

Inhibition de la traduction antisens du rétrovirus HTLV-1 par des acides nucléiques peptidiques

Auteur : Fievez, Perrine

Promoteur(s) : Willems, Luc; Beauvois, Aurélie

Faculté : Gembloux Agro-Bio Tech (GxABT)

Diplôme : Master en bioingénieur : chimie et bioindustries, à finalité spécialisée

Année académique : 2020-2021

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/12981>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

INHIBITION DE LA TRADUCTION ANTISENS DU RETROVIRUS HTLV-1 PAR DES ACIDES NUCLEIQUES PEPTIDIQUES

PERRINE FIEVEZ

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

ANNEE ACADEMIQUE 2020-2021

**PROMOTEUR : LUC WILLEMS
CO-PROMOTRICE : AURELIE BEAUVOIS**

Toute reproduction du présent document, par quelque procédé que ce soit, ne peut être réalisée qu'avec l'autorisation de l'auteur et de l'autorité académique¹ de Gembloux Agro-Bio Tech.

Le présent document n'engage que son auteur

¹ Dans ce cas, l'autorité académique est représentée par le(s) promoteur(s) membre du personnel(s) enseignant de GxABT

INHIBITION DE LA TRADUCTION ANTISENS DU RETROVIRUS HTLV-1 PAR DES ACIDES NUCLEIQUES PEPTIDIQUES

PERRINE FIEVEZ

**TRAVAIL DE FIN D'ETUDES PRESENTE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE
MASTER BIOINGENIEUR EN CHIMIE ET BIO-INDUSTRIES**

ANNEE ACADEMIQUE 2020-2021

**PROMOTEUR : LUC WILLEMS
CO-PROMOTRICE : AURELIE BEAUVOIS**

Institution d'accueil

Ce travail de fin d'études a été réalisé dans le laboratoire de « Cellular and Molecular Epigenetics » situé au sein du centre de recherche Giga-cancer appartenant à l'Université de Liège, Belgique.

Remerciements

Ce travail de fin d'études est le fruit de 7 mois de labeur, une production qui n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et le soutien de personnes que j'aimerais ici remercier :

- Le Professeur Luc Willems, pour avoir accepté de m'ouvrir les portes de son laboratoire, pour son expertise, ses conseils et son analyse. Je tiens à exprimer toute la gratitude que j'éprouve à son égard.
- Aurélie Beauvois, pour m'avoir encadrée quotidiennement, la gentillesse dont elle a fait preuve envers moi, son aide sans faille et son soutien.
- Hélène Gazon, pour sa gentillesse et pour avoir éclairci tous les points qui ont pu me paraître sombres à un moment donné.
- Mes collègues de laboratoire, Hélène Brossel, Alexis Fontaine, Malik Hamaïda, Hélène Hiertz, Clotilde Hoyos, Majeed Jamakhani et Mégane Willems pour leur gentillesse et les bons moments passés ensemble.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui m'ont soutenue lors de la réalisation de mon travail de fin d'études, et, plus largement, tout au long de mes études :

- Mes parents, pour leur soutien sans faille, pour avoir toujours cru en moi et pour m'avoir transmis l'envie de ne jamais abandonner.
- Mes frères et ma sœur, pour leur soutien et leur écoute.
- Mes amis, pour leur soutien et pour avoir su créer des moments de joie et de légèreté même dans les périodes les plus stressantes.
- Régis, pour m'avoir écoutée et soutenue sans jamais se plaindre, même dans les périodes les plus difficiles et les moments de doute. Merci du fond du cœur.

Résumé

Le virus T-lymphotrope humain de type 1 (HTLV-1) est le premier rétrovirus à avoir été caractérisé comme étant à l'origine d'une maladie humaine, infectant 5 à 10 millions de personnes à travers le monde. Il est associé à deux maladies principales : le lymphome/leucémie à cellules T de l'adulte (ATL) et la paraparésie spastique tropicale ou myélopathie associée au HTLV-1 (TSP/HAM). Il a la particularité de produire un transcrit antisens ainsi que sa protéine associée : HBZ. L'ARNm de HBZ est principalement localisé dans le noyau des cellules infectées. Ce transcrit présente des propriétés particulières en étant notamment capable d'interagir spécifiquement avec le promoteur HTLV-1, le 5'LTR. Ce mécanisme empêche l'expression génétique des protéines dirigée par le 5'LTR, une surexpression de ce transcrit provoquant un niveau de production des protéines Tax et Gag/Pol significativement plus bas. Le but de ce travail est d'étudier les fonctions de cet ARN en venant le cibler avec des acides peptidiques nucléiques (PNA) et ainsi d'évaluer un éventuel impact sur l'expression de la protéine Tax dans des lignées infectées par HTLV-1. Les résultats montrent que les PNA sont bien absorbés par les cellules, mais y sont toxiques. En étant capables de pénétrer dans les cellules et d'atteindre leur noyau, ces PNA pourraient permettre d'étudier le rôle de l'ARN de HBZ dans les mécanismes de viabilité cellulaire et de latence virale.

Abstract

The human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) is the first retrovirus that was associated with a human disease, infecting 5-10 million people worldwide. HTLV-1 causes two major diseases: adult T-cell leukemia (ATL) and HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). HTLV-1 has the singularity of producing an antisense transcript and its associated protein: HBZ. The HBZ mRNA is mainly located in the nucleus of infected cells. This mRNA has special properties, including the ability to interact specifically with the HTLV-1 promoter, the 5'LTR. This mechanism prevents gene expression of proteins directed by the 5'LTR. Overexpression of this transcript indeed significantly reduces Tax and Gag/Pol proteins production. The aim of this work is to study the functions of the HBZ mRNA by using peptide nucleic acids (PNAs) and to evaluate their impact on Tax protein expression in HTLV-1 infected lines. The results show that the PNAs are well incorporated by the cells, but are toxic. Being able to penetrate cells and reach their nucleus, the use of PNAs may be a relevant tool to study the role of the HBZ mRNA in cell viability and viral latency.

Liste d'abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNc	ARN CRISPR
ARNg	Acide ribonucléique génomique
ARNi	ARN interférent
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNsg	ARN guide
ARNt	ARNc transactivateur
ASP	Protéine antisens
ATL	Leucémie à cellules T de l'adulte
AXN	Xénonucléiques acides
BLV	Virus de la leucémie bovine
bZIP	Basic leucine zipper
CCR4	Récepteur de la chimiokine C-C de type
CREB	C-AMP Response Element-binding protein
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CRM1	Chromosomal region maintenance 1
FACS	Tri cellulaire induit par fluorescence
FBS	Sérum de veau fœtal
GLUT1	Glucose transporter 1
GNA	Acides nucléiques à glycol
HSPG	Protéoglycane à héparane sulfate
HTLV	Virus T lymphotrope humain
ICAM-1	InterCellular Adhesion Molecule
KRAB	Kruppel-associated box
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LNA	Acides nucléiques bloqués
LTR	Séquence terminale longue répétée
miRNA	MicroARN
MLV	Virus de la leucémie murine
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NRP-1	Neuropiline 1
ORF	Open reading frame (cadre de lecture ouvert)
PBS	Tampon phosphate salin
PMO	Morpholino
PMO-CPP	Arginine-rich cell-penetrating peptides
PNA	Acides nucléiques peptidiques
PRC2	Complexe répresseur polycomb 2
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAPII	ARN polymérase II
RNAseH	Ribonucléase H
RT-qPCR	Réaction de polymérisation en chaine quantitative en temps réel
shRNA	Petits ARN en épingle à cheveux
siRNA	Small interfering RNA

STLV	Virus T-lymphotrope simien
TBP	Tata box binding protein
TLR80	Toll Like Receptor 80
TNA	Acides nucléiques à thréose
TSP/HAM	Paraparésie spastique tropicale ou myélopathie associée au HTLV-1
UTR	Région non traduite
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

Table des tableaux

Tableau 1 : Comparaison des différents moyens d'étude de la fonction des ARN.....	18
Tableau 2 : Constitution des PNA.	20
Tableau 3 : Structure secondaire et séquence des PNA.....	39

Table des figures

Figure 1 : Distribution de la séroprévalence de HTLV-1 parmi les donneurs de sang.....	2
Figure 2 : Génome de HTLV-1	4
Figure 3 : Les modes de transmission de HTLV-1	6
Figure 4 : Structure des LNA.....	10
Figure 5 : Structure des PNA.....	11
Figure 6 : Structure des TNA.....	12
Figure 7 : Structure des morpholinos.....	12
Figure 8 : Fonctionnement des mirna	14
Figure 9 : Les ribozymes en tête de marteau	16
Figure 10 : Le ribozyme en épingle à cheveux.....	16
Figure 11 : Mesure de la transcription des lignées cellulaires ATL-2, C8166 et HuT102.....	24
Figure 12 : Evaluation de la toxicité des PNA.	26
Figure 13 : Internalisation des PNA et impact sur la production de Tax pour la lignée HuT102.	29
Figure 14 : Internalisation des PNA et impact sur la production de Tax pour la lignée ATL-2.	32
Figure 15 : Internalisation des PNA et impact sur la production de Tax pour la lignée C8166.....	35
Figure 16 : Impact des PNA sur la transcription des ARN de Tax et HBZ.....	37
Figure 17 : Zones de l'ARNm de HBZ ciblées par les PNA.....	41

Table des matières

INSTITUTION D'ACCUEIL	II
REMERCIEMENTS	II
RESUME	III
ABSTRACT	IV
LISTE D'ABBRÉVIATIONS	V
TABLE DES TABLEAUX	VII
TABLE DES FIGURES	VII
TABLE DES MATIERES	VIII
INTRODUCTION	1
I. PRESENTATION DU VIRUS HTLV-1	1
1. ÉPIDÉMIOLOGIE	1
2. Transmission et maladies associées	2
3. Traitements	3
4. Organisation génomique du virus	3
5. Propagation de HTLV-1	5
a. Transmission intercellulaire	5
b. Cycle infectieux	7
c. Persistance	7
II. GENES A L'ORIGINE DE L'ONCOGENICITE DE HTLV-1	7
1. TAX	7
2. HBZ	8
a. La protéine	8
b. L'ARN messager	8
III. MOYENS D'ETUDE DE LA FONCTION D'UN ARN	9
1. LES ANALOGUES AUX ACIDES NUCLEIQUES	9
a. Les LNA	9
b. Les PNA	10
c. Les TNA	11
d. Les morpholinos	12
2. L'INTERFERENCE ARN	13
a. miRNA	13
b. siRNA	14
3. LES RIBOZYMES	15
4. CRISPR/Cas9	17
OBJECTIFS	19
MATERIEL ET METHODE	20
1. CULTURE CELLULAIRE	20
2. MISE EN CONTACT AVEC LES PNA	20
3. TEST DE SURVIE CELLULAIRE : IODURE DE PROPIDIUM	20
4. MARQUAGE TAX	21
5. RT-qPCR	21
RESULTATS	23
1. CARACTERISATION DES LIGNEES UTILISEES	23
2. ÉVALUATION DE LA TOXICITE DES PNA	25
3. INTERNALISATION DES PNA ET IMPACT SUR LA PRODUCTION DE TAX DANS LA LIGNEE HUT102	27
4. INTERNALISATION DES PNA ET IMPACT SUR LA PRODUCTION DE TAX DANS LA LIGNEE ATL-2	30
5. INTERNALISATION DES PNA ET IMPACT SUR LA PRODUCTION DE TAX DANS LA LIGNEE C8166	33
6. IMPACT DES PNA SUR LA TRANSCRIPTION DES ARN DE TAX ET HBZ	36
DISCUSSION	38

1.	<i>TOXICITE DES PNA</i>	38
2.	<i>INTERNALISATION DES PNA</i>	39
3.	<i>UTILISATION DES PNA</i>	39
i.	<i>Éventuel impact des PNA sur d'autres mécanismes</i>	40
ii.	<i>Modification de la séquence visée</i>	41
4.	<i>PERSPECTIVE DE THERAPIE HUMAINE</i>	42
	<i>CONTRIBUTION PERSONNELLE DE L'ETUDIANT</i>	43
	<i>CONCLUSION</i>	44
	<i>ANNEXES</i>	45
	<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	52

Introduction

I. Présentation du virus HTLV-1

C'est en 1977 que fut pour la première fois décrite la leucémie à cellules T de l'adulte (ATL) chez la population japonaise ¹. Quelques temps plus tard, un rétrovirus à l'origine de cette maladie fut isolé : ATL². De manière indépendante, le virus T-lymphotrope humain (HTLV) fut aussi détecté et isolé en 1979 aux Etats-Unis ³. Les deux rétrovirus identifiés par les différentes équipes se sont révélés être en réalité les mêmes. Il fut décidé que le nom ATL serait utilisé pour désigner la maladie, et HTLV le rétrovirus à l'origine de celle-ci ^{2,3}. Ce dernier fut ainsi le premier rétrovirus caractérisé comme étant à l'origine d'une maladie humaine ⁴.

1. Épidémiologie

Bien que présent sur tous les continents, le virus HTLV est endémique à certaines régions du monde : le Sud-Ouest du Japon, les Antilles, certaines parties de l'Amérique du Sud, l'Afrique Sub-Saharienne, quelques foyers du Moyen-Orient et la Mélanésie ⁵. Cette répartition géographique s'expliquerait par un effet fondateur suivi d'un taux de transmission élevé dans une population donnée ⁶. HTLV-1 serait originaire d'Afrique et serait probablement apparu au sein de la population pygmée suite à une transmission inter-espèce entre l'homme et le singe. HTLV-1 est en effet proche du Virus T-lymphotrope simien 1 (STLV-1) présent notamment chez le gorille et le chimpanzé, d'autres espèces de singes étant probablement aussi impliquées via la consommation de viande de brousse ^{7,8}. La propagation en Océanie se serait ensuite produite au courant d'une vague d'immigration ayant eu lieu il y a 60 000 ans. Il existe deux hypothèses quant à l'arrivée du virus en Amérique : celle-ci aurait eu lieu soit durant et après une migration préhistorique par le Détroit du Bering il y a 11 à 13 000 ans, soit suite à la traite des esclaves entre les XVIème et XIXème siècles ⁷. HTLV-1 est actuellement présent sur tous les continents avec un taux de prévalence variable, notamment au sein de la population caucasienne suite à des contacts avec des individus originaires des zones endémique du virus ⁶ (**Figure 1**).

Il est difficile d'estimer le nombre de personnes actuellement touchées par ce virus. La plus récente étude globale disponible date de l'année 2012. D'après celle-ci, entre 5 et 10 millions d'individus seraient concernés à travers le monde, bien qu'il s'agisse d'une sous-évaluation due au manque d'informations disponibles dans certaines régions et pays ^{6,9}.

HTLV-1 est d'un point de vue moléculaire très stable, chose inattendue pour un rétrovirus ⁶. Il présente néanmoins une certaine variabilité au niveau nucléotidique ¹⁰ à l'origine de 7 sous-types (allant de A à G) ¹¹. Ces derniers ne présentent pas de différence majeure en terme de rôle épidémiologique ¹¹, mais, étant en lien avec l'origine géographique du virus, peuvent être utilisés afin d'étudier la transmission de HTLV-1 et ainsi de suivre les mouvements des populations concernées ¹⁰. Le sous-type A, également appelé le sous-type cosmopolite ⁶, est le plus dispersé d'un point de vue géographique en étant présent sur tous les continents ¹⁰. Les autres sont plus localisés : le sous type C est retrouvé en Australie et en Mélanésie, les B, D, E, F et G en Afrique ⁹.

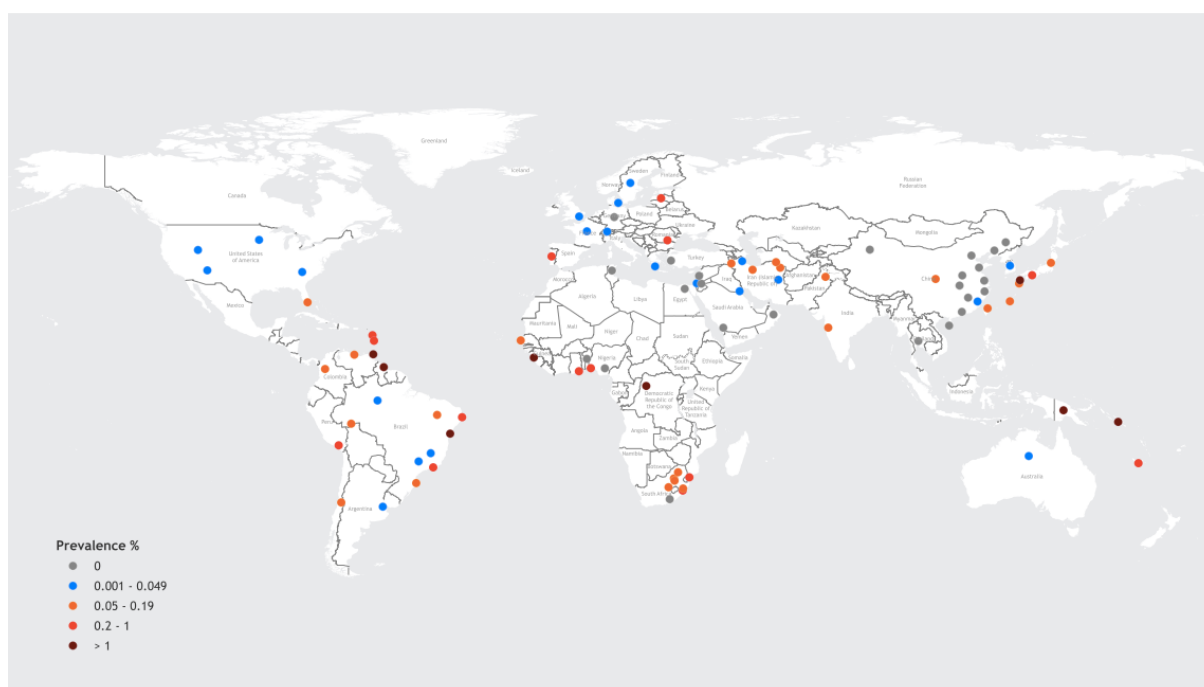


Figure 1 : Distribution de la séroprévalence de HTLV-1 parmi les donneurs de sang

Le virus est endémique à certaines régions du monde : le Sud-Ouest du Japon, les Antilles, certaines parties de l'Amérique du Sud, l'Afrique Sub-Saharienne, quelques foyers du Moyen-Orient et la Mélanésie mais est présent sur tous les continents avec un taux de prévalence variable ⁹.

2. Transmission et maladies associées

HTLV-1 se propage par l'allaitement (avec un taux de transmission d'environ 20% de la mère vers l'enfant), les rapports sexuels (généralement, la contamination se fait de l'homme vers la femme), le partage d'aiguilles chez les consommateurs de drogue par injection en intraveineuse, des greffes d'organes ou des transfusions sanguines ^{9,12,13}. Dans ce dernier cas, le taux de transmission peut atteindre les 60% ⁹. Le nombre de cas augmente avec l'âge et est plus important au sein de la population féminine ⁷.

Parmi les individus porteurs du virus, moins de 10% développeront les maladies principales que cause HTLV-1 ¹⁴ : le lymphome/leucémie à cellules T de l'adulte (ATL) et la paraparésie spastique tropicale ou myélopathie associée au HTLV-1 (TSP/HAM) ¹⁵. Parmi les porteurs du virus, 2 à 4% développeront l'ATL ¹⁵, correspondant à une lymphoprolifération maligne des lymphocytes T périphériques matures ^{10,16}. Il existe 4 formes cliniques : aigüe, lymphome, chronique et indolente ^{17,18}. Environ 4 % des porteurs du virus développeront la

TSP/HAM¹⁹. Cette maladie dégénérative touche le système nerveux central²⁰. Les personnes atteintes peuvent souffrir d'une paralysie ou d'une faiblesse des membres inférieurs, de lombalgie et de troubles urinaires^{20,21}.

3. Traitements

Il semble que les porteurs du virus soient infectés durant le début de leur vie et, si un cancer vient à se développer, cela se produit après une période de latence de 20 à 40 ans. Bien que de nombreux progrès aient été faits en terme de compréhension des mécanismes, les possibilités de thérapie ou de prévention sont insatisfaisantes²⁰. Parmi les différents traitements contre l'ATL existants, aucun ne s'est révélé réellement efficace, les rechutes sont nombreuses et le pronostic à long terme reste mauvais. De nouvelles alternatives existent mais doivent encore être testées cliniquement¹⁷. Enfin, il n'existe actuellement pas de vaccin permettant de prévenir la transmission du virus d'un individu à l'autre, notamment de la mère à l'enfant ou entre deux partenaires sexuels²².

Pour cette raison, la prévention contre la transmission de HTLV-1 consiste notamment à déconseiller l'allaitement et à réaliser des dépistages chez les donneurs dans les zones endémiques²³. L'identification de biomarqueurs ainsi que la mise au point d'un vaccin et de nouveaux traitements sont également des pistes à explorer²².

4. Organisation génomique du virus

HTLV-1 est un virus enveloppé qui appartient au genre des *Deltaretrovirus* dans la sous-famille des rétrovirus *Oncovirinae*^{12,24,25}. Il possède un génome de 9 kpb et fait environ 100 nm de diamètre^{12,25}. L'enveloppe des virions consiste en une bicouche phospholipidique dans laquelle se trouvent des glycoprotéines de surface (gp46) et transmembranaires (gp21)^{18,26}. Sa partie interne est en contact avec la protéine de la matrice virale (MA)²⁵. A l'intérieur de cette structure se trouve la capside virale renfermant 2 brins identiques d'ARN génomique liés à la protéine de nucléocapside (NC)²⁶, ainsi que différentes enzymes : des transcriptases inverses, des protéases et des intégrases²⁵. S'agissant d'un rétrovirus, le génome de HTLV-1 comporte les gènes typiques *gag*, *pro*, *pol* et *env* flanqués de deux séquences terminales longues répétées (LTR) en 5' et 3' (**Figure 2**)²⁷. Les LTR comportent 3 parties, U3, R et U5, contenant les sites de liaison des facteurs de transcription, de début et de fin de transcription, d'épissage et de polyadénylation²⁷. Entre *env* et le 3'LTR se trouve une région pX¹². Elle code pour des gènes régulateurs subissant un épissage alternatif¹² et possède 4 cadres de lecture ouverte (ORF)^{28,29}. Le promoteur des gènes codant pour les protéines accessoires p12, p13 et p30 ainsi que Rex et Tax se situe au niveau du 5'LTR, tandis que celui de HBZ se situe au niveau du 3' LTR^{27,29} (**Figure 2**).

