



HAL
open science

Modification de l'organisation tridimensionnelle de la chromatine par l'oncogène Tax de HTLV-1 : conséquences fonctionnelles sur la transcription et l'épissage alternatif des gènes cellulaires.

Paul Alexandre Marie

► To cite this version:

Paul Alexandre Marie. Modification de l'organisation tridimensionnelle de la chromatine par l'oncogène Tax de HTLV-1 : conséquences fonctionnelles sur la transcription et l'épissage alternatif des gènes cellulaires.. *Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]*. Université Claude Bernard Lyon 1, 2023. Français. NNT : . tel-04135214

HAL Id: tel-04135214

<https://hal.science/tel-04135214v1>

Submitted on 20 Jun 2023

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

N°d'ordre NNT : xxx



THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

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

Spécialité de doctorat : Biologie moléculaire, Génétique
Discipline : Science de la Vie et de la Santé

Soutenue publiquement le 14/06/2023, par :

Paul MARIE

**Modification de l'organisation
tridimensionnelle de la chromatine par
l'oncogène Tax de HTLV-1 :
conséquences fonctionnelles sur la
transcription et l'épissage alternatif des
gènes cellulaires**

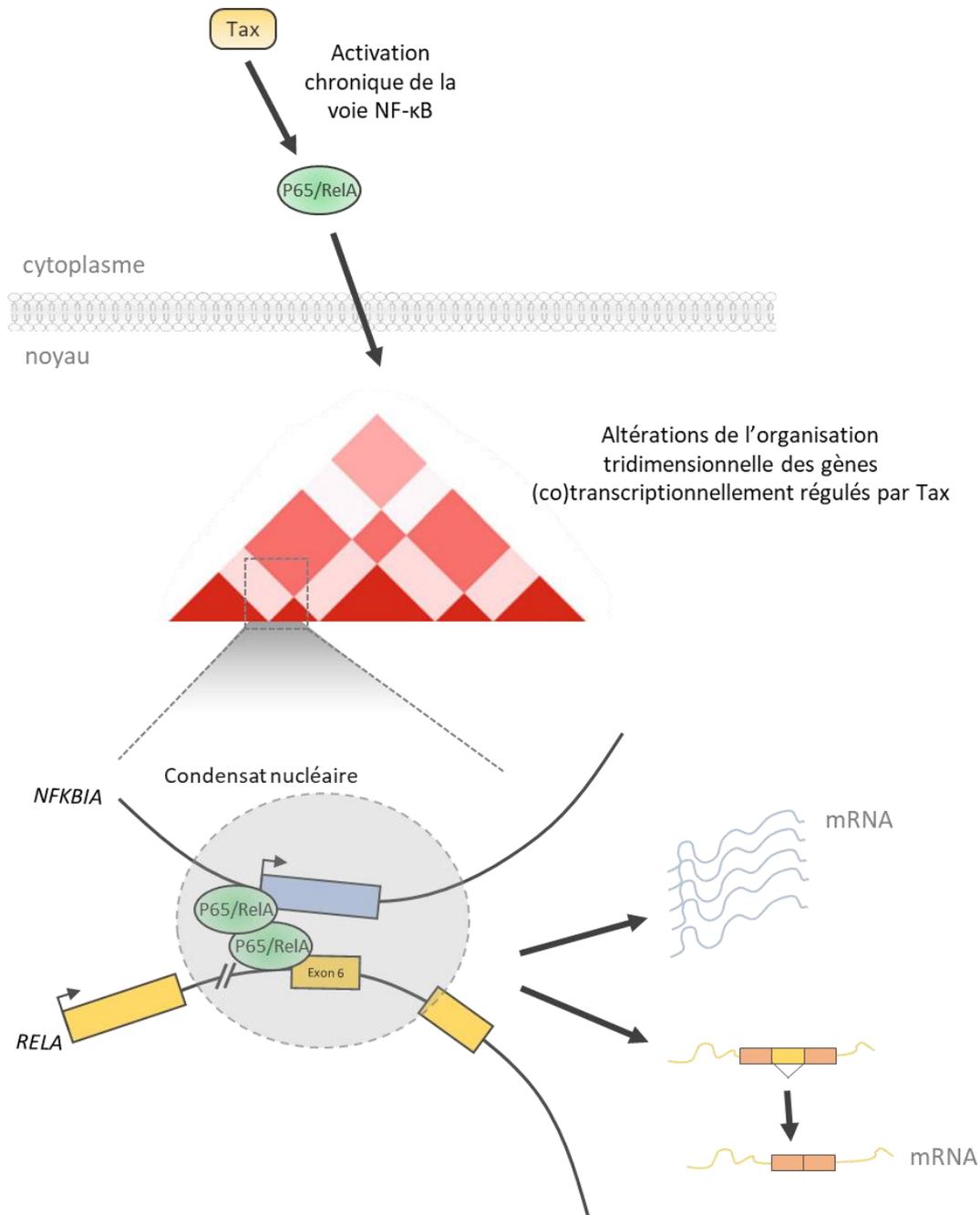
Devant le jury composé de :

F. LUCO Reini	Chargée de Recherches CNRS	Institut Curie, Orsay	Rapporteuse
PIQUE Claudine	Directrice de Recherches CNRS	Intitut Cochin, Paris	Rapporteuse
FAURE Mathias	Professeur des Universités	CIRI, Lyon	Examineur
GADAL Olivier	Directeur de Recherche CNRS	CBI, Toulouse	Examineur
MORTREUX Franck	Chargé de Recherche CNRS	LBMC, Lyon	Directeur de thèse

Résumé

L'activation de la voie NF- κ B contrôle la transcription de nombreux gènes engagés dans des processus physiologiques majeurs tels que l'inflammation et la réponse immune. Néanmoins, son activation chronique est fréquemment associée dans des maladies tels que les cancers. L'organisation tridimensionnelle de la chromatine joue un rôle dans la coordination des régulations transcriptionnelles mise en place lors de l'activation de la voie NF- κ B. Mes travaux montrent dans un contexte d'activation de la voie NF- κ B par l'oncogène Tax du rétrovirus HTLV-1 que de nombreuses dérégulations d'épissage alternatif sont médiées par le recrutement intragénique du facteur NF- κ B p65/RelA à proximité des exons régulés via ses capacité d'interaction avec des facteurs d'épissage, dont l'hélicase à ARN DDX17. Par des approches de Hi-C, 4C et 3C, mes données montrent que les régulations transcriptionnelles et co-transcriptionnelles engendrées par Tax, notamment via l'activation de la voie NF- κ B, s'accompagnent d'une réorganisation de l'architecture tridimensionnelle du génome, induisant la formation de complexes multigéniques composés de gènes régulés par Tax dans leur niveau transcriptionnel ou leur épissage alternatif. Les analyses de l'enrichissement à la chromatine de p65/RelA, ainsi que des approches moléculaires permettant de moduler expérimentalement le recrutement de p65/RelA à la chromatine, ont permis d'identifier que la fixation intragénique de p65/RelA participe à la formation de contacts entre gènes et à leurs régulations au niveau de la transcription et de l'épissage alternatif. Ces données apportent de nouvelles connaissances dans les mécanismes de régulation lors de l'infection par HTLV-1 mais également dans les pathologies associées à l'activation de la voie NF- κ B.

Résumé graphique



Abstract

The NF- κ B pathway controls the transcription of numerous genes involved in major physiological processes such as inflammation and immune response. However, its chronic activation is frequently associated with diseases such as cancer. The 3D organization of chromatin plays a role in coordinating transcriptional regulations established during NF- κ B pathway activation. My work demonstrates that, in the context of NF- κ B pathway activation by the HTLV-1 retrovirus oncoprotein Tax, numerous alternative splicing deregulations are mediated by the intragenic recruitment of the NF- κ B p65/RelA factor near regulated exons through its interaction capabilities with splicing factors, including the RNA helicase DDX17. Using Hi-C, 4C, and 3C approaches, my data reveal that transcriptional and post-transcriptional regulations induced by Tax, particularly through the NF- κ B pathway, are accompanied by a reorganization of the 3D genome architecture, leading to the formation of multigenic complexes composed of genes regulated by Tax at the transcriptional level or at the alternative splicing. Analyses of p65/RelA chromatin occupancy, as well as molecular approaches to experimentally modulate p65/RelA recruitment to the chromatin, have identified that intragenic binding of p65/RelA contributes to the formation of contacts between genes and their regulation at the transcriptional and alternative splicing levels. These findings provide new insight into the complex regulatory mechanisms involved in gene perturbations upon HTLV-1 infection as well as in pathologies associated with chronic NF- κ B activation.

Remerciements

Table des matières

Table des matières

Résumé	2
Abstract	4
Table des matières	8
Table des illustrations	13
Lexique.....	16
Introduction.....	19
1. Epissage alternatif	20
a. Généralités.....	20
b. Régulations de l'épissage alternatif.....	21
i. Séquences cis-régulatrices et facteurs trans-régulateurs	21
ii. Les protéines SR, activateurs de l'épissage.....	23
iii. Les protéines hnRNP, inhibiteurs de l'épissage	23
iv. Structures secondaires d'ARN et modulation de l'épissage alternatif.....	24
v. Les hélicases DDX5 et DDX17 et leurs rôles dans le couplage de l'épissage et de la transcription	24
c. Couplage entre transcription et épissage alternatif	26
i. Modèle de recrutement.....	27
ii. Modèle cinétique	29
iii. Exemple du couplage entre transcription et épissage par les hélicases DDX5 et DDX17	31
iv. Facteurs de transcription et épissage alternatif.....	32
2. Organisation linéaire de la chromatine et impact sur l'expression des gènes.....	35
a. Nucléosome : l'unité de base de la chromatine	35
b. Histones PTM, impact sur la chromatine et la transcription.....	36
i. Remodelage de la chromatine, une nécessité pour la régulation des gènes	36

ii.	Histones PTM et impact sur l'état de la chromatine	36
iii.	Régulation de l'épissage alternatifs par les histones.....	39
3.	Organisation tridimensionnelle de la chromatine et impact sur l'expression des gènes..	43
a.	Généralités.....	43
b.	Organisation à différentes échelles	45
i.	Territoires chromosomiques	45
ii.	Compartiments A et B.....	45
iii.	Domaines d'association topologique	45
iv.	Boucles intragéniques.....	48
v.	Boucles de chromatine intergéniques.....	48
vi.	Facteurs de transcription et boucles de chromatine	51
c.	Les condensats nucléaires comme acteurs de l'organisation du génome et de l'expression des gènes	54
i.	Usines à transcription : une compartimentalisation de la transcription.....	56
ii.	Les corps nucléaires, des condensats dédiés à l'épissage	60
d.	Epissage alternatif et organisation du génome	62
i.	Boucles promoteur-exon et impact sur l'épissage	62
ii.	Rapprochement de gènes et épissage alternatif.....	64
iii.	Corps nucléaires et organisation du génome	65
iv.	Localisation nucléaire et impact sur l'épissage.....	66
4.	HTLV-1, Tax et l'épissage alternatif	68
a.	Généralités et épidémiologie du HTLV-1 et des pathologies associées	68
i.	Généralités.....	68
ii.	Epidémiologie	68
iii.	Transmission du virus.....	69
iv.	Pathologies associées à HTLV-1.....	70

b.	Structure du HTLV-1 et mécanismes de réplication	71
i.	Structure de la particule virale	71
ii.	Génome viral	72
iii.	Réplication de HTLV-1	75
c.	L'oncoprotéine Tax	80
i.	Généralités et interactôme	80
ii.	Apoptose, cycle cellulaire et instabilité génomique	81
iii.	Transactivation des gènes viraux et cellulaires par Tax	83
d.	Tax et la voie NF- κ B, pierre angulaire de la pathogénie du HTLV-1.....	91
i.	Généralités.....	91
ii.	Les différentes voies NF- κ B.....	93
iii.	Modulation transcriptionnelle de la réponse NF- κ B	95
iv.	Tax et la voie NF- κ B	104
v.	Dérégulations de transcriptionnelles des gènes cellulaires par HTLV-1 et par Tax	108
	Problématique.....	113
	Résultats	116
	Résumé :	117
	Discussion générale et perspectives	166
	Spécificité de l'activation de la voie NF- κ B Tax-dépendante	169
	Epissage alternatif et structures subnucléaires	172
	La réorganisation tridimensionnelle du génome par Tax dans les processus mutagènes.	176
	L'intégration de HTLV-1 dans le génome altère l'organisation tridimensionnelle du génome	177
	Conclusion	179
	Annexes	180

Annexe 1	181
Bibliographie.....	194
Résumé	234

Table des illustrations

Table des illustrations

Figure 1 : Schéma représentatif de la réaction d'épissage et de la structure.....	21
Figure 2 : Les sites d'épissage et leurs séquences consensus	22
Figure 3 : Les principaux types d'épissage alternatif.....	22
Figure 4 : Schéma représentatif des séquences cis-régulatrices et acteurs trans-régulateurs de l'épissage alternatif.....	23
Figure 5 : Epissage alternatif de l'exon 10 de Tau par DDX5	25
Figure 6 : Exemple de modèle de recrutement	28
Figure 7 : Modèle cinétique de l'épissage alternatif.....	30
Figure 8 : modèles d'implication des facteurs de transcription	34
Figure 9 : Composition et modifications post-traductionnelles des nucléosomes.....	38
Figure 10 : Schéma des grandes étapes des protocoles des principales techniques C.....	44
Figure 11 : Organisation du génome à différentes échelles et motifs associés sur les cartes d'interaction de Hi-C.....	47
Figure 12 : Schéma des altération génétiques et de leurs conséquences sur l'organisation du génome et l'expression des gènes WNT6, IHH, EPHA4 et PAX3 dans diverses pathologies	50
Figure 13 : Schéma des différents modes d'action des facteurs de transcription sur la formation de boucles de chromatine	53
Figure 14 : Représentation d'une usine à transcription	57
Figure 15 : Illustration de la spécialisation d'usines à transcription dans le cas de l'activation de la voie NF- κ B	59
Figure 16 : représentation des Nuclear speckles et de leurs fonctions	66
Figure 17 : Distribution mondiale de HTLV-1.....	69
Figure 18 : Représentation schématique de la particule virale de HTLV-1 et de sa structure ...	72
Figure 19 : Génome proviral et transcrits de HTLV-1	73
Figure 20 : Cycle répliatif du HTLV-1	75
Figure 21 : Représentation des trois voies de transmission cellule à cellule du HTLV-1	76
Figure 22: Les différents profils de clonalité de HTLV-1.....	77
Figure 23 : Schéma des grandes étapes de l'infection par HTLV-1 et du développement de l'ATLL et de l'HAM/TSP.....	79
Figure 24 : Structure et domaines de la protéine Tax-1.....	80

Figure 25: Schéma des effets de Tax sur la progression du cycle cellulaire.....	82
Figure 26 : transactivation du LTR de HTLV-1 par Tax.....	84
Figure 27 : Schéma des voies de signalisation impactées par Tax	90
Figure 28 : les acteurs de la voie NF- κ B	92
Figure 29 : Schéma d'activation des voies canoniques et non-canoniques de NF- κ B	93
Figure 30 : modèle de la coordination hiérarchique de gènes co-régulés lors de l'activation par le TNF α	104
Figure 31 : Interactions de Tax avec les protéines de la voie NF- κ B	106
Figure 32 : Modèle de régulation de l'épissage alternatif par p65/RelA et DDX17.	111
Figure 33 : illustration de la problématique posée.....	115
Figure 34 : modèle de la coordination de la régulation transcriptionnelle et co-transcriptionnelle de la voie NF- κ B par Tax.	168
Figure 35 : Effets de la PMA et du TNF α sur l'exclusion de l'exon 6 de RELA.....	170
Figure 36 : Tax co-localise avec RelA et DDX17 dans des structures discrètes subnucléaires ..	176
Tableau 1 : Exemple de modifications post-traductionnelles d'histones reliées à l'épissage.	41
Tableau 2 : Composition des usines à transcription.	58
Tableau 3 : Exemples de rapprochements de gènes co-régulés.	60
Tableau 4 : Les protéines virales codées par HTLV-1 et leurs fonctions	74
Tableau 5 : Les modifications post-traductionnelles de Tax et leurs rôles.	98

