

# L'oncoprotéine Tax délocalise le suppresseur de tumeur hScrib

Charlotte Andre

► **To cite this version:**

Charlotte Andre. L'oncoprotéine Tax délocalise le suppresseur de tumeur hScrib. Biologie cellulaire. 2009. <hal-01464607>

**HAL Id: hal-01464607**

**<https://hal-ephe.archives-ouvertes.fr/hal-01464607>**

Submitted on 10 Feb 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES  
Sciences de la Vie et de la Terre

MEMOIRE

Présenté par

Charlotte ANDRE

En vue de l'obtention du **Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Études**

# L'oncoprotéine Tax délocalise le suppresseur de tumeur hScrib

Soutenu le : 2 Juillet 2009

devant le Jury suivant :

Dr Christophe TERZIAN  
Pr Jean-Paul BORG  
Dr Nathalie CHAZAL  
Dr Jean-Michel MESNARD  
Dr Thierry DUPRESSOIR

Président  
Examineur  
Rapporteur  
Tuteur scientifique  
Tuteur pédagogique

cterzian@univ-lyon1.fr  
jean-paul.borg@inserm.fr  
nathalie.chazal@univ-montp1.fr  
jean-michel.mesnard@univ-montp1.fr  
tdupressoir@univ-montp2.fr

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Jean-Michel MESNARD  
UMR 5236 CNRS - UMI - UMII, Montpellier  
Centre d'études des Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé  
Equipe : « HTLV-1 et Leucémie »

Directeur : Dr Christian DEVAUX

Et de :

Dr Thierry DUPRESSOIR  
UMR 1231 CNRS – INRA, Montpellier  
FOURNIER  
Biologie Intégrative et Virologie des Insectes  
Equipe : « Densovirus »

Directeur : Dr Philippe

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE  
ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES  
Sciences de la Vie et de la Terre

# MEMOIRE

Présenté par

Charlotte ANDRE

En vue de l'obtention du **Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Études**

## L'oncoprotéine Tax délocalise le suppresseur de tumeur hScrib

Soutenu le : 2 Juillet 2009

devant le Jury suivant :

Dr Christophe TERZIAN  
Pr Jean-Paul BORG  
Dr Nathalie CHAZAL  
Dr Jean-Michel MESNARD  
Dr Thierry DUPRESSOIR

Président  
Examineur  
Rapporteur  
Tuteur scientifique  
Tuteur pédagogique

cterzian@univ-lyon1.fr  
jean-paul.borg@inserm.fr  
nathalie.chazal@univ-montp1.fr  
jean-michel.mesnard@univ-montp1.fr  
tdupressoir@univ-montp2.fr

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr Jean-Michel MESNARD  
UMR 5236 CNRS - UMI - UMII, Montpellier  
Centre d'études des Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé  
Equipe : « HTLV-1 et Leucémie »

Directeur : Dr Christian DEVAUX

Et de :

Dr Thierry DUPRESSOIR  
UMR 1231 CNRS – INRA, Montpellier  
Biologie Intégrative et Virologie des Insectes  
Equipe : « Denguevirus »

Directeur : Dr Philippe FOURNIER

### TABLE DES MATIERES

#### INTRODUCTION. 8

#### CHAPITRE I : LE VIRUS HTLV-1.. 9

##### A. Historique et données épidémiologiques. 9

##### B. Pathologies associées au HTLV-I. 9

##### 1. La leucémie à cellules T de l'adulte : ATL.. 10

##### 2. La TSP/HAM... 10

##### 3. Les autres maladies associées à HTLV-I. 11

##### 4. HTLV-I et le système immunitaire. 11

### C. Le cycle répliatif 11

### D. Organisation génomique. 12

1. Les « long terminal repeat » ou LTR.. 13
2. Les gènes structuraux classiques. 13
3. Les autres gènes. 14
  - a. Les protéines accessoires. 15
  - b. La protéine codée par le brin anti-sens : HTLV-I bZIP (HBZ) 15
  - c. Les protéines « régulatrices ». 16

### E. Rôle de la protéine virale Tax au niveau cellulaire. 19

1. Tax régule les voies de signalisation d'activation cellulaire. 20
  - a. La voie de signalisation ATF/CREB.. 20
  - b. La voie de signalisation SRF. 20
  - c. La voie de signalisation NF-kB.. 21
  - d. La voie de signalisation AP-1. 23
  - e. La voie de signalisation NFAT. 23
2. Tax régule le cycle cellulaire de la cellule. 24
3. Tax inhibe l'apoptose. 25
4. Tax réprime les fonctions de p53 et des membres de la famille bHLH.. 26
5. Tax altère la stabilité génomique. 26

## CHAPITRE II : LES PROTÉINES À DOMAINES PDZ... 29

### A. Découverte des domaines PDZ.. 29

### B. Structure. 29

### C. Classifications. 29

1. Classification des domaines PDZ.. 29
2. Classification des protéines à domaines PDZ.. 31

## CHAPITRE III : RÔLE DES PROTÉINES À DOMAINES PDZ DANS LA POLARITÉ

### CELLULAIRE.. 32

### A. La polarité dans les cellules épithéliales. 32

### B. La polarité dans les lymphocytes T.. 33

1. La migration. 33
2. La reconnaissance d'une APC.. 34
3. La formation d'une synapse immunologique. 35

### C. Les complexes de polarité. 35

1. Le complexe Par. 36
  - a. Découverte du complexe Par 36
  - b. Rôle du complexe Par 36
2. Le complexe Crumbs. 37
  - a. Découverte du complexe Crumbs. 37
  - b. Rôle du complexe Crumbs. 38
3. Le complexe Scrib. 39
  - a. Découverte du complexe Scrib. 39
  - b. Structure des protéines. 40
  - c. Rôle du complexe Scrib chez *Drosophila*. 41
  - d. Rôle du complexe Scrib dans les cellules épithéliales de mammifères. 42
  - e. Rôle des protéines Dlg au niveau des synapses. 43
  - f. Rôle de hScrib dans les astrocytes. 45
  - g. Rôle du complexe Scrib dans les lymphocytes T. 46
  - h. Rôle du complexe Scrib dans la tumorigénèse. 47
4. Le complexe Scrib : cible des oncogènes viraux. 48

## LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ADNc :	Acide désoxyribonucléique complémentaire (de l'ARNm)
AMPA (R) :	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (receptor)
AP-1:	activator protein 1
APC :	Adenomatous polyposis coli ou cellule présentatrice d'antigène
APKc :	Protéine Kinase C atypique
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ATF/CREB :	Activating Transcription Factor/CRE-Binding Protein
ATL :	Leucémie T de l'adulte
ATLV :	Virus de l'ATL
BER :	Base excision repair
bHLH :	b helix loop helix
AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
CBP/p300 :	CREB binding protein et son homologue p300
CD :	Cluster de differenciation
Cdk :	Cyclin dependant kinase
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
Crb :	Crumbs
CRE :	Cyclic AMP responsive element
CREM :	cyclic AMP responsive element modulator
CRS :	<i>cis</i> -acting repressive sequence
DC-SIGN :	dendritic cell-specific ICAM-3 grabbin nonintegrin
DEP :	domaine mis en évidence chez Dishevelled, Egl-10 et Pleckstrin
Dlg :	Discs large
DSBR :	double-strand break repair
ERM :	Ezrin-radixin-moesin
GLGF :	Gly-Leu-Gly-Phe
GuK :	Guanylate kinase

HBZ :	HTLV-I b-ZIP
HPV :	Human papilloma virus
HSPG :	Heparan sulfate proteoglycan
hTERT :	Human telomerase reverse transcriptase
ICAM :	intercellular adhesion molecule
IL :	Interleukin
IS :	Immunological synapse
kb :	Kilo-base
kDa :	Kilo-Dalton
L27 :	Lin2 Lin7
LAP :	LRR and PDZ
LAT :	linker for activation of T-cells
Lck :	lymphocyte specific protein tyrosine kinase
LFA :	leukocyte fonction antigen
Lgl :	Lethal giant larvae
LIM :	domaine mis en évidence chez Lin-11, Isl-1 et Mec-3
LRR :	Leucin rich repeat
LTR :	Long terminal repeat
MAD-1 :	mitotic arrest-deficient-1
MAGUK :	Membrane associated guanylate kinase
MEKK :	mitogen-activated protein kinase/extracellular-signal regulated kinase (ERK) kinase kinase
MMR :	Mismatch repair
MTOC :	microtubule-organizing center
NEMO :	NF-kB essential modulator
NER :	nucleotide exchange repair
NES :	Nuclear export signal (signal d'export nucléaire)
NFAT :	nuclear factor of activated T-cell
NF-kB :	nuclear factor kappa B
NIK :	NF-kB-inducing kinase
NLS :	Nuclear localisation signal (signal de localisation nucléaire)
NMDA (R) :	N-methyl-D-aspartic acid (receptor)
nNOS :	neuronal nitric oxide synthase
NRS :	Negative Regulatory Sequence
ORF :	Open reading frame

pb :	Paire de base
PBM :	PDZ binding motif
PBMC :	cellules mononucléaires du sang périphérique
pCAF :	p300/CBP associated factor
PCNA :	proliferating cell nuclear antigen
PDZ :	PSD-95, Dlg, ZO-1
PH :	pleckstrin homology domain
PI3K :	phosphatidylinositol kinase-3
PIP2 :	phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PSD :	Post synaptic density
Rb :	Retinoblastoma
RSD :	Rel-similarity domain
Scrib :	Scribble
Sdt :	Stardust
SMAC :	supramolecular activation clusters
SRF/SRE :	Serum responsive factor / serum responsive factor
TARP :	Transmembrane AMPA receptors regulatory protein
Tax1BP :	Tax1 binding protein
TBP :	Tax binding protein
TCF :	ternary complex factors
TCR :	T-cell receptor
TNFa :	tumor necrosis factor alpha
TPA :	12- <i>O</i> -tetradecanoylphorbol-13-acetate
TRE :	TPA responsive element
TSP/HAM :	Tropical Spastic Paraparesis / HTLV-1 Associated Myelopathy
TSS :	Tax Speckles Structures
TxRE :	Tax responsive element
UV :	Ultraviolet
WW :	domaine contenant 2 tryptophanes invariants
ZAP-70 :	z-chain associated protein kinase, 70 kDa
ZIP :	zipper
ZO :	Zonula occludens
bPIX/GIT1 :	PAX-interacting exchange factor b/G-protein-coupled receptor kinase-interacting protein 1

# INTRODUCTION

## Chapitre I : Le Virus HTLV-1

### A. Historique et données épidémiologiques

En 1980, l'équipe de Poiesz et ses collègues découvre pour la première fois le lien entre un rétrovirus et un cancer humain chez un patient atteint d'un lymphome cutané à cellules T (Poiesz, Ruscetti *et al.* 1980). Quelques années auparavant, une entité clinique nommée ATL (pour Adult T-cell Leukemia, ou Leucémie à cellules T de l'Adulte) avait été décrite au Japon (Uchiyama, Yodoi *et al.* 1977). Il fut ensuite démontré que l'ATL était due à la présence d'un rétrovirus appelé ATLTV (Adult T-cell Leukemia Virus) grâce à la présence d'anticorps contre ce virus dans les sérums de patients infectés (Hinuma, Nagata *et al.* 1981; Yoshida, Miyoshi *et al.* 1982). Peu après, il a été mis en évidence que ATLTV était en fait le virus découvert par Poiesz et un nom unique fut retenu : HTLV-1 pour Human T-cell Leukemia Virus (Popovic, Reitz *et al.* 1982).

Aujourd'hui, il infecte 15 à 20 millions d'individus dans le monde, avec des foyers endémiques au Japon, en Afrique centrale, aux Caraïbes et en Amérique du Sud. Les études épidémiologiques montrent que HTLV-1 est aussi répandu en Mélanésie, Nouvelle guinée et sur les îles Salomon, ainsi que chez les aborigènes australiens (Matsuoka and Jeang 2007).

Il se transmet de différentes façons :

- par voie sexuelle (avec un sens préférentiel de l'homme vers la femme),
- par voie parentérale (transfusion sanguine ou administration de drogues par intraveineuse avec des seringues contaminées)
- au cours de l'allaitement, surtout s'il est prolongé.

La transmission par des particules virales libres semble peu efficace et s'opère principalement par la transmission des protéines virales et du matériel génétique lors de la formation d'une synapse virologique entre une cellule infectée et une cellule non-infectée. De ce fait, la présence de cellules infectées vivantes est nécessaire à l'infection.



## **B. Pathologies associées au HTLV-I**

L'individu infecté est porteur du virus durant toute sa vie et 90 % des séropositifs restent porteurs asymptomatiques. Seulement 10 % des personnes infectées développent la maladie après une longue période de latence. Les maladies associées à HTLV-I sont l'ATL, une forme agressive et rapidement mortelle de leucémie, ou des maladies inflammatoires. La plus fréquente est la TSP/HAM (Tropical Spastic Paraparesis / HTLV-I Associated Myelopathy), mais on retrouve aussi l'uvéïte, l'arthropathie ou encore la myosite (Proietti, Carneiro-Proietti *et al.* 2005).

### **1. La leucémie à cellules T de l'adulte : ATL**

La leucémie à cellules T de l'adulte touche 2 à 3 % des personnes infectées par HTLV-I après une longue période de latence de 30 à 60 ans. Trois critères ont été définis pour identifier les malades atteints d'ATL. Le premier est la détection de la morphologie des lymphocytes T possédant les antigènes de surface comme CD4+ et CD25+. Chez les patients atteints d'ATL aiguë, les lymphocytes T transformés ont un noyau multilobé caractéristique en forme de fleur et résultent d'une prolifération monoclonale. Le deuxième est la détection d'anticorps contre HTLV-I dans le sérum des patients et le troisième est la démonstration de l'intégration monoclonale du provirus dans les cellules tumorales par Southern Blot. La charge provirale est ensuite estimée par des techniques de PCR et permet d'évaluer la progression de la maladie chez les patients infectés.

Quatre formes d'ATL ont été classifiées selon M. Shimoyama en 1991 (Shimoyama 1991), et une cinquième a récemment été proposée (la forme tumorale primaire cutanée) (Bittencourt 2005). Elles ont une évolution et des pronostics différents (voir Tableau I).

La forme aiguë est la plus agressive. Les patients atteints ont un nombre élevé de lymphocytes T typiques de l'ATL, avec des lésions fréquentes de la peau, une lympho-adénopathie, une hépatosplénomégalie et une hypercalcémie (Matsuoka 2003). Pour la forme lymphomateuse, le nombre de lymphocytes T anormaux est moins élevé mais l'espérance de vie reste minime (Tableau I) vu que ce sont des formes agressives et que les patients atteints sont résistants aux chimiothérapies intensives. Les formes indolente et chronique sont caractérisées par un nombre faible de lymphocytes T typiques de l'ATL. La forme chronique peut cependant évoluer rapidement vers les formes agressives (Yasunaga and Matsuoka 2007).

### **2. La TSP/HAM**

La TSP/HAM est une maladie inflammatoire chronique du système nerveux central caractérisée par une démarche altérée, une lombalgie, un dysfonctionnement urinaire et une faiblesse spastique progressive des membres inférieurs. La cause de la production par l'hôte de facteurs inflammatoires est très probablement l'infiltration de lymphocytes T CD8+ infectés dans le système nerveux central. Le développement de la maladie est fortement variable entre individus. La TSP/HAM peut se développer rapidement, progresser très lentement pendant des décennies ou même arrêter d'évoluer dans certains cas. La maladie affecte davantage les femmes (rapport homme/femme de 1 pour 2, à l'inverse de l'ATL). Les traitements actuellement utilisés ne sont malheureusement pas satisfaisants (Proietti, Carneiro-Proietti *et al.* 2005).

### **3. Les autres maladies associées à HTLV-I**

Parmi les autres syndromes associés à HTLV-I, on peut citer un certain degré d'immunodépression, des cas d'arthrites chroniques, des uvéïtes de l'adulte jeune, des dermatites infectieuses chez l'enfant ou encore des myosites et polymyosites.

### **4. HTLV-I et le système immunitaire**

HTLV-I se retrouve principalement sous forme de provirus au sein de la cellule. La cellule infectée ne produit que très peu de particules virales libres et la charge virale dans le plasma est donc presque indétectable. Cependant, de nouvelles cellules peuvent être infectées par la formation d'une synapse virologique. Une première étape de dissémination du virus semble être réalisée d'abord par l'intermédiaire de contacts cellules-cellules, entraînant une prolifération polyclonale du virus dans les cellules CD4+ et CD8+. Lorsque l'équilibre entre la réplication du virus et la réponse immune est atteint, HTLV-I se multiplie surtout par une prolifération monoclonale dépendante de la mitose de la cellule hôte. Ce mécanisme contribue à la stabilité génomique du virus puisque sa transcription est opérée par une polymérase cellulaire dont l'activité enzymatique est de haute fidélité. L'équilibre entre la réplication du virus et la réponse immune est principalement lié à une forte réponse cytotoxique dirigée principalement contre la protéine Tax (Verdonck, Gonzalez *et al.* 2007). Pour échapper à cette forte réponse cytotoxique, l'expression de Tax dans les cellules d'ATL est fréquemment « éteinte » par différents mécanismes. La perte du LTR5' (Long Terminal Repeat), élément proviral contenant le promoteur des gènes viraux, est observée chez 39% de patients diagnostiqués avec l'ATL, empêchant ainsi la production de Tax. Un deuxième mécanisme s'explique par les mutations observées sur le gène *tax* dans les cellules d'ATL. On peut aussi observer des mutations du site de reconnaissance de la molécule du complexe d'histocompatibilité de classe I pour la protéine Tax, permettant une évation de la reconnaissance virale. Le troisième mécanisme évoqué est une régulation épigénétique de l'activité du LTR5' par hyperméthylation et modification des histones qui permettent d'inhiber la transcription des gènes viraux. Par ces mécanismes, les cellules d'ATL limitent l'expression de Tax et peuvent ainsi échapper à la surveillance du système immunitaire (Yasunaga and Matsuoka 2007).

## C. Le cycle réplcatif

HTLV-1 est un rétrovirus enveloppé de type C (Poiesz, Ruscetti *et al.* 1980). Il est constitué de deux molécules d'ARN identiques, chacune associée à la protéine de nucléocapside ainsi qu'à la transcriptase inverse (Figure 1). Ce complexe ribonucléoprotéique est entouré par une capsid (protéines CA) qui est reliée à l'enveloppe virale par les protéines de matrice (protéines MA). L'enveloppe, d'origine cellulaire, est acquise lors du bourgeonnement du virus à la surface de la cellule cible. Elle est constituée par les complexes glycoprotéiques d'enveloppe TM et SU d'origine virale insérés dans une bicouche phospholipidique cellulaire.

La première étape du cycle débute par la formation d'une synapse virologique où les glycoprotéines d'enveloppe virales interagissent avec un ou plusieurs récepteur(s) cellulaire(s) (Figure 2). Les récepteurs cibles du HTLV-1 connus aujourd'hui sont les protéines GLUT-1 (Manel, Kinet *et al.* 2003) et la neuropilin-1 (Ghez, Lepelletier *et al.* 2006). Ces deux récepteurs sont co-localisés au niveau de la jonction membranaire entre une cellule non-infectée et une cellule infectée par HTLV-I, suggérant un complexe trimérique avec l'enveloppe (Ghez, Lepelletier *et al.* 2006). De plus, il a été démontré que la présence des HSPGs (heparan sulfate proteoglycans) était nécessaire à une entrée efficace du virus dans les lymphocytes CD4+ (Jones, Fugo *et al.* 2006). Au niveau de cette synapse virologique, il y a fusion entre la cellule infectée et les virions avec la membrane plasmique de la cellule non-infectée. L'ARN viral et les protéines virales sont relargués dans le cytoplasme (Figure 2). L'ARN est rétrotranscrit en ADN double brin sous l'action de la transcriptase inverse virale. Ce double brin d'ADN migre ensuite dans le noyau où il sera intégré dans le génome de la cellule cible grâce à l'intégrase virale ce qui permet la transcription future des gènes viraux grâce à la machinerie transcriptionnelle de la cellule hôte. Une fois transcrits et épissés, les ARNm viraux vont être traduits et donner les protéines virales précoces Tax et Rex. La protéine Tax transactive le promoteur viral alors que la protéine Rex est impliquée dans le transport des ARNm non épissés ou simplement épissés, du noyau vers le cytoplasme (Yoshida 2005). Les ARNm non épissés permettront l'expression des précurseurs protéiques Gag (matrice, capsid et nucléocapsid), Pol (polymérase, transcriptase inverse et intégrase), et Pro (protéase virale). Les ARNm mono-épissés seront à l'origine du précurseur Env qui sera clivé par une protéase cellulaire pour donner les

glycoprotéines virales gp46 (SU) et gp21 (TM). Le cycle viral se termine par la formation d'une particule virale avec encapsidation de l'ARNm génomique non épissé ainsi que certaines protéines cellulaires nécessaires au cycle répliatif du virus et la formation d'une synapse virologique pour infecter une nouvelle cellule. Cette synapse se forme au niveau du site de contact entre la cellule infectée et la cellule non-infectée. Les protéines Gag et Env se retrouvent concentrées au site de contact. Dans la cellule cible, la protéine taline du cytosquelette se concentre au niveau du site de contact et le MTOC (microtubule-organizing center) se réoriente vers la synapse virologique. Il s'en suit un mouvement de la protéine Gag vers la cellule non infectée accompagné d'un rapide transfert des ARN viraux (Igakura, Stinchcombe *et al.* 2003).

## D. Organisation génomique

Le génome viral de 9 kb comporte les gènes structuraux classiques des rétrovirus (Gag, Pro, Pol, Env) auxquels s'ajoute une région supplémentaire, la région « pX », codant pour les protéines de régulation (Figure 3). A chaque extrémité du génome viral se trouvent deux séquences non codantes : les « Long Terminal Repeat ».

### 1. Les « long terminal repeat » ou LTR

Les LTR sont des séquences redondantes qui jouent un rôle dans l'intégration, la répliation et la régulation de la transcription du génome viral. Ils sont divisés en trois régions distinctes : U3, R et U5. La région promotrice se trouve dans la région U3 du LTR5', tandis que le LTR3' joue un rôle dans la polyadénylation. La région promotrice du HTLV-I est composée de trois éléments de réponse à Tax (les TxRE1-I, -II et -III pour Tax Responsive Element) qui sont des séquences répétées de 21 pb contenant une séquence consensus homologue à l'élément de réponse à l'AMP-cyclique (CRE) (Figure 4) (Nyborg, Dynan *et al.* 1988). Les facteurs de transcription cellulaires de la famille ATF/CREB (Activating Transcription Factor/CRE-Binding Protein) peuvent venir se fixer sur les TxRE1s et ainsi activer la transcription virale. D'autres facteurs cellulaires sont connus pour activer la transcription basale du HTLV-I : les protéines AP-1 (activator protein 1) (Grant, Jain *et al.* 2006), AP-2, sp1 et sp3 (specificity protein 1 et 3), Gli-2 de la famille des protéines Gli, la protéine TIF-1 (Winter, Dayaram *et al.* 2007), les protéines HEB1 et HEB2 (Montagne, Beraud *et al.* 1990). Il existe un autre élément de réponse à Tax entre les domaines TxRE1-II et -III, le TxRE2, mais qui est inactif de façon isolé. Récemment, il a été démontré que les membres de la famille Ets (Ets 1 et 2, Elk-1) (Winter, Dayaram *et al.* 2007) et les membres de la famille SRF (serum responsive factors) (Marriott, Boros *et al.* 1989) activent la transcription basale du promoteur viral à partir du TxRE2.