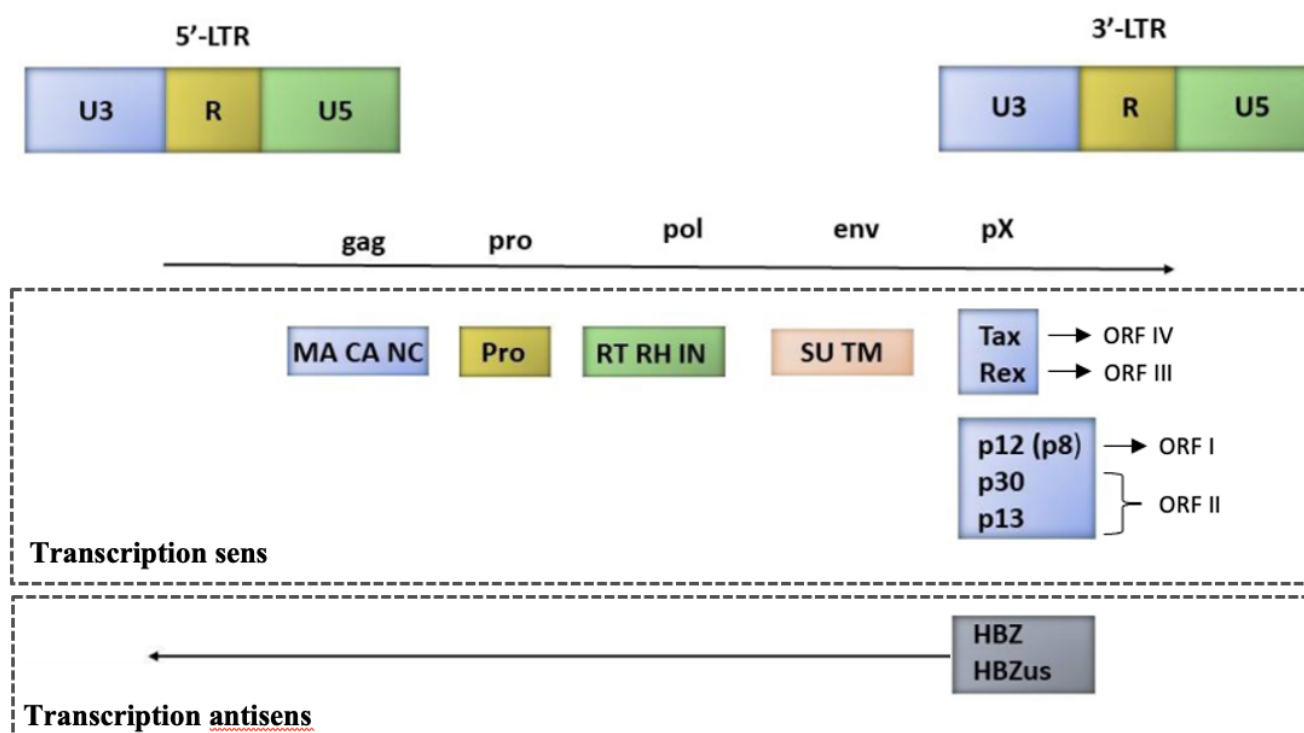


Figure 2 : Génome de HTLV-1

HTLV-1 comporte les gènes typiques *gag*, *pro*, *pol* et *env* situés entre deux LTR comportant les parties U3, R et U5. Entre *env* et le 3'-LTR se trouve une région pX possédant 4 cadres ORF. Le promoteur des gènes codant pour les protéines accessoires p12, p13 et p30 ainsi que Rex et Tax se situe au niveau du 5'-LTR, tandis que celui de HBZ se situe au niveau du 3' LTR ²⁴.

Gag code pour des protéines de la capsid, de la nucléocapsid et de la matrice, *pro* pour une protéase qui facilite la maturation des virions ²⁴, *pol* pour une RNaseH, une intégrase ainsi qu'une transcriptase inverse, et *env* pour les protéines gp46 et gp21 ^{24,30}.

La protéine p12 est codée par l'ORF I. On la retrouve au niveau de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique. Elle contrôle l'activation et la production des cellules T, notamment grâce à sa capacité à réguler la concentration cytoplasmique d'ions calcium Ca^{2+} , aboutissant à l'augmentation de la production d'interleukine 2, permettant ainsi leur prolifération ²⁹. Par ailleurs, p12 peut être clivée en p8 dans le réticulum endoplasmique. Cette protéine favorise le processus de transmission virale en augmentant la mise en place de conduits cellulaires ²⁹.

L'ORF II code pour p13 et p30 ³¹. La protéine p13 se situe principalement dans la partie interne de la membrane mitochondrienne. Elle joue un rôle important dans l'infection ainsi que l'immortalisation des cellules T et favorise l'apoptose ²⁵. La protéine p30 permet la mise en place de la latence du virus en inhibant son expression grâce à sa capacité à retenir Tax et Rex dans le noyau ²⁷.

Tax et Rex, respectivement codés par les ORF IV et III ³¹, sont deux régulateurs transcriptionnels importants. Rex augmente la stabilité des ARNm génomiques et simplement épissés de HTLV-1. Il est en effet capable de se lier à ces ARN et à un exportateur cellulaire, CRM1, permettant alors aux ARN de sortir du noyau et d'être efficacement traduits ³². Tax est un transactivateur du promoteur du 5' LTR, soutenant ainsi l'expression du virus. Cette protéine est également impliquée dans l'expression des gènes, la régulation du cycle cellulaire, l'immortalisation ainsi que la transformation des cellules T ^{32,33}.

HBZ est la seule protéine issue d'une transcription d'un ARNm antisens. Elle empêche l'interaction de Tax avec le promoteur du 5'LTR, et est essentielle à la prolifération cellulaire ³⁴.

5. Propagation de HTLV-1

La transmission d'HTLV-1 s'effectue en traversant la barrière muqueuse ou directement par transfert sanguin. Le virus peut ensuite soit directement infecter les cellules immunitaires de la muqueuse, soit infecter des cellules présentatrices de l'antigène ou des cellules dendritiques¹³. Celles-ci sont alors capables d'infecter d'autres cellules (transmission intercellulaire) via 3 mécanismes principaux. Ensuite, après la primo infection, le virus continue son expansion en infectant d'autres cellules et en y intégrant son génome (cycle infectieux). Il peut également se propager par division mitotique (expansion clonale) ³⁵.

a. Transmission intercellulaire

HTLV-1 infecte principalement les lymphocytes T CD4⁺, mais il est également capable d'infecter dans une moindre mesure des cellules dendritiques, des monocytes, des lymphocytes T CD8⁺ et des lymphocytes B ^{18,36}. Les particules virales ont une capacité infectieuse assez faible mais sont néanmoins capables d'infecter des cellules dendritiques et certaines études *in vitro* ont montré qu'il était possible que des lymphocytes T et B soient infectés par des virions ^{37,38}. HTLV-1 se transmet de cellule à cellule suite à un contact étroit entre celles-ci, permettant une augmentation de l'efficacité infectieuse d'un facteur 10 000 ^{39,40}.

La transmission du virus se fait selon trois mécanismes : la synapse virologique, les conduits cellulaires et la formation de biofilms ⁴¹ (**Figure 3**).

i. Synapse virologique

La synapse virologique a lieu entre un lymphocyte T infecté et un autre non infecté ¹³. Ceux-ci rentrent alors en contact par le biais d'interactions protéiques entre les ICAM-1 et les LFA-1, respectivement présentes sur la cellule infectée et la cible ¹⁸. Tax est responsable de l'augmentation de l'expression des ICAM-1 ³⁶, tandis que p8 et p12 contrôlent la concentration en LFA-1 ¹⁸. Ce phénomène est suivi d'une polarisation du centre organisateur des microtubules de la cellule infectée vers la non infectée dans laquelle Tax est également impliquée⁴¹, différant ainsi de la synapse immunologique où il s'agit du cytosquelette de la cellule infectée qui se voit polariser vers celle non infectée³⁶. Celui-ci joue un rôle crucial dans la mise en place de la synapse virologique, une interférence avec sa polymérisation faisant en effet diminuer l'efficacité de l'infection des cellules cibles ³⁹. Gag et Env s'accumulent au niveau du point de contact entre les deux cellules. Il y a alors bourgeonnement viral dans la fente synaptique ⁴²

et libération de virions vers la cellule cible ⁴³. Les lymphocytes T sont par ailleurs capables de former de telles structures avec plus d'une cellule non infectée simultanément ⁴².

ii. Conduits cellulaires

Les lymphocytes T infectés peuvent également transmettre du matériel viral à d'autres non infectés via des extensions membranaires : des conduits cellulaires ¹³. Leur mise en place est permise grâce à la protéine p8 qui regroupe les LFA-1, augmentant alors l'adhésion entre les deux cellules, et qui contrôle également leur nombre ainsi que leur longueur ^{36,44}. Contrairement à la synapse virologique, la mise en place de conduits peut se faire entre deux cellules distantes ¹³.

iii. Biofilms

Les biofilms viraux sont formés à la surface des cellules infectées, retenant les particules virales autour de la membrane plasmique ^{18,36}. L'avantage de cet agrégat viral est qu'il permet une adhérence rapide entre deux cellules, ce qui n'est pas le cas de la synapse virologique. Ainsi, il assure un transfert des virions vers les cellules cibles même lorsque les contacts entre cellules sont rapides ¹⁸. Cette structure composée notamment de collagène, d'agrine, de tetherine et de la Galectine-3, est essentielle à la transmission du virus, le décrochage des cellules liées par un biofilm diminuant de 80% le nombre de cellules infectées ^{18,41}.

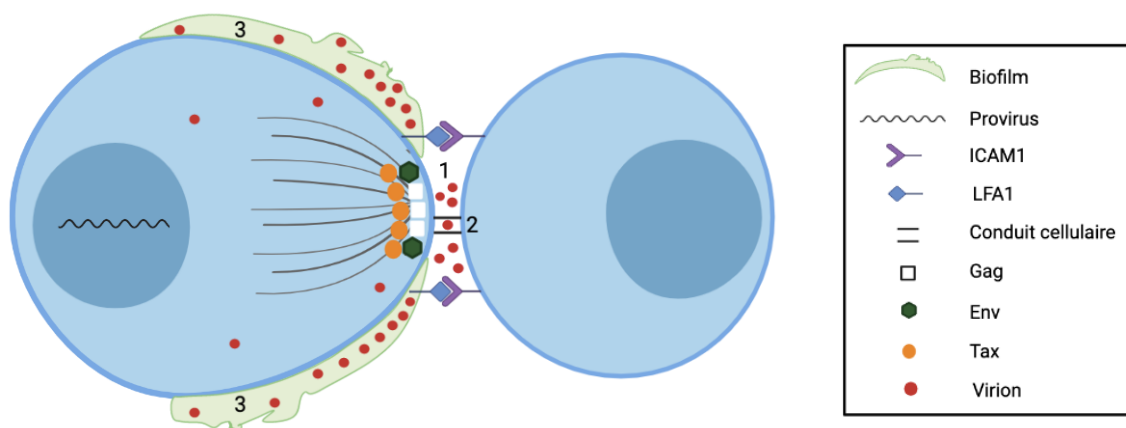


Figure 3 : Les modes de transmission de HTLV-1

HTLV-1 possède 3 modes de transmission intercellulaire : la synapse virologique (1), les conduits cellulaires (2) et les biofilms (3) ¹²⁵.

b. Cycle infectieux

Comme tous les rétrovirus, HTLV-1 est capable d'intégrer son génome à celui de la cellule qu'il infecte. Son cycle infectieux commence par la liaison d'un virion aux récepteurs de la cellule cible via une interaction entre les récepteurs GLUT1 et NRP-1 ainsi que les HSPG de cette dernière, et les protéines virales gp21 et gp46^{45,46}. Après fusion, la capside contenant l'ARN génomique (ARNg) viral pénètre dans la cellule. Grâce à la transcriptase inverse et l'intégrase, l'ARNg est transcrit en ADN viral double brin qui s'intègre dans le génome de la cellule cible^{40,45,46}. S'en suit la transcription de l'ARN viral sous l'action de Tax. Ensuite, l'ARN, épissé ou complet selon les niveaux de concentration en protéine Rex, migre vers le cytoplasme dans lequel a lieu la synthèse de protéines virales⁴⁵. Ces dernières s'assemblent avec deux copies de l'ARNg le long de la membrane plasmique. Il y a alors bourgeonnement et, suite à un processus de maturation protéolytique, libération de virions infectieux^{45,46}.

c. Persistance

HTLV-1 possède 2 modes de réplication. Les mécanismes précédemment décrits concernent la phase infectieuse. La réplication virale se caractérise également par une division mitotique des cellules infectées après immortalisation. On parle alors d'expansion clonale^{24,47}. Sont définis comme clones un ensemble de lymphocytes T possédant le provirus HTLV-1 au même endroit dans le génome hôte⁴⁸. Certains d'entre eux pouvant perdurer de nombreuses années, il semblerait que ce soit cette voie qui soit majoritairement responsable de la persistance de la maladie et pas la transmission intercellulaire²⁴.

II. Gènes à l'origine de l'oncogénicité de HTLV-1

Les gènes Tax et HBZ codent pour les principales protéines oncogéniques de HTLV-1, impliquées dans la multiplication des cellules infectées ainsi que la transformation maligne⁴⁹.

1. Tax

Tax est composée de 353 acides aminés, et joue divers rôles⁵⁰.

Tout d'abord, elle joue le rôle de transactivateur, notamment pour la voie NF- κ B qui régule l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, l'inflammation, la réponse immunitaire et l'apoptose^{51,52}. Elle est impliquée dans la production de cytokines. Tax est également capable d'interférer avec des facteurs régulateurs du cycle cellulaire ainsi qu'avec les mécanismes de réparation de l'ADN. Ces caractéristiques lui confèrent un rôle important dans la prolifération et la transformation des lymphocytes T lors de l'ATL⁵⁰.

Tax est également impliquée dans la formation de la synapse virologique de par sa capacité à réguler l'expression des ICAM-1, dont l'augmentation de la signalisation contribuerait également à la polarisation du cytosquelette ¹³.

Tax est une importante cible des lymphocytes T cytotoxiques ⁵³. On la trouve aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme des cellules infectées ⁵⁴. Elle est toutefois moins exprimée dans les patients souffrant d'ATL que de TSP/HAM, et ne l'est par ailleurs que chez une faible proportion des cellules infectées ⁵³. De plus, ce niveau d'expression n'est pas constant et varie spontanément. Il semblerait que Tax empêche l'apoptose des cellules infectées, chose essentielle à leur maintien. Ainsi, par une expression transitoire de Tax, HTLV-1 assure la survie et la prolifération de la population cellulaire en contournant l'action du système immunitaire ⁵⁵.

2. HBZ

L'ARNm et la protéine de HBZ jouent tous deux un rôle au niveau oncogénique, bien que différents ^{48,56}.

a. La protéine

Tout d'abord, cette protéine est capable de se lier au facteur de transcription cellulaire CREB via son domaine b-ZIP, empêchant alors la régulation médiée de Tax du 5' LTR ^{57,58}. De plus, selon plusieurs études, HBZ a un effet opposé à celui de Tax ⁴⁹. Dans le cas de la voie NF- κ B, HBZ module son activation par Tax en l'inhibant ⁵⁹. De plus, si Tax induit l'expression de AP-1, une protéine impliquée dans la prolifération cellulaire, la tumorigenèse et l'apoptose, HBZ l'empêche ⁶⁰. Par ailleurs, en interférant avec ces voies de signalisation cellulaires, HBZ échappe au système immunitaire de l'hôte ⁶¹.

HBZ a également un rôle dans l'infektivité de par sa capacité à augmenter le nombre de récepteurs ICAM-1 ⁶².

HBZ se trouve dans les cytoplasmes des cellules infectées des personnes asymptomatiques et celles souffrant de HAM/TSP, tandis qu'elle est présente dans le cytoplasme et le noyau de toutes les cellules de celles ayant l'ATL, contrairement à Tax, peu importe le stade de la maladie ⁵⁴. HBZ voit aussi son niveau d'expression varier. En effet, celui de Tax est favorisé en l'absence d'HBZ, alors que celui de HBZ augmente dans les cellules dans lesquelles Tax est fortement exprimée ⁶³. Cela s'explique par la capacité de HBZ à interagir avec CREB-2 situé au niveau du 5' LTR, inhibant ainsi la transcription de Tax ⁵⁶. Cette collaboration entre les deux protéines permet de réguler la latence ainsi que la persistance virale ⁶⁴.

b. L'ARN messenger

La prolifération des cellules infectées est également assurée par l'ARNm antisens de HBZ de par sa capacité à stimuler l'activité du promoteur d'un inhibiteur de l'apoptose, la survivine, ainsi que par son recrutement

sur le promoteur du récepteur de la chimiokine C-C de type 4 (CCR4) dont il augmente la transcription ^{65,66}. Il favorise également la persistance virale ^{65,67}.

S'il existe une interaction entre les protéines Tax et HBZ, c'est également le cas de l'ARNm de HBZ. En effet, une diminution de l'expression de l'ARNm de Tax est constatée suite à une diminution de celle de l'ARNm de HBZ, phénomène qui n'est pas observé suite à la perturbation de la protéine HBZ ⁶⁸. Cet ARNm antisens est principalement localisé dans le noyau des cellules infectées, ce qui va à l'encontre de la fonction habituelle de cet acide nucléique qui normalement quitte le noyau avant d'être traduit en protéines dans le cytoplasme. Cela est dû à une polyadénylation inefficace effectuée par le 3' LTR ⁶⁵. L'ARNm a alors une fonction de régulateur transcriptionnel.

Par ailleurs, il existe une interaction spécifique de l'ARNm de HBZ et le promoteur HTLV-1. Le transcrit déplace l'initiateur de la traduction basale, TBP, ce qui impacte l'interaction existant entre RNAPII et le promoteur situé au niveau du 5'LTR. Ce phénomène empêche l'expression de protéines dont la traduction est sous le contrôle du 5'LTR ⁶⁹.

Enfin, l'ARNm de HBZ est retrouvé dans toutes les cellules infectées chez les patients souffrant d'ATL ⁷⁰. Celui-ci n'étant pas reconnu par les lymphocytes T cytotoxiques, et en étant capable d'empêcher la production de protéines dont la transcription est sous le contrôle du 5'LTR qui stimulent une réponse immunitaire cytotoxique, il constitue un élément stratégique dans la prolifération d'HTLV-1 ^{67,69}.

III. Moyens d'étude de la fonction d'un ARN

1. Les analogues aux acides nucléiques

De nombreux analogues aux acides nucléiques, également appelés acides xénonucléiques (AXN) ⁷¹, sont utilisés pour étudier les fonctions d'un ARN ainsi que dans le cadre de la thérapie antisens. Un oligonucléotide antisens est un acide nucléique synthétique court, simple brin, capable de s'hybrider sur des molécules d'ARN lui étant complémentaires tels que l'ARNm ou les microARN, inhibant alors leur fonction ^{72,73}. Les AXN acycliques tels que les acides nucléiques peptidiques (PNA), les acides nucléiques à thréose (TNA), les acides nucléiques à glycol (GNA), les acides nucléiques bloqués (LNA) et les morpholinos présentent l'avantage d'être facilement synthétisés et de ne pas être affectés par l'activité des nucléases, ni par celle des ADN polymérases ce qui leur permet de ne pas être dupliqués ⁷¹.

a. Les LNA

Les acides nucléiques bloqués tiennent leur nom de leur structure. Cette dernière est bicyclique et comprend des riboses reliés entre eux par une liaison méthylène située entre l'oxygène lié au carbone 2' et le carbone en 4'

auxquels sont liés des bases puriques et pyrimidiques ⁷⁴ (**Figure 4**). La flexibilité de la structure est verrouillée par rapport au furanose parent, ce qui explique l'absence d'isomère conformationnel ⁷⁵.

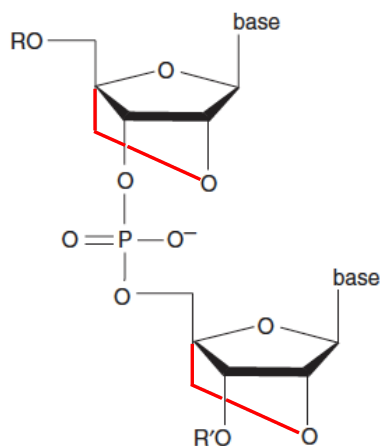


Figure 4 : Structure des LNA

Les LNA sont constitués de riboses reliés entre eux par une liaison méthylène (en rouge sur la figure) située entre l'oxygène lié au carbone 2' et le carbone en 4' auxquels sont liées des bases puriques et pyrimidiques ¹²⁶.

Les LNA présentent une très grande affinité pour l'ARN avec lequel ils sont capables de former des appariements de type Watson-Crick. Une fois de plus, ce phénomène s'explique par la structure de ces molécules. En effet, il semble que leur rigidité soit à l'origine d'une réduction du nombre de degrés de liberté conformationnels. Une diminution de l'entropie serait donc alors à l'origine d'une hybridation rapide ce qui expliquerait cette grande affinité. A cela s'ajoute la formation d'hélice de forme A. Celle-ci est caractérisée par un empilement Π - Π plus fort ainsi qu'une exclusion de l'eau, rendant la structure très compacte, contribuant ainsi à la favorisation de la formation du duplex ⁷⁵.

La membrane cellulaire constitue une barrière importante à la pénétration des LNA. Pour pallier à ce problème, des vecteur lipidiques sont communément utilisés lors de l'utilisation de LNA de grande taille ⁷⁵. Toutefois, les LNA de petite taille sont plus facilement transfectés, et réussissent même à traverser la membrane cellulaire nus et à ensuite avoir une activité antisens ⁷⁵. Ce phénomène est appelé *gymnose*.

b. Les PNA

Les PNA ont une structure consistant en un squelette pseudo-peptidique constitué d'une répétition de N-(2-aminoéthyl)-glycine auxquelles sont liées des bases puriques et pyrimidiques via une liaison méthylcarbonyle ^{76,77} (**Figure 5**). Ce sont des composés très similaires à l'ADN et à l'ARN, tant géométriquement qu'au niveau de l'espacement intramoléculaire, leur design ayant été pensé de manière à ce que les bases les constituant soient séparées par la même distance que celle des acides nucléiques cellulaires ^{74,76}. Les dimères formés avec l'ADN ou

l'ARN sont très stables : le squelette n'étant pas chargé, il y a absence de répulsion, et la mise en place de liaisons hydrogène entre les atomes d'azote du squelette pseudo-peptidique du PNA et le phosphate de l'acide nucléique auquel le PNA se lie assurent le maintien de la structure ⁷⁴.

Grâce à leur capacité de liaison aux acides nucléiques, notamment à l'ARNm, les PNA peuvent être utilisés pour empêcher la traduction de cet ARN en protéines et sont dès lors utilisés dans des applications de recherche ⁷⁴. Ils pourraient être utilisés cliniquement d'ici quelques années, mais leur faible capacité à pénétrer la membrane cellulaire, notamment celle des eucaryotes, est leur principal problème ^{78,79}. De plus, les PNA présentent une faible solubilité dans l'eau, dans laquelle ils ont tendance à former des agrégats ⁸⁰. Plusieurs stratégies ont été utilisées pour tenter de palier à ce problème telles que la micro-injection, l'électroporation, la transduction médiée par l'ADN et la fixation covalente à des peptides pénétrant dans les cellules, la plupart étant inefficaces ⁷⁸. Une des approches les plus prometteuses consiste en l'ajout d'une queue polyarginine liée par covalence au PNA ⁷⁸.