Lexique

3C - Chromosome Conformation Capture	DSB - Double-Strand Break
4C - Circular Chromosome Conformation Capture	dUTP - Deoxyuridine Triphosphate
5C - Chromosome Conformation Capture Carbon Copy	EDI – Extra Domain I
ADN – Acide Désoxyribonucleique	Egr1 - Early Growth Response 1
AP-1 - Activator Protein-1	EHMT1/2 - Euchromatic Histone-Lysine N-Methyltransferase
ARN – Acide Ribonucléique	Elk-1 - ETS-Like Protein 1
ARNm - ARN messenger	Env - Envelope Protein
ARNPII - ARN Polymérase II	EPHA4 - Ephrin type-A receptor 4
ATF - Activating Transcription Factor	ERa - Estrogen Receptor alpha
ATF - Activating Transcription Factor	eRNA - Enhancer RNA
ATLL- Adult T-cell Leukemia	ESE - Exonic Splicing Enhancer
ATP - Adenosine triphosphate	ESS - Exonic Splicing Silencer
BAFF - B-cell Activating Factor	FBI-1 - Pokemon/ZBTB7A
BCL - B-cell Lymphoma	FRAP - Fluorescence Recovery After Photobleaching
BER - Base Excision Repair	GCH1 - GTP Cyclohydrol
BLV - Bovine Leukemia Virus	GCH1: GTP cyclohydrolase 1
BRD4 - Bromodomain-containing Protein 4	GLUT-1: glucose transporter type 1
Brm - Brahma	GO: Gene Ontology
BrUTP - Bromouridine Triphosphate	GPS2: G protein pathway suppressor 2
C/EPBβ - CCAAT/enhancer-binding protein beta	HAM/TSP: HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis
CA - Capside	HAT: histone acetyltransferase
CAF1B - Chromatin Assembly Factor 1B	HBO1: KAT7 (lysine acetyltransferase 7)
Capture-C - Chromosome Conformation Capture-C	HBZ: basic leucine zipper factor
CarG - Cysteine-rich and Glycine-rich sequence	HDAC: histone deacetylase
CARM1 - Coactivator-associated Arginine Methyltransferase 1	HDM: histone demethylase
CBP/p300 - CREB-binding Protein/ E1A-binding Protein P300	HEK: human embryonic kidney
CDK - Cyclin-dependent Kinase	HGH: human growth hormone
cFLIP - Cellular FLICE-inhibitory Protein	Hi-C: high-throughput chromosome conformation capture
C-FOS - FBJ Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog	HIV: human immunodeficiency virus
CHD - Chromodomain Helicase DNA-binding protein	HLA: human leukocyte antigen
ChIA-PET - Chromatin Interaction Analysis with Paired-End Tag Sequencing	HMT: histone methyltransferase
ChIP - Chromatin Immunoprecipitation	hnRNP: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
ChIP-seq - Chromatin Immunoprecipitation sequencing	HOXA9: homeobox A9
Chk1/2 - Checkpoint Kinase 1/2	HP1: heterochromatin protein 1
ciAP - cellular Inhibitor of Apoptosis	HSPG: heparan sulfate proteoglycan
CLOuD9 - CTD-like phosphoesterase domain-containing protein 9	hTERT: human telomerase reverse transcriptase
CRE - cAMP Response Element	HTLV-1: human T-cell lymphotropic virus type 1
CREB - cAMP Response Element-Binding protein	IHH: Indian hedgehog
CRISPR/Cas9 - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated Protein 9	IKK: I kappa B kinase
CTCF - CCCTC-binding Factor	IL: interleukin
CTD - C-terminal Domain	INT6: integrator complex subunit 6
DBD - DNA-binding Domain	ISE: intronic splicing enhancer
dCas9 - Dead Cas9	ISS: intronic splicing silencer
DDX - DEAD-box helicase	ISWI: imitation switch
DEAD - Asp-Glu-Ala-Asp (motif)	JNK: c-Jun N-terminal kinase
DNA-FISH - DNA Fluorescence In Situ Hybridization	LCR: locus control region
DRB - 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole	LDB1: LIM domain binding 1
	LHX2: LIM homeobox 2
	LLPS: liquid-liquid phase separation
	lncRNA: long non-coding RNA
	LPS: lipopolysaccharide
	LTR: long terminal repeat
	MA: matrix protein

MAPK(KK): mitogen-activated protein kinase (kinase kinase)
 MED23: mediator complex subunit 23
 MEKK1: mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
 MMP-9: matrix metalloproteinase-9
 MRG15: mortality factor-related gene 15
 MSK1: mitogen- and stress-activated protein kinase 1
 MyoD: myogenic differentiation 1
 Nacc1: nucleus accumbens-associated protein 1
 NAP1: nucleosome assembly protein 1
 NC: nucleocapsid
 NCAM: neural cell adhesion molecule
 NF- κ B: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
 NF-YB: nuclear transcription factor Y subunit beta
 NHEJ: non-homologous end joining
 NIK: NF-kappa-B-inducing kinase
 NMD: nonsense-mediated mRNA decay
 NRP: neuropilin
 NRP-1: neuropilin-1
 NS: Nuclear speckle
 NUP98: nucleoporin 98
 PAX3: paired box gene 3
 PCAF: p300/CBP-associated factor
 PCNA: proliferating cell nuclear antigen
 PI3K/Akt: phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B
 PKA: Protein kinase A
 PRC2: Polycomb repressive complex 2
 Pre-mRNA: Precursor messenger RNA
 Pro: Protease
 PTB: Polypyrimidine tract-binding protein
 P-TEFb: Positive transcription elongation factor b
 PTHrP: Parathyroid hormone-related protein
 PTM : Post translational modification
 INO80: Phosphotransferase-related protein
 MINO80
 RANKL: Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
 RBM20: RNA-binding motif protein 20
 RBM4: RNA-binding motif protein 4
 RBP: Retinol-binding protein
 RHD: Rel Homology Domain
 RNA-FISH: RNA fluorescent in situ hybridization
 RNP: Ribonucleoprotein
 RPA: Replication protein A
 RPABC3: RNA polymerase II-associated protein 3
 RPAC1: RNA polymerase II-associated protein complex subunit 1
 RPB2: RNA polymerase II subunit B2
 RRM: RNA recognition motif
 RTK: Receptor tyrosine kinase
 RUNX1/RUNX1T1: Runt-related transcription factor 1/Runt-related transcription factor 1 translocation partner 1
 SAF1B1/B2: Scaffold attachment factor 1B1/B2
 Sam68: Src-associated in mitosis of 68 kDa
 SAMD4A: Sterile alpha motif domain-containing protein 4A
 SAP1: Serum response factor accessory protein 1
 SAPK: Stress-activated protein kinase
 Sc35: spliceosomal component 35
 SF2/ASF: Splicing factor 2/alternative splicing factor
 SL6C6A5: Solute carrier family 6 member 6, isoform A5
 snRNP : Small nuclear ribonucleoprotein
 Sp1: Specificity protein 1
 SP3: Specificity protein 3
 SPRITE: Split-pool recognition of interactions by tag extension
 SR: Serine-arginine-rich protein
 SRA: Steroid receptor RNA activator
 SRE: Serum response element
 SRF: Serum response factor
 SRRM2: Serine/arginine repetitive matrix protein 2
 SRSF3/SRp20: Serine/arginine-rich splicing factor 3/20 kDa
 SS: Splice site
 STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3
 STLV: Simian T-cell lymphotropic virus
 SUMO: Small ubiquitin-like modifier
 SUV39H1: Suppressor of variegation 3-9 homolog 1
 SWI/SNF: Switch/sucrose nonfermentable complex
 TAD: Topologically associated domain
 TAK1: TGF- β -activated kinase 1
 TaxTax1B1: T-cell leukemia/lymphoma 1B protein
 TBP: TATA-binding protein
 TCT: T-cell leukemia translocation
 TF20: Transcription factor 20
 TFIIH: Transcription factor II H
 TFII-I: Transcription factor II I
 TGF- β : Transforming growth factor
 TNFR: Tumor Necrosis Factor Receptor
 TNF α : Tumor Necrosis Factor Alpha
 TNFAIP2: Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Protein 2
 TrxG: Trithorax Group
 TSS: Transcription Start Site
 TTN: Titin
 TxRE: Transcriptional Regulatory Element
 U2AF65: U2 small nuclear RNA Auxiliary Factor 65
 Ubx: Ultrabithorax
 UPF1: Up-frameshift suppressor 1
 USF1: Upstream Stimulatory Factor 1
 WNT6: Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 6
 XIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein
 XPB: Xeroderma Pigmentosum Group B
 Zfp871: Zinc Finger Protein 871

Introduction

1. Epissage alternatif

a. Généralités

Chez les eucaryotes supérieurs, les gènes codants les protéines codent des transcrit pré-messagers (pré-ARNm) composés de séquences codantes (exons) et non-codantes (introns). Chez l'homme, les quelques 22 000 gènes codants comportent en moyenne 8 introns ([Hong et al., 2006](#)). Pour former un ARN messager mature (ARNm) à partir d'un pré-ARNm, la cellule doit donc être capable de reconnaître et d'exciser les introns. Cette étape, nommée épissage, est le plus souvent réalisée de façon co-transcriptionnelle par un complexe ribonucléoprotéique (RNP) composé de 5 protéines nucléaires complexées à des petits ARN (small nuclear ribonucleoprotein ou snRNP) et de plus de 200 autres protéines. L'ensemble de ces facteurs forment un large complexe fonctionnel, le splicéosome, qui reconnaît et s'assemble sur les sites d'épissage (SS pour Splicing Sites) et réalise les étapes nécessaires à l'exclusion des introns ([Figure 1](#)). Ces étapes d'épissage sont finement régulées et peuvent parfois aboutir à l'inclusion ou l'exclusion d'un même exon au sein de l'ARNm. Ce processus appelé épissage alternatif concerne plus de 95% des gènes codants, et permet d'accroître grandement le protéome à partir d'un nombre limité de gènes. En effet, malgré les 22 000 gènes codants, 215 000 isoformes d'ARNm sont retrouvés chez l'homme ([Lee and Rio, 2015](#)). Ce phénomène et sa régulation sont impliqués dans de très nombreuses fonctions, et peuvent être spécifiques du tissu. Des épissages alternatifs aberrants sont décrits dans de nombreuses pathologies humaines telles que l'amyotrophie spinale et les cancers ([Barash et al., 2010](#)).

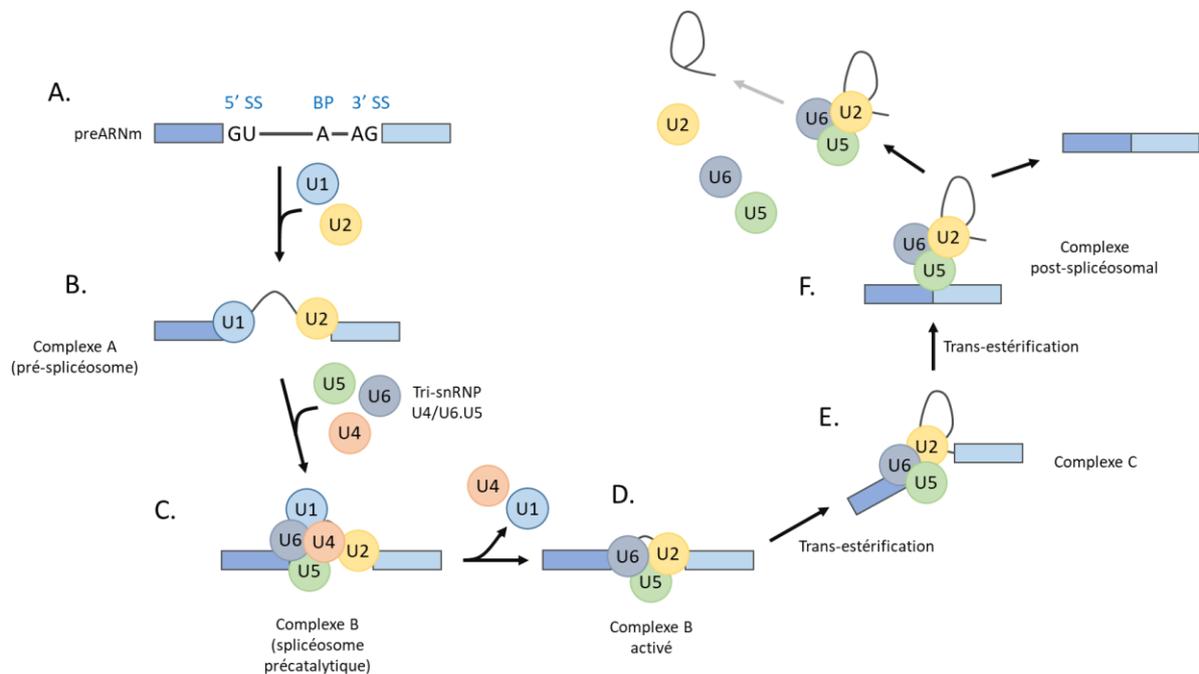


Figure 1 : Schéma représentatif de la réaction d'épissage et de la structure. A. La réaction d'épissage démarre par la reconnaissance du site donneur d'épissage 5' (5' Splice Site, 5'SS) reconnu par le U1 snRNP tandis que U2 se fixe au point de branchement (Branch Point Site, BP), formant alors le complexe A (B.). C. Le tri-snRNP U4/U6.U5 est recruté pour former le complexe pré-catalytique B. D. Les snRNP U1 et U4 sont évincés du complexe B qui est alors actif et catalyse la première réaction de trans-estérification. E. Le complexe C est formé et réalise la seconde réaction de trans-estérification permettant de connecter les deux exons ensemble. F. Le lariat formé par l'intron est libéré, et les facteurs d'épissage évincés du transcrits sont recyclés pour un nouveau cycle catalytique. Adapté de Lee and Rio, 2015.

b. Régulations de l'épissage alternatif

i. Séquences cis-régulatrices et facteurs trans-régulateurs

Chaque site d'épissage peut être défini par une séquence consensus très conservée (Figure 2). Les sites d'épissage peuvent être « forts » ou « faibles ». Les sites d'épissages forts ou faibles peuvent être définis selon leur degré de divergence par rapport au motif consensus, permettant ainsi une reconnaissance plus ou moins efficace de ces sites par les snRNP, respectivement. Des sites forts induiront un épissage constitutif et les exons correspondants seront toujours retrouvés dans l'ARNm. En revanche, un site faible d'épissage verra son utilisation varier et donc le pourcentage d'inclusion de l'exon variera selon le contexte cellulaire.

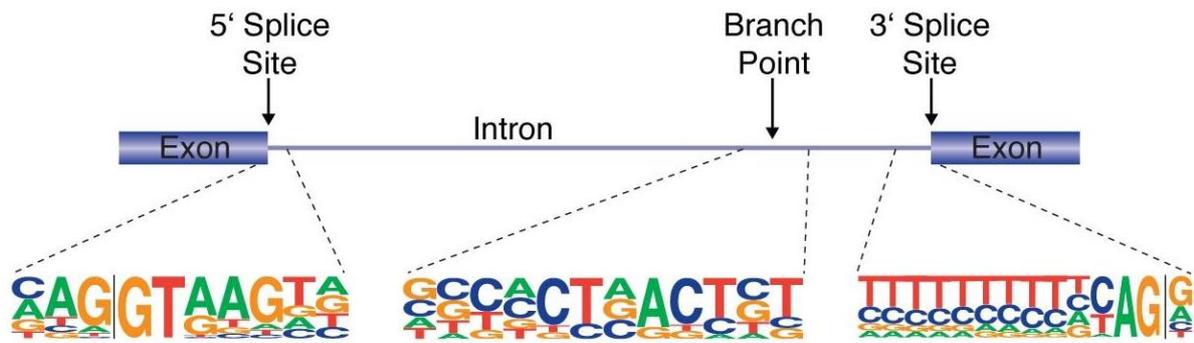


Figure 2 : Les sites d'épissage et leurs séquences consensus. D'après McManus and Graveley, 2011.

Selon la position des sites d'épissage forts et faibles, plusieurs événements d'épissage alternatif ont alors lieu, tels que l'exclusion/inclusion d'un exon ou encore l'utilisation d'un SS 3' ou 5' alternatif (Figure 3). L'utilisation de ces sites faibles peut être régulée par des séquences *cis*-régulatrices, et par d'autres facteurs agissant en *trans*.

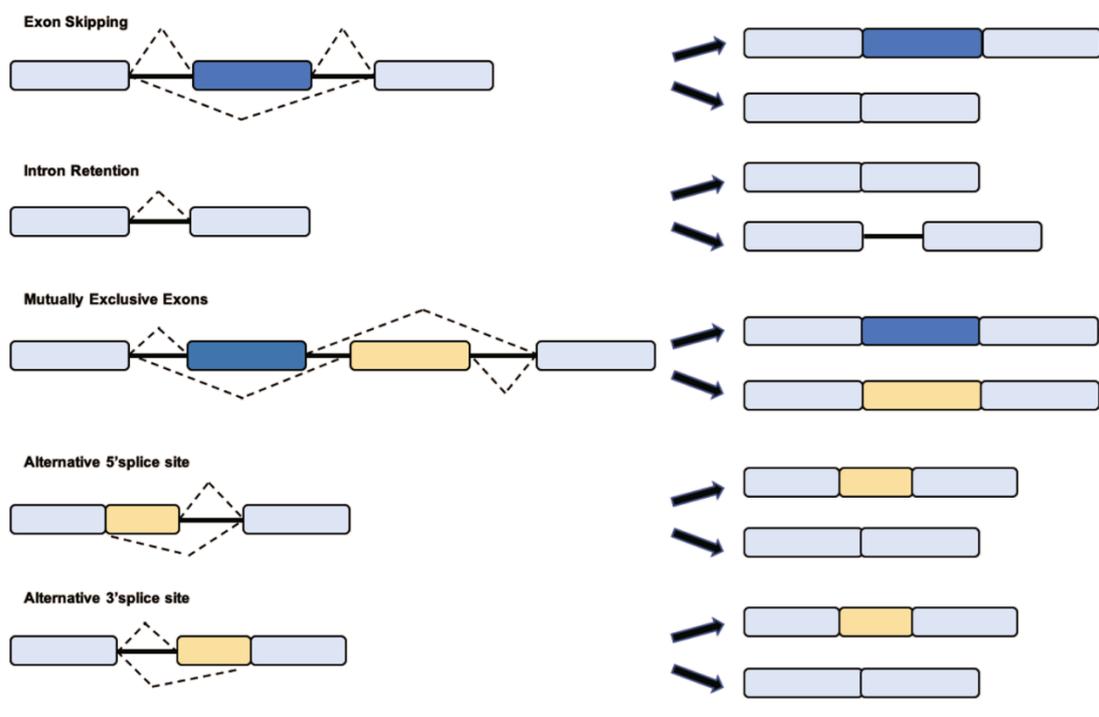


Figure 3 : Les principaux types d'épissage alternatif. Plusieurs événements d'épissage alternatifs différents existent, selon la position des sites d'épissage utilisés. Ces événements sont l'exclusion d'exon entier, la rétention d'intron, l'inclusion d'exons mutuellement exclusifs, ou l'utilisation de 3' ou 5' SS alternatifs menant à l'inclusion ou non d'une partie d'un exon. D'après Zhang et al., 2021.

