced growth of HTLV-1-infected T cells. *Virology* 403, 173–180.
- Santiago, F., Clark, E., Chong, S., Molina, C., Mozafari, F., Mahieux, R., Fujii, M., Azimi, N., and Kashanchi, F. (1999). Transcriptional Up-Regulation of the Cyclin D2 Gene and Acquisition of New Cyclin-Dependent Kinase Partners in Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Infected Cells. *J Virol* 73, 9917–9927.
- Santpere, G., Darre, F., Blanco, S., Alcamí, A., Villoslada, P., Mar Albà, M., and Navarro, A. (2014). Genome-Wide Analysis of Wild-Type Epstein–Barr Virus Genomes Derived from Healthy Individuals of the 1000 Genomes Project. *Genome Biol Evol* 6, 846–860.
- Schmidt, T.I., Kleylein-Sohn, J., Westendorf, J., Le Clech, M., Lavoie, S.B., Stierhof, Y.-D., and Nigg, E.A. (2009). Control of Centriole Length by CPAP and CP110. *Current Biology* 19, 1005–1011.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. *Nat Methods* 9, 671–675.

Références

- Semmes, O.J., and Jeang, K.T. (1996). Localization of human T-cell leukemia virus type 1 tax to subnuclear compartments that overlap with interchromatin speckles. *J Virol* *70*, 6347–6357.
- Shembade, N., Harhaj, N.S., Yamamoto, M., Akira, S., and Harhaj, E.W. (2007). The Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Oncoprotein Requires the Ubiquitin-Conjugating Enzyme Ubc13 for NF- κ B Activation. *Journal of Virology* *81*, 13735–13742.
- Shimoyama, M. (1991). Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. *British Journal of Haematology* *79*, 428–437.
- Shumilov, A., Tsai, M.-H., Schlosser, Y.T., Kratz, A.-S., Bernhardt, K., Fink, S., Mizani, T., Lin, X., Jauch, A., Mautner, J., et al. (2017). Epstein–Barr virus particles induce centrosome amplification and chromosomal instability. *Nature Communications* *8*, 14257.
- Simonis, N., Rual, J.-F., Lemmens, I., Boxus, M., Hirozane-Kishikawa, T., Gatot, J.-S., Dricot, A., Hao, T., Vertommen, D., Legros, S., et al. (2012). Host-pathogen interactome mapping for HTLV-1 and-2 retroviruses. *Retrovirology* *9*, 26.
- Singla, V., Romaguera-Ros, M., Garcia-Verdugo, J.M., and Reiter, J.F. (2010). *Ofd1*, a human disease gene, regulates the length and distal structure of centrioles. *Dev Cell* *18*, 410–424.
- Sir, J.-H., Barr, A.R., Nicholas, A.K., Carvalho, O.P., Khurshid, M., Sossick, A., Reichelt, S., D’Santos, C., Woods, C.G., and Gergely, F. (2011). A primary microcephaly protein complex forms a ring around parental centrioles. *Nature Genetics* *43*, 1147–1153.
- Smith, M.R., and Greene, W.C. (1990a). Identification of HTLV-I tax trans-activator mutants exhibiting novel transcriptional phenotypes. *Genes & Development* *4*, 1875–1885.
- Smith, M.R., and Greene, W.C. (1990b). Identification of HTLV-I tax trans-activator mutants exhibiting novel transcriptional phenotypes. *Genes & Development* *4*, 1875–1885.
- Smith, E., Dejsuphong, D., Balestrini, A., Hampel, M., Lenz, C., Takeda, S., Vindigni, A., and Costanzo, V. (2009). An ATM- and ATR-dependent checkpoint inactivates spindle assembly by targeting CEP63. *Nature Cell Biology* *11*, 278–285.
- Sonnen, K.F., Schermelleh, L., Leonhardt, H., and Nigg, E.A. (2012). 3D-structured illumination microscopy provides novel insight into architecture of human centrosomes. *Biology Open* *1*, 965–976.
- Soung, N.-K., Kang, Y.H., Kim, K., Kamijo, K., Yoon, H., Seong, Y.-S., Kuo, Y.-L., Miki, T., Kim, S.R., Kuriyama, R., et al. (2006). Requirement of hCenexin for Proper Mitotic Functions of Polo-Like Kinase 1 at the Centrosomes. *Mol Cell Biol* *26*, 8316–8335.
- Spear, G.T., Lurain, N.S., Parker, C.J., Ghassemi, M., Payne, G.H., and Saifuddin, M. (1995). Host cell-derived complement control proteins CD55 and CD59 are incorporated into the virions of two unrelated enveloped viruses. Human T cell leukemia/lymphoma virus type I (HTLV-I) and human cytomegalovirus (HCMV). *The Journal of Immunology* *7*.
- Stark, J.L., Mehla, K., Chaika, N., Acton, T.B., Xiao, R., Singh, P.K., Montelione, G.T., and Powers, R. (2014). Structure and Function of Human DnaJ Homologue Subfamily A Member 1 (DNAJA1) and Its Relationship to Pancreatic Cancer. *Biochemistry* *53*, 1360–1372.
- Sun, S.-C. (2012). The noncanonical NF- κ B pathway. *Immunol Rev* *246*, 125–140.
- Sun, S.C., Elwood, J., Béraud, C., and Greene, W.C. (1994). Human T-cell leukemia virus type I Tax activation of NF- κ B/Rel involves phosphorylation and degradation of I kappa B alpha and RelA (p65)-mediated induction of the c-rel gene. *Mol Cell Biol* *14*, 7377–7384.

Références

- Sütterlin, C., and Colanzi, A. (2010). The Golgi and the centrosome: building a functional partnership. *The Journal of Cell Biology* 188, 621–628.
- Sütterlin, C., Polishchuk, R., Pecot, M., and Malhotra, V. (2005). The Golgi-associated Protein GRASP65 Regulates Spindle Dynamics and Is Essential for Cell Division. *Mol Biol Cell* 16, 3211–3222.
- Suzuki, T., Hirai, H., Murakami, T., and Yoshida, M. (1995). Tax protein of HTLV-1 destabilizes the complexes of NF-kappa B and I kappa B-alpha and induces nuclear translocation of NF-kappa B for transcriptional activation. *Oncogene* 10, 1199–1207.
- Suzuki, T., Narita, T., Uchida-Toita, M., and Yoshida, M. (1999). Down-regulation of the INK4 Family of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors by Tax Protein of HTLV-1 through Two Distinct Mechanisms. *Virology* 259, 384–391.
- Svenning, S., and Johansen, T. (2013). Selective autophagy. *Essays in Biochemistry* 55, 79–92.
- Takahashi, M., Higuchi, M., Makokha, G.N., Matsuki, H., Yoshita, M., Tanaka, Y., and Fujii, M. (2013). HTLV-1 Tax oncoprotein stimulates ROS production and apoptosis in T cells by interacting with USP10. *Blood* 122, 715–725.
- Tang, H.-M.V., Gao, W.-W., Chan, C.-P., Cheng, Y., Deng, J.-J., Yuen, K.-S., Iha, H., and Jin, D.-Y. (2015). SIRT1 Suppresses Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Transcription. *J Virol* 89, 8623–8631.
- Tegowski, M., and Baldwin, A. (2018). Noncanonical NF-κB in Cancer. *Biomedicines* 6.
- Teruel, É., Rizkallah, G., Journo, C., and Dutartre, H. (2017). Quand le cytosquelette d'actine fait le jeu des rétrovirus. *médecine/sciences* 33, 839–842.
- Thauvin-Robinet, C., Lee, J.S., Lopez, E., Herranz-Pérez, V., Shida, T., Franco, B., Jego, L., Ye, F., Pasquier, L., Loget, P., et al. (2014). The oral-facial-digital syndrome gene C2CD3 encodes a positive regulator of centriole elongation. *Nat Genet* 46, 905–911.
- Thomas, M., and Banks, L. (1998). Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* 17, 2943–2954.
- Thomas, M., and Banks, L. (1999). Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *Journal of General Virology* 80, 1513–1517.
- Tollenaere, M.A.X., Mailand, N., and Bekker-Jensen, S. (2015). Centriolar satellites: key mediators of centrosome functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 11–23.
- Toro, C., Benito, R., Aguilera, A., Bassani, S., Rodríguez, C., Calderón, E., Caballero, E., Álvarez, P., García, J., Rodríguez-Iglesias, M., et al. (2005). Infection with human T lymphotropic virus type I in organ transplant donors and recipients in Spain. *Journal of Medical Virology* 76, 268–270.
- Trinkle-Mulcahy, L. (2019). Recent advances in proximity-based labeling methods for interactome mapping. *F1000Research* 8, 135.
- Trottier, H., Buteau, C., Robitaille, N., Duval, M., Tucci, M., Lacroix, J., and Alfieri, C. (2012). Transfusion-related Epstein-Barr virus infection among stem cell transplant recipients: a retrospective cohort study in children. *Transfusion* 52, 2653–2663.
- Tsai, K., Thikmyanova, N., Wojcechowskyj, J.A., Delecluse, H.-J., and Lieberman, P.M. (2011). EBV Tegument Protein BNRF1 Disrupts DAXX-ATRAX to Activate Viral Early Gene Transcription. *PLoS Pathogens* 7, e1002376.
- Tsuji, T., Sheehy, N., Gautier, V.W., Hayakawa, H., Sawa, H., and Hall, W.W. (2007). The Nuclear Import of the Human T Lymphotropic Virus Type I (HTLV-1) Tax Protein Is Carrier- and Energy-independent. *J. Biol. Chem.* 282, 13875–13883.

Références

- Tursiella, M.L., Bowman, E.R., Wanzeck, K.C., Throm, R.E., Liao, J., Zhu, J., and Sample, C.E. (2014). Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3A Promotes Cellular Proliferation by Repression of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21WAF1/CIP1. *PLoS Pathog* 10.
- Tytgat, H.L.P., Schoofs, G., Driesen, M., Proost, P., Van Damme, E.J.M., Vanderleyden, J., and Lebeer, S. (2015). Endogenous biotin-binding proteins: an overlooked factor causing false positives in streptavidin-based protein detection. *Microb Biotechnol* 8, 164–168.
- Uehara, R., Nozawa, R., Tomioka, A., Petry, S., Vale, R.D., Obuse, C., and Goshima, G. (2009). The augmin complex plays a critical role in spindle microtubule generation for mitotic progression and cytokinesis in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6998–7003.
- Uehara, R., Kamasaki, T., Hiruma, S., Poser, I., Yoda, K., Yajima, J., Gerlich, D.W., and Goshima, G. (2016). Augmin shapes the anaphase spindle for efficient cytokinetic furrow ingression and abscission. *Mol Biol Cell* 27, 812–827.
- Uzbekov, R., and Alieva, I. (2018). Who are you, subdistal appendages of centriole? *Open Biol* 8.
- Van Prooyen, N., Gold, H., Andresen, V., Schwartz, O., Jones, K., Ruscetti, F., Lockett, S., Gudla, P., Venzon, D., and Franchini, G. (2010). Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 20738–20743.
- Vandermeulen, C., Hajingabo, L.-J., and Twizere, J.-C. (2015). Comparative Interactome of HIV-1 Tat and Human T Lymphotropic Virus Type-1 Tax and the Cellular Transcriptional Machinery. *AIDS Research and Human Retroviruses* 31, 1204–1205.
- Varrin-Doyer, M., Nicolle, A., Marignier, R., Cavagna, S., Benetollo, C., Wattel, E., and Giraudon, P. (2012). Human T Lymphotropic Virus Type 1 Increases T Lymphocyte Migration by Recruiting the Cytoskeleton Organizer CRMP2. *The Journal of Immunology* 188, 1222–1233.
- Vermeulen, K., Bockstaele, D.R.V., and Berneman, Z.N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Proliferation* 36, 131–149.
- Vernin, C., Thenoz, M., Pinatel, C., Gessain, A., Gout, O., Delfau-Larue, M.-H., Nazaret, N., Legras-Lachuer, C., Wattel, E., and Mortreux, F. (2014). HTLV-1 bZIP Factor HBZ Promotes Cell Proliferation and Genetic Instability by Activating OncomiRs. *Cancer Research* 74, 6082–6093.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307–310.
- Vogt, M., Butz, K., Dymalla, S., Semzow, J., and Hoppe-Seyler, F. (2006). Inhibition of Bax activity is crucial for the antiapoptotic function of the human papillomavirus E6 oncoprotein. *Oncogene* 25, 4009–4015.
- Waldele, K. (2006). Requirement of the human T-cell leukemia virus (HTLV-1) tax-stimulated HIAP-1 gene for the survival of transformed lymphocytes. *Blood* 107, 4491–4499.
- Wang, C., Long, W., Peng, C., Hu, L., Zhang, Q., Wu, A., Zhang, X., Duan, X., Wong, C.C.L., Tanaka, Y., et al. (2016). HTLV-1 Tax Functions as a Ubiquitin E3 Ligase for Direct IKK Activation via Synthesis of Mixed-Linkage Polyubiquitin Chains. *PLOS Pathogens* 12, e1005584.
- Wang, L., Failler, M., Fu, W., and Dynlacht, B.D. (2018). A distal centriolar protein network controls organelle maturation and asymmetry. *Nat Commun* 9.
- Watanabe, Y., Honda, S., Konishi, A., Arakawa, S., Murohashi, M., Yamaguchi, H., Torii, S., Tanabe, M., Tanaka, S., Warabi, E., et al. (2016a). Autophagy controls centrosome number by degrading Cep63. *Nature Communications* 7, 13508.

Références

- Watanabe, Y., Honda, S., Konishi, A., Arakawa, S., Murohashi, M., Yamaguchi, H., Torii, S., Tanabe, M., Tanaka, S., Warabi, E., et al. (2016b). Autophagy controls centrosome number by degrading Cep63. *Nature Communications* 7, 13508.
- Wencker, M., Sausse, C., Derse, D., Gazzolo, L., and Duc Dodon, M. (2007). Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Protein Down-Regulates Pre-T-Cell Receptor Alpha Gene Transcription in Human Immature Thymocytes. *J Virol* 81, 301–308.
- Williamson, A., Wickliffe, K.E., Mellone, B.G., Song, L., Karpen, G.H., and Rape, M. (2009). Identification of a physiological E2 module for the human anaphase-promoting complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18213–18218.
- Wilson, V.G. (2017). Introduction to Sumoylation. In *SUMO Regulation of Cellular Processes*, V.G. Wilson, ed. (Cham: Springer International Publishing), pp. 1–12.
- Winter, H.Y., and Marriott, S.J. (2007). Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Enhances Serum Response Factor DNA Binding and Alters Site Selection. *J Virol* 81, 6089–6098.
- Wisdom, R., Johnson, R.S., and Moore, C. (1999). c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO J* 18, 188–197.
- Woodman, C.B., Collins, S., Winter, H., Bailey, A., Ellis, J., Prior, P., Yates, M., Rollason, T.P., and Young, L.S. (2001). Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *The Lancet* 357, 1831–1836.
- Wu, X., and Sun, S.-C. (2007). Retroviral oncoprotein Tax deregulates NF- κ B by activating Tak1 and mediating the physical association of Tak1–IKK. *EMBO Rep* 8, 510–515.
- Wu, G., Lin, Y.-T., Wei, R., Chen, Y., Shan, Z., and Lee, W.-H. (2008). Hice1, a Novel Microtubule-Associated Protein Required for Maintenance of Spindle Integrity and Chromosomal Stability in Human Cells. *Mol Cell Biol* 28, 3652–3662.
- Wu, X., Zhang, M., and Sun, S.-C. (2011). Mutual regulation between deubiquitinase CYLD and retroviral oncoprotein Tax. *Cell Biosci* 1, 27.
- Xiao, G., Harhaj, E.W., and Sun, S.-C. (2001). NF- κ B-Inducing Kinase Regulates the Processing of NF- κ B2 p100. *Molecular Cell* 9.
- Yamamoto, K., Ishida, T., Nakano, K., Yamagishi, M., Yamochi, T., Tanaka, Y., Furukawa, Y., Nakamura, Y., and Watanabe, T. (2011). SMYD3 interacts with HTLV-1 Tax and regulates subcellular localization of Tax. *Cancer Science* 102, 260–266.
- Yamano, Y., Cohen, C.J., Takenouchi, N., Yao, K., Tomaru, U., Li, H.-C., Reiter, Y., and Jacobson, S. (2004). Increased Expression of Human T Lymphocyte Virus Type I (HTLV-I) Tax11-19 Peptide–Human Histocompatibility Leukocyte Antigen A*201 Complexes on CD4+ CD25+ T Cells Detected by Peptide-specific, Major Histocompatibility Complex–restricted Antibodies in Patients with HTLV-I–associated Neurologic Disease. *J Exp Med* 199, 1367–1377.
- Yamauchi, J., Yamano, Y., and Yuzawa, K. (2019). Risk of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Infection in Kidney Transplantation. *New England Journal of Medicine* 380, 296–298.
- Yau, R., and Rape, M. (2016). The increasing complexity of the ubiquitin code. *Nature Cell Biology* 18, 579–586.
- Yin, M.-J., Christerson, L.B., Yamamoto, Y., Kwak, Y.-T., Xu, S., Mercurio, F., Barbosa, M., Cobb, M.H., and Gaynor, R.B. (1998). HTLV-I Tax Protein Binds to MEKK1 to Stimulate I κ B Kinase Activity and NF- κ B Activation. 10.

Références

- Younis, I., and Green, P.L. (2005). The human T-cell leukemia virus Rex protein. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 10, 431.
- Yu, F., Sharma, S., Skowronek, A., and Erdmann, K.S. (2016). The serologically defined colon cancer antigen-3 (SDCCAG3) is involved in the regulation of ciliogenesis. *Sci Rep* 6.
- Yu, Q., Minoda, Y., Yoshida, R., Yoshida, H., Iha, H., Kobayashi, T., Yoshimura, A., and Takaesu, G. (2008). HTLV-1 Tax-mediated TAK1 activation involves TAB2 adapter protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 365, 189–194.
- Yuan, H., Fu, F., Zhuo, J., Wang, W., Nishitani, J., An, D.S., Chen, I.S.Y., and Liu, X. (2005). Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins upregulate c-IAP2 gene expression and confer resistance to apoptosis. *Oncogene* 24, 5069–5078.
- Zerfass-Thome, K., Zwerschke, W., Mannhardt, B., Tindle, R., Botz, J.W., and Jansen-Dürr, P. (1996). Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* 13, 2323–2330.
- Zotti, T., Scudiero, I., Settembre, P., Ferravante, A., Mazzone, P., D’Andrea, L., Reale, C., Vito, P., and Stilo, R. (2014). TRAF6-mediated ubiquitination of NEMO requires p62/sequestosome-1. *Mol Immunol* 58, 27–31.
- (2012). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 100 B, biological agents: this publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 24 February - 03 March 2009 (Lyon: IARC).

ANNEXES

Annexe 1 : Optimisation du BioID - Purification des protéines biotinylées

Afin d'identifier uniquement les potentiels partenaires de Tax parmi toutes les protéines cellulaires, une dernière étape est requise: la purification des protéines biotinylées. Pour cela, nous avons adapté le protocole de purification des protéines biotinylées développé par Firat-Karalar et Stearns (ref 2015). Dans cet article, les auteurs présentent deux protocoles de BioID : un réalisé sur lysats totaux et un réalisé sur des fractions enrichies en centrosomes. Dans l'objectif d'identifier des partenaires centrosomaux de Tax, nous avons essayé de purifier les centrosomes selon le protocole décrit dans l'article (expériences non montrées dans le manuscrit). Cependant, les contraintes techniques ne nous ont pas permis de purifier les centrosomes. Nous avons utilisé le protocole décrivant la technique de BioID sur lysats totaux.

Le protocole initial est détaillé dans la partie Méthodes du manuscrit. Il est important de noter pour la suite de la démonstration que dans ce protocole, 60µL de billes de streptavidine sont utilisés pour purifier les protéines biotinylées du lysat cellulaire de $6,75 \cdot 10^6$ cellules 293T (soit, « une boîte de 15cm de diamètre » comme décrit dans l'article).

Ici, nous présentons les différentes étapes de mise au point réalisées à partir du protocole initial (cf. Méthodes) qui ont été nécessaires pour permettre une purification initiale des protéines biotinylées.

Dans une première expérience, nous avons suivi le protocole décrit dans cet article. Cependant, ici nous avons utilisé 60µL de billes pour $3 \cdot 10^6$ cellules 293T (cf. Méthodes ; [Figure 43](#)).

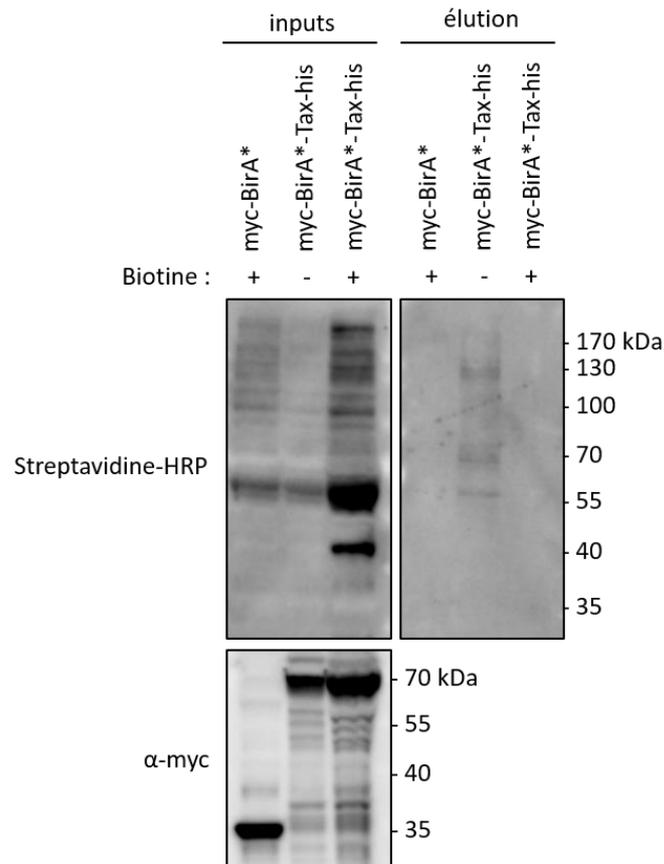


Figure 43. Purification des protéines biotinylées : protocole initial. Les différentes constructions ont été transfectées en cellules 293T (3.10^6 cellules par condition) et exprimées durant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées (+) ou non (-) avec de la biotine ($50\mu\text{M}$) pendant 18h. Après le traitement, les cellules ont été lysées et les protéines biotinylées purifiées sur une résine de streptavidine ($60\mu\text{L}$ par condition) sur la nuit à $+4^\circ\text{C}$ sous agitation. La présence de protéines biotinylées est mise en évidence par western-blot à l'aide de streptavidine-HRP, dans les lysats totaux (inputs) et après élution. Les constructions sont révélées à l'aide d'un anticorps $\alpha\text{-myc}$.

Dans ce premier test, les protéines BirA* et BirA*-Tax sont bien exprimées (présence de bandes à 35kDa et 70kDa dans les lysats totaux, respectivement). L'utilisation de la streptavidine-HRP révèle de multiples bandes correspondant aux protéines cellulaires biotinylées dans les lysats totaux. Ici, la présence de bandes de faible intensité dans la condition BirA*-Tax sans traitement préalable à la biotine suggère une faible biotinylation induite par BirA* en présence de la biotine naturellement présente dans le milieu de culture. Cependant, aucune bande n'est révélée après la purification (pistes « élution ») dans les trois conditions de transfection. Lors de ce premier test nous n'avons pas réussi à purifier des protéines biotinylées.

Nous avons par la suite formulé deux hypothèses : soit les protéines biotinylées ne se fixaient pas sur les billes de streptavidine, soit elles se fixaient bien sur les billes, mais l'interaction était perdue avant l'élution (probablement au cours des lavages) ou l'élution n'était tout simplement pas efficace.

Pour cela, nous avons répété le protocole et nous avons prélevé le surnageant à chacune des étapes avant et après la purification, c'est-à-dire les inputs, les flow-through (plus loin dans le texte nommés « FT » ; ie. la fraction protéique non fixée aux billes), les fractions suivant les quatre lavages successifs (w1-4) des billes et les éluats (*Figure 44*). Chacune de ces fractions est analysée par western-blot. Il est important de noter ici que 1/100 du lysat total pour les inputs et 1/00 du volume après élution sont déposés pour l'analyse en western-blot. Ici, ramenées à la même quantité de protéines déposées, les intensités des bandes sont donc dix fois plus faibles dans les inputs et les flow-throughs que ce qu'elles devraient être comparées aux éluations.

Dans ce second test, les protéines BirA* et BirA*-Tax sont bien exprimées (*Figure 44A*). En présence de BirA*, nous observons des protéines biotinylées après traitement à la biotine dans les lysats totaux (*Figure 44B*). Cependant, dans la condition BirA*-Tax, nous observons la présence de protéines biotinylées en absence de traitement à la biotine et légèrement plus de protéines biotinylées après traitement à la biotine dans les lysats totaux (*Figure 44C*). Ceci suggère que la biotinylation induite par le traitement à la biotine n'a ici pas été très efficace. La présence de protéines biotinylées a également été révélée à l'aide de la streptavidine-HRP dans les FT et après le premier lavage mais pas dans les fractions suivantes (w2-4 et élution) pour chacune des conditions de transfection (*Figure 44 B et C*). Ici, la présence de protéines biotinylées dans le FT (ie. en comparaison à l'absence de protéines biotinylées dans la condition « élution ») confirme donc notre première hypothèse : BirA* et BirA*-Tax biotinylent bien des protéines cellulaires mais ces protéines biotinylées ne se fixent pas aux billes de streptavidine.