La région située entre U3 et R du LTR3' comprend un élément de réponse à Rex, la séquence RexRE (Rex responsive element) (Grone, Koch *et al.* 1996). De plus il existe plusieurs sites d'atténuation de la transcription. Le NRS (Negative Regulatory Sequence), situé dans la région R, régule négativement l'activité transcriptionnelle du promoteur HTLV-I en affectant la transcription induite par des activateurs forts comme Tax (Montagne and Jalinet 1995). La région U5 du LTR5' contient le CRS (*cis*-acting repressive sequence) qui exerce un effet répressif au niveau post-transcriptionnel (Seiki, Inoue *et al.* 1988). En revanche, à la jonction R/U5 se trouve la séquence DRE1 (Downstream Regulatory Element I) requise pour la transcription basale du HTLV-I et activée par des facteurs cellulaires comme TFIIA et TFIID (Kashanchi, Duvall *et al.* 1993). Enfin on trouve également dans la région U5 les sites impliqués dans la terminaison et la polyadénylation des ARNm (Seiki, Hattori *et al.* 1983).

### 2. Les gènes structuraux classiques

- Le gène *gag* code les protéines qui interviendront dans l'assemblage et la structure du virion. La première étape de synthèse consiste en la production d'un précurseur protéique de 53 kDa (p53) à partir d'un

ARNm non épissé (Figure 3-B). Ce précurseur possède un signal d'adressage à la membrane nécessaire pour l'assemblage et le relargage des virions. Il est suffisant pour permettre le relargage de particules virales immatures (les VLP pour Virus-like particules) (Le Blanc, Grange *et al.* 2001). Durant le processus de ciblage vers la membrane plasmique, la protéase virale clive le précurseur Gag en trois protéines de structure :

- la matrice (MA ou p19)
- la capsid (CA ou p24)
- la nucleocapsid (NC ou p15)

- Le gène *pro* est situé à cheval sur la partie 3' de la région *gag* et la partie 5' de la région *pol* (Figure 3-B). La synthèse de la protéase est obtenue par un changement de cadre de lecture dans l'ARNm génomique (Nam, Copeland *et al.* 1993) grâce à un décalage ribosomique au niveau d'un pseudonoeud où se retrouve une séquence conservée : A AAA AAC. La protéase est clivée de manière autocatalytique à partir des précurseurs protéiques Gag-Pro et Gag-Pro-Pol pour générer la protéase mature de 28 kDa. Vu son rôle primordial dans la réplication virale, la protéase est l'une des cibles importantes pour le développement d'inhibiteurs permettant de traiter les infections liées à HTLV-I (Shuker, Mariani *et al.* 2003).

- Le gène *pol* est situé entre les gènes *gag-pro* et le gène *env* (Figure 3-B). La synthèse du précurseur Pol nécessite deux changements de cadre de lecture dans l'ARNm génomique. Ce précurseur est clivé par la protéase virale pour générer les protéines matures de la transcriptase inverse/RNaseH (RT/RNaseH) et de l'intégrase (IN). La transcriptase inverse, protéine clé du cycle répliatif, catalyse la réaction enzymatique qui sera à l'origine de la synthèse du double brin d'ADN à partir de l'ARN viral. Grâce à son activité RNaseH, elle dégrade le brin d'ARN viral au fur et à mesure qu'il est rétro-transcrit. L'intégrase quant à elle permet l'intégration de l'ADN néosynthétisé dans le génome de la cellule hôte. L'intégration semble se faire de façon aléatoire, bien qu'il ait été montré que des éléments présents au sein du génome cellulaire influencent positivement cette intégration (Leclercq, Mortreux *et al.* 2000; Ozawa, Itoyama *et al.* 2004; Jones, Akel *et al.* 2005).

- Le gène *env* est issu de l'ARNm génomique à partir d'un simple épissage et code pour le précurseur protéique Env de 61 kDa (Figure 3-B). Ce précurseur est synthétisé au niveau du réticulum endoplasmique où il s'assemble sous forme de dimère. Il est clivé par des protéases cellulaires au niveau du Golgi pour donner les deux glycoprotéines d'enveloppe : SU, qui est une protéine de surface fortement glycosylée impliquée dans la reconnaissance du récepteur cellulaire et TM, qui est une protéine transmembranaire ancrant le complexe SU-TM dans l'enveloppe virale composée de membrane d'origine cellulaire jouant aussi un rôle important dans la fusion et l'infection du HTLV-I. (Le Blanc, Grange *et al.* 2001).

### 3. Les autres gènes

En plus des gènes *gag*, *pro*, *pol* et *env*, le génome du HTLV-I possède une région codante de 2 kb appelée pX située entre le gène *env* et le LTR3' (Figure 3-B). Cette région contient au moins quatre cadres ouverts de lecture (ORF pour Open Reading Frame). Ces quatre ORFs codent des protéines dites accessoires et régulatrices. De plus, il existe une protéine appelée HBZ codée au niveau de cette région mais à partir d'un gène situé sur le brin complémentaire du génome proviral (Gaudray, Gachon *et al.* 2002).

#### a. Les protéines accessoires

Suite à des épissages alternatifs de l'ARNm viral ainsi qu'à la présence de codons initiateurs internes, les ORF I et II génèrent quatre protéines accessoires : p12<sup>I</sup>, p27<sup>I</sup>, p13<sup>II</sup> et p30<sup>II</sup> (Furukawa and Shiku 1991; Koralnik, Gessain *et al.* 1992). Ces protéines ont un rôle dans l'infection virale (Collins, Newbound *et al.* 1998; Silverman, Phipps *et al.* 2004), le maintien de la charge virale (Bartoe, Albrecht *et al.* 2000), l'activation de la cellule hôte (Albrecht, Collins *et al.* 2000; Michael, Nair *et al.* 2004) et la régulation de la transcription des gènes (Albrecht,

Collins *et al.* 2000; Nair, Michael *et al.* 2005). Les ARNm spécifiques de ces quatre protéines ont été détectés *in vitro* dans les cellules transfectées avec le clone moléculaire d'HTLV-I, dans les lignées cellulaires transformées par HTLV-I et *ex vivo* dans des lymphocytes primaires fraîchement isolés de patients infectés par HTLV-I ou atteints d'ATL ou de TSP/HAM. (Berneman, Gartenhaus *et al.* 1992; Ciminale, Pavlakis *et al.* 1992; Cereseto, Berneman *et al.* 1997). L'expression *in vivo* de ces quatre protéines est difficilement démontrable mais des preuves indirectes de leur expression ont été révélées suite à l'étude de la réponse immunitaire lors de l'infection virale. En effet, des anticorps ainsi que des cellules T cytotoxiques CD8+ dirigés contre des protéines recombinantes ou des peptides représentant ces protéines ont été détectés chez les patients malades ou porteurs sains, démontrant ainsi la présence des protéines des ORFs I et II *in vivo* durant une infection naturelle (Chen, Chen *et al.* 1997; Dekaban, Peters *et al.* 2000; Pique, Ureta-Vidal *et al.* 2000).

#### b. La protéine codée par le brin anti-sens : HTLV-I bZIP (HBZ)

Le brin complémentaire situé au niveau de la région pX code la protéine HBZ. Cette protéine de 31 kDa a été identifiée au sein de notre équipe par utilisation d'un double hybride sur une banque d'ADNc de cellules chroniquement infectées par HTLV-I, avec comme appât la protéine CREB-2, membre de la famille ATF/CREB. HBZ est une protéine nucléaire possédant un domaine « leucine zipper » (ZIP) et pourrait être rattachée, selon ses caractéristiques moléculaires, aux membres de la famille AP-1. Elle a été décrite comme favorisant l'établissement et la persistance d'une infection chez des lapins infectés par HTLV-I, ce qui peut être lié à la capacité d'HBZ de réprimer la transcription virale dépendante de Tax. Pour cela, la protéine HBZ forme des hétérodimères avec les protéines CREB, CREB-2, CREM et ATF-1 qui ne seront donc plus capables d'interagir avec les TxRE1s. En conséquence, Tax ne peut plus se fixer sur le promoteur viral et donc *trans*-activer la transcription virale. La protéine HBZ inhibe aussi la transcription virale indépendante de Tax en interagissant avec c-Jun et JunB, membres de la famille AP-1. Ces phénomènes de régulation négative de la transcription virale entraînent une réduction de l'expression des protéines virales dans les cellules infectées ce qui pourrait aider ces dernières à échapper à la réponse cytotoxique médiée par les lymphocytes T.

En revanche, HBZ est aussi capable de stimuler l'activité transcriptionnelle de JunD sur les boîtes AP-1. L'interaction entre HBZ et JunD pourrait jouer un rôle important dans l'oncogénèse liée à l'ATL (Barbeau and Mesnard 2007).

#### c. Les protéines « régulatrices »

Elles sont appelées ainsi de par leur rôle dans la régulation de l'expression du génome viral. Elles sont codées par les ORF III et IV de la région pX.

##### i. La protéine Rex (p27III)

Elle est codée à partir d'un ARNm doublement épissé de 2,1 kb qui contient des éléments du LTR5', du gène *env* et de la région pX (Figure 3-B). Capable de se lier à l'ARN, elle est essentielle pour le transport et l'épissage des ARNm viraux. Elle est nécessaire pour une infection efficace et persistante *in vivo* mais n'est pas impliquée dans l'immortalisation des lymphocytes T primaires humains *in vitro* (Ye, Silverman *et al.* 2003). La protéine Rex agit au niveau post-transcriptionnel en augmentant le taux de transcrits non-épissés (transcrits *gag-pro-pol*) et mono-épissés (*env*) aux dépens des transcrits doublement épissés (Hidaka, Inoue *et al.* 1988). Elle les dirige depuis un compartiment nucléaire où ils sont protégés de la dégradation et de l'épissage, vers le cytoplasme où ils seront alors traduits pour donner les protéines structurales du virus. En absence de Rex, ces ARNm viraux restent stockés dans le noyau. (Grone, Koch *et al.* 1996). Comme mentionné précédemment, Rex interagit avec l'ARNm viral au niveau du RexRE qui correspond à une grande structure d'ARN énergétiquement stable formée de multiples boucles. La liaison entre Rex et cette séquence est essentielle pour son activité *in vivo* (Grone, Koch *et*

al. 1996).

Il existe deux niveaux de régulation qui agissent sur l'activité post-transcriptionnelle : d'une part, les séquences inhibitrices CRS (*cis-acting repressive sequence*) situées sur l'ARNm, l'une au niveau de la région U5, l'autre chevauche le RexRE (Seiki, Hikikoshi *et al.* 1990; King, Bridger *et al.* 1998). Une délétion de ces deux CRS entraîne une délocalisation quasi quantitative de l'ARNm hors du noyau. D'autre part, différentes protéines cellulaires régulent la protéine Rex. Ainsi, l'activité de Rex est liée à sa phosphorylation. En effet, les Ser-70, Ser-177 et Thr-174 sont phosphorylées *in vivo*. L'inhibition de ces phosphorylations par un inhibiteur de la protéine kinase C entraîne une accumulation des ARNm non-épissés et diminue la synthèse de la protéine Gag (Adachi, Copeland *et al.* 1992). La protéine hnRNP A1 (heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1) est capable de rentrer en compétition avec Rex dans la formation des complexes Rex-RexRE perturbant ainsi l'activité post-transcriptionnelle de Rex (Dodon, Hamaia *et al.* 2002). Lorsque cette protéine est inhibée, on observe une augmentation des niveaux de transcription et de production virales ainsi que de l'expression des ARNm cytoplasmiques, montrant un effet répresseur de cette protéine sur la réplication du HTLV-I (Kress, Baydoun *et al.* 2005). La protéine B-23 interagit avec la région du signal de localisation nucléaire/nucléolaire (NLS/NoLS) de Rex. B-23 aiderait l'importation de Rex du cytoplasme vers le nucléole, ce qui faciliterait par la suite l'export des ARNm non-épissés vers le cytoplasme (Adachi, Copeland *et al.* 1993). Enfin, la protéine hCRM1 (l'exportine humaine), en interagissant avec le signal d'export nucléaire (NES) de Rex, apparaît importante pour la multimérisation de Rex et son mécanisme d'export (Hakata, Umemoto *et al.* 1998).

Une protéine additionnelle de 21 kDa, nommée p21<sup>rex</sup>, et correspondant à une forme tronquée de Rex, peut également être exprimée à partir de l'ORFIII. Cette protéine a été détectée dans des cellules infectées par HTLV-I et son ARNm retrouvé dans des cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) purifiées à partir d'individus infectés. Cette protéine semble intervenir dans le cycle du HTLV-I en inhibant l'activité de Rex par action sur sa distribution subcellulaire (Kubota, Hatanaka *et al.* 1996).

Connaissant l'importance du rôle de Rex au niveau de l'infection virale, il me semble essentiel de définir précisément ses mécanismes d'action afin de faciliter le développement d'un traitement thérapeutique contre l'ATL ou la TSP/HAM.

#### ii. La protéine Tax (p40Tax)

Elle est codée à partir de l'ORF IV situé sur le même ARNm doublement épissé que celui qui code la protéine Rex (Figure 3-B). La protéine Tax est composée de 353 acides aminés et se localise majoritairement dans le noyau. Les 48 premiers acides aminés de la protéine forment une région basique correspondant au NLS. Au sein du noyau, Tax se localise dans des zones de transcription hautement actives. Ces structures, formant des zones tachetées dans le noyau, ont été appelées dans le cas de Tax les Tax Speckles Structures (TSS) (Semmes and Jeang 1996). Tax possède aussi un signal d'export nucléaire (NES) qui lui permet de faire la navette entre le noyau et le cytoplasme (Burton, Upadhyaya *et al.* 2000). Différentes régions de Tax (Figure 5) sont impliquées dans son homo-dimérisation, étape essentielle pour la fonctionnalité de la protéine (Jin and Jeang 1997; Basbous, Bazarbachi *et al.* 2003). Dans sa partie C-terminale, Tax possède un domaine d'activation, une région nécessaire pour l'interaction avec plusieurs protéines cellulaires impliquées dans l'activation transcriptionnelle induite par Tax. Enfin, les 4 derniers acides aminés (ETEV) forment le PSD-95-Discs-Large-ZO-1 (PDZ)-Binding Motif (PBM) de Tax. Ce motif est nécessaire pour l'interaction de Tax avec différentes protéines à domaines PDZ (Figure 5).

Les premières études ont montré que Tax agit comme un transactivateur transcriptionnel viral (Sodroski, Rosen *et al.* 1984; Felber, Paskalis *et al.* 1985) à partir du LTR5'. Celui-ci contient dans la région U3 les trois motifs répétés de 21 pb appelés TxRE1 nécessaires pour l'activité transcriptionnelle de Tax (voir le paragraphe sur les LTRs). Les TxRE1s contiennent dans leur région centrale (régions B) des boîtes CRE imparfaites (Figure 4) où

se fixent les protéines de la famille ATF/CREB composée de facteurs de transcription membres de la famille des leucines zipper (ZIP) (Landschulz, Johnson *et al.* 1988).

Bien que plusieurs membres de la famille ATF/CREB interagissent avec le TxRE1, seules les protéines CREB, CREB-2, CREM et ATF-1 interagissent avec le LTR5' du HTLV-1 *in vivo*. Parmi ces candidats, la protéine CREB apparaît comme ayant un rôle important dans l'activation de la transcription virale. En l'absence de Tax, CREB forme un complexe instable avec le TxRE1. En interagissant avec le bZIP de CREB *via* sa partie N-terminale, Tax favorise l'homo-dimerisation de CREB et augmente ainsi son affinité sur le TxRE1 (Grassmann, Aboud *et al.* 2005). Ce complexe Tax-CREB-TxRE1 est ensuite stabilisé par une interaction directe entre Tax et l'ADN proviral au niveau des régions flanquantes de la région B du TxRE1, les régions A et C qui sont riches en G/C (Figure 6). De la même manière, il a été démontré que la protéine CREB-2 joue un rôle central dans l'activation de l'expression des gènes du HTLV-I (Gachon, Thebault *et al.* 2000). Contrairement à CREB en absence de Tax, CREB2 n'a pas besoin d'être phosphorylée pour activer le LTR du HTLV-I et active de façon plus efficace le LTR en présence de Tax par rapport à CREB (Azran, Schavinsky-Khrapunsky *et al.* 2004).

La stabilisation de ces complexes au niveau de l'ADN proviral permet à Tax de recruter plusieurs coactivateurs transcriptionnels comme CBP/p300 (CREB binding protein et son homologue p300) et pCAF (p300/CBP associated factor). L'interaction entre Tax et CBP/p300 fait intervenir deux régions de Tax (entre les acides aminés 81 et 95 et 312 et 319 de Tax) (Figure 5) et trois domaines de CBP : le domaine CH1, le domaine KIX et un domaine carboxy terminal de liaison à la protéine SRC-1 (Lemasson and Nyborg 2001; Scoggin, Ulloa *et al.* 2001; Azran, Schavinsky-Khrapunsky *et al.* 2004). La partie C-terminale de p/CAF interagit avec un domaine de Tax situé entre les acides aminés 318 et 320 (Figure 5) (Azran, Schavinsky-Khrapunsky *et al.* 2004). Ces coactivateurs exercent leurs effets *via* leur activité histones acétyltransférase (HAT), qui entraîne une modification dans la conformation de la chromatine à proximité du promoteur viral et facilite ainsi le recrutement de plusieurs facteurs de la transcription basale, comme l'ARN polymérase II. Des interactions entre les protéines TBP (TATA binding protein) (Caron, Rousset *et al.* 1993), TAF<sub>II</sub>28 (Caron, Mengus *et al.* 1997), TFIIA (Clemens, Piras *et al.* 1996) ont été mises en évidence et semblent essentielles à l'activation de la transcription induite par Tax.

La transactivation transcriptionnelle des gènes viraux induite par Tax dans la cellule semble subir un rétrocontrôle négatif. En effet, Tax est capable d'interagir avec l'histone déacétylase I (HDAC1). Cette protéine déacétyle les histones et conduit à une condensation de la chromatine et donc à une répression de la transcription. De même, Tax entraîne une méthylation de l'histone H3 ce qui résulte en un changement conformationnel au niveau de la chromatine et donc une répression de la transcription. Cependant, les dernières études montrent que Tax, en interagissant avec ces protéines de remodelage de la chromatine, les empêcherait de venir au niveau du promoteur viral et par conséquent d'exercer leurs effets inhibiteurs sur la transcription des ADN viraux (Lemasson, Polakowski *et al.* 2004; Lu, Pise-Masison *et al.* 2004).

La protéine Tax est capable de se lier à un deuxième élément de réponse situé dans la région U3 du LTR5' du HTLV-I, le TxRE2. Celui-ci est constitué d'un élément de réponse au sérum (SRE), sur lequel viennent se fixer les facteurs de réponse au sérum (SRF) et les facteurs de la famille Ets comme Elk-1 (Figure 7). Ces facteurs, détaillés plus amplement dans le chapitre suivant, sont impliqués dans la transcription de plusieurs gènes, notamment ceux de la famille AP-1. D'autres facteurs interagissent avec le domaine TxRE2 : Sp-1, TIF-1 et Myb et peuvent ainsi jouer un rôle dans la transcription basale du génome de HTLV-I. Winter et Marriott démontrent aussi que Tax interagit avec les facteurs SRF et favorise leur stabilité au niveau du SRE, suggérant une régulation de la transcription du HTLV-I similaire à celle observée avec les facteurs ATF/CREB (Winter and Marriott 2007).

## **E. Rôle de la protéine virale Tax au niveau cellulaire**

Bien que les mécanismes moléculaires impliqués dans l'établissement de la transformation par HTLV-I ne soient pas clairement définis, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle primordial de la protéine Tax dans la transformation cellulaire et par conséquent son rôle potentiel dans l'établissement de l'ATL. La protéine Tax est ainsi capable, seule, de transformer *in vitro* des lignées fibroblastiques NIH3T3, Rat-1 et Rat-2 et son expression est nécessaire au maintien de cette transformation (Yamaoka, Tobe *et al.* 1992). Grâce à l'utilisation de souris transgéniques, Grossman *et al.*, ont montré que l'expression de la protéine Tax, contrôlée par le promoteur du gène *B*, dans des cellules T matures induisait le développement d'une leucémie granulocytaire chez la souris (Grossman, Kimata *et al.* 1995). De la même façon, il a été montré que des souris transgéniques exprimant Tax développaient spontanément des métastases osseuses (Gao, Deng *et al.* 2005). Enfin, par une approche similaire, l'expression de Tax contrôlée cette fois-ci par le promoteur viral dans des souris transgéniques est à l'origine de nombreuses tumeurs comme des lymphomes, des fibrosarcomes, des adénosarcomes ou encore des carcinomes pulmonaires (Coscoy, Gonzalez-Dunia *et al.* 1998; Hasegawa, Sawa *et al.* 2006).

Ces propriétés transformantes de Tax sont la conséquence de sa capacité à interférer avec de nombreuses protéines cellulaires, régulant ainsi leur expression et interférant avec plusieurs voies de signalisation cellulaires. Ainsi, Tax est oncogène par sa capacité à réguler les voies d'activation induites par les facteurs ATF/CREB, SRF, NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B), AP-1 et NFAT (nuclear factor of activated T-cell). Tax entraîne la prolifération et la transformation cellulaire par sa capacité à altérer le cycle cellulaire de l'hôte, à interférer avec les mécanismes régulant l'apoptose de la cellule et à inhiber les fonctions de la protéine p53 et la famille de protéines bHLH. Tax altère aussi la stabilité du génome cellulaire. Or, il est intéressant de noter que le PBM de Tax est essentiel à la prolifération des cellules T infectées, à l'instabilité génomique *in vitro* ainsi qu'à la persistance du virus *in vivo* (Xie, Yamamoto *et al.* 2006). Ce motif est indispensable à Tax pour son interaction avec des protéines à domaines PDZ, protéines qui seront détaillées dans le deuxième chapitre.

## **1. Tax régule les voies de signalisation d'activation cellulaire**

En plus de sa capacité à activer le génome viral, Tax régule de nombreux gènes cellulaires en contrôlant l'activité de plusieurs facteurs de transcription : ATF/CREB, SRF, NF- $\kappa$ B, AP-1 et NFAT. Les gènes induits par ces facteurs de transcription sont principalement des gènes précoces, des cytokines, des facteurs de croissance ou des oncogènes cellulaires.

### **a. La voie de signalisation ATF/CREB**

Comme nous l'avons déjà vu, la famille ATF/CREB est très importante pour la transcription virale dépendante de Tax puisque ce dernier stabilise les facteurs de la famille ATF/CREB sur des boîtes CRE imparfaites situées au niveau du promoteur du HTLV-I. De nombreux gènes cellulaires possèdent aussi dans leur promoteur une boîte CRE et sont activés par des signaux qui augmentent le niveau d'AMPc (Adénosine monophosphate cyclique) cellulaire. Ce taux élevé d'AMPc active la phosphorylation de CREB par la protéine kinase A (PKA), qui interagit alors avec les boîtes CRE et recrute CBP/p300. Tax est capable de former un complexe avec CREB mais celui-ci ne semble pas activer les boîtes CRE cellulaires (Jeang 2001). Des études démontrent que Tax réprime l'expression de certains gènes comme la *cycline A*, *p53* et *c-myc* en interagissant avec les facteurs de la famille ATF/CREB, les empêchant ainsi de jouer leur rôle initial au sein de la cellule (Azran, Schavinsky-Khrapunsky *et al.* 2004).