Les séquences *cis*-régulatrices sont contenues dans les introns et exons, et peuvent affecter positivement ou négativement la reconnaissance des sites d'épissage. Ils sont ainsi nommés selon leur effet et leur localisation sur le transcrit, et forment 4 familles :

- Les éléments introniques activateurs ou ISE (intronic splicing enhancer)
- Les éléments introniques inhibiteurs ou ISS (intronic splicing silencer)
- Les éléments exoniques activateurs ou ESE (exonic splicing enhancer)
- Les éléments exoniques inhibiteurs ou ESS (exonic splicing silencer).

Ces séquences cis-régulatrices sont la cible des facteurs trans-régulateurs de l'épissage. Ces derniers se distribuent en deux grandes familles : les protéines SR (Ser/Arg-rich) activant les sites d'épissage, et les membres de la famille des RNP nucléaires hétérogènes (heterogeneous ribonucleoprotein particle ou hnRNP), inhibant l'utilisation des sites d'épissage (Figure 4).

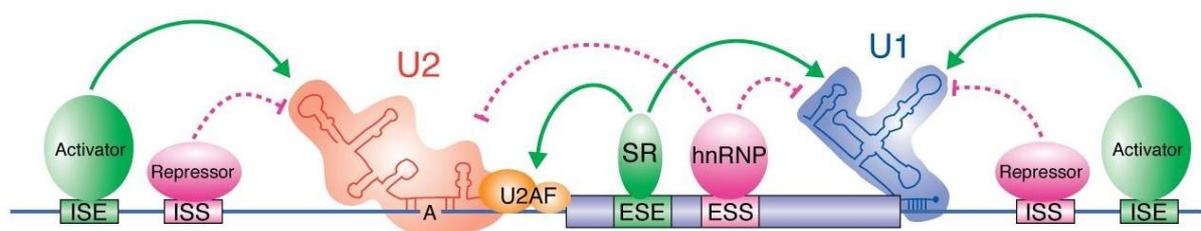


Figure 4 : Schéma représentatif des séquences cis-régulatrices et acteurs trans-régulateurs de l'épissage alternatif. Des séquences cis-régulatrices peuvent influencer les décisions d'épissage alternatif. Ces séquences peuvent être introniques (ISS, ISE) ou exoniques (ESE, ESS) et sont de deux types. Les séquences de type enhancer (ISE et ESE) permettent de recruter des protéines activatrices telles que les protéines SR favorisant le recrutement des snRNP. Les séquences de type silencer (ISS et ESS) recrutent des protéines inhibitrices telles que les hnRNP qui inhibent l'assemblage du spliceosome sur l'ARN. D'après McManus and Graveley, 2011.

ii. Les protéines SR, activateurs de l'épissage

La famille des protéines SR contient des facteurs tels que SF2/ASF (splicing factor 2/alternative splicing factor) ou Sc35 (spliceosomal component 35). Les protéines SR se caractérisent par leur domaine riche en dipeptides arginine et sérine, et par un domaine de fixation à l'ARN (RNA Recognition motif ou RRM) (Long and Caceres, 2008). Elles se fixent sur les sites ISE et ESE et favorisent la reconnaissance des sites d'épissage notamment en stabilisant snRNP U1 au 5'SS et/ou U2AF au 3'SS, ainsi que les interactions protéine-protéine permettant de relier les 5' et 3'SS (Shen et al., 2004). Les protéines SR sont à la fois impliquées dans les processus d'épissage constitutif et alternatif.

iii. Les protéines hnRNP, inhibiteurs de l'épissage

Les hnRNP présentent aussi un domaine RRM permettant la fixation sur les sites ISS et ESS. Les facteurs hnRNP induisent une répression des sites d'épissage. Les mécanismes de cette

répression restent peu décrits, mais impliquent une oligomérisation sur les exons, cachant les sites d'épissage, ou une répression de la fixation des snRNP ([Busch and Hertel, 2012](#)). Outre les processus d'épissage, Les protéines hnRNP sont engagées dans de nombreux autres mécanismes dont la stabilisation des ARNm et les régulations transcriptionnelles et traductionnelles ([Geuens et al., 2016](#)).

iv. Structures secondaires d'ARN et modulation de l'épissage alternatif

Les ARN sont capables de repliements par hybridation intramoléculaire et forment de nombreuses structures secondaires. Les facteurs d'épissage (comme les hnRNP) fixent pour la plupart des séquences monocaténaire d'ARN ([Auweter et al., 2006](#)). Les structures secondaires d'ARN peuvent masquer des motifs cis-régulateurs et affecter la régulation des sites d'épissage par le spliceosome ([Buratti and Baralle, 2004](#); [Warf and Berglund, 2010](#)). Ce processus a été impliqué dans la régulation de l'inclusion de l'exon 3 du gène HGH, où une tige-boucle d'ARN en amont du site 3'SS de l'exon 3 du transcrit HGH masque le site 3'SS alternatif ([Estes et al., 1992](#)). Des mutations déstabilisant ou stabilisant cette structure permet d'induire une augmentation ou une réduction de l'utilisation du site 3'SS, respectivement. Ces structures secondaires d'ARN peuvent être déroulées par des hélicases à ARN, définissant ainsi ces facteurs comme des acteurs majeurs de l'épissage constitutif et alternatif. Nous nous intéresserons ici plus particulièrement aux hélicase de la famille des DEAD-box p68/DDX5 et p72/DDX17.

v. Les hélicases DDX5 et DDX17 et leurs rôles dans le couplage de l'épissage et de la transcription

i. Structure et fonction des hélicases DDX5 et DDX17

Les hélicases DDX5 et DDX17 sont deux hélicases paralogues, appartenant à la famille des hélicases à domaine DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) leur conférant une activité hélicase dépendante de l'ATP ([Bourgeois et al., 2016](#)). Ces deux hélicases partagent un domaine ATPase et hélicase très conservé, ayant plus de 90 % d'homologie entre elles, mais présentent des extrémité N- et C-terminales divergentes ([Giraud et al., 2018](#)). Ces deux hélicases sont retrouvées exprimées

de façon ubiquitaire, bien que leur expression puisse varier lors du processus de différenciation neuronale (Dardenne et al., 2014; Lambert et al., 2018). Ces hélicases jouent un rôle dans de nombreux processus des ARN, dont le contrôle des microARN. Ces hélicases sont aussi impliquées à la fois dans la régulation transcriptionnelle et l'épissage alternatif, et notamment dans le couplage entre ces deux processus.

ii. Régulation de l'épissage alternatif par DDX5 et DDX17

Les hélicases DDX5 et DDX17 jouent un rôle dans la modulation de l'épissage alternatif, via la déstructuration de structures secondaires qui masquent des sites d'épissage ou des éléments cis-régulateurs (Camats et al., 2008; Höning et al., 2002). Par exemple, p68/DDX5, dans le cas de l'exon 10 du transcrit Tau, est recrutée par le facteur d'épissage RBM4 (se fixant sur un ISE), et déroule une structure en tige-boucle au niveau du site de fixation du snRNP U1 en aval de l'exon 10 (Figure 5). La déstructuration de cette tige boucle par p68/DDX5 permet ainsi la fixation de U1 snRNP et l'inclusion de l'exon 10, dont des défauts d'épissage sont impliqués dans des Tauopathies (Kar et al., 2011). Cette régulation est dépendante de l'activité ATPase de p68/DDX5, car un mutant déficient en activité ATPase induit une exclusion de l'exon 10. Outre son implication dans l'épissage alternatif, p68/DDX5 est également impliqué dans la réaction canonique d'épissage, en permettant la dissociation de l'U1 snRNA du site 5'SS, de façon dépendante de son activité ATPase (C. Lin et al., 2005).

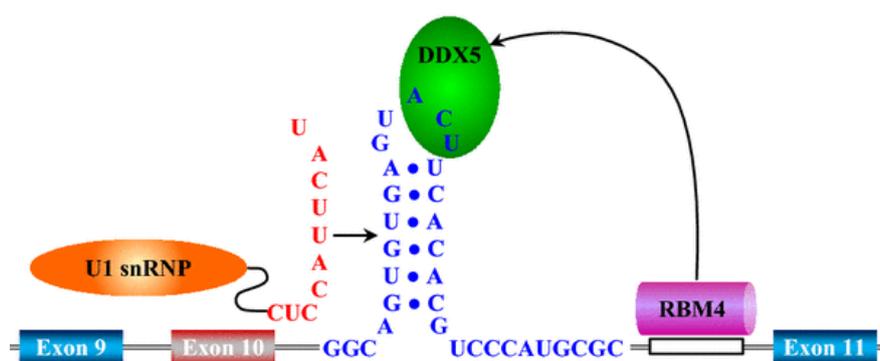


Figure 5 : Épissage alternatif de l'exon 10 de Tau par DDX5. La présence d'une structure secondaire au niveau du 5'SS de l'intron 10 de Tau empêche la reconnaissance du 5'SS par U1 snRNP, induisant l'exclusion de l'exon 10. Le recrutement de DDX5 par RBM4, permet de déstructurer cette boucle grâce à son activité hélicase, rendant accessible le 5'SS et permettant l'inclusion de l'exon 10. D'après Ramanoukaya and Grinev, 2017.

c. Couplage entre transcription et épissage alternatif

Il est dorénavant bien établi que, contrairement aux premiers modèles proposés, les étapes de maturation des pré-ARNm ne sont pas réalisées de manière séquentielle après la synthèse du pré-ARNm, mais de manière concomitante à sa transcription. On parle de procédés co-transcriptionnels qui sont mis en place pour la régulation de la coiffe 5', l'épissage, et la polyadénylation.

La première démonstration *in vivo* de ce mécanisme co-transcriptionnel de l'épissage a été faite lors d'expériences de microscopie électronique avec des ARN naissants d'embryons de drosophiles, où il a été observé une excision d'un intron avant la transcription de l'intron localisé en aval ([Beyer and Osheim, 1988](#)). Cette même étude a montré par ailleurs que certains transcrits naissant subissent également une exclusion d'exon, indiquant que ce processus de couplage avec la transcription concerne également les mécanismes de régulation de l'épissage alternatif. Toujours chez la drosophile, des expériences de séquençage à haut débit d'ARN naissants ont également pu démontrer qu'une vaste majorité (87 %) des introns sont épissés préférentiellement de manière co-transcriptionnelle, et que la longueur et la position des introns influencent leur degré d'épissage ([Khodor et al., 2011](#)). Par la suite, ces mécanismes ont pu être confirmés chez l'homme dans des cellules de cerveau et de foie ([Ameur et al., 2011](#)). Cependant, certains ARNs peuvent présenter des introns après leur transcription, qui ne seront épissés que de manière post-transcriptionnelle. C'est notamment le cas lorsque des structures secondaires fortes masquent des sites d'épissage ([Vargas et al., 2011](#)).

Un couplage entre transcription et épissage alternatif suggère que ces deux phénomènes peuvent s'influencer l'un l'autre. En effet, des éléments clés de la régulation transcriptionnelle tels que la structure du promoteur, des facteurs de transcription ou de remodelage de la chromatine, sont capable d'influencer les décisions d'épissage ([Kornblihtt et al., 2013](#)). De la même manière, certaines protéines décrites initialement comme des facteurs d'épissage peuvent exercer un rôle sur la transcription. Deux modèles, qui ne sont pas mutuellement exclusifs, ont été proposés afin d'expliquer le couplage étroit entre épissage alternatif et

transcription : les modèles de couplage par recrutement, et le modèle de couplage par cinétique d'élongation de la transcription.

i. Modèle de recrutement

Le modèle de couplage par recrutement repose sur la capacité de la machinerie de transcription à recruter des facteurs allant affecter les décisions d'épissage. Ainsi, l'ARN polymérase II (ARNPII) apparaît comme l'acteur majeur de ce modèle, notamment via son domaine C-terminal (C-terminal domain ou CTD) qui, chez l'homme, est composé de 52 répétitions de l'heptapeptide Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser. Plus particulièrement, les Sérines 2 et 5 sont des cibles de phosphorylations qui régulent l'initiation et l'élongation productive de la transcription par l'ARNPII ([Phatnani and Greenleaf, 2006](#)).

Le CTD exerce un rôle central dans le couplage de la transcription et des mécanismes de maturation des ARN. Il a été montré qu'une troncature du CTD engendre une inhibition du coiffage, de l'épissage et du clivage et polyadénylation ([McCracken et al., 1997](#)), ([Fong and Bentley, 2001](#)). Par ailleurs, une inhibition de la phosphorylation du CTD par le DRB (5,6-Dichlorobenzimidazole 1-β-D-Ribofuranoside) permet d'inhiber l'épissage co-transcriptionnel dans les ovocytes du xénope ([Bird et al., 2004](#)). De nombreux facteurs d'épissage comme les protéines SR ou U1snRNP, interagissent avec le CTD ([Das et al., 2007](#)). L'ARNPII joue ainsi le rôle de plateforme de recrutement pour des facteurs d'épissage, modulant ainsi l'épissage alternatif. Dans le modèle de minigène utilisant le domaine fibronectin extra domain I (EDI), il a été montré que le recrutement de SRp20 (SRSF3) au niveau du CTD permet d'induire l'exclusion de l'EDI, tandis que l'utilisation d'une ARNPII dépourvue de CTD, et donc incapable d'interagir avec SRp20, induit une inclusion de l'EDI (Figure 6) ([de la Mata and Kornblihtt, 2006](#)).

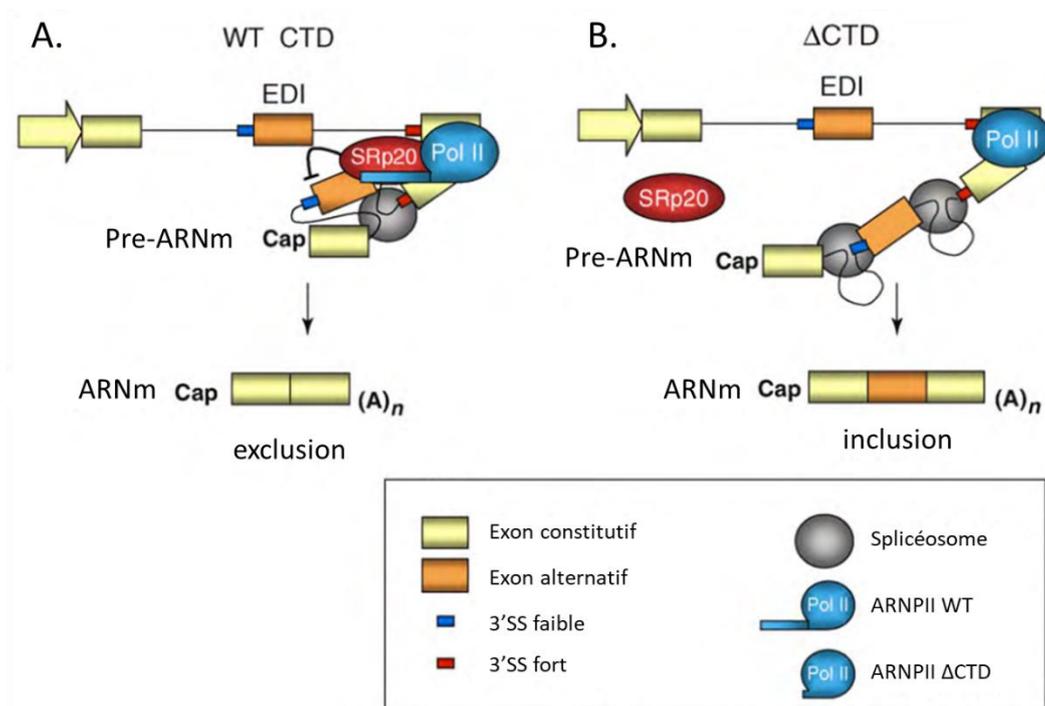


Figure 6 : Exemple de modèle de recrutement. A. Dans un contexte wild-type, l'ARN polymérase II, via son CTD, permet de recruter la protéine SR SRp20, qui va induire l'exclusion de l'exon EDI de la fibronectine en inhibant le recrutement du splicéosome. B. Une polymérase présentant une troncature du CTD n'est plus capable d'interagir avec SRp20, et induira donc un plus grand niveau d'inclusion de l'EDI. D'après Muñoz et al., 2010.

Un second exemple intéressant est le rôle du complexe Médiateur, acteur majeur dans la régulation de la transcription. Une de ses sous-unité, MED23, joue un rôle dans l'épissage alternatif, via son interaction avec des facteurs d'épissage notamment hnRNP L (dont l'interaction est validée *in vitro* et *in vivo*), dont le niveau d'occupation au niveaux d'exons régulés est modulé par MED23. De façon intéressante, leurs données de spectrométrie de masse ont permis d'identifier d'autres facteurs d'épissage dont DDX17 ou encore hnRNP H1 (Huang et al., 2012).