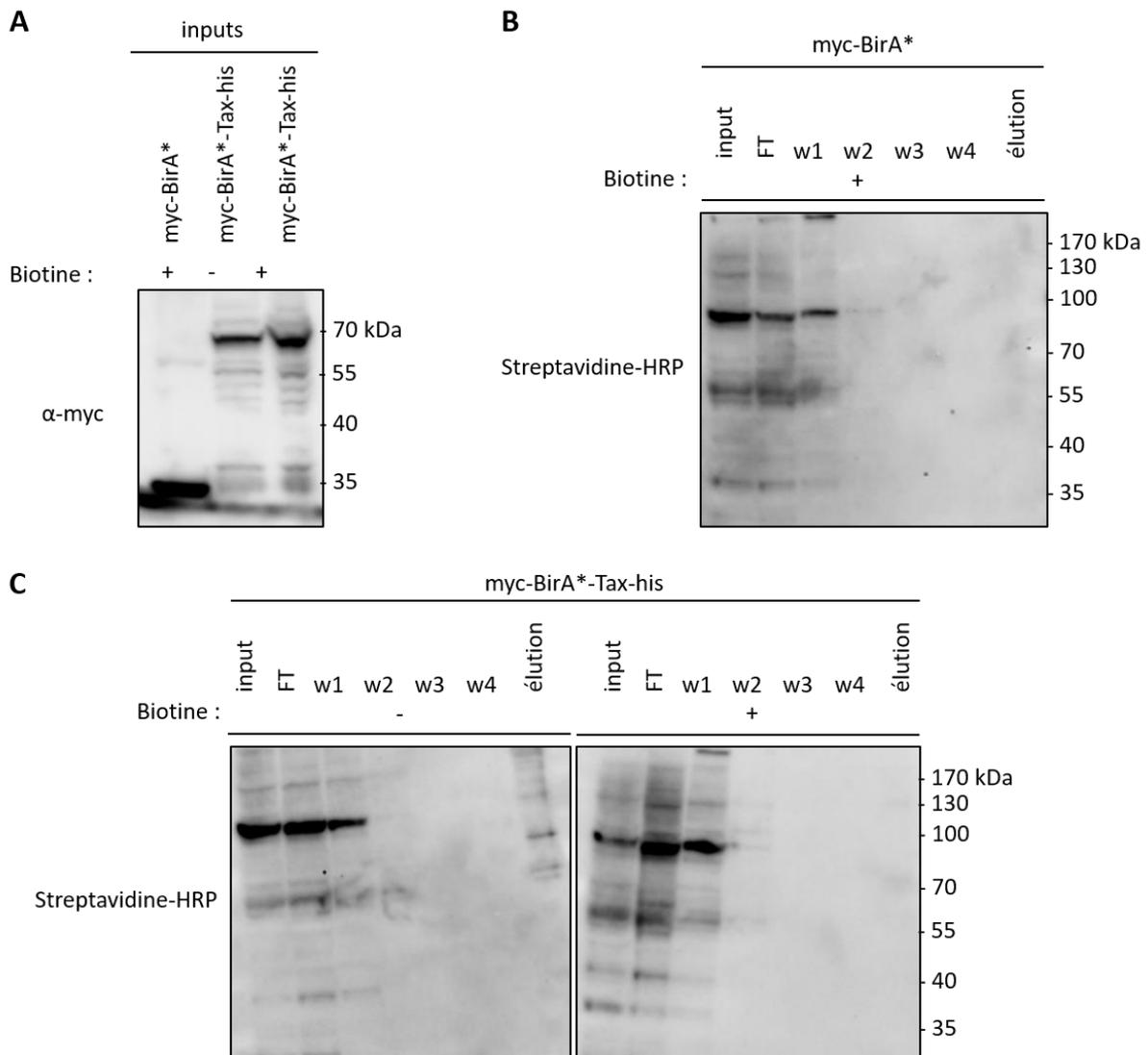


Figure 44. Purification des protéines biotinylées : analyse des flow-throughs et des fractions de lavages. Les différentes constructions ont été transfectées en cellules 293T et exprimées durant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées (+) ou non (-) avec de la biotine (50 μ M) pendant 18h. Après le traitement, les cellules ont été lysées et les protéines biotinylées purifiées sur une résine de streptavidine sur la nuit à +4°C sous agitation. La présence de protéines biotinylées est mise en évidence par western-blot à l'aide de la streptavidine-HRP dans les lysats totaux (inputs), les Flow-Through (FT), et les quatre fractions de lavages successifs (w1-4) et après élution. Les constructions sont révélées à l'aide d'un anticorps α -myc.

Il a donc été nécessaire d'optimiser le protocole de purification des protéines biotinylées. Les principales étapes du protocole qui peuvent être optimisées sont la concentration finale de la biotine lors du traitement, la composition du tampon utilisé pour la lyse chimique, la dilution de l'échantillon avant l'étape de purification, le volume de billes ajouté sur une quantité précise de protéines, le temps de la purification ainsi que le volume et le type d'élution (*Figure 45*).

Nous détaillerons ici uniquement l'étape d'optimisation qui a été déterminante pour une purification efficace des protéines biotinylées : le ratio « billes de streptavidine/quantité de protéines dans le lysat total ».

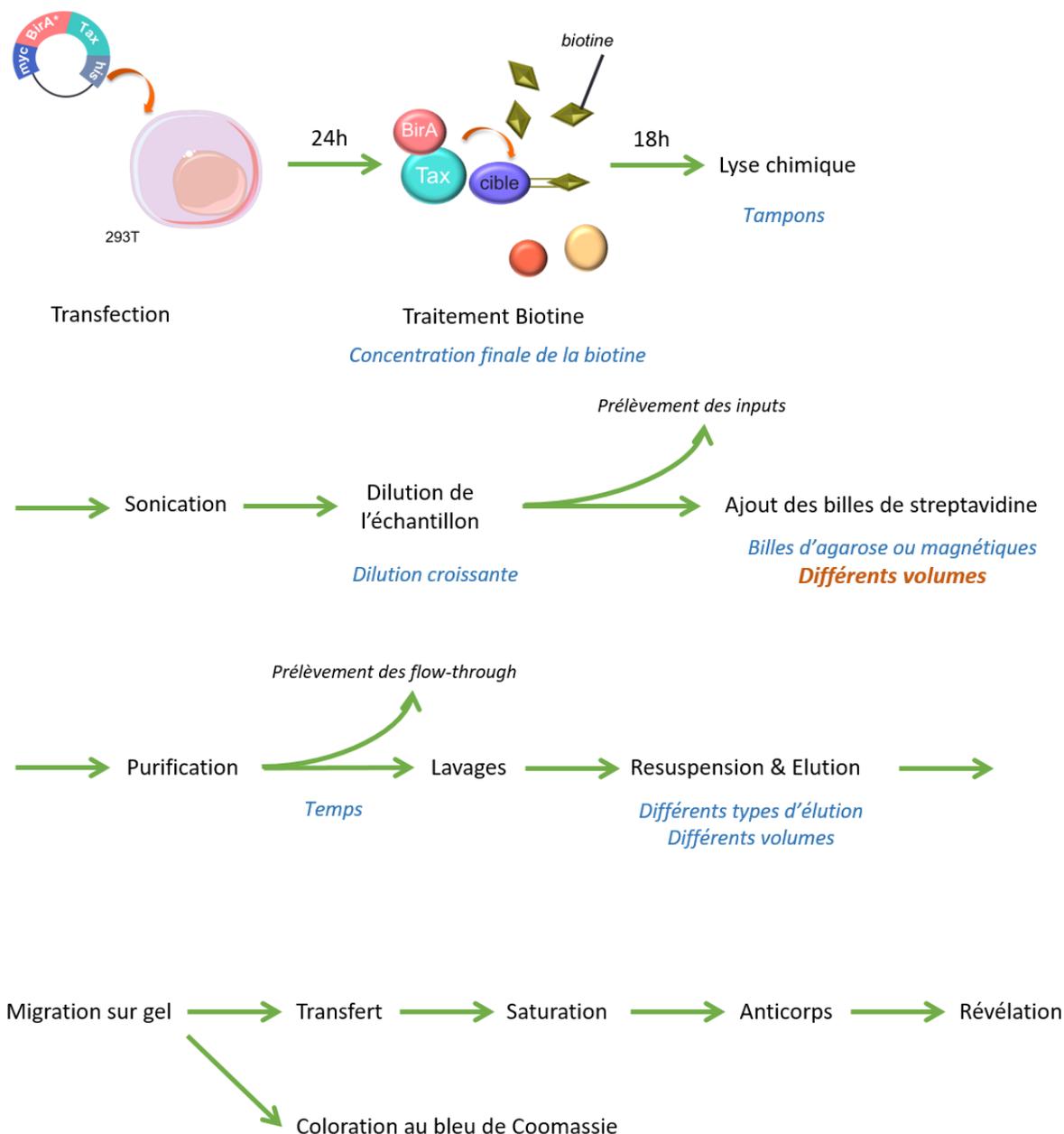
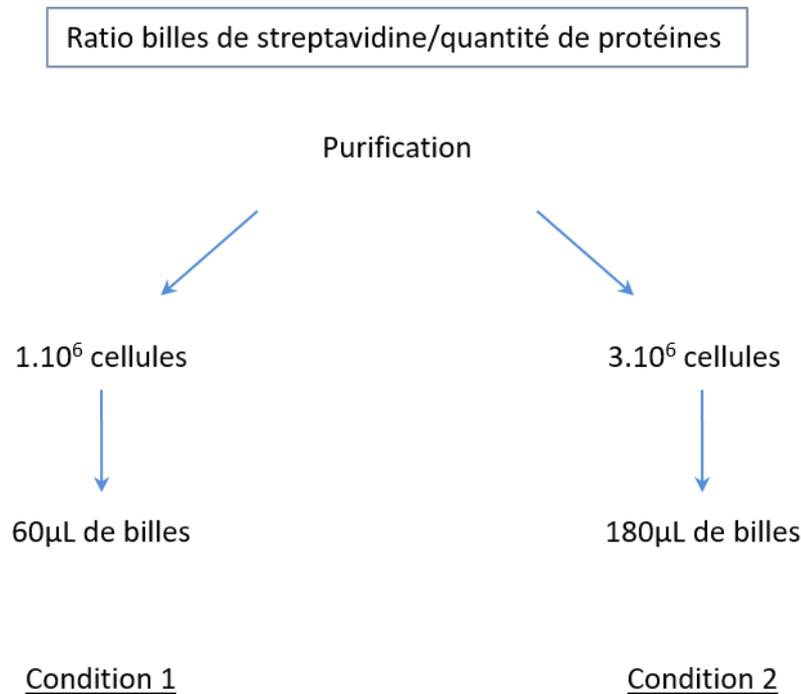


Figure 45. Schéma général de l'optimisation de la purification des protéines biotinylées. Les différentes étapes de la technique de BioID sont illustrées. Les étapes optimisables sont représentées en bleu. En orange est représentée l'étape déterminante quant à la purification optimale des protéines biotinylées.

Pour cela, nous avons lysé les cellules dans le volume initial de tampon de lyse (décrit dans l'article) et fait varier le ratio « billes de streptavidine/quantité de protéines dans le lysat total » à partir du protocole initial selon le schéma suivant :



Pour la purification, nous avons choisi dans une première condition de conserver le volume initial de billes mais d'y ajouter un volume de lysat cellulaire (et donc une quantité initiale de cellules) moins important afin d'augmenter la concentration des billes et favoriser le contact entre les billes et les protéines biotinylées. Dans la deuxième condition, nous avons choisi de conserver le volume initial de lysat cellulaire (ie. la quantité initiale de cellules) mais d'y ajouter un volume de bille adéquat pour conserver le ratio « billes/protéines » de la première condition.

Lorsque BirA* est présent (ie. dans la construction BirA*-Tax), nous observons la présence de protéines biotinylées dans les lysats totaux (*Figure 46*). Nous observons le même profil pour les deux conditions « 1.10⁶ cellules + 60µL de billes » et « 3.10⁶ cellules + 180µL de billes » : présence de protéines biotinylées dans les FT et dans les éluats après purification. La présence de bandes dans les FT en comparaison aux éluats suggère que la purification des protéines biotinylées a bien fonctionné mais qu'elle n'est pas totalement efficace.

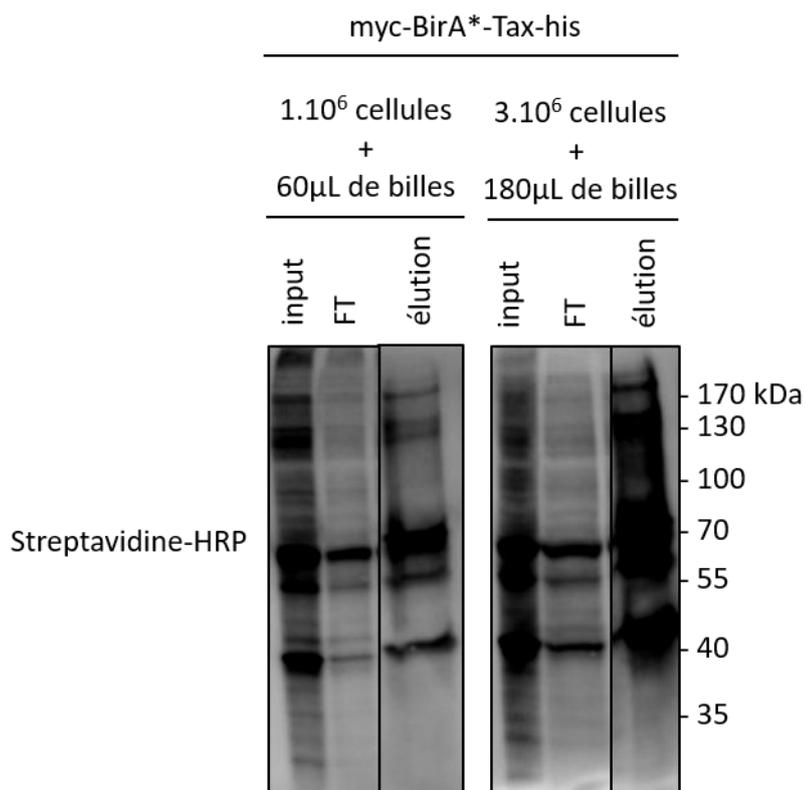


Figure 46. Purification des protéines biotinylées : variation du ratio billes/protéines. Les différentes constructions ont été transfectées en cellules 293T et exprimées durant 24h. Les cellules ont ensuite été traitées avec de la biotine (50μM) pendant 18h. Après le traitement, les cellules ont été lysées et les protéines biotinylées purifiées sur une résine de streptavidine pendant 4h à +4°C sous agitation. La présence de protéines biotinylées est mise en évidence par western-blot dans les lysats totaux (inputs), les FT et après élution à l'aide de la streptavidine-HRP. 1/20 du volume pour chaque élution et 1/200 du volume pour les inputs et FT ont été déposés pour l'analyse en WB.

Nous avons choisi de garder pour la suite des expériences ce ratio de 180μL de billes de streptavidine pour 3.10⁶ cellules initiales.

Annexe 2 : Liste des partenaires connus de Tax

Accession	Description
P43487	Ran-binding protein 1 (RanBP1)
Q12834	Cell division cycle protein 20 homolog (cdc20)
Q9Y6D9	Mitotic spindle assembly checkpoint protein (MAD1)
Q08AM6	Protein VAC14 homolog (Tax1BP2, TaxBP121)
Q06609	DNA repair protein RAD51 homolog 1 (RAD51)
P11387	DNA topoisomerase 1
P0DMV9	Heat shock 70 kDa protein 1B
O14757	Serine/threonine-protein kinase Chk1
O96017	Serine/threonine-protein kinase Chk2
O15297	Protein phosphatase 1D (Wip1)
Q14676	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 (MDC1)
Q12888	TP53-binding protein 1
P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs)
P12956	X-ray repair cross-complementing protein 6 (XRCC6, Ku70)
Q16352	Alpha-internexin
P06396	Gelsolin
P23258	Tubulin gamma-1 chain
P05787	Keratin, type II cytoskeletal 8
P68133	Actin, alpha skeletal muscle
P06400	Retinoblastoma-associated protein
P24385	G1/S-specific cyclin-D1
P30279	G1/S-specific cyclin-D2
P30281	G1/S-specific cyclin-D3
P11802	Cyclin-dependent kinase 4
Q00534	Cyclin-dependent kinase 6
P42771	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (INK4a)
P42772	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor B (INK4b)
O60563	Cyclin-T1
P30260	Cell division cycle protein 27 homolog
Q99558	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14 (MAP3K14)
Q9Y6K9	IKKg/NEMO
Q13233	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 (MEKK1)
O43318	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 (TAK1)
O15111	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha
O14920	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta
P25963	NF-kappa-B inhibitor alpha (Ikb alpha)
Q15653	NF-kappa-B inhibitor beta (Ikb beta)
P61088	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N (Ubc13)
Q13227	G protein pathway suppressor 2
Q15283	Ras GTPase-activating protein 2 (Gap1m)
P62873	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1
P27986	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit alpha (PI3K p85alpha)
Q15796	Mothers against decapentaplegic homolog 2 (Smad2)
P84022	Mothers against decapentaplegic homolog 3 (Smad3)
Q13485	Mothers against decapentaplegic homolog 4 (Smad4)
P56945	Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1 (BCAR1, p130Cas)
Q14511	Enhancer of filamentation 1 (CasL)
P25789	Proteasome subunit alpha type-4 (HC9)
P28070	Proteasome subunit beta type-4 (HsN3)
P63000	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1)
Q07960	Rho GTPase-activating protein 1 (cdc42)
P61586	Transforming protein RhoA
P16220	Cyclic AMP-responsive element-binding protein 1
Q03060	cAMP-responsive element modulator
P18846	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-1
P15336	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-2
P18847	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-3
P18848	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-4
P17861	X-box-binding protein 1
Q92793	CREB-binding protein
Q6UUU9	CREB-regulated transcription coactivator 1 (TORC1)
Q53ET0	CREB-regulated transcription coactivator 2 (TORC2)
Q6UUU7	CREB-regulated transcription coactivator 3 (TORC3)
P11831	Serum response factor (SRF)
P28324	ETS domain-containing protein Elk-4 (Sap1)
P19419	ETS domain-containing protein Elk-1

Accession	Description
P17947	Transcription factor PU.1 (Spi1)
Q86VP1	Tax1-binding protein 1
P14921	Protein C-ets-1
Q04206	Transcription factor p65 (RelA)
Q04864	Proto-oncogene c-Rel
P19838	Nuclear factor NF-kappa-B p50 subunit
Q00653	Nuclear factor NF-kappa-B p52 subunit
P25208	Nuclear transcription factor Y subunit beta
P17676	CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP beta)
P08047	Transcription factor Sp1
P18146	Early growth response protein 1
P35548	Homeobox protein MSX-2
P20226	TATA-box-binding protein
P52655	Transcription initiation factor IIA subunit 1 (TFIIA alpha)
Q15544	Transcription initiation factor TFIID subunit 11 (TAFII28)
Q09472	Histone acetyltransferase p300
Q92831	Histone acetyltransferase KAT2B (P/CAF)
Q13547	Histone deacetylase 1
Q9Y618	Nuclear receptor corepressor 2 (SMRT)
Q9UBN7	Histone deacetylase 6 (HDAC6)
Q9UBB5	Methyl-CpG-binding domain protein 2 (MBD2)
O75164	Lysine-specific demethylase 4A (JMJD2A)
O43463	Histone-lysine N-methyltransferase SUV39H1
Q86X55	Histone-arginine methyltransferase CARM1
Q9H7B4	Histone-lysine N-methyltransferase SMYD3
P26651	mRNA decay activator protein ZFP36 (TTP)
P60228	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E (Int6)
Q15633	RISC-loading complex subunit TARBP2 (TRBP)
Q14005	Pro-interleukin-16
Q12959	Disks large homolog 1
P78352	Disks large homolog 4 (PSD-95)
O14907	Tax1-binding protein 3 (Tax1BP3, Tip1)
Q5TCQ9	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 3 (MAGI3)
Q96EY1	DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial (hTid1)
Q14160	Protein scribble homolog (hScrib, LAP4)
Q13884	Beta-1-syntrophin (Tax interaction protein 43, TIP-43)
P37198	Nuclear pore glycoprotein p62
O96019	Actin-like protein 6A (BAF53)
Q969G3	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily E member 1 (BAF57)
Q92922	SWI/SNF complex subunit SMARCC1 (BAF155)
P51532	Transcription activator BRG1
P55895	V(D)J recombination-activating protein 2
P62826	GTP-binding nuclear protein Ran
P38936	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
P62879	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2
O14775	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-5
P67775	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform (PPP2CA)
Q8N448	Ligand of Numb protein X 2 (LNX2)
O00560	Syntenin-1 (SDCBP)
P33076	MHC class II transactivator (CTIIA)
P78317	E3 ubiquitin-protein ligase RNF4
O76064	E3 ubiquitin-protein ligase RNF8
Q9BTM9	Ubiquitin-related modifier 1
Q86WV6	Stimulator of interferon genes protein (STING)
Q16656	Nuclear respiratory factor 1 (NRF1)
Q9UHD2	Serine/threonine-protein kinase TBK1
Q14164	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon (IKKe)
Q13114	TNF receptor-associated factor 3 (TRAF3)
Q13546	Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 Rip1
Q8IUC6	TIR domain-containing adapter molecule 1 (TRIF)
Q92900	Regulator of nonsense transcripts 1 (Upf1)
O15162	Phospholipid scramblase 1 (PLSCR)
Q96QZ7	Membrane-associated guanylate kinase, WW and PDZ domain-containing protein 1 (MAGI 1)
Q13526	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1
Q96CV9	Optineurin (NRP)
P41182	B-cell lymphoma 6 protein (BCL6)
P17844	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5

La liste des partenaires connus de Tax a été établie par analyse des données disponibles dans la littérature et de l'interactome publié par Boxus et al., (2008).

Annexe 3 : Données issues de la spectrométrie de masse

Analyse qualitative

Accession	Description	#peptides	#PSMs	Score Sequest HT
P34931	Heat shock 70 kDa protein 1-like HSPA1L	14	37	70,01
P17066	Heat shock 70 kDa protein 6 HSPA6	10	28	56,83
Q13501	Sequestosome-1 SQSTM1	12	18	35,36
Q9BWF3	RNA-binding protein 4 RBM4	15	18	29,82
Q9BQ04	RNA-binding protein 4B RBM4B	15	18	29,04
Q92841	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	10	13	23,38
P57721	Poly(rC)-binding protein 3 PCBP3	5	11	22,76
P52292	Importin subunit alpha-1 KPNA2	8	10	22,32
Q96PK6	RNA-binding protein 14 RBM14	12	14	22,2
Q99615	DnaJ homolog subfamily C member 7 DNAJC7	13	14	20,3
P0DJD1	RANBP2-like and GRIP domain-containing protein 2 RGPD2	11	13	18,51
O60814	Histone H2B type 1-K HIST1H2BK	5	12	15,31
Q9NW64	Pre-mRNA-splicing factor RBM22	6	7	14,5
P11940	Polyadenylate-binding protein 1 PABPC1	8	10	14,25
Q9Y5A9	YTH domain-containing family protein 2 YTHDF2	7	12	13,42
P31350	Ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2 RRM2	6	6	12,52
Q6P2H3	Centrosomal protein of 85 kDa CEP85	9	11	12,16
Q72739	YTH domain-containing family protein 3 YTHDF3	7	11	11,94
Q13310	Polyadenylate-binding protein 4 PABPC4	5	6	11,84
P35606	Coatomeer subunit beta' COPB2	7	7	11,45
Q5H9F3	BCL-6 corepressor-like protein 1 BCORL1	6	7	11,32
Q9H2J4	Phosducin-like protein 3 PDCL3	5	5	10,12
Q8IY67	Ribonucleoprotein PTB-binding 1 RAVR1	5	5	9,99
Q16352	Alpha-internexin INA	3	4	8,8
O95229	ZW10 interactor ZWINT	4	4	8,74
Q9P2D1	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7 CHD7	5	6	8,35
Q15717	ELAV-like protein 1 ELAVL1	4	4	8,35
P26196	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX6 DDX6	5	5	7,99
Q9BYJ9	YTH domain-containing family protein 1 YTHDF1	5	9	7,99
Q9NVZ3	Adaptin ear-binding coat-associated protein 2 NECAP2	3	3	7,95
O95628	CCR4-NOT transcription complex subunit 4 CNOT4	3	4	7,77
O75925	E3 SUMO-protein ligase PIAS1 PIAS1	3	4	7,74
Q8N684	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 7 CPSF7	6	6	7,74
Q9UHV9	Prefoldin subunit 2 PFDN2	3	3	7,66
P00918	Carbonic anhydrase 2 CA2	4	4	7,43
P56545	C-terminal-binding protein 2 CTBP2	5	5	7,39
P13693	Translationally-controlled tumor protein TPT1	3	3	6,98
P09234	U1 small nuclear ribonucleoprotein C SNRPC	3	3	6,88
Q4VCS5	Angiomotin AMOT	5	5	6,86
P31689	DnaJ homolog subfamily A member 1 DNAJA1	5	6	6,74
Q99729	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B HNRNPAB	2	4	6,66
Q9NPI6	mRNA-decapping enzyme 1A DCP1A	3	3	6,62
Q9Y5V3	Melanoma-associated antigen D1 MAGED1	3	3	6,61
Q9H7S9	Zinc finger protein 703 ZNF703	3	4	6,51
P62937	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A PPIA	6	6	6,42
Q5JRA6	Transport and Golgi organization protein 1 homolog MIA3	7	7	6,12
Q9Y3B4	Splicing factor 3B subunit 6 SF3B6	2	2	6,05
P05412	Transcription factor AP-1 JUN	2	3	5,53
Q92900	Regulator of nonsense transcripts 1 UPF1	4	4	5,44
P46782	40S ribosomal protein S5 RPSS5	3	4	5,36
O75190	DnaJ homolog subfamily B member 6 DNAJB6	2	2	5,31
P51114	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 FXR1	2	2	5,23
Q6P3W7	SCY1-like protein 2 SCYL2	4	4	5,11
Q9BY77	Polymerase delta-interacting protein 3 POLDIP3	3	3	5,06
P06493	Cyclin-dependent kinase 1 CDK1	6	6	5,02
P61758	Prefoldin subunit 3 VBP1	2	2	4,96
Q96F45	Zinc finger protein 503 ZNF503	2	3	4,81
Q5VUA4	Zinc finger protein 318 ZNF318	3	3	4,75
P78318	Immunoglobulin-binding protein 1 IGBP1	3	3	4,73
O00762	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C UBE2C	5	5	4,63
Q9Y2X9	Zinc finger protein 281 ZNF281	6	6	4,53
Q9UPQ9	Trinucleotide repeat-containing gene 6B protein TNRC6B	5	5	4,51
P50502	Hsc70-interacting protein ST13	2	2	4,45
P29558	RNA-binding motif, single-stranded-interacting protein 1 RBMS1	2	2	4,41
Q9UNE7	E3 ubiquitin-protein ligase CHIP STUB1	3	3	4,3
Q8N6H7	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 2 ARFGAP2	4	4	4,3

Accession	Description	#peptides	#PSMs	Score Sequest HT
Q86UK7	E3 ubiquitin-protein ligase ZNF598 ZNF598	3	3	4,18
Q9BQ52	Zinc phosphodiesterase ELAC protein 2 ELAC2	3	3	4,13
Q92733	Proline-rich protein PRCC PRCC	5	5	4,08
P08243	Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing] ASNS	3	3	3,96
Q7Z589	BRCA2-interacting transcriptional repressor EMSY EMSY	2	2	3,92
P11387	DNA topoisomerase 1 TOP1	3	3	3,91
P31942	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3 HNRNPH3	4	4	3,8
Q43175	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase PHGDH	3	3	3,77
Q99708	DNA endonuclease RBBP8 RBBP8	4	4	3,69
O60884	DnaJ homolog subfamily A member 2 DNAJA2	2	2	3,62
Q8N9N5	Protein BANP BANP	3	3	3,61
Q8TB72	Pumilio homolog 2 PUM2	3	3	3,53
Q92615	La-related protein 4B LARP4B	2	2	3,26
Q53GG5	PDZ and LIM domain protein 3 PDLIM3	2	2	2,97
Q13526	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1 PIN1	3	3	2,93
P20290	Transcription factor BTF3 BTF3	3	3	2,88
Q9Y314	Nitric oxide synthase-interacting protein NOSIP	4	4	2,86
Q9UHF7	Zinc finger transcription factor Trps1 TRPS1	2	2	2,81
Q8N6T3	ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein 1 ARFGAP1	4	4	2,81
Q9BT25	HAUS augmin-like complex subunit 8 HAUS8	2	2	2,7
Q9HCJ3	Ribonucleoprotein PTB-binding 2 RAVER2	2	2	2,67
Q42694	Probable helicase with zinc finger domain HELZ	2	2	2,52
O95721	Synaptosomal-associated protein 29 SNAP29	2	2	2,51
Q9HAH7	Probable fibrosin-1 FBRS	4	4	2,47
Q9NZN8	CCR4-NOT transcription complex subunit 2 CNOT2	2	2	2,38
Q6VMQ6	Activating transcription factor 7-interacting protein 1 ATF7IP	2	2	2,33
Q96GA3	Protein LTV1 homolog LTV1	2	2	2,32
P14678	Small nuclear ribonucleoprotein-associated proteins B and B' SNRPB	2	2	2,17
Q9Y295	Developmentally-regulated GTP-binding protein 1 DRG1	2	2	2,16
P53365	Arfaptin-2 ARFIP2	4	5	2,15
Q9UI30	Multifunctional methyltransferase subunit TRM112-like protein TRMT112	2	2	2,13
Q13625	Apoptosis-stimulating of p53 protein 2 TP53BP2	5	5	2,07
Q9UQN3	Charged multivesicular body protein 2b CHMP2B	2	2	2,05
Q71RC2	La-related protein 4 LARP4	2	2	2,05
Q9NXR8	Inhibitor of growth protein 3 ING3	3	3	2,03
Q9Y371	Endophilin-B1 SH3GLB1	3	3	2,02
O60716	Catenin delta-1 CTNND1	3	3	2,02
P63220	40S ribosomal protein S21 RPS21	2	2	2,02
P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial HSPD1	3	3	2,01
P49674	Casein kinase I isoform epsilon CSNK1E	2	2	2,01
Q9NRA8	Eukaryotic translation initiation factor 4E transporter EIF4ENIF1	4	4	2,01
Q92540	Protein SMG7 SMG7	2	2	2
Q7KZF4	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 SND1	4	4	1,99
P25789	Proteasome subunit alpha type-4 PSMA4	3	3	1,97
Q9UQB8	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2 BAIAP2	2	2	1,92
Q8ND56	Protein LSM14 homolog A LSM14A	2	2	1,89
Q6ZU65	Ubiquitin-2 UBN2	2	2	1,85
Q9Y4B4	Helicase ARIP4 RAD54L2	5	5	1,84
P51970	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8 NDUFA8	2	2	1,82
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A ALDOA	4	4	1,76
O75934	Pre-mRNA-splicing factor SPF27 BCAS2	2	2	1,75
P46783	40S ribosomal protein S10 RPS10	2	2	1,74
Q9BQ67	Glutamate-rich WD repeat-containing protein 1 GRWD1	2	2	1,62
P30419	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1 NMT1	3	3	1,61

Filtres utilisés

Nombre de peptides identifiés > 1

Score Sequest HT > 1 ; au plus ce score est élevé, au mieux la protéine est identifiée.