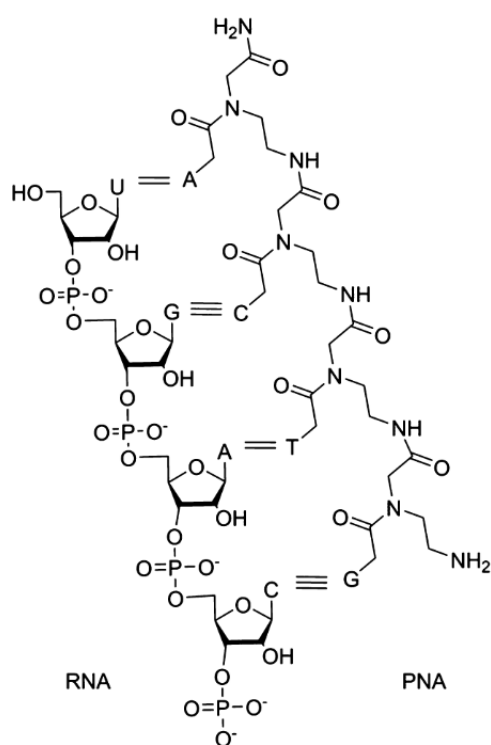


Figure 5 : Structure des PNA

Les PNA ont un squelette pseudo-peptidique constitué d'une répétition de N-(2-aminoéthyl)-glycine auxquelles sont liées des bases puriques et pyrimidiques via une liaison méthylcarbonyle. Ils forment des structures très stables avec l'ARN ¹²⁷.

c. Les TNA

Les TNA diffèrent des acides nucléiques naturels par la présence d'un sucre à 4 atomes de carbone : le α -L-thréose. Leur squelette a une périodicité de 5 atomes de carbone reliés entre eux par des liaisons phosphodiester présentes au niveau des carbones 2' et 3' du thréose ⁸¹. Si l'on compare la structure d'un TNA à celle de l'ADN ou de l'ARN, on constate que sa liaison principale est plus courte d'un atome ⁸² (**Figure 6**).

Lorsque qu'un TNA s'hybride avec lui-même, de l'ARN ou de l'ADN, il forme une hélice de forme A, ce qui explique la forte affinité de cette molécule pour les acides nucléiques cellulaires ^{82,83}. Par ailleurs, il se lie plus étroitement à l'ARN qu'à l'ADN ⁸³.

Ces molécules ont déjà été utilisées avec succès comme oligonucléotide antisens en 2018 par Liu et al. Le TNA synthétisé dans le cadre de cette expérience présentait une bonne hybridation avec l'ARN, une très faible cytotoxicité et pénétrait la membrane d'une grande variété de cellules ⁸⁰.

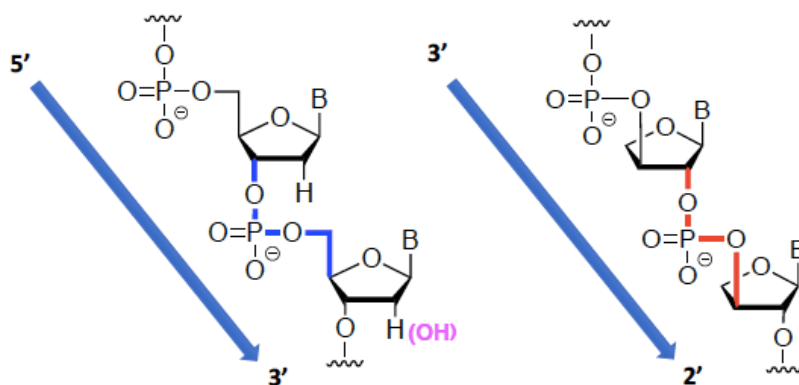


Figure 6 : Structure des TNA

La liaison principale des TNA est plus courte d'un atome que celle de l'ADN (ARN en rose) ⁸².

d. Les morpholinos

Les morpholinos ont une structure simple brin composée de cycles morpholinos reliés entre eux via des liaisons phosphorodiamidates ^{74,84} (**Figure 7**). Ils sont couramment appelés PMO.

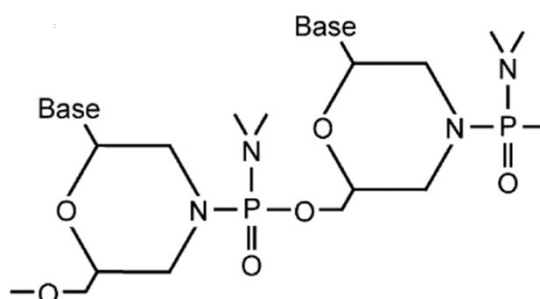


Figure 7 : Structure des morpholinos

Les morpholinos ont une structure courte simple brin composée de cycles morpholinos reliés entre eux via des liaisons phosphorodiamidate ²⁶.

Comme les oligonucléotides précédemment décrits, ils sont capables de se lier à l'ARN via des empilements Watson-Crick. Toutefois, ce lien étant peu étroit, il est nécessaire d'utiliser des structures faisant environ 25 paires de bases⁸⁵. La pénétration de la membrane cellulaire reste un obstacle.

Des techniques de pénétration mécanique comme la microinjection ou l'électroporation ont d'abord été utilisées. D'autres moyens moins fastidieux ont été mis en place, notamment l'ajout d'un peptide riche en arginine appelé CPP, l'ensemble formant un PMO-CPP. Il présentait de bonnes capacités de pénétration cellulaire, mais les doses nécessaires à l'obtention d'une activité antisens étaient cytotoxiques, rendant son optimisation nécessaire⁸⁴. Deux morpholinos semblent prometteurs : Le vivo PMO et le PMOplusTM. Le premier est un PMO lié à un échafaudage moléculaire composé d'une structure dendritique assemblée autour d'un noyau de triazine contenant huit groupes de têtes de guanidinium. Sa pénétration cellulaire apparaît comme bonne, sa cytotoxicité est inférieure à celle des PMO-CPP mais son activité antisens est néanmoins moins étudiée⁸⁴. Le PMOplusTM contient des groupes pipérazine chargés positivement. Il semble moins cytoxique et plus sûr que le vivo PMO mais les recherches quant à son efficacité doivent être poursuivies⁸⁴.

2. L'interférence ARN

L'inférence ARN est un mécanisme naturel de défense face à l'entrée de matériel génétique étranger à la cellule⁸⁶. Les petits ARN interférents (siRNA) et les micro-ARN (miRNA) sont de courts duplexes d'ARN non codants, qui, en utilisant des mécanismes différents, sont capables d'inhiber l'expression de l'ARNm^{87,88}

a. miRNA

Les miRNA sont capables de cliver l'ARNm après transcription ou d'empêcher sa traduction en protéines⁸⁹. Leur rôle premier est de réguler l'expression génétique tout au long de la vie de la cellule⁹⁰. Le phénomène a lieu selon une voie principale, appelée voie canonique. Pour ce faire, lorsqu'un gène est transcrit, des têtes d'épingle, appelées pri-miRNA, se forment par appariement au niveau de l'ARN. Le complexe microprocesseur, composé de Drosha et DGCR8, vient couper ces pri-miRNA pour obtenir des pré-miRNA^{91,92}. Ceux-ci sont reconnus par une exportine et atteignent le cytoplasme dans lequel se situe Dicer, une endoribonucléase. Elle va alors cliver les pré-miRNA de manière à obtenir un duplex miRNA mature. La structure double brin se lie à une protéine Argonaute pour ensuite former le complexe de silencing miRISC constitué d'un seul brin d'ARN guide pouvant se lier à la séquence lui étant complémentaire au niveau de l'ARNm⁹¹. Cette complémentarité va déterminer si le miRISC, en se liant, sera à l'origine d'un clivage ou s'il ne s'agira que d'une interférence⁸⁹. Dans le cas des cellules animales, l'appariement n'est pas parfait, RISC ne va donc qu'empêcher la traduction de l'ARNm en protéines. Toutefois, en étant capable d'inhiber la traduction de l'ARN même en absence de complémentarité parfaite, un miRNA va pouvoir agir sur l'expression de plusieurs gènes simultanément, contrairement à un siRNA⁸⁶ (**Figure 8**).

Ce système peut être utilisé en thérapie en utilisant des miRNA synthétiques. Sa conception est plus simple que celle du siRNA. Toutefois, le développement de cette thérapie peut être difficile à mettre en place, l'administration *in vivo* de ces molécules pouvant également activer le système immunitaire innée via TLR80⁸⁸. De plus, se pose également le problème de l'utilisation d'un moyen d'administration efficace⁸⁸. Les miRNA sont considérés comme des modulateurs épigénétiques car ils affectent la quantité de protéines produites en ciblant le transcrite associé à celles-ci sans modifier la séquence d'ADN initiale⁹³.

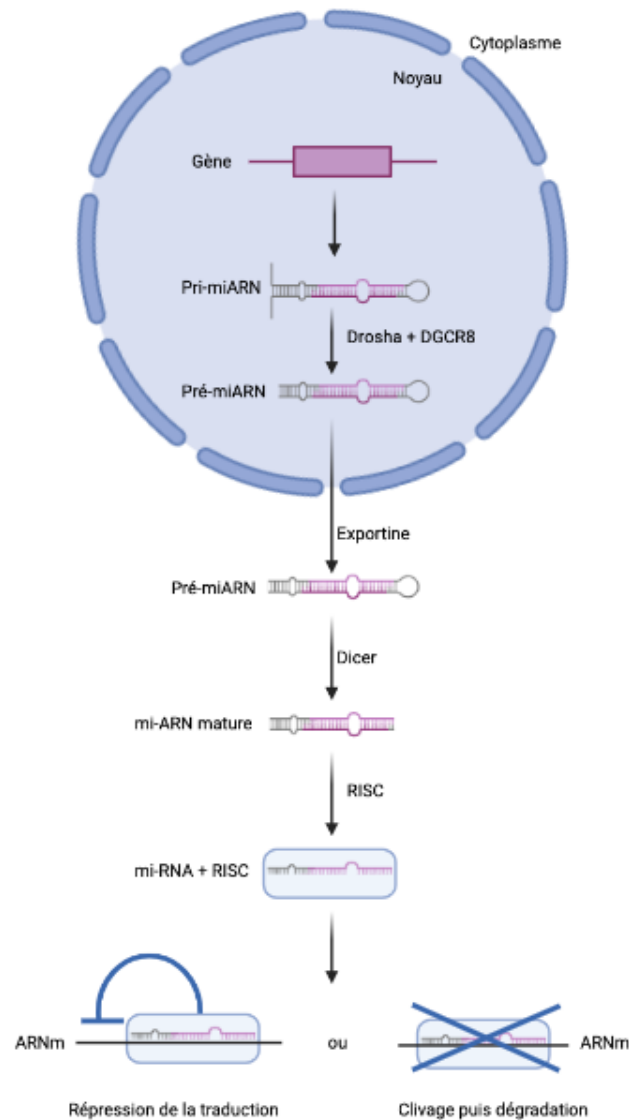


Figure 8 : Fonctionnement des miRNA

Les pri-miRNA se forment par appariement au niveau de l'ARN. Drosha et DGCR8 viennent les couper en pré-miRNA. Ceux-ci sont reconnus par une exportine et atteignent le cytoplasme dans lequel se situe Dicer. Les pré-miRNA sont clivés de manière à obtenir un duplex miRNA mature. La structure double brin se lie à une protéine Argonaute pour former le complexe de silencing miRISC constitué d'un seul brin d'ARN guide. La complémentarité entre l'ARNm et le brin guide détermine si le miRISC sera à l'origine d'un clivage, ou s'il ne s'agira que d'une inhibition de la traduction¹²⁸.

b. siRNA

Les siRNA sont de petits ARN doubles brins (19 à 30 nucléotides) se trouvant dans le cytoplasme. Ils sont capables de dégrader l'ARNm auxquels ils sont complémentaires. Pour ce faire, lorsque de l'ARN double brin se

trouve dans le cytoplasme, celui-ci est clivé par Dicer, et des siRNA sont obtenus ^{94,95}. Ces derniers peuvent également être obtenus après clivage de courts fragments d'ADN en épingle à cheveux : les shRNA ⁹⁶. Ils vont ensuite se lier à l'Argonaute qui va cliver un des deux brins pour ne plus contenir qu'un seul brin, dit brin guide. L'ensemble forme alors un complexe RISC capable de se lier à l'ARNm complémentaire au brin guide qui est ensuite clivé par l'argonaute ^{94,95}. La coupure a lieu entre les bases 10 et 11 par rapport à l'extrémité 5' du brin antisens du siRNA ⁹⁴. Ce système peut être utilisé en introduisant des siRNA synthétiques afin d'interférer de manière ciblée sur un ARN.

Un des risques de l'utilisation de siRNA comme moyen d'interférer avec l'ARN est de déclencher le système immunitaire inné ⁹⁷. Se posent également des problèmes de stabilité des molécules ainsi que d'administration afin qu'elles puissent atteindre les cellules cibles et passer les membranes ^{86,98}.

3. Les ribozymes

Les ribozymes sont des ARN possédant une activité catalytique ⁹⁶. Ils sont en effet capables de reconnaître une séquence d'ARN, de s'y lier et de cliver les liens phosphodiester et de se détacher pour ensuite se lier à une autre molécule d'ARN ⁹⁹. Cette reconnaissance se fait de la même manière que l'appariement antisens. L'avantage de cette technique est que le ribozyme est capable de cliver plusieurs brins d'ARN, ce qui n'est pas le cas dans des techniques antisens classiques où les molécules utilisées ne peuvent se lier qu'à une seule molécule d'ARN ⁹⁹. Il existe de nombreuses sortes de ribozymes. Deux d'entre eux sont souvent utilisés à des fins thérapeutiques : le ribozyme en tête de marteau et le ribozyme en épingle à cheveux ⁹⁹ (**Figures 9 et 10**). Il s'agit de ribozymes dits auto-catalytiques ¹⁰⁰.

Il existe deux formes possibles de ribozymes en tête de marteau : le minimal et le complet. Les ribozymes minimaux sont constitués de trois structures d'ARN hélicoïdales entourant un cœur catalytique constitué de 15 bases non complémentaires et sont caractérisés par une constante de vitesse de rotation catalytique d'environ 1/min ¹⁰¹. Par la suite, il fut découvert que les ribozymes naturels, dits complets, comprennent des éléments de séquences très peu conservés, notamment à l'origine d'une interaction tertiaire entre les hélices 1 et 2. Ils possèdent une constante de vitesse de rotation catalytique supérieure à 100/min ¹⁰¹. S'ils sont plus efficaces, ils sont néanmoins extrêmement difficiles à élaborer. Il est apparu par la suite que la seule séquence additionnelle nécessaire consistait en l'ajout d'une base uracile 7 nucléotides après le site de clivage ¹⁰¹. Afin d'assurer le clivage de l'ARN, le ribozyme est modifié : la boucle 3 est retirée et les hélices 3 et 1 deviennent alors le brin antisens. Pour que la structure puisse assurer le clivage, le cofacteur catalytique Mg^{2+} est nécessaire ⁹⁹.

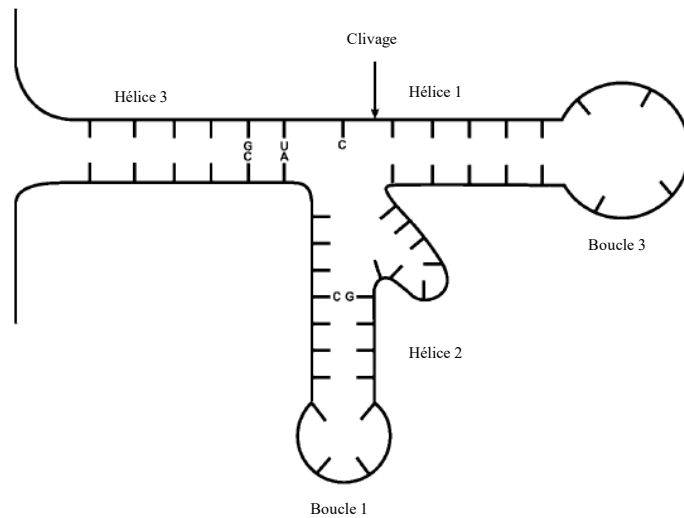


Figure 9 : Les ribozymes en tête de marteau

Les ribozymes en tête de marteau sont constitués de trois structures d'ARN hélicoïdales entourant un cœur catalytique constitué de 15 bases non complémentaires⁹⁹.

Le ribozyme en épingle à cheveux est composé de 4 hélices reliées par des boucles contenant des bases non appariées. La boucle à la base de l'hélice 4 est retirée et les hélices 1 et 4 forment alors le brin antisens. Il nécessite également la présence de Mg^{2+} , non pas pour assurer le clivage mais pour maintenir sa structure secondaire⁹⁹.

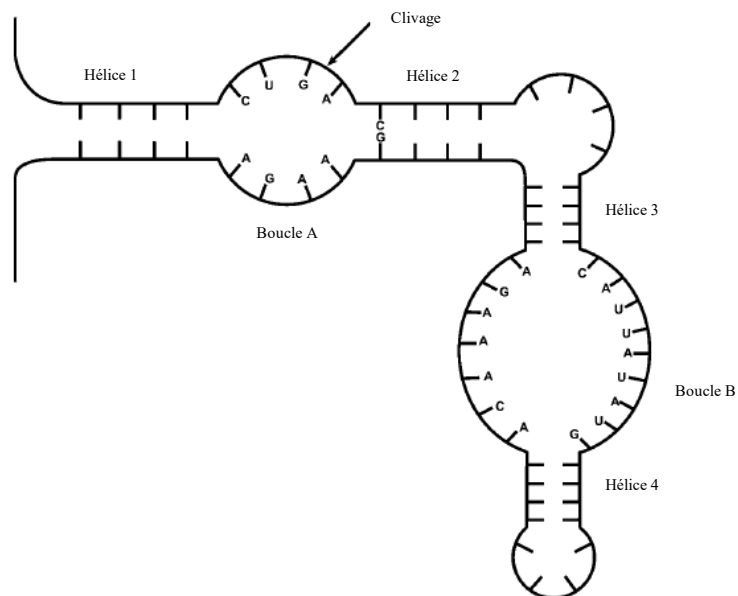


Figure 10 : Le ribozyme en épingle à cheveux

Le ribozyme en épingle à cheveux est composé de 4 hélices reliées par des boucles contenant des bases non appariées¹⁰¹.

Afin de pouvoir faire traverser la membrane cellulaire aux ribozymes, des liposomes cationiques peuvent être utilisés, ce qui permet également de les protéger des nucléases ⁹⁹.

4. *CRISPR/Cas9*

Cas 9 est une protéine de type nucléase provenant du système immunitaire CRISPR bactérien où elle a comme rôle la dégradation d'ADN étranger à l'hôte. Cas 9 forme un duplexe avec deux ARN non codants : L'ARN CRISPR (ARNc) et l'ARNc transactivateur (ARNt). Cette structure peut être modifiée de manière à lier ces deux ARN qui sont alors transcrits en un ARN guide (ARNsg) capable de se lier à l'ADN étranger complémentaire à sa séquence nucléotidique via un appariement de type Watson-Crick ¹⁰². L'ADN est alors lysé par Cas 9. Une des caractéristiques de cette structure est qu'elle agit dans le noyau, contrairement à d'autres systèmes comme l'ARNi dont l'action a lieu dans le cytoplasme ¹⁰³. Elle agit donc au niveau de l'ADN et entraîne l'inactivation définitive d'un gène ¹⁰³.

Toutefois, Cas 9 peut être désactivée en effectuant une mutation de deux résidus situés dans ses domaines nucléasiques, on parle alors de dCas9 ¹⁰². Plus précisément, cette modification consiste en la substitution catalytique dans le domaine RuvC, l'abolition de l'activité endonucléasique et un remplacement catalytique dans le domaine HNH ¹⁰³. La dCas9 peut être liée à l'ADN et inhibe alors la transcription, soit au niveau de l'initiation, ou de l'élongation. De plus, sa présence sur l'ADN empêche stériquement l'action de l'ARN polymérase ¹⁰³. De plus, dCas 9 peut être liée à des domaines répresseurs de la transcription tel que la Kruppel-associated box (KRAB) ¹⁰⁴.

Tableau 1 : Comparaison des différents moyens d'étude de la fonction des ARN

Parmi toutes les techniques présentées, presque toutes nécessitent l'utilisation de système de transport permettant un meilleur passage de la membrane cellulaire. Toutefois, les analogues aux acides nucléiques présentent une meilleure capacité de résistance face aux nucléases que les si et les miRNA. Ces derniers présentent également le désavantage de pouvoir activer une réponse du système immunitaire de l'hôte.

Techniques	Avantages	Inconvénients
LNA	Bonne capacité de liaison à l'ARN Bonne pénétration de la membrane cellulaire pour les LNA de petite taille Bonne résistance aux nucléases	Faible capacité à franchir la membrane pour les LNA de grande taille
PNA	Bonne capacité de liaison à l'ARN Bonne résistance aux nucléases	Faible solubilité dans l'eau Faible capacité à franchir la membrane cellulaire
TNA	Bonne capacité de liaison à l'ARN Bonne résistance aux nucléases	Bonne pénétration de la membrane Faible toxicité
Morpholinos	Faible capacité de liaison à l'ARN Bonne résistance aux nucléases	Faible capacité à franchir la membrane cellulaire
miRNA	Possibilité d'agir sur plusieurs gènes simultanément	Risque d'activation du système immunitaire Faible capacité à franchir la membrane cellulaire Faible résistance aux nucléases
siRNA	Meilleure capacité d'extinction de gènes que les miRNA	Risque d'activation du système immunitaire Faible capacité à franchir la membrane cellulaire Faible résistance aux nucléases
Ribozymes	Possibilité de cliver plusieurs brins d'ARN	Technique encore peu utilisée
CRISPR/Cas9	Action dans le noyau Système fiable et spécifique	

Objectifs

Le but de ce projet est d'étudier le rôle de l'ARNm de HBZ, notamment son implication dans la production de protéines virales issues de la transcription sens, à l'aide de PNA. Ceux-ci ciblent des zones situées au niveau des 50 premiers nucléotides de HBZ. Les tâches à effectuer sont :

- Étudier la toxicité des PNA sur les lignées cellulaires utilisées :

Dans un premier temps, il est nécessaire d'étudier l'effet des PNA sur la viabilité des différentes lignées utilisées. Pour cela, ils seront mis en contact avec les lignées HuT102, ATL-2 et C8166 à des concentrations et des temps d'incubation différents. Après cela, leur toxicité a été évaluée à l'aide d'un marquage à l'iodure de propidium.

- Étudier l'internalisation des PNA dans les lignées cellulaires utilisées :

Ensuite, l'internalisation des PNA sera étudiée. Ils seront mis en contact avec les lignées HuT102, ATL-2 et C8166 à des concentrations et des temps d'incubation différents. Après cela, une analyse de cytométrie en flux sera réalisée.

- Étudier l'impact de l'utilisation des PNA sur la production de protéines virales :

L'impact des PNA sur la production de protéines virales dont la transcription est sous le contrôle du 5' LTR sera étudié. Pour cela, ils seront mis en contact avec les lignées HuT102, ATL-2 et C8166 à des concentrations et des temps d'incubation différents. Après cela, un marquage ciblant la protéine Tax sera réalisé, suivi d'une analyse de cytométrie en flux.

- Étudier l'impact de l'utilisation des PNA sur le niveau d'expression des ARNm de HBZ et des protéines virales :

L'impact de l'utilisation des PNA sur le niveau d'expression des ARNm de HBZ et des protéines virales sera finalement étudié. Pour cela, ils seront mis en contact avec les lignées HuT102, ATL-2 et C8166 à des concentrations et des temps d'incubation différents. Après quoi, une analyse RT-qPCR sera réalisée.