L'état de phosphorylation du CTD permet de moduler le recrutement des facteurs transrégulateurs de l'épissage alternatif. La forme hyperphosphorylée de l'ARNPII interagit *in vitro* avec des facteurs d'épissage snRNP et SR (Mortillaro et al., 1996). En particulier, la forme Ser5P (phosphorylation en Sérine 5) du CTD, interagit spécifiquement avec des composants du splicéosome, dont les snRNA U1, U2, U4 et U5, les protéines Sm, U1 et U2 snRNP (Nojima et al., 2018). Une ARNPII modifiée de telle sorte que la Ser2 du CTD n'est pas phosphorylable a

été montrée incapable de recruter les facteurs UAF65 et le snRNA U2, et en conséquence induit des défauts d'épissage du gène C-FOS (Gu et al., 2013).

Cette influence de la transcription sur les décisions d'épissage est également réciproque selon ce modèle. En effet, le recrutement de facteurs d'épissage par le CTD peut influencer la transcription (Fong and Zhou, 2001). Une déplétion du facteur Sc35 induit une accumulation d'ARNPII au niveau des corps des gènes, suggérant une pause de cette dernière (Lin et al., 2008). Cette accumulation est associée à une diminution de l'interaction entre le CTD et P-TEFb (complexe catalysant la phosphorylation du CTD en Sérine 2 afin d'induire une élongation productive), et donc également à une diminution de Ser2P. Ces données suggèrent que le facteur d'épissage Sc35 joue donc un rôle dans la transcription, en promouvant l'interaction entre P-TEFb et le CTD, afin de stimuler l'élongation.

ii. Modèle cinétique

Le second modèle de couplage entre transcription et épissage repose sur la vitesse d'élongation de l'ARNPII. Selon ce modèle, la cinétique d'élongation régit l'épissage alternatif en modulant la vitesse à laquelle les sites d'épissages et leurs séquences régulatrices apparaissent sur le transcrit naissant durant l'élongation de l'ARNPII (Figure 7). Une polymérase lente favorisera l'inclusion d'exons alternatifs, tandis qu'une élongation rapide induira leur exclusion (Fong et al., 2014). Il est proposé qu'une élongation lente permet d'agrandir la fenêtre temporelle durant laquelle des séquences d'épissages faibles peuvent être mieux reconnues et utilisées par le splicéosome. Dans ce contexte, un exon défini par des sites d'épissage faibles sera sélectionné et inclus dans l'ARNm lors d'un ralentissement ou d'une pause de l'ARNPII. Au contraire, une élongation rapide diminuera cette fenêtre temporelle, car des séquences plus fortes situées en aval seront reconnues plus rapidement, et le splicéosome favorisera alors l'utilisation de ces sites plus forts, induisant une exclusion de l'exon faible.

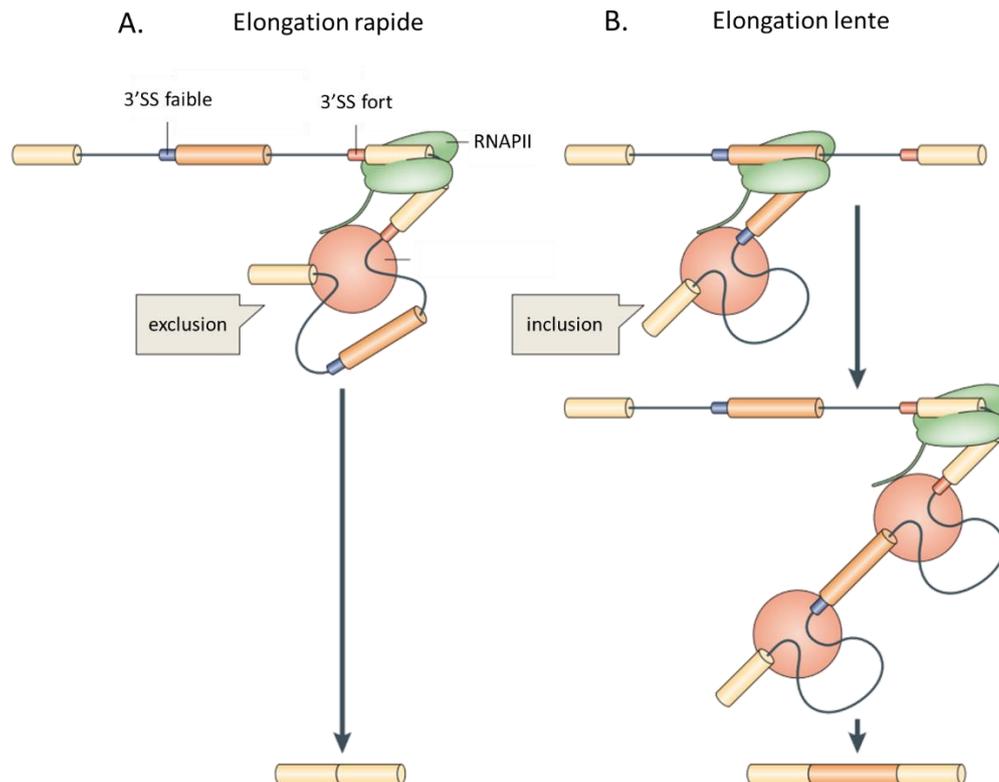


Figure 7 : Modèle cinétique de l'épissage alternatif. A. Lors de la transcription par l'ARN polymérase II, une vitesse d'élongation rapide va favoriser l'inclusion d'un exon en aval portant un site 3'SS plus fort que l'exon en amont, induisant l'exclusion de l'exon portant un 3'SS faible. B. Une vitesse d'élongation faible permet de laisser plus de temps pour recruter les composants du splicéosome avant que le site 3'SS fort en aval soit transcrit et reconnu par le splicéosome. Dans ce contexte, un exon portant un site 3'SS faible sera alors inclus. D'après Kornblihtt et al., 2013.

En utilisant l'exemple de l'EDI mentionné plus haut, il a été démontré qu'une mutation de l'ARNPII menant à une transcription plus lente (mutant C4), induit une augmentation du taux d'inclusion d'EDI, et de l'exon 18 de *NCAM* (de la Mata et al., 2003; Schor et al., 2009). De la même façon, une inhibition de l'élongation par une drogue (le DRB) permet une plus forte inclusion d'EDI (Nogues et al., 2002). Cette observation a également été faite à l'échelle génomique dans des cellules T lymphoïdes (Jurkat), de même qu'avec une autre drogue interférant avec l'élongation de l'ARNPII, la camptothécine (Ip et al., 2011). Au niveau de l'exon 5 du gène *CD45*, il a été montré qu'une pause de l'ARNPII induite par la fixation du facteur CTCF, agissant comme une barrière transcriptionnelle, permet l'inclusion de cet exon faible (Shukla et al., 2011). De façon inverse, une stimulation de l'élongation par l'enhancer SV40 ou le facteur Tat de HIV induisent une exclusion de l'EDI.

Outre CTCF, la sous unité Brm du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF interagit avec les composants du spliceosome U1 et U5 (Batsché et al., 2006). Notamment, Brm interagit avec le facteur Sam68 pour induire un épissage alternatif de l'exon v5 du gène *CD44*. Cet épissage est associé à une accumulation de l'ARNPII-Ser5P, signant une pause transcriptionnelle au niveau de l'exon variable. Les auteurs suggèrent alors un modèle alliant cinétique et recrutement, où Sam68 se fixe sur l'ARN pour reconnaître une séquence régulatrice recrutant Brm à proximité de l'ARNPII, permettant le recrutement de snRNP et induisant une pause des ARNPII suivantes, favorisant l'inclusion de l'exon v5. Ce modèle propose que la modification de la structure de la chromatine, comme dans le cas d'une relaxation des nucléosomes, peut influencer les décisions d'épissage en modulant la cinétique d'élongation. Par exemple, lors de la dépolarisation de cellules neuronales, l'exon 18 du gène *NCAM* est exclu (Schor et al., 2009). Les auteurs démontrent que cet événement est lié à une hyperacétylation des histones et une décondensation de la chromatine permettant une vitesse d'élongation accrue.

La réciproque fonctionnelle, c'est-à-dire un couplage entre épissage et transcription, a également été démontrée (Fong and Zhou, 2001). Par exemple, la déplétion du facteur Sc35 induit une accumulation d'ARNPII aux niveaux des corps des gènes, suggérant une pause de cette dernière (Lin et al., 2008). Cette accumulation est associée à une diminution de l'interaction entre le CTD et P-TEFb (un facteur d'élongation transcriptionnelle impliqué dans la phosphorylation de la Ser2 du CTD), et donc également à une diminution de Ser2P. Ces données suggèrent que le facteur d'épissage Sc35 influence la cinétique de transcription, en favorisant l'interaction entre P-TEFb et le CTD, afin de stimuler l'élongation de l'ARNPII.

iii. Exemple du couplage entre transcription et épissage par les hélicases DDX5 et DDX17

Les hélicases DDX5 et DDX17 interagissent directement avec l'ARNPII et de nombreux facteurs de transcription comme NF- κ B/p50, Er α , SMAD ou encore STAT3, modulant ainsi leurs fonctions dans la régulation de la transcription (Rossow and Janknecht, 2003). Au niveau de la chromatine, DDX5/17 interagissent aussi avec des facteurs de modification des histones tels que SWI/SNF, CBP/p300, HDAC1, et EHMT2. Par cette voie, DDX5/17 sont capables de moduler

l'acétylation et la méthylation des histones, et donc la régulation de l'expression des gènes. Enfin, DDX5/17 interagissent avec le facteur CTCF, régulateur de la transcription (Marino et al., 2019). Ces interactions peuvent reposer sur des ARN non codants (Akhade et al., 2014; Sallam et al., 2018). DDX5/17 ont été décrits en interaction avec le long ARN non codants (lncRNA) SRA, qui à son tour se lie à de nombreux facteurs de transcription comme E α , Notch1, CTCF ou MyoD pour réguler leur activité (Yao et al., 2010). Un exemple est le cas de l'interaction de SRA avec le complexe trithorax (Trithorax group TrxG) et le complexe répressif polycomb 2 (polycomb repressive complex 2 ou PRC2). DDX5/17 améliorent l'interaction entre SRA et TrxG, facilitant la déposition SRA/TrxG-dépendante des marques d'histone activatrices comme H3K4me3 (Wongtrakoongate et al., 2015).

iv. Facteurs de transcription et épissage alternatif

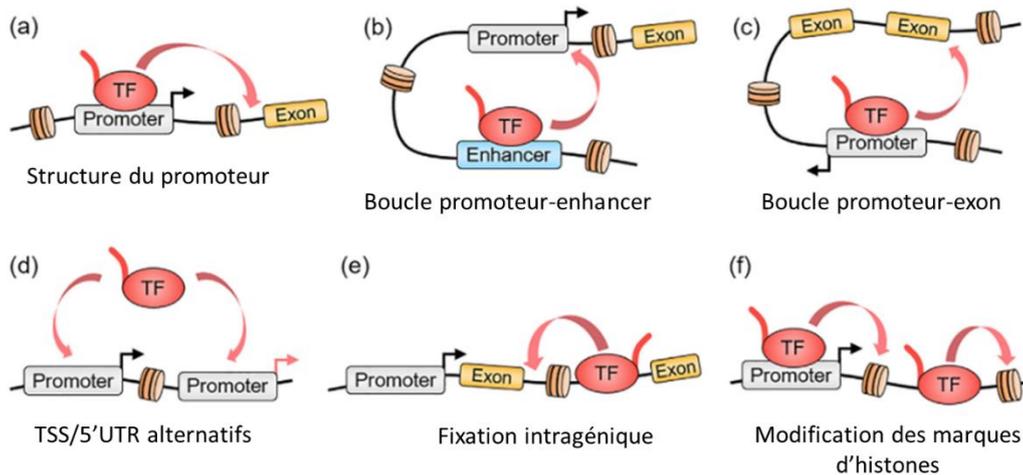
Les facteurs de transcription jouent également un rôle dans la régulation de l'épissage alternatif. Ces régulations peuvent être indirectes et passer par une régulation de l'expression de facteurs d'épissage. C'est par exemple le cas du facteur RUNX1/RUNX1T1, Zfp871 et Nacc1 qui induisent une expression différentielle de facteurs d'épissage, modulant ainsi l'épissage alternatif (Grinev et al., 2021; Han et al., 2017).

De façon intéressante, certains facteurs de transcription semblent jouer un rôle plus direct dans l'épissage alternatif. Chez la levure, il a été montré que le facteur mei4 est capable d'interagir avec l'ARNPII en élongation (phosphorylée en Ser2/Ser5), et de recruter directement les composants du splicéosome sur plusieurs ARN comme *rem1*, permettant leur épissage (Moldón et al., 2008). Chez la drosophile, il a été fait la même observation avec le facteur Ubx qui interagit à la fois avec des RBP et le CTD de l'ARNPII, et permet de médier un épissage alternatif à la fois dépendant de la cinétique d'élongation et du recrutement actif de facteurs d'épissage (Carnesecchi et al., 2021, 2020). De plus, Ubx est retrouvé fixé non seulement aux promoteurs mais également de façon intragénique, suggérant un rôle supplémentaire que celui de recrutement de la machinerie de transcription. Ces deux études argumentent un modèle où les facteurs de transcription seraient recrutés au promoteur, mais via leur interaction avec l'ARNPII pourraient « traverser » le gène avec l'ARNPII et ainsi recruter le splicéosome sur les exons cibles. Le facteur de transcription FBI-1, en interagissant avec Sam68, permet d'inhiber sa fixation sur l'ARN de BCL-X, favorisent ainsi la forme longue anti-

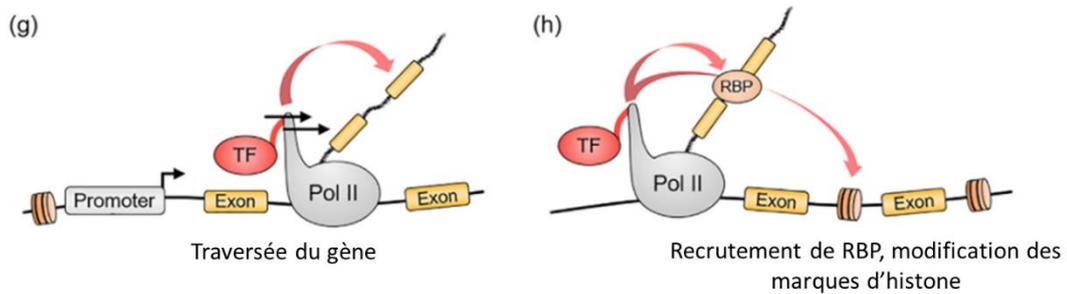
apoptotique BCL-XL (Bielli et al., 2014). En revanche, la déplétion de FBI-1 ou l'expression d'un mutant de Sam68 incapable d'interagir avec FBI-1, favorisent la forme courte BCL-XS médiée par la fixation de Sam68 sur l'ARN. Egalement, le facteur de transcription oncogène c-myc induit une inclusion de l'exon 3 de Sam68 en se fixant au promoteur du gène et en induisant une élongation rapide de l'ARNPII, qui s'accompagne d'une faible fixation de hnRNPF (Caggiano et al., 2019). En revanche, une déplétion de c-myc induit une baisse de la cinétique d'élongation de l'ARNPII et un recrutement plus important de hnRNPF, permettant d'induire l'exclusion de l'exon 3 de Sam68. Ces études récentes suggèrent ainsi que les facteurs de transcription sont capables d'exercer un rôle supplémentaire que leur régulation de la transcription. En effet, que ce soit par une modulation de la cinétique de transcription, ou par le recrutement de facteurs d'épissage, différents mécanismes semblent être employés par les facteurs de transcription afin de réguler l'épissage alternatif (Figure 8).

Outre ces effets sur la machinerie de transcription, toutes les composantes de la structure de la chromatine, à l'échelle du gène ou de l'espace tridimensionnel du noyau, semblent impliquées dans la régulation de l'épissage alternatif. Ces points seront l'objet des deux prochaines parties.

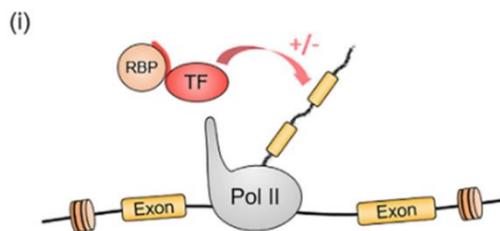
Fixation à l'ADN



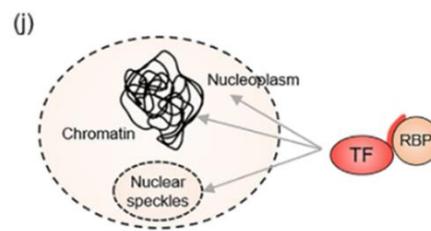
Interaction avec l'ARNPII



Interaction avec des RBP



Localisation



Fixation à l'ARN

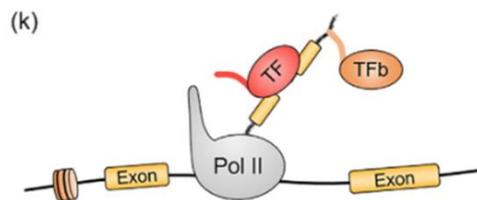


Figure 8 : modèles d'implication des facteurs de transcription. (a) Les facteurs d'épissage peuvent moduler les décisions d'épissage alternatif via leur seule fixation au promoteur. (b,c) La fixation de facteurs de transcription sur les promoteurs ou enhanceurs peut stimuler l'épissage alternatif via la formation de boucle de chromatine. (d) La fixation des facteurs de transcription peut influencer la nature des ARNm via la sélection de TSS ou de promoteur alternatif. (e) La fixation intragénique des facteurs de transcription peut directement altérer l'épissage alternatif. (f) La fixation des facteurs de transcription peut altérer l'épissage alternatif par un remodelage de la chromatine. (g) L'interaction des facteurs de transcription avec l'ARNPII au promoteur permet leur traversée sur les gènes, et d'influencer directement l'épissage. (h) L'interaction des facteurs de transcription avec l'ARNPII peut permettre le recrutement de facteurs d'épissage ou le remodelage de la chromatine influençant l'épissage alternatif. (i) Les facteurs de transcription peuvent directement interagir avec des RBP dans divers afin de réguler leur recrutement et leur fonction sur l'épissage alternatif. (j) Les facteurs de transcription peuvent moduler la localisation subnucléaire de RBP régulant ainsi leurs fonctions. (k) Les facteurs de transcription peuvent également réguler l'épissage alternatif en interagissant avec l'ARN naissant. D'après Boumpas et al., 2023.