Protéines spécifiques de la condition BirA*-Tax

Analyse quantitative #1

Accession	Description	#peptides	#PSMs	log2(Abundance ratio)	p-value
Q15654	Thyroid receptor-interacting protein 6 TRIP6	13	49	6,64	3,72E-17
Q9UDY4	DnaJ homolog subfamily B member 4 DNAJB4	3	34	6,64	3,72E-17
P84085	ADP-ribosylation factor 5 ARF5	6	26	6,64	3,72E-17
P63220	40S ribosomal protein S21 RPS21	3	22	6,64	3,72E-17
Q9BSD7	Cancer-related nucleoside-triphosphatase NTPCR	7	31	6,64	3,72E-17
Q9Y467	Sal-like protein 2 SALL2	7	27	6,64	3,72E-17
O00762	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C UBE2C	4	17	6,64	3,72E-17
P36543	V-type proton ATPase subunit E 1 ATP6V1E1	3	13	6,64	3,72E-17
Q9Y281	Cofilin-2 CFL2	5	21	6,64	3,72E-17
Q9NZN8	CCR4-NOT transcription complex subunit 2 CNOT2	8	32	6,64	3,72E-17
P61024	Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 1 CKS1B	2	14	6,64	3,72E-17
Q8IWP9	Coiled-coil domain-containing protein 28A CCDC28A	7	26	6,64	3,72E-17
P51970	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8 NDUFA8	3	12	6,64	3,72E-17
Q13547	Histone deacetylase 1 HDAC1	4	27	6,64	3,72E-17
P16333	Cytoplasmic protein NCK1	4	14	6,64	3,72E-17
Q6PII3	Coiled-coil domain-containing protein 174 CCDC174	7	18	6,64	3,72E-17
Q5TKA1	Protein lin-9 homolog LIN9	4	15	6,64	3,72E-17
Q96EP5	DAZ-associated protein 1 DAZAP1	2	12	6,64	3,72E-17
Q86TU7	Actin-histidine N-methyltransferase SETD3	8	19	6,64	3,72E-17
Q9H496	Torsin-1A-interacting protein 2, isoform IFRG15 TOR1AIP2	4	16	6,64	3,72E-17
O60573	Eukaryotic translation initiation factor 4E type 2 EIF4E2	2	12	6,64	3,72E-17
Q95067	G2/mitotic-specific cyclin-B2 CCNB2	6	17	6,64	3,72E-17
P31483	Nucleolysin TIA-1 isoform p40 TIA1	3	11	6,64	3,72E-17
Q96DH6	RNA-binding protein Musashi homolog 2 MSI2	3	10	6,64	3,72E-17
P10244	Myb-related protein B MYBL2	5	15	6,64	3,72E-17
Q9HAU5	Regulator of nonsense transcripts 2 UPF2	12	22	6,64	3,72E-17
Q9UGP8	Translocation protein SEC63 homolog SEC63	4	9	6,64	3,72E-17
Q6UUU7	CREB-regulated transcription coactivator 3 CRT3	2	8	6,64	3,72E-17
Q8NFH5	Nucleoporin NUP35 NUP35	3	9	6,64	3,72E-17
O43639	Cytoplasmic protein NCK2 NCK2	4	13	6,64	3,72E-17
Q9NP77	RNA polymerase II subunit A C-terminal domain phosphatase SSU72	2	11	6,64	3,72E-17
Q9UI30	Multifunctional methyltransferase subunit TRM112-like protein TRMT112	3	11	6,64	3,72E-17
Q86YS7	C2 domain-containing protein 5 C2CD5	5	9	6,64	3,72E-17
P48730	Casein kinase I isoform delta CSNK1D	4	12	6,64	3,72E-17
O14965	Aurora kinase A AURKA	4	12	6,64	3,72E-17
Q99816	Tumor susceptibility gene 101 protein TSG101	4	14	6,64	3,72E-17
Q17RY0	Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 4 CPEB4	5	14	6,64	3,72E-17
Q9UBT7	Alpha-catulin CTNNA1	3	16	6,64	3,72E-17
P24666	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase ACP1	3	10	6,64	3,72E-17
Q7L2Z9	Centromere protein Q CENPQ	2	7	6,64	3,72E-17
Q8N2M8	CLK4-associating serine/arginine rich protein CLASRP	3	11	6,64	3,72E-17
P24941	Cyclin-dependent kinase 2 CDK2	4	13	6,64	3,72E-17
O43447	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H PPIH	3	12	6,64	3,72E-17
Q9NSY1	BMP-2-inducible protein kinase BMP2K	4	11	6,64	3,72E-17
P13804	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial ETFA	3	7	6,64	3,72E-17
Q9UBQ5	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit K EIF3K	2	6	6,64	3,72E-17
O14777	Kinetochore protein NDC80 homolog NDC80	7	15	6,64	3,72E-17
Q96MT8	Centrosomal protein of 63 kDa CEP63	1	6	6,64	3,72E-17
Q96S94	Cyclin-L2 CCNL2	3	6	6,64	3,72E-17
Q9HCM7	Fibrosin-1-like protein FBRS1	1	5	6,64	3,72E-17
Q6NTE8	MRN complex-interacting protein MRNIP	2	9	6,64	3,72E-17
Q9P031	Thyroid transcription factor 1-associated protein 26 CCDC59	5	8	6,64	3,72E-17
Q8ND24	RING finger protein 214 RNF214	2	15	6,64	3,72E-17
Q9HBI1	Beta-parvin PARVB	1	5	6,64	3,72E-17
Q86XN7	Proline and serine-rich protein 1 PROSER1	2	8	6,64	3,72E-17
Q9Y244	Proteasome maturation protein POMP	2	7	6,64	3,72E-17
Q13363	C-terminal-binding protein 1 CTBP1	4	15	6,64	3,72E-17
O94973	AP-2 complex subunit alpha-2 AP2A2	6	15	6,64	3,72E-17
O00629	Importin subunit alpha-3 KPNA4	2	4	6,64	3,72E-17
Q8N9N5	Protein BANP BANP	6	16	6,64	3,72E-17
Q4KMP7	TBC1 domain family member 10B TBC1D10B	3	8	6,64	3,72E-17
Q9BW85	Splicing factor YJU2 YJU2	2	4	6,64	3,72E-17
Q9UBB6	Neurochondrin NCDN	2	4	6,64	3,72E-17
O00483	Cytochrome c oxidase subunit NDUFA4 NDUFA4	1	4	6,64	3,72E-17
Q9H089	Large subunit GTPase 1 homolog LSG1	2	6	6,64	3,72E-17
P57076	Cilia- and flagella-associated protein 298 CFAP298	2	3	6,64	3,72E-17
Q9Y3A5	Ribosome maturation protein SBDS SBDS	3	5	6,64	3,72E-17
O14545	TRAF-type zinc finger domain-containing protein 1 TRAFD1	2	6	6,64	3,72E-17
P56945	Breast cancer anti-estrogen resistance protein 1 BCAR1	3	5	6,64	3,72E-17
O14907	Tax1-binding protein 3 TAX1BP3	1	5	6,64	3,72E-17
Q8NG27	E3 ubiquitin-protein ligase Praja-1 PJA1	3	10	6,64	3,72E-17
Q14533	Keratin, type II cuticular Hb1 KRT81	4	11	6,64	3,72E-17
P11172	Uridine 5'-monophosphate synthase UMPS	1	3	6,64	3,72E-17
Q9BRX5	DNA replication complex GINS protein PSF3 GINS3	1	3	6,64	3,72E-17
P41214	Eukaryotic translation initiation factor 2D EIF2D	2	5	6,64	3,72E-17
Q2M1P5	Kinesin-like protein KIF7 KIF7	6	17	6,64	3,72E-17
Q8NF64	Zinc finger MIZ domain-containing protein 2 ZMIZ2	5	13	6,64	3,72E-17
P38606	V-type proton ATPase catalytic subunit A ATP6V1A	2	6	6,64	3,72E-17
Q9ULE6	Paladin PALD1	3	6	6,64	3,72E-17

Accession	Description	#peptides	#PSMs	log2(Abundance ratio)	p-value
Q9NP72	Ras-related protein Rab-18 RAB18	2	4	6,64	3,72E-17
Q9P000	COMM domain-containing protein 9 COMMD9	5	13	6,64	3,72E-17
Q16864	V-type proton ATPase subunit F ATP6V1F	3	7	6,64	3,72E-17
Q6N021	Methylcytosine dioxygenase TET2 TET2	3	4	6,64	3,72E-17
Q9NYR9	NF-kappa-B inhibitor-interacting Ras-like protein 2 NKIRAS2	1	4	6,64	3,72E-17
A8MWD9	Putative small nuclear ribonucleoprotein G-like protein 15 SNRPGP15 5	1	3	6,64	3,72E-17
Q9BZ25	Apoptosis inhibitor 5 API5	2	5	6,64	3,72E-17
Q9HAP2	MLX-interacting protein MLXIP	1	5	6,64	3,72E-17
Q9NX01	Thioredoxin-like protein 4B TXNL4B	1	2	6,64	3,72E-17
O75694	Nuclear pore complex protein Nup155 NUP155	4	6	6,64	3,72E-17
Q9UIU6	Homeobox protein SIX4 SIX4	1	4	6,64	3,72E-17
Q9HCU5	Prolactin regulatory element-binding protein PREB	3	3	6,64	3,72E-17
Q8WU58	Protein FAM222B FAM222B 2	2	4	6,64	3,72E-17
Q96NB1	LisH domain-containing protein FOPNL FOPNL	3	8	6,64	3,72E-17
Q6GMV3	Putative peptidyl-tRNA hydrolase PTRHD1 PTRHD1	1	6	6,64	3,72E-17
O75044	SLIT-ROBO Rho GTPase-activating protein 2 SRGAP2	2	5	6,64	3,72E-17
Q15650	Activating signal cointegrator 1 TRIP4	4	7	6,64	3,72E-17
Q9Y5J3	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1 HEY1	1	3	6,64	3,72E-17
P49643	DNA primase large subunit PRIM2	1	5	6,64	3,72E-17
Q9NVM6	Dnal homolog subfamily C member 17 DNAJC17	2	5	6,64	3,72E-17
P30044	Peroxisome protein 5, mitochondrial PRDX5	2	6	6,64	3,72E-17
P62304	Small nuclear ribonucleoprotein E SNRPE	2	7	6,64	3,72E-17
Q9UG63	ATP-binding cassette sub-family F member 2 ABCF2	1	5	6,64	3,72E-17
P47928	DNA-binding protein inhibitor ID-4	2	4	6,64	3,72E-17
Q5TGY3	AT-hook DNA-binding motif-containing protein 1 AHDC1	3	6	6,64	3,72E-17
O75528	Transcriptional adapter 3 TADA3	1	5	6,64	3,72E-17
Q9H6K1	Uncharacterized protein C6orf106 C6orf106	1	4	6,64	3,72E-17
Q8NB14	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 38 USP38	3	9	6,64	3,72E-17
Q15038	DAZ-associated protein 2 DAZAP2	1	4	6,64	3,72E-17
P35244	Replication protein A 14 kDa subunit RPA3	2	6	6,64	3,72E-17
C9JLW8	Mapk-regulated corepressor-interacting protein 1 MCRIP1	1	2	6,64	3,72E-17
Q6P1Q9	Methyltransferase-like protein 2B METTL2B	2	5	6,64	3,72E-17
Q5BJF6	Outer dense fiber protein 2 ODF2	1	2	6,64	3,72E-17
O15344	E3 ubiquitin-protein ligase Midline-1 MID1	3	12	6,64	3,72E-17
O75525	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 3 KHDRBS3	1	2	6,64	3,72E-17
P17275	Transcription factor jun-B JUNB	1	2	6,64	3,72E-17
Q9BYR9	Keratin-associated protein 2-4 KRTAP2-4	1	4	6,64	3,72E-17
Q5TAX3	Terminal uridylyltransferase 4 TUT4	2	5	6,64	3,72E-17
Q14596	Next to BRCA1 gene 1 protein NBR1	4	9	6,64	3,72E-17
Q9BTT4	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 10 MED10	2	3	6,64	3,72E-17
Q9H8Y8	Golgi reassembly-stacking protein 2 GORASP2	3	6	6,64	3,72E-17
Q8IX15	Homeobox and leucine zipper protein Homez HOMEZ	1	4	6,64	3,72E-17
Q8IW35	Centrosomal protein of 97 kDa CEP97	1	2	6,64	3,72E-17
Q9H2U2	Inorganic pyrophosphatase 2, mitochondrial PPA2	1	4	6,64	3,72E-17
Q9Y4K4	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 MAP4K5	2	5	6,64	3,72E-17
O14950	Myosin regulatory light chain 12B MYL12B	1	2	6,64	3,72E-17
Q96C92	Endosome-associated-trafficking regulator 1 ENTR1	2	5	6,64	3,72E-17
Q8IYA6	Cytoskeleton-associated protein 2-like CKAP2L	1	3	6,64	3,72E-17
Q9BRA2	Thioredoxin domain-containing protein 17 TXNDC17	1	2	6,64	3,72E-17
P18847	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-3 ATF3	3	4	6,64	3,72E-17
Q8N128	Protein FAM177A1	2	3	6,64	3,72E-17
P15927	Replication protein A 32 kDa subunit RPA2	1	1	6,64	3,72E-17
Q15785	Mitochondrial import receptor subunit TOM34	1	1	6,64	3,72E-17
Q96F63	Coiled-coil domain-containing protein 97 CCDC97	1	5	6,64	3,72E-17
Q9Y237	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 4 PIN4	2	3	6,64	3,72E-17
Q9NP97	Dynein light chain roadblock-type 1 DYNLRB1	2	2	6,64	3,72E-17
Q15907	Ras-related protein Rab-11B RAB11B	1	3	6,64	3,72E-17
O75420	GRB10-interacting GYF protein 1 GIGYF1	3	4	6,64	3,72E-17
Q9H9A5	CCR4-NOT transcription complex subunit 10 CNOT10	1	6	6,64	3,72E-17
Q9GZ21	N-alpha-acetyltransferase 50 NAA50	1	2	6,64	3,72E-17
O95613	Pericentrin PCNT	2	2	6,64	3,72E-17
Q96C36	Pyrrrole-5-carboxylate reductase 2 PYCR2	1	5	6,64	3,72E-17
Q99497	Protein/nucleic acid deglycase DJ-1 PARK7	1	3	6,64	3,72E-17
Q9BWG6	Sodium channel modifier 1 SCN11	3	6	6,64	3,72E-17
Q96GC5	39S ribosomal protein L48, mitochondrial MRPL48	1	3	6,64	3,72E-17
P38398	Breast cancer type 1 susceptibility protein BRCA1	2	4	6,64	3,72E-17
Q2TAY7	WD40 repeat-containing protein SMU1 SMU1	3	6	6,64	3,72E-17
Q96M11	Hydrolethalus syndrome protein 1 HYLS1	2	3	6,64	3,72E-17
Q07666	KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1 KHDRBS1	1	2	6,64	3,72E-17
P30405	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase F, mitochondrial PPIF	1	3	6,64	3,72E-17
Q99717	Mothers against decapentaplegic homolog 5 SMAD5	3	3	6,64	3,72E-17
Q14161	ARF GTPase-activating protein GIT2 GIT2	2	3	6,64	3,72E-17
P50219	Motor neuron and pancreas homeobox protein 1 MNX1	1	3	6,64	3,72E-17
Q15121	Astrocytic phosphoprotein PEA-15 PEA15	1	2	6,64	3,72E-17
Q96DE0	U8 snoRNA-decapping enzyme NUDT16	1	3	6,64	3,72E-17
P23919	Thymidylate kinase DTYMK	1	5	6,64	3,72E-17
Q9BRK4	Leucine zipper putative tumor suppressor 2 LZTS2	2	5	6,64	3,72E-17
Q00653	Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit NFKB2	1	1	6,64	3,72E-17
P00374	Dihydrofolate reductase DHFR	1	1	6,64	3,72E-17
Q14493	Histone RNA hairpin-binding protein SLBP	1	1	6,64	3,72E-17
Q96BD8	Spindle and kinetochore-associated protein 1 SKA1	1	3	6,64	3,72E-17
Q66LE6	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kDa regulatory subunit B delta PPP2R2D	1	5	6,64	3,72E-17
Q02535	DNA-binding protein inhibitor ID-3 ID3	2	4	6,64	3,72E-17
O00506	Serine/threonine-protein kinase 25 STK25	1	2	6,64	3,72E-17

Accession	Description	#peptides	#PSMs	log2(Abundance ratio)	p-value
Q9Y3E2	BolA-like protein 1 BOLA1	1	3	6,64	3,72E-17
Q95997	Securin PTTG1	1	1	6,64	3,72E-17
Q9NQ22	Something about silencing protein 10 UTP3	2	5	6,64	3,72E-17
P49759	Dual specificity protein kinase CLK1 CLK1	1	1	6,64	3,72E-17
O43347	RNA-binding protein Musashi homolog 1 MSI1	2	3	6,64	3,72E-17
Q15545	Transcription initiation factor TFIIID subunit 7 TAF7	2	2	6,64	3,72E-17
Q7RTV0	PHD finger-like domain-containing protein 5A PHF5A	2	8	6,64	3,72E-17
Q86XL3	Ankyrin repeat and LEM domain-containing protein 2 ANKLE2	3	7	6,64	3,72E-17
Q9HCJ0	Trinucleotide repeat-containing gene 6C protein TNRC6C	3	6	6,64	3,72E-17
Q9ULX6	A-kinase anchor protein 8-like AKAP8L	1	1	6,64	3,72E-17
P49721	Proteasome subunit beta type-2 PSMB2	1	3	6,64	3,72E-17
Q7LC44	Activity-regulated cytoskeleton-associated protein ARC	2	3	6,64	3,72E-17
Q9H6L4	Armadillo repeat-containing protein 7 ARMC7	1	3	6,64	3,72E-17
Q7L523	Ras-related GTP-binding protein A RRAGA	2	8	6,64	3,72E-17
Q9P265	Disco-interacting protein 2 homolog B DIP2B	1	2	6,64	3,72E-17
Q9UJ41	Rab5 GDP/GTP exchange factor RABGEF1	2	2	6,64	3,72E-17
Q9NS73	MAP3K12-binding inhibitory protein 1 MBIP	1	2	6,64	3,72E-17
Q8N0Z3	Spindle and centriole-associated protein 1 SPICE1	3	3	6,64	3,72E-17
Q9Y5A7	NEDD8 ultimate buster 1 NUB1	1	2	6,64	3,72E-17
Q9UPW0	Forkhead box protein J3 FOXJ3	1	1	6,64	3,72E-17
Q92481	Transcription factor AP-2-beta TFAP2B	2	3	6,64	3,72E-17
P50213	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha, mitochondrial IDH3A	1	1	6,64	3,72E-17
Q9UGI8	Testin TES	3	5	6,64	3,72E-17
Q9UPY6	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 3 WASF3	1	1	6,64	3,72E-17
P27540	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator ARNT	2	5	6,64	3,72E-17
Q9UK59	Lariat debranching enzyme DBR1	1	1	6,64	3,72E-17
Q12815	Tastin TROAP	2	2	6,64	3,72E-17
A2RUB6	Coiled-coil domain-containing protein 66 CCDC66	2	5	6,64	3,72E-17
Q96F44	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM11 TRIM11	1	3	6,64	3,72E-17
Q9Y3Z3	Deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase SAMHD1 SAMHD1	1	1	6,64	3,72E-17
Q9UET6	Putative tRNA (cytidine(32)/guanosine(34)-2'-O)-methyltransferase FTSJ1	1	2	6,64	3,72E-17
Q8WV22	Non-structural maintenance of chromosomes element 1 homolog NSMCE1	1	2	6,64	3,72E-17
Q9UJM3	ERBB receptor feedback inhibitor 1 ERRF1	1	4	6,64	3,72E-17
Q96P11	Probable 28S rRNA (cytosine-C(5))-methyltransferase NSUN5	1	5	6,64	3,72E-17
Q9NQC8	Intraflagellar transport protein 46 homolog IFT46	1	6	6,64	3,72E-17
P52435	DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB11-a POLR2J	1	1	6,64	3,72E-17
Q5T7V8	RAB6-interacting golgin GORAB	2	2	6,64	3,72E-17
Q96E57	SAGA-associated factor 29 SGF29	1	2	6,64	3,72E-17
P49841	Glycogen synthase kinase-3 beta GSK3B	1	3	6,64	3,72E-17
Q8NBT2	Kinetochore protein Spc24 SPC24	1	1	6,64	3,72E-17
Q8IVD9	NudC domain-containing protein 3 NUDCD3	2	4	6,64	3,72E-17
Q96M89	Coiled-coil domain-containing protein 138 CCDC138	2	2	6,64	3,72E-17
Q8ND04	Protein SMG8 SMG8	1	5	6,64	3,72E-17
P26651	mRNA decay activator protein ZFP36 ZFP36	2	6	6,64	3,72E-17
Q8IXT5	RNA-binding protein 12B RBM12B	1	1	6,64	3,72E-17
P53041	Serine/threonine-protein phosphatase 5 PPP5C	1	1	6,64	3,72E-17
Q86U90	YrdC domain-containing protein, mitochondrial YRDC	1	1	6,64	3,72E-17
Q9H8K7	Uncharacterized protein C10orf88 C10orf88	2	2	6,64	3,72E-17
Q7RTV3	Zinc finger protein 367 ZNF367	1	1	6,64	3,72E-17
Q86YH2	Zinc finger protein 280B ZNF280B	2	2	6,64	3,72E-17
Q9H7E9	UPF0488 protein C8orf33 C8orf33	2	4	6,64	3,72E-17
Q8N543	Prolyl 3-hydroxylase OGFOD1 OGFOD1	2	3	6,64	3,72E-17
P47756	F-actin-capping protein subunit beta CAPZB	2	3	6,64	3,72E-17
Q9BRG1	Vacuolar protein-sorting-associated protein 25 VPS25	3	10	6,64	3,72E-17
Q9BWH6	RNA polymerase II-associated protein 1 RPAP1	1	5	6,64	3,72E-17
Q92625	Ankyrin repeat and SAM domain-containing protein 1A ANKS1A	2	6	6,64	3,72E-17
P23526	Adenosylhomocysteinase AHCY	1	3	6,64	3,72E-17
Q9BV86	N-terminal Xaa-Pro-Lys N-methyltransferase 1 NTMT1	1	2	6,64	3,72E-17
Q8N8D1	Programmed cell death protein 7 PDCD7	1	1	6,64	3,72E-17
Q4KMZ1	IQ domain-containing protein C IQCC	2	3	6,64	3,72E-17
O00716	Transcription factor E2F3 E2F3	1	4	6,64	3,72E-17
Q8NFH3	Nucleoporin Nup43 NUP43	1	2	6,64	3,72E-17
P50579	Methionine aminopeptidase 2 METAP2	1	3	6,64	3,72E-17
Q9BX63	Fanconi anemia group J protein BRIP1	3	6	6,64	3,72E-17
Q9H9H4	Vacuolar protein sorting-associated protein 37B VPS37B	2	2	6,64	3,72E-17
Q9BPZ3	Polyadenylate-binding protein-interacting protein 2 PAIP2	1	2	6,64	3,72E-17
Q8N883	Zinc finger protein 614 ZNF614	1	1	6,64	3,72E-17
Q9BZX2	Uridine-cytidine kinase 2 UCK2	1	2	6,64	3,72E-17
Q92882	Osteoclast-stimulating factor 1 OSTF1	2	4	6,64	3,72E-17
P61163	Alpha-centractin ACTR1A	1	1	6,64	3,72E-17
Q9NWU2	Glucose-induced degradation protein 8 homolog GID8	2	2	6,64	3,72E-17
Q9NZJ0	Denticleless protein homolog DTL	1	3	6,64	3,72E-17
Q8TCU4	Alstrom syndrome protein 1 ALMS1	2	3	6,64	3,72E-17
P41134	DNA-binding protein inhibitor ID-1	2	3	6,64	3,72E-17
P78312	Protein FAM193A FAM193A	1	1	6,64	3,72E-17
P54725	UV excision repair protein RAD23 homolog A RAD23A	1	3	6,64	3,72E-17
Q15004	PCNA-associated factor PCLAF	1	2	6,64	3,72E-17
P35080	Profilin-2 PFN2	2	2	6,64	3,72E-17
Q9H7T9	Aurora kinase A and ninein-interacting protein AUNIP	2	5	6,64	3,72E-17
Q96BR5	Cytochrome c oxidase assembly factor 7 COA7	3	6	6,64	3,72E-17
Q9BUI4	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC3 POLR3C	1	3	6,64	3,72E-17
O00165	HCLS1-associated protein X-1 HAX1	1	1	6,64	3,72E-17
Q9HCC0	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial MCCC2	1	1	6,64	3,72E-17
P62324	Protein BTG1 BTG1	1	4	6,64	3,72E-17