### **b. La voie de signalisation SRF**

Les cellules infectées par HTLV-I subissent l'activation de la transcription de gènes précoces comme *c-fos*, *c-jun*, *junB*, *junD* et *fra-1*, membres de la famille AP-1, mais aussi des gènes *egr-1* et *-2*, *krox-20* et *-24*.



L'expression de ces gènes est normalement activée par le facteur de réponse au sérum (SRF) en réponse à divers agents comme le sérum, le lipopolysaccharide (LPS), le 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA), des cytokines et le TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor), ce qui entraîne une stimulation de la prolifération cellulaire. SRF se lie sur l'ADN au niveau de l'élément de réponse au sérum (SRE) qui se situe dans le promoteur de ces différents gènes. La région SRE est composée de deux sites d'interaction : la boîte CArG avec en amont la boîte Ets (Figure 7). Après interaction avec la boîte CArG, les protéines SRF interagissent avec les facteurs du complexe ternaire TCF (ternary complex factors), qui se lient ainsi sur l'ADN au niveau des boîtes Ets. Les coactivateurs CBP/p300 et p/CAF sont ensuite requis pour l'activation des facteurs SRF (Azran, Schavinsky-Khrapunsky *et al.* 2004). La protéine Tax est capable d'activer ces gènes précoces en interagissant avec SRF et TCF, CBP/p300 et p/CAF.

### c. La voie de signalisation NF-kB

Les effets oncogéniques de Tax sont en partie attribués à sa capacité d'activer les facteurs de transcription de la voie NF-kB. En effet, ces facteurs sont impliqués dans la régulation de l'expression de nombreux gènes cellulaires associés à plusieurs fonctions biologiques : le développement embryonnaire, les réponses immunes et inflammatoires, la prolifération cellulaire, l'apoptose ou encore les réponses au stress et l'oncogénèse (pour revue *cf.* (Ahn and Aggarwal 2005)).

La fonction des facteurs NF-kB est reliée au proto-oncogène c-Rel. Les protéines membres de cette famille, p50 (NF-kB1), p52 (NF-kB2), p65 (RelA), RelB et c-Rel, se combinent pour former des homo- ou des hétérodimères ayant chacun une activité différente. Ils contiennent un domaine conservé de 300 acides aminés en N-terminal, appelé Rel homology domain (RHD), responsable de la liaison à l'ADN, de la dimérisation, de l'interaction avec les membres de la famille I $\kappa$ B et de la localisation nucléaire (Sarkar, Li *et al.* 2008). Dans les cellules T quiescentes, les facteurs NF-kB sont retenus dans le cytoplasme sous forme inactive *via* des interactions avec des protéines inhibitrices spécifiques de la famille I $\kappa$ B, dont les membres principaux sont I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$  et I $\kappa$ B $\epsilon$ , Bcl-3 et les précurseurs p100 et p105. Cette association provoque le masquage du domaine de localisation nucléaire de NF-kB par les protéines I $\kappa$ B. L'expression nucléaire de NF-kB est induite après stimulation de la cellule par une variété d'agents tels que des cytokines proinflammatoires comme le TNF $\alpha$  et l'IL-1 (interleukine 1), des mitogènes, des irradiations aux rayonnements UV, des ligands du récepteur TCR/CD8 (T-cell receptor/CD8), des lipopolysaccharides et suite à une infection virale ou bactérienne (Sarkar, Li *et al.* 2008). Cette activation se fait en deux étapes (Figure 8), l'une dans le cytoplasme, l'autre dans le noyau. La phase cytoplasmique débute par une phosphorylation de I $\kappa$ B $\alpha$  et I $\kappa$ B $\beta$  ce qui conduit à leur ubiquitinylation et leur dégradation par le protéasome. Cette phosphorylation est médiée par le complexe de kinases I $\kappa$ B (IKK) composée de deux sous-unités catalytiques, IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  et d'une sous-unité régulatrice, IKK $\gamma$ , connue aussi sous le nom de NEMO (NF-kB essential modulator), qui est dépourvue d'activité kinase intrinsèque et qui est impliquée dans la formation du complexe d'échafaudage avec les deux autres sous-unités. IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  sont activées et phosphorylées suite à leur interaction avec des protéines kinases appartenant à la famille des MAP3-kinases comme NIK (NF-kB-inducing kinase) et MEKK1 (mitogen-activated protein kinase/extracellular-signal regulated kinase (ERK) kinase kinase 1). La dégradation des facteurs I $\kappa$ B suite à leur phosphorylation par le complexe IKK permet la deuxième étape d'activation : les facteurs NF-kB vont être libérés et subir une translocation dans le compartiment nucléaire où ils pourront se fixer sur des séquences consensus présentes sur le promoteur des gènes cellulaires cibles. Au niveau du noyau, il a été montré que la protéine p65(RelA), après phosphorylation, recrute les coactivateurs CBP/p300 et p/CAF qui sont essentiels à l'activation des dimères NF-kB (Sarkar, Li *et al.* 2008).

Les facteurs NF-kB sont constitutivement activés dans des cellules infectées par HTLV-I ou exprimant Tax. Deux mécanismes permettent d'expliquer comment la protéine Tax active ces facteurs au niveau cytoplasmique

(Figure 9):

- i) Tax en s'associant avec la sous-unité régulatrice NEMO interagit avec le complexe IKK. Tax s'associe aussi avec les kinases MEKK1 et NIK et induit leur activité kinase. De cette manière, Tax en interagissant avec NEMO, favorise son oligomérisation au sein du complexe IKK ce qui favorise la phosphorylation des deux sous-unités IKKa et IKKb qui à leur tour phosphorylent et entraînent la dégradation des protéines inhibitrices de la famille I $\kappa$ B (Peloponese, Yeung *et al.* 2006).
- ii) Tax interagit aussi avec les protéines de la famille I $\kappa$ B entraînant leur dégradation par le protéasome indépendamment de leur phosphorylation par le complexe IKK (Peloponese, Yeung *et al.* 2006).

De plus, Tax joue un rôle important sur la régulation nucléaire de l'activation des facteurs NF- $\kappa$ B. En effet, dans le noyau, la protéine Tax et les facteurs NF- $\kappa$ B sont capables d'être co-localisés au niveau de corps nucléaires spécifiques de Tax qui sont des structures transcriptionnellement actives contenant l'ARN polymérase II et d'autres facteurs de transcription. De plus, il a été montré que Tax interagit directement avec les protéines p50, p52, p65(RelA) et cRel, favorisant leur dimérisation, essentielle pour leur fixation sur l'ADN au niveau des éléments de réponse aux facteurs NF- $\kappa$ B (Figure 9). Une fois fixée sur l'ADN, Tax peut aussi favoriser l'activation transcriptionnelle dépendante de NF- $\kappa$ B en recrutant les facteurs CBP/p300 et p/CAF directement sur le site de transcription (Peloponese, Yeung *et al.* 2006).

Des études récentes ouvrent la voie sur un nouveau mécanisme par lequel Tax active la voie NF- $\kappa$ B. En effet, Tax interfère sur la voie de signalisation de la phosphatidylinositol kinase-3 (PI3K)/Akt (Peloponese and Jeang 2006). Cette voie est activée par de nombreux facteurs de croissance et par les récepteurs de la réponse immune et permet la régulation de plusieurs fonctions biologiques : la transcription, la traduction, la prolifération et la survie cellulaire. La protéine Akt, ou protéine kinase B (PKB), est une kinase homologue à PKA et PKC. Or Akt est capable de phosphoryler IKKa entraînant la phosphorylation et la dégradation de I $\kappa$ Ba. De façon intéressante, une perturbation de cette voie de signalisation a été retrouvée dans plusieurs types de cancers humains invasifs comme dans l'ATL (Peloponese, Yeung *et al.* 2006). Récemment, Jeong *et al.*, (Jeong, Pise-Masison *et al.* 2005) ont montré que Tax pouvait activer la protéine Akt induisant l'activation des facteurs NF- $\kappa$ B. Ainsi, dans des cellules exprimant Tax, si la protéine Akt endogène est inhibée, cela empêche l'activation des facteurs NF- $\kappa$ B mais aussi l'inactivation de la fonction de la protéine p53. Akt semble donc jouer un rôle important sur l'activation des voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire dans les cellules infectées par HTLV-I en induisant l'activation des facteurs NF- $\kappa$ B et l'inhibition de la fonction de p53.

#### d. La voie de signalisation AP-1

Les facteurs de transcription de la famille AP-1 (activator protein-1) se retrouvent sous forme d'hétérodimères formés à partir des protéines des familles Jun (c-Jun, JunB et JunD et DJunD) et Fos (c-Fos, FosB, FosB2, Fra-1 et Fra-2) grâce à des interactions *via* leur domaine leucine zipper (ZIP). Les hétérodimères AP-1 peuvent aussi se former entre les familles Jun ou Fos et d'autres protéines de type ZIP, comme les facteurs de transcription des familles ATF/CREB et Maf. Ils jouent un rôle primordial dans la prolifération et la transformation des lymphocytes T, dans la régulation de l'apoptose et la production de cytokines (Hall and Fujii 2005). Les facteurs AP-1 ont tout d'abord été identifiés par leur capacité à se lier à l'ADN au niveau de séquences appelées TRE (TPA responsive element, identifiées sur le promoteur de la *collagénase* comme élément de réponse au TPA) (Lee, Mitchell *et al.* 1987). Par la suite, des sites de liaison aux facteurs AP-1 ont été identifiés dans de nombreux gènes cellulaires et viraux, comme par exemple les gènes codant pour l'IL-2, la cycline D1, le TGF- $\beta$  (Angel and Karin 1991). Selon l'hétérodimère formé, les protéines AP-1 peuvent aussi reconnaître les sites CRE. Ainsi, les combinaisons possibles d'hétérodimères et leurs modifications post-traductionnelles offre une régulation fine - et

variée - de l'expression des gènes contenant des éléments de réponse aux protéines AP-1.

Dans des lymphocytes T non stimulés, le niveau basal de protéines AP-1 est très faible, et une activation entraîne une induction rapide des gènes *jun* et *fos*. Les cellules T infectées par HTLV-I montrent une activation constitutive de ces gènes indépendamment de signaux externes ce qui peut contribuer à l'initiation de la transformation cellulaire impliquée dans l'ATL. Il a été démontré que Tax induit l'expression des gènes codant pour c-Jun, JunD, c-Fos et Fra-1 (Fujii, Niki *et al.* 1991). Cette induction est médiée par l'activation de la voie SRF par Tax (voir le paragraphe sur la voie de signalisation SRF). Récemment, la découverte de l'activation de Akt par Tax a permis d'expliquer un autre mécanisme d'activation des facteurs AP-1 (Peloponese and Jeang 2006).

#### e. La voie de signalisation NFAT

La famille des facteurs NFAT est représentée par des protéines impliquées dans la régulation de l'expression de gènes codant pour des cytokines, des récepteurs de surface cellulaire et des facteurs de transcription. La famille NFAT est composée de cinq membres structurellement liés et exprimés de façon différentielle dans les différentes lignées cellulaires : NFAT1-5. Elles possèdent un domaine similaire, de par sa conformation, au domaine Rel des protéines NF- $\kappa$ B, appelé RSD (Rel-similarity domain). Elles peuvent interagir directement avec l'ADN et d'autres facteurs de transcription comme les membres de la famille AP-1. Certains promoteurs, comme le promoteur de l'IL-2, sont composés d'une boîte NFAT/AP-1. Les protéines NFAT inactives sont séquestrées dans le cytoplasme sous forme de précurseurs hyperphosphorylés (Rao, Luo *et al.* 1997) (Figure 10). Suite à l'activation de la cellule, leur activité est régulée par la calcineurine, une phosphatase dépendante du calcium/calmoduline. Cette dernière contrôle par déphosphorylation la translocation des facteurs NFAT depuis le cytoplasme vers le noyau des cellules activées (Rao, Luo *et al.* 1997).

Dans les cellules Jurkat stablement transfectées par Tax ou dans des cellules T infectées par HTLV-I, il a été mis en évidence une activation constitutive de l'activité de liaison à l'ADN de la protéine NFAT1 liée à sa déphosphorylation constitutive. NFAT1 est l'un des facteurs importants qui se lie à l'élément de réponse du CD28 (CD28RE), situé au niveau du promoteur de l'IL-2. Aussi, Tax peut induire la transcription du gène IL-2 en contrôlant l'activité de la protéine NFAT1. L'expression constitutive des récepteurs à l'IL-2 (IL-2R) par la voie NF- $\kappa$ B et l'activation de l'expression du gène codant pour l'IL-2 par la voie NFAT laisse à penser que cette boucle autocrine IL-2/IL-2R favorisée par Tax contribue à la prolifération des cellules infectées et à leur transformation en cellules leucémiques *in vivo*.

## **2. Tax régule le cycle cellulaire de la cellule**

Une des caractéristiques principales du cancer est la perte de contrôle de la régulation dans la progression du cycle cellulaire. Les protéines de la famille Rb (Rb, p107, p130) jouent un rôle important dans la régulation de la prolifération cellulaire. Rb est inactivée sous forme hyperphosphorylée grâce à des complexes de kinases dépendantes des cyclines, les cdk (cyclin-dépendant kinase) activées lors de signaux mitogènes. Dans sa forme hypophosphorylée, Rb inhibe l'activité des facteurs de la famille E2F (Figure 11). Ainsi, la phosphorylation de Rb par le complexe cycline D-cdk libère les facteurs E2F qui pourront alors activer la transcription de gènes cellulaires impliqués dans le point de contrôle autorisant le passage de la phase G1 vers la phase S, comme la *cycline A* ou *c-myc* (Kehn, Fuente Cde *et al.* 2005). Il existe plusieurs inhibiteurs de ce point de contrôle comme p16<sup>INK4A</sup>, p15<sup>INK4B</sup>, p18<sup>INK4C</sup> et p19<sup>INK4D</sup> (Figure 12). Ces inhibiteurs agissent principalement en réprimant les complexes de kinases de la phase G1 comme la cycline D/cdk-4 et -6 (Barbeau and Mesnard 2007).

Il a été montré que Tax augmentait les activités transcriptionnelles de plusieurs protéines E2F (Figure 13). Tax

régule positivement l'expression des gènes cellulaires stimulant le passage de la phase G1 à la phase S comme les gènes *E2F-1*, *cycline D2*, *cycline E*, *cdk-4* et *-6* (Lemasson, Thebault *et al.* 1998) et réprime l'expression des inhibiteurs p18<sup>INK4C</sup> et p19<sup>INK4D</sup> (Iwanaga, Ohtani *et al.* 2001). De plus, Tax interagit et dérégule les activités de plusieurs régulateurs du cycle cellulaire comme Rb, p16<sup>INK4A</sup>, p15<sup>INK4B</sup> et la cycline D3 (Neuveut, Low *et al.* 1998; Kehn, Deng *et al.* 2004). L'expression de p21<sup>Waf1</sup> est normalement activée par la protéine p53 afin d'engendrer un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 par l'inhibition des complexes cdk. Dans les cellules infectées par HTLV-I, l'expression de p21<sup>Waf1</sup> est fortement activée et la protéine Tax stimule l'association de p21<sup>Waf1</sup> avec la cycline D2 et cdk-4 afin de créer un complexe capable d'accélérer la transition de la phase G1 à S et d'inhiber l'apoptose (Akita, Kawata *et al.* 2005). Tous ces effets de Tax sur ces protéines régulatrices du cycle cellulaire mènent à un raccourcissement de la phase G1, une transition accélérée de la cellule en phase S et une inhibition de l'apoptose, tous ces mécanismes étant impliqués dans la prolifération des cellules T infectées par HTLV-I (Schmitt, Rosin *et al.* 1998).

De plus, Tax dérégule la transition de la phase G2 à la mitose en interagissant *in vitro* et *in vivo* avec les protéines de régulation du point de restriction G2/M : cdc25, Chk1 et Chk2. Ainsi, dans les cellules infectées par HTLV-I, la répression de cdc25 n'a plus lieu et la progression vers la mitose est accélérée (Afonso, Zamborlini *et al.* 2007). Tax interagit aussi avec la protéine MAD1 (mitotic arrest-deficient), une protéine régulant le point de restriction du fuseau mitotique qui permet d'arrêter la progression du cycle cellulaire avant l'anaphase lorsque les chromosomes ne sont pas correctement alignés. Plusieurs protéines cellulaires régulent ce point de contrôle, comme les protéines MAD1 et MAD2. Or, Tax entraîne la relocalisation de MAD1 du noyau vers le cytoplasme (Jin, Spencer *et al.* 1998). MAD1 joue aussi un rôle dans la cytokinèse. La perte de fonction de MAD1 liée à l'activité de Tax pourrait donc expliquer certaines aberrations chromosomiques et la formation de cellules multinucléées.

### 3. Tax inhibe l'apoptose

Les stimuli apoptotiques sont classés en deux voies : la voie médiée par les séquences *via* les ligands Fas et TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) et la voie induite chimiquement par des drogues chimiothérapeutiques et les irradiations (Johnstone, Ruefli *et al.* 2002). Ces deux voies apoptotiques ciblent la mitochondrie pour libérer le cytochrome c dans le cytoplasme activant les caspases et entraînant la mort cellulaire. Bcl2 et Bcl-X<sub>L</sub> sont impliquées dans la régulation de la signalisation apoptotique et jouent un rôle protecteur contre la mort cellulaire en maintenant l'homéostasie mitochondriale (Tsujimoto and Shimizu 2000). Les cellules T immortalisées et transformées par HTLV-I *in vitro* ont des niveaux d'expression élevés des protéines anti-apoptotiques Bcl2 et Bcl-X<sub>L</sub> (Nicot, Mahieux *et al.* 2000). Tax *trans*-active le promoteur Bcl-X<sub>L</sub> *via* la voie NF-kB et protège la cellule des stimuli apoptotiques d'une manière dépendante de la mitochondrie. De plus, Tax stimule l'expression de gènes impliqués directement dans l'inhibition de l'apoptose dont FAP-1 (Fas-associated phosphatase 1), XIAP (X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis) et IAP (inhibitor of apoptosis1). Plusieurs études suggèrent que l'induction de l'activité de NF-kB médiée par Tax contribue à la leucémogénèse *in vivo* en stimulant la résistance à l'apoptose des cellules infectées par HTLV-I. Les cellules exprimant HTLV-I sont faiblement susceptibles à l'apoptose induite par les anticorps anti-Fas ou des agents stressants (Copeland, Haaksma *et al.* 1994). De plus, l'inactivation par Tax de protéines comme p53, p16<sup>INK4A</sup>, p15<sup>INK4B</sup>, et MAD1, régulateurs clé de la prolifération cellulaire, entraîne la résistance des cellules T infectées à l'apoptose.

### 4. Tax réprime les fonctions de p53 et des membres de la famille bHLH

En réponse à plusieurs types de stress cellulaires ou des lésions de l'ADN, la protéine p53 est activée et

entraîne soit l'arrêt de la division cellulaire et la réparation de l'ADN, soit l'apoptose. Dans une cellule normale, p53 est maintenue à un faible niveau d'expression grâce à son ubiquitinylation continue aboutissant à sa dégradation par le protéasome. Lorsque la cellule est soumise à un stress, p53 se stabilise et s'accumule dans le noyau où elle régule l'expression de plus de 150 gènes. Ces gènes sont principalement impliqués dans la régulation de l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou encore les processus de réparation de l'ADN empêchant ainsi la prolifération de cellules endommagées (Bode and Dong 2004). Or l'expression de Tax dans les cellules est associée à une inactivation de la fonction de p53 (Pise-Masison, Choi *et al.* 1998). Plusieurs mécanismes semblent impliqués dans cette inactivation. Tax entraîne une phosphorylation constitutive de p53 qui n'est alors plus capable de lier le facteur de transcription basal TFIID, ni la protéine MDM2, la ligase responsable de l'ubiquitinylation et donc de la dégradation de p53. La voie NF- $\kappa$ B joue aussi un rôle important dans l'inactivation de la fonction de p53, notamment en induisant sa phosphorylation (Pise-Masison, Mahieux *et al.* 2000). Une autre étude montre que Tax favorise le complexe p65(RelA)-p53. Ce complexe ne fixe plus TFIID et entraîne une répression de l'expression de MDM2 (Jeong, Radonovich *et al.* 2004). Comme nous l'avons déjà mentionné dans le paragraphe sur la voie de signalisation NF- $\kappa$ B, un autre mécanisme d'inactivation de la fonction de p53 implique la protéine Akt. En effet, Tax en activant cette protéine, induit une activation de la voie NF- $\kappa$ B, une inhibition de p53 et favorise la survie des cellules transformées par HTLV-I (Jeong, Pise-Masison *et al.* 2005). Plusieurs études ont aussi montré que l'inhibition de la fonction de p53 est liée à une séquestration par Tax des co-activateurs CBP/p300 qui ne peuvent donc plus être recrutés par la protéine p53. Ce dernier mécanisme permet aussi d'expliquer la répression de Tax sur l'expression des gènes régulés par les protéines de la famille bHLH (basic helix-loop-helix) (Riou, Bex *et al.* 2000). Les protéines de cette famille forment des complexes homo- ou hétérodimériques capable de se fixer sur des boîtes E et ont des effets différents sur l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire, comme par exemple l'expression de la tyrosine kinase p56<sup>lck</sup> (Lemasson, Robert-Hebmann *et al.* 1997) et de l'inhibiteur CDK p18<sup>ink4c</sup> (Suzuki, Narita *et al.* 1999). En interagissant avec les co-activateurs CBP/p300, Tax inhibe les fonctions transcriptionnelles des protéines de la famille bHLH au niveau des boîtes E.

## 5. Tax altère la stabilité génomique

Après la dérégulation du cycle cellulaire et l'acquisition de la résistance à l'apoptose, l'instabilité génomique est la troisième caractéristique des cellules cancéreuses.

Les cellules transformées par HTLV-I isolées de patients infectés possèdent de nombreuses anomalies chromosomiques comme des délétions, des translocations, des réarrangements, des duplications et des aneuploidies. Bien que Tax puisse perturber les fonctions de la cellule en affectant par exemple l'activation transcriptionnelle de certains gènes, celui-ci ne génère pas directement de dommages au niveau de l'ADN. En outre, Tax interfère avec les différents mécanismes cellulaires qui conduisent à l'instabilité génomique. Ainsi, Tax altère les voies de réparation de l'ADN cellulaire. La voie de réparation par excision de base, BER (base excision repair) et la voie de réparation par excision de nucléotide, NER (nucleotide exchange repair) sont les cibles privilégiées de Tax. Des effets de Tax sur les deux autres voies de réparation ont récemment été décrites : la voie de réparation des erreurs d'appariement de nucléotides, MMR (mismatch repair) et enfin la voie de réparation des coupures double-brin d'ADN, DSBR (double-strand break repair) (Ng, Iha *et al.* 2001; Morimoto, Tsukada *et al.* 2005). Tax agit en réprimant la transcription de la polymérase  $\beta$  impliquée dans les voies BER et MMR tandis qu'il inhibe la voie NER en *trans*-activant le promoteur du gène *PCNA* (proliferating cell nuclear antigen). PCNA est un cofacteur nécessaire à l'ADN polymérase  $\delta$ , une enzyme impliquée dans la réparation et la réplication de l'ADN. L'augmentation de l'expression de PCNA dans les cellules exprimant Tax permet la suppression de la voie NER et la réplication de l'ADN endommagé.