2. Organisation linéaire de la chromatine et impact sur l'expression des gènes

a. Nucléosome : l'unité de base de la chromatine

La chromatine est un assemblage nucléoprotéique complexe, composé d'ADN génomique, d'ARN, et de protéines (histone et non-histones). Dans une cellule eucaryote, l'ADN génomique est habillé d'octamères d'histones autour desquels s'enroule des unités de base de l'organisation de la chromatine appelées nucléosomes ([Luger et al., 1997](#)). Ces structures nucléoprotéiques découvertes par Albrecht Kossel en 1884 se replient les unes sur les autres pour former des fibres de 30 nm de diamètre, puis des structures de différentes échelles qui permettent d'assurer la compaction de près de deux mètres d'ADN au sein d'un noyau d'une dizaine de μm de diamètre. Outre ces effets de structuration de l'ADN, les nucléosomes jouent un rôle de plateforme mise en jeu dans le recrutement de nombreux facteurs de régulation de l'expression des gènes ou de la réplication de l'ADN.

Le nucléosome est un complexe formé d'une séquence d'ADN de 147 pb en moyenne et de deux copies respectives des histones H2A, H2B, H3 et H4 ([Figure 9](#)). L'histone H1 maintient quant à elle l'ADN enroulé sur le nucléosome ([McGinty and Tan, 2015](#)). La formation des nucléosomes, c'est-à-dire l'interaction de l'ADN nu avec les histones, s'opère au cours de la réplication. Les histones présentent des extrémités N- et C-terminales non structurées, qui émanent du cœur du nucléosome. Exposées au solvant, elles constituent des cibles de nombreuses modifications post-traductionnelles (PTM, pour post translational modifications) permettant la régulation fine de la structure de la chromatine et de l'expression des gènes.

b. Histones PTM, impact sur la chromatine et la transcription

i. Remodelage de la chromatine, une nécessité pour la régulation des gènes

De par le rôle de compaction du génome, les nucléosomes sont un obstacle à l'accessibilité des séquences de régulations. Des facteurs de remodelage des histones permettent de lever ces obstacles. Quatre grandes familles de remodeleurs sont aujourd'hui définies : switch/sucrose nonfermentable (SWI/SNF), imitation switch (ISWI), chromodomain-helicase-DNA-binding protein (CHD), et inositol-requiring 80 (INO80) ([Saha et al., 2006](#)). Ces facteurs comportent tous un domaine ATPase qui permet de réguler le dépôt, le positionnement, l'éviction, et la composition des nucléosomes. Ces complexes sont engagés dans divers mécanismes, comme par exemple la réparation de l'ADN pour les facteurs du complexe INO80 ou l'assemblage de la chromatine lors de la réplication de l'ADN avec le complexe ISWI ([Collins et al., 2002](#); [Fyodorov and Kadonaga, 2002](#)). Les facteurs du complexe SWI/SNF sont recrutés sur des histones arborant des lysines acétylées, notamment au niveau des promoteurs ([Singh et al., 2007](#)), et permettent la translocation et l'éviction des nucléosomes, rendant l'ADN accessible à la machinerie transcriptionnelle.

ii. Histones PTM et impact sur l'état de la chromatine

Initialement, la chromatine fut divisée en deux états : l'euchromatine, présentant une chromatine décondensée, accessible et présentant un niveau de transcription élevé, et l'hétérochromatine, une forme plus condensée et présentant un faible niveau de transcription. Ces deux états de la chromatine sont réversibles et interchangeables via des modifications épigénétiques. Une des régulations majeures de la structure et de l'état de la chromatine réside dans la modulation des marques apposées sur les histones. Leurs extrémités N- et C-terminales sont la cible de nombreuses modifications covalentes post-traductionnelles. L'ensemble de ces modifications, et leur combinaison, permettent de définir un « code chromatinien » qui, lu par divers facteurs, peut définir des événements fonctionnels localisés ([Strahl and Allis, 2000](#)). Il existe une myriade de PTM des histones dont la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation, et l'ubiquitylation, la sumoylation, qui sont les plus étudiées, mais également d'autres modifications plus récemment identifiées telles que la butyrylation,

ou encore la crotonylation (Figure 9). Seuls seront abordés plus après les mécanismes et l'impact fonctionnel des acétylations et méthylations des histones. En dehors des PTM, il est à noter que certaines histones comportent également des variants qui participent à la régulation fine de la chromatine (Henikoff and Smith, 2015). Il existe des variants d'histone pour H1, H2A, H2B, H3 ainsi que H4, et ces variants peuvent être déposés sur la chromatine de façon réplication-indépendante, en remplaçant les histones évincées. Par exemple, le variant de H2A, H2A.X, comporte un motif phosphorylable en C-terminal, qui une fois phosphorylé (on parle alors de γ H2A.X) joue un rôle dans le recrutement d'enzymes de réparations aux cassures double brin (Kuo and Yang, 2008). Le variant H3.3 est retrouvé chez de nombreuses espèces comme l'homme, la drosophile, et Arabidopsis. Il remplace H3 au niveau des régions actives transcriptionnellement lors de l'éviction des nucléosomes par l'ARNPII, et, et joue un rôle dans la reprogrammation épigénétique de la lignée germinale (Ooi et al., 2006).

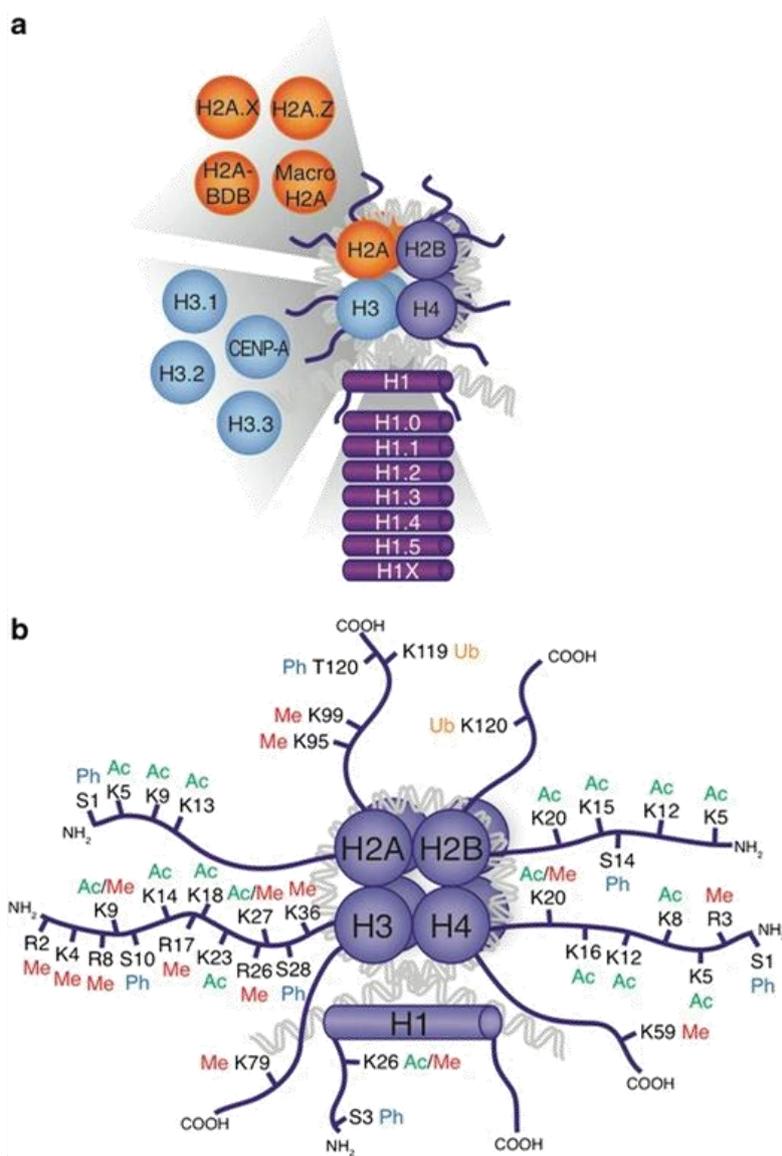


Figure 9 : Composition et modifications post-traductionnelles des nucléosomes. (a) Un nucléosome est canoniquement composé des histones H2A, H2B, H3, H4 et de l'histone linker H1. Les variants d'histones existants sont représentés. (b) Les histones composant les nucléosomes sont la cible de nombreuses modification post-traductionnelle. Les modifications principales déposées sur les extrémités C- et N-terminales sont représentées, ainsi que leurs positions. Ac : acétylation ; Me : méthylation ; Ph : phosphorylation ; Ub : ubiquitinylation. D'après (Zhao et al., 2013).

L'avènement de techniques d'analyse de la chromatine a permis d'établir une carte de la répartition sur le génome des différentes marques d'histone et de leur associer un rôle. Ces analyses reposent principalement sur des données de MNase-seq (MNase digestion followed by high-throughput sequencing), technique permettant l'identification de la distribution des nucléosomes, et de ChIP-seq (Chromatin Immunoprecipitation Sequencing) des marques d'histones, permettant de connaître la distribution de chaque marque d'histone. Les marques et combinaisons de marques portées par les histones permettent de définir des sites fonctionnels spécifiques de la chromatine, comme les promoteurs, enhancers, les régions de

répression transcriptionnelle, les sites de réplication ou les sites de dommage à l'ADN. Le rôle des PTM d'histone est de pouvoir recruter des facteurs spécifiques, appelés « readers », et sont chacune déposées et retirées par des enzymes spécifiques, nommés « writers » et « erasers » respectivement. Ainsi, les acétylations et méthylations d'histones sont déposées par des acétyltransférases/méthyltransférases (HAT/HMT) et retirées par des déacétylases/déméthylases (HDAC/HDM). L'acétylation est la première modification post-traductionnelle des histones découverte en 1963 ([Phillips, 1963](#)). Elle concerne les lysines de la queue N-terminale ([Zentner and Henikoff, 2013](#)) et permet d'affaiblir l'interaction ionique avec la molécule d'ADN (chargée négativement). Elle est donc associée à une chromatine ouverte, offrant une meilleure accessibilité aux facteurs de transcription ([Hong et al., 1993](#)). L'acétylation des histones est reconnue par le facteur BRD4 (bromodomain-containing protein 4), qui active l'ARNPII pour l'élongation transcriptionnelle, montrant un lien direct entre acétylation et transcription ([Devaiah et al., 2012](#)). Il est aujourd'hui bien établi que les régions de la chromatine acétylées sur les Lysines 9 et 27 de l'histone 3 (H3K9ac et H3K27ac respectivement) sont des régions transcriptionnellement actives ([Allfrey et al., 1964](#)), tandis que l'hypo-acétylation des histones s'accompagne d'une répression de la transcription.

L'impact fonctionnel de la méthylation des lysines est plus complexe. Elle peut s'associer à une activation ou une répression de la transcription en fonction de la position du résidu modifié. Contrairement à l'acétylation, la méthylation des histones n'affecte pas leur charge mais elle influence le recrutement de « readers ». La méthylation des Lysines d'histones peut être de type mono-, di- ou tri-méthylés. Certaines marques sont associées à une répression de la chromatine comme la méthylation des Lysines 9, 20 et 27 de l'histone H3 (H3K9me, H3K20me et H3K27m3 respectivement), tandis que les méthylations des Lysines 4, 36 et 79 (H3K4me, H3K36me, H3K79me) sont associées à une activation de la transcription, que ce soit au niveau d'enhancers, de promoteurs ou de corps des gènes ([Gates et al., 2017](#)).

iii. Régulation de l'épissage alternatifs par les histones

La répartition des nucléosomes comporte une répartition génomique non-aléatoire. Des analyses de données de MNase-seq ont pu démontrer notamment un biais de répartition des nucléosomes au sein des gènes chez l'homme, la drosophile et *Caenorhabditis elegans* ([Schwartz et al., 2009](#)). Ainsi, les nucléosomes présentent une occupation plus importante des

bornes des exons (qu'ils soient définis comme exons constitutifs ou alternatif) que des introns. La préférence des histones pour les régions riches en GC peut expliquer en partie cette distribution (Andersson et al., 2009). Il apparaît également que le niveau d'occupation des nucléosomes est inversement proportionnel à la force des sites d'épissage des exons (Tilgner et al., 2009). Le positionnement et l'enrichissement des nucléosomes aux bornes des exons pourrait ainsi favoriser la définition des exons et, notamment au niveau des exons faibles, induire un ralentissement de l'élongation par l'ARNPII en créant un obstacle physique à l'ARNPII, laissant une fenêtre temporelle plus grande au spliceosome pour reconnaître et épisser l'exon (Brodsky et al., 2005). Les niveaux d'occupation des nucléosomes sur les exons, aussi bien que les introns, sont inversement corrélés au niveau de transcription des exons, ce qui est cohérent avec une déplétion globale des nucléosomes dans les régions fortement transcrites. Outre le niveau d'occupation des histones entre les introns et exons, certaines PTM d'histones sont également enrichies au niveau des exons (Kolasinska-Zwierz et al., 2009; Spies et al., 2009). En effet, une étude de la distribution de différentes marques d'histones sur le gène *FGFR2* montre que certaines marques, telles que H3K36me3 et H3K27me3, présentent un enrichissement différent au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse, et coïncident avec un épissage différent des exons IIIb et IIIc (Luco et al., 2010). Notamment, la régulation de l'épissage de *FGFR2* passe par le recrutement de la protéine adaptatrice PTB reconnaissant ces marques, qui va pouvoir à son tour recruter le facteur MRG15 permettant la modulation de l'épissage du gène. Plus récemment, l'utilisation de dérivés du système CRISPR/Cas9 afin d'induire des modifications locales des marques d'histones a pu révéler que les marques H3K27me3 et H3K27Ac sont suffisantes pour induire des changements d'épissage des exons de 2 de *CTNND1* et IIIb/IIIc de *FGFR2* (Segelle et al., 2022). Une étude a également pu observer qu'un sous-groupe d'exons alternatifs arbore des histones avec des PTM habituellement retrouvées au niveau de promoteurs (H3K27ac, H3K4me3, H3K9ac) (Curado et al., 2015)

En considérant que les modèles cinétiques et de recrutement comme régulateurs de l'épissage alternatif ne sont pas mutuellement exclusifs, la distribution des nucléosomes, de même que les marques portées par les histones, permettraient de moduler l'épissage alternatif de façon exon-spécifique. C'est ainsi le cas du gène *CD44*, gène modèle de l'étude de l'épissage alternatif, comportant un cluster d'exons variables. Il a été observé que ces exons variables

comportent un enrichissement en H3K9me3 de façon cellule-spécifique, ce qui induit une accumulation de l'ARNPII, suggérant son ralentissement et ainsi favorisant l'inclusion de ces exons alternatifs (Saint-André et al., 2011). L'analyse computationnelle de diverses marques d'histones par CHIP-seq et de leur niveau d'enrichissement à différents sites d'épissages (sites accepteurs, donneurs, corps des exons) a également identifié les marques H3K36me3 et H3K4me1 comme les plus significativement associées à des événements d'épissage alternatif (Hu et al., 2017). D'autres études qui ont pu mettre en avant le lien entre les modifications d'histones et des événements d'épissage alternatifs, sont listés dans le tableau ci-dessous.

Modification		Effet sur l'épissage alternatif	Mécanisme (facteurs mis en jeu)	Référence
Méthylation	H3K4me3	Recrutement de facteurs d'épissage pour faciliter l'épissage des pré-mRNA	Interaction avec CHD1 et recrutement de facteurs de splicéosome (U2snRNPs/ protéines SR)	(Sims et al., 2007)
	H3K9me3	Inclusion d'exons variables de CD44, PKN2, TAF4B /	Diminution de la cinétique d'élongation de l'ARNPII (HP1 _v , EHMT1/2, U2AF65) Interaction avec des protéines SR (SRp20, ASF/F2) et HP1	(Saint-André et al., 2011) (Loomis et al., 2009)
	H3K36me3	Répression de l'exon IIIb du gène FGFR2 Epissage alternatif de SRSF11	Induction de l'épissage d'exons dépendant de PTB via une protéine adaptatrice (MRG15, PTB)	(Luco et al., 2010) (Schor et al., 2009) (Xu et al., 2021)
Acétylation	H3ac, H4ac	Exclusion de l'exon 2 de MCL1 Exclusion de l'exon 25 de FN1	Augmentation de la cinétique d'élongation de l'ARNPII (PCAF, HBO1) Augmentation de la cinétique d'élongation de l'ARNPII (SRp40)	(Khan et al., 2014) (Hnilicová et al., 2011)
	H3K9ac	Exclusion de l'exon 18 de NCAM	/	(Schor et al., 2009)

Tableau 1 : Exemple de modifications post-traductionnelles d'histones reliées à l'épissage.