Accession	Description	#peptides	#PSMs	log2(Abundance ratio)	p-value
Q9HC77	Centromere protein J CENPJ	1	2	6,64	3,72E-17
P05412	Transcription factor AP-1 JUN	8	34	5,44	0,011786007
Q13501	Sequestosome-1 SQSTM1	16	137	4,67	0,043355515
P31689	DnaJ homolog subfamily A member 1 DNAJA1	18	112	4,62	0,047244099
Q86WR7	Proline and serine-rich protein 2 PROSER2	2	2	4,27	0,007875284
P60981	Dextrin DSTN	4	12	3,97	0,02932385
Q9NWB1	RNA binding protein fox-1 homolog 1 RBFOX1	2	10	3,93	0,030220467
Q5MNZ6	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 3 WDR45B	4	19	3,9	0,033448025
P78310	Coxsackievirus and adenovirus receptor CXADR	6	16	3,76	0,035666157
Q9UKD1	Glucocorticoid modulatory element-binding protein 2 GMEB2	1	7	3,45	0,004464946
Q9NYF3	Protein FAM53C FAM53C	1	5	3,34	0,010903441
Q9NVX0	HAUS augmin-like complex subunit 2 HAUS2	1	6	3,24	0,023540952
POCAP2	DNA-directed RNA polymerase II subunit GRINL1A POLR2M	2	3	2,55	0,049457357

Filtres utilisés

$\log_2(\text{Abundance ratio}) > 1$

Lorsque $\log_2(\text{Abundance ratio}) = 64$, cela signifie que l'identification est spécifique à la condition BirA*-Tax

$p\text{-value} < 0,05$

Analyse quantitative #2

Accession	Description	#peptides	#PSMs	log2(Abundance ratio)	p-value
Q00763	Acetyl-CoA carboxylase 2 ACACB	11	40	6,64	3,93E-17
Q15323	Keratin, type I cuticular Ha1 KRT31	3	16	6,64	3,93E-17
P05412	Transcription factor AP-1 JUN	5	10	6,64	3,93E-17
Q16352	Alpha-internexin INA	4	10	6,64	3,93E-17
Q9NWB1	RNA binding protein fox-1 homolog 1 RBFOX1	3	8	6,64	3,93E-17
P25789	Proteasome subunit alpha type-4 PSMA4	3	8	6,64	3,93E-17
Q8NDV7	Trinucleotide repeat-containing gene 6A protein TNRC6A	4	13	6,64	3,93E-17
P04181	Ornithine aminotransferase, mitochondrial OAT	4	6	6,64	3,93E-17
Q9UKT4	F-box only protein 5 FBXO5	5	12	6,64	3,93E-17
P07195	L-lactate dehydrogenase B chain LDHB	5	10	6,64	3,93E-17
Q5TC82	Roquin-1 RC3H1	4	6	6,64	3,93E-17
P15927	Replication protein A 32 kDa subunit RPA2	3	5	6,64	3,93E-17
Q9H496	Torsin-1A-interacting protein 2, isoform IFRG15 TOR1AIP2	2	6	6,64	3,93E-17
P61077	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 D3 UBE2D3	3	6	6,64	3,93E-17
P31150	Rab GDP dissociation inhibitor alpha GDI1	1	5	6,64	3,93E-17
Q92499	ATP-dependent RNA helicase DDX1 DDX1	3	5	6,64	3,93E-17
Q9BU14	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC3 POLR3C	2	5	6,64	3,93E-17
Q53ET0	CREB-regulated transcription coactivator 2 CRTC2	2	4	6,64	3,93E-17
P08865	40S ribosomal protein SA RPSA	2	5	6,64	3,93E-17
Q9Y295	Developmentally-regulated GTP-binding protein 1 DRG1	2	5	6,64	3,93E-17
Q12905	Interleukin enhancer-binding factor 2 ILF2	2	3	6,64	3,93E-17
Q12849	G-rich sequence factor 1 GRSF1	1	3	6,64	3,93E-17
P51970	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 8 NDUFA8	2	6	6,64	3,93E-17
Q16864	V-type proton ATPase subunit F ATP6V1F	2	5	6,64	3,93E-17
Q9H074	Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1 PAIP1	2	4	6,64	3,93E-17
Q9NVP2	Histone chaperone ASF1B ASF1B	2	4	6,64	3,93E-17
Q92844	TRAF family member-associated NF-kappa-B activator TANK	4	7	6,64	3,93E-17
Q715Y5	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 25 MED25	1	3	6,64	3,93E-17
Q9NUG6	p53 and DNA damage-regulated protein 1 PDRG1	1	2	6,64	3,93E-17
P61024	Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 1 CKS1B	1	3	6,64	3,93E-17
Q9NQC7	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase CYLD CYLD	3	6	6,64	3,93E-17
Q01085	Nucleolysin TIAR TIAL1	2	3	6,64	3,93E-17
O75175	CCR4-NOT transcription complex subunit 3 CNOT3	2	3	6,64	3,93E-17
Q9UH16	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX20	1	2	6,64	3,93E-17
O75113	NEDD4-binding protein 1 N4BP1	3	5	6,64	3,93E-17
Q6PII3	Coiled-coil domain-containing protein 174 CCDC174	1	3	6,64	3,93E-17
Q99623	Prohibitin-2 PHB2	1	2	6,64	3,93E-17
Q96J01	THO complex subunit 3 THOC3	3	6	6,64	3,93E-17
P45880	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 VDACC2	1	3	6,64	3,93E-17
Q14201	Protein BTG3 BTG3	1	3	6,64	3,93E-17
Q9BT25	HAUS augmin-like complex subunit 8 HAUS8	2	2	6,64	3,93E-17
Q9NV59	Pyridoxine-5'-phosphate oxidase PNPO	1	5	6,64	3,93E-17
Q13352	Centromere protein R ITGB3BP	1	2	6,64	3,93E-17
Q9GZR1	Sentrin-specific protease 6 SENP6	1	2	6,64	3,93E-17
P99999	Cytochrome c CYCS	1	2	6,64	3,93E-17
Q9NRG9	Aladin AAAS	1	4	6,64	3,93E-17
Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 HSD17B10	1	2	6,64	3,93E-17
P41091	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3 EIF2S3	4	4	6,64	3,93E-17
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A ALDOA	4	6	6,64	3,93E-17
Q96C92	Endosome-associated-trafficking regulator 1 ENTR1	1	2	6,64	3,93E-17
P07711	Cathepsin L1 CTSL	1	2	6,64	3,93E-17
Q8ND24	RING finger protein 214 RNF214	3	3	6,64	3,93E-17
Q6XZF7	Dynamin-binding protein DNMBP	1	2	6,64	3,93E-17
O00762	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C UBE2C	2	2	6,64	3,93E-17
Q9UJX3	Anaphase-promoting complex subunit 7 ANAPC7	1	2	6,64	3,93E-17
Q6ZNA4	E3 ubiquitin-protein ligase Arkadia RNF111	2	3	6,64	3,93E-17
Q96AY4	Tetrapeptide repeat protein 28 TTC28	2	2	6,64	3,93E-17
Q9UJY4	ADP-ribosylation factor-binding protein GGA2	2	3	6,64	3,93E-17
Q8IVM0	Coiled-coil domain-containing protein 50 CCDC50	1	3	6,64	3,93E-17
Q5TAX3	Terminal uridylyltransferase 4 TUT4	1	2	6,64	3,93E-17
O75665	Oral-facial-digital syndrome 1 protein OFD1	2	3	6,64	3,93E-17
P62304	Small nuclear ribonucleoprotein E SNRPE	1	1	6,64	3,93E-17
Q8NBU5	ATPase family AAA domain-containing protein 1 ATAD1	1	2	6,64	3,93E-17
P21741	Midkine MDK	1	3	6,64	3,93E-17
P07741	Adenine phosphoribosyltransferase APRT	1	1	6,64	3,93E-17
O95758	Polypyrimidine tract-binding protein 3 PTBP3	2	3	6,64	3,93E-17
Q8N9N5	Protein BANP BANP	1	1	6,64	3,93E-17
O75586	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 6 MED6	2	4	6,64	3,93E-17
P18754	Regulator of chromosome condensation RCC1	1	1	6,64	3,93E-17
Q96QD5	DEP domain-containing protein 7 DEPDC7 2	1	2	6,64	3,93E-17
Q7LC44	Activity-regulated cytoskeleton-associated protein ARC	1	1	6,64	3,93E-17
Q6NZ36	Fanconi anemia core complex-associated protein 20 FAAP20	1	1	6,64	3,93E-17
Q8NCN2	Zinc finger and BTB domain-containing protein 34 ZBTB34	1	1	6,64	3,93E-17
P78406	mRNA export factor RAE1	2	2	6,64	3,93E-17
Q17RY0	Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein 4 CPEB4	2	3	6,64	3,93E-17
Q99471	Prefoldin subunit 5 PFDN5	1	2	6,64	3,93E-17
Q9H9B4	Sideroflexin-1 SFXN1	1	2	6,64	3,93E-17
P54886	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase ALDH18A1	1	2	6,64	3,93E-17
Q9P1Y6	PHD and RING finger domain-containing protein 1 PHRF1	1	3	6,64	3,93E-17
Q9NR31	GTP-binding protein SAR1a SAR1A	2	2	6,64	3,93E-17
Q16637	Survival motor neuron protein SMN1	2	4	6,64	3,93E-17
Q99816	Tumor susceptibility gene 101 protein TSG101	4	6	6,64	3,93E-17
Q9UI30	Multifunctional methyltransferase subunit TRM112-like protein TRMT112	1	1	6,64	3,93E-17
Q8N3C0	Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3 ASCC3	3	5	6,64	3,93E-17
Q1MSJ5	Centrosome and spindle pole-associated protein 1 CSPP1	1	1	6,64	3,93E-17
Q9UI41	Rab5 GDP/GTP exchange factor RABGEF1	1	2	6,64	3,93E-17
P43686	26S proteasome regulatory subunit 6B PSMC4	1	1	6,64	3,93E-17
Q96P63	Serpin B12 SERPINB12	2	2	6,64	3,93E-17
Q86WP2	Vasculin GPBP1	2	2	6,64	3,93E-17

Accession	Description	#peptides	#PSMs	log2(Abundance ratio)	p-value
Q9Y6K9	NF-kappa-B essential modulator IKBKG	3	5	6,64	3,93E-17
P61158	Actin-related protein 3 ACTR3	1	1	6,64	3,93E-17
Q9Y248	DNA replication complex GINS protein PSF2 GINS2	2	2	6,64	3,93E-17
Q96BZ8	Leukocyte receptor cluster member 1 LENG1	1	1	6,64	3,93E-17
Q8N9E0	Protein FAM133A FAM133A	1	2	6,64	3,93E-17
P18847	Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-3 ATF3	1	2	6,64	3,93E-17
Q8NFH5	Nucleoporin NUP35 NUP35	2	2	6,64	3,93E-17
Q9H9A5	CCR4-NOT transcription complex subunit 10 CNOT10	1	2	6,64	3,93E-17
Q96G25	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 8 MED8	2	3	6,64	3,93E-17
P62841	40S ribosomal protein S15 RPS15	1	3	6,64	3,93E-17
P63208	S-phase kinase-associated protein 1 SKP1	2	5	6,64	3,93E-17
Q99497	Protein/nucleic acid deglycase DJ-1 PARK7	1	2	6,64	3,93E-17
Q9BX40	Protein LSM14 homolog B LSM14B	2	2	6,64	3,93E-17
Q9UBP0	Spastin SPAST	1	2	6,64	3,93E-17
O00165	HCLS1-associated protein X-1 HAX1	1	3	6,64	3,93E-17
O94972	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM37 TRIM37	1	2	6,64	3,93E-17
P63167	Dynein light chain 1, cytoplasmic DYNLL1	1	1	6,64	3,93E-17
P20248	Cyclin-A2 CCNA2	2	4	6,64	3,93E-17
Q96P70	Importin-9 IPO9	1	1	6,64	3,93E-17
Q86U58	Telomerase-binding protein EST1A SMG6	1	1	6,64	3,93E-17
O00443	Phosphatidylinositol 4-phosphate 3-kinase C2 domain-containing subunit alpha PIK3C2A	2	3	6,64	3,93E-17
Q9UKB3	DnaJ homolog subfamily C member 12 DNAJC12	1	2	6,64	3,93E-17
Q6NZ67	Mitotic-spindle organizing protein 2B MZT2B	1	1	6,64	3,93E-17
Q9H019	Mitochondrial fission regulator 1-like MTFR1L	1	1	6,64	3,93E-17
Q8TCX1	Cytoplasmic dynein 2 light intermediate chain 1 DYNC2L1	1	1	6,64	3,93E-17
O75575	DNA-directed RNA polymerase III subunit RPC9 CRCP	1	1	6,64	3,93E-17
Q13501	Sequestosome-1 SQSTM1	18	78	5,86	1,05E-05
Q96PK6	RNA-binding protein 14 RBM14	22	71	3,69	0,00928057
P13693	Translationally-controlled tumor protein TPT1	4	10	3,69	0,009196266
P17987	T-complex protein 1 subunit alpha TCP1	30	142	3,38	0,019731856
P31689	DnaJ homolog subfamily A member 1 DNAJA1	10	37	3,21	0,029093277
Q00653	Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit NFKB2	5	10	3,13	0,034652576
O14974	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A PPP1R12A	5	8	3	0,045746705
P25398	40S ribosomal protein S12 RPS12	2	7	2,99	0,047033087

Filtres utilisés

$\log_2(\text{Abundance ratio}) > 1$

Lorsque $\log_2(\text{Abundance ratio}) = 64$, cela signifie que l'identification est spécifique à la condition BirA*-Tax

$p\text{-value} < 0,05$

Annexe 4 : Alignement des séquences protéiques des quatre isoformes de Cep63

Les quatre isoformes de Cep63 sont produites par épissage alternatif dans les cellules.

Isoforme 1 (81 kDa) MEALLEGIQNRGHGGGFLTSCEAELQELMKQIDIMVAHKKSEWEGRTHALETCLKIREQE 60
Isoforme 2 (63 kDa) MEALLEGIQNRGHGGGFLTSCEAELQELMKQIDIMVAHKKSEWEGRTHALETCLKIREQE 60
Isoforme 3 (58 kDa) MEALLEGIQNRGHGGGFLTSCEAELQELMKQIDIMVAHKKSEWEGRTHALETCLKIREQE 60
Isoforme 4 (56 kDa) MEALLEGIQNRGHGGGFLTSCEAELQELMKQIDIMVAHKKSEWEGRTHALETCLKIREQE 60

Isoforme 1 (81 kDa) LKSLRSQLDVTHKEVGMLHQQVEEHEKIQEMTMEYKQELKKLHEELCILKRSYEKLQKK 120
Isoforme 2 (63 kDa) LKSLRSQLDVTHKEVGMLHQQVEEHEKIQEMTMEYKQELKKLHEELCILKRSYEKLQKK 120
Isoforme 3 (58 kDa) LKSLRSQLDVTHKEVGMLHQQVEEHEKIQEMTMEYKQELKKLHEELCILKRSYEKLQKK 120
Isoforme 4 (56 kDa) LKSLRSQLDVTHKEVGMLHQQVEEHEKIQEMTMEYKQELKKLHEELCILKRSYEKLQKK 120

Isoforme 1 (81 kDa) QMREFRGNTKNHREDRSEIERLTAKIEEFRQKSLDWEKQRLIYQQVSSLEAQRKALAEQ 180
Isoforme 2 (63 kDa) QMREFRGNTKNHREDRSEIERLTAKIEEFRQKSLDWEKQRLIYQQVSSLEAQRKALAEQ 180
Isoforme 3 (58 kDa) QMREFRGNTKNHREDRSEIERLTAKIEEFRQKSLDWEKQRLIYQQVSSLEAQRKALAEQ 180
Isoforme 4 (56 kDa) QMREFRGNTKNHREDRSEIERLTAKIEEFRQKSLDWEKQRLIYQQVSSLEAQRKALAEQ 180

Isoforme 1 (81 kDa) SEIIQAQLVNRKQKLESVELSSQSEIQHLSSKLERANDTICANELEIERLTMRVNDLVGT 240
Isoforme 2 (63 kDa) SEIIQAQLVNRKQKLESVELSSQSEIQHLSSKLERANDTICANELEIERLTMRVNDLVGT 240
Isoforme 3 (58 kDa) SEIIQAQLVNRKQKLESVELSSQSEIQHLSSKLERANDTICANELEIERLTMRVNDLVGT 240
Isoforme 4 (56 kDa) SEIIQAQLVNRKQKLESVELSSQSEIQHLSSKLERANDTICANELEIERLTMRVNDLVGT 240

Isoforme 1 (81 kDa) SMTVLQEQQKKEEKLRESEKLEALQEEKRELKAALQSQENLIHEARIQKEKLQEKVKAT 300
Isoforme 2 (63 kDa) SMTVLQEQQKKEEKLRESEKLEALQEEKRELKAALQSQENLIHEARIQKEKLQEKVKAT 300
Isoforme 3 (58 kDa) SMTVLQEQQKKEEKLRESEKLEALQEEKRELKAALQSQENLIHEARIQKEKLQEKVKAT 300
Isoforme 4 (56 kDa) SMTVLQEQQKKEEKLRESEKLEALQEEKRELKAALQSQENLIHEARIQKEKLQEKVKAT 300

Isoforme 1 (81 kDa) NTQHAVEAIRPREESLAEKKYTSQGQGDLDVLSQLNFTHTSEDLLQAEVTCLEGSLESV 360
Isoforme 2 (63 kDa) NTQHAVEAIRPREESLAEKKYTSQGQGDLDVLSQLNFTHTSEDLLQAEVTCLEGSLESV 360
Isoforme 3 (58 kDa) NTQHAVEAI-----SLESV 314
Isoforme 4 (56 kDa) NTQHAVEAI-----SLESV 314

Isoforme 1 (81 kDa) SATCKQLSQELMEKYEELKRMEAHNNEYKAEIKKLKEQILQGEQSYSSALEGMKMEISHL 420
Isoforme 2 (63 kDa) SATCKQLSQELMEKYEELKRMEAHNNEYKAEIKKLKEQILQGEQSYSSALEGMKMEISHL 420
Isoforme 3 (58 kDa) SATCKQLSQELMEKYEELKRMEAHNNEYKAEIKKLKEQILQGEQSYSSALEGMKMEISHL 374
Isoforme 4 (56 kDa) SATCKQLSQELMEKYEELKRMEAHNNEYKAEIKKLKEQILQGEQSYSSALEGMKMEISHL 374

Isoforme 1 (81 kDa) TQELHQRDITIASTKGSSSDMEKRLRAEMQKAEDKAVEHKEILDQLESKLENRHLSEMV 480
Isoforme 2 (63 kDa) TQELHQRDITIASTKGSSSDMEKRLRAEMQKAEDKAVEHKEILDQLESKLENRHLSEMV 480
Isoforme 3 (58 kDa) TQELHQRDITIASTKGSSSDMEKRLRAEMQKAEDKAVEHKEILDQLESKLENRHLSEMV 434
Isoforme 4 (56 kDa) TQELHQRDITIASTKGSSSDMEKRLRAEMQKAEDKAVEHKEILDQLESKLENRHLSEMV 434

Isoforme 1 (81 kDa) MKLELGLHEAKEISLADLQ-ENYI-EALNKLVSENQQLQKDLMNTKSQLEISTQMCKKQN 538
Isoforme 2 (63 kDa) MKLELGLH----- 488
Isoforme 3 (58 kDa) MKLELGLH----- 442
Isoforme 4 (56 kDa) MKLELGLHERWGFTMLSSLVLNFGIQAIR----- 463

Isoforme 1 (81 kDa) DRIFKPTHSRTTEFKNTEFKPTHGQHRHDGIKTEHYKTDLHSPRGQASDSINPMSRVLSP 598
Isoforme 2 (63 kDa) -----
Isoforme 3 (58 kDa) -----
Isoforme 4 (56 kDa) ----QPQRPKVLELQV----- 475

Isoforme 1 (81 kDa) LSPQISPCSSTRSLTSYSLCKTHSLPSALDTNEANFSDTMSESMNDQEEFISSCSLPVSP 658
Isoforme 2 (63 kDa) -----ECSLPVSP 496
Isoforme 3 (58 kDa) -----ECSLPVSP 450
Isoforme 4 (56 kDa) -----

Isoforme 1 (81 kDa) LGSIATRFLEEEELRSHHILERLDAHIEELKRESEKTVRQFTALK 703
Isoforme 2 (63 kDa) LGSIATRFLEEEELRSHHILERLDAHIEELKRESEKTVRQFTALK 541
Isoforme 3 (58 kDa) LGSIATRFLEEEELRSHHILERLDAHIEELKRESEKTVRQFTALK 495
Isoforme 4 (56 kDa) -----

PUBLICATIONS

OPEN

SQSTM-1/p62 potentiates HTLV-1 Tax-mediated NF- κ B activation through its ubiquitin binding function

Aurélien Schwob^{1,2,7}, Elodie Teruel^{1,2,7}, Louise Dubuisson^{1,2}, Florence Lormières^{1,2}, Pauline Verlhac^{3,4}, Yakubu Princely Abudu⁵, Janelle Gauthier^{1,2}, Marie Naoumenko^{1,2}, Fanny-Mei Cloarec-Ung^{1,2,6}, Mathias Faure³, Terje Johansen⁵, Hélène Dutartre^{1,2}, Renaud Mahieux^{1,2} & Chloé Journo^{1,2*}

The NF- κ B pathway is constitutively activated in adult T cell leukemia, an aggressive malignancy caused by Human T Leukemia Virus type 1 (HTLV-1). The viral oncoprotein Tax triggers this constitutive activation by interacting with the ubiquitin-rich IKK complex. We previously demonstrated that Optineurin and TAX1BP1, two members of the ubiquitin-binding, Sequestosome-1 (SQSTM-1/p62)-like selective autophagy receptor family, are involved in Tax-mediated NF- κ B signaling. Here, using a proximity-dependent biotinylation approach (BioID), we identify p62 as a new candidate partner of Tax and confirm the interaction in infected T cells. We then demonstrate that p62 knock-out in MEF cells as well as p62 knock-down in HEK293T cells significantly reduces Tax-mediated NF- κ B activity. We further show that although p62 knock-down does not alter NF- κ B activation in Jurkat T cells nor in infected T cells, p62 does potentiate Tax-mediated NF- κ B activity upon over-expression in Jurkat T cells. We next show that p62 associates with the Tax/IKK signalosome in cells, and identify the 170–206 domain of p62 as sufficient for the direct, ubiquitin-independent interaction with Tax. However, we observe that this domain is dispensable for modulating Tax activity in cells, and functional analysis of p62 mutants indicates that p62 could potentiate Tax activity in cells by facilitating the association of ubiquitin chains with the Tax/IKK signalosome. Altogether, our results identify p62 as a new ubiquitin-dependent modulator of Tax activity on NF- κ B, further highlighting the importance of ubiquitin in the signaling activity of the viral Tax oncoprotein.

Human T cell Leukemia Virus type 1 (HTLV-1) is a member of the *Retroviridae* family and of the *Deltaretrovirus* genus^{1,2}. It infects at least 5 to 10 million people worldwide, notably in several endemic regions such as Japan, Sub-Saharan Africa, the Caribbean, Brazil and a part of Eastern Europe^{3,4}. HTLV-1 is the etiologic agent of Adult T cell Leukemia (ATL) and of a set of inflammatory diseases including Tropical Spastic Paraparesis/HTLV-Associated Myelopathy (HAM/TSP)⁵. At the cellular level, HTLV-1 induces the constitutive activation of the NF- κ B signaling pathway in infected T cells. This drives both cell transformation and inflammation^{6,7}. The viral transactivator Tax promotes constitutive activation of both the canonical and non-canonical NF- κ B pathways⁸.

¹International Center for Research in Infectiology, Retroviral Oncogenesis Laboratory, INSERM U1111 – Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308,  cole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon, Lyon, France. ²Equipe labellisée "Fondation pour la Recherche Médicale", Paris, France. ³International Center for Research in Infectiology, Autophagy, Infection, Immunity Laboratory, INSERM U1111 – Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308,  cole Normale Supérieure de Lyon, Université Lyon, Lyon, France. ⁴Department of Biomedical Sciences of Cells and Systems, Section Molecular Cell Biology, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands. ⁵Molecular Cancer Research Group, Institute of Medical Biology, University of Troms  - The Arctic University of Norway, Troms , Norway. ⁶ cole Normale Supérieure Paris-Saclay, Université Paris-Saclay, Cachan, France. ⁷These authors contributed equally: Aurélien Schwob and Elodie Teruel. *email: chloe.journo@ens-lyon.fr

In non-infected T cells, the canonical NF- κ B pathway is activated downstream of several receptors, such as Toll-Like Receptors (TLR), Tumor Necrosis Factor Receptors (TNFR) and the T Cell Receptor (TCR). Regardless of the nature of the receptor, its engagement results in the recruitment of the I κ B kinase (IKK) complex by K63-linked and linear M1-linked polyubiquitin chains borne by signaling intermediates, such as TRAF6, RIP1 or MALT1, or by unanchored polyubiquitin chains⁹. The IKK complex activation then promotes the I κ B α inhibitor phosphorylation, followed by its ubiquitination and proteasomal degradation, allowing NF- κ B nuclear translocation and target gene transactivation.

HTLV-1 Tax has been shown to recruit the IKK γ regulatory subunit of the IKK complex^{10–12} via direct interaction strengthened by Tax-conjugated K63-polyubiquitin chains^{13–19}, leading to I κ B α degradation and NF- κ B activation²⁰. In addition, recent studies also suggested that Tax could enhance synthesis of unanchored polyubiquitin chains by RNF8²¹, and of hybrid K63- and M1-linked polyubiquitin chains by LUBAC²². Tax could thus trigger IKK activation through indirect, ubiquitin-dependent interactions, by organizing an active macromolecular IKK signalosome. On the other hand, it was also suggested that Tax acts as an E3-ubiquitin ligase that directly catalyzes synthesis of unanchored polyubiquitin chains, although these results are still debated²³.

The Tax/IKK signalosome has been described as a cytoplasmic complex associated with the centrosome and the Golgi^{14,16,19} that assembles mainly on lipid rafts²⁴ by a mechanism that relies on the membrane-associated CADM1 protein²⁵. In a previous work, we identified both Optineurin (OPTN) and Tax1-Binding Protein 1 (TAX1BP1) as crucial cellular partners involved in Tax-dependent NF- κ B activation²⁶. More specifically, OPTN was shown to interact with Tax in Golgi-associated structures and to enhance its K63-polyubiquitination in a TAX1BP1-dependent manner. OPTN and TAX1BP1 association with the Tax/IKK signalosome on lipid raft-enriched membranes in infected cell lysates was further confirmed by other investigators²⁵. Independently, Shembade *et al.* demonstrated that Tax interaction with TAX1BP1 impaired the assembly of the inhibitory TAX1BP1/A20 complex, further contributing to constitutive NF- κ B activation²⁷.