Tax perturbe aussi le maintien de l'intégrité du génome en perturbant le fonctionnement de la télomérase, une

enzyme renfermant une activité reverse transcriptase (hTERT). Dans la plupart des cellules cancéreuses, l'expression de hTERT est élevée. Les cellules d'ATL sont aussi caractérisées par une activité importante de la télomérase. Mais l'effet de Tax sur hTERT est plus complexe. En effet, il a été montré que suite à une stimulation par un mitogène, Tax réprime l'activité de la télomérase (Gabet, Mortreux *et al.* 2003). Ainsi, Tax réprime la transcription de hTERT ce qui favorise une accumulation transitoire de réarrangements chromosomiques. Lors de l'évolution de la cellule infectée vers un état leucémique, l'expression de Tax est réprimée ce qui peut engendrer une réactivation de la télomérase. Ceci permet d'éviter le raccourcissement des télomères, stimulant la prolifération de cellules endommagées et menant ainsi à l'ATL. La réactivation de la télomérase est un événement clé dans la progression vers l'ATL et il a été suggéré qu'elle soit un des marqueurs du diagnostic de cette pathologie.

Un autre phénomène apparaît lors de l'instabilité génomique : l'aneuploïdie qui peut s'expliquer par une erreur dans la duplication du centrosome. Le centrosome joue un rôle important en contrôlant la polarité cellulaire en régulant la distribution des microtubules, phénomène essentiel dans la ségrégation des chromosomes. Lorsqu'une erreur apparaît lors de la réplication du centrosome, les centrosomes ainsi amplifiés peuvent conduire à la formation de multiples points de restriction du fuseau mitotique entraînant une instabilité génomique. De récentes études démontrent que Tax est capable de déréguler la réplication des centrosomes en interagissant avec les protéines cellulaires TAX1BP2 et RANBP1 (Peloponese, Haller *et al.* 2005; Ching, Chan *et al.* 2006).

En 1995, l'équipe de K. Jeang démontrait *in vitro* l'importance de la présence de la partie C-terminale de Tax pour conduire à une instabilité génomique (Semmes, Majone *et al.* 1996). Deux ans plus tard, le motif d'interaction avec les protéines à domaine PDZ (PBM) a été identifié (Rousset, Fabre *et al.* 1998). Depuis, plusieurs études ont montré que ce motif est essentiel dans la prolifération et la transformation cellulaire induite par Tax (Suzuki, Ohsugi *et al.* 1999; Hirata, Higuchi *et al.* 2004; Xie, Yamamoto *et al.* 2006).

Dans le chapitre suivant sera détaillé la découverte, la structure ainsi que les différentes classifications de domaines PDZ et les familles de protéines à domaine PDZ. Nous verrons par la suite leur implication dans la polarité cellulaire qui, de par son importance dans le maintien de l'intégrité cellulaire, conduit ces protéines à être la cible de plusieurs oncogènes viraux.

## Chapitre II : Les protéines à domaines PDZ

### A. Découverte des domaines PDZ

Les domaines PDZ ont été décrits pour la première fois suite à la présence d'une répétition de séquence au sein de trois protéines : post-synaptic density 95 (PSD-95), discs large (Dlg) et zonula occludens-1 (ZO-1). Ces motifs ont d'abord été nommés domaines GLGF (Gly-Leu-Gly-Phe) suite à la présence de la répétition de ce motif dans la partie C-terminale du domaine PDZ, et aussi DHR pour discs large homology region. Peu après, l'acronyme PDZ (prenant en compte les initiales des trois premières protéines découvertes : PSD-95, Dlg, ZO-1) a été adopté par la communauté scientifique (Kennedy 1995).

Les protéines à domaines PDZ représentent 0,2 à 0,5 % des cadres ouverts de lecture chez les métazoaires, avec 484 protéines chez *Homo sapiens*, 153 protéines chez *Drosophila melanogaster* et 95 protéines chez *Caenorhabditis elegans*. Dans les autres organismes comme les plantes (*Arabidopsis thaliana*) ou les levures (*Saccharomyces cerevisiae*), on ne retrouve que 23 et 3 protéines à domaine PDZ, respectivement (Schultz, Copley *et al.* 2000).

Ces domaines sont rapidement reconnus comme capables d'interagir avec le domaine C-terminal de protéines

partenaires formant par la suite des complexes supra-moléculaires.

## B. Structure

Le domaine PDZ est composé de 80 à 90 acides aminés agencés en 6 feuillets  $\beta$  entrelacés ( $\beta$ A- $\beta$ F) et 2 hélices  $\alpha$  ( $\alpha$ A et  $\alpha$ B) (Figure 14). Le motif GLGF, complété en amont d'une séquence très conservée de 4 acides aminés (R ou K-XXX-GLGF), aussi appelé boucle d'interaction du carboxylate, permet de former une boucle de connexion entre le feuillet  $\beta$ A et  $\beta$ B et contribue à l'interaction entre le domaine PDZ et la protéine d'interaction. Les parties N et C-terminales du domaine PDZ sont situées à l'opposé du site d'interaction, une caractéristique idéale pour un domaine d'interaction d'une protéine globulaire (Nourry, Grant *et al.* 2003).

## C. Classifications

### 1. Classification des domaines PDZ

La découverte quasi continue de nouveaux domaines PDZ et du rôle physiologique de leur ligand a entraîné des complications dans la mise en place d'une classification.

Au départ, les domaines PDZ ont été séparés en 3 classes selon le motif C-terminal des protéines partenaires (Tableau II). Les protéines de classe I, dont font partie les protéines PSD-95,Dlg et ZO-1, interagissent préférentiellement avec un motif C-terminal comprenant un résidu serine ou thréonine en position (-2)(Nourry, Grant *et al.* 2003). Les domaines PDZ de classe II interagissent avec un motif composé de résidus hydrophobes (par ex : Val, Tyr, Phe, Leu, Ile) (Nourry, Grant *et al.* 2003). La protéine CASK est à l'origine de l'étude de cette classe II (Songyang, Fanning *et al.* 1997). La troisième classe de domaines PDZ comprend la protéine nNOS (neuronal nitric oxide synthase) qui interagit de préférence avec les acides aminés chargés négativement en position (-2) (Nourry, Grant *et al.* 2003). Depuis, d'autres domaines PDZ avec des motifs d'interaction différents ont été découverts. C'est le cas de la protéine Mint1-1 (Msx2 interacting nuclear target) qui interagit avec un motif D-H-W-C (Tableau II). Ceci a engendré la proposition d'une autre classification basée sur la nature (hydrophobe, polaire, aromatique, négative) des acides aminés situés au niveau de deux points critiques : l'un au niveau du résidu situé immédiatement après le feuillet  $\beta$ B et l'autre au niveau du résidu situé en première position de l'hélice  $\alpha$ B1. Selon ce principe, les domaines PDZ ont été divisés en 25 groupes auxquels ont été attribués différentes caractéristiques d'interaction avec les ligands (Bezprozvanny and Maximov 2001). Il est fort probable que ces classifications évolueront dans le futur compte tenu de l'augmentation des données sur les domaines PDZ et leurs ligands.

Bien que l'interaction entre un domaine PDZ et le motif C-terminal de son ligand représente le mode d'association le plus commun, de nouveaux modes d'interaction sont décrits. Ainsi, les domaines PDZ peuvent aussi interagir avec d'autres domaines PDZ et les deux protéines peuvent former des homo- ou hétérodimères. Un exemple de ce type d'interaction est le domaine PDZ N-terminal de la protéine nNOS qui s'associe à la fois avec le domaine PDZ des protéines PSD-95 et  $\alpha$ 1-syntrophin (Nourry, Grant *et al.* 2003). Grâce à l'utilisation de banques de phages, des interactions entre les domaines PDZ et des peptides cycliques ont pu être démontrées. Ces peptides possèdent généralement un motif similaire au motif C-terminal additionné de résidus cystéines pouvant former un pont disulfure capable d'induire un changement dans la conformation de la boucle  $\beta$  du domaine PDZ facilitant ainsi l'interaction (Gee, Sekely *et al.* 1998). Récemment, il a pu être démontré que les domaines PDZ pouvaient aussi interagir avec des lipides comme le phosphatidylinositol 4,5-biphosphate ( $PIP_2$ ) (Zimmermann, Meerschaert *et al.* 2002). En effet, le  $PIP_2$  est fortement concentré au niveau de la membrane plasmique, compartiment cellulaire auquel sont associées de nombreuses protéines à domaines PDZ. C'est le cas des protéines

synthétin, CASK ou Tiam-1 qui interagissent avec le  $PIP_2$ , ce dernier rentrant en compétition pour l'interaction entre le domaine PDZ de ces protéines et leur ligand possédant un motif C-terminal.

Bien que les modes d'interaction des domaines PDZ avec leurs ligands soient assez polyvalents, une grande partie s'opère par le mécanisme « classique » où un domaine PDZ s'associe avec une protéine partenaire *via* son motif C-terminal. De nouveaux partenaires ne cessent d'être découverts et chez les mammifères, on retrouve entre autres des récepteurs couplés aux protéines G, des récepteurs de facteurs de croissance, des récepteurs de neurotransmetteurs, des canaux ioniques ou encore des molécules d'adhérence.

## 2. Classification des protéines à domaines PDZ

Les protéines possédant des domaines PDZ peuvent être divisées en trois groupes (Figure 15) :

- i) Les protéines à domaines PDZ multiples : elles ne possèdent que des domaines PDZ dont le nombre varie de 1, comme pour la protéine PICK-1, à plus de 10, comme la protéine MUPP-1 qui en possède 13.
- ii) Les protéines de la famille MAGUKs (membrane-associated guanylate kinases) : elles possèdent 1 ou 3 domaines PDZ, un domaine SH3, un domaine HOOK et un domaine guanylate kinase (GuK) dépourvu de toute activité enzymatique. Certaines protéines de cette famille peuvent posséder d'autres domaines, comme la protéine CASK qui compte 1 domaine calmodulin kinase (CAMK) et 2 domaines L27 (Lin2 Lin7). Tous ces domaines servent de modules d'interactions entre protéines. Dans cette famille, on retrouve les protéines PSD95, Dlg et ZO-1.
- iii) Les protéines à domaines PDZ avec d'autres domaines protéiques : elles possèdent 1 ou plusieurs domaines PDZ et d'autres domaines comme les domaines ankirine, LIM (domaine mis en évidence chez Lin-11, Isl-1 et Mec-3), L27, C2, PH (pleckstrin homology domain), WW (domaine contenant 2 tryptophanes invariants), DEP (domaine mis en évidence chez Dishevelled, Egl-10 et Pleckstrin) et LRR (leucine rich repeat). La famille LAP (LRR and PDZ) comprenant les protéines Erbin, Densin et Scribble, est incluse dans cette troisième famille de protéines à domaines PDZ.

## Chapitre III : Rôle des protéines à domaines PDZ dans la polarité cellulaire

La polarité cellulaire se manifeste par une distribution asymétrique des protéines au niveau du cytoplasme et de la membrane plasmique. Etant donné que la membrane plasmique sert d'interface entre la cellule et son environnement, la polarisation de la membrane et du cytosquelette de la cellule est particulièrement cruciale pour les différentes fonctions de la cellule, comme nous le verrons en détail avec les lymphocytes T. La polarisation de la membrane implique la création de régions distinctes composées de protéines, lipides et glycoprotéines. Les mécanismes permettant de cibler les protéines dans ces compartiments spécifiques sont essentiels et c'est à ce niveau qu'interviennent les protéines à domaines PDZ en s'organisant *in vivo* sous forme de complexes



macromoléculaires. Trois complexes de protéines ancestrales, possédant pour la plupart des domaines PDZ, sont aujourd'hui caractérisés pour jouer un rôle lors de cette polarisation.

## A. La polarité dans les cellules épithéliales

Les cellules épithéliales forment la base de la structure des tissus et donc des organes. Ces tissus régulent les échanges de molécules du compartiment extérieur vers les autres tissus. Pour assurer ces fonctions, les cellules épithéliales sont fortement polarisées. Les caractéristiques de cette polarité sont similaires chez *Drosophila*, *C. Elegans* et chez les mammifères, même s'il existe quelques spécificités au sein de chaque espèce.

La polarité épithéliale se caractérise par une organisation des protéines au sein de deux compartiments membranaires bien distincts : la membrane apicale, en contact avec la lumière, et la membrane basolatérale, du côté des tissus. Ces deux compartiments sont séparés par des jonctions étroites ou septées et adhérentes (Figure 16). Ces jonctions sont indispensables pour former une barrière étanche entre le milieu extérieur et les tissus, et permettent de limiter la diffusion des protéines de transport membranaires entre les deux compartiments. D'autres jonctions dites d'ancrage sont reliées au cytosquelette d'actine et maintiennent l'architecture de la cellule et son ancrage à la lame basale ainsi qu'aux cellules avoisinantes. Enfin, les jonctions de type « gap-junction » servent au transport de molécules de petite taille pour passer directement de l'intérieur d'une cellule vers l'intérieur d'une autre cellule (Dow and Humbert 2007).

Le pôle apical est spécialisé dans le transport de nutriments, d'ions vers la cellule et les tissus avoisinants. La membrane apicale se retrouve souvent sous la forme de microvillosités qui sont des protrusions de membranes cytoplasmiques, afin d'augmenter les surfaces d'échange avec l'environnement extérieur. Certaines cellules épithéliales ont pour fonction de sécréter des molécules vers le milieu extérieur. La membrane apicale est alors le siège de formation de vésicules d'exocytose (cellules glandulaires par exemple) (Dow and Humbert 2007).

La membrane basolatérale est en contact avec les cellules avoisinantes ainsi qu'avec le tissu conjonctif. Les cellules adhèrent les unes aux autres grâce à différents types de jonctions. L'anneau de jonctions adhérentes, communes aux cellules de *Drosophila* et de mammifères, forment la zonula adherens (ZA), qui sépare le pôle apical du pôle basolatéral. Les protéines E-cadhérine, a- et b-caténine sont les composants principaux de ces jonctions.

Chez les mammifères, les jonctions serrées sont situées du côté apical des jonctions adhérentes (Figure 16). Elles sont formées grâce à des protéines membranaires (Claudines, Occludine et JAM) qui interagissent avec plusieurs complexes de protéines d'échafaudage et de signalisation. Ces protéines peuvent être réparties en 2 groupes : les protéines à domaines PDZ et des protéines régulatrices cytoplasmiques. Les complexes de polarité Crumbs et Par font partie du 1<sup>er</sup> groupe, ainsi que les protéines ZO-1, -2 et -3, MAGI-1, -2 et -3. Ces protéines servent d'adaptateurs entre les protéines membranaires et le cytosquelette d'actine ou des protéines régulatrices. Les protéines Cdc42 et aPKC font parties du 2<sup>ème</sup> groupe et sont indispensables à la formation des jonctions serrées (Dow and Humbert 2007).

Chez *Drosophila*, il n'existe pas de jonctions serrées, mais des jonctions septées, situées du côté basal des jonctions adhérentes (Figure 16). Les protéines transmembranaires comme la Neurexin IV et des protéines de la famille ERM se retrouvent au niveau de ces jonctions, tout comme les protéines à domaines PDZ Dlg et Scribble du complexe de polarité Scrib. Dans les cellules épithéliales de mammifères, ce complexe se localise au niveau du compartiment basolatéral.

## B. La polarité dans les lymphocytes T

Les défenses de l'organisme reposent sur une coopération entre différents types cellulaires du système

immunitaire. Les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigène (APC), comme les macrophages, les cellules dendritiques (DC), et les lymphocytes B, coopèrent dans le but d'induire une réponse immune efficace suite à la reconnaissance d'un antigène. Cette coopération peut se faire grâce aux contacts cellulaires directs qui interviennent entre ces cellules. La migration lymphocytaire est une des premières étapes qui mène à ces contacts cellulaires et qui permettent par la suite la reconnaissance d'un antigène présenté sur une APC. Lorsque l'antigène spécifique est reconnu, il se forme alors une synapse immunologique. Ces trois étapes nécessitent un changement morphologique profond de la cellule impliquant la localisation polaire de nombreuses protéines.

## 1. La migration

Le lymphocyte migre soit du sang vers les tissus, soit au travers des tissus. Il devient alors polarisé, avec une évolution du cytosquelette d'actomyosine, des microtubules, du trafic vésiculaire et la formation d'une asymétrie au niveau des récepteurs de surface, et au sein de complexes protéiques conservés impliqués dans la polarité : les complexes de polarité. Le lymphocyte T présente alors deux pôles (Figure 17) : le front de migration (leading edge) enrichi en actine de type F et qui permet au lymphocyte T de se propulser en avant avec une activité quasiment sensorielle. Ce pôle regroupe des récepteurs impliqués dans le chimiotactisme, comme les récepteurs aux chimiokines CCR2, CCR5 et CXCR4 (Nieto, Frade *et al.* 1997; Singer, Scott *et al.* 2001), ainsi que les éléments du cytosquelette d'actomyosine. L'autre pôle est situé à l'arrière de la cellule, c'est l'uropode. On y retrouve des molécules d'adhérence qui sont rattachées au cytosquelette et aux microtubules. Les domaines membranaires tels que les radeaux lipidiques jouent aussi un rôle dans cette asymétrie et se retrouvent distribués différemment au sein des deux pôles, permettant ainsi la compartimentation des protéines membranaires (Gomez-Mouton, Abad *et al.* 2001; Millan, Montoya *et al.* 2002).

## 2. La reconnaissance d'une APC

Lorsqu'une cellule T rencontre une APC, les premiers contacts qui se forment mettent en jeu un système d'adhérence de faible affinité indépendant de l'antigène. ICAM-3 (intercellular adhesion molecule-3), fortement exprimée dans les lymphocytes T quiescents, joue un rôle important dans ce mécanisme avec LFA-1 (leukocyte function antigen-1) et interagit avec DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbin nonintegrin), une protéine exprimée au niveau des APC (Montoya, Sancho *et al.* 2002).

Une fois l'antigène reconnu, plusieurs mécanismes contribuent à la stabilisation du complexe cellule T-APC, afin de maintenir les deux cellules proches lors de la stimulation. Cette interaction entraîne un changement dans la polarité du lymphocyte et les molécules d'adhérence comme ICAM-1 et -3, concentrées au niveau de l'uropode lors de la migration du lymphocyte, se retrouvent alors projetées vers l'avant de la cellule au niveau du contact cellulaire. Ce changement de localisation est peut-être lié à des protéines impliquées dans le transport vésiculaire, comme les protéines ERM (ezrin-radixin-moesin) (Serrador, Vicente-Manzanares *et al.* 2002; Tilghman and Hoover 2002), qui interagissent avec Dlg, et aussi grâce aux remaniements des rafts lipidiques (Tilghman and Hoover 2002). Ainsi, l'interaction entre ICAM-3 et LFA-1 avec DC-SIGN et les protéines ICAM permet un premier contact de faible affinité, suivi par l'interaction entre CD2 et CD58 qui permet un rapprochement des deux membranes nécessaire à la reconnaissance du peptide porté par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Il a été montré que l'engagement du complexe CD3/TCR, de ICAM-3 et de CD2, permet d'induire l'adhérence entre LFA-1 et ICAM-1 (Dustin and Springer 1989; Campanero, del Pozo *et al.* 1993), ce qui renforce le contact entre l'APC et la cellule T suite à la reconnaissance d'un complexe CMH-peptide spécifique du TCR. Cette reconnaissance entraîne une cascade de signalisation qui active le lymphocyte T et diminue la mobilité du lymphocyte T.

L'activation du lymphocyte T entraîne des réponses précoces en aval du TCR, avec une accumulation de

calcium intracellulaire et l'activation de phosphotyrosines sous l'action des kinases Lck (lymphocyte specific protein tyrosine kinase) et ZAP-70 (z-chain associated protein kinase, 70 kDa), Lck interagissant avec l'une des protéines des complexes de polarité. Ceci montre une fois de plus l'implication de ces complexes à la fois dans la migration et la signalisation du lymphocyte T.

### 3. La formation d'une synapse immunologique

Lorsque le TCR reconnaît un antigène spécifique, il y a formation d'une synapse immunologique (IS) mature qui correspond à la structuration d'un réseau complexe de récepteurs et de protéines cytoplasmiques. La réorganisation de la cellule entraîne une repolarisation du cytosquelette d'actomyosine, la réorientation du MTOC du côté de la synapse et la formation d'une structure riche en actine à l'arrière de la cellule appelée le pôle distal (distal-pole complex). Au sein de l'IS, les molécules sont regroupées sous forme d'amas tri-dimensionnels appelés « supramolecular activation clusters » (SMACs) (Figure 18). Il existe plusieurs SMACs : le SMAC central (cSMAC) composé du complexe TCR/CD3, des complexes CD4/CMH-peptide ou CD8/CMH-peptide avec la molécule de co-stimulation CD28 qui interagit avec le CD80 ou CD86 situé sur l'APC. Le cSMAC est entouré par le « peripheral SMAC » (pSMAC) dans lequel on retrouve les molécules d'adhérence comme LFA-1 qui interagit avec ICAM. Une troisième structure nommée « distal SMAC » (dSMAC) est caractérisée par la présence des protéines CD43, CD44 et CD45 et par une structure riche en actine (Huppa and Davis 2003). La signalisation semble être assurée grâce à une structuration supramoléculaire appelée microcluster (Seminario and Bunnell 2008). Cette structure est en perpétuelle évolution : elle se forme à l'extérieur de la synapse immunologique et se dirige vers le cSMAC où elle devient alors inactive. Les microclusters regroupent des protéines telles que ZAP-70, LAT (linker for activation of T-cells), GRB2 (growth-factor-receptor-bound protein-2), GRAP2 (GRB2 adaptator protein-2), et SLP76 (SRC homology-2 (SH2)-domain-containing leukocytes, 76 kDa) (Billadeau, Nolz *et al.* 2007). Les mécanismes impliqués dans la mobilité de ces microclusters sont encore indéterminés bien que de nombreuses études mettent en jeu la régulation de la polarisation du cytosquelette d'actine (Seminario and Bunnell 2008).

Grâce à leur fonction d'adaptateur entre les récepteurs et les molécules des voies de signalisation, les complexes de polarité ont la capacité de former de larges complexes moléculaires et jouent un rôle important lors de la régulation de la polarité. Ces complexes ont d'abord été découverts chez les invertébrés grâce à des mutations permettant de prédire leur rôle dans la polarité cellulaire. Ils sont au nombre de trois et sont détaillés dans le chapitre suivant.

## C. Les complexes de polarité

Le premier complexe est le complexe PAR, composé par les protéines Par3 aussi appelée Bazooka (Baz), Par6, et la protéinase K atypique (aPKC). La protéine transmembranaire Crumbs (Crb) associée à Stardust (Sdt) et dPATJ forme le deuxième complexe appelé CRUMBS. Le troisième complexe, SCRIB, est composé par les protéines Scribble (Scrib), Discs Large (Dlg) et Lethal giant larvae (Lgl). Parmi les neuf protéines que composent ces complexes, six possèdent un ou plusieurs domaines PDZ. Des organismes modèles comme *C. elegans* et *D. melanogaster* ont permis de découvrir ces complexes puis les études génétiques ont démontré l'existence de protéines ubiquitaires conservées lors de l'évolution dans plusieurs types cellulaires. Ces protéines ont été particulièrement étudiées ces dernières années dans les cellules épithéliales, et quelques études commencent à démontrer leur importance dans les lymphocytes.