L'ensemble de ces données suggèrent que l'épissage alternatif est un phénomène intimement lié à la transcription mais également à la structure linéaire de la chromatine. Cependant, dans le noyau, la chromatine s'organise de façon tridimensionnelle, et cette organisation a de nombreuses conséquences transcriptionnelles et co-transcriptionnelles, qui sont discutées dans la partie suivante.

3. Organisation tridimensionnelle de la chromatine et impact sur l'expression des gènes

a. Généralités

Le développement des techniques d'imagerie du génome tels que le DNA-FISH et des outils d'analyse des contacts de la chromatine (Chromosome Conformation Capture ou 3C) ont contribué à l'émergence d'un nouveau champ d'étude de la régulation épigénétique à l'échelle tridimensionnelle (Dekker et al., 2002). Depuis, de nombreuses techniques dérivées du 3C, baptisées techniques « C » (4C, Hi-C, ChIA-PET), ont vu le jour, permettant d'interroger grâce au Hi-C l'organisation simultanée du génome entier à l'échelle du kilobase (Figure 10) (Denker and Laat, 2016). Elles reposent toutes sur l'identification de régions chromatiniennes en contacts l'une de l'autre par un procédé de ligation de proximité de régions génomiques à l'origine distantes à l'échelle cis ou trans-chromosomique (Dekker et al., 2002). Les spécificités de certaines de ces techniques les plus utilisées, telles que les Hi-C et 4C, sont présentées dans la Figure 10 (Denker and Laat, 2016).

Le développement de ces techniques « C » a permis de questionner les interactions et proximités spatiales entre loci, à des échelles de plus en plus résolutive afin de comprendre le repliement local, et global du génome. En effet, l'espace nucléaire n'est pas un amas de protéines et d'acides nucléiques aléatoirement distribué. Il est au contraire un organelle hautement régulé sur le plan structurel, présentant de nombreux compartiments et sous-compartiments chromatiniens à l'échelle inter- et -intra chromosomique (Figure 11). Cette organisation intervient dans la compaction du génome, mais elle semble également jouer un rôle fonctionnel dans la régulation dynamique de la chromatine et dans l'expression des gènes. Notamment, la transcription, longtemps considérée d'un point de vue linéaire comme une polymérase se déplaçant sur une séquence d'ADN statique, apparaît en réalité comme un acteur majeur dans l'organisation tridimensionnelle du génome.

Introduction Organisation tridimensionnelle de la chromatine et impact sur l'expression des gènes

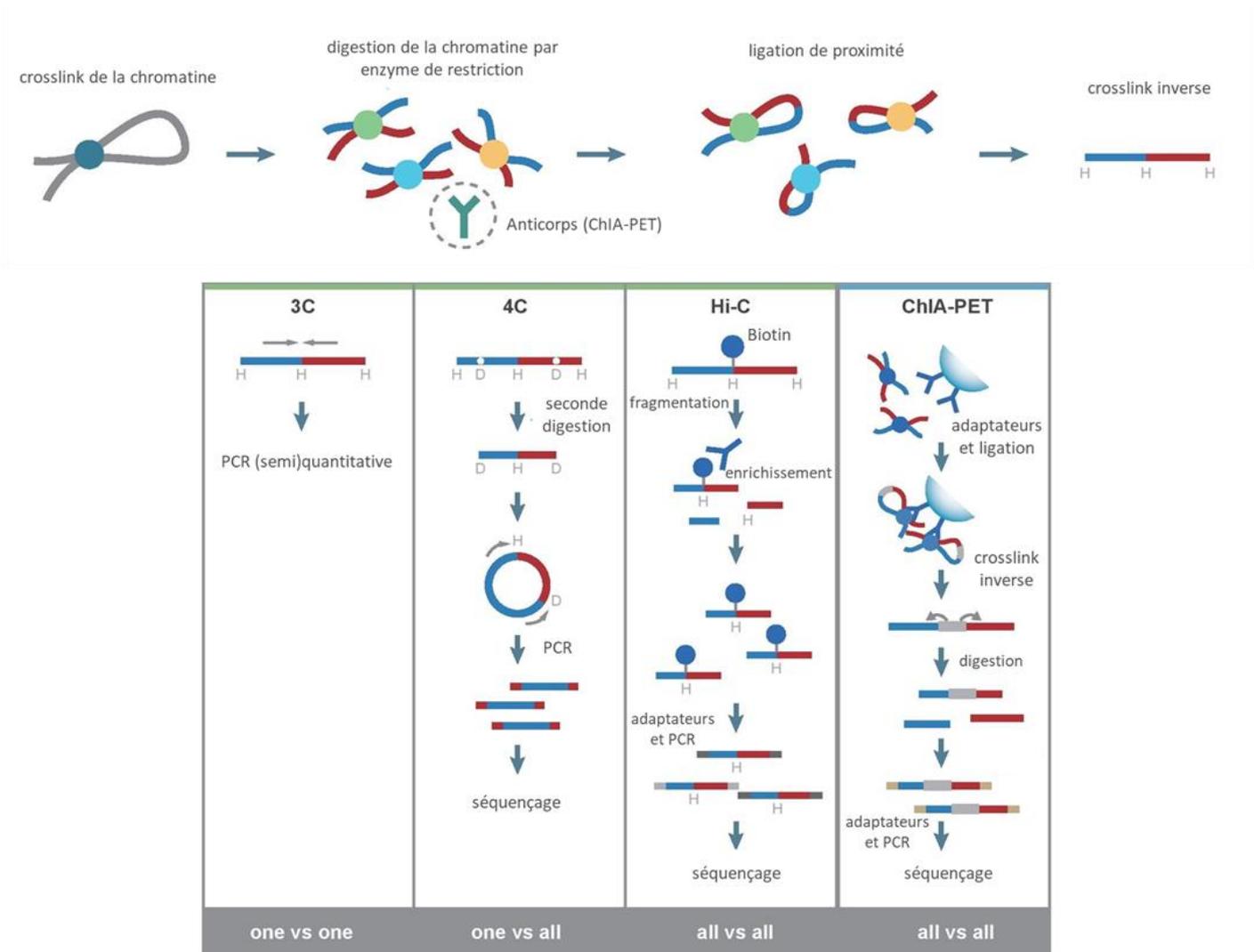


Figure 10 : Schéma des grandes étapes des protocoles des principales techniques C. Les techniques C reposent partagent des étapes premières communes : Les cellules sont fixées (crosslink) grâce au formaldéhyde afin de figer les interactions entre loci distants de chromatine. La chromatine fixée est ensuite fragmentée par une enzyme de restriction (H et D), et dans le cas du ChIA-PET, une étape d'immunoprécipitation est également réalisée. Une étape de ligation de proximité est ensuite réalisée, permettant de favoriser la ligation des fragments cross-linkés (ligation intramolécule au sein du complexe cross-linké) au détriment de la ligation intermolécule par collision aléatoire de deux molécules d'ADN. Une librairie d'ADN chimérique est alors obtenue, témoignant de la fréquence d'interaction entre deux loci d'ADN. Ces interactions peuvent être quantifiées par plusieurs façons. Le 3C (Chromosome Conformation Capture) permet l'amplification spécifique par une paire d'oligonucléotides permet d'interroger l'interaction entre deux locis spécifiques. Le 4C (Circular Chromosome Conformation Capture) utilise un second cycle de digestion et de ligation permettant l'obtention de molécules circularisées. Ces molécules sont amplifiées par PCR-inverse avec des oligonucléotides spécifiques d'une région à questionner. L'ADN amplifié est ensuite séquençé et permet d'obtenir l'ensemble des régions formant des interactions avec cette région d'intérêt, appelé aussi viewpoint. La technique de Hi-C utilise un séquençage haut-débit en paire de tous les fragments après ligation. Les séquences obtenues sont formées de deux séquences correspondant aux deux locis interagissant ensemble. Ces séquences sont alors alignées sur le génome et permettent de définir la fréquence d'interaction entre tous les locis à l'échelle du génome. Le ChIA-PET (Chromatin Interaction Analysis by Paired-End Tag Sequencing) permet de combiner le Hi-C avec le ChIP-seq, via l'immunoprécipitation de la chromatine. Cette technique permet ainsi de caractériser l'ensemble des interactions associées à la fixation d'une protéine d'intérêt.

b. Organisation à différentes échelles

i. Territoires chromosomiques

Les territoires chromosomiques constituent l'échelle la plus large de l'organisation du génome (Figure 11.a). Dans le noyau les chromosomes occupent chacun des domaines distincts, avec peu de contacts inter-chromosomiques à leurs interfaces (Cremer and Cremer, 2010).

ii. Compartiments A et B

Au sein des chromosomes, à l'échelle de quelques mégabases, la chromatine se répartit en deux compartiments principaux, bien que des données récentes suggèrent des sous-compartiments distincts (Rao et al., 2014). Ces deux compartiments A et B, sont définis selon leur préférence d'interaction entre eux (les compartiments A interagissent préférentiellement avec d'autres compartiments A et vice-versa). Ils se définissent par des données de Hi-C en réalisant une analyse par composante principale. Le compartiment A correspond à des domaines majoritairement actifs et enrichi en gènes transcrits et en marques activatrices (H3K27ac, H3K4me3). La chromatine des compartiments A est donc plus ouverte, et se retrouve préférentiellement au centre du noyau (Lieberman-Aiden et al., 2009) (Figure 11.b). A l'inverse, les compartiments B correspondent à des régions de chromatine inactives, plus condensées, associées aux lamines nucléaires et donc à la périphérie du noyau. Contrairement à d'autres niveau d'organisation du noyau comme décrits ci-après, les compartiments A et B ne sont pas aussi conservés et peuvent être cellule-spécifiques (Dixon et al., 2015). Les compartiments A et B peuvent être subdivisés en sous-compartiments, dont le nombre et la définition n'est à ce jour pas totalement établie. Les sous compartiments A1 sont associés à une chromatine très ouverte enrichie en marques activatrices (H3K4me1, H3K36me3, H3K27ac) et en gènes fortement transcrits. Les sous-compartiments B1 et B2 sont quant à eux associés à des marques répressives (comme H3K27me3) et les compartiments B2 et B3 sont associés à la lamine (Liu et al., 2021; Rao et al., 2014)

iii. Domaines d'association topologique

Des domaines structuraux dits domaines d'association topologique (Figure 11.c) (TAD, pour Topologically Associated Domains) sont définis à l'échelle de la Mégabase (entre 40 kb et 3Mb

en moyenne) ([Rao et al., 2014](#)). Les TADs sont délimités par des frontières formant de fortes interactions, majoritairement enrichies en protéines insultrices comme CTCF (CCCTC-binding factor) et protéines du complexe cohésine, deux acteurs majeur de l'organisation du génome ([Dixon et al., 2012](#)). Ces domaines sont relativement conservés à travers les lignées cellulaires et les espèces. Ils forment des structures permettant de confiner les interactions de la chromatine au sein du même TAD, tandis que les interactions entre TADs sont moins fréquentes. La formation de TADs repose principalement sur le modèle d'extrusion de la chromatine. Dans ce modèle, le complexe cohésine (formant une structure en anneau) se fixe à la chromatine et est capable de transloquer une boucle d'ADN, à la manière d'une boucle de corde passée à travers un anneau. Cette boucle d'ADN formée est ensuite extrudée au travers de l'anneau de cohésine, grandissant donc selon l'avancée de l'anneau, jusqu'à la dissociation du complexe, ou jusqu'à rencontrer des sites CTCF. Cependant, ce modèle semble questionné par de récentes études ([Banigan and Mirny, 2020](#); [Pradhan et al., 2022](#)). Selon leurs orientations, le rapprochement des sites CTCF va induire la formation d'un homodimère stable de CTCF, stoppant la cohésine, et délimitera alors le TAD. Cependant certains TADs CTCF-indépendants peuvent être définis selon leur état transcriptionnel, suggérant donc que la transcription elle-même puisse jouer un rôle dans l'organisation du génome ([Rowley and Corces, 2018](#)), pouvant expliquer la présence de certains TADs cellule-spécifique. Dans ce sens, des études ont montrées que certaines bordures de TADs sont dépendantes de l'interaction de CTCF avec des ARNs ([Hansen et al., 2019](#); [Saldaña-Meyer et al., 2019](#)).

Au sein des TADs, de plus petites structures sont observées (à l'échelle sous-mégabase), appelées sub-TAD ([Berlivet et al., 2013](#); [Llères et al., 2019](#); [Phillips-Cremins et al., 2013](#)). Il existe plusieurs types de boucles longues ou courtes distances au sein des TAD (Figure 11.d). En effet des boucles peuvent concerner plusieurs éléments d'un même gène (boucles intragéniques), ou bien des éléments différents (comme boucles enhancer-promoteur) ou entre plusieurs gènes (boucles intergéniques).

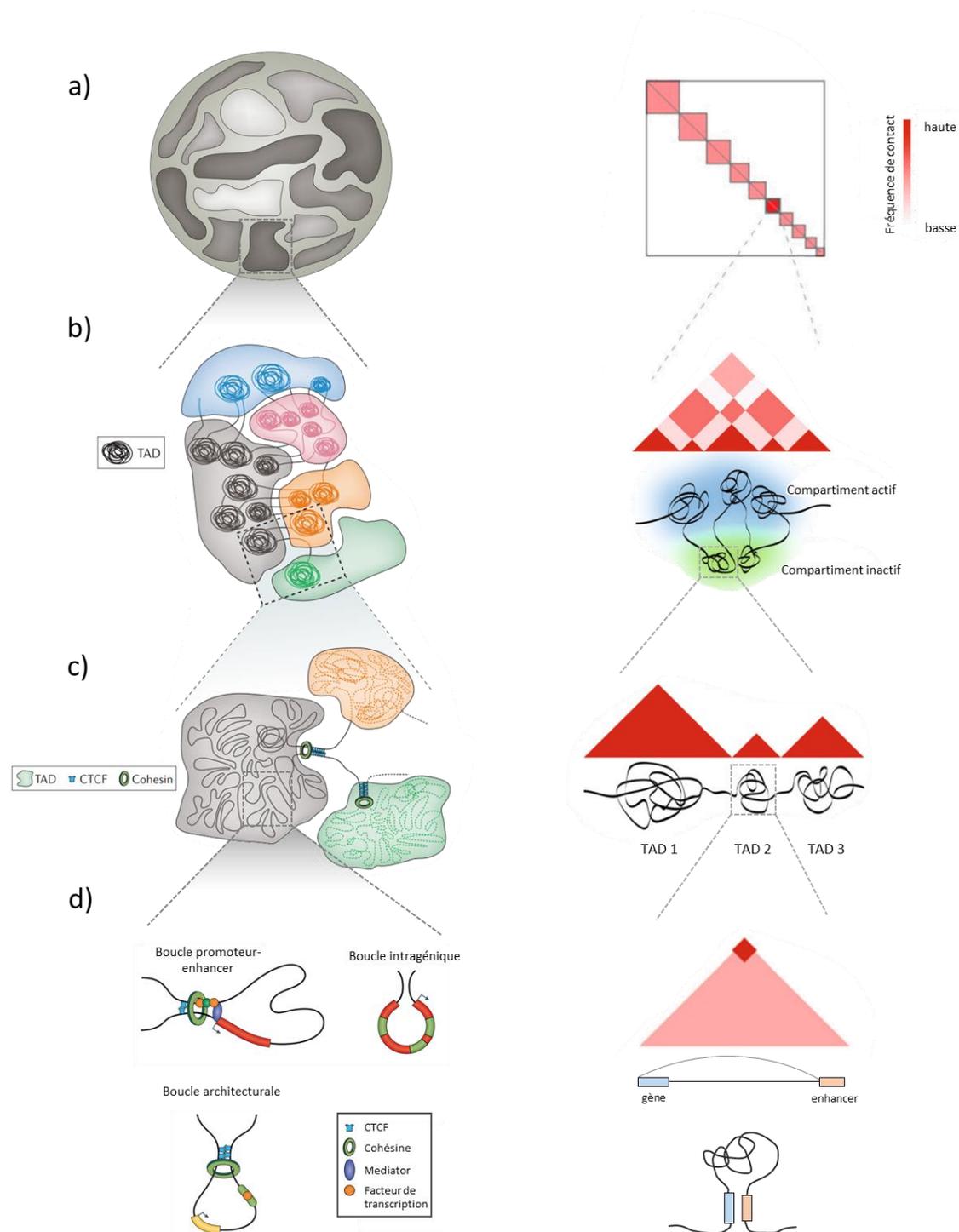


Figure 11 : Organisation du génome à différentes échelles et motifs associés sur les cartes d'interaction de Hi-C. (a) A l'échelle du génome, les chromosomes s'organisent en territoires chromosomiques et forment quelques interactions trans-chromosomiques **(b)** les chromosomes sont composés de compartiments de même nature épigénétique (actifs en bleu et gris; inactifs en vert, orange et rouge), appelés compartiments A et B respectivement. **(c)** A l'échelle de quelques mégabases, la chromatine se ségrège sous forme de TAD, observables sur la carte de Hi-C correspondante (les TAD sont délimités par des lignes noires). Ces TAD peuvent être fonctionnellement enrichis en marques activatrices ou répressives comme indiqué par les représentations des marques d'histones. Les TAD sont bordés par la fixation de CTCF stabilisant des complexes d'extrusion de boucle. **(d)** A l'échelle des kilobases, différentes boucles peuvent exister et mettre en contact différentes régions régulatrices de gènes (promoteur-enhancer, promoteur terminateur) au travers de différents facteurs (tels que CTCF ou le complexe Mediator). D'après Bonev and Cavalli, 2016.

iv. Boucles intragéniques

Des boucles intragéniques entre promoteur et terminateur d'un même gène ont été observées, pouvant participer à l'orientation et au recyclage de l'ARNPII, impactant donc le niveau d'expression des gènes (Ansari and Hampsey, 2005; O'Sullivan et al., 2004; Tan-Wong et al., 2012). Il existe également des boucles intragéniques reliant le promoteur et un exon d'un même gène (Curado et al., 2015; Ruiz-Velasco et al., 2017; Shukla et al., 2011)

v. Boucles de chromatine intergéniques

Au sein des TADs ont lieu de nombreuses interactions longue distance de l'ordre de plusieurs kilobases entre des régions régulatrices de l'expression des gènes. En effet, un TAD permet de mettre en contact des promoteurs et leurs éléments régulateurs en *cis* comme les enhancer, situés parfois à plusieurs kilobases de leurs gènes cibles (Li et al., 2012). Ces éléments régulateurs portent des marques activatrices, dont H3K4Me1 et H3K27Ac, et sont capables de recruter l'ARNPII et d'activer la transcription via la formation du complexe de pré-initiation. La formation de TAD participe à la formation d'un environnement tridimensionnel contraint dans lequel un enhancer va pouvoir diffuser et « trouver » facilement son ou ses promoteurs cibles par la formation de boucles chromatiniennes. La structure des TAD permet également de limiter les contacts d'un enhancer à un seul sous-ensemble de gènes, évitant une diffusion plus large à de nombreux gènes de façon aléatoire, ce qui peut induire une expression incontrôlée de gènes et des dysfonctions pathologiques (Franke et al., 2016; Spielmann et al., 2018).