Both OPTN and TAX1BP1 have recently been identified as members of the Sequestosome-1 (SQSTM-1/p62)-like selective autophagy receptor (SLR) family^{28–31}, which function as selective macroautophagy receptors³². Interestingly, in addition to its function as a selective autophagic receptor, p62 has also been shown to potentiate NF- κ B signaling downstream of TNF α and IL-1 stimulation by interacting with PKC ζ , RIP1, TRAF6 and IKK γ , and enhancing TRAF6 E3 ubiquitin ligase activity towards TRAF6 itself and towards IKK γ ^{33–37}. p62 was further shown to interact with MEKK3 and to allow MEKK3 association with TRAF6, thereby allowing MEKK3-induced activation of NF- κ B³⁸. p62 also potentiates TRAF6-dependent NF- κ B signaling downstream of CD40 activation in macrophages³⁹. Upon TCR stimulation in T cells, p62 was identified as an essential scaffold that mediates clustering of the MALT1-BCL10-TRAF6 signalosome upstream of IKK activation⁴⁰. Taken together, these findings suggest a crucial scaffolding hub function for p62 in NF- κ B signaling. Herein, we identify p62 as a new partner of Tax and demonstrate that in addition to OPTN and TAX1BP1, p62 also potentiates Tax-mediated NF- κ B signaling. We further show that p62 associates with the Tax/IKK signalosome in infected cells. Data obtained using p62 mutants suggest that p62 could potentiate Tax activity by binding to ubiquitin chains. Altogether, our results identify p62 as a new modulator of Tax activity on NF- κ B and support a ubiquitin-dependent scaffolding role for p62 in this process.

Results

Proximity-dependent biotinylation by BirA*-Tax fusion protein identifies p62 as a new partner of Tax.

In order to identify new cellular partners of Tax involved in NF- κ B signaling, we took advantage of BioID, a recently developed proximity-dependent labelling approach⁴¹. In this procedure, the protein of interest (here Tax) is fused to a biotin ligase domain modified from an *E. coli* enzyme (BirA*). Expression of this fusion protein in the presence of biotin allows proximity-dependent labelling of partners in a 10nm-radius. Biotinylated partners are then purified and analyzed by mass spectrometry. We first verified that the BirA*-Tax fusion protein was able to induce biotinylation (Fig. 1a). Of note, BirA*-Tax displayed the expected subcellular localization previously described for Tax, with nuclear speckles as well as a perinuclear accumulation of Tax reminiscent of the Tax/IKK signalosome associated with the Golgi apparatus¹⁴ (Fig. 1b, see arrows). BirA*-Tax-mediated biotinylation depended on proximity, as shown by the colocalization of BirA*-Tax and Streptavidin-stained biotinylated protein (Fig. 1b). Using a NF- κ B-dependent luciferase reporter assay, we then verified that the BirA*-Tax fusion protein conserved its ability to activate the NF- κ B pathway (Fig. 1c). The BirA*-Tax fusion protein conserved its ability to undergo polyubiquitination, a feature required for NF- κ B signaling^{13–19}, as shown by its purification by Ni-NTA pulldown under denaturing conditions followed by ubiquitin-specific western blotting (Fig. 1d). These control experiments indicate that the BirA*-fused Tax construct is appropriate for identifying cellular partners involved in NF- κ B signaling.

We then purified the biotinylated proteins from BirA*-Tax-expressing cells and subjected them to mass spectrometry identification. As a control, biotinylated proteins from BirA*-only expressing cells were also analyzed. One of the top-ranked BirA*-Tax-specific protein identified in the three independent replicas was identified as Sequestosome-1 (SQSTM-1/p62, Fig. 1e), indicating that p62 could be a proximity partner of Tax.

We then verified whether Tax and p62 could interact in infected T cells. Co-immunoprecipitation assays were performed in HTLV-1 chronically-infected C8166, HuT102 and C91PL cells (Fig. 1f). Endogenous Tax and p62 co-immunoprecipitated in all these cell lines, confirming that p62 is indeed a partner of Tax.

p62 potentiates Tax-dependent NF- κ B activation. Because p62 has been shown to potentiate NF- κ B signaling downstream of TNF α and IL-1 stimulation, we first assessed whether p62 also modulates Tax-induced NF- κ B signaling. We first compared Tax-induced NF- κ B activation in WT and p62^{-/-} MEF cells using a NF- κ B-dependent luciferase reporter assay. Interestingly, Tax-dependent NF- κ B activation was significantly lower in p62^{-/-} MEF cells compared to wild type cells, reaching only 50% of maximal activation (Fig. 2a), thus

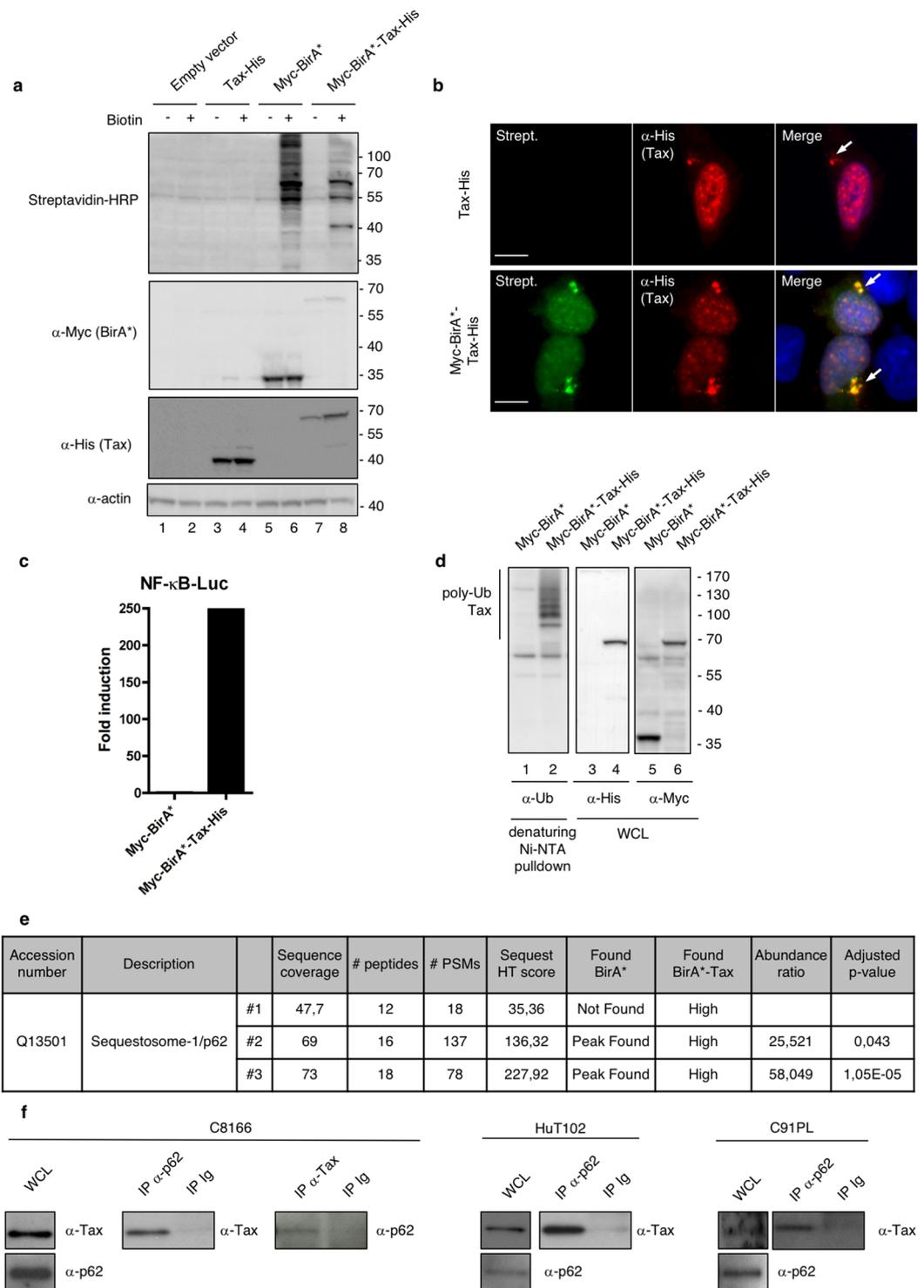


Figure 1. Functional validation of the BirA*-Tax fusion protein and identification of p62 as a new candidate partner of Tax. **(a)** Lysates from HEK293T cells transfected with the indicated plasmids for 24 h and then treated overnight with biotin or left untreated were analyzed by western blot. **(b)** U2OS cells transiently expressing Tax-His or Myc-BirA*-Tax-His and treated overnight with biotin were analyzed by epifluorescence microscopy after staining with Streptavidin (Strept., green) and His-specific antibodies (red). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Representative images are shown. Scale bar = 10 μ m. The arrows indicate perinuclear accumulation of Tax reminiscent of the Tax/IKK signalosome. **(c)** HEK293T cells were transfected with Myc-BirA* or Myc-BirA*-Tax-His, together with an NF- κ B-luc construct. Luciferase activity was measured and normalized over the “Myc-BirA*” condition. The graph shows the result from a representative experiment. **(d)** Lysates from HEK293T cells transiently expressing Myc-BirA* or Myc-BirA*-Tax-His were submitted to a His-specific Ni-NTA pulldown in denaturing conditions before western blot analyses. WCL, whole cell lysate. **(e)** SQSTM-1/p62 is a BirA*-Tax-specific biotinylated protein identified by mass spectrometry. **(f)** Lysates

from HTLV-1 chronically infected cells (C8166, HuT102 or C91PL cells) were immunoprecipitated with a p62-specific or Tax-specific antibody, or with control Ig (IP Ig). Samples were then analyzed by western blot. WCL, whole cell lysates. Full-length blots are presented in Supplementary Fig. S4.

indicating that p62 is necessary for an optimal activation of NF- κ B by Tax. To verify that p62 is specifically involved in Tax-mediated NF- κ B activation, and not in other functions of Tax such as the HTLV-1 LTR transactivation, we repeated the experiment using an LTR-dependent reporter. p62 knock-out did not significantly affect Tax-dependent HTLV-1 LTR activation (Supplementary Fig. S1), thus demonstrating an NF- κ B-specific interplay between p62 and Tax. To confirm the involvement of p62 in Tax-mediated NF- κ B activation in a luciferase reporter-independent assay, an ELISA assay was performed to quantify the transcriptionally active form of p65 (i.e. able to bind an NF- κ B-responsive promoter) in nuclear extracts from Tax-transfected WT and p62^{-/-} MEF cells (Fig. 2b and Supplementary Fig. S1 for the controls of cell fractionation). While an increasing level of Tax expression led to an increasing amount of transcriptionally active p65 in WT MEF cells, the increase in transcriptionally active p65 upon Tax expression was undetectable in p62^{-/-} MEF cells (Fig. 2b, compare grey bars). As an additional control, we further checked that p62 knock-out did not affect Tax expression levels (Fig. 2c, compare lanes 2–4 with lanes 6–8).

Then, in order to confirm the importance of p62 in Tax-mediated NF- κ B activation, we measured *Il6* expression as an NF- κ B target gene in WT or p62^{-/-} MEF cells (Fig. 2d). In contrast to WT MEF cells in which Tax expression led to an average 7.5-fold increase in *Il6* mRNA abundance, *Il6* was barely up-regulated upon Tax expression in p62^{-/-} MEF cells (Fig. 2d, left and middle panels), confirming that p62 is required for full NF- κ B activation by Tax in MEF cells.

Because these results were obtained in murine cells, we then confirmed that p62 was required for an efficient NF- κ B activation by Tax in human cells by comparing Tax activity in mock- and p62-silenced HEK293T cells (Fig. 2e). In agreement with data from p62^{-/-} MEF cells, Tax-dependent NF- κ B activation was significantly lower in p62-silenced cells compared to mock-silenced cells (Fig. 2e). As a control, we checked that Tax expression levels were also stable upon p62 silencing in HEK293T cells (Fig. 2f, compare lanes 3 and 6). Results from reporter assays were confirmed with two additional siRNA targeting p62 (Supplementary Fig. S1), and expression of ectopic p62 in p62-knocked down cells restored full Tax-induced NF- κ B activation (Supplementary Fig. S1), further confirming that p62 is responsible for the modulation of Tax function. Of note, the magnitude of p62 effect on Tax-dependent NF- κ B activation was similar to the well-documented effect of OPTN, as shown by silencing either p62 or OPTN in HEK293T cells before assaying NF- κ B activity (Supplementary Fig. S1). Similar to results obtained in MEF cells, no significant difference was observed for HTLV-1 LTR activation upon p62 silencing (Supplementary Fig. S1), indicating that p62 is specifically involved in Tax-mediated NF- κ B activation in HEK293T cells.

Finally, Tax activity was analyzed in human T cells. Surprisingly, in HTLV-1-infected cells, p62 silencing did not alter IKK complex activation, as shown by WB analysis of IKK α / β phosphorylation, I κ B α phosphorylation and I κ B α degradation in C91PL and C8166 cells (Supplementary Fig. S2). Similarly, p62 silencing in Jurkat T cells did not inhibit Tax-induced NF- κ B activation, as shown by WB analysis of IKK α / β phosphorylation and I κ B α degradation as well as by a luciferase assay using an NF- κ B reporter construct (Supplementary Fig. S2). Importantly, and consistent with a role of p62 in Tax-induced NF- κ B activation, expression of ectopic p62 in Jurkat T cells resulted in a 4-fold potentiation of Tax-induced NF- κ B activity compared to cells expressing endogenous levels of p62 (Fig. 2g). Of note, the potentiation of Tax-induced NF- κ B activation by p62 was confirmed at the level of endogenous IKK α / β phosphorylation in Jurkat T cells, which was specifically detected in Tax-transduced cells and not in mock-transduced cells (Fig. 2h, compare lanes 1–3–5 with lanes 2–4–6), and which increased upon p62 over-expression in the presence of Tax (Fig. 2h, compare lanes 2, 4 and 6). Control western blot as well as flow cytometry analyses confirmed the expression of Tax following transduction as well as the expression of ectopic p62 (Fig. 2h and Supplementary Fig. S2).

Altogether, these results demonstrate that p62 modulates Tax-dependent NF- κ B activation in all tested cell types, including human T cells. This effect is specific for NF- κ B activation, as p62 is not required for HTLV-1 LTR activation. Mechanistically, this first set of experiments indicates that p62 impacts Tax activity upstream of IKK α / β phosphorylation.

p62 interacts with the Tax/IKK signalosome in peri-Golgi structures. To explain the potentiation of Tax-dependent IKK activation by p62, and because p62 is known to mediate scaffolding of signaling complexes, we hypothesized that p62 could be associated with the Tax/IKK signalosome, which is known to assemble on golgian membranes. We then analyzed the localization of the Tax/p62 complexes in cells by investigating whether they also stained positive for the GM130 Golgi marker and for IKK γ , used here as a marker of the IKK complex. Confocal microscopy analyses were first performed in Jurkat T cells transiently expressing Tax. Consistent with previous reports, Tax was detected in perinuclear structures in addition to the nucleus (Fig. 3a, second row). Foci of Tax colocalization with endogenous p62 were observed in the cytoplasmic perinuclear region, but not in the nucleus. Perinuclear Tax/p62 speckles were distributed in the vicinity of the Golgi compartment with partial co-localization with GM130 (Fig. 3a, second row, see intensity plot on the right). Similar observations were made in the chronically infected C91PL cell line (Fig. 3a, third row and intensity plot on the right). We next investigated colocalization with IKK γ . As a control, Tax-negative Jurkat T cells exhibited a diffuse distribution of IKK γ and no co-localization between IKK γ and p62 (Fig. 3b, first row). Consistent with previous reports, IKK γ was massively relocalized both in Jurkat cells transiently expressing Tax and in infected C91PL cells, and perfectly colocalized with Tax in perinuclear structures (Fig. 3b, second and third rows). Interestingly, while p62-negative regions of

least 3 independent experiments. (f) Lysates from HEK293T cells transfected with siCTRL or *sip62* and Tax-His were analyzed by western blot. (g) Jurkat cells were transfected with increasing amounts of Myc-p62 and an NF- κ B-luc construct, followed by transduction with an empty or Flag-Tax-encoding lentivector. Luciferase activity was measured and normalized to the corresponding Tax-negative condition. Values obtained with endogenous p62 were set to 1 and other values are shown as fold change over the “endogenous p62” condition. The graph shows results from 3 independent experiments. (h) Lysates from Jurkat cells were analyzed by western blot. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ (one-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc* test). Full-length blots and gels are presented in Supplementary Fig. S4.

Tax/IKK γ speckles were consistently observed (Fig. 3b, second row, see intensity plot, b), foci of Tax/p62 colocalization were consistently distributed at the periphery of the perinuclear Tax/IKK signalosome, showing an overlap with the IKK γ staining (Fig. 3b, second row, see intensity plot, a; and third row). Taken together, microscopy analyses thus suggest that a fraction of Tax/IKK complexes assembles with p62 in peri-golgian speckles.

To confirm that p62 assembles with Tax/IKK complexes, a biochemical approach was undertaken. HeLa cells were transiently transfected with FLAG-tagged IKK γ and His-tagged Tax constructs and the Tax/IKK signalosome was purified by FLAG-specific immunoprecipitation followed by His-selective Ni-NTA purification (Fig. 3c). FLAG-tagged IKK γ and His-tagged Tax-expressing cells analyzed by this two-step protocol showed that endogenous p62 co-purified with Tax and IKK γ (Fig. 3c, lane 3), demonstrating that p62 is indeed associated with the Tax/IKK signalosome.

p62 does not allow Tax autophagic degradation at the steady-state. Because p62 is known to function as a selective autophagy receptor that allows the recruitment of cargoes to autophagosomal membranes and their degradation following fusion with lysosomes^{32,42}, we investigated whether p62 could dually modulate Tax activity by concomitantly recruiting Tax to autophagic degradation. This was tested in HeLa cells stably expressing GFP-LC3, a widely accepted marker of autophagic structures⁴³. These cells were transiently transfected with a Tax-encoding plasmid and observed by confocal microscopy (Fig. 4a). Comparison of Tax, p62 and LC3 subcellular distributions showed that foci of Tax/p62 co-localization were GFP-positive (Fig. 4a, see merge panel and intensity plot), indicating that p62 can possibly recruit Tax into LC3-containing structures. Similar observations were made with OPTN (Fig. 4a, see merge panel and intensity plot). To determine whether this possible recruitment of Tax into LC3-containing structures by Tax-interacting selective autophagic receptors might correlate with Tax degradation by lysosomal activity, cells were treated with inhibitors of lysosomal enzymes (E64D and pepstatin) and Tax expression levels were monitored by western blot (Fig. 4b). While lysosomal inhibition stabilized p62 (Fig. 4b, compare lanes 1 and 2 and see quantification), as expected since p62 is a known substrate of autolysosomal degradation, it did not affect Tax expression levels, indicating that at the steady-state, Tax is not degraded in autolysosomes. In addition, starvation-induced autophagy activation (Fig. 4c, “HBSS”) only partially decreased Tax levels compared to p62 levels (Fig. 4c, compare lanes 1 and 2 and see quantification), indicating that starvation-induced autophagy does not efficiently degrade Tax. Taken together, these results suggest that at the steady-state, p62 does not recruit Tax into the autophagic degradation pathway. They thus further support the notion that p62 can potentiate Tax-dependent NF- κ B activation.

p62 directly interacts with Tax via the 170-206 region of p62. We next aimed at gaining insight into the mechanism of p62 potentiation of Tax activity on the NF- κ B pathway. To this end, mapping of the interaction domain between p62 and Tax was first undertaken. *In vitro* GST pull-down assays were performed using GST-p62 and *in vitro* translated ³⁵S-labeled Tax. This resulted in Tax detection after GST-p62 pull-down (Fig. 5a, lane 3), indicating that Tax and p62 interact directly. Repeating the experiment with GST-tagged deletion mutants of p62 (Fig. 5b), we further showed that the GST-p62 Δ 170-256 mutant alone was unable to pull down *in vitro* translated Tax, indicating that the 170-256 region of p62 is required for interaction with Tax (Fig. 5c). Using MBP-tagged deletion constructs of p62, we demonstrated that the p62 region 170-221, corresponding to the Multiple protein Interaction Region (MIR), was required for Tax binding (Fig. 5d). In addition, a fragment containing amino acids 170-206 of p62 fused to MBP was sufficient for binding Tax (Fig. 5d). Taken together, these results indicate that Tax interacts directly with p62 via the MIR domain of p62 and more specifically via the 170-206 region.

p62 binding to ubiquitin is required for p62 potentiation of Tax-mediated NF- κ B activation. Following the identification of the domain of p62 required for the interaction with Tax, we hypothesized that a p62 mutant deleted from this domain and thus unable to directly interact with Tax would be unable to potentiate Tax activity on NF- κ B. Surprisingly however, when repeating the functional luciferase assay in Jurkat T cells with ectopic p62 Δ 170-221, we observed that this p62 mutant did not lose its ability to potentiate Tax-mediated NF- κ B activity when compared to full-length (FL) p62 (Fig. 6a), indicating that direct interaction with Tax is dispensable for p62 function on Tax. Because Tax-induced activation of the IKK complex is known to rely on the assembly of a signalosome containing multiple anchored and unanchored ubiquitin chains, and because p62 is known to bind ubiquitin chains via its ubiquitin-associated UBA domain^{44,45}, we investigated whether the potentiation of Tax-mediated NF- κ B activation by p62 required binding of ubiquitin by p62. We thus included the p62 Δ UBA construct in the luciferase assay. This p62 mutant lost its ability to potentiate Tax-mediated NF- κ B activity when compared to the full-length p62 (Fig. 6a), indicating that p62 binding to ubiquitin chains is critical for its ability to enhance Tax-dependent NF- κ B signaling. As a control, we further checked that expression levels of both mutants were similar to full-length p62 (Supplementary Fig. S3).

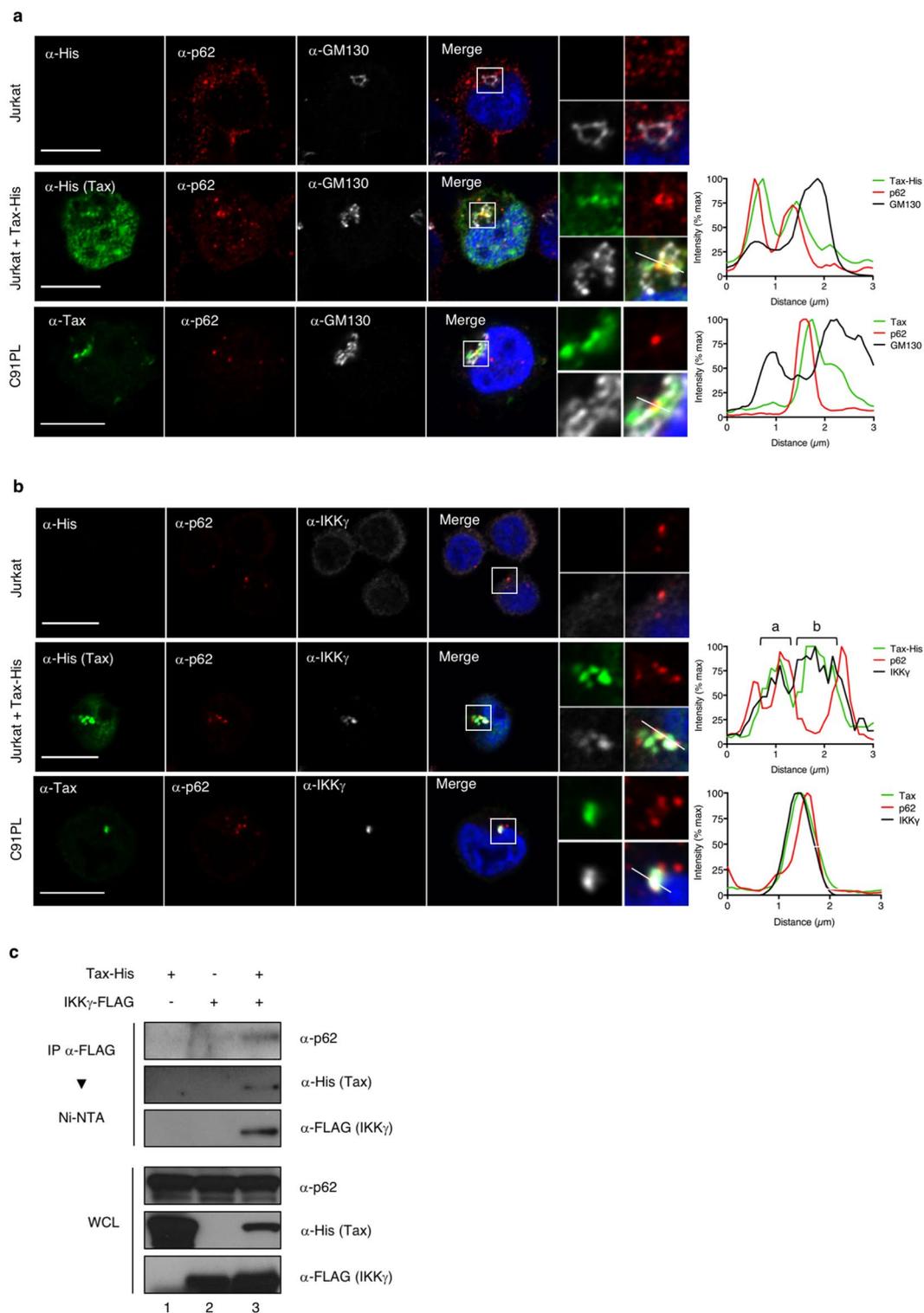


Figure 3. p62 associates with Tax/IKK signalosomes in peri-golgian structures. **(a,b)** Jurkat cells transiently expressing Tax-His and HTLV-1 chronically infected C91PL cells were analyzed by confocal microscopy after staining with His- or Tax- (green), p62- (red), and GM130- **(a)**, white) and IKK γ -specific **(b)**, white) antibodies. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Representative images are shown. Tax, p62, GM130 and IKK γ signals were quantified along the segments represented on the merge panels and plotted on the histogram. Scale bar = 10 μ m. **(c)** Lysates from HeLa cells transiently expressing Tax-His and/or IKK γ -FLAG were submitted to a FLAG-immunoprecipitation followed by a His-specific Ni-NTA purification and western blot analyses. Full-length blots are presented in Supplementary Fig. S4.

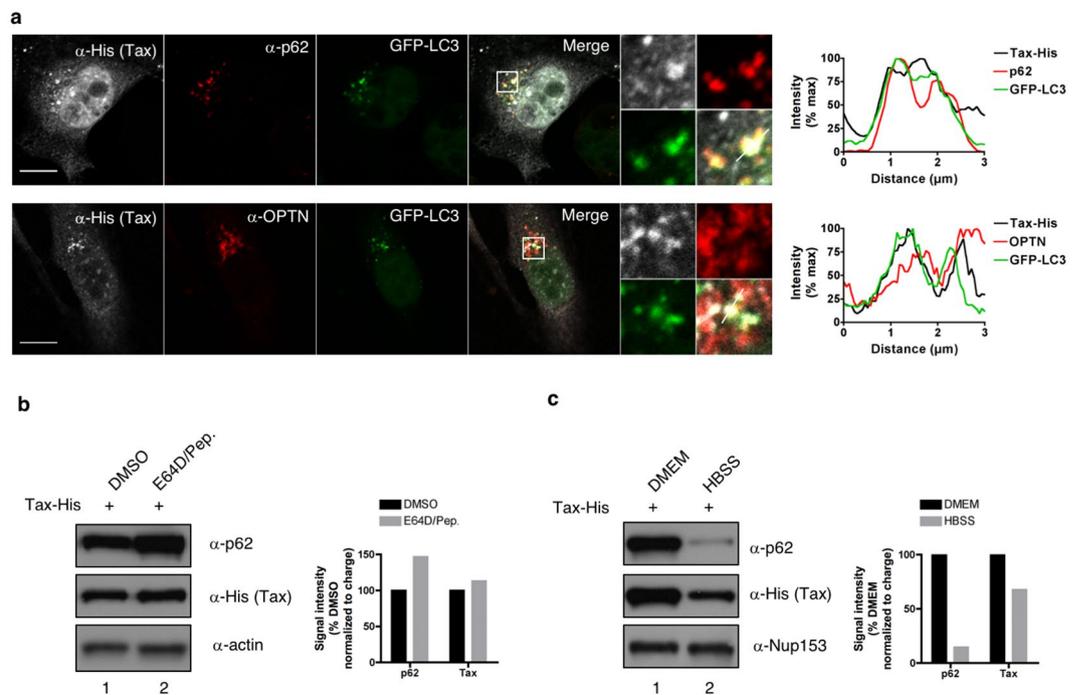


Figure 4. p62 does not allow Tax autophagic degradation at the steady-state. (a) HeLa cells stably expressing GFP-LC3 were transfected with Tax-His and analyzed by confocal microscopy after staining with His- (white) and p62- or OPTN-specific (red) antibodies. Representative images are shown. Tax, p62 or OPTN and GFP-LC3 signals were quantified along the segment represented on the merge panel and plotted on the histogram. Scale bar = 10 μm. (b,c) HeLa cells transiently expressing Tax-His were treated with lysosomal inhibitors (b, E64D/Pep.) or starved (c, HBSS) before lysis, western blot analyses and quantification. Full-length blots are presented in Supplementary Fig. S4. Blots and graphs show results representative of at least 3 experiments.