### 1. Le complexe Par

#### a. Découverte du complexe Par

Les premiers gènes impliqués dans la polarisation cellulaire ont été identifiés par Kempthorn *et al.*, en 1988 grâce à leurs études sur les divisions asymétriques observées sur des zygotes de *C. elegans* (Kempthorn, Priess *et al.* 1988). Des mutations létales affectant l'asymétrie observée lors des divisions cellulaires ont été détectées grâce à des criblages génétiques et les gènes identifiés, au nombre de six, ont été appelés *par* pour « partition defective » (défaut de partition). Elles sont distribuées de façon asymétrique au stade unicellulaire de l'embryon de *C. elegans* et sont requises pour la transmission des informations nécessaires à la distribution asymétrique des protéines régulatrices impliquées dans les premières étapes du cycle cellulaire et pour l'orientation du fuseau mitotique. Quelques années plus tard, un septième gène *par* a été découvert et code pour la protéine kinase C atypique (PKC-3). Les mutants n'exprimant pas PKC-3 meurent et ont un phénotype similaire à celui observé chez les mutants n'exprimant pas Par3. Ces deux protéines interagissent *in vitro*, colocalisent dans l'embryon précoce de *C. elegans* et dépendent l'une de l'autre pour conserver leur localisation asymétrique. Par6 étant indispensable au maintien de la distribution asymétrique de Par3, le concept du premier complexe protéique de polarité, Par6/Par3/PKC3 est né (Figure 19) (Tabuse, Izumi *et al.* 1998). Ces trois protéines forment un complexe stable chez *C. elegans*, mais aussi chez *D. melanogaster* et dans les cellules de mammifères (Tableau III). Chez ces derniers, il existe deux homologues de Par3 (Par3 ou ASIP et Par3b), trois de Par6 (Par6a, Par6b et Par6g) et deux de PKC3 (aPKCz et aPKCi/1) (Humbert, Dow *et al.* 2006).

### b. Rôle du complexe Par

L'établissement de la polarité apico-basale au niveau de l'épithélium de *Drosophila* est le système le plus étudié pour comprendre le rôle du complexe Par. Le recrutement de ce complexe au niveau du compartiment sub-apical constitue l'une des premières étapes requises pour l'établissement de la polarité épithéliale. Par3 et Par6 possèdent tous deux des domaines PDZ et un site d'interaction avec aPKC (Figure 20). La localisation du complexe Par au niveau du compartiment sub-apical est dépendante de l'interaction de Par6 avec la forme active de Cdc42 ce qui permettrait de réguler l'activité spatio-temporelle de aPKC. Le compartiment sub-apical de *Drosophila* correspond aux jonctions serrées observées dans l'épithélium des vertébrés (Figure 16). Chez les mammifères, la protéine JAM sert de point d'ancrage à Par3 permettant ainsi le recrutement au niveau des jonctions serrées de Par6 et aPKC qui interagissent directement avec Par3 (Assemat, Bazellieres *et al.* 2008).

Chez les mammifères, le complexe Par a été impliqué dans les premières étapes de migration des cellules astrocytaires de rat et des fibroblastes en réponse à une blessure. Dans ce modèle, les intégrines, engagées avec la matrice extracellulaire, se localisent à l'avant de la cellule en migration et entraînent l'activation et le recrutement de Cdc42, qui à son tour recrute et active le complexe Par6-aPKC. L'activité de aPKC permet l'association de la protéine suppresseur de tumeur adénomateux polyposis coli (APC) avec le pôle positif des microtubules, favorisant ainsi leur polarisation et leur polymérisation vers l'avant de la cellule (Humbert, Dow *et al.* 2006).

Dans les lymphocytes T en migration, Par3, Par6, aPKC et Lgl sont tous localisés au centre de la cellule. Par6 interagit avec Lgl qui s'associe à la fois avec la myosine II et les syntaxines, des protéines capables de contrôler le transport des vésicules vers la membrane plasmique. aPKC interagit et phosphoryle l'ubiquitine E3 ligase Smurf1, ce qui favorise la dégradation de RhoA et réduit ainsi les propriétés contractiles de l'actine. De plus, Par3, en interagissant avec Tiam1 et la kinase LIM (LIMK), régule aussi le cytosquelette d'actine. Ainsi, le complexe Par est impliqué dans la régulation des filaments d'actine au niveau du centre de la cellule, ainsi que dans le transport vésiculaire à travers la régulation des syntaxines, ces deux mécanismes étant impliqués dans la mobilité cellulaire (Krummel and Macara 2006).

Le complexe Par est aussi présent lors de la formation de la synapse immunologique (IS) du lymphocyte T. Il semble être recruté au niveau de l'IS grâce au complexe Crumbs (Krummel and Macara 2006).

De par ses interactions avec Lgl ou encore le complexe Crumbs, il est impossible d'isoler le rôle du complexe Par des autres complexes de polarité.

## 2. Le complexe Crumbs

### a. Découverte du complexe Crumbs

En 1990, Tepass *et al.*, établirent l'existence d'un lien entre la polarité épithéliale et *crumbs* (*crb*), un gène initialement identifié chez *D. melanogaster*. Les mutants n'exprimant pas la protéine Crb sont incapables de former des jonctions adhérentes ce qui entraîne une perte de la polarité et de l'adhérence cellulaire, suivi par la décomposition de la structure épithéliale et la mort cellulaire (Tepass, Theres *et al.* 1990).

Le gène *Crb* code pour une protéine membranaire de 200 kDa composée de domaines extracellulaires répétés (30 domaines apparentés au facteur de croissance de l'épiderme (EGF) et 4 domaines apparentés au domaine G de la laminine A) et d'une courte queue cytoplasmique de 37 acides aminés indispensable à sa fonction (Figure 21). Medina *et al.*, ont démontré que cette queue cytoplasmique constituait un lien avec la chaîne lourde b de la spectrine dans des cellules de *Drosophila* (Medina, Williams *et al.* 2002). En 1993, Tepass et Knust ont observé que les défauts de développement causés par une mutation du gène *Stardust* (*Sdt*) ressemblaient fortement à ceux observés lors d'une mutation du gène *Crb*. En effet, *Sdt* code pour une protéine de la famille MAGUK et interagit avec la partie C-terminale de Crb. Cette interaction permet l'activation de Sdt qui signale en aval de Crb (Tepass and Knust 1993). Puis, en 1999, Bhat *et al.*, caractérisent une nouvelle protéine composée de quatre domaines PDZ qu'ils nomment Disc Lost (*Dlt*) (Bhat, Izaddoost *et al.* 1999). Celle-ci interagit avec Crb et apparaît essentielle pour l'établissement et le maintien de la polarité épithéliale. Par la suite, des mutations correspondant au phénotype de *dlt* ont montré que la protéine mise en cause dans ce phénotype était l'homologue de la codanine-1 chez *Drosophila*, une protéine cytoplasmique, et non pas la protéine à domaine PDZ précédemment caractérisée, appelée désormais Dpatj (Pielage, Stork *et al.* 2003). Dpatj possède 1 domaine d'interaction L27 lui permettant de s'associer avec le domaine L27 de la protéine Sdt. Il s'ensuit la formation du deuxième complexe de polarité, Crb/Sdt/Dpatj.

Suite à la découverte de ce complexe chez *Drosophila*, des homologues ont été découverts chez les mammifères. Il existe trois homologues de Crb chez les mammifères (Tableau III), nommés CRB1, CRB2 et CRB3. L'homologue de Sdt est PALS1 (protein associated with lin seven 1), aussi appelée membrane-associated palmitoylated protein 5 (MPP5). Et il existe deux homologues de Dpatj : PATJ (Pals-associated tight jonction) (Roh, Liu *et al.* 2002) et MUPP1 (multi-PDZ domain protein) (Ullmer, Schmuck *et al.* 1998).

### b. Rôle du complexe Crumbs

Le rôle principal du complexe Crumbs est d'établir et de stabiliser la formation des jonctions serrées. Chez les mammifères, la protéine PALS1 sert d'adaptateur entre les protéines CRB et PATJ ou MUPP1. PALS1, membre de la famille MAGUK, interagit grâce à son domaine PDZ avec le PDZ Binding Motif (PBM) de CRB, et par association de leur domaine L27, PALS1 interagit avec les protéines PATJ et MUPP1 (Figure 22). Or, PATJ, grâce à ses domaines PDZ 8 et 6, s'associe respectivement avec les protéines Claudine-1 et ZO-3, cette dernière étant localisée au niveau des jonctions serrées grâce à son interaction avec la protéine Occludine. Il est à noter que les protéines Claudine-1 et Occludine sont des protéines trans-membranaires qui forment la base de l'architecture des jonctions serrées. Le complexe Crb, ainsi localisé aux jonctions serrées, participe à leur formation et à leur stabilisation et il a été démontré que des déplétions de l'une ou l'autre des protéines par la technique du RNAi entraîne un retard dans la formation de ces jonctions (Straight, Shin *et al.* 2004) (Shin, Straight *et al.* 2005).

La formation d'une couche de cellules épithéliales polarisées avec des jonctions serrées fonctionnelles nécessite donc une coordination entre les différents complexes de polarité. Cependant, les trois complexes ont des localisations bien distinctes : les complexes Par et Crumbs se localisent en effet tous deux au niveau des jonctions serrées et régulent leur assemblage au niveau de la membrane apicale. Leur coopération est renforcée par la

démonstration récente de l'association entre ces deux complexes grâce à l'interaction directe entre Par6 et Pals1 (Hurd, Gao *et al.* 2003). Cette interaction, comme nous l'avons déjà mentionné dans le chapitre précédent, permet à ces deux complexes de jouer un rôle au niveau de la synapse immunologique du lymphocyte T. En revanche, le complexe Scrib ne se localise pas dans les mêmes régions que les deux autres complexes de polarité, et il est même indispensable pour restreindre leur localisation au niveau des jonctions serrées des cellules épithéliales.

### 3. Le complexe Scrib

#### a. Découverte du complexe Scrib

*Drosophila lgl* fut le premier gène suppresseur de tumeur décrit dans la littérature scientifique moderne. Il fut découvert par Bridges en 1930 et publié par Hadorn en 1938 (Scharrer and Hadorn 1938) puis le gène *lgl* fut cloné et caractérisé en 1985 par Mechler *et al.*, (Mechler, McGinnis *et al.* 1985). Les drosophiles mutées au niveau du gène *lgl* exhibent un phénotype typique du cancer avec une excroissance au niveau des disques imaginaux et du cerveau qui entraîne la mort de la larve avant même son entrée dans le stade de la métamorphose (De Lorenzo, Mechler *et al.* 1999).

Le gène *dlg* a été identifié en 1991 lors d'une mutation chez *Drosophila* entraînant une perte des jonctions septées, structure homologue aux jonctions serrées chez les vertébrés, ainsi que des tumeurs au niveau du cerveau chez la larve et au niveau des cellules épithéliales des disques imaginaux. Il est alors considéré que *dlg* est un gène suppresseur de tumeur. Elle fut utilisée comme marqueur spécifique pour localiser les jonctions septées à n'importe quel stade du développement de *Drosophila* (Woods and Bryant 1991).

Récemment, le gène *Scribble* (*Scrib*) a été identifié chez *Drosophila* lors d'un criblage visant à découvrir des mutations perturbant les aspects morphologiques de la structure épithéliale comme l'adhérence cellulaire, la forme tissulaire et la polarité (Bilder and Perrimon 2000). La couche externe sécrétée par l'épiderme de *Drosophila*, appelée cuticule, se structure normalement, au niveau embryonnaire, avec une forme lisse et des couches continues de cuticules. Lorsque les embryons sont mutés au niveau du gène *Scrib*, ils produisent une surface cuticulaire plissée, criblée de trous, d'où le nom de Scribble qui signifie « griffonnage ». La même année, Bilder *et al.*, établirent l'existence d'une corrélation entre *Scrib*, *lgl* et *dlg* (Bilder, Li *et al.* 2000). En effet, lorsque ces gènes sont mutés chez *Drosophila*, ces dernières ont un phénotype similaire à celui observé chez les mutants de *Scrib*. Les mutants de *Scrib* développent de nombreux défauts au niveau de l'organisation du tissu épithélial avec des cellules rondes, de forme irrégulière et empilées les unes sur les autres. Une autre caractéristique permettant de relier ces 3 protéines est que la localisation au niveau du cortex cellulaire de Scrib et Lgl dans les cellules épithéliales dépend de la présence de Dlg, tandis que la localisation de Dlg au niveau des jonctions septées nécessite la présence de Scrib et Lgl (Yamanaka and Ohno 2008).

Toutes ces observations ont permis de définir que Lgl, Dlg et Scrib agissent de concert pour réguler la polarité cellulaire et la prolifération des cellules épithéliales chez *Drosophila*. D'autres études ont aussi permis de définir le rôle primordial de ces trois protéines pour la polarisation des neuroblastes (Albertson and Doe 2003).

#### b. Structure des protéines

##### i. Lgl

*Lgl* est très conservé chez les eucaryotes et il existe deux homologues de *Drosophila lgl* chez les vertébrés (Tableau III) : *lgl1* qui code pour Lgl1 aussi nommée Hugl1, une protéine de 115kDa, et *lgl2* qui code pour Lgl2, une protéine de 113 kDa. La structure des domaines protéiques est conservée chez les eucaryotes (Figure 23). La protéine Lgl, bien que partie intégrante du complexe Scrib, ne possède pas de domaine PDZ. Elle est composée de 5 domaines WD40 répétés situés dans la partie N-terminale (6 domaines WD40 pour Lgl-1 et -2) impliqués dans l'assemblage de complexes protéiques. Par6 s'associe avec le domaine WD40 de Lgl, tout comme la protéine Scrib *via* son domaine LRR (Kallay, McNickle *et al.* 2006). Dans sa partie C-terminale, Lgl possède

un domaine très conservé spécifique des protéines Lgl où se trouvent des résidus sérine phosphorylés par aPKC.

### ii. Dlg

La protéine Dlg est membre de la famille des protéines MAGUKs caractérisées par la présence de 3 domaines protéiques distincts (Figure 23) :

- 1 ou plusieurs domaines PDZ situés en partie N-terminale
- 1 domaine SH3
- 1 domaine guanylate kinase (GuK)

Dlg possède en plus d'autres régions conservées : le domaine HOOK, situé entre les domaines SH3 et GuK. Elle a un poids moléculaire de 102 kDa. Il existe 5 protéines homologues de Dlg chez les mammifères (Tableau III): Dlg1 (hDlg/SAP97), Dlg2 (PSD-93/Chapsyn-110), Dlg3 (NE-Dlg/SAP102), Dlg4 (PSD-95/SAP90) avec un poids moléculaire variant de 80 à 200 kDa. Dlg1 a la particularité de posséder un domaine L27 supplémentaire en N-terminal.

### iii. Scribble

Scribble possède dans sa partie N-terminale 16 domaines répétés riches en leucines (LRR) ancrant la protéine à la membrane, suivis de deux domaines spécifiques LAP (LAPSD) a et b, et de 4 domaines PDZ situés dans la partie C-terminale (Figure 23). De par cette structure, Scribble fait partie de la famille LAP (Leucin-rich And PDZ) au même titre que Erbin, Lano et Densin-180. C'est une protéine de 1630 résidus avec un poids moléculaire de 220 kDa. Le seul homologue de Scrib chez les mammifères est hScrib, bien que Lano, malgré l'absence de domaine PDZ, possède des domaines LRR très similaires à Scrib.

## c. Rôle du complexe Scrib chez *Drosophila*

### i. Dans les neuroblastes

Les neuroblastes de *Drosophila*, qui se développent à partir de cellules ectodermiques neurogènes, subissent une série de divisions asymétriques, chaque division permettant ensuite de produire soit un neuroblaste, soit une cellule mère ganglionnaire. Lgl, Dlg et Scrib jouent un rôle important dans la distribution asymétrique des protéines basales, mais aussi pour l'asymétrie au niveau de la taille de la cellule et du fuseau mitotique au cours de la mitose du neuroblaste (Ohshiro, Yagami *et al.* 2000; Albertson and Doe 2003).

En 2003, Betschinger *et al.*, démontrent l'interaction directe entre Lgl et le complexe Par6/aPKC dans les neuroblastes, ce dernier jouant aussi un rôle lors de leur polarisation. Lorsque aPKC phosphoryle Lgl au niveau de ses 3 résidus sérine situés dans la partie C-terminale, Lgl est alors inactivée au niveau apical, tandis qu'elle reste active au niveau basal (Betschinger, Mechtler *et al.* 2003).

### ii. Dans les cellules épithéliales

Au niveau de l'épiderme embryonnaire, l'inactivation des gènes *scrib*, *dlg* ou *lgl* entraîne une délocalisation du complexe Crumbs du pôle apical vers les régions latérales de la cellule (Bildler, Li *et al.* 2000; Bildler and Perrimon 2000). Le rôle du complexe Scrib dans la polarité passe par un maintien de Crumb au niveau apical.

Par un mécanisme similaire à celui décrit dans les neuroblastes, Lgl restreint la localisation du complexe Par au niveau apical, tandis que Par-6 et aPKC sont impliqués dans l'inactivation de Lgl au niveau apical et la localisation de Lgl au niveau basal (Hutterer, Betschinger *et al.* 2004).

Des expériences de mutations sur Dlg exprimée chez *Drosophila* ont permis de définir les domaines impliqués de cette protéine dans l'établissement des structures épithéliales ainsi que dans la prolifération cellulaire. Ainsi, deux domaines apparaissent essentiels à la localisation de Dlg au niveau des jonctions septées : le domaine HOOK, qui est nécessaire à la localisation de Dlg au niveau du cortex cellulaire, et le deuxième domaine PDZ,

qui permet une accumulation de Dlg aux jonctions septées (Hough, Woods *et al.* 1997). Grâce à cette approche, il a été démontré que le deuxième et le troisième domaine PDZ de Dlg sont nécessaires à la régulation de la prolifération, mais pas pour l'établissement de la structure épithéliale, tandis que les domaines HOOK et SH3 sont essentiels pour ces deux fonctions.

Dans le cas de Scrib, des expériences similaires démontrent que les domaines LRR de Scrib sont nécessaires à la localisation de Scrib au niveau du cortex cellulaire, tandis que les domaines PDZ-1 et -2 sont nécessaires à l'accumulation de Scrib aux jonctions septées (Zeitler, Hsu *et al.* 2004). Les domaines LRR sont aussi nécessaires pour l'établissement de la polarité ainsi que pour la régulation de la prolifération. Les domaines PDZ permettent d'augmenter la capacité des domaines LRR à contrôler la prolifération.

Il semble donc que Scrib et Dlg aient des fonctions similaires au niveau de la cellule épithéliale grâce à leurs domaines respectifs. Récemment, grâce au criblage d'une banque d'ADN codant de *Drosophila*, Mathew *et al.*, ont mis en évidence une protéine interagissant avec le domaine GuK de Dlg (Mathew, Gramates *et al.* 2002). Ils ont démontré que cette protéine, nommée GUK-Holder (GUKH), est exprimée au cours de la formation du bouton synaptique. GUKH interagit aussi avec le PDZ-2 de Scribble créant ainsi un lien entre les protéines Dlg et Scribble.

#### d. Rôle du complexe Scrib dans les cellules épithéliales de mammifères

Tout comme dans chez *Drosophila*, les complexes Par et Crumbs se localisent aux jonctions serrées et au niveau apical, régulant la formation de ces jonctions ainsi que l'établissement de la polarité apico-basale (Figure 24). Au contraire, les homologues mammifères de Lgl, Dlg et Scrib se localisent au niveau de la région basolatérale et sont capables de restaurer les défauts de polarité observés lors de la mutation des gènes respectifs chez *Drosophila* (Thomas, Phannavong *et al.* 1997; Dow, Brumby *et al.* 2003; Grifoni, Garoia *et al.* 2004). Ils sont donc considérés comme des homologues fonctionnels des suppresseurs de tumeurs de *Drosophila*. Des analyses dans des cellules adhérentes comme les MDCK ou les Caco-2 ont permis de définir que ces protéines nécessitent la présence de la E-cadhérine pour être localisées correctement à la membrane plasmique (Reuver and Garner 1998; Musch, Cohen *et al.* 2002; Navarro, Nola *et al.* 2005).

##### i. Rôle de Lgl

Tout comme cela a été démontré chez *Drosophila*, Lgl1 et Lgl2 interagissent avec le complexe Par6/aPKC, et sont phosphorylées par aPKC dans les cellules épithéliales et dans les fibroblastes (Plant, Fawcett *et al.* 2003; Yamanaka, Horikoshi *et al.* 2003). L'interaction de Lgl avec le complexe Par6/aPKC précède l'association de Par3 avec ce complexe en interagissant avec et en inhibant la partie catalytique de aPKC, ce qui a pour conséquence d'empêcher la formation du pôle apical. Suite à l'activation de aPKC par la forme active de Cdc42, aPKC phosphoryle Lgl qui se détache alors du complexe Par6/aPKC (Figure 25). Lgl devient alors inactive au niveau du pôle apical, tandis qu'elle reste active au niveau du pôle basolatéral ce qui entraîne l'exclusion du complexe Par6/aPKC du pôle basolatéral, et contribue ainsi à l'intégrité de la localisation des complexes de polarité dans la cellule (Yamanaka, Horikoshi *et al.* 2006).

D'autres mécanismes encore peu connus permettent d'expliquer le rôle de Lgl dans le maintien de la polarité cellulaire. Il semble que Lgl soit impliquée dans la régulation de la polarisation de l'exocytose et dans la régulation du cytosquelette d'actomyosine en interagissant directement avec la myosine II (Vasioukhin 2006).

##### ii. Rôle de Dlg

hDlg, la protéine humaine la plus homologue à Dlg, est aussi la plus étudiée dans les cellules épithéliales. Dans ces dernières, hDlg interagit avec la protéine E-cadhérine (Figure 25) afin d'être localisée au niveau des sites de contacts cellulaires (Reuver and Garner 1998). Le domaine L27 de hDlg interagit avec les protéines MPP2,



MPP3, MPP7, Lin2/Cask et Lin7 (Assemat, Bazellieres *et al.* 2008). Ces interactions sont indispensables pour maintenir hDlg au niveau des sites de contacts cellulaires. Le domaine HOOK, situé entre le domaine SH3 et le domaine GuK de la protéine, permet de localiser la protéine au niveau du cortex cellulaire en établissant un lien entre le cytosquelette d'actine après interaction avec les protéines 4.1 et Ezrin, membres de la famille ERM (ezrin, radixin and moesin) (Hanada, Takeuchi *et al.* 2003).

### iii. Rôle de hScrib

Dans les cellules épithéliales, hScrib se localise au niveau des membranes latérales par l'intermédiaire de la E-cadhérine (Navarro, Nola *et al.* 2005) (Figure 25). Son inhibition n'altère pas la formation des jonctions adhérentes et ne perturbe pas significativement la polarité apicobasale des cellules MDCK. Cependant, en absence de hScrib, les cellules acquièrent une apparence mésenchymateuse, migrent plus rapidement et de manière aléatoire. L'adhérence cellulaire, par l'intermédiaire de la E-cadhérine, est aussi perturbée en absence de hScrib (Navarro, Nola *et al.* 2005). Dans la lignée cellulaire humaine MCF10A, hScrib n'est pas nécessaire au maintien de la polarité apicobasale ; en revanche, une diminution de l'expression de hScrib perturbe la migration épithéliale et le recrutement de Cdc42 et de Rac1 au front de migration (Dow, Kauffman *et al.* 2007). hScrib semble donc impliquée dans la régulation de l'adhérence et de la migration mais son rôle dans la régulation de la polarité apicobasale reste à éclaircir.