Matériel et méthode

1. Culture cellulaire

Des lignées cellulaires infectées par HTLV-1 (ATL-2, C8166, HuT102) ont été cultivées dans du milieu de culture RPMI 1640 (Gibco) complété avec du FBS 10%, de la pénicilline 100 U/mL et de la streptomycine 100 U/mL (Gibco), mentionné dans la suite du texte par "RPMI complet". Les cellules ont été incubées à 37°C dans une atmosphère d'humidité constante contenant 5% de CO₂. Chaque lignée a été conservée 2 mois et passée tous les 3 jours. Les cellules semi-adhérentes (ATL-2) ont été décollées toutes les 1-2 semaines à l'aide de trypsine-EDTA (Lonza). Les références des lignées cellulaires se trouvent en annexe (**Annexe 1**).

2. Mise en contact avec les PNA

Des PNA synthétisés par le Docteur Alex Manicardi (Department of Organic and Macromolecular Chemistry, UGent, Belgique), dont les caractéristiques sont décrites dans le Tableau 2, ont été mis en contact avec les différentes lignées cellulaires. Ils ont été placés avec 200 µL de cellules à 1.10⁶ cellules/mL dans une plaque 48 puits. Différentes concentrations de PNA ont été utilisées (1, 2 et 4 µM) pendant trois temps d'incubation différents (16, 24 et 48 heures).

Tableau 2 : Constitution des PNA

Chaque PNA cible une zone des 50 premiers nucléotides de l'ARN de HBZ. Le PNA 4 est le PNA contrôle, dont la séquence ne cible aucune partie de l'ARN de HBZ. Fl correspond à la fluorescéine, O au 2-(2-(aminoethoxy)ethoxy)acetamide (un lien permettant un meilleur rendement lors de réaction de marquage du PNA), pkkkrkv est un signal de localisation nucléaire^{105,106}.

Nom	Séquence
PNA 1	Fl-O-TCCTCCGGGCATGGAACA-pkkkrkv-NH2
PNA 2	Fl-O-CAGGCAAACATCGAAACA-pkkkrkv-NH2
PNA 3	Fl-O-CAGCCCTGAGGCCGCCAT-pkkkrkv-NH2
PNA 4 (contrôle)	Fl-O-ACCTGCTGAACTGAGACG-pkkkrkv-NH2

3. Test de survie cellulaire : iodure de propidium

La perméabilité de la membrane des cellules a été le critère choisi pour évaluer la toxicité des PNA sur les lignées cellulaires utilisées. Pour cela, les cellules ont été centrifugées et marquées avec 3 µL de iodure de

propidium 1µg/ml pendant 10 minutes à l'obscurité. Une analyse de cytométrie en flux a ensuite été réalisée à l'aide du cytomètre en flux BD FACSCanto II (BD Bioscience). Le logiciel FlowJo a été utilisé pour analyser les résultats.

4. Marquage Tax

Après mise en contact avec les PNA, les cellules ont été récoltées puis fixées à l'aide de PBS contenant 4% PFA durant 20 minutes à l'obscurité. Ensuite, les cellules ont été perméabilisées avec 100µl de PBS contenant 1% Triton et bloquées avec 300µl du PBS - 2% FBS. Après le blocage, les cellules ont été transférées sur une plaque 96 puits et un marquage ciblant Tax a été réalisé en utilisant l'anticorps monoclonal mouse IgG2a anti-Tax-1 (Tax3, fourni par F. Bex, ULB, Bruxelles) (1/20) et Alexa FluorTM647 Donkey antimouse IgG (*Invitrogen*) (1/1000). Finalement, une analyse de cytométrie en flux a été réalisée à l'aide du BD FACS CantoTMII (BD Bioscience). Les résultats ont été analysés à l'aide des logiciels FlowJo et GraphPad. Une analyse ANOVA à deux facteurs a été réalisée pour identifier une éventuelle différence significative entre les moyennes.

5. RT-qPCR

L'ARN a été extrait à l'aide du kit Nucleospin RNA Plus (Macherey Nagel) selon le protocole de la firme. Ensuite, l'ADNc a été synthétisé à partir de 1µg de cet ARN en utilisant le kit the FastGene Scriptase II cDNA (NIPPON Genetics). Une fois obtenu, celui-ci a été dilué 10 fois avec de l'eau distillée (Gibco). Les transcrits de Tax, HBZ et HPRT ont ensuite été quantifiés par qPCR en utilisant des amorces présentant les caractéristiques suivantes :

- Tax :
 - o ACCAACACCATGGCCCA (fw)
 - o GAGTCGAGGGATAAGGAAC (rev)

- HBZ :
 - o CTGTGCTTGACGGTTTGCTA (fw)
 - o CCTCTTTCTCCCGCTCTTTT (rev)

- HPRT :
 - o AAGGGCATATCCTACAACAAAC (fw)
 - o GGTCAGGCAGTATAATCCAAAG (rev)

Le Takyon No Rox SYBR 2X MasterMix (Eurogentec) a été utilisé. La qPCR a été réalisée avec l'appareil de mesures LightCycler 480 selon le programme de températures suivant :

- 2 min à 50°C,
- 3 min à 95°C,
- 45 cycles de 10 secondes à 95°C et de 45 secondes à 60°C.

Les résultats ont été analysés en utilisant les logiciels LightCycler480 et GraphPad. Une analyse ANOVA à un facteur a finalement été réalisée de manière à identifier une éventuelle différence significative entre les moyennes du contrôle et celles des différents PNA testés.

1. Caractérisation des lignées utilisées

Dans un premier temps, les lignées cellulaires ATL-2, C8166 et HuT102 ont été caractérisées de manière à évaluer le niveau d'expression des ARN de Tax et HBZ.

Le provirus de HTLV-1 contient deux extrémités LTR contrôlant la transcription de l'ARN de ces deux protéines (**Figure 11.A**). La transcription de Tax est sous le contrôle du LTR situé à l'extrémité 5', tandis que celle de HBZ est sous le contrôle de celui situé à l'extrémité 3'.

Après avoir été cultivées, les cellules ont été récoltées et leur ARN extrait. Ensuite, le niveau d'expression des ARN de Tax et HBZ a été déterminé par RT-qPCR. Les ATL-2 ont un faible niveau d'expression de Tax et un haut niveau d'expression de HBZ (**Figure 11.B-C**). Les HuT102 expriment fortement Tax et très faiblement HBZ. Les C8166 quant à elles ont un niveau d'expression de Tax intermédiaire entre celui des HuT102 et celui des ATL-2, et expriment très faiblement HBZ. En conclusion, ces lignées cellulaires expriment toutes l'ARN de Tax et HBZ mais à des niveaux d'expression différents.

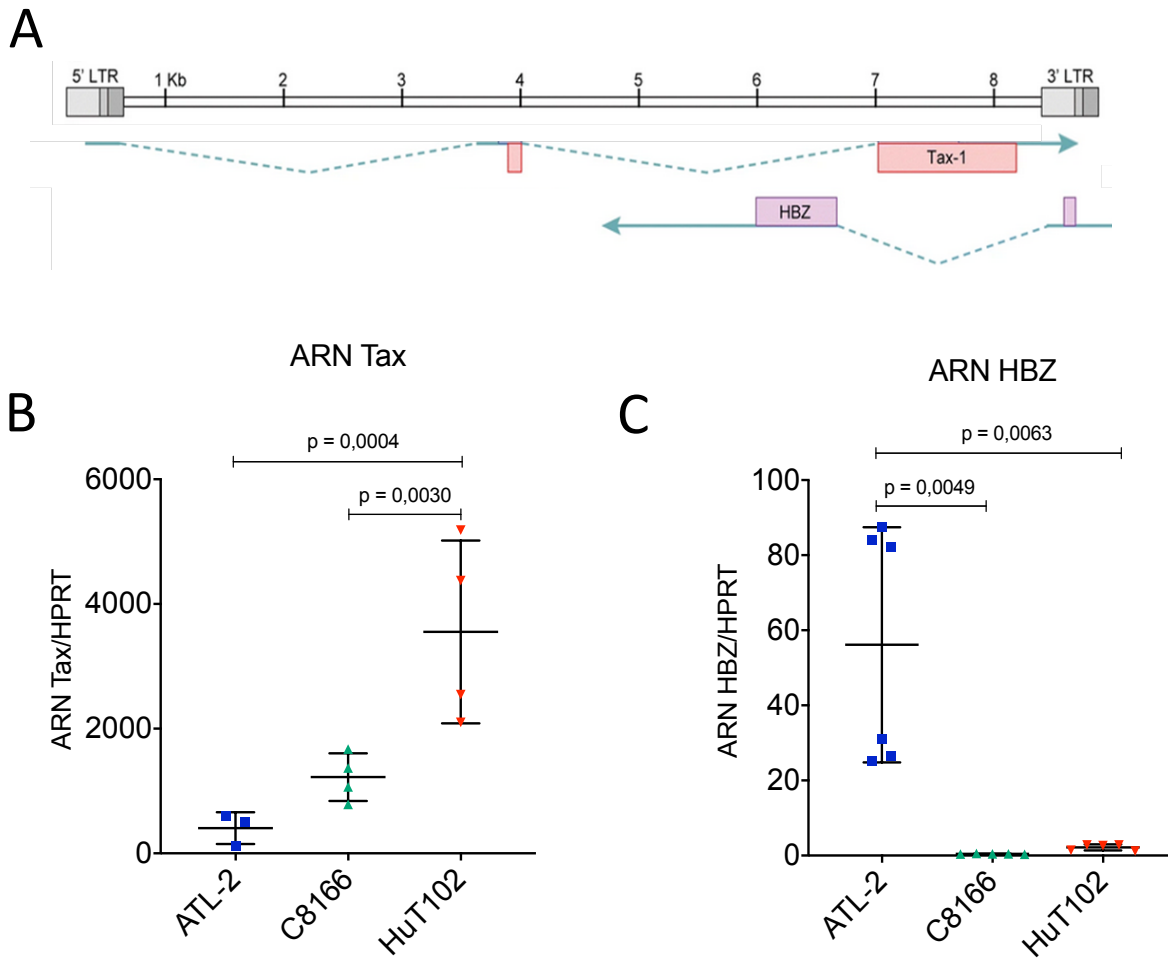


Figure 11 : Mesure de la transcription des lignées cellulaires ATL-2, C8166 et HuT102

(A) Organisation du provirus de HTLV-1. (B-C) Les niveaux d'expression des transcrits Tax et HBZ ont été quantifiés par RT-qPCR selon la méthode des ΔCt . HPRT est le gène choisi comme contrôle endogène. La signification statistique a été déterminée par une analyse ANOVA à un facteur.

2. *Évaluation de la toxicité des PNA*

La perméabilité de la membrane des cellules a été le critère choisi pour évaluer la toxicité des PNA sur les lignées cellulaires utilisées. Pour ce faire, les PNA ont été mis en contact avec les 3 lignées cellulaires à trois concentrations (1, 2 et 4 μM) pendant trois temps d'incubation (16, 24 et 48 heures). Une fois les cellules récoltées, de l'iodure de propidium a été ajouté. Une analyse de cytométrie en flux a ensuite été réalisée (**Figure 12 A**). Les cellules qui ont internalisé l'iodure de propidium ont été mises en évidence et correspondent à la population rouge (**Figures 12 B.D.F**). La population bleue correspond aux cellules qui n'ont pas internalisé l'iodure de propidium. Les cellules qui ont internalisé l'iodure de propidium ont une membrane perméable. Il s'agit d'une caractéristique des cellules nécrosées ou en apoptose. Sur base de ce marquage, les FSC-A et les SSC-A des cellules positives et négatives à l'iodure de propidium ont été déterminés. Cela a permis d'identifier les deux populations pour chaque lignée cellulaire pour toutes les conditions testées. Sur cette base, le pourcentage de cellules vivantes a été identifié. (**Figures 12 C.E.G**).

Pour les HuT102, il est constaté que le pourcentage en cellules vivantes diminue significativement après la mise en contact avec les PNA 1 et 4. Ce pourcentage diminue davantage lorsque la concentration en PNA testée est élevée (**Figure 12 C**). Le pourcentage en cellules vivantes est de 43,6 % pour le PNA 1 à 4 μM pour un temps d'incubation de 16 heures ($p < 0,0001$) et de 47,2% pour le PNA 4 à 4 μM pour un temps d'incubation de 24 heures ($p = 0,0060$) et de 46,2% pour un temps d'incubation de 48 heures ($p = 0,0018$). En revanche, dans le cas des ATL-2, ce pourcentage diminue de manière significative pour presque toutes les conditions testées (**Figure 12 E**). Enfin, aucune différence significative n'est constatée dans le cas de la lignée C8166 (**Figure 12 G**). Le détail des statistiques se trouve en annexe (**Annexes 2-3**). Il peut donc être constaté que les PNA n'ont pas le même impact sur les différentes lignées cellulaires. Dans tous les cas, leur ajout fait diminuer le pourcentage de cellules vivantes, ce qui montre que les PNA ont un effet toxique sur les cellules. Toutefois, cet effet est différent pour chaque lignée cellulaire. Cela montre que les PNA sont toxiques pour toutes les cellules, mais dans des proportions variables.

Ces résultats ne permettent pas de mettre en évidence de différence significative entre les concentrations et les temps d'incubation testés. Pour la suite des expérimentations il est décidé de se focaliser sur une concentration intermédiaire de 2 μM et un temps d'incubation de 48 heures. Ces conditions donnent aux PNA le temps nécessaire de s'internaliser et d'agir sur les mécanismes de la cellule. Un éventuel effet des PNA aurait pu passer inaperçu en choisissant un temps plus court.

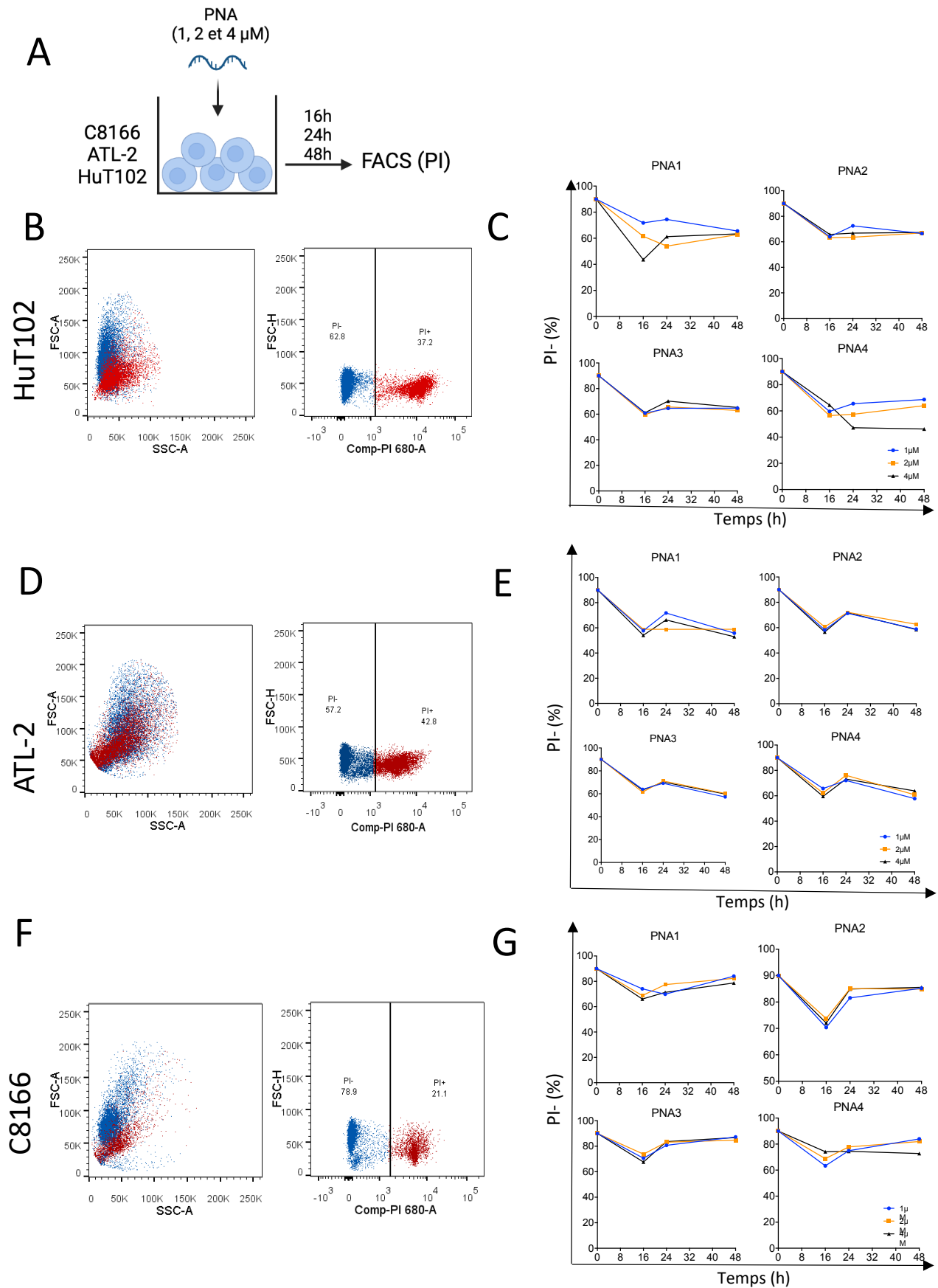


Figure 12 : Evaluation de la toxicité des PNA

(A) Schéma expérimental : les PNA ont été mis en contact avec les cellules selon trois concentrations (1, 2 et 4 μ M) et trois temps d'incubation (16, 24 et 48 heures). De l'iodure de propidium a ensuite été ajouté, suivi d'une analyse de cytométrie en flux. **(B.D.F)** La population de cellules négatives à l'iodure de propidium a été identifiée (en rouge sur le graphique) pour chaque lignée selon les FSC-A et SSC-A (forward scatter area et side scatter area). **(C.E.G)** Le pourcentage de cellules négatives à l'iodure de propidium est représenté pour chaque condition testée. La signification statistique a été déterminée par une analyse ANOVA à 2 facteurs.

3. Internalisation des PNA et impact sur la production de Tax dans la lignée HuT102

Les PNA ont été mis au contact des HuT102 à trois concentrations (1, 2 et 4 μM) pendant trois temps d'incubation (16, 24 et 48 heures). Après cela, l'expression de la protéine Tax a été analysée par cytométrie en flux après marquage avec un anticorps monoclonal et un conjugué Alexa FluorTM647 Donkey antimouse IgG. Les PNA, couplés à la fluorescéine, n'ont pas nécessité de marquage (**Figure 13 A**). Les résultats présentés se focalisent sur une condition : un temps d'incubation de 48 heures et une concentration en PNA de 2 μM (**Figure 13 B-E**). Après analyse de la cytométrie en flux, deux populations sont visibles en fonction de leur FSC-A et SSC-A (**Figure 13 B**). Précédemment, un marquage au propidium iodure a permis d'identifier les FSC-A et les SSC-A des cellules négatives à l'iodure de propidium (**Figure 12 B,D,F**). Ces cellules n'ayant pas internalisé l'iodure de propidium ne présentent pas de membrane poreuse et correspondent à des cellules vivantes. Ainsi, sur base des FSC-A et des SSC-A, la population en cellules vivantes a été identifiée. Il s'agit de celle pour laquelle la FSC-A est supérieure à 50K. En sélectionnant cette population, le pourcentage de cellules vivantes a été déterminé (correspondant à l'encadré noir) (**Figure 13 B**). Ensuite, les intensités de fluorescence de la protéine Tax (représentées en ordonnée) et des PNA (représentées en abscisse) ont été mesurées (**Figure 13 C**). Il peut être observé que les intensités de fluorescence des PNA sont plus élevées pour les PNA 1 et 4 avec des valeurs de respectivement de 1513 et 3009. Ces intensités de fluorescence plus élevées se traduisent par un décalage des densités de population vers la droite. L'intensité de fluorescence de Tax est plus élevée pour le PNA 1 avec une valeur de 2056. Celle-ci est proche de celle du mock : 1937. Les intensités de fluorescence des autres PNA sont inférieures à celle du mock. De plus, deux populations apparaissent après exposition aux PNA 2 et 4. Ensuite, les intensités de fluorescences moyennes des PNA et de Tax sont représentées pour chaque PNA testé (**Figure 13 D-E**). Le PNA 4 est celui pour lequel la valeur de fluorescence moyenne est la plus élevée avec une valeur de 2363,75 contre une valeur de 1408,25 pour le PNA 1, de 556,25 pour le PNA 2 et de 1141,5 pour le PNA 3 ($p < 0,0001$) (**Figure 13 D**). L'intensité de fluorescence de Tax n'est pas impactée par les PNA, celle-ci n'étant pas significativement différente après mise en contact avec les PNA 1, 2 et 3 par rapport au PNA 4 correspondant au PNA contrôle (**Figure 13 E**). Enfin, l'intensité de fluorescence moyenne des PNA et de Tax est représentée pour les différentes concentrations testées en fonction du temps d'incubation (**Figure 13 F-G**). Un pic d'augmentation de l'intensité de fluorescence moyenne des PNA pour un temps d'incubation de 16 heures est observé pour les PNA 1, 2 et 3. Celui-ci est d'autant plus important que la concentration en PNA est élevée. Par ailleurs, pour chaque PNA et chaque temps d'incubation, plus la concentration au contact des cellules est élevée, plus l'intensité de fluorescence moyenne des PNA augmente (**Figure 13 F**). L'intensité de fluorescence moyenne de Tax n'est pas impactée par les PNA, aucune différence significative n'étant constatée (**Figure 13 G**).

Sur base de ces résultats, il apparaît que l'intensité de fluorescence moyenne des PNA est d'autant plus importante que la concentration en PNA est élevée. Cette intensité de fluorescence moyenne des PNA a été mesurée par cytométrie en flux. La préparation des échantillons en vue de cette analyse a nécessité plusieurs étapes de lavage. Ainsi, si un signal de fluorescence correspondant au PNA est détecté, il s'agit de PNA qui ont soit pénétré la membrane cellulaire, soit qui sont en interaction avec elle, les autres ayant été éliminés lors des lavages.

Ces PNA sont considérés par la suite comme ceux ayant été internalisés par la cellule. De plus, la variation de l'intensité de fluorescence moyenne des PNA peut être mise en relation avec leur quantité. Cette intensité de fluorescence moyenne est d'autant plus importante que la concentration en PNA est élevée. Il peut donc être conclu que plus la concentration de PNA mise en contact avec les cellules est élevée, plus les PNA sont internalisés (**Figure 13 F**). Selon le même raisonnement, lorsque les PNA ont été mis en contact avec les cellules pendant 48 heures à une concentration en PNA de 2 μ M, le PNA 4 est celui qui est le mieux internalisé (**Figure 13 D**). De plus, les deux populations apparaissant après exposition aux PNA 2 et 4 se traduisent par un décalage des densités de population vers la droite. La population la plus à droite internalise donc mieux les PNA (**Figure 13 C**). Enfin, aucune différence significative pour les intensités de fluorescence et les intensités de fluorescence moyennes de Tax n'a été constatée. Ces intensités peuvent également être mises en relation avec la quantité de protéines Tax produite par la cellule. Ainsi, l'absence de différence significative ne permet pas de mettre en évidence un lien entre l'ajout de PNA et la production de la protéine Tax. Le détail des statistiques se trouve en annexe (**Annexe 4**).