Because assembly of protein complexes *in vitro* may not reflect the processes occurring in cells, we then asked whether the $\Delta 170-221$ p62 mutant was able to associate with Tax in cells. Co-immunoprecipitation assays were performed using either the full-length or the $\Delta 170-221$ p62 construct. Because p62 is known to polymerize, and in order to avoid rescue of mutant p62 function by polymerization with wild type p62, the experiment was conducted in $p62^{-/-}$ MEF cells (Fig. 6b). Interestingly, only a weak association between p62 $\Delta 170-221$ and Tax was detected (Fig. 6b, compare lanes 4 and 5), indicating that the 170-221 domain of p62 is indeed necessary for an efficient association with Tax in cells, and thus, that p62 potentiating activity might not correlate with its degree of association with Tax. We then asked whether the UBA domain of p62 could be necessary for its interaction with Tax complexes in cells. Indeed, although it is dispensable for interaction with Tax *in vitro* (see Fig. 5c), it could facilitate recruitment of p62 to ubiquitin-rich Tax complexes in specific cell compartments. Co-immunoprecipitation assays were performed using either the full-length or the Δ UBA p62 construct (Fig. 6c). However, and consistent with Fig. 5c, p62 Δ UBA interacted with Tax as efficiently as full-length p62 (Fig. 6c, compare lanes 1 and 4), indicating that p62 binding to ubiquitin is not required for p62 to assemble with Tax complexes.

Tax harbors 10 lysine residues and ubiquitination on lysine 4 to 8 is required for interaction with IKK γ , OPTN and activation of the NF- κ B pathway^{13,14,16-18,26}. To further confirm that p62 interaction with Tax complexes does not rely on p62 binding to Tax-anchored ubiquitin chains, ubiquitination-defective Tax mutants (Tax-K4-8R, mutated on lysine 4 to 8, and Tax-K1-10R, mutated on all 10 lysine residues) were used. Ubiquitination-defective Tax mutants co-immunoprecipitated with endogenous p62 as efficiently as wild type Tax (Supplementary Fig. S3), indicating that Tax ubiquitination is not required for its interaction with p62, which is consistent with the *in vitro* pulldown experiments. In a control experiment, the antisense protein of HTLV-1 (HBZ) did not immunoprecipitate with p62 (Supplementary Fig. S3), indicating that the Tax/p62 interaction is specific in this assay.

We previously showed that OPTN potentiates Tax activity by stabilizing Tax polyubiquitination through the ubiquitin-binding domain of OPTN²⁶. To investigate whether p62 could act in a similar manner, we then compared Tax polyubiquitination in mock- and p62-silenced cells (Fig. 6d). Tax polyubiquitination was unaffected by p62 silencing (Fig. 6d, compare lanes 1 and 2), indicating that in contrast to OPTN²⁶, p62 does not modulate Tax polyubiquitination.

Because the p62 Δ UBA protein associates with Tax complexes but is unable to potentiate Tax activity, we further hypothesized that p62 could potentiate Tax activity by allowing the efficient association of the Tax with IKK γ in a ubiquitin-binding-dependent process. Wild type and $p62^{-/-}$ MEF cells were transiently transfected with FLAG-tagged IKK γ and His-tagged Tax constructs and cell lysates were submitted to anti-FLAG immunoprecipitation (Fig. 6e). Tax and IKK γ interacted equally efficiently in wild type and $p62^{-/-}$ cells (Fig. 6e, compare lanes

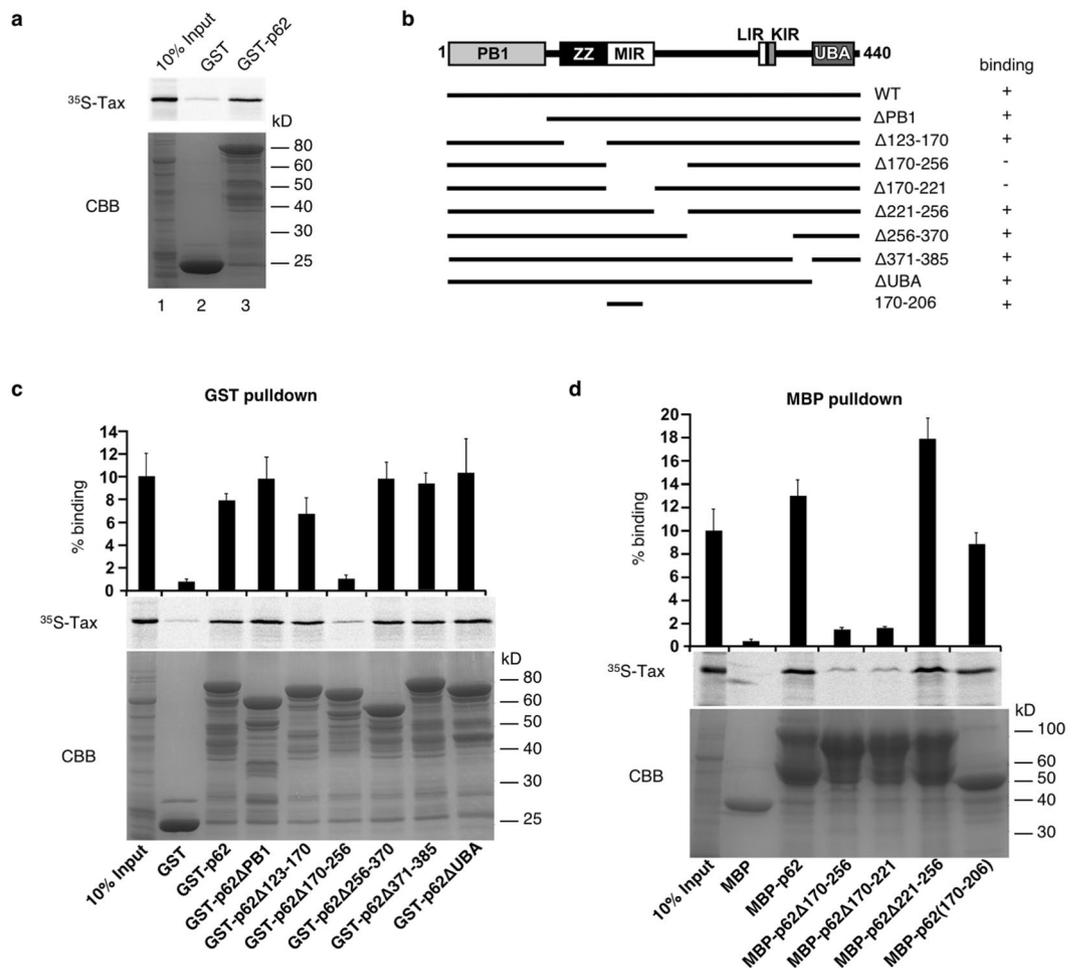


Figure 5. p62 directly interacts with Tax through its 170-206 domain. **(a)** GST and GST-tagged p62 were expressed in bacteria and used for GST pull-down of *in vitro* translated ^{35}S -labeled Tax. Inputs as well as eluates were run on SDS-PAGE gels and autoradiography was performed. **(b)** Domain organization of p62 constructs with different deletion used for GST and MBP pull-down assays. The results of the pull-down assays shown in **(c,d)** indicate Tax binding ability and are indicated on the right. PB1, Phox and Bem1 domain; ZZ, zinc finger domain; MIR, multiple protein interaction region; LIR, LC3-interacting region; KIR, KEAP1 interacting region; UBA, ubiquitin-associated domain. **(c,d)** GST pull-down **(c)** and MBP pull-down assays **(d)** were performed with different p62 constructs. The percentage of input radioactively labeled-Tax bound to p62 was quantified from three independent experiments. CBB, Coomassie brilliant blue-stained SDS-PAGE gel.

1 and 4), indicating that p62 is not required for the association of Tax and $\text{IKK}\gamma$ but is critical for the subsequent activation of the IKK complex.

Taken together, these data support a model in which p62 is recruited to the Tax/IKK complexes in peri-golgian structures, downstream of the association of Tax with $\text{IKK}\gamma$, and participates in the efficient activation of IKK complexes by a mechanism requiring the binding of ubiquitin chains by p62.

Discussion

Since the initial identification of $\text{IKK}\gamma$ as a key target of Tax¹⁰⁻¹², several additional partners required for efficient NF- κB signaling have been characterized by our laboratory and others. These include OPTN and TAX1BP1²⁶. Here, using the BioID proteomic approach, we identified Sequestosome-1 (SQSTM-1/p62) as a novel candidate partner of Tax. The recent description of OPTN and TAX1BP1 as members of the SQSTM-1/p62-like selective autophagy receptor (SLR) family and the well-described involvement of p62 in NF- κB regulation prompted us to hypothesize a hijacking of p62 functions for full signaling efficiency by Tax. Our results indicate that in addition to OPTN and TAX1BP1, p62 is indeed also able to potentiate Tax-induced NF- κB signaling. Of note, while ectopic p62 expression in T cells led to a significant potentiation of Tax activity (see Fig. 2g,h), the consequences of p62 knock-out or knock-down differed among the cell lines tested: the decrease in p62 expression did not hamper Tax activity in T cells (see Supplementary Fig. S2), but led to a significantly lower NF- κB activity in MEF or HEK293T cells (see Fig. 2a-f). These observations indicate that while p62 mechanistically modulates Tax functions in all tested cell lines, the requirement of p62 for full Tax-induced NF- κB signaling may be limited to certain cell types and may not apply to T cells. This would be consistent with the emergent view that NF- κB modulation

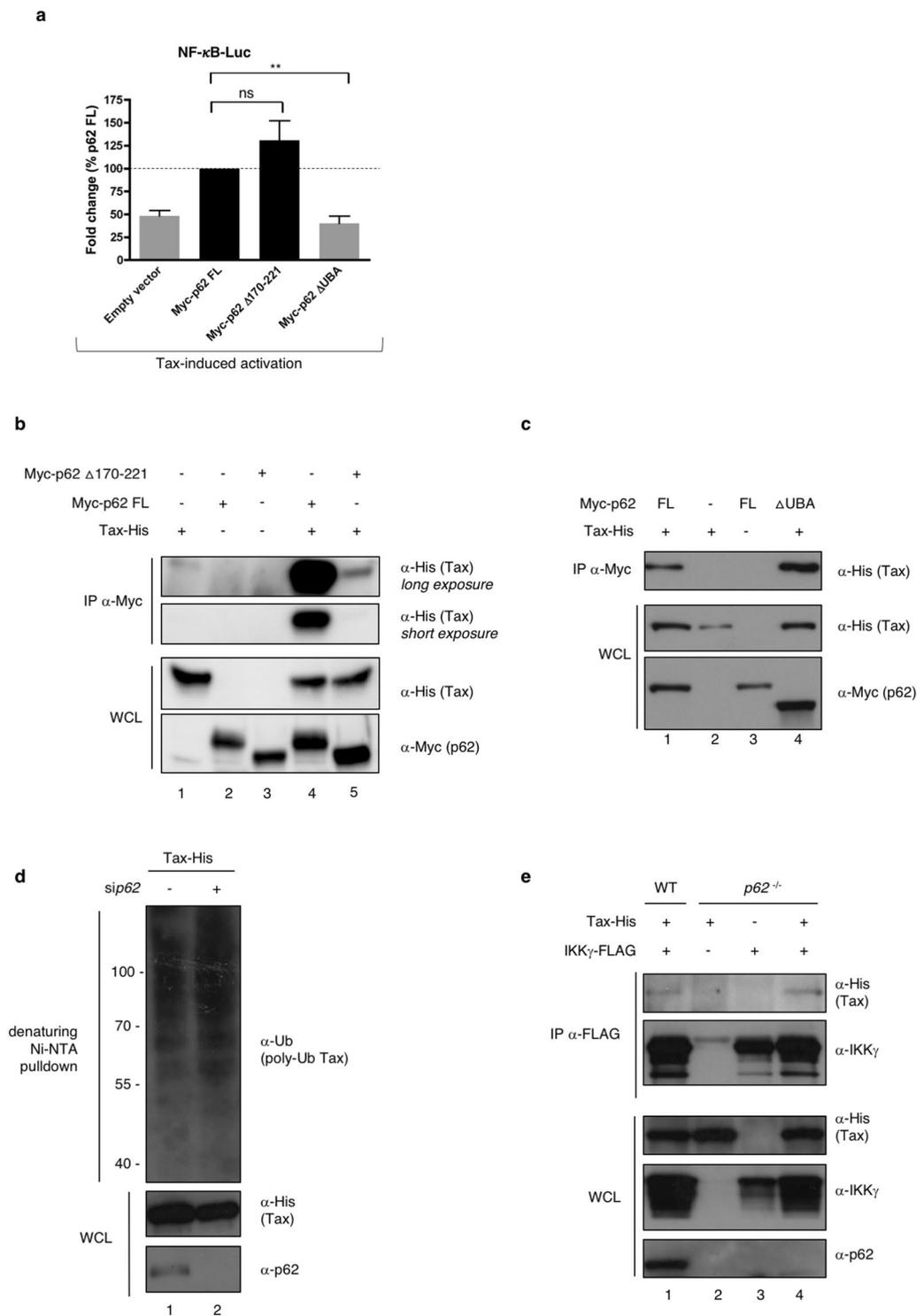


Figure 6. p62 binding to ubiquitin is required for p62 potentiation of Tax-mediated NF- κ B activation. **(a)** Jurkat cells were transfected with full-length Myc-p62 (My-p62 FL) or p62 mutants in which the Tax-interacting region (Myc-p62 Δ 170-221) or the ubiquitin-binding domain (Myc-p62 Δ UBA) were deleted, and an NF- κ B-luc construct, followed by transduction with an empty or Flag-Tax-encoding lentivector. Luciferase activity was measured and normalized to the corresponding Tax-negative condition. Values obtained with full-length ectopic p62 were set to 1 and other values are shown as fold change over the “p62 FL” condition. The graph shows results from 3 independent experiments. **(b)** Lysates from *p62*^{-/-} MEF cells transiently expressing Tax-His and either Myc-tagged full-length p62 (p62FL) or p62 Δ 170-221 were immunoprecipitated with a Myc-specific antibody followed by western blot analyses. **(c)** Lysates from *p62*^{-/-} MEF cells transiently expressing Tax-His and either Myc-tagged full-length p62 (p62FL) or p62 Δ UBA were immunoprecipitated with a Myc-specific antibody followed by western blot analyses. **(d)** HeLa cells were transfected with control (-) or *p62*-specific (+) siRNA and Tax-His. Cell lysates were submitted to a His-specific Ni-NTA pulldown in denaturing

conditions before western blot analyses. (e) Lysates from WT and *p62*^{-/-} MEF cells transiently expressing Tax-His- and FLAG-IKK γ were immunoprecipitated with a FLAG-specific antibody followed by western blot analyses. ***p* < 0.01; ns, *p* > 0.05 (one-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc* test). Full-length blots are presented in Supplementary Fig. S4.

and dynamics may vary in a cell type-specific manner, and in particular may differ between fibroblasts or epithelial cells and immune cells⁴⁶. In T cells, possible additional mechanisms of potentiation (for instance by several members of the SLR family) may hinder the detection of a reduction of Tax activity upon silencing of *p62* alone, in contrast to non-T cells.

Interestingly, Tax interaction with *p62* is independent of Tax ubiquitination, and this is a distinctive feature when compared to Tax interaction with OPTN and TAX1BP1. We show that *p62* associates with the Tax/IKK signalosome and that binding of *p62* to ubiquitin chains is required for *p62* to potentiate Tax activity. However, in contrast to OPTN, *p62* does not modulate Tax polyubiquitination. *p62* is also not required for the efficient assembly of IKK γ with Tax. We therefore propose a model in which *p62* participates in the efficient activation of the IKK complex by Tax by a mechanism requiring the scaffolding of ubiquitin chains, in agreement with the known functions of *p62* in NF- κ B signaling.

Indeed, *p62* is a multi-functional scaffold protein regulating NF- κ B activation downstream of TNFR, IL1R, CD40 and TCR³⁶. Its scaffold properties mainly arise from its ability to bind ubiquitin chains through its C-terminal UBA domain⁴⁷. *p62* shows high affinity for linear M1-linked polyubiquitin chains, and a weaker but significant affinity for K63-linked chains, while the affinity for K48 chains is low⁴⁸. The link between ubiquitin binding by *p62* and NF- κ B signaling was first identified following the analysis of *p62* mutations present in Paget's disease of bone (PDB). This disorder results from defects in osteoclast differentiation and/or activity, which are controlled by the NF- κ B pathway. *p62* mutations in PDB patients are commonly affecting the UBA domain, indicating that ubiquitin binding by *p62* could modulate NF- κ B signaling⁴⁹. The UBA domain of *p62* was further shown to modulate TRAF6 polyubiquitination by influencing TRAF6 E3 ligase activity³⁴.

The domain of *p62* that engages Tax by direct interaction (amino acids 170 to 221) encompasses the MIR (for Multiple Protein Interaction Region) through which several proteins are known to bind *p62*, including the LIM domain protein Ajuba⁵⁰, p38 MAPK⁵¹, a familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS) mutant of superoxide dismutase (SOD1)⁵² and the autophagy adapter ALFY⁵³. Hence, this region functions as an important protein-protein interaction domain. This direct interaction, which does not require Tax ubiquitination, contrasts with Tax/IKK γ and Tax/OPTN interactions for which Tax ubiquitination is essential²⁶. Interestingly, *p62* has been described to interact with other viral proteins independently of their ubiquitination, such as with the capsid protein of Sindbis virus⁵⁴ and with the Tat transactivator of human immunodeficiency virus type 1⁵⁵, leading to the autophagic clearance of these viral proteins. However, and in contrast to our work, these interactions were analyzed in cells and not *in vitro*, so that indirect interactions cannot be excluded in those settings. Hence, Tax is the first direct, ubiquitin-independent viral partner of *p62* to be reported.

To our surprise however, a *p62* mutant in which the Tax-interaction region is deleted, and which thus can no longer directly interact with Tax (see Figs 5 and 6b), is still able to efficiently potentiate Tax activity (see Fig. 6a). Our data thus support a two-step mechanism (Fig. 7): (i) association of Tax with IKK γ in a *p62*-independent process (see Fig. 6e) that initiates the assembly of ubiquitin-rich IKK complexes and (ii) recruitment of *p62* by both direct interaction with Tax and indirect binding to ubiquitin chains, the latter being necessary to enhance Tax signaling. Because Tax induces the synthesis of anchored and unanchored polyubiquitin chains, our data indicate that *p62* could interact with polyubiquitin chains produced upon Tax expression and retain them in close proximity to the IKK signalosome for full activation. *p62*-mediated scaffolding of Tax-induced ubiquitin chains combined with *p62* ability to oligomerize would possibly facilitate the organization of active macromolecular IKK complexes favorable to IKK *trans*-autophosphorylation, and/or the recruitment of the activating kinases of IKK such as MEKK3, which interacts with *p62* through *p62* PB1 domain³⁸, although the requirement of MEKK3 for Tax-induced NF- κ B activation is still under debate²².

In addition, although TRAF6 was initially described as dispensable for Tax-induced NF- κ B activation⁵⁶, Tax has also been demonstrated to interact with TRAF6 and to promote TRAF6 self-ubiquitination in an IKK γ -dependent manner, a process that was proposed to play a role in Tax-induced NF- κ B activation^{57,58}. Whether Tax exploits *p62* ability to increase TRAF6 self-ubiquitination³⁴ for efficient NF- κ B signaling remains to be investigated. In IL-1-induced NF- κ B signaling, *p62* has recently been shown to compete with the de-ubiquitinase YOD1 for the binding to TRAF6⁵⁹. Thus, association of *p62* with the Tax/IKK signalosome could similarly help it to escape negative regulatory mechanisms such as editing of polyubiquitin chains by the A20/Itch complex²⁷ or de-ubiquitination by CYLD or USP20^{58,60,61}, although this needs to be tested.

Our results indicate that while *p65* activity induced by Tax is totally abrogated in *p62*-deficient cells, a residual activity of the synthetic NF- κ B reporter construct (which responds to several members of the NF- κ B family in addition to *p65*) is detected in these cells. This suggests that *p62* may be specifically involved in the activation of the canonical (*i.e.* *p65*-dependent) NF- κ B pathway by Tax, and may not be required for activation of the non-canonical (*i.e.* *p65*-independent) pathway.

Recent work by Paul *et al.* showed that *p62* scaffolds the MALT1-BCL10-TRAF6-IKK signalosome in so-called cytosolic POLKADOTS (punctate and oligomeric killing or activating domains transducing signals) downstream of TCR activation in T cells⁴⁰. These POLKADOTS are associated with autophagic structures involved in the degradation of BCL10 and termination of signaling⁶². In our study, assessment of Tax/*p62* localization in GFP-LC3-expressing cells showed that these complexes may be localized at LC3-positive structures. However, Tax expression levels were unaffected by lysosomal inhibition, indicating that at the steady-state, Tax is not degraded

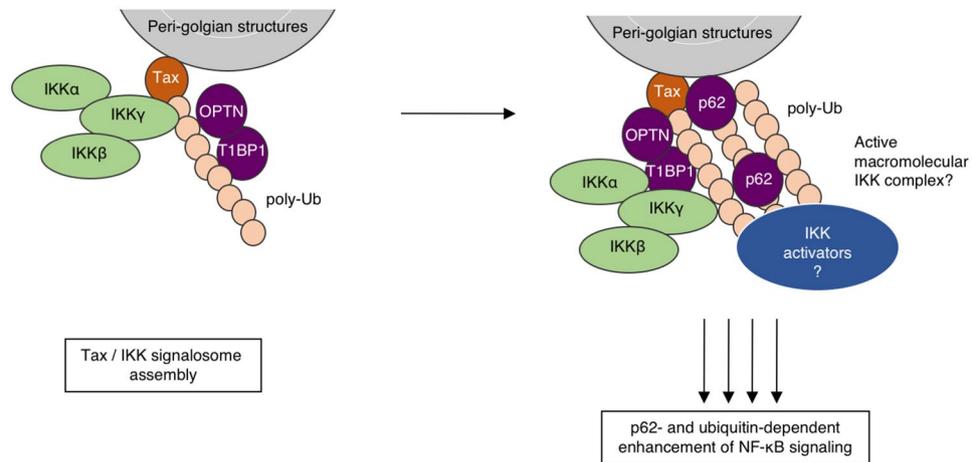


Figure 7. Involvement of ubiquitin binding by p62 in Tax-induced NF- κ B activation: working model. p62 associates with Tax in peri-golgian structures, downstream of the formation of Tax/IKK complexes, and participates in the efficient activation of the IKK complex by a mechanism requiring binding to ubiquitin chains. See text for further details. TAX1BP1: TAX1BP1. Artwork is a derivative of Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>), used under CC BY 3.0 FR (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>), and includes modifications in shapes, colors and disposition of the original material.

by an autophagic pathway. This is in agreement with the fact that Tax has been shown to inhibit autophagic degradation in infected cells through inhibition of the fusion between autophagosomes and lysosomes⁶³. Thus, despite its functions as a selective autophagy receptor, p62 could indeed be a positive modulator of Tax-induced NF- κ B activation.

Taken together, our results identify p62 as a new modulator of Tax activity on NF- κ B and support a ubiquitin-dependent scaffolding role for p62 in this process, further highlighting the importance of ubiquitin in the signaling activity of the viral Tax oncoprotein. Together with the previously published observations that Tax exploits OPTN and TAX1BP1 functions for NF- κ B signaling, these results indicate that Tax might hijack the functions of the Sequestosome-1/p62-like selective autophagy receptor family for its signaling activity.

Methods

Cell culture. HeLa and HEK293T cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). U2OS cells were a kind gift from Dr. Michel Bornens. Wild-type and p62 knockout (p62^{-/-}) MEF cells were kindly provided by Dr. Toru Yanagawa. These cells were grown in high glucose, GlutaMAX Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biosera) and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin, Gibco). Non-infected Jurkat T cells (ATCC) and HTLV-1 chronically infected C8166, HuT102 and C91PL T cells (kind gifts from Dr. Antoine Gessain) were grown in GlutaMAX Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Biosera) and antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin, Gibco). All cells were maintained at 37°C in 5% CO₂. In order to induce autophagy, cells were cultivated in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) for 6 hours.

Constructs and siRNA. pSG5M vectors encoding His-tagged Tax, Tax-K4-8R, Tax-K1-10R have been previously described¹³. The Tax-His coding sequence was amplified by PCR and tagged with BirA* by cloning between *EcoRI* and *HindIII* sites into the Myc-BioID2-MCS vector (Addgene #74223, from Dr Kyle Roux⁴¹). The HBZ-SP1 coding sequence was amplified from the pcDNA3.1-Myc-His vector (a kind gift from Dr. Jean-Michel Mesnard)⁶⁴ and cloned into the pSG5M backbone with a C-terminal His-tag. Flag-Tax-encoding lentivectors have been described previously⁶⁵. Myc-p62 constructs cloned into the pCMV-Myc-Gat backbone were kindly provided by Dr. Anne-Sophie Nicot and Dr. Laurent Schaeffer. Myc-p62FL and Myc-p62 Δ UBA constructs cloned into pcDNA3-Myc backbone were kindly provided by Dr. Jorge Moscat³⁴. The Myc-p62 Δ 170-221 was generated from Myc-p62FL by site-directed mutagenesis (QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent Technologies, #200521) using the following primers: forward primer CCAAGCTCGCATTCGCCAGCCCACGTCCTCC; reverse primer GGAGGACGTGGGCTGGGGAATGCGAGCTTGG. The p62 expression vectors used for GST pulldown, or their ENTR constructs (pDEST15-p62, pDEST15-p62 Δ PB1, pDEST15-p62 Δ 123-170, pDEST15-p62 Δ 170-256, pDEST15-p62 Δ 256-370, pDEST15-p62 Δ 371-385 and pDEST15-p62 Δ UBA), or used for MBP pulldown (pTH1-p62, pTH1-p62 Δ 170-256, pTH1-p62 Δ 170-221, pTH1-p62 Δ 221-256 and pTH1-p62(170-206)) have been described before⁵³. The NF- κ B-luciferase and HTLV-1-LTR-luciferase reporter gene plasmids have been previously described⁶⁶. The FLAG-tagged IKK γ expression vector was used previously⁶⁶.