En revanche, son implication dans la régulation de la polarité planaire a pu être démontrée grâce à l'analyse de souris mutantes dites *circletail*. Ces souris n'expriment plus la protéine hScrib et présentent des défauts sévères de la fermeture du tube neural conduisant à la mort rapide de l'embryon. Or, un phénotype similaire est observé chez les souris mutées au niveau du gène *Vangl2*, un homologue mammifère de *Strabismus*, un gène impliqué dans l'établissement de la polarité planaire chez *Drosophila*. Par la suite, il s'est avéré que l'interaction entre Scrib et Vangl2, *via* les domaines PDZ 3 et 4 de Scrib et le PBM de Vangl2, était nécessaire à l'établissement de la polarité planaire dans les cellules épithéliales de cochlée chez la souris (Kallay, McNickle *et al.* 2006).

### e. Rôle des protéines Dlg au niveau des synapses

Les millions de neurones que composent le cerveau des mammifères communiquent les uns les autres *via* des jonctions spécialisées que sont les synapses. La majorité de ces synapses se retrouvent au contact entre un axone pré-synaptique et une dendrite post-synaptique. Afin d'être excitées, elles utilisent le glutamate comme neurotransmetteur qui est excrété au niveau de l'axone pré-synaptique et agit sur des récepteurs-canaux situés au niveau post-synaptique. On retrouve deux principaux types de récepteurs au glutamate : le récepteur à l'AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique acid) (AMPA) et à la NMDA (N-méthyl-D-aspartic acid) (NMDARs). Ces derniers s'ouvrent afin de libérer des ions  $\text{Na}^+$  (ou aussi des ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cas des NMDAR) permettant la propagation de la dépolarisation du neurone post-synaptique. La transmission synaptique dépend de la localisation et de la disposition de nombreuses protéines spécialisées de chaque côté de la synapse. Ainsi, la synapse est soumise à une plasticité indispensable permettant des modifications de la composition moléculaire ainsi que des modifications post-traductionnelles des protéines synaptiques (Okabe 2007).

Il existe une zone dense au niveau post-synaptique appelée PSD (post-synaptic density) où se forme un complexe macro-moléculaire spécialisé dans la signalisation post-synaptique et dans la plasticité. Cette zone est composée de récepteurs de tyrosine kinases, de récepteurs couplés aux protéines G, de canaux ioniques, de molécules d'adhérence et de protéines d'échafaudage (Figure 26).

PSD-95 (Dlg-4) est la 1<sup>ère</sup> protéine d'échafaudage découverte dans la PSD. Par la suite, les autres membres de la famille Dlg (Dlg-1, -2, -3), ont été identifiés. Leur localisation au niveau du PSD semble dépendante de leur palmitoylation (El-Husseini, Craven *et al.* 2000). Grâce à leurs domaines PDZ, les protéines Dlg interagissent avec les PBM de nombreuses protéines membranaires situées au niveau post-synaptique. Ainsi, les canaux

potassiques voltage-dépendants interagissent avec PSD-95. L'interaction entre PSD-95 et les sous-unités des NMDAR semble indispensable pour maintenir ces derniers au niveau post-synaptique. Cependant, une mutation de PSD-95 chez la souris ne modifie pas la localisation de ces récepteurs. Il semble que les autres membres de la famille Dlg puissent compenser la perte de PSD-95 pour cette fonction. Par l'intermédiaire de protéines transmembranaires appelées TARPs (Transmembrane AMPA receptors regulatory protein) possédant un PBM dans leur partie C-terminale, les protéines Dlg interviennent aussi dans la localisation post-synaptique et l'activité des AMPARs. PSD-95 interagit aussi avec des molécules de signalisation, comme par exemple SPAR (Spine-associated RapGAP), SynGAP (synaptic RAS GTPase-activating protein) ou les protéines de la voie nNOS (neuronal nitric oxide synthase). De plus, par son interaction avec la neuroligine, une protéine membranaire impliquée dans la différenciation synaptique, PSD-95 est impliquée dans le développement synaptique. Enfin, par son interaction avec la protéine GKAP (guanylate kinase-associated protein), PSD-95 est liée à d'autres protéines d'échafaudage comme la protéine Shank (SH3 and ankyrin repeat-containing protein) et la protéine Homer qui se lie au récepteur mGluR (metabotropic glutamate receptors). Ces protéines, situées dans la partie cytoplasmique de la zone PSD, interagissent avec des protéines du cytosquelette. De plus, *via* le domaine L27, PSD-95 interagit avec la myosine VI (Okabe 2007).

Ainsi, les protéines Dlg jouent un rôle multiple dans l'organisation du domaine PSD et dans sa fonction en intervenant dans la localisation des récepteurs AMPA et NMDA, des canaux potassiques voltage-dépendants, en jouant le rôle de protéine d'échafaudage entre ces récepteurs et les molécules des voies de signalisation qui en découlent, et avec les protéines du cytosquelette.

#### f. Rôle de hScrib dans les astrocytes

Dans les astrocytes, hScrib contrôle la polarité au cours de la migration cellulaire (Osmani, Vitale *et al.* 2006). hScrib, normalement localisée au niveau des jonctions cellulaires, est recrutée dès l'initiation de la migration au front de migration des cellules épithéliales et des astrocytes (Figure 27) (Osmani, Vitale *et al.* 2006; Dow, Kauffman *et al.* 2007). Ainsi, la déplétion de hScrib endogène par ARN interférence inhibe la réorientation du centrosome et de l'appareil de Golgi vers le front de migration. La surexpression ou la délocalisation de hScrib perturbe aussi l'orientation des cellules et induit la formation de multiples régions protrusives (Osmani, Vitale *et al.* 2006).

Le complexe bPIX/GIT1 (PAX-interacting exchange factor b/G-protein-coupled receptor kinase-interacting protein 1) joue un rôle important dans la régulation de la polarité par hScrib. En effet, dans les astrocytes, l'interaction constitutive entre hScrib et  $\beta$ PIX augmente au cours de la polarisation des cellules. Les deux protéines co-localisent à la membrane plasmique au front de migration et hScrib est nécessaire au recrutement et au maintien de  $\beta$ PIX à la membrane plasmique. L'interaction entre hScrib et bPIX est essentielle à la polarisation astrocytaire. Ainsi, l'expression d'une forme tronquée de  $\beta$ PIX incapable d'interagir avec hScrib inhibe complètement la réorientation du MTOC et la protrusion cellulaire. Enfin, l'inhibition de l'expression de bPIX par ARN interférence induit un phénotype similaire à celui causé par la suppression de hScrib (Audebert, Navarro *et al.* 2004).

Cdc42 est aussi impliquée dans la régulation de la polarité cellulaire, notamment au cours de la division cellulaire et de la différenciation des cellules polarisées (cellules épithéliales, neurones...). Au cours de la polarisation des astrocytes, Cdc42 se localise spécifiquement au front de migration où elle est activée (Etienne-Manneville and Hall 2001). L'expression d'un mutant de Cdc42 comme la délocalisation de la forme active de la protéine inhibe la polarisation des cellules. Cdc42 recrute et active le complexe Par6-aPKC au front de migration, ce qui conduit au recrutement de la protéine APC et hDlg à l'avant des cellules en migration (Etienne-Manneville,

Manneville *et al.* 2005). Or, une diminution de l'expression de hScrib ou de  $\beta$ PIX inhibe l'activation de Cdc42 au cours de la polarisation astrocytaire. Le rôle de hScrib et  $\beta$ PIX dans le contrôle de l'activité de Cdc42 est confirmé par le fait que la suppression de ces protéines affecte la voie de signalisation en aval de Cdc42 et en particulier le recrutement d'APC et de hDlg au front de migration (Osmani, Vitale *et al.* 2006).

Ainsi, le recrutement de hScrib au front de migration des astrocytes permet, par l'intermédiaire du facteur d'échange  $\beta$ PIX, de réguler l'activité et la localisation de Cdc42. Ceci conduit à la formation du front de migration astrocytaire.

#### g. Rôle du complexe Scrib dans les lymphocytes T

Les complexes de polarité Par, Crumbs et Scrib, de par leur capacité à former de larges complexes multi-protéiques, ont un rôle majeur dans l'établissement et le maintien de la polarité dans les cellules épithéliales mais aussi dans les lymphocytes T. Ludford-Menting *et al.*, ont démontré que les protéines des complexes de polarité sont exprimées dans les lymphocytes T avec une localisation asymétrique (Figure 28) (Ludford-Menting, Oliaro *et al.* 2005). Ils mettent en évidence le rôle de ces complexes dans l'établissement de réseaux protéiques impliqués dans la migration, la formation de l'uropode, la formation des synapses immunologiques et la signalisation *via* le TCR lors de son activation.

L'effet de hScrib dans les lymphocytes T est étudié grâce à des expériences d'ARN interférence diminuant l'expression de hScrib dans des lymphocytes T cytotoxiques. Ces cellules perdent alors leur capacité à former des uropodes, migrent beaucoup moins et sont incapables de former une synapse immunologique.

Le rôle du complexe Scrib dans la migration lymphocytaire et la formation d'uropode peut s'expliquer par les nombreuses interactions protéiques qui existent entre ce complexe et des protéines impliquées dans la régulation du trafic vésiculaire comme le complexe  $\beta$ PIX/GIT1 ; du cytosquelette d'actomyosine comme la myosine II ou Cdc42, impliquée dans l'orientation du front de migration ; et dans le recyclage de récepteurs vers le front de migration comme le recyclage des récepteurs couplés aux protéines G. Certaines de ces interactions ont été démontrées dans d'autres types cellulaires, mais il semble raisonnable de penser qu'elles peuvent s'appliquer dans les lymphocytes T.

La régulation du cytosquelette d'actomyosine est aussi un des événements clés nécessaires à la formation de la synapse immunologique. Or, l'activation du complexe TCR/CD28 induit la formation d'un complexe Lck-hDlg-ZAP70-Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) impliqué dans la polymérisation de l'actine. Au sein de ce complexe, hDlg facilite l'interaction de Lck avec ZAP70 et WASp (Round, Tomassian *et al.* 2005). Une diminution de l'expression de hDlg par ARN interférence inhibe la formation des complexes Lck-WASp et Lck-ZAP70, ainsi que la polarisation de CD3 et des rafts lipidiques au niveau de la synapse immunologique. Une étude récente permet de mieux comprendre le rôle de hDlg dans l'activation lymphocytaire. En réprimant l'expression de hDlg dans les lymphocytes de rat, Stephenson *et al.*, démontrent que l'expression de hDlg n'est pas nécessaire pour le développement thymique des lymphocytes et pour la signalisation du TCR, mais qu'elle est indispensable à la régulation négative de la prolifération lymphocytaire suite à une activation (Stephenson, Sammut *et al.* 2007).

Récemment, l'interaction entre hScrib et CRTAM, une protéine connue pour être stimulée lors de l'activation lymphocytaire, montre que hScrib est indispensable à la régulation de la prolifération suite à une activation, à la polarisation de protéines comme la taline, ainsi que pour la production de cytokine (IFN $\gamma$  et IL22) (Yeh, Sidhu *et al.* 2008).

#### h. Rôle du complexe Scrib dans la tumorigénèse

Plusieurs études démontrent l'interaction de protéines du complexe Scrib avec d'autres protéines suppresseurs

de tumeurs.

Ainsi, hDlg interagit avec la protéine adenomatous polyposis coli (APC) *via* la partie C-terminale de APC et le PDZ-2 de hDlg (Matsumine, Ogai *et al.* 1996). APC est mutée dans la plupart des polyposes adénomateuses familiales (FAP) et dans la majorité des cas de cancers colorectaux sporadiques. Ces mutations interviennent principalement dans la région d'interaction de APC avec la b-catenine, entraînant une accumulation de la b-catenine et de ce fait une activation de la voie Wnt. Cette voie est liée à l'activation de nombreux gènes cibles comme par exemple l'oncogène c-Myc ou encore la cycline D1. L'interaction entre APC et la b-catenine joue donc un rôle important dans le rôle suppresseur de tumeur de APC. Cependant, il a aussi été démontré l'importance du complexe APC-hDlg dans ce rôle, ce dernier permettant de réguler négativement la progression du cycle cellulaire entre la phase G0/G1 et la phase S (Ishidate, Matsumine *et al.* 2000). De plus, le complexe APC/hDlg est impliqué dans la polarisation et la migration des cellules astrocytaires (Etienne-Manneville, Manneville *et al.* 2005). Dans ces cellules, la PKCz activée par Cdc42 inactive la glycogène-synthase kinase (GSK)-3b, ce qui permet la localisation de APC, suite à son interaction avec la b-catenine, au niveau des extrémités positives des microtubules. Grâce au complexe Par6/PKCz, hDlg est recrutée à la membrane où il s'associe alors avec APC afin de promouvoir la polarisation et la migration des cellules. Dans des cellules embryonnaires de souris, le complexe b-catenine/APC interagit avec hScrib (Takizawa, Nagasaka *et al.* 2006). hScrib interagit avec le PBM de APC *via* ses domaines PDZ 1 et 4 et cette interaction semble être nécessaire à la localisation de APC au niveau des jonctions adhérentes.

Une étude a récemment mis en évidence l'interaction de hDlg avec la voie PI3K/Akt et l'un de ses inhibiteurs : PTEN (protein tyrosine phosphatase and tensin homologue). hDlg interagit en effet avec le domaine SH2 de la PI3K (Laprise, Viel *et al.* 2004) et avec la partie C-terminale de PTEN (Adey, Huang *et al.* 2000). La voie PI3K/Akt est impliquée dans la régulation de la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la prolifération, l'apoptose et la mobilité cellulaire. Le rôle suppresseur de tumeur de PTEN est attribué à son activité de phosphatase sur les 3-phosphoinositides qui permet de réduire le taux de phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PtdIns (3,4,5)P3), molécule activant la protéine Akt. L'interaction entre PTEN et des protéines à domaines PDZ comme hDlg permettrait de réguler les fonctions de PTEN en favorisant la stabilisation et la phosphorylation de PTEN (Das, Dixon *et al.* 2003). Ceci permettrait d'expliquer l'un des mécanismes impliqués dans le rôle suppresseur de tumeurs de hDlg, mais ces études restent à confirmer dans d'autres modèles cellulaires afin de généraliser ce mécanisme.

De plus, des souris invalidées pour le gène *Lgl* révèlent l'importance de *Lgl* dans la régulation de la prolifération cellulaire et de la division asymétrique. Les souris invalidées pour l'expression de *Lgl-1* évoluent avec une tumeur sévère au niveau du cerveau (Klezovitch, Fernandez *et al.* 2004). Ce phénotype s'explique par le fait que de nombreuses cellules neurogènes continuent de proliférer de façon symétrique, sans se différencier. Ce phénotype ressemble à celui observé pour des mutants de *lgl* chez *Drosophila*, où la population de neuroblastes dans le cerveau augmente suite à des divisions symétriques (Lee, Robinson *et al.* 2006).

Enfin, de plus en plus d'articles décrivent l'inhibition ou la délocalisation de *Lgl*, *Dlg* ou *Scrib* dans des cancers humains (Nakagawa, Yano *et al.* 2004; Navarro, Nola *et al.* 2005; Gardiol, Zacchi *et al.* 2006; Kuphal, Wallner *et al.* 2006; Grifoni, Garoia *et al.* 2007; Kamei, Kito *et al.* 2007).

Parallèlement à ces observations, d'autres articles démontrent que le complexe *Scrib* est la cible d'oncogènes viraux, expliquant l'un des mécanismes de transformation virale.

#### **4. Le complexe Scrib : cible des oncogènes viraux**

Plusieurs protéines oncogènes virales possèdent dans leur partie C-terminale un domaine d'interaction avec les protéines à domaines PDZ. La présence de ce domaine est souvent associée au caractère oncogène des virus.

C'est le cas des protéines E6 des papilloma virus humains (HPV). Les HPV sont de petits virus à ADN et infectent les épithélia humains comme la peau ou les muqueuses. Ils induisent généralement des lésions bénignes hyper prolifératives comme les verrues. Cependant, certains HPV, dits à haut risque, induisent des tumeurs malignes comme le cancer du col de l'utérus, associé neuf fois sur dix à un HPV. Deux protéines virales sont impliquées dans l'oncogenèse virale des HPV à haut risque : les protéines E6 et E7, capables d'interagir avec des suppresseurs de tumeur. Ainsi, les protéines E7 des HPV à haut risque ont une forte affinité avec la protéine du rétinoblastome (Rb) (Munger, Werness *et al.* 1989) tandis que les protéines E6 fixent et dégradent la protéine p53 (Scheffner, Werness *et al.* 1990), et se lient aux protéines à domaines PDZ *via* leur PBM. Sans cette partie C-terminale, les protéines E6 des HPV à haut risque, comme la E6 du HPV16, ne sont plus capables d'immortaliser des cellules épithéliales (Watson, Thomas *et al.* 2003). Il existerait donc deux mécanismes différents expliquant le potentiel oncogénique des protéines E6 des HPV à haut risque : d'une part la dégradation de la protéine p53, d'autre part, la capacité à interagir avec des protéines à domaines PDZ comme les protéines hScrib et hDlg. Ces dernières sont la cible des protéines E6 des HPV-16 et -18 et cette interaction induit leur dégradation *via* le protéasome par l'intermédiaire d'une ubiquitine ligase cellulaire associée à E6, la E6AP (Lee, Weiss *et al.* 1997; Nakagawa and Huibregtse 2000). Cette dégradation permettrait d'expliquer la perte de polarité et l'abolition des jonctions cellulaires observées dans les cellules cancéreuses infectées par les HPV à haut risque.

D'autres virus expriment des protéines virales contenant un PBM en partie C-terminale. C'est le cas des adénovirus humains, des virus à ADN organisés en 6 espèces (de A à F) selon leurs propriétés biologiques. Ils touchent principalement les voies respiratoires, le tube digestif, l'œil et les voies urinaires, avec une évolution très souvent asymptomatique, bien que certaines espèces puissent être tumorigènes. Au sein de l'espèce D, l'adénovirus de type 9 induit des tumeurs chez la rate similaires aux cancers du sein chez la femme. La protéine oncogénique 9ORF1, nécessaire à la transformation cellulaire est codée par la région *E4* du gène *ORF1* (Javier, Raska *et al.* 1992). Il existe trois régions dans cette protéine nécessaires à son potentiel oncogénique (Weiss, Gold *et al.* 1997), dont la partie C-terminale contenant le PBM et il a été démontré que hDlg est l'une des protéines à domaines PDZ interagissant avec 9ORF1 (Lee, Weiss *et al.* 1997). Il est intéressant de noter que 9ORF1 et APC interagissent sur le même domaine PDZ de hDlg, ce qui pourrait expliquer l'un des mécanismes oncogéniques de 9ORF1.

La protéine virale NS5 du tick-borne encephalitis virus possède aussi un PBM dans sa partie C-terminale. Ce virus à ARN de la famille des flavivirus, transmis par piqûre de tiques à l'homme, peut engendrer des encéphalites, des méningites et des fièvres hémorragiques. La réplication de ce virus nécessite deux protéines virales à activité enzymatique : les protéines NS3 et NS5. Récemment, il a été démontré que NS5 forme un complexe avec hScrib en interagissant avec son domaine PDZ-4. Ce complexe est nécessaire pour cibler NS5 à la membrane plasmique où elle interagit alors avec le récepteur à l'IFN, perturbant ainsi la voie d'activation JAK/STAT (Werme, Wigerius *et al.* 2008).

Deux protéines du HTLV-I possèdent aussi un PBM dans leur partie C-terminale. C'est le cas de la glycoprotéine d'enveloppe et de Tax.

Contrairement à d'autres virus, HTLV-I se transmet suite à un contact cellule-cellule, par l'intermédiaire d'une synapse virologique, les particules virales libres étant non infectieuses *in vivo*. Les protéines Gag et Env, ainsi que l'ARN viral, se retrouvent concentrées au niveau de cette synapse. Le domaine cytoplasmique de la partie transmembranaire de Env est indispensable à la transmission du virus, impliquant donc une voie cytosolique dans ce mécanisme. Par la technique du double hybride en levure, Blot *et al.*, démontrent que le domaine cytoplasmique de Env interagit avec hDlg. Les deux protéines co-localisent au niveau des sites de contacts cellulaires entre une cellule infectée et une cellule non-infectée. Cette interaction est nécessaire pour stabiliser Env au niveau de la synapse virologique et facilite donc la transmission virale (Blot, Delamarre *et al.* 2004).

En 1998 avec la découverte du PBM de Tax (Rousset, Fabre *et al.* 1998), de nombreuses protéines à domaines PDZ ont été caractérisées comme interagissant avec Tax. La présence de cette partie C-terminale est essentielle pour l'activité transformante de Tax (Hirata, Higuchi *et al.* 2004), l'induction de la prolifération IL-2 indépendante des cellules (Tsubata, Higuchi *et al.* 2005), la prolifération des cellules T infectées et l'instabilité génomique *in vitro* ainsi que pour la persistance du virus *in vivo* (Xie, Yamamoto *et al.* 2006). A ce jour, les protéines à domaines PDZ connues pour interagir avec Tax sont MAGI-3 (Ohashi, Sakurai *et al.* 2004), TIP-1 (Reynaud, Fabre *et al.* 2000), le précurseur de l'IL-16 (Wilson, Center *et al.* 2003), Erbin (Ress and Moelling 2006), la bêta-syntrophine, Lin-7, PSD95 (Rousset, Fabre *et al.* 1998), hTid-70 (Cheng, Cenciarelli *et al.* 2001) et hDlg (Suzuki, Ohsugi *et al.* 1999).

Contrairement à ce qui est observé avec le HPV, Tax n'induit pas la dégradation de hDlg. En revanche, il modifie sa localisation cellulaire, celle-ci passant de diffuse à ponctuelle dans le cytoplasme et d'une fraction soluble à une fraction insoluble en présence de Tax (Hirata, Higuchi *et al.* 2004). En interagissant et en séquestrant hDlg, Tax perturbe les fonctions cellulaires de hDlg, et l'empêche de former des complexes avec ses partenaires. Ainsi, dans la cellule infectée, Tax rentre en compétition avec APC pour l'interaction avec le domaine PDZ-2 de hDlg ce qui conduit à la suppression de l'arrêt du cycle cellulaire induit par hDlg (Suzuki, Ohsugi *et al.* 1999). Dans les lymphocytes T, une des fonctions essentielles de hDlg étant de réprimer la prolifération suite à une activation (Stephenson, Sammut *et al.* 2007), l'inhibition de hDlg par Tax permettrait d'expliquer l'un des mécanismes oncogéniques induits par Tax.

L'inactivation de hDlg dans une lignée lymphocytaire de souris induit une augmentation du pouvoir transformant de Tax. Ceci suggère que hDlg permet de réguler négativement le pouvoir transformant de Tax. L'expression d'un mutant de Tax délété de sa partie C-terminale dans des lignées lymphocytaires de souris exprimant hDlg n'est plus capable d'induire une transformation cellulaire. Cependant, ce même mutant de Tax exprimé dans des lignées lymphocytaires n'exprimant pas hDlg n'induit toujours pas la transformation cellulaire. Il semble donc que le pouvoir transformant de Tax ne soit pas entièrement lié à son interaction avec hDlg mais nécessite la présence d'une autre protéine capable d'interagir avec Tax *via* son PBM (Ishioka, Higuchi *et al.* 2006).