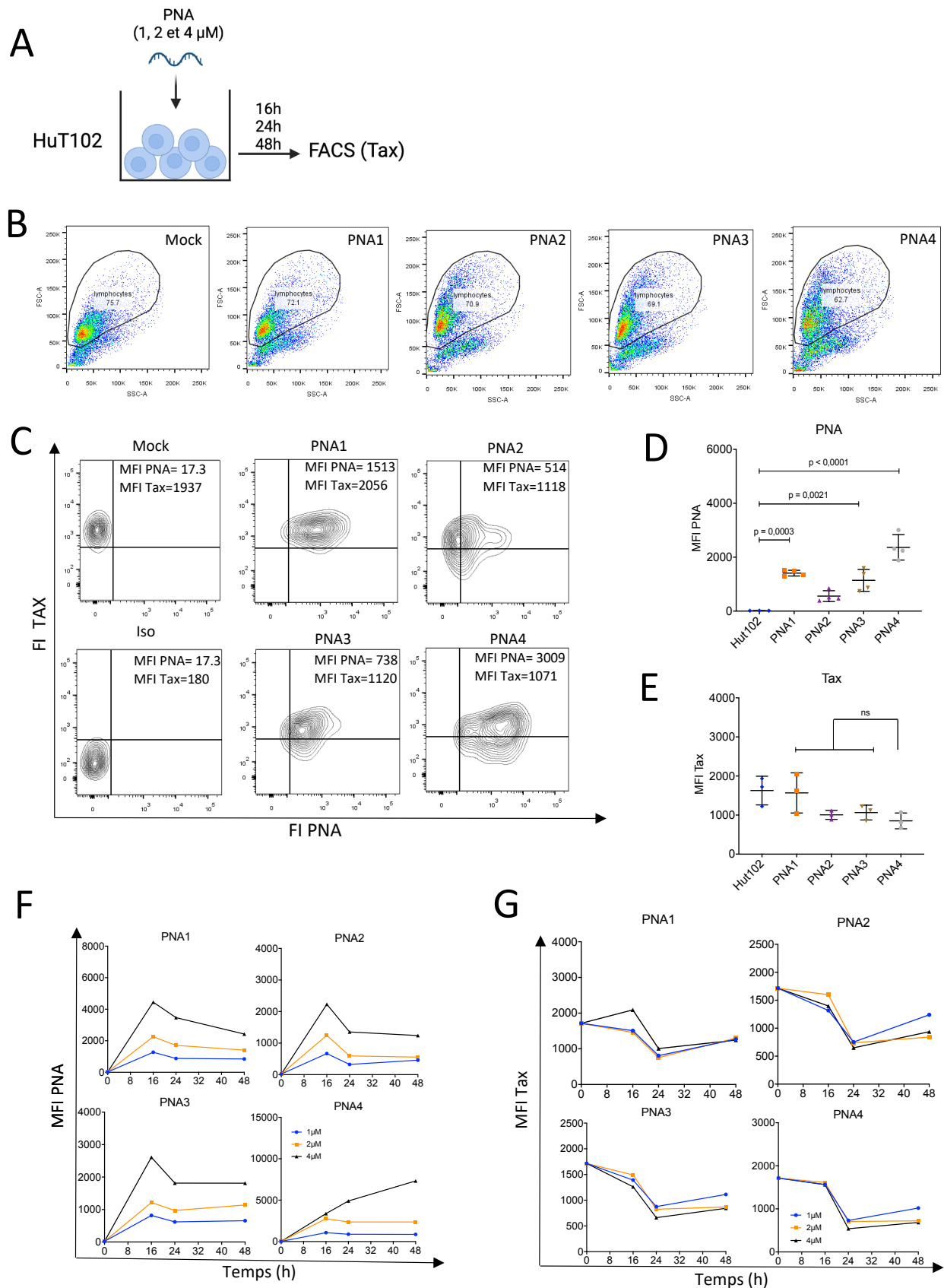


Figure 13 : Internalisation des PNA et impact sur la production de Tax pour la lignée HuT102

(A) les PNA ont été mis en contact avec les cellules à trois concentrations (1, 2 et 4 μ M) et à trois temps d'incubation (16, 24 et 48 heures). Un marquage de Tax a ensuite été réalisé, suivi d'une analyse de cytométrie en flux. (B) La population de lymphocytes vivants a été identifiée sur base des FSC-A SSC-A (forward scatter area et side scatter area). Les résultats présentés correspondent à une concentration en PNA de 2 μ M et un temps d'incubation de 48 heures. (C,D,E) Les FI (intensités de fluorescence) et les MFI (intensités de fluorescence moyennes) des PNA et de Tax ont été mesurées. Les résultats présentés correspondent à une concentration de PNA de 2 μ M et un temps d'incubation de 48 heures. Le mock correspond aux cellules n'ayant pas été mises en contact avec les PNA. (F) La MFI des PNA pour toutes les concentrations est représentée en fonction du temps d'incubation (G) La MFI des PNA pour toutes les concentrations est représentée en fonction du temps d'incubation. La signification statistique a été déterminée par une analyse ANOVA à 2 facteurs.

4. Internalisation des PNA et impact sur la production de Tax dans la lignée ATL-2

Les PNA ont été mis au contact des ATL-2 à trois concentrations (1, 2 et 4 μM) pendant trois temps d'incubation (16, 24 et 48 heures). Après cela, l'expression de la protéine Tax a été analysée par cytométrie en flux après marquage avec un anticorps monoclonal et un conjugué Alexa FluorTM647 Donkey antimouse IgG. Les PNA, couplés à la fluorescéine, n'ont pas nécessité de marquage (**Figure 14 A**). Les résultats présentés se focalisent sur une condition : un temps d'incubation de 48 heures et une concentration en PNA de 2 μM (**Figure 14 B-E**). Après analyse de la cytométrie en flux, deux populations sont visibles en fonction de leur FSC-A et SSC-A (**Figure 14 B**). Précédemment, un marquage au propidium iodure a permis d'identifier les FSC-A et les SSC-A des cellules négatives à l'iodure de propidium (**Figure 12 B,D,F**). Ces cellules n'ayant pas internalisé l'iodure de propidium ne présentent pas de membrane poreuse et correspondent à des cellules vivantes. Ainsi, sur base des FSC-A et des SSC-A, la population en cellules vivantes a été identifiée. Il s'agit de celle pour laquelle la FSC-A est supérieure à 50K. En sélectionnant cette population, le pourcentage de cellules vivantes a été déterminé (correspondant à l'encadré noir) (**Figure 14 B**). Ensuite, les intensités de fluorescence de la protéine Tax (représentées en ordonnée) et des PNA (représentées en abscisse) ont été mesurées (**Figure 14 C**). Il peut être observé que les intensités de fluorescence des PNA sont plus élevées pour les PNA 1 et 4 avec des valeurs de respectivement de 1915 et 1647. Ces intensités de fluorescence plus élevées se traduisent par un décalage des densités de population vers la droite. L'intensité de fluorescence de Tax est plus élevée pour le PNA 1 avec une valeur de 86,3. Celle du mock est de 80. Les intensités de fluorescence pour les autres PNA sont inférieures ou égales à celle du mock. De plus, deux populations apparaissent après exposition aux PNA 2. Ensuite, les intensités de fluorescences moyennes des PNA et de Tax sont représentées pour chaque PNA testé (**Figure 14 D-E**). Le PNA 4 est celui pour lequel la valeur de fluorescence moyenne est la plus élevée avec une valeur de 1452,7 contre une valeur de 1419,3, de 856,3 et de 1194,0 et pour les PNA 1, 2 et 3 respectivement ($p < 0,0001$) (**Figure 14 D**). L'intensité de fluorescence de Tax n'est pas impactée par les PNA, celle-ci n'étant pas significativement différente après mise en contact avec les PNA 1, 2 et 3 par rapport au PNA 4 correspondant au PNA contrôle (**Figure 14 E**). Enfin, l'intensité de fluorescence moyenne des PNA et de Tax est représentée pour les différentes concentrations testées en fonction du temps d'incubation (**Figure 14 F-G**). Un pic d'augmentation de l'intensité de fluorescence moyenne des PNA pour un temps d'incubation de 16 heures est observé pour tous les PNA. Celui-ci est d'autant plus important que la concentration en PNA est élevée. Par ailleurs, pour chaque PNA et chaque temps d'incubation, plus la concentration au contact des cellules est élevée, plus l'intensité de fluorescence moyenne des PNA augmente (**Figure 14 F**). L'intensité de fluorescence moyenne de Tax n'est pas impactée par les PNA, aucune différence significative n'étant constatée (**Figure 14 G**).

Sur base de ces résultats, il apparaît que l'intensité de fluorescence moyenne des PNA est d'autant plus importante que la concentration en PNA est élevée. Cette intensité de fluorescence moyenne des PNA a été mesurée par cytométrie en flux. La préparation des échantillons en vue de cette analyse a nécessité plusieurs étapes de lavage. Ainsi, si un signal de fluorescence correspondant au PNA est détecté, il s'agit de PNA qui ont soit pénétré la membrane cellulaire, soit qui sont en interaction avec elle, les autres ayant été éliminés lors des lavages.

Ces PNA sont considérés par la suite comme ceux ayant été internalisés par la cellule. De plus, la variation de l'intensité de fluorescence moyenne des PNA peut être mise en relation avec leur quantité. Cette intensité de fluorescence moyenne est d'autant plus importante que la concentration en PNA est élevée. Il peut donc être conclu que plus la concentration de PNA mise en contact avec les cellules est élevée, plus les PNA sont internalisés (**Figure 14 F**). Selon le même raisonnement, lorsque les PNA ont été mis en contact avec les cellules pendant 48 heures à une concentration en PNA de 2 μ M, le PNA 4 est celui qui est le mieux internalisé (**Figure 14 D**). De plus, les deux populations apparaissant après exposition au PNA 2 se traduisent par un décalage des densités de population vers la droite. La population la plus à droite internalise donc mieux les PNA (**Figure 14 C**). Enfin, aucune différence significative pour les intensités de fluorescence et les intensités de fluorescence moyennes de Tax n'a été constatée. Ces intensités peuvent également être mises en relation avec la quantité de protéines Tax produite par la cellule. Ainsi, l'absence de différence significative ne permet pas de mettre en évidence un lien entre l'ajout de PNA et la production de la protéine Tax. Le détail des statistiques se trouve en annexe (**Annexe 5**).

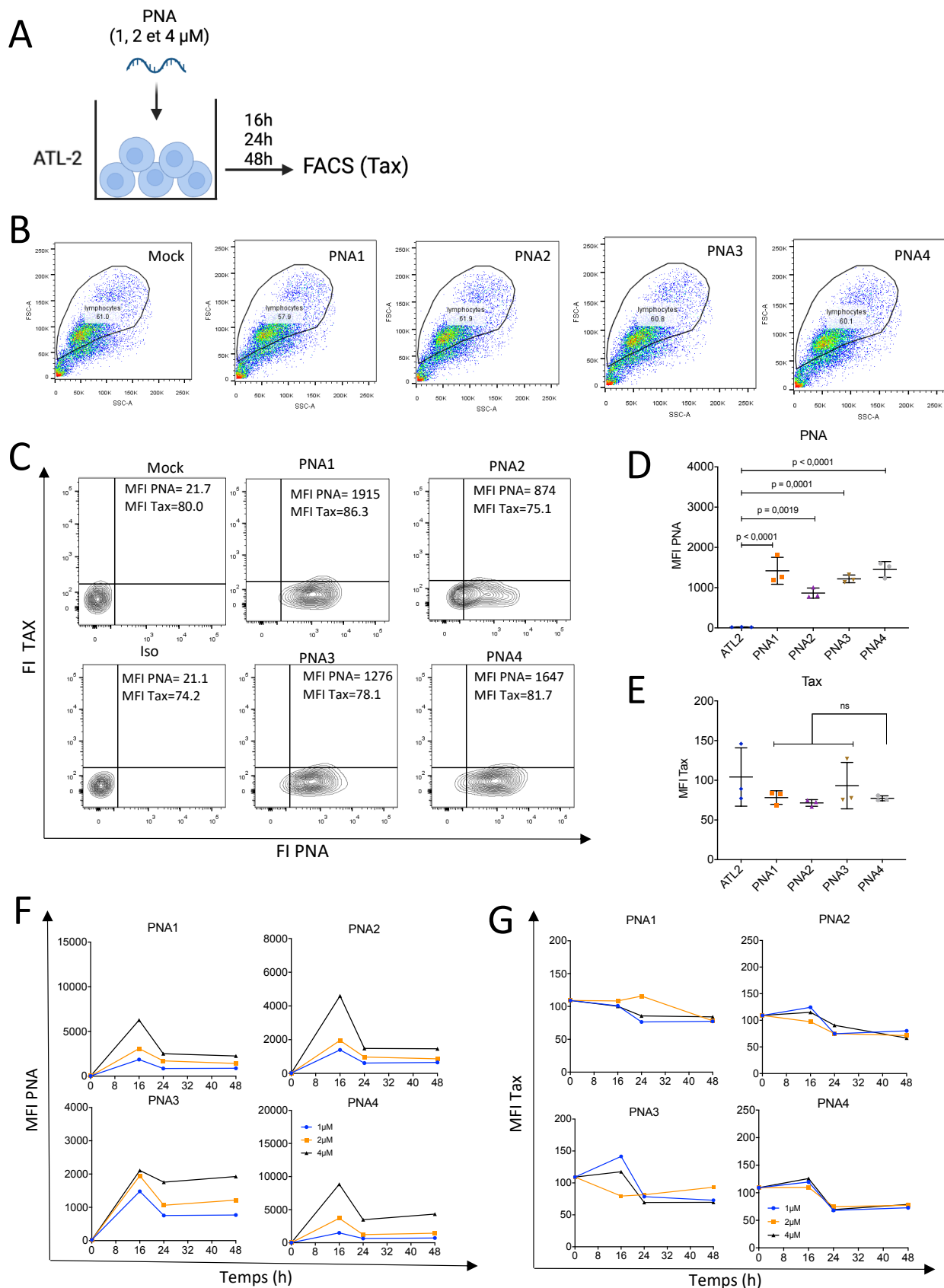


Figure 14 : Internalisation des PNA et impact sur la production de Tax pour la lignée ATL-2

(A) les PNA ont été mis en contact avec les cellules à trois concentrations (1, 2 et 4 µM) et à trois temps d'incubation (16, 24 et 48 heures). Un marquage de Tax a ensuite été réalisé, suivi d'une analyse de cytométrie en flux. (B) La population de lymphocytes vivants a été identifiée sur base des FSC-A SSC-A (forward scatter area et side scatter area). Les résultats présentés correspondent à une concentration en PNA de 2 µM et un temps d'incubation de 48 heures. (C,D,E) Les FI (intensités de fluorescence) et les MFI (intensités de fluorescence moyennes) des PNA et de Tax ont été mesurées. Les résultats présentés correspondent à une concentration de PNA de 2 µM et un temps d'incubation de 48 heures. Le mock correspond aux cellules n'ayant pas été mises en contact avec les PNA. (F) La MFI des PNA pour toutes les concentrations est représentée en fonction du temps d'incubation (G) La MFI des PNA pour toutes les concentrations est représentée en fonction du temps d'incubation. La signification statistique a été déterminée par une analyse ANOVA à 2 facteurs.

5. Internalisation des PNA et impact sur la production de Tax dans la lignée C8166

Les PNA ont été mis au contact des C8166 à trois concentrations (1, 2 et 4 μM) pendant trois temps d'incubation (16, 24 et 48 heures). Après cela, l'expression de la protéine Tax a été analysée par cytométrie en flux après marquage avec un anticorps monoclonal et un conjugué Alexa FluorTM647 Donkey antimouse IgG. Les PNA, couplés à la fluorescéine, n'ont pas nécessité de marquage (**Figure 15 A**). Les résultats présentés se focalisent sur une condition : un temps d'incubation de 48 heures et une concentration en PNA de 2 μM (**Figure 15 B-E**). Après analyse de la cytométrie en flux, deux populations sont visibles en fonction de leur FSC-A et SSC-A (**Figure 15 B**). Précédemment, un marquage au propidium iodure a permis d'identifier les FSC-A et les SSC-A des cellules négatives à l'iodure de propidium (**Figure 12 B,D,F**). Ces cellules n'ayant pas internalisé l'iodure de propidium ne présentent pas de membrane poreuse et correspondent à des cellules vivantes. Ainsi, sur base des FSC-A et des SSC-A, la population en cellules vivantes a été identifiée. Il s'agit de celle pour laquelle la FSC-A est supérieure à 50K. En sélectionnant cette population, le pourcentage de cellules vivantes a été déterminé (correspondant à l'encadré noir) (**Figure 15 B**). Ensuite, les intensités de fluorescence de la protéine Tax (représentées en ordonnée) et des PNA (représentées en abscisse) ont été mesurées (**Figure 15 C**). Il peut être observé que l'intensité de fluorescence des PNA est plus élevée pour le PNA 4 avec une valeur de respectivement de 1607. Cette intensité de fluorescence plus élevée se traduit par un décalage des densités de population vers la droite. L'intensité de fluorescence de Tax est inférieure à celle du mock pour tous les PNA. De plus, deux populations apparaissent après exposition aux PNA 4. Ensuite, les intensités de fluorescences moyennes des PNA et de Tax sont représentées pour chaque PNA testé (**Figure 15 D-E**). Le PNA 4 est celui pour lequel la valeur de fluorescence moyenne est la plus élevée avec une valeur de 1463,0 contre une valeur de 964, de 485,7 et de 431,0 pour les PNA 2, 3 et 4 respectivement ($p < 0,0001$) (**Figure 15 D**). L'intensité de fluorescence de Tax n'est pas impactée par les PNA, celle-ci n'étant pas significativement différente après mise en contact avec les PNA 1, 2 et 3 par rapport au PNA 4 correspondant au PNA contrôle (**Figure 15 E**). Enfin, l'intensité de fluorescence moyenne des PNA et de Tax est représentée pour les différentes concentrations testées en fonction du temps d'incubation (**Figure 15 F-G**). Un pic d'augmentation de l'intensité de fluorescence moyenne des PNA pour un temps d'incubation de 16 heures est observé pour les PNA 1, 2 et 3. Celui-ci est d'autant plus important que la concentration en PNA est élevée. Par ailleurs, pour chaque PNA et chaque temps d'incubation, plus la concentration au contact des cellules est élevée, plus l'intensité de fluorescence moyenne des PNA augmente (**Figure 15 F**). L'intensité de fluorescence moyenne de Tax n'est pas impactée par les PNA, aucune différence significative n'étant constatée (**Figure 15 G**).

Sur base de ces résultats, il apparaît que l'intensité de fluorescence moyenne des PNA est d'autant plus importante que la concentration en PNA est élevée. Cette intensité de fluorescence moyenne des PNA a été mesurée par cytométrie en flux. La préparation des échantillons en vue de cette analyse a nécessité plusieurs étapes de lavage. Ainsi, si un signal de fluorescence correspondant au PNA est détecté, il s'agit de PNA qui ont soit pénétré la membrane cellulaire, soit qui sont en interaction avec elle, les autres ayant été éliminés lors des lavages. Ces PNA sont considérés par la suite comme ceux ayant été internalisés par la cellule. De plus, la variation de l'intensité de fluorescence moyenne des PNA peut être mise en relation avec leur quantité. Cette intensité de

fluorescence moyenne est d'autant plus importante que la concentration en PNA est élevée. Il peut donc être conclu que plus la concentration de PNA mise en contact avec les cellules est élevée, plus les PNA sont internalisés (**Figure 15 F**). Selon le même raisonnement, lorsque les PNA ont été mis en contact avec les cellules pendant 48 heures à une concentration en PNA de 2 μ M, le PNA 4 est celui qui est le mieux internalisé (**Figure 15 D**). De plus, les deux populations apparaissant après exposition au PNA 4 se traduisent par un décalage des densités de population vers la droite. La population la plus à droite internalise donc mieux les PNA (**Figure 15 C**). Enfin, aucune différence significative pour les intensités de fluorescence et les intensités de fluorescence moyennes de Tax n'a été constatée. Ces intensités peuvent également être mises en relation avec la quantité de protéines Tax produite par la cellule. Ainsi, l'absence de différence significative ne permet pas de mettre en évidence un lien entre l'ajout de PNA et la production de la protéine Tax. Le détail des statistiques se trouve en annexe (**Annexe 6**).

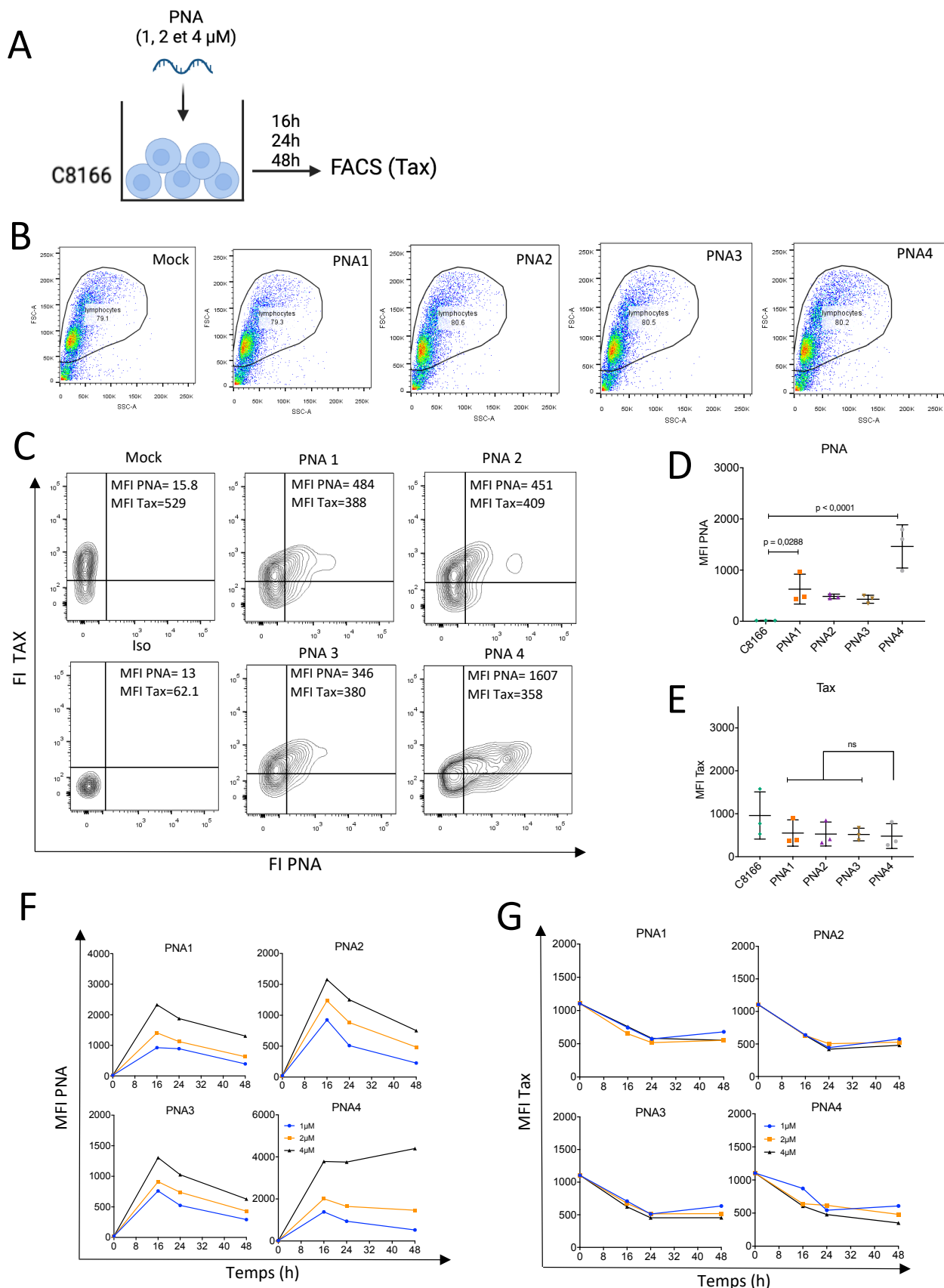


Figure 15 : Internalisation des PNA et impact sur la production de Tax pour la lignée C8166

(A) les PNA ont été mis en contact avec les cellules à trois concentrations (1, 2 et 4 μM) et à trois temps d'incubation (16, 24 et 48 heures). Un marquage de Tax a ensuite été réalisé, suivi d'une analyse de cytométrie en flux. (B) La population de lymphocytes vivants a été identifiée sur base des FSC-A SSC-A (forward scatter area et side scatter area). Les résultats présentés correspondent à une concentration en PNA de 2 μM et un temps d'incubation de 48 heures. (C,D,E) Les FI (intensités de fluorescence) et les MFI (intensités de fluorescence moyennes) des PNA et de Tax ont été mesurées. Les résultats présentés correspondent à une concentration de PNA de 2 μM et un temps d'incubation de 48 heures. Le mock correspond aux cellules n'ayant pas été mises en contact avec les PNA. (F) La MFI des PNA pour toutes les concentrations est représentée en fonction du temps d'incubation (G) La MFI des PNA pour toutes les concentrations est représentée en fonction du temps d'incubation. La signification statistique a été déterminée par une analyse ANOVA à 2 facteurs.