Non-targeting siRNA and p62-specific siRNA were purchased from Dharmacon (ON-TARGET plus Human SQSTM1) and from Ambion (Silencer Select Human SQSTM1, siRNA ID #s16961 and #s16962, referred to here as sip62 #2 and sip62 #3). OPTN-specific siRNA were from Sigma-Aldrich.

Antibodies and reagents. The following antibodies were used: anti-His (ab9136 or ab18184, Abcam or sc-804, Santa Cruz), anti-Tax1 (Tab172, NIH), anti-p62 (GP62-C, Progen), anti-OPTN (100000, Cayman), anti-GM130 (610823, BD), anti-IKK γ (611306, BD), anti-phosphorylated IKK α/β (2078, Cell Signaling Technology), anti-I κ B α (4814, Cell Signaling Technology), anti-phosphorylated I κ B α (9246, Cell Signaling Technology), anti-FLAG (M2, Sigma-Aldrich), anti-Myc (4A6, Millipore), anti-Ub (P4D1, sc-8017, Santa Cruz), anti-actin (AC-74, Sigma-Aldrich), anti-Nup153 (147050002, Covance). HRP-Streptavidin was from Sigma (RAB-HRP3). For control immunoprecipitation, normal guinea pig IgG (sc-2711, Santa-Cruz) were used. For inhibition of lysosomal degradation, E64D and pepstatin (Sigma) were both used at 10 μ g/mL.

Transient transfections and transduction. HEK293T and HeLa cells were transfected using either Polyfect or Effectene (Qiagen), or with DreamFect Gold (OZ Biosciences). MEF and U2OS cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Life Technologies). For siRNA transfections, the Lipofectamine RNAiMax reagent (Life Technologies) was used, while Lipofectamine 2000 (Life Technologies) was used for siRNA and DNA co-transfection. Jurkat cells, C91PL cells and C8166 cells were transfected using the Neon electroporation system (Thermo Fisher). When indicated, Jurkat cells were transduced using Flag-Tax-expressing lentiviruses, as described previously⁶⁵.

BioID procedure and mass spectrometry analyses. HEK293T cells were transfected with BirA*-encoding vectors for 24 h and treated with biotin (50 μ M, Sigma) for 18 h. BioID streptavidin pull-down was performed on whole cell lysates as described previously⁶⁷ using Dynabead MyOne Streptavidin C1 (ThermoFisher Scientific). After the washing steps, beads were washed twice in 50 mM NH₄HCO₃. Bound proteins were reduced with 200 mM DTT and alkylated with 200 mM Iodoacetamide. Digestion was performed with trypsin enzyme (Promega) at a ratio 1/100 overnight at 37 °C. After desalting on C18 cartridges (Harvard Apparatus), samples were analyzed qualitatively or in a Label Free quantitation strategy using an Ultimate 3000 nano-RSLC (Thermo Scientific, San Jose California) coupled on line with a Q Exactive HF mass spectrometer via a nano-electrospray ionization source (Thermo Scientific, San Jose California). Samples were injected and loaded on a C18 Acclaim PepMap100 trap-column 75 μ m ID x 2 cm, 3 μ m, 100 Å, (Thermo Scientific) for 3.0 minutes at 5 μ L/min with 2% ACN, 0.05% TFA in H₂O and then separated on a C18 Acclaim Pepmap100 nano-column, 50 cm x 75 μ m i.d, 2 μ m, 100 Å (Thermo Scientific) with a 60-minute linear gradient from 3.2% to 40% buffer B (A: 0.1% FA in H₂O, B: 100% ACN, 0.1% FA) and then from 40 to 90% of B in 2 min, hold for 10 min and returned to the initial conditions in 1 min for 14 min. The total duration was set to 90 minutes at a flow rate of 300 nL/min. The oven temperature was kept constant at 40 °C.

Samples were analysed in triplicate with TOP20 HCD method: MS data were acquired in a data-dependent strategy selecting the fragmentation events based on the 20 most abundant precursor ions in the survey scan (350–1600 Th). The resolution of the survey scan was 60,000 at m/z 200 Th and for MS/MS scan the resolution was set to 15,000 at m/z 200 Th. The Ion Target Value for the survey scans in the Orbitrap and the MS/MS scan were set to 3E6 and 1E5 respectively and the maximum injection time was set to 60 ms for MS and MS/MS scan. Parameters for acquiring HCD MS/MS spectra were as follows: collision energy = 27 and an isolation width of 2 m/z. The precursors with unknown charge state, charge state of 1 and 8 or greater than 8 were excluded. Peptides selected for MS/MS acquisition were then placed on an exclusion list for 30 s using the dynamic exclusion mode to limit duplicate spectra.

Data files were then analyzed with Proteome Discover 2.1 or with Proteome Discover 2.2 using the SEQUEST HT algorithm against the Swissprot Human database (2018-09 release, 20332 sequences), complemented with the Uniprot HTLV sequences (2018-09 release, 3298 sequences) and the BirA and streptavidin sequences. Precursor mass tolerance was set at 10 ppm and fragment mass tolerance was set at 0.02 Da, and up to 2 missed cleavages were allowed. Oxidation (M), acetylation (Protein N-terminus) were set as variable modification, and Carbamidomethylation (C) as fixed modification. Peptides and proteins were filtered with a false discovery rate (FDR) at 1% using percolator. For qualitative analysis, proteins specifically identified in the BirA*-Tax-transfected cells and not in the BirA*-transfected control cells were considered. For quantitative analysis, protein quantification was done by the Label Free Quantification (LFQ) approach, and LFQ abundance values were obtained for each sample, normalized to the total peptide amount. The abundance ratio [BirA*-Tax/BirA*] was calculated as well as the adjusted p-value. The numbers presented in Fig. 1e include the SEQUEST HT score. The highest this score is, the better the protein is identified.

Immunofluorescence microscopy. Cells were fixed in 10% formalin solution (HT5011, Sigma-Aldrich) or ice-cold methanol (for Fig. 1b), washed and permeabilized in PBS containing 0.5% Triton X-100. After saturation in PBS containing 0.2% Tween (PBS-T) and 5% milk, cells were incubated with primary antibodies for 1 h at room temperature. After three washes in PBS-T, cells were incubated with Dylight 488 anti-mouse IgG (DI-2488, Vector), Dylight 488 anti-rabbit IgG (ab98488, Abcam), Dylight 549 anti-mouse IgG (DI-2549, Vector), AlexaFluor 647 anti-mouse (715-605-150, Jackson), Alexa Fluor 555 anti-guinea pig IgG (ab150186, Abcam) or AlexaFluor 647 Streptavidin (S21374, ThermoFisher Scientific) for 1 h at room temperature. After three washes in PBS-T, coverslips were then mounted on glass slides in Fluoromount-G medium containing DAPI (0100-20, Southern Biotech).

GFP-LC3 HeLa cells were plated in 6-well plates and transfected using DreamFect Gold (OZ Biosciences). Twenty-four hours after transfection, cells were transferred onto glass coverslips. The next day, cells were fixed in 2% paraformaldehyde, washed and permeabilized using Triton X100. After saturation in PBS supplemented with 1% BSA, coverslips were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies diluted in saturation buffer. After washing, coverslips were incubated for 45 min at 4 °C with secondary antibodies diluted in saturation buffer. Coverslips were then mounted onto glass slides using Dako Fluorescence mounting medium.

Samples were examined under a Leica spectral SP5 confocal microscope equipped with a 63x 1.4–0.6 oil-immersion objective using the LAS-AF software, or under a Zeiss LSM800 confocal microscope equipped with a 63x 1.4 oil immersion objective using the ZEN software. For Fig. 1b, samples were observed under an AxioImager.Z1 microscope (Zeiss) equipped with a 63x/1.4 Plan Apochromat oil-immersion objective using the Metamorph software. Images were processed with ImageJ⁶⁸.

Reporter gene assays. HEK293T and Jurkat cells were transfected with the NF- κ B-luciferase or HTLV-1-LTR-luciferase reporter vectors together with the indicated plasmids or siRNA. A *Renilla* luciferase reporter vector (phRG-TK, Promega) was used as an internal control to normalize for transfection efficiency. Cells were harvested 24 h after transfection and assayed for luciferase activity using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega), according to the manufacturer's instructions, and a Mithras multimode plaque reader luminometer (Berthold).

NF- κ B (p65) transcription factor ELISA assay. After transfection, cells were fractionated using the following buffers: buffer A for cytoplasm extraction (0.2% Igepal-630, 10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 100 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, supplemented with protease inhibitors [Complete, Roche]) and buffer B for nuclear extraction (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 400 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Igepal-630, 0.2% SDS, 1 mM DTT, 100 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, supplemented with protease inhibitors). Protein quantification was performed using the detergent-compatible Bradford assay kit (Pierce, #23246). Active p65 was quantified from 2 μ g of WT and p62^{-/-} MEF cell nuclear extracts using the Cayman Chemical assay kit (#10007889), following the supplier's instructions.

Western blot analyses, immunoprecipitation, Ni-NTA purification and GST and MBP pulldown assays. For western blots, cells were lysed for 20 min on ice in the following buffer: 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.25% sodium deoxycholate, complemented with protease inhibitors (Complete, Roche) and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). After centrifugation and protein concentration determination (Bradford, Biorad), proteins were analyzed by SDS-PAGE. Alternatively, for Fig. 2h, cells were lysed in Laemmli buffer before SDS-PAGE analysis.

For immunoprecipitation, cells were lysed for 20 min on ice in the following buffer: 50 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% NP40, complemented with protease inhibitors (Complete, Roche) as well as the phosphatase inhibitors NaF (100 mM) and Na₃VO₄ (2 mM), and then scraped from Petri dishes. Cell lysates were passed through 26G^{1/2} needles, centrifuged, and protein concentration was quantified using the Bradford method (Biorad). Equal quantities of proteins were immunoprecipitated overnight at 4 °C with anti-p62, anti-Myc antibodies or normal guinea pig IgG and *Staphylococcus aureus* Protein G sepharose beads (GE Healthcare). After three washes in lysis buffer, proteins were eluted and analyzed by SDS-PAGE.

For anti-FLAG immunoprecipitation followed by His purification, cell lysates were incubated with an anti-FLAG M2 affinity gel (A2220, Sigma-Aldrich). After three washes in lysis buffer, bound proteins were eluted with 3X FLAG peptide (F4799, Sigma-Aldrich). His-specific purification was then performed using His-select HF agarose beads (H0537, Sigma-Aldrich). After three washes in lysis buffer, proteins were eluted and analyzed by SDS-PAGE.

For ubiquitination assay, denaturing Ni-NTA pulldown was performed as described previously¹⁵.

For GST and MBP pulldown assays, GST and GST-tagged proteins were expressed in *E. coli* soluBL21 (Amsbio) and immobilized on glutathione-coupled Sepharose beads (Glutathione-Sepharose 4 Fast Flow; GE Healthcare). MBP and MBP-tagged proteins were expressed in *E. coli* BL21(DE3) (Amsbio) and immobilized on amylose resin (New England Biolabs). Pulldown assays with *in vitro* translated [³⁵S]-labeled proteins (here HTLV-1 Tax) were performed as described previously⁴².

For SDS-PAGE analysis, proteins were separated on 10% or 12% Bis-Tris gels or on 10% or 12% TGX stain-free gels (Criterion, Biorad) and transferred onto PVDF membranes (Immobilon P, Millipore). After incubation in TBS-Tween (Sigma-Aldrich) containing 5% milk, membranes were incubated in primary antibodies. Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (NA9310, GE Healthcare or #32430, Thermo Fisher), anti-rabbit IgG (NA9340, GE Healthcare or #32460, Thermo Fisher), and anti-guinea pig Ig (P0141, Dako) were used as secondary antibodies, before revelation with ECL Prime (Amersham), ECL Select (Amersham) or SuperSignal West Femto (Thermo Fisher) substrates. Signals were quantified using the ImageJ software⁶⁸.

RT-PCR assay. Total RNAs were obtained by Trizol extraction. After treatment with DNase (DNA-free™ DNA Removal Kit, Invitrogen), 500 ng of total RNA were converted to cDNA using the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific), following the supplier's instructions with OligodT primers. A volume of 2 μ l of cDNA was then used in a PCR reaction (25 μ l reaction volume) containing 1X PCR buffer (Invitrogen), 0.4 μ M of forward and reverse primers, 0.2 mM dNTP mix, 1.5 mM MgCl₂, and 0.5 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). The *gapdh* primers from the RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit were used to amplify *gapdh* cDNAs (496 bp). The following primer pair was used to amplify *Il6* cDNAs (460 bp): forward 5'-GACTTCACAGAGGATACCCTC and reverse 5'-GTCCTTAGCCACTCCTCTG. PCR products were visualized after agarose gel electrophoresis. Signals were quantified using the Image Lab software (Biorad).

Flow cytometry. To estimate the transduction efficiency with the GFP-encoding lentivector, cells were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde and analyzed on a MACSQuant cytometer (Miltenyi). Analyses were performed under the FlowJo software.

Statistical analyses. Data are presented as mean \pm SEM. One-way ANOVA with Bonferroni *post-hoc* test was used to compare means (GraphPad Prism). Differences between means were considered significant when the *p*-value was less than 0.05. ****p* < 0.001; ***p* < 0.01; **p* < 0.05; ns, *p* > 0.05.

Data availability

The datasets generated during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 18 May 2019; Accepted: 15 October 2019;

Published online: 05 November 2019

References

- Poiesz, B. J. *et al.* Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *PNAS* **77**, 7415–9 (1980).
- Yoshida, M., Miyoshi, I. & Hinuma, Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *PNAS* **79**, 2031–2035 (1982).
- Gessain, A. & Cassar, O. Epidemiological aspects and world distribution of HTLV-1 infection. *Front. Microbiol.* **3**, 388 (2012).
- Willems, L. *et al.* Reducing the global burden of HTLV-1 infection: An agenda for research and action. *Antiviral Res.* **137**, 41–48 (2017).
- Satou, Y. & Matsuoka, M. Virological and immunological mechanisms in the pathogenesis of human T-cell leukemia virus type 1. *Rev. Med. Virol.* **23**, 269–280 (2013).
- Dewan, M. Z. *et al.* Rapid Tumor Formation of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Infected Cell Lines in Novel NOD-SCID/gammaCnull Mice: Suppression by an Inhibitor against NF- κ B. *J. Virol.* **77**, 5286–5294 (2003).
- Mori, N. *et al.* Constitutive Activation of NF- κ B in Primary Adult T-Cell Leukemia Cells. *Blood* **93**, 2360–2368 (1999).
- Kfoury, Y. *et al.* The multifaceted oncoprotein Tax: subcellular localization, posttranslational modifications, and NF- κ B activation. *Adv Cancer Res* **113**, 85–120 (2012).
- Chen, J. & Chen, Z. J. Regulation of NF- κ B by ubiquitination. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 4–12 (2013).
- Yamaoka, S. *et al.* Complementation Cloning of NEMO, a Component of the I κ B Kinase Complex Essential for NF- κ B Activation. *Cell* **93**, 1231–1240 (1998).
- Chu, Z. L., Shin, Ya, Yang, J. M., DiDonato, Ja & Ballard, D. W. IKKgamma mediates the interaction of cellular I κ B kinases with the tax transforming protein of human T cell leukemia virus type 1. *J. Biol. Chem.* **274**, 15297–15300 (1999).
- Harhaj, E. W. & Sun, S. C. IKKgamma serves as a docking subunit of the I κ B kinase (IKK) and mediates interaction of IKK with the human T-cell leukemia virus tax protein. *J. Biol. Chem.* **274**, 22911–22914 (1999).
- Chiari, E., Lamsoul, I., Lodewick, J., Bex, F. & Pique, C. Stable Ubiquitination of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Is Required for Proteasome Binding. *J. Virol.* **78**, 11823–11832 (2004).
- Harhaj, N. S., Sun, S. & Harhaj, E. W. Activation of NF- κ B by the Human T Cell Leukemia Virus Type I Tax Oncoprotein Is Associated with Ubiquitin-dependent Relocalization of I κ B Kinase. *J. Biol. Chem.* **282**, 4185–4192 (2007).
- Journo, C. *et al.* Human T cell leukemia virus type 2 tax-mediated NF- κ B activation involves a mechanism independent of Tax conjugation to ubiquitin and SUMO. *J. Virol.* **87**, 1123–36 (2013).
- Kfoury, Y. *et al.* Ubiquitylated Tax targets and binds the IKK signalosome at the centrosome. *Oncogene* **27**, 1665–1676 (2008).
- Lamsoul, I. *et al.* Exclusive Ubiquitination and Sumoylation on Overlapping Lysine Residues Mediate NF- κ B Activation by the Human T-Cell Leukemia Virus Tax Oncoprotein. *Mol. Cell Biol.* **25**, 10391–10406 (2005).
- Nasr, R. *et al.* Tax ubiquitylation and sumoylation control critical cytoplasmic and nuclear steps of NF- κ B activation. *Blood* **107**, 4021–9 (2006).
- Shembade, N., Harhaj, N. S., Yamamoto, M., Akira, S. & Harhaj, E. W. The human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein requires the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 for NF- κ B activation. *J. Virol.* **81**, 13735–42 (2007).
- Lavorgna, A. & Harhaj, E. W. Regulation of HTLV-1 tax stability, cellular trafficking and NF- κ B activation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Viruses* **6**, 3925–3943 (2014).
- Ho, Y. K. *et al.* HTLV-1 Tax Stimulates Ubiquitin E3 Ligase, Ring Finger Protein 8, to Assemble Lysine 63-Linked Polyubiquitin Chains for TAK1 and IKK Activation. *PLoS Pathog.* **11**, e1005102 (2015).
- Shibata, Y. *et al.* HTLV-1 Tax Induces Formation of the Active Macromolecular IKK Complex by Generating Lys63- and Met1-Linked Hybrid Polyubiquitin Chains. *PLOS Pathog.* **13**, e1006162 (2017).
- Wang, C. *et al.* HTLV-1 Tax Functions as a Ubiquitin E3 Ligase for Direct IKK Activation via Synthesis of Mixed-Linkage Polyubiquitin Chains. *PLoS Pathog.* **12**, 1–25 (2016).
- Huang, J., Ren, T., Guan, H., Jiang, Y. & Cheng, H. HTLV-1 tax is a critical lipid raft modulator that hijacks I κ B kinases to the microdomains for persistent activation of NF- κ B. *J. Biol. Chem.* **284**, 6208–6217 (2009).
- Pujari, R. *et al.* Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) Tax Requires CADM1/TSLC1 for Inactivation of the NF- κ B Inhibitor A20 and Constitutive NF- κ B Signaling. *PLoS Pathog.* **11**, 1–27 (2015).
- Journo, C. *et al.* NRP/Optineurin Cooperates with TAX1BP1 to potentiate the activation of NF- κ B by human T-lymphotropic virus type 1 tax protein. *PLoS Pathog.* **5**, e1000521 (2009).
- Shembade, N., Pujari, R., Harhaj, N. S., Abbott, D. W. & Harhaj, E. W. The kinase IKK α inhibits activation of the transcription factor NF- κ B by phosphorylating the regulatory molecule TAX1BP1. *Nat. Immunol.* **12**, 834–843 (2011).
- Tumbarello, Da *et al.* Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome. *Nat. Cell Biol.* **14**, 1024–1035 (2012).
- Wild, P. *et al.* Phosphorylation of the Autophagy Receptor Optineurin Restricts Salmonella. *Science* **333**, 228–233 (2011).
- Petkova, D. S. *et al.* Distinct Contributions of Autophagy Receptors in Measles Virus Replication. *Viruses* **9**, 123 (2017).
- Deretic, V. Autophagy as an innate immunity paradigm: Expanding the scope and repertoire of pattern recognition receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **24**, 21–31 (2012).
- Svenning, S. & Johansen, T. Selective autophagy. *Essays Biochem.* **55**, 79–92 (2013).
- Sanz, L., Diaz-Meco, M. T., Nakano, H. & Moscat, J. The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF- κ B activation by the IL-1-TRAF6 pathway. *EMBO J.* **19**, 1576–86 (2000).
- Wooten, M. W. *et al.* The p62 scaffold regulates nerve growth factor-induced NF- κ B activation by influencing TRAF6 polyubiquitination. *J. Biol. Chem.* **280**, 35625–35629 (2005).
- Zotti, T. *et al.* TRAF6-mediated ubiquitination of NEMO requires p62/sequestosome-1. *Mol. Immunol.* **58**, 27–31 (2014).
- Moscat, J., Diaz-Meco, M. T. & Wooten, M. W. Signal integration and diversification through the p62 scaffold protein. *Trends Biochem. Sci.* **32**, 95–100 (2007).
- Faure, M. & Lafont, F. Pathogen-induced autophagy signaling in innate immunity. *J. Innate Immun.* **5**, 456–470 (2013).
- Nakamura, K., Kimple, A. J., Siderovski, D. P. & Johnson, G. L. PB1 domain interaction of p62/sequestosome 1 and MEK3 regulates NF- κ B activation. *J. Biol. Chem.* **285**, 2077–2089 (2010).

39. Seibold, K. & Ehrenschrwender, M. p62 regulates CD40-mediated NF- κ B activation in macrophages through interaction with TRAF6. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **464**, 330–335 (2015).
40. Paul, S. *et al.* T Cell Receptor Signals to NF- κ B Are Transmitted by a Cytosolic p62-Bcl10-Malt1-IKK Signalosome. *Sci. Signal.* **7**, ra45 (2014).
41. Kim, D. I. *et al.* An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. *Mol. Biol. Cell* **27**, 1188–1196 (2016).
42. Pankiv, S. *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* **282**, 24131–24145 (2007).
43. Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **12**, 1–222 (2015).
44. Bjørkøy, G. *et al.* p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* **171**, 603–614 (2005).
45. Khaminets, A., Behl, C. & Dikic, I. Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends Cell Biol.* **26**, 6–16 (2016).
46. Dorrington, M. G. & Fraser, I. D. C. NF- κ B Signaling in Macrophages: Dynamics, Crosstalk, and Signal Integration. *Front. Immunol.* **10**, 705 (2019).
47. Vadlamudi, R. K., Joung, I., Strominger, J. L. & Shin, J. p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **271**, 20235–20237 (1996).
48. Wurzer, B. *et al.* Oligomerization of p62 allows for selection of ubiquitinated cargo and isolation membrane during selective autophagy. *eLife* **4**, e08941 (2015).
49. Laurin, N., Brown, J. P., Morissette, J. & Raymond, V. Recurrent Mutation of the Gene Encoding sequestosome 1 (SQSTM1/p62) in Paget Disease of Bone. *Am. J. Hum. Genet.* **70**, 1582–1588 (2002).
50. Feng, Y. & Longmore, G. D. The LIM Protein Ajuba Influences Interleukin-1-Induced NF- κ B Activation by Affecting the Assembly and Activity of the Protein Kinase C/p62/TRAF6 Signaling Complex. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 4010–4022 (2005).
51. Kawai, K., Saito, A., Sudo, T. & Osada, H. Specific regulation of cytokine-dependent p38 MAP kinase activation by p62/SQSTM1. *J. Biochem. (Tokyo)* **143**, 765–772 (2008).
52. Gal, J. *et al.* Sequestosome 1/p62 links familial ALS mutant SOD1 to LC3 via an ubiquitin-independent mechanism. *J. Neurochem.* **111**, 1062–1073 (2009).
53. Clausen, T. H. *et al.* p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and their degradation by autophagy. *Autophagy* **6**, 330–344 (2010).
54. Orvedahl, A. *et al.* Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system. *Cell Host Microbe* **7**, 115–27 (2010).
55. Sagnier, S. *et al.* Autophagy restricts HIV-1 infection by selectively degrading Tat in CD4+ T lymphocytes. *J. Virol.* **89**, 615–25 (2015).
56. Gelezianas, R. *et al.* Human T-cell leukemia virus type 1 Tax induction of NF- κ B involves activation of the IkappaB kinase alpha (IKKalpha) and IKKbeta cellular kinases. *Mol Cell Biol* **18**, 5157–5165 (1998).
57. Choi, Y. B. & Harhaj, E. W. HTLV-1 Tax Stabilizes MCL-1 via TRAF6-Dependent K63-Linked Polyubiquitination to Promote Cell Survival and Transformation. *PLoS Pathog.* **10**, e1004458 (2014).
58. Yasunaga, J., Lin, F. C., Lu, X. & Jeang, K. T. Ubiquitin-specific peptidase 20 targets TRAF6 and human T cell leukemia virus type 1 tax to negatively regulate NF- κ B signaling. *J. Virol.* **85**, 6212–6219 (2011).
59. Schimmack, G. *et al.* YOD1/TRAF6 association balances p62-dependent IL-1 signaling to NF- κ B. *eLife* **6** (2017).
60. Kovalenko, A. & Chable-Bessia, C. The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF κ B signalling by deubiquitination. *Nature* **424**, 801–805 (2003).
61. Trompouki, E. *et al.* CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF- κ B activation by TNFR family members. *Nature* **107**, 793–796 (2003).
62. Paul, S., Kashyap, A. K., Jia, W., He, Y. W. & Schaefer, B. C. Selective Autophagy of the Adaptor Protein Bcl10 Modulates T Cell Receptor Activation of NF- κ B. *Immunity* **36**, 947–958 (2012).
63. Tang, S. W., Chen, C. Y., Klase, Z., Zane, L. & Jeang, K. T. The Cellular Autophagy Pathway Modulates Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Replication. *J. Virol.* **87**, 1699–1707 (2013).
64. Thebault, S., Basbous, J., Hivin, P., Devaux, C. & Mesnard, J. M. HBZ interacts with JunD and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett* **562**, 165–70 (2004).
65. Chevalier, S. A. *et al.* The transcription profile of Tax-3 is more similar to Tax-1 than Tax-2: insights into HTLV-3 potential leukemogenic properties. *PLoS One* **7**, e41003 (2012).
66. Meertens, L., Chevalier, S., Weil, R., Gessain, A. & Mahieux, R. A 10-amino acid domain within human T-cell leukemia virus type 1 and type 2 tax protein sequences is responsible for their divergent subcellular distribution. *J. Biol. Chem.* **279**, 43307–20 (2004).
67. Firat-Karalar, E. N. & Stearns, T. Probing mammalian centrosome structure using BioID proximity-dependent biotinylation. *In Methods in Cell Biology* **129**, 153–170 (Elsevier, 2015).
68. Abramoff, M. D., Magalhães, P. J. & Ram, S. J. Image processing with imageJ. *Biophotonics Int.* **11**, 36–41 (2004).