# LE PROJET DE RECHERCHE EPHE

L'infection par HTLV-I est associée à deux pathologies principales : une maladie neuro-dégénérative, la TSP/HAM, et une maladie lymphoproliférative, l'ATL. Parmi les facteurs responsables de la transformation des cellules observée lors de l'ATL, la protéine virale Tax joue un rôle primordial. La présence d'un motif d'interaction avec des protéines à domaines PDZ dans la partie C-terminale de Tax, le PBM, est un des facteurs importants nécessaires à la transformation cellulaire. Plusieurs protéines à domaines PDZ ont déjà été démontrées comme interagissant avec Tax *via* ce PBM, comme par exemple hDlg. Cependant, la liaison entre Tax et hDlg ne semble pas suffisante pour expliquer le pouvoir transformant de Tax.

Dans le cadre du diplôme EPHE, j'ai été amenée à poursuivre les études impliquant hScrib en tant que partenaire potentiel de Tax. En effet, lors d'une étude consistant à rechercher les partenaires protéiques de Tax par double hybride, notre équipe avait caractérisé différents clones dont l'un contenait l'ADNc correspondant au gène du myéloblaste humain KIAA0147 (Gachon, Peleraux *et al.* 1998), codant pour une protéine alors inconnue. Par la suite, il a été démontré que cet ADNc codait une séquence incomplète de hScrib (Dow, Brumby *et al.* 2003), suggérant une interaction possible entre hScrib et Tax.

Dans un premier temps, je vous présenterai le travail préliminaire à ce projet qui a consisté à confirmer cette interaction, *in vitro* grâce à des expériences de GST pull-down, et *in vivo* grâce à des expériences de double hybride en levure et de co-immunoprécipitation dans des cellules chroniquement infectées par HTLV-I.

Ensuite, au cours de ce projet, j'ai étudié la localisation de ces deux protéines au niveau cellulaire, tout d'abord en transfectant les deux protéines dans différents types cellulaires, ainsi que différents mutants, afin de confirmer les domaines impliqués dans leur interaction. J'ai ensuite étudié leur localisation dans des cellules chroniquement infectées par HTLV-I.

Afin de déterminer l'influence de Tax sur l'un des rôles physiologiques de hScrib dans les lymphocytes T, je vous présenterai ensuite les résultats obtenus sur le rôle de hScrib et de Tax lors de l'activation de la voie NFAT dans des lymphocytes T activés.

# BIBLIOGRAPHIE

- Adachi, Y., T. D. Copeland, et al. (1993). "Nucleolar targeting signal of Rex protein of human T-cell leukemia virus type I specifically binds to nucleolar shuttle protein B-23." *J Biol Chem* **268**(19): 13930-4.
- Adachi, Y., T. D. Copeland, et al. (1992). "Phosphorylation of the Rex protein of human T-cell leukemia virus type I." *J Biol Chem* **267**(30): 21977-81.
- Adey, N. B., L. Huang, et al. (2000). "Threonine phosphorylation of the MMAC1/PTEN PDZ binding domain both inhibits and stimulates PDZ binding." *Cancer Res* **60**(1): 35-7.
- Afonso, P. V., A. Zamborlini, et al. (2007). "Centrosome and retroviruses: the dangerous liaisons." *Retrovirology* **4**: 27.
- Ahn, K. S. and B. B. Aggarwal (2005). "Transcription factor NF-kappaB: a sensor for smoke and stress signals." *Ann N Y Acad Sci* **1056**: 218-33.
- Akita, K., S. Kawata, et al. (2005). "p21WAF1 modulates NF-kappaB signaling and induces anti-apoptotic protein Bcl-2 in Tax-expressing rat fibroblast." *Virology* **332**(1): 249-57.
- Albertson, R., C. Chabu, et al. (2004). "Scribble protein domain mapping reveals a multistep localization mechanism and domains necessary for establishing cortical polarity." *J Cell Sci* **117**(Pt 25): 6061-70.
- Albertson, R. and C. Q. Doe (2003). "Dlg, Scrib and Lgl regulate neuroblast cell size and mitotic spindle asymmetry." *Nat Cell Biol* **5**(2): 166-70.
- Albrecht, B., N. D. Collins, et al. (2000). "Human T-lymphotropic virus type 1 open reading frame I p12(I) is required for efficient viral infectivity in primary lymphocytes." *J Virol* **74**(21): 9828-35.
- Angel, P. and M. Karin (1991). "The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation." *Biochim Biophys Acta* **1072**(2-3): 129-57.
- Assemat, E., E. Bazellieres, et al. (2008). "Polarity complex proteins." *Biochim Biophys Acta* **1778**(3): 614-30.
- Audebert, S., C. Navarro, et al. (2004). "Mammalian Scribble forms a tight complex with the betaPIX exchange factor." *Curr Biol* **14**(11): 987-95.
- Azran, I., Y. Schavinsky-Khrapunsky, et al. (2004). "Role of Tax protein in human T-cell leukemia virus type-I leukemogenicity." *Retrovirology* **1**(1): 20.
- Barbeau, B. and J. M. Mesnard (2007). "Does the HBZ gene represent a new potential target for the treatment of adult T-cell leukemia?" *Int Rev Immunol* **26**(5-6): 283-304.
- Barnard, A. L., T. Igakura, et al. (2005). "Engagement of specific T-cell surface molecules regulates cytoskeletal polarization in HTLV-1-infected lymphocytes." *Blood* **106**(3): 988-95.
- Bartoe, J. T., B. Albrecht, et al. (2000). "Functional role of pX open reading frame II of human T-lymphotropic virus type 1 in maintenance of viral loads in vivo." *J Virol* **74**(3): 1094-100.
- Basbous, J., A. Bazarbachi, et al. (2003). "The central region of human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein contains distinct domains involved in subunit dimerization." *J Virol* **77**(24): 13028-35.
- Berneman, Z. N., R. B. Gartenhaus, et al. (1992). "Expression of alternatively spliced human T-lymphotropic virus type I pX mRNA in infected cell lines and in primary uncultured cells from patients with adult T-cell leukemia/lymphoma and healthy carriers." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(7): 3005-9.
- Betschinger, J., K. Mechtler, et al. (2003). "The Par complex directs asymmetric cell division by phosphorylating the cytoskeletal protein Lgl." *Nature* **422**(6929): 326-30.
- Bezprozvanny, I. and A. Maximov (2001). "Classification of PDZ domains." *FEBS Lett* **509**(3): 457-62.
- Bhat, M. A., S. Izaddoost, et al. (1999). "Discs Lost, a novel multi-PDZ domain protein, establishes and maintains epithelial polarity." *Cell* **96**(6): 833-45.
- Bilder, D., M. Li, et al. (2000). "Cooperative regulation of cell polarity and growth by Drosophila tumor suppressors." *Science* **289**(5476): 113-6.



- Bilder, D. and N. Perrimon (2000). "Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble." *Nature* **403**(6770): 676-80.
- Billadeau, D. D., J. C. Nolz, et al. (2007). "Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton." *Nat Rev Immunol* **7**(2): 131-43.
- Bittencourt, A. L. (2005). "Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) in Bahia, Brazil." *Braz J Infect Dis* **9**(5): 437-8.
- Blot, V., L. Delamarre, et al. (2004). "Human Dlg protein binds to the envelope glycoproteins of human T-cell leukemia virus type 1 and regulates envelope mediated cell-cell fusion in T lymphocytes." *J Cell Sci* **117**(Pt 17): 3983-93.
- Bode, A. M. and Z. Dong (2004). "Post-translational modification of p53 in tumorigenesis." *Nat Rev Cancer* **4**(10): 793-805.
- Burton, M., C. D. Upadhyaya, et al. (2000). "Human T-cell leukemia virus type 1 Tax shuttles between functionally discrete subcellular targets." *J Virol* **74**(5): 2351-64.
- Campanero, M. R., M. A. del Pozo, et al. (1993). "ICAM-3 interacts with LFA-1 and regulates the LFA-1/ICAM-1 cell adhesion pathway." *J Cell Biol* **123**(4): 1007-16.
- Caron, C., G. Mengus, et al. (1997). "Human TAF(II)28 interacts with the human T cell leukemia virus type I Tax transactivator and promotes its transcriptional activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(8): 3662-7.
- Caron, C., R. Rousset, et al. (1993). "Functional and biochemical interaction of the HTLV-I Tax1 transactivator with TBP." *Embo J* **12**(11): 4269-78.
- Cereseto, A., Z. Berneman, et al. (1997). "Differential expression of alternatively spliced pX mRNAs in HTLV-I-infected cell lines." *Leukemia* **11**(6): 866-70.
- Chen, Y. M., S. H. Chen, et al. (1997). "Antibody reactivities to tumor-suppressor protein p53 and HTLV-I Tof, Rex and Tax in HTLV-I-infected people with differing clinical status." *Int J Cancer* **71**(2): 196-202.
- Cheng, H., C. Cenciarelli, et al. (2001). "Human T cell leukemia virus type 1 Tax associates with a molecular chaperone complex containing hTid-1 and Hsp70." *Curr Biol* **11**(22): 1771-5.
- Ching, Y. P., S. F. Chan, et al. (2006). "The retroviral oncoprotein Tax targets the coiled-coil centrosomal protein TAX1BP2 to induce centrosome overduplication." *Nat Cell Biol* **8**(7): 717-24.
- Ciminale, V., G. N. Pavlakis, et al. (1992). "Complex splicing in the human T-cell leukemia virus (HTLV) family of retroviruses: novel mRNAs and proteins produced by HTLV type I." *J Virol* **66**(3): 1737-45.
- Clemens, K. E., G. Piras, et al. (1996). "Interaction of the human T-cell lymphotropic virus type 1 tax transactivator with transcription factor IIA." *Mol Cell Biol* **16**(9): 4656-64.
- Collins, N. D., G. C. Newbound, et al. (1998). "Selective ablation of human T-cell lymphotropic virus type 1 p12I reduces viral infectivity in vivo." *Blood* **91**(12): 4701-7.
- Copeland, K. F., A. G. Haaksma, et al. (1994). "Inhibition of apoptosis in T cells expressing human T cell leukemia virus type I Tax." *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**(10): 1259-68.
- Coscoy, L., D. Gonzalez-Dunia, et al. (1998). "Molecular mechanism of tumorigenesis in mice transgenic for the human T cell leukemia virus Tax gene." *Virology* **248**(2): 332-41.
- Das, S., J. E. Dixon, et al. (2003). "Membrane-binding and activation mechanism of PTEN." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(13): 7491-6.
- De Lorenzo, C., B. M. Mechler, et al. (1999). "What is Drosophila telling us about cancer?" *Cancer Metastasis Rev* **18**(2): 295-311.
- Dekaban, G. A., A. A. Peters, et al. (2000). "The HTLV-I orfI protein is recognized by serum antibodies from naturally infected humans and experimentally infected rabbits." *Virology* **274**(1): 86-93.
- Dodon, M. D., S. Hamaia, et al. (2002). "Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 interferes with the binding of the human T cell leukemia virus type 1 rex regulatory protein to its response element." *J Biol Chem* **277**(21): 18744-52.
- Dow, L. E., A. M. Brumby, et al. (2003). "hScrib is a functional homologue of the Drosophila tumour suppressor Scribble." *Oncogene* **22**(58): 9225-30.
- Dow, L. E. and P. O. Humbert (2007). "Polarity regulators and the control of epithelial architecture, cell migration, and tumorigenesis." *Int Rev Cytol* **262**: 253-302.
- Dow, L. E., J. S. Kauffman, et al. (2007). "The tumour-suppressor Scribble dictates cell polarity during directed epithelial migration: regulation of Rho GTPase recruitment to the leading edge." *Oncogene* **26**(16): 2272-82.
- Dustin, M. L. and T. A. Springer (1989). "T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1." *Nature* **341**(6243): 619-24.
- El-Husseini, A. E., S. E. Craven, et al. (2000). "Dual palmitoylation of PSD-95 mediates its vesiculotubular sorting, postsynaptic targeting, and ion channel clustering." *J Cell Biol* **148**(1): 159-72.

- Etienne-Manneville, S. and A. Hall (2001). "Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta." *Cell* **106**(4): 489-98.
- Etienne-Manneville, S., J. B. Manneville, et al. (2005). "Cdc42 and Par6-PKCzeta regulate the spatially localized association of Dlg1 and APC to control cell polarization." *J Cell Biol* **170**(6): 895-901.
- Felber, B. K., H. Paskalis, et al. (1985). "The pX protein of HTLV-I is a transcriptional activator of its long terminal repeats." *Science* **229**(4714): 675-9.
- Fujii, M., T. Niki, et al. (1991). "HTLV-1 Tax induces expression of various immediate early serum responsive genes." *Oncogene* **6**(6): 1023-9.
- Furukawa, K. and H. Shiku (1991). "Alternatively spliced mRNA of the pX region of human T lymphotropic virus type I proviral genome." *FEBS Lett* **295**(1-3): 141-5.
- Gabet, A. S., F. Mortreux, et al. (2003). "Inactivation of hTERT transcription by Tax." *Oncogene* **22**(24): 3734-41.
- Gachon, F., A. Peleraux, et al. (1998). "CREB-2, a cellular CRE-dependent transcription repressor, functions in association with Tax as an activator of the human T-cell leukemia virus type 1 promoter." *J Virol* **72**(10): 8332-7.
- Gachon, F., S. Thebault, et al. (2000). "Molecular interactions involved in the transactivation of the human T-cell leukemia virus type 1 promoter mediated by Tax and CREB-2 (ATF-4)." *Mol Cell Biol* **20**(10): 3470-81.
- Gao, L., H. Deng, et al. (2005). "HTLV-1 Tax transgenic mice develop spontaneous osteolytic bone metastases prevented by osteoclast inhibition." *Blood* **106**(13): 4294-302.
- Gardiol, D., A. Zacchi, et al. (2006). "Human discs large and scrib are localized at the same regions in colon mucosa and changes in their expression patterns are correlated with loss of tissue architecture during malignant progression." *Int J Cancer* **119**(6): 1285-90.
- Gaudray, G., F. Gachon, et al. (2002). "The complementary strand of the human T-cell leukemia virus type 1 RNA genome encodes a bZIP transcription factor that down-regulates viral transcription." *J Virol* **76**(24): 12813-22.
- Gee, S. H., S. A. Sekely, et al. (1998). "Cyclic peptides as non-carboxyl-terminal ligands of syntrophin PDZ domains." *J Biol Chem* **273**(34): 21980-7.
- Ghez, D., Y. Lepelletier, et al. (2006). "Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry." *J Virol* **80**(14): 6844-54.
- Gomez-Mouton, C., J. L. Abad, et al. (2001). "Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(17): 9642-7.
- Grant, C., P. Jain, et al. (2006). "AP-1-directed human T cell leukemia virus type 1 viral gene expression during monocytic differentiation." *J Leukoc Biol* **80**(3): 640-50.
- Grassmann, R., M. Aboud, et al. (2005). "Molecular mechanisms of cellular transformation by HTLV-1 Tax." *Oncogene* **24**(39): 5976-85.
- Grifoni, D., F. Garoia, et al. (2007). "aPKCzeta cortical loading is associated with Lgl cytoplasmic release and tumor growth in Drosophila and human epithelia." *Oncogene* **26**(40): 5960-5.
- Grifoni, D., F. Garoia, et al. (2004). "The human protein Hugl-1 substitutes for Drosophila lethal giant larvae tumour suppressor function in vivo." *Oncogene* **23**(53): 8688-94.
- Grone, M., C. Koch, et al. (1996). "The HTLV-1 Rex protein induces nuclear accumulation of unspliced viral RNA by avoiding intron excision and degradation." *Virology* **218**(2): 316-25.
- Grossman, W. J., J. T. Kimata, et al. (1995). "Development of leukemia in mice transgenic for the tax gene of human T-cell leukemia virus type I." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(4): 1057-61.
- Hakata, Y., T. Umemoto, et al. (1998). "Involvement of human CRM1 (exportin 1) in the export and multimerization of the Rex protein of human T-cell leukemia virus type 1." *J Virol* **72**(8): 6602-7.
- Hall, W. W. and M. Fujii (2005). "Deregulation of cell-signaling pathways in HTLV-1 infection." *Oncogene* **24**(39): 5965-75.
- Hanada, T., A. Takeuchi, et al. (2003). "Protein 4.1-mediated membrane targeting of human discs large in epithelial cells." *J Biol Chem* **278**(36): 34445-50.
- Hasegawa, H., H. Sawa, et al. (2006). "Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I." *Nat Med* **12**(4): 466-72.
- Hidaka, M., J. Inoue, et al. (1988). "Post-transcriptional regulator (rex) of HTLV-1 initiates expression of viral structural proteins but suppresses expression of regulatory proteins." *Embo J* **7**(2): 519-23.
- Hinuma, Y., K. Nagata, et al. (1981). "Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera." *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**(10): 6476-80.
- Hirata, A., M. Higuchi, et al. (2004). "PDZ domain-binding motif of human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein augments the transforming activity in a rat fibroblast cell line." *Virology* **318**(1): 327-36.
- Hough, C. D., D. F. Woods, et al. (1997). "Organizing a functional junctional complex requires specific

- domains of the Drosophila MAGUK Discs large." *Genes Dev* **11**(23): 3242-53.
- Humbert, P. O., L. E. Dow, et al. (2006). "The Scribble and Par complexes in polarity and migration: friends or foes?" *Trends Cell Biol* **16**(12): 622-30.
- Hung, A. Y. and M. Sheng (2002). "PDZ domains: structural modules for protein complex assembly." *J Biol Chem* **277**(8): 5699-702.
- Huppa, J. B. and M. M. Davis (2003). "T-cell-antigen recognition and the immunological synapse." *Nat Rev Immunol* **3**(12): 973-83.
- Hurd, T. W., L. Gao, et al. (2003). "Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly." *Nat Cell Biol* **5**(2): 137-42.
- Hutterer, A., J. Betschinger, et al. (2004). "Sequential roles of Cdc42, Par-6, aPKC, and Lgl in the establishment of epithelial polarity during Drosophila embryogenesis." *Dev Cell* **6**(6): 845-54.
- Igakura, T., J. C. Stinchcombe, et al. (2003). "Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton." *Science* **299**(5613): 1713-6.
- Ishidate, T., A. Matsumine, et al. (2000). "The APC-hDLG complex negatively regulates cell cycle progression from the G0/G1 to S phase." *Oncogene* **19**(3): 365-72.
- Ishioka, K., M. Higuchi, et al. (2006). "Inactivation of tumor suppressor Dlg1 augments transformation of a T-cell line induced by human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein." *Retrovirology* **3**: 71.
- Iwanaga, R., K. Ohtani, et al. (2001). "Molecular mechanism of cell cycle progression induced by the oncogene product Tax of human T-cell leukemia virus type I." *Oncogene* **20**(17): 2055-67.
- Javier, R., K. Raska, Jr., et al. (1992). "Requirement for the adenovirus type 9 E4 region in production of mammary tumors." *Science* **257**(5074): 1267-71.
- Javier, R. T. (2008). "Cell polarity proteins: common targets for tumorigenic human viruses." *Oncogene* **27**(55): 7031-46.
- Jeang, K. T. (2001). "Functional activities of the human T-cell leukemia virus type I Tax oncoprotein: cellular signaling through NF-kappa B." *Cytokine Growth Factor Rev* **12**(2-3): 207-17.
- Jelen, F., A. Oleksy, et al. (2003). "PDZ domains - common players in the cell signaling." *Acta Biochim Pol* **50**(4): 985-1017.
- Jeong, S. J., C. A. Pise-Masison, et al. (2005). "Activated AKT regulates NF-kappaB activation, p53 inhibition and cell survival in HTLV-1-transformed cells." *Oncogene* **24**(44): 6719-28.
- Jeong, S. J., M. Radonovich, et al. (2004). "HTLV-I Tax induces a novel interaction between p65/RelA and p53 that results in inhibition of p53 transcriptional activity." *Blood* **104**(5): 1490-7.
- Jin, D. Y. and K. T. Jeang (1997). "Transcriptional activation and self-association in yeast: protein-protein dimerization as a pleiotropic mechanism of HTLV-I Tax function." *Leukemia* **11 Suppl 3**: 3-6.
- Jin, D. Y., F. Spencer, et al. (1998). "Human T cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax targets the human mitotic checkpoint protein MAD1." *Cell* **93**(1): 81-91.
- Johnstone, R. W., A. A. Ruefli, et al. (2002). "Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy." *Cell* **108**(2): 153-64.
- Jones, K. S., S. Akel, et al. (2005). "Induction of human T cell leukemia virus type I receptors on quiescent naive T lymphocytes by TGF-beta." *J Immunol* **174**(7): 4262-70.
- Jones, K. S., K. Fugo, et al. (2006). "Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 use different receptor complexes to enter T cells." *J Virol* **80**(17): 8291-302.
- Kallay, L. M., A. McNickle, et al. (2006). "Scribble associates with two polarity proteins, Lgl2 and Vangl2, via distinct molecular domains." *J Cell Biochem* **99**(2): 647-64.
- Kamei, Y., K. Kito, et al. (2007). "Human scribble accumulates in colorectal neoplasia in association with an altered distribution of beta-catenin." *Hum Pathol* **38**(8): 1273-81.
- Kashanchi, F. and J. N. Brady (2005). "Transcriptional and post-transcriptional gene regulation of HTLV-1." *Oncogene* **24**(39): 5938-51.
- Kashanchi, F., J. F. Duvall, et al. (1993). "Sequences downstream of the RNA initiation site regulate human T-cell lymphotropic virus type I basal gene expression." *J Virol* **67**(5): 2894-902.
- Kehn, K., R. Berro, et al. (2004). "Mechanisms of HTLV-1 transformation." *Front Biosci* **9**: 2347-72.
- Kehn, K., L. Deng, et al. (2004). "The role of cyclin D2 and p21/waf1 in human T-cell leukemia virus type 1 infected cells." *Retrovirology* **1**: 6.
- Kehn, K., L. Fuente Cde, et al. (2005). "The HTLV-I Tax oncoprotein targets the retinoblastoma protein for proteasomal degradation." *Oncogene* **24**(4): 525-40.
- Kemphues, K. J., J. R. Priess, et al. (1988). "Identification of genes required for cytoplasmic localization in early C. elegans embryos." *Cell* **52**(3): 311-20.
- Kennedy, M. B. (1995). "Origin of PDZ (DHR, GLGF) domains." *Trends Biochem Sci* **20**(9): 350.
- Kim, E. and M. Sheng (2004). "PDZ domain proteins of synapses." *Nat Rev Neurosci* **5**(10): 771-81.
- King, J. A., J. M. Bridger, et al. (1998). "Nucleocytoplasmic transport of HTLV-I RNA is regulated by two independent LTR encoded nuclear retention elements." *Oncogene* **16**(25): 3309-16.