6. Impact des PNA sur la transcription des ARN de Tax et HBZ

Les PNA ont été mis en contact avec les 3 lignées cellulaires (HuT102, C8166 et ATL-2) pendant 48 heures à une concentration de 2 μ M. Le choix de ces conditions a été discuté précédemment. Après extraction de l'ARN, les niveaux d'expression des ARNm de HBZ et de Tax ont été quantifiés par RT-qPCR (**Figure 16 A**).

Aucune différence significative sur les niveaux d'expression de l'ARNm de HBZ n'est constatée après ajout des PNA 1, 2 et 3 lorsqu'ils sont comparés au PNA 4 qui est le PNA contrôle (**Figure 16 B.D.F**). Le même constat est fait pour les niveaux d'expression de l'ARNm de Tax après ajout des PNA 1, 2 et 3 lorsqu'ils sont comparés au PNA 4. Toutefois, des diminutions statistiquement significatives sont constatées dans le cas des lignées HuT102 et ATL-2 lorsque les cellules sont mises en contact avec le PNA 4 ($p = 0,0179$; $p = 0,001$).

Sur base de ces résultats, il peut être conclu que la mise en contact des cellules avec les PNA n'a pas d'impact sur le niveau d'expression de l'ARNm de HBZ et de Tax pour toutes les lignées. Toutefois, dans le cas des lignées HuT102 et ATL-2, le PNA 4 fait diminuer le niveau d'expression de l'ARNm de Tax.

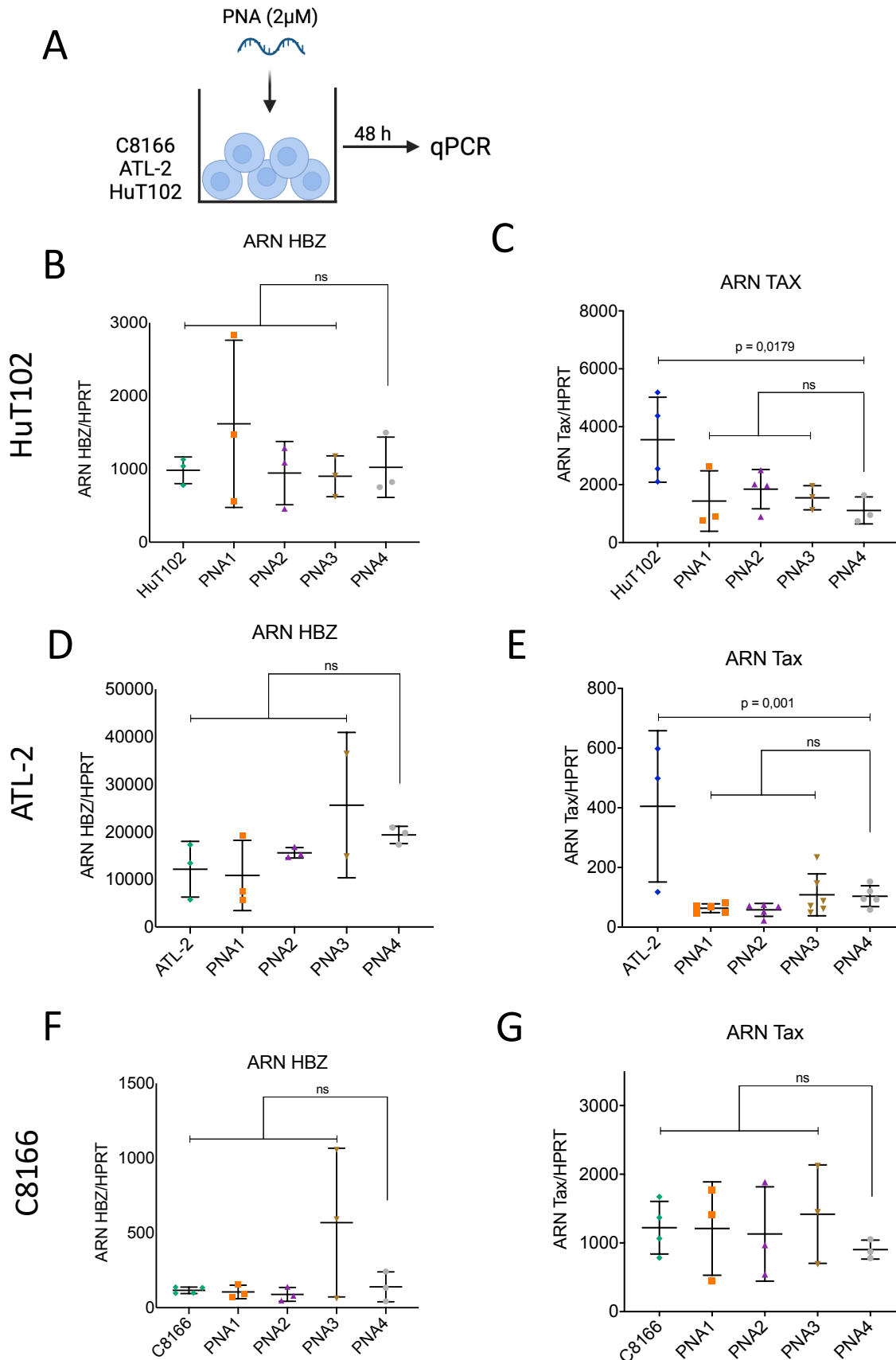


Figure 16 : Impact des PNA sur la transcription des ARN de Tax et HBZ

(A) Les PNA ont été mis en contact avec les cellules à une concentration de 2 μ M pendant 48 heures. L'ARN des cellules a ensuite été extrait suivi d'une RT-qPCR. (B) Le niveau d'expression de l'ARN de HBZ a été quantifié par RT-qPCR pour les cellules HuT102. (C) Le niveau d'expression de l'ARN de Tax a été quantifié par RT-qPCR pour les cellules HuT102. (D) Le niveau d'expression de l'ARN de HBZ a été quantifié par RT-qPCR pour les cellules ATL-2. (E) Le niveau d'expression de l'ARN de Tax a été quantifié par RT-qPCR pour les cellules ATL-2. (F) Le niveau d'expression de l'ARN de HBZ a été quantifié par RT-qPCR pour les cellules C8166. (G) Le niveau d'expression de l'ARN de Tax a été quantifié par RT-qPCR pour les cellules C8166.

Les résultats ont été analysés selon la méthode des Δ Ct. HPRT est le gène choisi comme contrôle endogène.

Discussion

Le but de ce projet est d'étudier le rôle de l'ARNm de HBZ à l'aide de PNA ciblant des zones situées au niveau des 50 premiers nucléotides. Les résultats ont montré que :

- Les PNA sont toxiques pour les cellules
- Les PNA sont internalisés par les cellules
- Les PNA ne semblent pas avoir d'impact sur l'expression des ARN et des protéines virales

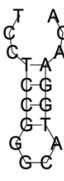
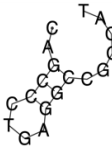
1. Toxicité des PNA

Les résultats obtenus mettent en évidence le fait que les PNA sont toxiques pour les cellules (**Figure 12 B-G**). Les PNA 1, 2 et 3 ciblent différentes zones situées au niveau des 50 premiers nucléotides de l'ARN de HBZ tandis que le PNA 4 est un PNA contrôle ne ciblant aucune séquence particulière (le choix de cette séquence cible est discuté plus bas). Tous les PNA semblent toxiques pour les cellules, y compris le PNA 4. Il peut donc être conclu que la toxicité apparente est liée à l'utilisation des PNA et non à la séquence qu'ils ciblent.

Cette toxicité peut être causée par la constitution du PNA, notamment par leur séquence nucléotidique. Tout d'abord, les séquences de nucléotides des PNA 1 et 3 sont capables de s'apparier et de donner lieu à une structure secondaire de type épingle à cheveux (Tableau 3). Ce type de structure compromet l'appariement des PNA au niveau de l'ARN de HBZ et peut même interagir avec d'autres molécules de la cellule. De plus la séquence nucléotidique des PNA 2 et 1 n'est pas exactement complémentaire à la séquence ciblée (Tableau 3). Cela peut donc compromettre le bon appariement de ces PNA au niveau de HBZ. Enfin, ces séquences de nucléotides sont assez courtes, il peut donc être supposé qu'il y a une forte probabilité pour que ces dernières puissent être complémentaires à d'autres séquences que celle de HBZ. Afin de le savoir, une analyse blast a été réalisée sur le système bio-informatique d'annotation automatique de génomes « Ensembl ». Celle-ci a révélé que les 17 premiers nucléotides de la séquence du PNA 1 sont complémentaires à une séquence située sur le chromosome 14 entre les paires de bases 36557912 et 36557928. Cette zone est située sur un intron du gène ENSG00000283098. L'analyse a ensuite révélé que le PNA 2 est complémentaire à une séquence située entre les paires de bases 25389602 et 25389619 du chromosome 5, toutefois cette zone n'est associée à aucun gène. Enfin, aucune correspondance n'a été trouvée pour les PNA 3 et 4. Il apparaît donc que le fait que les PNA 1 et 2 puissent se lier à d'autres endroits que l'ARNm de HBZ n'a pas de conséquence sur la production d'une éventuelle protéine. Les détails de cette analyse se trouvent en **Annexes 7, 8, 9 et 10**.

Tableau 3 : Structure secondaire et séquence des PNA

Le complément inverse des PNA a été comparé à la séquence de l'ARN de HBZ. Il est constaté que les compléments inverses des PNA 1 et 2 comportent des insertions (correspondant aux nucléotides soulignés). La prédiction de la structure secondaire a été réalisée à l'aide de ViennaRNA Package 2.0.

Nom du PNA	Séquence nucléotidique du complément inverse des PNA	Séquence nucléotidique de l'ARN de HBZ visée	Structure secondaire
PNA 1	TGT <u>T</u> <u>C</u> CATGCCCGGAGGA	TGTCATGCCCGGAGGA	
PNA 2	TGTTTCGATG <u>T</u> TCCTG	TGTTTCGATGCTTGCCTG	/
PNA 3	ATGGCGGCCTCAGGGCTG	ATGGCGGCCTCAGGGCTG	
PNA 4 (contrôle)	CGTCTCAGTTCAGCAGGT	/	/

2. Internalisation des PNA

Les résultats obtenus permettent de mettre en évidence le fait que les PNA sont internalisés par les différentes cellules, c'est à dire qu'ils sont en interaction avec la membrane ou qu'ils l'ont pénétrée et qu'ils se trouvent à l'intérieur de la cellule (**Figures 14, 15 et 16**). L'internalisation nucléaire des PNA n'a pas nécessité d'étape de transfection. Cela est permis grâce à leur signal de localisation nucléaire (pkkkrv) qui permet aux PNA de franchir la membrane cellulaire spontanément, notamment grâce à la présence de lysines (k)¹⁰⁷. Il peut être supposé que, grâce à ce signal, les PNA ont bien atteint le noyau des cellules. Cette expérience met également en avant le fait que l'utilisation des PNA est compatible avec celle de lignées de lymphocytes T.

3. Utilisation des PNA

Les PNA utilisés n'ont pas permis de mettre en évidence un lien entre les 50 premiers nucléotides de l'ARN de HBZ et la production de transcrits et de protéines viraux, aucune différence n'ayant été constatée.

Il se peut que les PNA n'aient pas d'impact sur la production de transcrits viraux et de leurs protéines parce qu'ils n'interfèrent pas avec l'ARN de HBZ. Ainsi, comme cette interférence n'a pas pu être mise en évidence pour les lignées cellulaires infectées par HTLV-1 utilisées, il serait intéressant de vérifier si elle a lieu dans un système

simplifié. Des cellules de type HEK peuvent par exemple être transfectées avec un clone moléculaire de HTLV-1 ¹⁰⁸, et ensuite être mises en contact avec des PNA. Une RT-qPCR ou un marquage Tax suivi d'une analyse de cytométrie en flux peuvent ensuite être réalisés afin de constater un éventuel changement dans la production de transcrits de HBZ ou de sa protéine.

D'autres expériences impliquant les PNA pourraient être menées de manière à, éventuellement, mettre en évidence l'implication de l'ARN de HBZ dans d'autres mécanismes cellulaires comme la transmission et la latence virales. De plus, il est possible qu'une autre séquence de nucléotides que celle ciblée par les PNA puisse être liée à la production de protéines virales. Cela peut notamment concerner une zone située dans les 207 premiers nucléotides de HBZ.

i. Éventuel impact des PNA sur d'autres mécanismes

Tout d'abord, HTLV-1 n'est pas le seul rétrovirus à produire une protéine et des transcrits antisens. En effet, HBZ a été la première protéine antisens formellement identifiée en 2002 ¹⁰⁹, une découverte rapidement suivie par celles de protéines antisens chez HTLV-2, HTLV-3 et HTLV-4 ^{110,111}. Ensuite, un gène, une protéine et un transcrit antisens ont été identifiés dans le cas de STLV-1 ¹¹². Des transcrits antisens ont par la suite été détectés dans ces cellules infectées par le virus de la leucémie murine (MLV) et celui de la leucémie bovine (BLV) sans pour autant qu'une protéine antisens puisse être identifiée pour le moment ^{113,114}. Enfin, l'existence d'une protéine antisens et d'un transcrit antisens a été observée dès les années 1990 chez le Virus de l'Immunodéficience Humaine 1 (VIH-1) ^{115,116}. Celui-ci produit la Protéine AntiSens (ASP) et ses fonctions restent pour le moment largement méconnues ¹¹⁷. Toutefois, son ARN est notamment impliqué dans l'inhibition de la réplication virale en étant capable de diminuer ce phénomène de 70 à 80% ^{118,119}. Ce transcrit est également responsable de l'extinction épigénétique du 5'LTR en recrutant le complexe répresseur polycomb 2 (PRC2) qui vient s'y lier, provoquant la formation de H3K27me3 ¹²⁰. Ce mécanisme est donc à l'origine d'une extinction transcriptionnelle ¹²⁰. Enfin, l'ARN de ASP est également capable de promouvoir la mise en place de la latence virale et sa maintenance ¹¹⁹. De plus, en recrutant le complexe répresseur polycomb 2 (PRC2) sur le 5' LTR, il est également capable de promouvoir la mise en place de la latence virale et sa maintenance ¹¹⁹.

Il serait intéressant d'utiliser les PNA afin d'étudier si l'ARN de HBZ est impliqué dans le mécanisme de transmission virale de HTLV-1, comme c'est le cas de la protéine ASP dans le contexte du VIH. Pour ce faire, des lignées de Jurkat rapporteuses peuvent être utilisées. Ces dernières consistent en des cellules T présentant le gène de la luciférase. Celui-ci est sous le contrôle du U3R de HTLV-1. Lorsque ce type de cellules est infecté, la protéine Tax est produite, ce qui active le promoteur viral. L'activité de la luciférase peut alors être détectée ¹²¹. Des lignées cellulaires infectées peuvent donc être mises en contact avec les PNA puis avec ces cellules rapporteuses afin d'étudier l'impact des PNA sur le mécanisme de transmission virale. Si cette expérience se révèle fructueuse, et donc que le gène de la luciférase n'est pas activé, une analyse par microscopie confocale peut être réalisée, suivie éventuellement d'une autre en microscopie électronique.

Il serait également intéressant d'utiliser les PNA afin d'étudier l'impact de l'ARN de HBZ sur le phénomène de latence virale. En effet, la protéine HBZ est connue pour maintenir le phénomène de latence virale en régulant à la baisse l'activation du NF-kB induite par Tax¹²². De plus, il a déjà été récemment mis en évidence que l'ARN de HBZ est à l'origine d'un mécanisme épigénétique causant un arrêt de la transcription des protéines dont la production est sous le contrôle du 5' LTR, causant l'entrée en latence de la cellule⁶⁹. Utiliser les PNA dans ce contexte permettrait de préciser le rôle de l'ARN de HBZ dans la latence virale.

ii. *Modification de la séquence visée*

Chacun des PNA utilisés dans le cadre de cette expérience visait une zone située dans les 50 premiers nucléotides de l'ARN de HBZ (**Figure 17**). Ce choix a été fait en se basant sur un article publié en 2015 dans lequel la fonction de HBZ a été étudiée⁶⁶. D'après celui-ci, les 50 premiers nucléotides de l'ARN de HBZ sont essentiels pour la survie cellulaire. Plus précisément, il s'agirait de la région 5' du second exon de l'ARN qui soit indispensable à cette activité.



Figure 17 : Zones de l'ARNm de HBZ ciblées par les PNA

Les résultats présentés précédemment ne permettent pas de conclure que cette zone soit également impliquée dans l'interférence de l'ARN de HBZ au niveau du 5' LTR. Toutefois, cet article met également en évidence que les 207 premiers nucléotides sont essentiels à la fonction de l'ARN de HBZ. De plus, un précédent article paru en 2006 avait déjà mis en avant le fait que cette zone est importante pour la stimulation de la croissance dans des cellules kit225, et qu'elle est également essentielle pour la favorisation de la prolifération d'une lignée de cellules T humaines¹²³. Il apparaît donc que d'autres PNA ciblant différentes zones dans ces 207 premiers nucléotides pourraient être créés afin d'étudier leur rôle éventuel dans l'interaction entre l'ARN de HBZ et le 5' LTR.

4. Perspective de thérapie humaine

Les PNA n'ont pas permis pas de mettre en évidence l'implication des 50 premiers nucléotides de HBZ et la production de protéines virales. Toutefois, ceux-ci représentent un espoir de thérapie humaine.

Tout d'abord, les PNA sont très intéressants en ce qui concerne leur thermostabilité et leur résistance face aux nucléases¹²⁴. L'utilisation de shRNA pourraient être envisagée. Ils ont d'ailleurs déjà été utilisés avec succès en 2006 par Matsuoka et al. dans le but d'étudier les fonctions de l'ARN de HBZ. Cette expérience consistait en l'utilisation d'un lentivirus recombinant transcrivant de courts shRNA ciblant HBZ sous le contrôle du promoteur U6. Toutefois, les siRNA sont thermo-instables et sensibles aux nucléases. De plus, l'utilisation des PNA ne nécessitant pas l'introduction de matériel génétique dans les cellules, ils apparaissent comme une alternative plus sûre. Après, les PNA étant toxiques pour les cellules, il s'agit d'un point positif dans une optique thérapeutique : il serait possible de venir détruire les cellules infectées par HTLV-1 en les utilisant. Par ailleurs, il a été également discuté plus haut que le signal de localisation nucléaire permet aux PNA de franchir la membrane cellulaire sans qu'un système de transfection soit nécessaire, rendant très simple leur utilisation.

Contribution personnelle de l'étudiant

Toutes les données présentées représentent la contribution personnelle de l'étudiante.

Conclusion

L'objectif de ce travail de fin d'études était d'étudier l'implication des 50 premiers nucléotides de l'ARN de HBZ dans l'expression des protéines virales de HTLV-1. L'utilisation de PNA n'a pas permis de mettre en évidence un lien entre les deux. Toutefois, ces derniers présentent de nombreux avantages les rendant très intéressants dans une optique thérapeutique. Tout d'abord, étant toxiques pour les cellules, ils peuvent être utilisés dans le but de détruire les cellules infectées par HTLV-1. De plus, étant capables de pénétrer les cellules sans qu'une étape de transfection soit nécessaire, leur utilisation est rendue très simple. Enfin, leur action ne nécessitant pas l'introduction de matériel génétique dans les cellules, couplé à leur thermo-stabilité et leur résistance face aux nucléases, rend leur utilisation sûre.