Un exemple permettant d'illustrer l'importance des TADs dans la régulation de l'expression et les pathologies pouvant en découler concerne une région du chromosome 2. Il a été démontré que cette région est découpée en trois TADs adjacents qui comprennent les gènes *WNT6* et *IHH* (TAD 1), *EPHA4* (TAD 2), et enfin *PAX3* (TAD 3) (Figure 12.a). Des malformations des membres chez l'homme ont été associées à des perturbations de ces bordures de TAD (Lupiáñez et al., 2015). Des analyses de Hi-C et 4C chez des patients et des souris modifiées par CRISPR pour reproduire ces altérations ont permis de montrer que pour le cas de la brachydactylie, une délétion de la séquence de bordure de TAD entre les TAD 2 et 3, aboutit à la formation d'un néo-TAD qui permet l'interaction entre l'enhancer activant le gène *EPHA4* et *PAX3*, induisant la surexpression de *PAX3*, et ainsi la malformation (Figure 12.b). Le syndrome

Introduction Organisation tridimensionnelle de la chromatine et impact sur l'expression des gènes

F (dysplasie acro-pectoro-vertébrale) est quant à lui associé à une inversion au niveau de la bordure entre le TAD 1 et 2, induisant une interaction entre *WNT6* et l'enhancer de *EPHA4*, menant à une surexpression de *WNT6* (Figure 12.c). Enfin, une délétion au niveau de la bordure entre le TAD 1 et 2 est associée à une fusion entre ces deux TADs en un néo-TAD, et à un contact entre l'enhancer de *EPHA4* et *IHH* qui est alors surexprimé, entraînant la polydactylie (Figure 12.c).

Introduction Organisation tridimensionnelle de la chromatine et impact sur l'expression des gènes

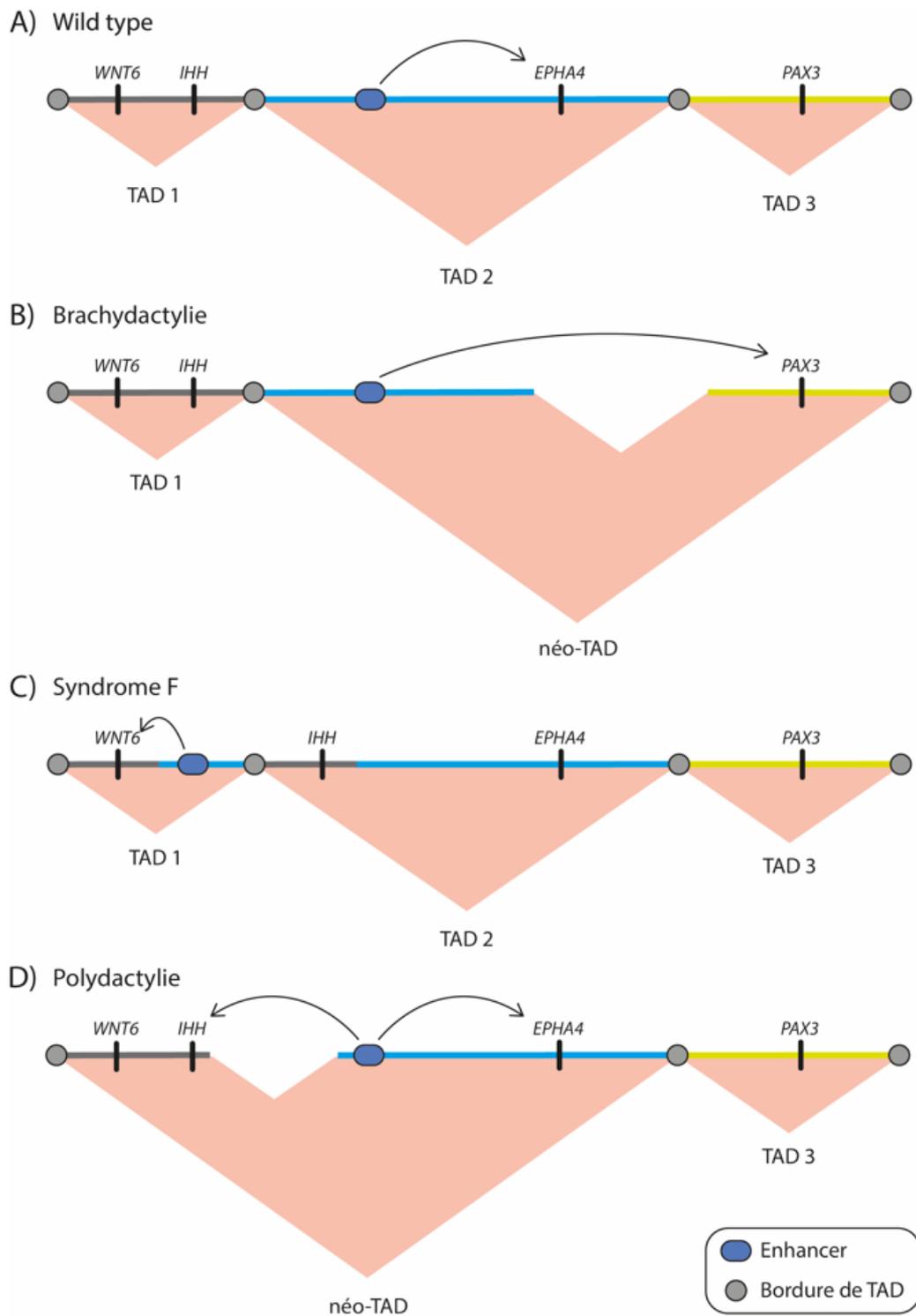


Figure 12 : Schéma des altérations génétiques et de leurs conséquences sur l'organisation du génome et l'expression des gènes WNT6, IHH, EPHA4 et PAX3 dans diverses pathologies. D'après (Lupiáñez et al., 2015).

Ces boucles locales au sein d'un TAD ne sont pas aussi conservées, et elles peuvent varier selon le type cellulaire. C'est le cas notamment du locus control region (LCR) de la β -globine, où un

contact est observé entre un enhancer et ses gènes cibles seulement dans les lignées erythroïdes qui expriment ce gène (Schoenfelder et al., 2010).

vi. Facteurs de transcription et boucles de chromatine

Les boucles d'ADN ne concernent cependant pas seulement les enhancers et promoteurs. Il a été montré que des gènes co-régulés par un même facteur de transcription peuvent interagir physiquement, comme c'est le cas avec les gènes de la β -globine, où le facteur de transcription Klf1 induit les gènes co-régulés, ou encore les facteurs de transcription STAT qui induisent des rapprochements de gènes co-régulés lors de la différenciation des cellules T (Hakim et al., 2013). Récemment, il a été montré que le facteur de transcription EWS/FLI, retrouvé dans les sarcomes d'Ewing, engendre un réarrangement tridimensionnel de la chromatine qui permet de réguler l'expression des gènes cibles (Showpnil et al., 2022).

Cette formation de boucles longue distante par des facteurs de transcription peut être attribuée à plusieurs mécanismes propres aux facteurs de transcription (Figure 13):

- Ces boucles peuvent être formées grâce à la capacité de certaines protéines de fixer deux loci directement. C'est par exemple le cas des facteurs GATA qui dans leur domaine de fixation à l'ADN (DBD) comportent deux doigts de zinc et sont capables de fixer directement deux sites de fixation comme ce fut déterminé pour GATA3 par cristallographie (Chen et al., 2012).
- D'autres facteurs sont capables de former des homodimères, et ainsi de fixer et rapprocher deux loci distants, comme c'est le cas avec CTCF. Les facteurs de transcription peuvent également s'associer pour former des hétérodimères et induire une boucle de chromatine entre deux loci. Un exemple impliquant la voie NF- κ B concerne les facteurs NF- κ B p65 et AP-1/c-Jun. En effet des expériences de ChIP et 3C montrent qu'après stimulation au LPS, les sites de fixation NF- κ B et AP-1 du promoteur du gène de l'ostéopontine (OPN) forment une boucle d'ADN et le gène est exprimé de façon NF- κ B dépendante (Zhao et al., 2011). De même, après stimulation au TNF α , les sites de fixation NF- κ B et AP-1 du promoteur du gène MMP-9 sont fixés par les facteurs p65 et c-Jun, respectivement, et forment une boucle de chromatine, résultant en une augmentation transcriptionnelle du gène (Chen and Chang, 2015).

- Les boucles d'ADN peuvent être également médiées par des protéines adaptatrices ne fixant pas directement l'ADN, mais interagissant avec plusieurs facteurs de transcription. Un exemple de ce type de boucle concerne les neurones sensoriels olfactifs et plus particulièrement les gènes des récepteurs olfactifs. Ces derniers clustérisent en cis- et trans- grâce à la protéine adaptatrice LDB1, qui en interagissant avec le facteur de transcription LHX2 est capable d'induire des boucles de chromatine par dimérisation ([Monahan et al., 2019](#)). Dans ce sens, une manipulation du site d'auto-association de LDB1, en fusion avec des domaines à doigts de zinc spécifiques ciblant le LCR et un gène de globine embryonnaire ont permis de montrer que les deux protéines de fusion dimérisent et induisent une boucle de chromatine entre ces deux sites dans des érythroblastes de souris adultes, permettant ainsi de restaurer l'expression de ce gène ([Deng et al., 2014](#)).
- Enfin, d'autres forces, plus faibles que des interactions spécifiques entre protéines, peuvent médier la formation de boucles de chromatine, via des interactions de faible forces et aspécifiques, au sein de condensats. Ceci comme a récemment été démontré pour le facteur de transcription fusion NUP98-HOXA9 retrouvé dans des leucémies, qui établit des boucles de chromatines via sa capacité à former des condensats ([Ahn et al., 2021](#))

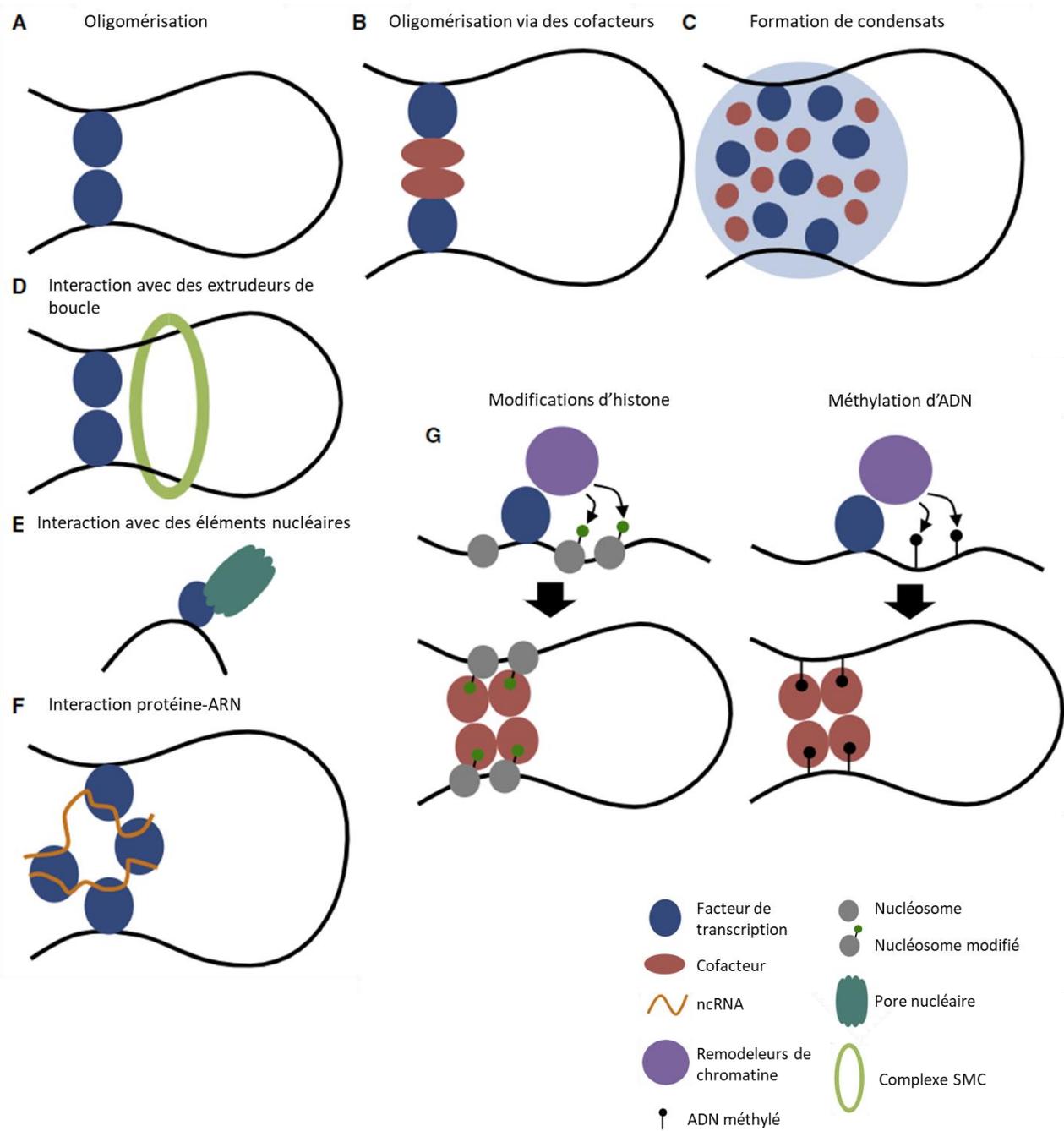


Figure 13 : Schéma des différents modes d'action des facteurs de transcription sur la formation de boucles de chromatine. D'après Kim and Shendure, 2019

Des données récentes, cartographiant la localisation des gènes au sein du noyau, ont pu démontrer que la transcription pourrait jouer un rôle dans l'organisation du génome. En effet, plusieurs observations montrent que les régions fortement exprimés et riches en gènes résident au centre du noyau, à proximité de compartiments nucléaires (Bickmore, 2013; Chen et al., 2018). A l'inverse, des gènes réprimés sont situés en périphérie nucléaire, aux abords de

la lamine, associés à des marques répressives. Ces données suggèrent qu'en plus de l'organisation hiérarchique de la chromatine, l'état de transcription du génome joue un rôle sur cette organisation.

c. Les condensats nucléaires comme acteurs de l'organisation du génome et de l'expression des gènes

De nombreux condensats sans membranes sont présents dans le noyau. Ils peuvent héberger différents processus, comme la biogénèse des ARN ribosomiques pour le nucléole ou l'assemblage de snRNP pour les corps de Cajal (Mao et al., 2011). Ces condensats présentent des propriétés physiques de gouttelettes liquides comme leur capacité de fission ou de fusion de façon dynamique. La formation de ces condensats a été décrite comme répondant aux lois de la transition de phase liquide-liquide (LLPS pour Liquid-Liquid Phase Separation) (Bhat et al., 2021). La LLPS est médiée par des interactions protéine-protéine ou protéine-ARN, multivalentes et de faibles affinités. Les protéines contenant des régions de désordre intrinsèques (IDR) ou de faible complexité structurale sont capables d'engager des interactions aspécifiques avec de nombreux partenaires, ce qui participe à induire ou stabiliser la LLPS. C'est le cas en particulier des hélicases à ARN de type DDX (Hondele et al., 2019; Nott et al., 2015). D'un point de vue fonctionnel, la LLPS aboutit à la formation d'un microenvironnement isolé qui concentre les enzymes, substrats et cofacteurs nécessaires à la régulation de mécanismes fonctionnels. Il a été montré que de nombreuses protéines nucléaires sont en réalité capables de faire de la LLPS.