Acknowledgements

We would like to thank Dr. M. Bornens, Dr. J.-M. Mesnard, Dr. A.-S. Nicot, Pr. L. Schaeffer, Dr. J. Moscat, Dr. T. Yanagawa, Dr. A. Gessain, Dr. V. Mocquet and Dr B. Horvat for their kindly gifts of plasmids, cells, reagents and technical advice. We thank the Retroviral Oncogenesis team, as well as Dr. P.V. Afonso, Dr. B. Py, Dr H. Gruffat and Dr. M. Tommasino for helpful discussion. We acknowledge the financial support from ITMO Cancer AVIESAN (Alliance Nationale pour les Sciences de la Vie et de la Santé, National Alliance for Life Sciences and Health) within the framework of the cancer plan, for the Orbitrap mass spectrometer funding. This work has benefited from the facilities and expertise of the Protein Science Facility (Adeline Page and Frédéric Delolme) of the SFR Biosciences Lyon (UMS3444/CNRS, US8/Inserm, ENS de Lyon, UCBL). We also thank the PLATIM microscopy facility of the SFR Biosciences Lyon (UMS3444/CNRS, US8/Inserm, ENS de Lyon, UCBL) for its help with image acquisition and analysis. We thank Layla Roesler for English proofreading. This work was supported by the “Ligue Nationale contre le Cancer, équipe labellisée” program to RM (grant number EL-2013 Mahieux), by the “Association de Recherche contre le Cancer” foundation to CJ (grant number PJA 20141202070), by the “Fondation pour la Recherche Médicale, équipe labellisée” program to RM (grant number DEQ. 20180339200), by an INSERM U1111 intramural grant to CJ, by the “Ligue Nationale contre le Cancer, comité du Rhône, Projet Pluri-Equipes” program to CJ and by the Research Council of Norway (grant number 249884) to T.J. AS, RM and CJ are funded by the ENS de Lyon.

Author contributions

A.S., C.J., R.M., M.F. and T.J. designed the experiments. A.S., E.T., L.D., F.L., P.V., Y.P.A., J.G., M.N. and F.M.C.U. performed the experiments. A.S., E.T., P.V., Y.P.A., M.F., T.J., H.D., R.M. and C.J. analyzed the data, and A.S. and C.J. wrote the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52408-x>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.J.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

L'actualité virologique sous l'œil critique des étudiants de Master 2

Recent virological literature under scrutiny by master students

Renaud Mahieux
renaud.mahieux@ens-lyon.fr

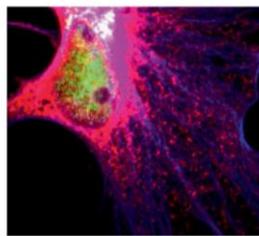


► Pour la seconde année, les étudiants du Master 2 « Génétique et Biologie de la cellule », parcours infectiologie fondamentale, de l'Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, ont analysé avec leurs enseignants, puis synthétisé sous forme de Brèves, cinq articles récents de virologie apportant des données originales et nouvelles sur différentes étapes du cycle viral : l'un illustre comment le virus de la dengue utilise des chaperonnes cellulaires pour sa réplication, le second démontre que des séquences non traduites des ARN viraux du virus *bluetongue* sont nécessaires à son assemblage, les conclusions du troisième prouvent que l'infectivité des particules du virus de l'hépatite C est liée à la présence de l'apolipoprotéine e (apoE), le quatrième conclut sur le fait que le bornavirus module sa propre réplication dans les neurones en manipulant l'acétylation des histones, enfin, le dernier dévoile comment les virus multipartites utilisent à leur profit le système vasculaire des plantes pour disséminer leurs ARN viraux lors d'une infection multicellulaire. Une actualité virologique riche et variée, sélectionnée par de jeunes chercheurs enthousiastes ! ◀
renaud.mahieux@ens-lyon.fr

Protéines chaperonnes et cycle viral du DENV : une nouvelle cible thérapeutique ?

Chaperone protein and dengue virus cycle: a new therapeutic target?

► Les protéines de la famille des Hsp70 (*heat shock protein of 70 kDa*) sont de petites chaperonnes ATP-dépendantes permettant la bonne conformation spatiale des protéines cellulaires mal repliées. Ces Hsp70 fonctionnent de concert avec leurs cofacteurs, les DNAJ, dont la distribution différentielle dans la cellule permet d'apporter une spécificité spatiale à leur activité. Certains virus sont capables de tirer profit de ce processus lors de leur réplication [1, 2], en particulier les virus à ARN en raison de la faible taille de leur génome. En effet, ces virus exploitent la machinerie cellulaire afin de mener à bien leur cycle viral, ce qui les amène à entretenir un contact étroit avec une multitude de facteurs cellulaires tels que les Hsp70. De récents travaux ont pu mettre en évidence la dépendance des protéines virales vis-à-vis de ces chaperonnes : ces dernières faciliteraient la réplication, et expliqueraient la vulnérabilité des virus à leur inhibition pharmacologique ; il en est ainsi des inhibiteurs de l'activité des Hsp70 vis-à-vis de certains *Herpes virus* [3]. Dans une



© Inserm - Kathleen Zylbersztejn

étude récemment publiée dans *Cell*, Taguwa *et al.* ont également démontré que le virus de la dengue (DENV) [4], un *Flavivirus*, est capable de détourner ce réseau de Hsp70/DNAJ lors de plusieurs étapes importantes du cycle viral, telles que l'entrée dans la cellule, la réplication du matériel génétique ou encore la biogenèse des virions. Le rôle essentiel de ce mécanisme, en particulier dans le maintien de la stabilité de la protéine de la capsid et de la polymérase NS5, confirme la propension du DENV à utiliser la machinerie cellulaire afin de contrôler efficacement l'homéostasie de ses propres protéines. En conséquence, l'utilisation du JG40, un inhibiteur allostérique empêchant la liaison des Hsp70 aux DNAJ, provoque une inhibition importante du cycle viral, et ce sans entraîner l'apparition de résistances ou d'effets toxiques sur les cellules de l'hôte. L'ensemble de ces résultats met en lumière la dépendance vis-à-vis de la chaperonne dans la relation qu'entretient le DENV



avec la cellule qu'il infecte, en utilisant la diversité des Hsp70 et DNAJ afin d'orchestrer efficacement chaque étape du cycle viral. De leurs travaux, les auteurs concluent que cibler la protéostasie virale, permettant un équilibre entre synthèse et dégradation des protéines via une balance protéasome et protéines chaperonnes, pourrait alors grandement améliorer le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. ♦

RÉFÉRENCES

1. Bozzacco L, et al. *J Virol* 2016 ; 90 : 3212-28.
2. Zhang C, et al. *Virology* 2015 ; 482 : 9-18.
3. Baquero-Pérez B, Whitehouse A. *Plos Pathog* 2015 ; 11 : e1005274.
4. Taguwa S, et al. *Cell* 2015 ; 163 : 1108-23.

Élodie Teruel¹, Anne-Sophie Godeux¹, Renaud Mahieux^{2,3}

¹ Master génétique et biologie de la cellule, parcours infectiologie fondamentale, Université Claude Bernard Lyon 1, Université de Lyon, France ;

² Centre de recherche en infectiologie, équipe oncogenèse rétrovirale, Inserm U1111 – Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École normale supérieure de Lyon, Université Lyon, France ;

³ Équipe labellisée Ligue nationale contre le cancer



Quand le cytosquelette d'actine fait le jeu des rétrovirus

Élodie Teruel*, Gerges Rizkallah*, Chloé Journo**, Hélène Dutartre**

Le rétrovirus HTLV-1, un modèle de choix pour étudier le rôle du cytosquelette dans la transmission virale

Les virus, « parasites » intracellulaires obligatoires, exploitent diverses stratégies pour se propager au sein de l'hôte qu'ils infectent. Les particules virales peuvent être libérées dans le milieu extracellulaire ou profiter des contacts entre cellules pour se propager directement, de cellule à cellule, en évitant l'environnement cellulaire. Ces contacts peuvent prendre la forme d'extensions (comme les filopodes ou les nanotubes) ou reposer sur une zone de contact étendue appelée « synapse virologique » (SV). La formation de cette synapse nécessite l'établissement d'une zone d'adhérence entre les cellules et l'adressage des éléments viraux de la cellule infectée vers cette zone

de contact avec la cellule saine, deux processus qui reposent sur des remaniements du cytosquelette au sein de la cellule infectée. Le rétrovirus HTLV-1 (*human T-lymphotropic virus type 1*) se transmet principalement par contact cellulaire, les particules virales libres n'étant que peu infectieuses [1] (→).

Tax, la protéine transactivatrice du virus HTLV-1, induit l'expression de Gem, une protéine membre des petites protéines fixant le GTP de la famille de la superfamille Ras, qui est associée au cytosquelette d'actine et contribue à la migration cellulaire et à la formation de zones de contact (ou conjugués) entre les cellules infectées et les cellules cibles [2]. La protéine Tax induit également l'expression de la

(→) Voir la Synthèse de G. Rizkallah et al., m/s n° 6-7, juin-juillet 2015, page 629

Centre international de recherche en infectiologie, équipe oncogénèse rétrovirale, Inserm U1111 - université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École normale supérieure de Lyon, université de Lyon, 46, allée d'Italie, F-69007, Lyon, France ; équipe labellisée « Ligue nationale contre le cancer ».

* Contribution égale en tant que premiers auteurs.

** Contribution égale en tant qu'auteurs seniors.

helene.dutartre@ens-lyon.fr

chloe.journo@ens-lyon.fr

protéine d'adhérence ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) qui stabilise les contacts entre cellules. La signalisation induite à la suite de la polarisation d'ICAM-1 à la surface de la cellule infectée, conduit au positionnement du centre organisateur des microtubules vers la synapse virologique, ce qui favoriserait la transmission virale et le ciblage vers les cellules saines [3]. La fascine contrôle la formation des faisceaux d'actine à partir de l'actine filamenteuse [4]. Elle favorise la migration et l'adhérence cellulaires [5], et stabilise les protrusions et les filopodes, ce qui facilite les contacts entre les cellules [6, 7]. Récemment, il a été montré que l'expression de la fascine était induite par Tax [8, 9] et que la protéine participait à la transmission du virus [10].

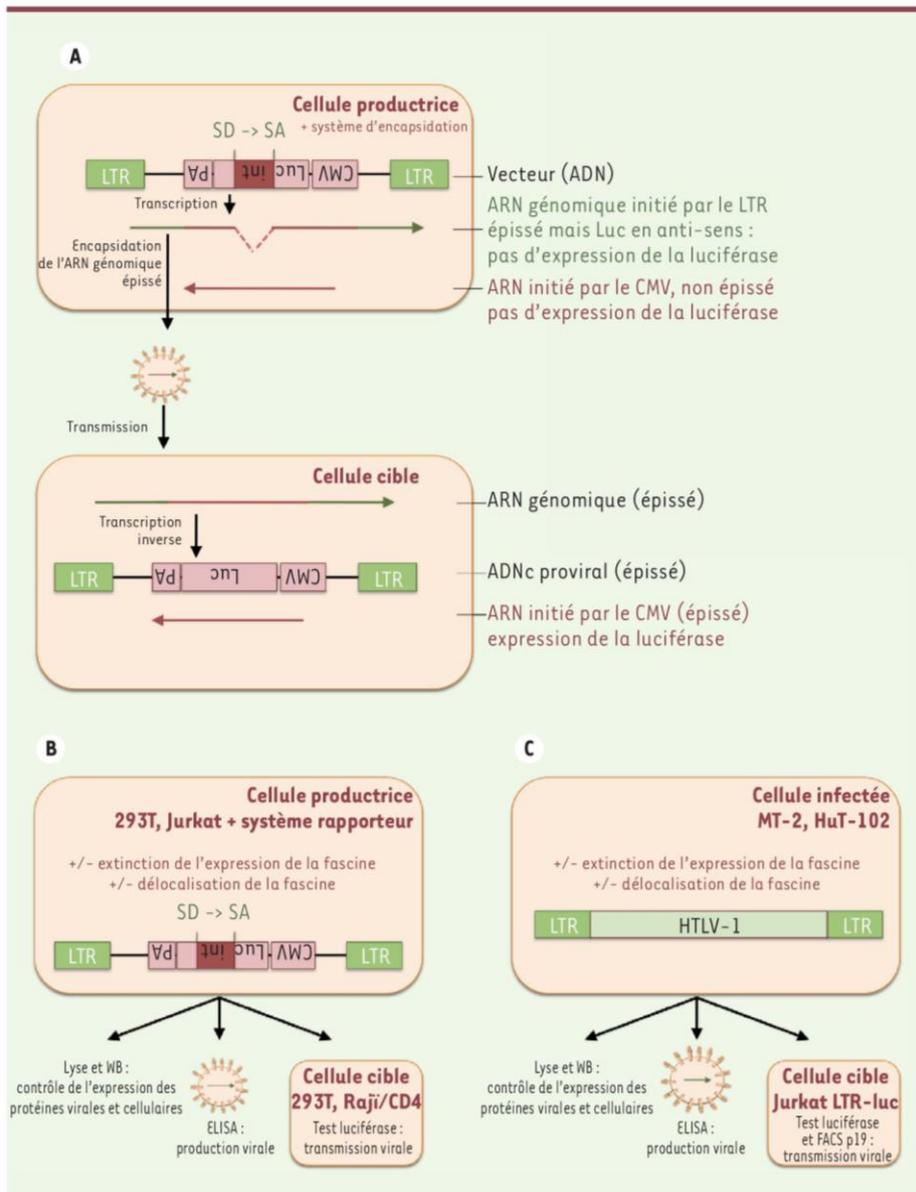


Figure 1. Représentation schématique des modèles expérimentaux utilisés dans l'étude.

A. Représentation du système rapporteur permettant de quantifier la transmission virale. Dans la cellule productrice, le gène rapporteur de la luciférase (Luc), sous le contrôle du promoteur cytomégalovirus (CMV, en rouge), est orienté en antisens et est flanqué des séquences LTR (*long term repeat*) du virus HTLV-1 (en vert). Ni l'ARN génomique épissé, initié par le LTR (flèche verte), ni l'ARN non-épissé initié par le CMV (flèche rouge), ne permettent l'expression de la luciférase. Après transmission de l'ARN génomique épissé à la cellule cible, la transcription inverse permet la production d'un ADN complémentaire (ADNc) proviral épissé, à l'origine d'un ARN initié par le CMV (flèche rouge) et de l'expression de la luciférase. SD : site donneur d'épissage ; SA : site accepteur d'épissage.

B. Représentation schématique des expériences réalisées avec le système rapporteur, après extinction ou délocalisation de la fascine dans les lignées cellulaires humaines : 293T, Raji et Jurkat.

C. Représentation schématique des expériences réalisées dans les lignées cellulaires

chroniquement infectées par HTLV-1 (MT-2, cellules transformées par HTLV-1, ou HuT-102, *T-cell lymphoma cell lines*), après extinction ou délocalisation de la fascine. Jurkat LTR-Luc : cellules Jurkat transfectée exprimant la luciférase sous le contrôle du LTR viral. In : intron ; PA : signal de poly-adénylation ; WB : *western-blot* ; ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay* ; FACS : *flow cytometry cell sorting* ; p19 : protéine de matrice p19^{gag}.

Un outil pour quantifier le virus néo-transmis

Afin d'évaluer le rôle de la fascine dans la transmission d'HTLV-1, un système permettant de distinguer le virus avant et après sa transmission a été utilisé (Figure 1A). Il s'agit d'une construc-

tion intégrant dans le génome du virus un gène rapporteur dont la traduction n'est autorisée qu'après sa transmission [11]. La construction est encadrée par les séquences LTR (*long terminal repeats*) d'HTLV-1. Le gène rapporteur de la luciférase, placé sous le contrôle

d'un promoteur fort (celui du CMV, cytomégalovirus), est orienté en antisens par rapport à l'organisation de la construction. Le gène rapporteur est interrompu par un intron orienté en sens opposé et donc dans la même orientation que la construction. Dans les cellules



productrices de virus, le transcrite produit, sous le contrôle du promoteur CMV, ne sera pas épissé et la protéine luciférase ne sera donc pas traduite. En revanche, la transcription virale initiée par le LTR 5' permettra l'épissage de l'intron, générant ainsi un ARN génomique viral correspondant à la construction sans intron. Pour que ce génome viral puisse être encapsidé, un vecteur d'encapsulation codant les protéines de capsid et d'enveloppe d'HTLV-1, ou permettant un pseudotypage par une enveloppe à large tropisme, a été co-transfecté avec la construction précédemment décrite. Les particules virales contenant le génome viral dépourvu d'intron peuvent ainsi se transmettre à de nouvelles cellules saines dans lesquelles la transcription inverse et l'intégration du génome viral s'effectueront. La transcription du gène rapporteur sous le contrôle du promoteur CMV permet alors l'expression de la luciférase dont l'activité traduit la quantité de virus néo-transmis.

La fascine facilite la transmission d'HTLV-1

Dans ce système, l'expression de la fascine a été abolie à l'aide d'ARN interférents. Après analyse de l'expression des protéines par *western-blot* (fascine, Tax, protéine de capsid virale p55^{gag}), un examen de la transmission virale a été réalisé par le suivi de l'activité luciférase. La production de particules virales libres a été évaluée par la quantification de p19^{gag}, la protéine de matrice d'HTLV-1, dans les surnageants de culture à l'aide d'un test ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (Figure 1B). Dans des cellules 293T (*human embryonic kidney*), l'extinction de l'expression de la fascine réduit de façon significative la transmission virale. Elle diminue également la production de particules virales libres, mais uniquement lorsque Tax est présent, ce qui suggère que ces deux protéines, Tax et fascine, coopèrent au cours de ce processus.

Dans ces expériences, la fascine a été « éteinte » dans les cellules de la lignée

293T qui sont, simultanément, productrices et cibles pour le virus. Afin d'exclure un possible rôle de la fascine au cours des étapes précoces de l'infection des cellules cibles, des expériences complémentaires ont été réalisées. Elles ont reposé sur une réduction de l'expression de la protéine spécifiquement dans les cellules productrices de virus. Afin de modéliser la physiologie de l'infection, des cellules de la lignée lymphocytaire T (la lignée Jurkat), cibles principales du virus *in vivo* ont été utilisées. Les cellules Jurkat expriment peu de fascine, comparées aux cellules 293T. Le taux basal de transmission virale dans ces cellules n'est donc pas affecté par l'extinction de la fascine. En revanche, les résultats obtenus avec les cellules 293T sont confirmés lorsque les cellules Jurkat sont transfectées avec le trans-activateur Tax qui induit l'expression de la fascine.

La contribution de la fascine à la transmission d'HTLV-1 a été vérifiée par l'utilisation de lignées cellulaires chroniquement infectées. Le système rapporteur, décrit précédemment, n'est alors plus nécessaire, les lignées infectées produisant naturellement le virus (Figure 1C). La transmission virale à partir de ces cellules est suivie à l'aide de cellules cibles « rapporteuses », en évaluant l'expression du gène de la luciférase sous contrôle du LTR du virus HTLV-1, lui-même transactivé par la protéine Tax. Après co-culture avec des cellules infectées, la protéine Tax est produite dans les cellules nouvellement infectées. Elle active ainsi l'expression de la luciférase. Dans ces cellules, l'activité luciférase est diminuée d'environ 50 % lorsque l'expression de la fascine est réprimée dans les cellules productrices, ce qui suggère, à nouveau, un rôle de cette protéine dans la transmission du virus. Le transfert du virus des cellules productrices aux cellules saines a été également mis en évidence en détectant la protéine de matrice p19^{gag} dans les cellules cibles par cytométrie en flux. L'ensemble de ces résultats montre qu'indépendamment du système expérimental utilisé, la fascine

participe à la transmission d'HTLV-1 de cellule à cellule.

La transmission de HTLV-1 repose sur la localisation de la fascine

Afin de déterminer si l'effet de la fascine sur la transmission virale reposait sur ses activités de régulation du cytosquelette d'actine, une technique permettant de perturber sa localisation au sein du cytosquelette d'actine a été utilisée. Pour cela, une méthode élégante, fondée sur l'expression de *nanobodies* dans les cellules productrices de virus a été appliquée. Les *nanobodies* sont des anticorps produits par les camélidés (dromadaires), réduits au domaine de liaison à l'antigène, le Fab. Dans le cas présent, les *nanobodies*, dirigés contre la fascine, ont été couplés à des séquences protéiques d'adressage vers la membrane externe de la mitochondrie. Après avoir contrôlé que ces *nanobodies* ne modifiaient pas le niveau d'expression de la protéine, mais qu'ils induisaient effectivement sa délocalisation, il a pu être montré que cette délocalisation diminuait la production et la transmission virales. La localisation subcellulaire de la fascine contrôle donc spécifiquement la transmission du virus HTLV-1, probablement par l'intermédiaire du cytosquelette d'actine.

La fascine ne participe pas à la formation de conjugués, mais pourrait contribuer à l'adressage du virus vers les zones de contact entre cellules

Pour identifier le mécanisme moléculaire par lequel la fascine facilite la transmission du virus, son implication dans la formation des zones de contact entre cellules productrices et cellules cibles a été étudiée. De façon surprenante, l'absence de fascine ne modifie pas la formation de ces conjugués (ou zones de contact). En revanche, les auteurs ont observé qu'en absence de fascine dans la zone de contact cellulaire, la protéine p19^{gag} n'était pas correctement localisée, ce qui suggère que la fascine contrôle l'adressage du

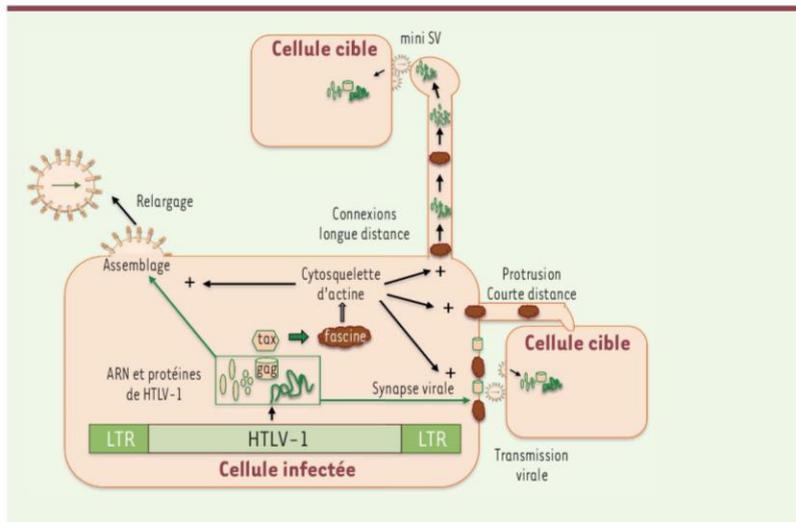


Figure 2. Schéma récapitulatif des rôles de la fascine lors de la transmission d'HTLV-1. Dans la cellule infectée, le génome proviral (représenté en vert) contrôle l'expression des protéines virales, dont la protéine Tax et les protéines nécessaires à la formation de nouvelles particules virales, regroupées dans le cadre vert. Les flèches vertes symbolisent l'adressage des protéines virales soit vers la synapse virale (SV) soit vers la membrane plasmique. Dans les deux cas, elles forment des particules virales qui sont alors soit transmises à une cellule cible au travers d'une SV, soit libérées dans le milieu extracellulaire. La fascine, dont l'expression est induite par Tax (représentée par une flèche large verte) est impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine (représentée par une flèche large grise). Elle peut être localisée au niveau de la SV ou des protrusions cellulaires. Le rôle de la réorganisation du cytosquelette d'actine induite par la fascine est représenté par des flèches noires : elle facilite (noté +) la formation de la synapse virale, le relargage des virions et la formation des connexions longue ou courte distance vers les cellules cibles, probablement via l'augmentation du transport des protéines virales.

virus vers les sites de contact. Cependant, l'analyse de la distribution de la protéine p19^{Gag} par microscopie confocale n'a pas été réalisée sur des cellules productrices dans lesquelles l'expression de la fascine serait réprimée ou la protéine délocalisée. On ne peut donc pas formellement conclure que la localisation de la fascine au niveau des contacts cellulaires influence l'adressage du virus.

Conclusion

La fascine et Gem, deux protéines cellulaires contrôlant le remodelage du cytosquelette et dont l'expression est induite par Tax, agissent donc différemment sur la transmission virale. La fascine favorise la production virale sans modifier la formation des zones de contact. Inversement, Gem favorise

la formation de ces conjugués sans modifier la production virale. La fascine pourrait donc contrôler l'adressage des particules virales vers la membrane plasmique (Figure 2). Les mécanismes moléculaires qui gouvernent l'effet de la fascine restent toutefois à préciser. De façon intéressante, le virus d'Epstein-Barr (EBV) induit également l'expression de fascine, via la protéine LMP1 (*latent membrane protein 1*), mais le rôle de la protéine dans la transmission de l'EBV n'a pas été analysé. En revanche, la fascine confère aux lymphocytes infectés par l'EBV des capacités invasives [12]. Elle pourrait également participer à l'invasivité des cellules infectées par HTLV-1 et être ainsi à l'origine de l'infiltration du système nerveux central chez les patients souffrant de myélopathie associée à HTLV-1 ou même de

l'infiltration du derme chez les patients souffrant de leucémie lymphoïde T de l'adulte à manifestation cutanée. Ainsi, une répression de l'expression de la fascine pourrait permettre d'envisager une thérapie efficace en infectiologie afin de limiter la transmission virale, et, en oncologie, afin d'abolir les propriétés invasives des cellules cancéreuses. ♦

The actin cytoskeleton goes retroviral

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Rizkallah G, Mahieux R, Dutartre H. Transmission intercellulaire du HTLV-1. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 629-37.
2. Chevalier SA, Turpin J, Cachat A, et al. Gem-induced cytoskeleton remodeling increases cellular migration of HTLV-1-infected cells, formation of infected-to-target T-cell conjugates and viral transmission. *PLoS Pathog* 2014 ; 10 : e1003917.
3. Nejmeddine M, Negi VS, Mukherjee S, et al. HTLV-1-tax and ICAM-1 act on T-cell signal pathways to polarize the microtubule-organizing center at the virological synapse. *Blood* 2009 ; 114 : 1016-25.
4. Otani T, Ogura Y, Misaki K, et al. IKKepsilon inhibits PKC to promote fascin-dependent actin bundling. *Development* 2016 ; 143 : 3806-16.
5. Villari G, Jayo A, Zanet J, et al. A direct interaction between fascin and microtubules contributes to adhesion dynamics and cell migration. *J Cell Sci* 2015 ; 128 : 4601-14.
6. Hoelzle MK, Svitkina T. The cytoskeletal mechanisms of cell-cell junction formation in endothelial cells. *Mol Biol Cell* 2012 ; 23 : 310-23.
7. Schafer C, Born S, Mohl C, et al. The key feature for early migratory processes: Dependence of adhesion, actin bundles, force generation and transmission on filopodia. *Cell Adh Migr* 2010 ; 4 : 215-25.
8. Mohr CF, Gross C, Bros M, et al. Regulation of the tumor marker fascin by the viral oncoprotein tax of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) depends on promoter activation and on a promoter-independent mechanism. *Virology* 2015 ; 485 : 481-91.
9. Kress AK, Kalmer M, Rowan AG, et al. The tumor marker fascin is strongly induced by the tax oncoprotein of HTLV-1 through NF-kappaB signals. *Blood* 2011 ; 117 : 3609-12.
10. Gross C, Wiesmann V, Millen S, et al. The tax-inducible actin-bundling protein fascin is crucial for release and cell-to-cell transmission of human t-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1). *PLoS Pathog* 2016 ; 12 : e1005916.
11. Mazurov D, Ilinskaya A, Heidecker G, et al. Quantitative comparison of HTLV-1 and HIV-1 cell-to-cell infection with new replication dependent vectors. *PLoS Pathog* 2010 ; 6 : e1000788.
12. Mohr CF, Kalmer M, Gross C, et al. The tumor marker fascin is induced by the Epstein-Barr virus-encoded oncoprotein *lmp1* via NF-kappaB in lymphocytes and contributes to their invasive migration. *Cell Commun Signal* 2014 ; 12 : 46.