Annexes

Annexe 1 : Référence des lignées cellulaires

Lignées cellulaires	Références
HuT102	CVCL_3526
ATL-2	CVCL_8338
C8166	CVCL_1099

Annexe 2 : Statistiques de la Figure 12.C

HuT102	PNA 1	2 μ M	0-24h	p = 0,0023
			0-48h	p = 0,0214
		4 μ M	0-16h	p < 0,0001
			0-24h	p = 0,0260
			0-48h	p = 0,0259
	PNA 4	4 μ M	0-24h	p = 0,0060
			0-48h	p = 0,0018

Annexe 3 : Statistiques de la Figure 12.E

ATL-2	PNA 1	1 μ M	0-16h	p = 0,0005
			0-48h	p = 0,0002
		2 μ M	0-16h	p = 0,0009
			0-24h	p = 0,0008
			0-48h	p = 0,0008
		4 μ M	0-16h	p = 0,0001
			0-24h	p = 0,0173
			0-48h	p < 0,0001
	PNA 2	1 μ M	0-16h	p < 0,0001
			0-24h	p = 0,095
			0-48h	p < 0,0001
		2 μ M	0-16h	p < 0,0001
			0-24h	p = 0,0147
			0-48h	p < 0,0001
		4 μ M	0-16h	p < 0,0001
			0-24h	p = 0,0127
			0-48h	p < 0,0001
	PNA 3	1 μ M	0-16h	p = 0,0028
			0-24h	p = 0,0263
			0-48h	p = 0,0001
		2 μ M	0-16h	p = 0,0009
			0-48h	P = 0,0005
		4 μ M	0-16h	p = 0,0020
			0-24h	p = 0,0415
			0-48h	p = 0,0004
	PNA 4	1 μ M	0-48h	p = 0,0144
		2 μ M	0-48h	p = 0,0347
		4 μ M	0-16h	p = 0,0241

Annexe 4 : Statistiques de la Figure 13.F

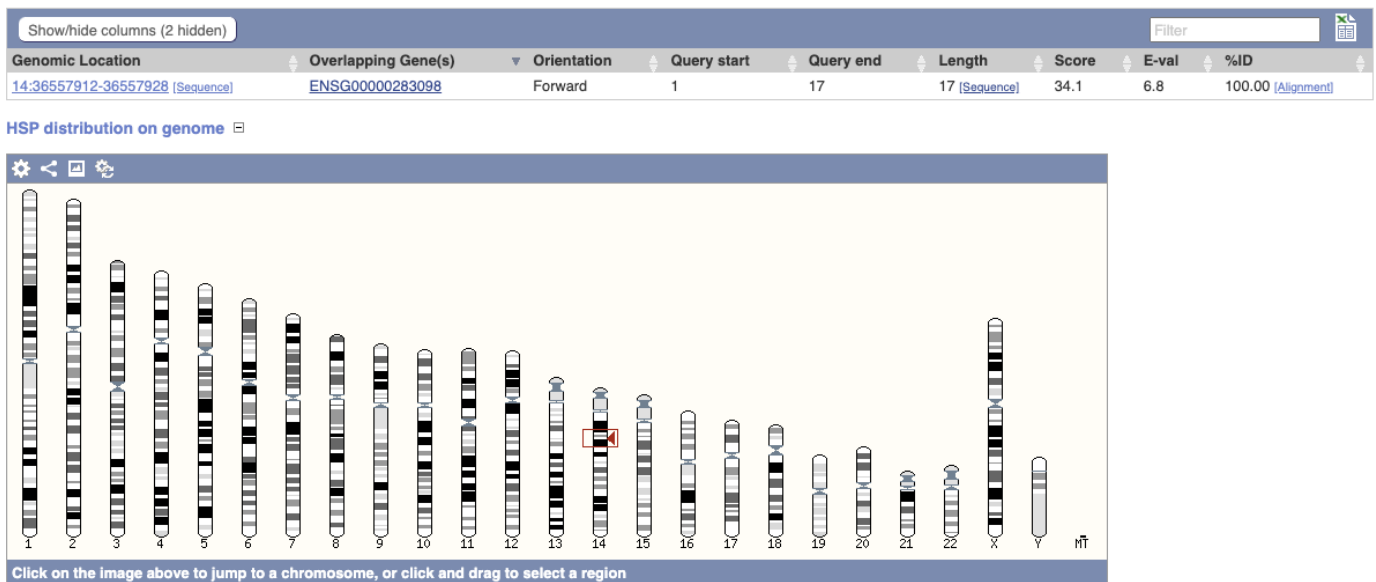
HuT102	PNA 1	2 μ M	0-16h	p = 0,0012
			0-24h	p = 0,0281
		4 μ M	0-16h	p < 0,0001
			0-24h	p < 0,0001
			0-48h	p < 0,0001
		16h	1-4 μ M	p < 0,0001
			2-4 μ M	p < 0,0036
		24h	1-4 μ M	p = 0,0004
			2-4 μ M	p = 0,0353
		48h	1-4 μ M	p = 0,0255
	PNA 2	2 μ M	0-16h	p = 0,0036
		4 μ M	0-16h	p < 0,0001
			0-24h	p = 0,0012
			0-48h	p = 0,0014
		16h	1-4 μ M	p = 0,0003
		24h	1-4 μ M	p = 0,0421
	PNA 3	4 μ M	0-16h	p < 0,0001
			0-24h	p = 0,0036
			0-48h	p = 0,0014
		16h	1-4 μ M	p = 0,0080
	PNA 4	4 μ M	0-24h	p = 0,0027
			0-48h	p < 0,0001
		24h	1-4 μ M	p = 0,0411
		48h	1-4 μ M	p < 0,0001
			2-4 μ M	p = 0,0008

Annexe 5 : Statistiques de la Figure 14.F

ATL-2	PNA 1	4 μ M	0-16h	p < 0,0001
		16h	1-4 μ M	p = 0,0065
	PNA 2	4 μ M	0-16h	p = 0,0001
			1-4 μ M	p = 0,0093
	PNA 3	2 μ M	0-16h	p = 0,0119
		4 μ M	0-16h	p = 0,0163
			0-24h	p = 0,0312
			0-48h	p = 0,0135
	PNA 4	4 μ M	0-16h	p = 0,0011
		16h	1-4 μ M	P = 0,0088

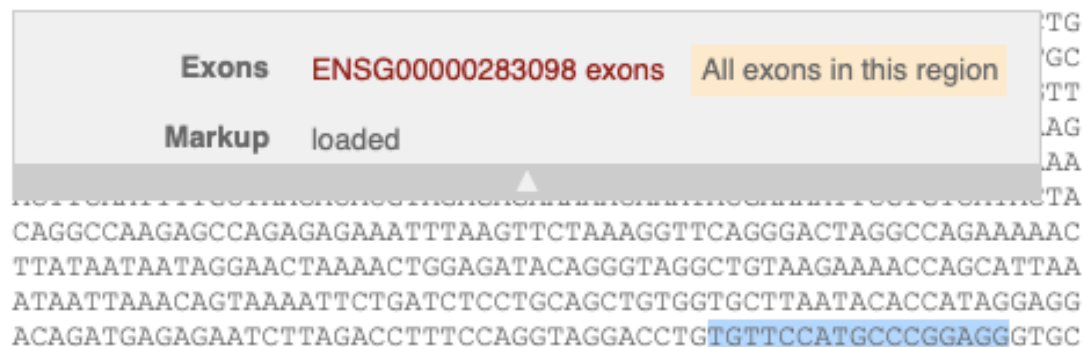
Annexe 6 : Statistiques de la Figure 15.F

C8166	PNA 1	2 μ M	0-16h	p = 0,0197
		4 μ M	0-16h	p < 0,0001
			0-24h	p = 0,0008
			0-48h	p = 0,0385
	PNA 2	16h	1-4 μ M	p = 0,0085
		24h	1-4 μ M	p = 0,0020
		1 μ M	0-16h	p = 0,0001
		2 μ M	0-16h	p < 0,0001
			0-24h	p = 0,0003
			0-16h	p = 0,0001
			0-24h	p = 0,0001
			0-48h	p = 0,0024
	PNA 3	1 μ M	0-16h	p = 0,0121
		2 μ M	0-16h	p = 0,0015
			0-24h	p = 0,0159
			0-16h	p < 0,0001
			0-24h	p = 0,0003
	PNA 4	16h	1-4 μ M	p = 0,0001
		24h	1-4 μ M	p < 0,0001
		48h	1-4 μ M	p < 0,0001
		2 μ M	0-16h	p = 0,0018
			0-24h	p = 0,0160
			0-48h	p = 0,0450
		4 μ M	0-16h	p < 0,0001
			0-24h	p < 0,0001
			0-48h	p < 0,0001



Annexe 7 : Résultats de l'analyse blast pour le PNA 1

L'analyse a été réalisée en utilisant le système bio-informatique d'annotation automatique de génomes « Ensembl ».



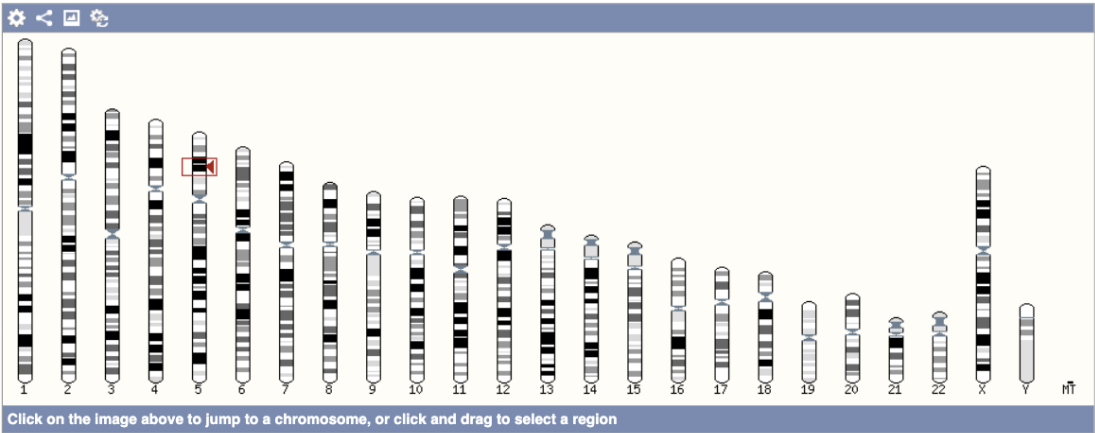
Annexe 8 : Zone du gène ENSG00000283098 ciblée par le PNA 1

La zone complémentaire aux 17 premiers nucléotides de la séquence du PNA 1 est représentée en bleu. Celle-ci se trouve dans un intron, les exons étant représentés dans une couleur orangée. L'analyse a été réalisée en utilisant le système bio-informatique d'annotation automatique de génomes « Ensembl ».

Results table

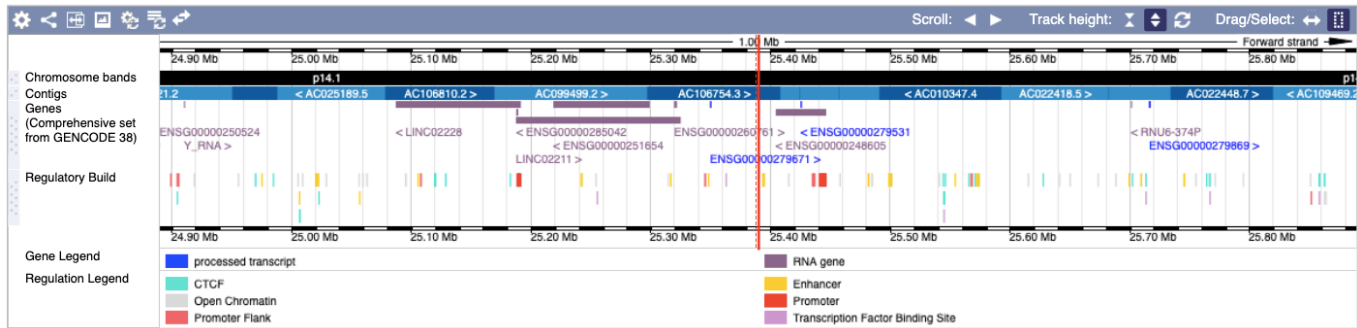
Show/hide columns (2 hidden)		Filter							
Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Query start	Query end	Length	Score	E-val	%ID	
5:25389602-25389619 [Sequence]		Forward	1	18	18 [Sequence]	36.1	1.7	100.00	[Alignment]

HSP distribution on genome



Annexe 9 : Résultats de l'analyse blast pour le PNA 2

L'analyse a été réalisée en utilisant le système bio-informatique d'annotation automatique de génomes « Ensembl ».



Annexe 10 : Détails de la région ciblée par le PNA 2

La zone ciblée par les PNA correspond à la ligne verticale rouge. Aucun gène ne s'y trouve. L'analyse a été réalisée en utilisant le système bio-informatique d'annotation automatique de génomes « Ensembl ».

Bibliographie

- (1) Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, U. H. Adult T-Cell Leukemia: Clinical and Hematologic Features of 16 Cases. *Blood* **1977**, 50 (3), 481–492. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-10-746677>.
- (2) Takatsuki, K. Discovery of Adult T-Cell Leukemia. *Retrovirology* **2005**, 2, 16. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-2-16>.
- (3) Gallo, R. C. The Discovery of the First Human Retrovirus: HTLV-1 and HTLV-2. *Retrovirology*. BioMed Central Ltd. March 2, 2005, pp 2–17. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-2-17>.
- (4) Poiesz, B. J.; Ruscetti, F. W.; Gazdar, A. F.; Bunn, P. A.; Minna, J. D.; Gallo, R. C. 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.* **1980**, 77 (12 II), 7415–7419. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.12.7415>.
- (5) Afonso, P. V.; Cassar, O.; Gessain, A. Molecular Epidemiology, Genetic Variability and Evolution of HTLV-1 with Special Emphasis on African Genotypes. *Retrovirology*. BioMed Central Ltd. December 16, 2019, pp 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12977-019-0504-z>.
- (6) Gessain, A.; Cassar, O. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Research Foundation November 15, 2012, p 388. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00388>.
- (7) Paiva, A.; Casseb, J. REVIEW ORIGIN AND PREVALENCE OF HUMAN T-LYMPHOTROPIC VIRUS TYPE 1 (HTLV-1) AND TYPE 2 (HTLV-2) AMONG INDIGENOUS POPULATIONS IN THE AMERICAS. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **2015**, 57 (1), 1–13. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652015000100001>.
- (8) Jégado, B.; Kashanchi, F.; Dutartre, H.; Mahieux, R. STLV-1 as a Model for Studying HTLV-1 Infection. *Retrovirology* **2019**, 16, 41. <https://doi.org/10.1186/s12977-019-0503-0>.
- (9) World Health Organization. *Human T-Lymphotropic Virus Type 1: Technical Report*; 2020.
- (10) Gessain, A. Le Rétrovirus Humain Oncogène HTLV-1: Épidé Miologie Descriptive et Moléculaire, Origine, Évolution et Aspects Diagnostiques et Maladies Associées. *Bull. la Soc. Pathol. Exot.* **2011**, 104 (3), 167–180. <https://doi.org/10.1007/s13149-011-0174-4>.
- (11) Utsch Gonçalves, D.; Augusto Proietti, F.; Gabriel Ramos Ribas, J.; Grossi Araújo, M.; Regina Pinheiro, S.; Carlos Guedes, A.; Bárbara Carneiro-Proietti, A. F. Epidemiology, Treatment, and Prevention of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Associated Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, 23 (3), 577–589.

- (12) Bangham, C. R. M. Human T Cell Leukemia Virus Type 1: Persistence and Pathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* **2018**, *36* (1), 43–71. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053222>.
- (13) Pique, C.; Jones, K. S.; Suzuki, Y.; Jacobson, S.; Brighty, D. W. Pathways of Cell-Cell Transmission of HTLV-1. *Front. Microbiol.* **2012**, *3* (378). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00378>.
- (14) Haziot, M. E.; Gascon, M. R.; Assone, T.; Fonseca, L. A. M.; Luiz, O. D. C.; Smid, J.; Paiva, A. M.; Marcusso, R. M. D. N.; de Oliveira, A. C. P.; Casseb, J. Detection of Clinical and Neurological Signs in Apparently Asymptomatic HTLV-1 Infected Carriers: Association with High Proviral Load. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13* (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006967>.
- (15) Futsch, N.; Prates, G.; Mahieux, R.; Casseb, J.; Dutartre, H. Cytokine Networks Dysregulation during HTLV-1 Infection and Associated Diseases. *Viruses* **2018**, *10* (12), 691. <https://doi.org/10.3390/v10120691>.
- (16) Malpica, L.; Pimentel, A.; Reis, I. M.; Gotuzzo, E.; Lekakis, L.; Komanduri, K.; Harrington, T.; Barber, G. N.; Ramos, J. C. Epidemiology, Clinical Features, and Outcome of HTLV-1-Related ATLL in an Area of Prevalence in the United States. *Blood Adv.* **2018**, *2* (6), 607–620. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017011106>.
- (17) Bazarbachi, A.; Hermine, O. HTLV-1-Associated Adult T-Cell Leukemia-Lymphoma. *Hematologie*. John Libbey Eurotext January 1, 2018, pp 104–110. <https://doi.org/10.1684/hma.2018.1316>.
- (18) Rizkallah, G.; Mahieux, R.; Dutartre, H. Transmission Intercellulaire de HTLV-1. *médecine/sciences* **2015**, *31* (6–7), 629–637. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153106016>.
- (19) Enose-Akahata, Y.; Jacobson, S. Immunovirological Markers in HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis (HAM/TSP). *Retrovirology* **2019**, *16* (35). <https://doi.org/10.1186/S12977-019-0499-5>.
- (20) Bangham, C. R. M.; Araujo, A.; Yamano, Y.; Taylor, G. P. HTLV-1-Associated Myelopathy/Tropical Spastic Paraparesis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2015**, *1*, 15012. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.12>.
- (21) Gessain, A.; Mahieux, R. Tropical Spastic Paraparesis and HTLV-1 Associated Myelopathy: Clinical, Epidemiological, Virological and Therapeutic Aspects. *Rev. Neurol. (Paris)*. **2012**, *168* (3), 257–269. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2011.12.006>.
- (22) Willems, L.; Hasegawa, H.; Accolla, R.; Bangham, C.; Bazarbachi, A.; Bertazzoni, U.; Carneiro-Proietti, A. B. de F.; Cheng, H.; Chieco-Bianchi, L.; Ciminale, V.; et al. Reducing the Global Burden of HTLV-1 Infection: An Agenda for Research and Action. *Antiviral Res.* **2017**, *137*, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.10.015>.
- (23) Yoshimitsu, M.; White, Y.; Arima, N. Prevention of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Infection

and Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. *Recent Results Cancer Res.* **2014**, *193*, 211–225. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38965-8_12.

- (24) Eusebio-Ponce, E.; Anguita, E.; Paulino-Ramirez, R.; Candel, F. J. HTLV-1 Infection: An Emerging Risk. Pathogenesis, Epidemiology, Diagnosis and Associated Diseases. *Rev. Esp. Quimioter.* **2019**, *32* (6), 485–496.
- (25) Kannian, P.; Green, P. L. Human T Lymphotropic Virus Type 1 (HTLV-1): Molecular Biology and Oncogenesis. *Viruses* **2010**, *2* (9), 2037–2077. <https://doi.org/10.3390/v2092037>.
- (26) Gillet, N.; Kettmann, R.; Willems, L. Homologies Entre Les Deux Rétrovirus BLV et HTLV-1 et Développement D'une Nouvelle Approche Thérapeutique Basée Sur La Levée de La Latence Virale. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2007**, *11* (2), 155–163.
- (27) Boxus, M.; Willems, L. Mechanisms of HTLV-1 Persistence and Transformation. *Br. J. Cancer* **2009**, *101* (9), 1497–1501. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605345>.
- (28) Barreto, F. K.; Khouri, R.; Rego, F. F. de A.; Santos, L. A.; Castro-Amarante, M. F. de; Bialuk, I.; Pise-Masison, C. A.; Galvão-Castro, B.; Gessain, A.; Jacobson, S.; et al. Analyses of HTLV-1 Sequences Suggest Interaction between ORF-I Mutations and HAM/TSP Outcome. *Infect. Genet. Evol.* **2016**, *45*, 420–425. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.020>.
- (29) Sinet, F. Complex Splicing in the Human T-Cell Leukemia Virus (HTLV) Family of Retroviruses: A Number of Proteins Play a Key Role in the Establishment and Maintenance of Viral Infection. *Biosci. Master Rev.* **2013**, 1–10.
- (30) Gessain, A. Virus HTLV-1: Structure et Fonction Des Protéines de La Région PX. *MEDECINE/SCIENCES* **1994**, *10*, 296–305.
- (31) Valeri, V. W.; Hryniewicz, A.; Andresen, V.; Jones, K.; Fenizia, C.; Bialuk, I.; Chung, H. K.; Fukumoto, R.; Parks, R. W.; Ferrari, M. G.; et al. Requirement of the Human T-Cell Leukemia Virus P12 and P30 Products for Infectivity of Human Dendritic Cells and Macaques but Not Rabbits. *Blood* **2010**, *116* (19), 3809–3817. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-284141>.
- (32) Nakano, K.; Watanabe, T.; Dodon, M. D. HTLV-1 Rex: The Courier of Viral Messages Making Use of the Host Vehicle. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 330. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00330>.
- (33) Pène, S. L'oncoprotéine Tax Du HTLV-1 et La Voie NF-KB: Une Histoire de Conjugaison : Nouvelle Exploration Du Rôle Des Machineries de SUMOylation et d'ubiquitinylation Dans l'activation de La Voie NF-KB, 2016.
- (34) Duc Dodon, M.; Barbeau, B.; Mesnard, J.-M. Leucémies T Induites Par HTLV-1. *Médecine/Sciences* **2010**, *26* (4), 391–396. <https://doi.org/10.1051/medsci/2010264391>.

- (35) Carpentier, A.; Barez, P. Y.; Hamaidia, M.; Gazon, H.; de Brogniez, A.; Perike, S.; Gillet, N.; Willems, L. Modes of Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Transmission, Replication and Persistence. *Viruses* **2015**, *7* (7), 3603–3624. <https://doi.org/10.3390/v7072793>.
- (36) Gross, C.; Thoma-Kress, A. K. Molecular Mechanisms of HTLV-1 Cell-to-Cell Transmission. *Viruses* **2016**, *8* (3), 74. <https://doi.org/10.3390/v8030074>.
- (37) Derse, D.; Hill, S. A.; Lloyd, P. A.; Chung, H.-K.; Morse, B. A. Examining Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Infection and Replication by Cell-Free Infection with Recombinant Virus Vectors. *J. Virol.* **2001**, *75* (18), 8461–8468. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.18.8461-8468.2001>.
- (38) Jones, K. S.; Petrow-Sadowski, C.; Huang, Y. K.; Bertolette, D. C.; Ruscetti, F. W. Cell-Free HTLV-1 Infects Dendritic Cells Leading to Transmission and Transformation of CD4⁺ T Cells. *Nat. Med.* **2008**, *14* (4), 429–436. <https://doi.org/10.1038/nm1745>.
- (39) Mazurov, D.; Ilinskaya, A.; Heidecker, G.; Lloyd, P.; Derse, D. Quantitative Comparison of HTLV-1 and HIV-1 Cell-to-Cell Infection with New Replication Dependent Vectors. *PLoS Pathog.* **2010**, *6* (2), e1000788. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000788>.
- (40) Derse, D.; Heidecker, G.; Mitchell, M.; Hill, S.; Lloyd, P.; Princler, G. Infectious Transmission and Replication of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1. *Front Biosci.* **2004**, *9*, 2495–2499.
- (41) Matsuoka, M.; Yasunaga, J. I. Human T-Cell Leukemia Virus Type 1: Replication, Proliferation and Propagation by Tax and HTLV-1 BZIP Factor. *Curr. Opin. Virol.* **2013**, *3* (6), 684–691. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.08.010>.
- (42) Nejmeddine, M.; Bangham, C. R. M. The HTLV-1 Virological Synapse. *Viruses* **2010**, *2*, 1427–1447. <https://doi.org/10.3390/v2071427>.
- (43) Majorovits, E.; Nejmeddine, M.; Tanaka, Y.; Taylor, G. P.; Fuller, S. D.; Bangham, C. R. M. Human T-Lymphotropic Virus-1 Visualized at the Virological Synapse by Electron Tomography. *PLoS One* **2008**, *3* (5), e2251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002251>.
- (44) Van Prooyen, N.; Gold, H.; Andresen, V.; Schwartz, O.; Jones, K.; Ruscetti, F.; Lockett, S.; Gudla, P.; Venzon, D.; Franchini, G. Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 P8 Protein Increases Cellular Conduits and Virus Transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107* (48), 20738–20743. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009635107>.
- (45) Martin, J. L.; Maldonado, J. O.; Mueller, J. D.; Zhang, W.; Mansky, L. M. Molecular Studies of HTLV-1 Replication: An Update. *Viruses* **2016**, *8* (2), 31. <https://doi.org/10.3390/v8020031>.
- (46) Kusuhara, K. Human T-Lymphotropic Virus (HTLV). *Fukuoka Igaku Zasshi* **2001**, *92* (12), 385–392. <https://doi.org/10.5772/36333>.