- Klezovitch, O., T. E. Fernandez, et al. (2004). "Loss of cell polarity causes severe brain dysplasia in Lgl1 knockout mice." *Genes Dev* **18**(5): 559-71.
- Koralnik, I. J., A. Gessain, et al. (1992). "Protein isoforms encoded by the pX region of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(18): 8813-7.
- Kress, E., H. H. Baydoun, et al. (2005). "Critical role of hnRNP A1 in HTLV-1 replication in human transformed T lymphocytes." *Retrovirology* **2**: 8.
- Krummel, M. F. and I. Macara (2006). "Maintenance and modulation of T cell polarity." *Nat Immunol* **7**(11): 1143-9.
- Kubota, S., M. Hatanaka, et al. (1996). "Nucleo-cytoplasmic redistribution of the HTLV-I Rex protein: alterations by coexpression of the HTLV-I p21x protein." *Virology* **220**(2): 502-7.
- Kuphal, S., S. Wallner, et al. (2006). "Expression of HUGL-1 is strongly reduced in malignant melanoma." *Oncogene* **25**(1): 103-10.
- Landschulz, W. H., P. F. Johnson, et al. (1988). "The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins." *Science* **240**(4860): 1759-64.
- Laprise, P., A. Viel, et al. (2004). "Human homolog of disc-large is required for adherens junction assembly and differentiation of human intestinal epithelial cells." *J Biol Chem* **279**(11): 10157-66.
- Le Blanc, I., M. P. Grange, et al. (2001). "HTLV-1 structural proteins." *Virus Res* **78**(1-2): 5-16.
- Leclercq, I., F. Mortreux, et al. (2000). "Basis of HTLV type 1 target site selection." *AIDS Res Hum Retroviruses* **16**(16): 1653-9.
- Lee, C. Y., K. J. Robinson, et al. (2006). "Lgl, Pins and aPKC regulate neuroblast self-renewal versus differentiation." *Nature* **439**(7076): 594-8.
- Lee, S. S., R. S. Weiss, et al. (1997). "Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(13): 6670-5.
- Lee, W., P. Mitchell, et al. (1987). "Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements." *Cell* **49**(6): 741-52.
- Lemasson, I. and J. K. Nyborg (2001). "Human T-cell leukemia virus type I tax repression of p73beta is mediated through competition for the C/H1 domain of CBP." *J Biol Chem* **276**(19): 15720-7.
- Lemasson, I., N. J. Polakowski, et al. (2004). "Transcription regulatory complexes bind the human T-cell leukemia virus 5' and 3' long terminal repeats to control gene expression." *Mol Cell Biol* **24**(14): 6117-26.
- Lemasson, I., V. Robert-Hebmann, et al. (1997). "Transrepression of lck gene expression by human T-cell leukemia virus type 1-encoded p40tax." *J Virol* **71**(3): 1975-83.
- Lemasson, I., S. Thebault, et al. (1998). "Activation of E2F-mediated transcription by human T-cell leukemia virus type I Tax protein in a p16(INK4A)-negative T-cell line." *J Biol Chem* **273**(36): 23598-604.
- Lu, H., C. A. Pise-Masison, et al. (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**(13): 6735-43.
- Ludford-Menting, M. J., J. Oliaro, et al. (2005). "A network of PDZ-containing proteins regulates T cell polarity and morphology during migration and immunological synapse formation." *Immunity* **22**(6): 737-48.
- Manel, N., S. Kinet, et al. (2003). "The HTLV receptor is an early T-cell activation marker whose expression requires de novo protein synthesis." *Blood* **101**(5): 1913-8.
- Marriott, S. J., I. Boros, et al. (1989). "Indirect binding of human T-cell leukemia virus type I tax1 to a responsive element in the viral long terminal repeat." *Mol Cell Biol* **9**(10): 4152-60.
- Mathew, D., L. S. Gramates, et al. (2002). "Recruitment of scribble to the synaptic scaffolding complex requires GUK-holder, a novel DLG binding protein." *Curr Biol* **12**(7): 531-9.
- Matsumine, A., A. Ogai, et al. (1996). "Binding of APC to the human homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein." *Science* **272**(5264): 1020-3.
- Matsuoka, M. (2003). "Human T-cell leukemia virus type I and adult T-cell leukemia." *Oncogene* **22**(33): 5131-40.
- Matsuoka, M. and K. T. Jeang (2007). "Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation." *Nat Rev Cancer* **7**(4): 270-80.
- Mechler, B. M., W. McGinnis, et al. (1985). "Molecular cloning of lethal(2)giant larvae, a recessive oncogene of Drosophila melanogaster." *Embo J* **4**(6): 1551-7.
- Medina, E., J. Williams, et al. (2002). "Crumbs interacts with moesin and beta(Heavy)-spectrin in the apical membrane skeleton of Drosophila." *J Cell Biol* **158**(5): 941-51.
- Meertens, L., S. Chevalier, et al. (2004). "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**(41): 43307-20.

- Michael, B., A. M. Nair, et al. (2004). "Human T lymphotropic virus type-1 p30II alters cellular gene expression to selectively enhance signaling pathways that activate T lymphocytes." Retrovirology **1**(1): 39.
- Millan, J., M. C. Montoya, et al. (2002). "Lipid rafts mediate biosynthetic transport to the T lymphocyte uropod subdomain and are necessary for uropod integrity and function." Blood **99**(3): 978-84.
- Montagne, J., C. Beraud, et al. (1990). "Tax1 induction of the HTLV-I 21 bp enhancer requires cooperation between two cellular DNA-binding proteins." Embo J **9**(3): 957-64.
- Montagne, J. and P. Jalinot (1995). "Characterization of a transcriptional attenuator within the 5' R region of the human T cell leukemia virus type 1." AIDS Res Hum Retroviruses **11**(9): 1123-9.
- Montoya, M. C., D. Sancho, et al. (2002). "Role of ICAM-3 in the initial interaction of T lymphocytes and APCs." Nat Immunol **3**(2): 159-68.
- Morimoto, H., J. Tsukada, et al. (2005). "Reduced expression of human mismatch repair genes in adult T-cell leukemia." Am J Hematol **78**(2): 100-7.
- Munger, K., B. A. Werness, et al. (1989). "Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product." Embo J **8**(13): 4099-105.
- Musch, A., D. Cohen, et al. (2002). "Mammalian homolog of Drosophila tumor suppressor lethal (2) giant larvae interacts with basolateral exocytic machinery in Madin-Darby canine kidney cells." Mol Biol Cell **13**(1): 158-68.
- Nair, A., B. Michael, et al. (2005). "Human T lymphotropic virus type 1 accessory protein p12I modulates calcium-mediated cellular gene expression and enhances p300 expression in T lymphocytes." AIDS Res Hum Retroviruses **21**(4): 273-84.
- Nakagawa, S. and J. M. Huijbregtse (2000). "Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase." Mol Cell Biol **20**(21): 8244-53.
- Nakagawa, S., T. Yano, et al. (2004). "Analysis of the expression and localisation of a LAP protein, human scribble, in the normal and neoplastic epithelium of uterine cervix." Br J Cancer **90**(1): 194-9.
- Nam, S. H., T. D. Copeland, et al. (1993). "Characterization of ribosomal frameshifting for expression of pol gene products of human T-cell leukemia virus type I." J Virol **67**(1): 196-203.
- Navarro, C., S. Nola, et al. (2005). "Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement." Oncogene **24**(27): 4330-9.
- Neuveut, C., K. G. Low, et al. (1998). "Human T-cell leukemia virus type 1 Tax and cell cycle progression: role of cyclin D-cdk and p110Rb." Mol Cell Biol **18**(6): 3620-32.
- Ng, P. W., H. Iha, et al. (2001). "Genome-wide expression changes induced by HTLV-1 Tax: evidence for MLK-3 mixed lineage kinase involvement in Tax-mediated NF-kappaB activation." Oncogene **20**(33): 4484-96.
- Nicot, C., R. Mahieux, et al. (2000). "Bcl-X(L) is up-regulated by HTLV-I and HTLV-II in vitro and in ex vivo ATLL samples." Blood **96**(1): 275-81.
- Nieto, M., J. M. Frade, et al. (1997). "Polarization of chemokine receptors to the leading edge during lymphocyte chemotaxis." J Exp Med **186**(1): 153-8.
- Nourry, C., S. G. Grant, et al. (2003). "PDZ domain proteins: plug and play!" Sci STKE **2003**(179): RE7.
- Nyborg, J. K., W. S. Dynan, et al. (1988). "Binding of host-cell factors to DNA sequences in the long terminal repeat of human T-cell leukemia virus type I: implications for viral gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(5): 1457-61.
- Ohashi, M., M. Sakurai, et al. (2004). "Human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein induces and interacts with a multi-PDZ domain protein, MAGI-3." Virology **320**(1): 52-62.
- Ohshiro, T., T. Yagami, et al. (2000). "Role of cortical tumour-suppressor proteins in asymmetric division of Drosophila neuroblast." Nature **408**(6812): 593-6.
- Okabe, S. (2007). "Molecular anatomy of the postsynaptic density." Mol Cell Neurosci **34**(4): 503-18.
- Osmani, N., N. Vitale, et al. (2006). "Scrib controls Cdc42 localization and activity to promote cell polarization during astrocyte migration." Curr Biol **16**(24): 2395-405.
- Ozawa, T., T. Itoyama, et al. (2004). "Rapid isolation of viral integration site reveals frequent integration of HTLV-1 into expressed loci." J Hum Genet **49**(3): 154-65.
- Peloponese, J. M., Jr., K. Haller, et al. (2005). "Abnormal centrosome amplification in cells through the targeting of Ran-binding protein-1 by the human T cell leukemia virus type-1 Tax oncoprotein." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(52): 18974-9.
- Peloponese, J. M., Jr. and K. T. Jeang (2006). "Role for Akt/protein kinase B and activator protein-1 in cellular proliferation induced by the human T-cell leukemia virus type 1 tax oncoprotein." J Biol Chem **281**(13): 8927-38.
- Peloponese, J. M., M. L. Yeung, et al. (2006). "Modulation of nuclear factor-kappaB by human T cell

- leukemia virus type 1 Tax protein: implications for oncogenesis and inflammation." *Immunol Res* **34**(1): 1-12.
- Pielage, J., T. Stork, et al. (2003). "The *Drosophila* cell survival gene discs lost encodes a cytoplasmic Codanin-1-like protein, not a homolog of tight junction PDZ protein Patj." *Dev Cell* **5**(6): 841-51.
- Pique, C., A. Ureta-Vidal, et al. (2000). "Evidence for the chronic in vivo production of human T cell leukemia virus type I Rof and Tof proteins from cytotoxic T lymphocytes directed against viral peptides." *J Exp Med* **191**(3): 567-72.
- Pise-Masison, C. A., K. S. Choi, et al. (1998). "Inhibition of p53 transactivation function by the human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax protein." *J Virol* **72**(2): 1165-70.
- Pise-Masison, C. A., R. Mahieux, et al. (2000). "Inactivation of p53 by human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax requires activation of the NF-kappaB pathway and is dependent on p53 phosphorylation." *Mol Cell Biol* **20**(10): 3377-86.
- Plant, P. J., J. P. Fawcett, et al. (2003). "A polarity complex of mPar-6 and atypical PKC binds, phosphorylates and regulates mammalian Lgl." *Nat Cell Biol* **5**(4): 301-8.
- Poiesz, B. J., F. W. Ruscetti, et al. (1980). "Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(12): 7415-9.
- Popovic, M., M. S. Reitz, Jr., et al. (1982). "The virus of Japanese adult T-cell leukaemia is a member of the human T-cell leukaemia virus group." *Nature* **300**(5887): 63-6.
- Proietti, F. A., A. B. Carneiro-Proietti, et al. (2005). "Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases." *Oncogene* **24**(39): 6058-68.
- Rao, A., C. Luo, et al. (1997). "Transcription factors of the NFAT family: regulation and function." *Annu Rev Immunol* **15**: 707-47.
- Ress, A. and K. Moelling (2006). "Interaction partners of the PDZ domain of erbin." *Protein Pept Lett* **13**(9): 877-81.
- Reuver, S. M. and C. C. Garner (1998). "E-cadherin mediated cell adhesion recruits SAP97 into the cortical cytoskeleton." *J Cell Sci* **111** ( Pt 8): 1071-80.
- Reynaud, C., S. Fabre, et al. (2000). "The PDZ protein TIP-1 interacts with the Rho effector rhotekin and is involved in Rho signaling to the serum response element." *J Biol Chem* **275**(43): 33962-8.
- Riou, P., F. Bex, et al. (2000). "The human T cell leukemia/lymphotropic virus type 1 Tax protein represses MyoD-dependent transcription by inhibiting MyoD-binding to the KIX domain of p300. A potential mechanism for Tax-mediated repression of the transcriptional activity of basic helix-loop-helix factors." *J Biol Chem* **275**(14): 10551-60.
- Roh, M. H., C. J. Liu, et al. (2002). "The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of discs lost to tight junctions." *J Biol Chem* **277**(30): 27501-9.
- Round, J. L., L. A. Humphries, et al. (2007). "Scaffold protein Dlg1 coordinates alternative p38 kinase activation, directing T cell receptor signals toward NFAT but not NF-kappaB transcription factors." *Nat Immunol* **8**(2): 154-61.
- Round, J. L., T. Tomassian, et al. (2005). "Dlg1 coordinates actin polymerization, synaptic T cell receptor and lipid raft aggregation, and effector function in T cells." *J Exp Med* **201**(3): 419-30.
- Rousset, R., S. Fabre, et al. (1998). "The C-terminus of the HTLV-1 Tax oncoprotein mediates interaction with the PDZ domain of cellular proteins." *Oncogene* **16**(5): 643-54.
- Russell, S. (2008). "How polarity shapes the destiny of T cells." *J Cell Sci* **121**(Pt 2): 131-6.
- Sarkar, F. H., Y. Li, et al. (2008). "NF-kappaB signaling pathway and its therapeutic implications in human diseases." *Int Rev Immunol* **27**(5): 293-319.
- Scharrer, B. and E. Hadorn (1938). "The Structure of the Ring-Gland (Corpus Allatum) in Normal and Lethal Larvae of *Drosophila Melanogaster*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **24**(6): 236-42.
- Scheffner, M., B. A. Werness, et al. (1990). "The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53." *Cell* **63**(6): 1129-36.
- Schmitt, I., O. Rosin, et al. (1998). "Stimulation of cyclin-dependent kinase activity and G1- to S-phase transition in human lymphocytes by the human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 Tax protein." *J Virol* **72**(1): 633-40.
- Schultz, J., R. R. Copley, et al. (2000). "SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains." *Nucleic Acids Res* **28**(1): 231-4.
- Scoggin, K. E., A. Ulloa, et al. (2001). "The oncoprotein Tax binds the SRC-1-interacting domain of CBP/p300 to mediate transcriptional activation." *Mol Cell Biol* **21**(16): 5520-30.
- Seiki, M., S. Hattori, et al. (1983). "Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(12): 3618-22.
- Seiki, M., A. Hikikoshi, et al. (1990). "The U5 sequence is a cis-acting repressive element for genomic RNA expression of human T cell leukemia virus type I." *Virology* **176**(1): 81-6.

- Seiki, M., J. Inoue, et al. (1988). "Two cis-acting elements responsible for posttranscriptional trans-regulation of gene expression of human T-cell leukemia virus type I." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(19): 7124-8.
- Seminario, M. C. and S. C. Bunnell (2008). "Signal initiation in T-cell receptor microclusters." *Immunol Rev* **221**: 90-106.
- Semmes, O. J. and K. T. Jeang (1996). "Localization of human T-cell leukemia virus type 1 tax to subnuclear compartments that overlap with interchromatin speckles." *J Virol* **70**(9): 6347-57.
- Semmes, O. J., F. Majone, et al. (1996). "HTLV-I and HTLV-II Tax: differences in induction of micronuclei in cells and transcriptional activation of viral LTRs." *Virology* **217**(1): 373-9.
- Serrador, J. M., M. Vicente-Manzanares, et al. (2002). "A novel serine-rich motif in the intercellular adhesion molecule 3 is critical for its ezrin/radixin/moesin-directed subcellular targeting." *J Biol Chem* **277**(12): 10400-9.
- Shimoyama, M. (1991). "Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87)." *Br J Haematol* **79**(3): 428-37.
- Shin, K., S. Straight, et al. (2005). "PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells." *J Cell Biol* **168**(5): 705-11.
- Shuker, S. B., V. L. Mariani, et al. (2003). "Understanding HTLV-I protease." *Chem Biol* **10**(5): 373-80.
- Silverman, L. R., A. J. Phipps, et al. (2004). "Human T-cell lymphotropic virus type 1 open reading frame II-encoded p30II is required for in vivo replication: evidence of in vivo reversion." *J Virol* **78**(8): 3837-45.
- Singer, II, S. Scott, et al. (2001). "CCR5, CXCR4, and CD4 are clustered and closely apposed on microvilli of human macrophages and T cells." *J Virol* **75**(8): 3779-90.
- Smith, M. R. and W. C. Greene (1990). "Identification of HTLV-I tax trans-activator mutants exhibiting novel transcriptional phenotypes." *Genes Dev* **4**(11): 1875-85.
- Sodroski, J. G., C. A. Rosen, et al. (1984). "Trans-acting transcriptional activation of the long terminal repeat of human T lymphotropic viruses in infected cells." *Science* **225**(4660): 381-5.
- Songyang, Z., A. S. Fanning, et al. (1997). "Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains." *Science* **275**(5296): 73-7.
- Stephenson, L. M., B. Sammut, et al. (2007). "DLGH1 is a negative regulator of T-lymphocyte proliferation." *Mol Cell Biol* **27**(21): 7574-81.
- Straight, S. W., K. Shin, et al. (2004). "Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity defects." *Mol Biol Cell* **15**(4): 1981-90.
- Suzuki, T., T. Narita, et al. (1999). "Down-regulation of the INK4 family of cyclin-dependent kinase inhibitors by tax protein of HTLV-1 through two distinct mechanisms." *Virology* **259**(2): 384-91.
- Suzuki, T., Y. Ohsugi, et al. (1999). "Tax oncoprotein of HTLV-1 binds to the human homologue of Drosophila discs large tumor suppressor protein, hDLG, and perturbs its function in cell growth control." *Oncogene* **18**(44): 5967-72.
- Tabuse, Y., Y. Izumi, et al. (1998). "Atypical protein kinase C cooperates with PAR-3 to establish embryonic polarity in *Caenorhabditis elegans*." *Development* **125**(18): 3607-14.
- Takizawa, S., K. Nagasaka, et al. (2006). "Human scribble, a novel tumor suppressor identified as a target of high-risk HPV E6 for ubiquitin-mediated degradation, interacts with adenomatous polyposis coli." *Genes Cells* **11**(4): 453-64.
- Tepass, U. and E. Knust (1993). "Crumbs and Stardust act in a genetic pathway that controls the organization of epithelia in *Drosophila melanogaster*." *Dev Biol* **159**(1): 311-26.
- Tepass, U., C. Theres, et al. (1990). "Crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia." *Cell* **61**(5): 787-99.
- Thomas, U., B. Phannavong, et al. (1997). "Functional expression of rat synapse-associated proteins SAP97 and SAP102 in *Drosophila* dlg-1 mutants: effects on tumor suppression and synaptic bouton structure." *Mech Dev* **62**(2): 161-74.
- Tilghman, R. W. and R. L. Hoover (2002). "E-selectin and ICAM-1 are incorporated into detergent-insoluble membrane domains following clustering in endothelial cells." *FEBS Lett* **525**(1-3): 83-7.
- Tsubata, C., M. Higuchi, et al. (2005). "PDZ domain-binding motif of human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein is essential for the interleukin 2 independent growth induction of a T-cell line." *Retrovirology* **2**: 46.
- Tsujimoto, Y. and S. Shimizu (2000). "Bcl-2 family: life-or-death switch." *FEBS Lett* **466**(1): 6-10.
- Uchiyama, T., J. Yodoi, et al. (1977). "Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases." *Blood* **50**(3): 481-92.
- Ullmer, C., K. Schmuck, et al. (1998). "Cloning and characterization of MUPP1, a novel PDZ domain protein." *FEBS Lett* **424**(1-2): 63-8.

- Vasioukhin, V. (2006). "Lethal giant puzzle of Lgl." *Dev Neurosci* **28**(1-2): 13-24.
- Verdonck, K., E. Gonzalez, et al. (2007). "Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection." *Lancet Infect Dis* **7**(4): 266-81.
- Watson, R. A., M. Thomas, et al. (2003). "Activity of the human papillomavirus E6 PDZ-binding motif correlates with an enhanced morphological transformation of immortalized human keratinocytes." *J Cell Sci* **116**(Pt 24): 4925-34.
- Weiss, R. S., M. O. Gold, et al. (1997). "Mutant adenovirus type 9 E4 ORF1 genes define three protein regions required for transformation of CRE6 cells." *J Virol* **71**(6): 4385-94.
- Werme, K., M. Wigerius, et al. (2008). "Tick-borne encephalitis virus NS5 associates with membrane protein scribble and impairs interferon-stimulated JAK-STAT signalling." *Cell Microbiol* **10**(3): 696-712.
- Wilson, K. C., D. M. Center, et al. (2003). "Binding of HTLV-1 tax oncoprotein to the precursor of interleukin-16, a T cell PDZ domain-containing protein." *Virology* **306**(1): 60-7.
- Winter, H. Y., T. Dayaram, et al. (2007). "Activation of the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat by the ternary complex factor Elk-1." *J Virol* **81**(23): 13075-81.
- Winter, H. Y. and S. J. Marriott (2007). "Human T-cell leukemia virus type 1 Tax enhances serum response factor DNA binding and alters site selection." *J Virol* **81**(11): 6089-98.
- Woods, D. F. and P. J. Bryant (1991). "The discs-large tumor suppressor gene of Drosophila encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions." *Cell* **66**(3): 451-64.
- Xavier, R., S. Rabizadeh, et al. (2004). "Discs large (Dlg1) complexes in lymphocyte activation." *J Cell Biol* **166**(2): 173-8.
- Xie, L., B. Yamamoto, et al. (2006). "PDZ binding motif of HTLV-1 Tax promotes virus-mediated T-cell proliferation in vitro and persistence in vivo." *Blood* **107**(5): 1980-8.
- Yamanaka, T., Y. Horikoshi, et al. (2006). "Lgl mediates apical domain disassembly by suppressing the PAR-3-aPKC-PAR-6 complex to orient apical membrane polarity." *J Cell Sci* **119**(Pt 10): 2107-18.
- Yamanaka, T., Y. Horikoshi, et al. (2003). "Mammalian Lgl forms a protein complex with PAR-6 and aPKC independently of PAR-3 to regulate epithelial cell polarity." *Curr Biol* **13**(9): 734-43.
- Yamanaka, T. and S. Ohno (2008). "Role of Lgl/Dlg/Scribble in the regulation of epithelial junction, polarity and growth." *Front Biosci* **13**: 6693-707.
- Yamaoka, S., T. Tobe, et al. (1992). "Tax protein of human T-cell leukemia virus type I is required for maintenance of the transformed phenotype." *Oncogene* **7**(3): 433-7.
- Yasunaga, J. and M. Matsuoka (2007). "Human T-cell leukemia virus type I induces adult T-cell leukemia: from clinical aspects to molecular mechanisms." *Cancer Control* **14**(2): 133-40.
- Ye, J., L. Silverman, et al. (2003). "HTLV-1 Rex is required for viral spread and persistence in vivo but is dispensable for cellular immortalization in vitro." *Blood* **102**(12): 3963-9.
- Yeh, J. H., S. S. Sidhu, et al. (2008). "Regulation of a late phase of T cell polarity and effector functions by Crtam." *Cell* **132**(5): 846-59.
- Yoshida, M. (2005). "Discovery of HTLV-1, the first human retrovirus, its unique regulatory mechanisms, and insights into pathogenesis." *Oncogene* **24**(39): 5931-7.
- Yoshida, M., I. Miyoshi, et al. (1982). "A retrovirus from human leukemia cell lines: its isolation, characterization, and implication in human adult T-cell leukemia (ATL)." *Princess Takamatsu Symp* **12**: 285-94.
- Zeitler, J., C. P. Hsu, et al. (2004). "Domains controlling cell polarity and proliferation in the Drosophila tumor suppressor Scribble." *J Cell Biol* **167**(6): 1137-46.
- Zimmermann, P., K. Meerschaert, et al. (2002). "PIP(2)-PDZ domain binding controls the association of syntenin with the plasma membrane." *Mol Cell* **9**(6): 1215-25.