- (47) Futsch, N.; Mahieux, R.; Dutartre, H. HTLV-1, the Other Pathogenic yet Neglected Human Retrovirus: From Transmission to Therapeutic Treatment. *Viruses* **2018**, *10* (1), 1–25. <https://doi.org/10.3390/v10010001>.
- (48) Bangham, C. R. M.; Cook, L. B.; Melamed, A. HTLV-1 Clonality in Adult T-Cell Leukaemia and Non-Malignant HTLV-1 Infection. *Semin. Cancer Biol.* **2014**, *26*, 89–98. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2013.11.003>.
- (49) Baratella, M.; Forlani, G.; Accolla, R. S. HTLV-1 HBZ Viral Protein: A Key Player in HTLV-1 Mediated Diseases. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A. December 22, 2017, p 2615. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02615>.
- (50) Rizkallah, G. Le Role de l' Interaction Des Cellules Dendritiques Avec Le Virus HTLV-1 Dans La Dissémination Virale : Capture Ou Infection Productive ?, 2017.
- (51) Kfoury, Y.; Nasr, R.; Hermine, O.; De Thé, H.; Bazarbachi, A. News and Commentary Proapoptotic Regimes for HTLV-I-Transformed Cells: Targeting Tax and the NF- κ B Pathway. *Cell Death Differ.* **2005**, *12* (1), 871–877. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401624>.
- (52) Mohanty, S.; Harhaj, E. W. Pathogens Mechanisms of Oncogenesis by HTLV-1 Tax. *Pathog. (Basel, Switzerland)* **2020**, *9* (7), 543. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070543>.
- (53) Nomura, M.; Ohashi, T.; Nishikawa, K.; Nishitsuji, H.; Kurihara, K.; Hasegawa, A.; Furuta, R. A.; Fujisawa, J.-I.; Tanaka, Y.; Hanabuchi, S.; et al. Repression of Tax Expression Is Associated Both with Resistance of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Infected T Cells to Killing by Tax-Specific Cytotoxic T Lymphocytes and with Impaired Tumorigenicity in a Rat Model. *J. Virol.* **2004**, *78* (8), 3827–3836. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.8.3827-3836.2004>.
- (54) Forlani, G.; Shallak, M.; Tedeschi, A.; Cavallari, I.; Marçais, A.; Hermine, O.; Accolla, R. S. Dual Cytoplasmic and Nuclear Localization of HTLV-1-Encoded HBZ Protein Is a Unique Feature of Adult T Cell Leukemia. *Haematologica* **2021**. <https://doi.org/10.3324/haematol.2020.272468>.
- (55) Mahgoub, M.; Yasunaga, J.-I.; Iwami, S.; Nakaoka, S.; Koizumi, Y.; Shimura, K.; Matsuoka, M. Sporadic on/off Switching of HTLV-1 Tax Expression Is Crucial to Maintain the Whole Population of Virus-Induced Leukemic Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2018**, *115* (6), 1269–1278. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715724115>.
- (56) Yamada, K.; Miyoshi, H.; Yoshida, N.; Shimono, J.; Sato, K.; Nakashima, K.; Takeuchi, M.; Arakawa, F.; Asano, N.; Yanagida, E.; et al. Human T-Cell Lymphotropic Virus HBZ and Tax mRNA Expression Are Associated with Specific Clinicopathological Features in Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. *Mod. Pathol.* **2021**, *34* (2), 314–326. <https://doi.org/10.1038/s41379-020-00654-0>.
- (57) Lemasson, I.; Lewis, M. R.; Polakowski, N.; Hivin, P.; Cavanagh, M.-H.; Thébault, S.; Barbeau, B.;

- Nyborg, J. K.; Mesnard, J.-M. Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) BZIP Protein Interacts with the Cellular Transcription Factor CREB To Inhibit HTLV-1 Transcription. *J. Virol.* **2007**, *81* (4), 1543–1553. <https://doi.org/10.1128/JVI.00480-06>.
- (58) Zhao, T.; Matsuoka, M. HBZ and Its Roles in HTLV-1 Oncogenesis. *Front. Microbiol.* **2012**, *3* (247). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00247>.
- (59) Zhi, H.; Yang, L.; Kuo, Y. L.; Ho, Y. K.; Shih, H. M.; Giam, C. Z. NF-KB Hyper-Activation by HTLV-1 Tax Induces Cellular Senescence, but Can Be Alleviated by the Viral Anti-Sense Protein HBZ. *PLoS Pathog.* **2011**, *7* (4), e1002025. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002025>.
- (60) Matsumoto, J.; Ohshima, T.; Isono, O.; Shimotohno, K. HTLV-1 HBZ Suppresses AP-1 Activity by Impairing Both the DNA-Binding Ability and the Stability of c-Jun Protein. *Oncogene* **2005**, *24* (6), 1001–1010. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208297>.
- (61) Zhao, T. The Role of HBZ in HTLV-1-Induced Oncogenesis. *Viruses*. MDPI AG February 2, 2016, p 34. <https://doi.org/10.3390/v8020034>.
- (62) Fazio, A. L.; Kendle, W.; Hoang, K.; Korleski, E.; Lemasson, I.; Polakowski, N. Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) BZIP Factor Upregulates the Expression of ICAM-1 To Facilitate HTLV-1 Infection. *J. Virol.* **2019**, *93* (19). <https://doi.org/10.1128/JVI.00608-19>.
- (63) Billman, M. R.; Rueda, D.; Bangham, C. R. M. Single-Cell Heterogeneity and Cell-Cycle-Related Viral Gene Bursts in the Human Leukaemia Virus HTLV-1. *Wellcome Open Res.* **2017**, *2*, 87. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.12469.1>.
- (64) Giam, C.-Z.; Semmes, O. J. HTLV-1 Infection and Adult T-Cell Leukemia/ Lymphoma-A Tale of Two Proteins: Tax and HBZ. *Viruses* **2016**, *8* (6), 161. <https://doi.org/10.3390/v8060161>.
- (65) Ma, G.; Yasunaga, J.; Shimura, K.; Takemoto, K.; Watanabe, M.; Amano, M.; Nakata, H.; Liu, B.; Zuo, X.; Matsuoka, M. Human Retroviral Antisense MRNAs Are Retained in the Nuclei of Infected Cells for Viral Persistence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2021**, *118* ((17)), e2014783118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2014783118/-/DCSupplemental>.
- (66) Mitobe, Y.; Yasunaga, J.-I.; Furuta, R.; Matsuoka, M. Molecular and Cellular Pathobiology HTLV-1 BZIP Factor RNA and Protein Impart Distinct Functions on T-Cell Proliferation and Survival. *Cancer Res* **2015**, *75* (19). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0942>.
- (67) Matsuoka, M.; Mesnard, J.-M. HTLV-1 BZIP Factor: The Key Viral Gene for Pathogenesis. *Retrovirology* **2020**, *17* (2). <https://doi.org/10.1186/s12977-020-0511-0>.
- (68) Choudhary, G.; Ratner, L. The HTLV-1 Hbz Antisense Gene Indirectly Promotes Tax Expression via Down-Regulation of P30II MRNA. *Gunjan. Bone* **2008**, *23* (1), 1–7.

<https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.11.019>.The.

- (69) Gazon, H.; Chauhan, P. S.; Porquet, F.; Hoffmann, G. B.; Accolla, R.; Willems, L. Epigenetic Silencing of HTLV-1 Expression by the HBZ RNA through Interference with the Basal Transcription Machinery. *Blood Adv.* **2020**, *4* (21), 5574–5579. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020001675>.
- (70) Usui, T.; Yanagihara, K.; Tsukasaki, K.; Murata, K.; Hasegawa, H.; Yamada, Y.; Kamihira, S. Characteristic Expression of HTLV-1 Basic Zipper Factor (HBZ) Transcripts in HTLV-1 Provirus-Positive Cells. *Retrovirology* **2008**, *5* (1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-34>.
- (71) Kashida, H.; Murayama, K.; Asanuma, H. Acyclic Artificial Nucleic Acids with Phosphodiester Bonds Exhibit Unique Functions. *Polymer Journal*. Nature Publishing Group July 1, 2016, pp 781–786. <https://doi.org/10.1038/pj.2016.39>.
- (72) Lee, J.; Yokota, T. Antisense Therapy in Neurology. *J. Pers. Med.* **2013**, *3* (3), 144–176. <https://doi.org/10.3390/jpm3030144>.
- (73) Morihiro, K.; Kasahara, Y.; Obika, S. Biological Applications of Xeno Nucleic Acids. *Mol. Biosyst.* **2017**, *13* (2), 235–245. <https://doi.org/10.1039/c6mb00538a>.
- (74) Clark, D. P.; Pazdernik, N. J.; McGehee, M. R. *Molecular Biology*; Elsevier, 2018. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-06229-3>.
- (75) Koch, T. LNA Antisense: A Review. *Curr. Phys. Chem.* **2013**, *3* (1), 55–68. <https://doi.org/10.2174/1877946811303010009>.
- (76) Montazersaheb, S.; Hejazi, M. S.; Charoudeh, H. N. Potential of Peptide Nucleic Acids in Future Therapeutic Applications. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. Tabriz University of Medical Sciences 2018, pp 551–563. <https://doi.org/10.15171/apb.2018.064>.
- (77) Siddiquee, S.; Rovina, K.; Azriah, A. A Review of Peptide Nucleic Acid. *Adv. Tech. Biol. Med.* **2015**, *3* (2). <https://doi.org/10.4172/2379-1764.1000131>.
- (78) Zhou, P.; Dragulescu-Andrasi, A.; Bhattacharya, B.; O'keefe, H.; Vatta, P.; Hyldig-Nielsen, J. J.; Ly, D. H. Synthesis of Cell-Permeable Peptide Nucleic Acids and Characterization of Their Hybridization and Uptake Properties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16* (18), 4931–4935. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.06.052>.
- (79) Gasparello, J.; Manicardi, A.; Casnati, A.; Corradini, R.; Gambari, R.; Finotti, A.; Sansone, F. Efficient Cell Penetration and Delivery of Peptide Nucleic Acids by an Argininocalix[4]Arene OPEN. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 3036. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39211-4>.
- (80) Liu, L. S.; Leung, H. M.; Tam, D. Y.; Lo, T. W.; Wong, S. W.; Lo, P. K. α -1-Threose Nucleic Acids as Biocompatible Antisense Oligonucleotides for Suppressing Gene Expression in Living Cells. *ACS Appl.*

- (81) Sau, S. P.; Fahmi, N. E.; Liao, J. Y.; Bala, S.; Chaput, J. C. A Scalable Synthesis of α -L-Threose Nucleic Acid Monomers. *J. Org. Chem.* **2016**, *81* (6), 2302–2307. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b02768>.
- (82) Bala, S. Synthesis of α L Threofuranosyl Nucleosides, Phosphoramidites, and Triphosphates for Synthetic Biology, 2019.
- (83) Blain, J. C.; Ricardo, A.; Szostak, J. W. Synthesis and Nonenzymatic Template-Directed Polymerization of 2'-Amino-2'-Deoxythreose Nucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136* (5), 2033–2039. <https://doi.org/10.1021/ja411950n>.
- (84) Nan, Y.; Zhang, Y. J. Antisense Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers as Novel Antiviral Compounds. *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A. April 20, 2018, p 750. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00750>.
- (85) Corey, D. R.; Abrams, J. M. Morpholino Antisense Oligonucleotides: Tools for Investigating Vertebrate Development. *Genome Biol.* **2001**, *2* (5), 1–3. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-5-reviews1015>.
- (86) Hu, B.; Zhong, L.; Weng, Y.; Peng, L.; Huang, Y.; Zhao, Y.; Liang, X. J. Therapeutic SiRNA: State of the Art. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2020**, *5* (101). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0207-x>.
- (87) Zeng, Y.; Yi, R.; Cullen, B. R. MicroRNAs and Small Interfering RNAs Can Inhibit MRNA Expression by Similar Mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **2003**, *100* (17), 9779–9784.
- (88) Lam, J. K. W.; Chow, M. Y. T.; Zhang, Y.; Leung, S. W. S. SiRNA versus MiRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **2015**, *4* (9). <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.23>.
- (89) Cai, Y.; Yu, X.; Hu, S.; Yu, J. A Brief Review on the Mechanisms of MiRNA Regulation. *Genomics, Proteomics Bioinforma.* **2009**, *7* (4), 147–154. [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(08\)60044-3](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(08)60044-3).
- (90) Tang, G. SiRNA and MiRNA: An Insight into RISCs. *Trends Biochem. Sci.* **2005**, *30* (2), 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.12.007>.
- (91) O'Brien, J.; Hayder, H.; Zayed, Y.; Peng, C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A. August 3, 2018, p 402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>.
- (92) Hartmann, C.; Corre-Menguy, F.; Boualem, A.; Jovanovic, M.; Lelandais-Brière, C. Les MicroARN Une Nouvelle Classe de Régulateurs de l'expression Génique La Découverte Des MicroARN. *MEDECINE/SCIENCES* **2004**, *20* (10), 894–898. <https://doi.org/10.1051/medsci/20042010894>.
- (93) Morales, S.; Monzo, M.; Navarro, A. Epigenetic Regulation Mechanisms of MicroRNA Expression. *Biomol. Concepts* **2017**, *8* (5–6), 203–212. <https://doi.org/10.1515/bmc-2017-0024>.

- (94) Wang, J.; Lu, Z.; Wientjes, M. G.; Au, J. L. S. Delivery of SiRNA Therapeutics: Barriers and Carriers. *AAPS Journal*. Springer December 11, 2010, pp 492–503. <https://doi.org/10.1208/s12248-010-9210-4>.
- (95) Shen, J.; Zhang, W.; Qi, R.; Mao, Z. W.; Shen, H. Engineering Functional Inorganic-Organic Hybrid Systems: Advances in SiRNA Therapeutics. *Chem. Soc. Rev.* **2018**, *47* (6), 1969–1995. <https://doi.org/10.1039/c7cs00479f>.
- (96) Thompson, A. J. V.; Patel, K. Antisense Inhibitors, Ribozymes, and SiRNAs. *Clin. Liver Dis.* **2009**, *13* (3), 375–390. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2009.05.003>.
- (97) Robbins, M.; Judge, A.; Maclachlan, I. SiRNA and Innate Immunity. *Oligonucleotides* **2009**, *19* (2), 89–102. <https://doi.org/10.1089/oli.2009.0180>.
- (98) Aagaard, L.; Rossi, J. J. RNAi Therapeutics: Principles, Prospects and Challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59* (2–3), 75–86. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.03.005>.
- (99) Zhang, Y. C.; Taylor, M. M.; Samson, W. K.; Phillips, M. I. Antisense Inhibition. *Methods Mol. Med.* **2005**, *106* (May 2014), 11–35. <https://doi.org/10.1385/1-59259-854-4>.
- (100) Park, S. V.; Yang, J. S.; Jo, H.; Kang, B.; Oh, S. S.; Jung, G. Y. Catalytic RNA, Ribozyme, and Its Applications in Synthetic Biology. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37* (8), 107452. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107452>.
- (101) M. O'Rourke, S.; G. Scott, W. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*; 2018; Vol. 159. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.07.006>.
- (102) Didovyk, A.; Borek, B.; Tsimring, L.; Hasty, J. Transcriptional Regulation with CRISPR-Cas9: Principles, Advances, and Applications. *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd August 1, 2016, pp 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.06.003>.
- (103) Baliou, S.; Adamaki, M.; Kyriakopoulos, A. M.; Spandidos, D. A.; Panayiotidis, M.; Chrstodoulou, I.; Zoumpourlis, V. Role of the CRISPR System in Controlling Gene Transcription and Monitoring Cell Fate (Review). *Mol. Med. Rep.* **2018**, *17* (1), 1421–1427. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8099>.
- (104) Lawhorn, I. E. B.; Ferreira, J. P.; Wang, C. L. Evaluation of SgRNA Target Sites for CRISPR-Mediated Repression of TP53. *PLoS ONE*. Public Library of Science November 14, 2014, p e113232. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113232>.
- (105) Cogoi, S.; Codognotto, A.; Rapozzi, V.; E Xodo, L. Antigene Property of PNA Conjugated to the Nuclear Localization Signal Peptide. *Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids* **2005**, *24* (5–7), 971–974. <https://doi.org/10.1081/NCN-200059333>.
- (106) Alberici, F. *SOLID-PHASE SYNTHESIS: A Practical Guide*.; CRC Press, 2019.

- (107) Kaihatsu, K.; Huffman, K. E.; Corey, D. R. Articles Intracellular Uptake and Inhibition of Gene Expression by PNAs and PNA-Peptide Conjugates †. *Biochemistry* **2004**, *43*, 14340–14347. <https://doi.org/10.1021/bi048519l>.
- (108) Kimata, J. T.; Wong, F. H.; Wang, J. J.; Ratner, L. Construction and Characterization of Infectious Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Molecular Clones. *Virology* **1994**, *204* (2), 656–664. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1581>.
- (109) Gaudray, G.; Gachon, F.; Basbous, J.; Biard-Piechaczyk, M.; Devaux, C.; Mesnard, J.-M. 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.* **2002**, *76* (24), 12813–12822. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.24.12813-12822.2002>.
- (110) Larocque, É.; Halin, M.; Landry, S.; J Marriott, S.; M Switzer, W.; Barbeau, B. Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 3 (HTLV-3)- and HTLV-4-Derived Antisense Transcripts Encode Proteins with Similar Tax-Inhibiting Functions but Distinct Subcellular Localization. *J. Virol.* **2011**, *85* (23), 12673–12685. <https://doi.org/10.1128/JVI.05296-11>.
- (111) Halin, M.; Douceron, E.; Clerc, I.; Journo, C.; Nga Ling, K.; Landry, S.; L Murphy, E.; Gessain, A.; Lemasson, I.; Mesnard, J.-M.; et al. Human T-Cell Leukemia Virus Type 2 Produces a Spliced Antisense Transcript Encoding a Protein That Lacks a Classic BZIP Domain but Still Inhibits Tax2-Mediated Transcription. *Blood* **2009**, *114* (12), 2427–2438. <https://doi.org/10.1182/BLOOD-2008-09-179879>.
- (112) Miura, M.; Yasunaga, J.; Tanabe, J.; Sugata, K.; Zhao, T.; Ma, G.; Miyazato, P.; Ohshima, K.; Kaneko, A.; Watanabe, A.; et al. Characterization of Simian T-Cell Leukemia Virus Type 1 in Naturally Infected Japanese Macaques as a Model of HTLV-1 Infection. *Retrovirology* **2013**, *10* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-118>.
- (113) Rasmussen, M. H.; Ballarín-González, B.; Liu, J.; Lassen, L. B.; Füchtbauer, A.; Füchtbauer, E.-M.; Nielsen, A. L.; Pedersen, F. S. Antisense Transcription in Gammaretroviruses as a Mechanism of Insertional Activation of Host Genes. *J. Virol.* **2010**, *84* (8), 3780. <https://doi.org/10.1128/JVI.02088-09>.
- (114) Durkin, K.; Rosewick, N.; Artesi, M.; Hahaut, V.; Griebel, P.; Arsic, N.; Burny, A.; Georges, M.; Broeke, A. Van den. Characterization of Novel Bovine Leukemia Virus (BLV) Antisense Transcripts by Deep Sequencing Reveals Constitutive Expression in Tumors and Transcriptional Interaction with Viral MicroRNAs. *Retrovirology* **2016**, *13* (1), 33. <https://doi.org/10.1186/S12977-016-0267-8>.
- (115) Vanhée-Brossollet, C.; Thoreau, H.; Serpente, N.; D'Auriol, L.; Lévy, J. P.; Vaquero, C. A Natural Antisense RNA Derived from the HIV-1 Env Gene Encodes a Protein Which Is Recognized by Circulating Antibodies of HIV+ Individuals. *Virology* **1995**, *206* (1), 196–202. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(95\)80034-4](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(95)80034-4).

- (116) Bukrinsky, M.; Etkin, A. Plus Strand of the HIV Provirus DNA Is Expressed at Early Stages of Infection. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **1990**, *6* (4), 425–426. <https://doi.org/10.1089/AID.1990.6.425>.
- (117) Savoret, J. ASP, La Protéine AntiSens Du VIH-1 : Étude de Ses Transcrits et de La Réponse Anticorps Anti-ASP Chez Le Patient, 2019.
- (118) Kobayashi-Ishihara, M.; Yamagishi, M.; Hara, T.; Matsuda, Y.; Takahashi, R.; Miyake, A.; Nakano, K.; Yamochi, T.; Ishida, T.; Watanabe, T. HIV-1-Encoded Antisense RNA Suppresses Viral Replication for a Prolonged Period. *Retrovirology* **2012**, *9*, 38. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-9-38>.
- (119) Zapata, J. C.; Campilongo, F.; Barclay, R. A.; DeMarino, C.; Iglesias-Ussel, M. D.; Kashanchi, F.; Romerio, F. The Human Immunodeficiency Virus 1 ASP RNA Promotes Viral Latency by Recruiting the Polycomb Repressor Complex 2 and Promoting Nucleosome Assembly. *Virology* **2017**, *506*, 34. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2017.03.002>.
- (120) Verdikt, R.; Hernalsteens, O.; Lint, C. Van. Epigenetic Mechanisms of HIV-1 Persistence. *Vaccine* **2021**, *9*, 514.
- (121) Gross, C.; K Thoma-Kress, A. Reporter Systems to Study HTLV-1 Transmission. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1582*, 33–46. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6872-5_3.
- (122) Philip, S.; Zahoor, M. A.; Zhi, H.; Ho, Y.-K.; Giam, C.-Z. Regulation of Human T-Lymphotropic Virus Type I Latency and Reactivation by HBZ and Rex. *PLoS Pathog.* **2014**, *10* (4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1004040>.
- (123) Satou, Y.; Yasunaga, J.; Yoshida, M.; Matsuoka, M. HTLV-I Basic Leucine Zipper Factor Gene MRNA Supports Proliferation of Adult T Cell Leukemia Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (3), 720–725. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0507631103>.
- (124) Özeş, A. R.; Wang, Y.; Zong, X.; Pilrose, J.; Nephew, K. P. Therapeutic Targeting Using Tumor Specific Peptides Inhibits Long Non-Coding RNA HOTAIR Activity in Ovarian and Breast Cancer. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 894. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00966-3>.
- (125) Matsuoka, M.; Jeang, K. T. Human T-Cell Leukaemia Virus Type 1 (HTLV-1) Infectivity and Cellular Transformation. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7* (4), 270–280. <https://doi.org/10.1038/nrc2111>.
- (126) Braasch, D. A.; Corey, D. R. Cellular Delivery of Locked Nucleic Acids (LNAs). *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2002**, *9* (1), 1–9. <https://doi.org/10.1002/0471142700.nc0413s09>.
- (127) Równicki, M.; Dabrowska, Z.; Wojciechowska, M.; Wierzbza, A. J.; Maximova, K.; Gryko, D.; Trylska, J. Inhibition of Escherichia Coli Growth by Vitamin B12-Peptide Nucleic Acid Conjugates. *ACS Omega* **2019**, *4* (1), 819–824. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b03139>.

- (128) Jafri, I.; Alsharif, G.; Bland, G. N.; Gambhir, K. K. Erythrocyte MiRNA 144 and MiRNA 451 as Cell Aging Biomarkers in African American Adults. *Open Biochem. J.* **2019**, *13* (1), 81–87. <https://doi.org/10.2174/1874091x01913010081>.