La chromatine elle-même présente intrinsèquement des caractéristiques propices à la LLPS grâce notamment à l'histone linker H1 qui, sur de la chromatine reconstituée in vitro, induit la formation de gouttelettes (Gibson et al., 2019). La formation de condensats de chromatine est également dépendante des modifications d'histone. En effet, l'hétérochromatine riche en marques répressives comme H3K9me3 est reconnue par le « reader » HP1 α (Heterochromatin protein 1) qui est capable de former des gouttelettes par LLPS, à la fois in vitro et in vivo (Larson et al., 2017; Strom et al., 2017). Ces données suggèrent que la régulation de l'hétérochromatine est en partie médiée par la LLPS, et que cette dernière est une force majeure de l'organisation du génome.

Outre l'hétérochromatine, des régions actives de la chromatine ont été identifiées dans la formation de LLPS, et notamment au niveau de régions riches en enhanceurs. Le régulateur transcriptionnel BRD4, qui reconnaît les histones acétylées H3K27Ac, a été montré impliqué dans la formation de la LLPS via la multivalence de ses bromodomains multiples, qui montrent de façon isolée leur fonction de LLPS (Gibson et al., 2019; Han et al., 2020). Le complexe Mediator, régulateur des enhanceurs et retrouvé co-localisé avec BRD4, apparaît également impliqué dans la LLPS (Sabari et al., 2018). Une étude basée sur de l'imagerie super-résolutive de cellules vivantes a permis de démontrer que les clusters de Mediator et d'ARNPII sont présents sous formes de condensats transitoires, mais également sous forme de larges clusters stables (Cho et al., 2018). Ces clusters sont définis comme condensats selon deux techniques principales utilisées en LLPS : une sensibilité à l'hexanediol et une récupération rapide observée par FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching). Une inhibition de la transcription par le DRB permet d'induire une perte des condensats enrichis en ARNPII mais non en Mediator, suggérant que la LLPS générée par Mediator a lieu en absence d'ARNPII, et précède son recrutement et la transcription au niveau des enhanceurs. La formation et le maintien des condensats associés à Mediator est également médiée par les ARN, et notamment les ARN non codants transcrits à partir d'enhanceur (eRNAs). Selon leur abondance, ceux-ci sont capables d'induire la LLPS, ou au contraire de dissoudre les condensats, soulignant l'importance des interactions ribonucléoprotéiques dans la formation et la stabilité des condensats (Henninger et al., 2021). Les ARN longs non codants (lncRNA) jouent également un rôle dans la formation de séparation de phase (Somasundaram et al., 2022). En effet, en présentant une grande taille et une grande flexibilité, les lncRNA sont capables de former des structures secondaires jouant le rôle de plateforme pour des RBPs et d'autres ARNs. Il a été proposé que la présence de lncRNA dans les condensats influencerait leur degré de viscosité et leur dynamique. Plusieurs études rapportent un lien direct entre l'inhibition d'ARNlnc et le blocage de la formation de condensats (Huo et al., 2020; Lee et al., 2021; Pessina et al., 2019). Le mécanisme de formation de ces structures dynamiques n'est pas entièrement connu, et des arguments contradictoires existent. En effet, il a été démontré qu'après une inhibition courte de la transcription, ces condensats persistent, suggérant un recrutement dynamique des gènes au sein de structures préassemblées plutôt qu'un assemblage sur les gènes, dépendant de leur transcription (Mitchell and Fraser, 2008). Bien que la plupart des études soient réalisées en

utilisant des cellules fixées, ces observations ont également été validées par microscopie in vivo, montrant que les foci d'ARNPII se regroupent et se dissolvent de façon transitoire et dynamique (Cho et al., 2018; Cisse et al., 2013).

Ces données remettent en cause le modèle classique du mécanisme transcriptionnel qui repose sur le chargement d'une polymérase au niveau d'un promoteur et le déplacement de cette même ARNPII le long du gène pour le transcrire. Les travaux de l'équipe de Peter Cook, et d'autres, proposent un modèle revisité dans lequel les condensats riches en ARNPII constitueraient des usines à transcription (transcription factories), où se regrouperaient plusieurs gènes co-régulés (Papantonis and Cook, 2013).

i. Usines à transcription : une compartimentalisation de la transcription

1. Généralités

Au cours des années 1990, plusieurs études basées sur l'incorporation de précurseurs à l'ARN naissant (BrUTP ou de dUTP radiomarqué) ont permis de montrer que la répartition des ARN naissants n'est pas totalement diffuse dans le nucléoplasme, mais comporte des sites discrets où la transcription par l'ARN pol I, II ou III est concentrée (Hozak et al., 1994; Jackson et al., 1993). Cette même observation a été faite avec l'ARNPII, montrant encore une fois une répartition en partie en clusters dans le noyau, impliquant ainsi une transcription dans des sites discrets par l'ARNPII (Iborra et al., 1996; Jackson et al., 1998). Des études et des modèles montrent que l'ARNPII est capable de former des condensats (Cho et al., 2018), et que les PTM présentent sur le CTD permettent d'induire des interactions protéine-protéine et d'augmenter la concentration locale en protéines, induisant la LLPS (Guo et al., 2019; Hnisz et al., 2017). Bien que les trois ARN polymérases forment des usines à transcription, il ne sera discuté ci-après que de celles concernant l'ARNPII qui seront nommées par le terme général d'usines à transcription. Le nombre d'usines à transcription dans le noyau varie entre 200 et environ 10 000 selon les types cellulaires étudiés. Ce sont des complexes multiprotéiques de plusieurs MDa, et d'un diamètre d'environ 90 nm en moyenne (Eskiw et al., 2008). Ces structures reposent sur un cœur protéique dense, contenant en moyenne 8 ARNPII, réparties en périphérie et engagées ou non sur des séquences d'ADN différentes (Martin and Pombo,

2003). Ce modèle propose donc que les polymérases sont retenues dans les usines à transcription, et que les gènes viennent à la rencontre des usines à transcription en diffusant dans le noyau (Figure 14). Ces données suggèrent que lorsqu'un gène rencontre une usine à transcription, il peut y être fixé de façon transitoire. La concentration locale de facteurs de transcription permettrait ainsi de catalyser la réaction de transcription (Sofiadis and Papantonis, 2018). Ainsi, les usines à transcription, et les facteurs de transcription, en se liant à plusieurs régions distantes simultanément, sont des acteurs également de l'organisation tridimensionnelle de la chromatine de façon locale, mais permettent une régulation coordonnée de l'expression de plusieurs gènes (Osborne et al., 2004). Des analyses de ChIA-PET (Chromatin Interaction Analysis by Paired-End Tag Sequencing) de la forme S5P (phosphorylation en Sérine 5) du CTD l'ARNPII, et donc centrée sur les promoteurs, ont montré que les gènes interagissant entre eux présentent des niveaux de transcriptions similaires, soulignant la coopérativité de leur expression au travers de leurs contacts (Li et al., 2012). De plus, la comparaison de données de ChIA-PET dans différentes lignées montrent que les interactions intergéniques entre promoteurs peuvent être spécifiques du type cellulaire, tandis que les gènes de ménage restent regroupés ensemble dans les différents types cellulaires. Ceci suggère la mise en place de programmes spécifiques d'expression des gènes au travers de contacts multigéniques formés par les usines à transcription.

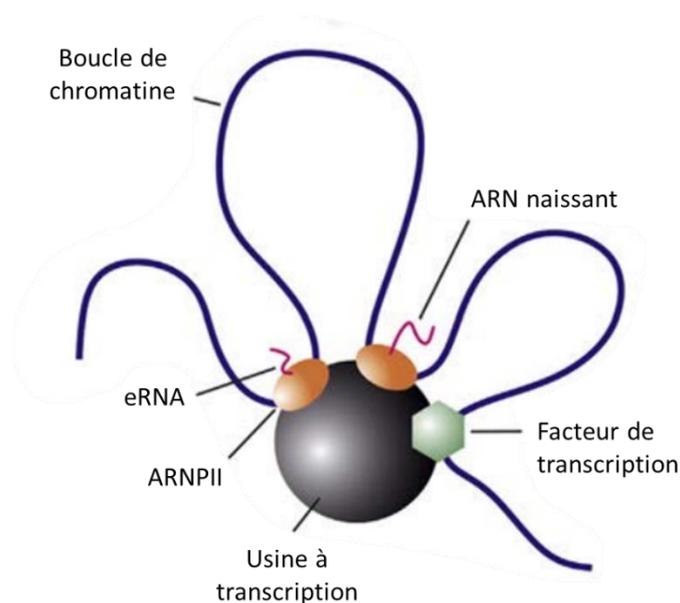


Figure 14 : Représentation d'une usine à transcription. L'usine à transcription comporte des ARNPII à sa périphérie et des facteurs de transcription pouvant ancrer la chromatine à la surface des usines. Les ARNPII transcrivent alors les gènes présents à la surface des usines, permettant la synthèse de d'ARN naissants codant ou non. D'après Sofiadis and Papantonis, 2018.

2. Composition des usines à transcription

La purification native des usines à transcription et leur analyse par des méthodes de protéomiques a permis de mettre en lumière la composition et les fonctions de ces condensats non-membranaires (Caudron-Herger et al., 2015; Melnik et al., 2011). L'ARNPII y est évidemment retrouvée, de même que des facteurs généraux de transcription et des facteurs de remodelage de la chromatine. De façon intéressante, de nombreuses RBP, comme des composants du splicéosome, des facteurs d'épissage et des hélicases à ARN sont également présents (Tableau 2). La présence de ces protéines suggère donc un lien étroit entre ces compartiments et la régulation co-transcriptionnelle de l'épissage.

Groupe de protéines	protéines
RNA polymérase II	RPB2, RPB3, RPB4, RPB7, RPB9, RPABC3, RPA2, RPA12, RPAC1
facteurs de transcription	TFII-I, TFIIH, XPB, TF20, AP-2, AP-4, SP3, SAF1B1 & B2, USF1
Régulateur de l'architecture du génome	CTCF
Composants du splicéosome / facteurs d'épissage/ hélicases à ARN	U2AF65, HnRNPs, snRNPs (Sm, U1, U5, U1, U4/U6, H/ACA), SF-1, SR proteins, DDXs (1, 18, 24, 3X, 10, 47, 49, 5), DHX15
Facteurs de remodelage de la chromatine/ modifications d'histone	SWI/SNF, CAF1B, HMTs (EZH2, SUV39H1, SUV39H2)

Tableau 2 : Composition des usines à transcription.

3. Spécialisation des usines à transcription

Les usines à transcription sont capables de se spécialiser pour organiser la transcription de différents gènes d'une même voie ou régulés par un même facteur de transcription. C'est ce qui fut notamment démontré pour les facteurs NF-κB (Figure 15) (Papantonis et al., 2010). La fixation de différents promoteurs dans une même usine à transcription permet ainsi d'induire des boucles d'ADN intergéniques (intra- ou inter-chromosomiques), de même qu'une ré-initiation de la transcription du gène dans la même usine à transcription induira des boucles intragéniques (Larkin et al., 2013). D'autres exemples attestent également d'un

Introduction Organisation tridimensionnelle de la chromatine et impact sur l'expression des gènes

rapprochement spatial de gènes co-régulés par un ou plusieurs facteurs de transcription, soulignant une spécialisation des usines à transcription, listés dans le tableau ci-dessous.

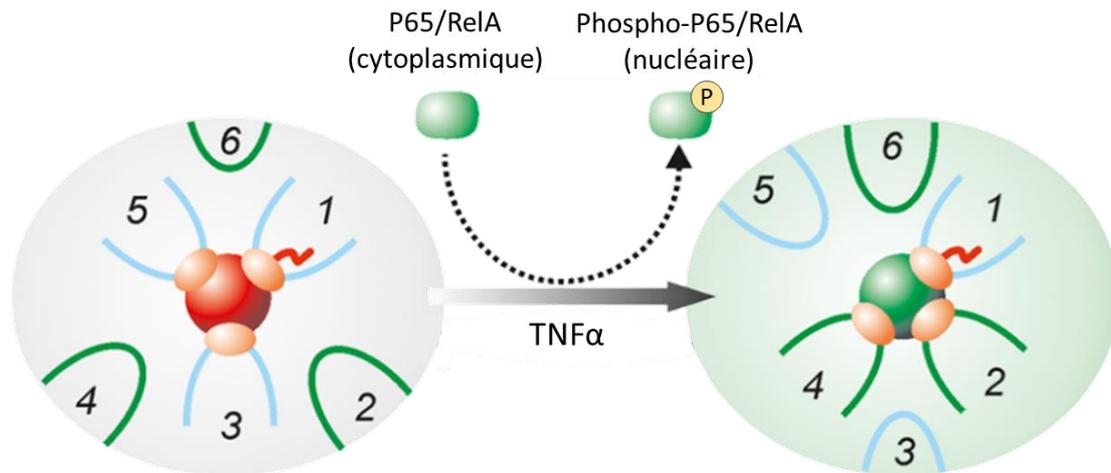


Figure 15 : Illustration de la spécialisation d'usines à transcription dans le cas de l'activation de la voie NF-κB. Avant activation, l'usine à transcription (rouge) transcrit les gènes 1, 3 et 5 non spécifiques de la voie NF-κB tandis que les gènes 2, 4 et 6 répondant à la voie NF-κB ne sont pas recrutés dans l'usine à transcription et ne sont pas transcrits. Après stimulation par le TNFα, les facteurs NF-κB transloquent dans le noyau et envahissent les promoteurs et/ou les usines à transcription. Les promoteurs des gènes 2, 4 et 6 peuvent ainsi diffuser dans les usines à transcription et être transcrits, formant ainsi une usine à transcription spécialisée dans la voie NF-κB, mais pas seulement, car des gènes initialement présents comme le gène 1 peuvent toujours être présents et transcrits. Les gènes 2 et 4 sont ainsi co-transcrits dans cette usine, mais le gène 6 situé à proximité pourra envahir cette usine selon la temporalité d'activation de la voie. D'après Papantonis and Cook, 2013.

Fonction des gènes co-régulés et contacté / facteurs mis en jeu	méthode d'observation	références
TNF α / NF- κ B	3C, 4C, ChIA-PET, RNA-FISH, ChIP-seq	(Fanucchi et al., 2013; Larkin et al., 2013; Papantonis et al., 2012, 2010)
TGF β / SMADs	4C, ChIP-seq	(Papantonis et al., 2012)
ER α	ChIA-PET, ChIP-seq	(Fullwood et al., 2009; Li et al., 2012)
ERG	Hi-C, 3C, ChIP-seq	(Rickman et al., 2012)
Gènes d'interleukines/cytokines (activation des cellules T _{H2}) / SATB1	3C, ChIP-loop, ChIP	(Cai et al., 2006)
Gènes érythroïdes	RNA-FISH	(Brown et al., 2008, 2006; Osborne et al., 2004)
Recombinaison V(D)J de l'immunoglobuline / Klf1, cohésine, CTCF, E2A	DNA-FISH, RNA-FISH, ChIP-4C,	(Corcoran, 2010; Karki et al., 2019a, 2019b; Park et al., 2014; Schoenfelder et al., 2010)
Récepteurs olfactifs	DNA-FISH, RNA-FISH, 4C	(Clowney et al., 2012)
Protocadherin cluster / CTCF, cohésine	ChIP-seq, 3C	(Guo et al., 2012)

Tableau 3 : Exemples de rapprochements de gènes co-régulés.

ii. Les corps nucléaires, des condensats dédiés à l'épissage

1. Les corps nucléaires dans la régulation de l'épissage et la transcription

Chez les mammifères, de nombreux composants du splicéosome sont retrouvés concentrés au sein de foci nucléaires (Spector et al., 1991, 1983). Ces structures, observées pour la première fois dans les années 1910, présentent des tailles variables de 1 et plusieurs micromètres et ont

tantôt été nommées « interchromatin granules », « splicing factor compartment » ou domaines Sc35, avant d'être définis de façon générique comme nuclear speckles (NS) ou corps nucléaires (NS) en 1961. Ces compartiments nucléaires interchromatiniens sont enrichis en facteurs d'épissage U1, U2, U4, U5, U6 snRNP, en protéines SR et également en kinases spécifiques de facteurs d'épissage. Certaines études montrent également à leur périphérie la présence d'ARN naissants, de facteurs d'initiation et d'élongation de la transcription, des régulateurs de l'export et de maturation 3' des ARN, ainsi que acteurs du remodelage de la chromatine tels que des HATs, HMTs et HDACs. Ces données soulignent les liens étroits qui peuvent exister entre les NS et les régulations de la chromatine et de la machinerie transcriptionnelle (Galganski et al., 2017; Smith et al., 1999; Spector and Lamond, 2011). Les NS sont des structures dynamiques au sein desquelles, et depuis lesquelles, les composants diffusent rapidement, suggérant qu'ils constituent des sites d'assemblage et de modification du spliceosome permettant de fournir les facteurs d'épissage appropriés aux sites transcriptionnellement actifs (Misteli et al., 1997). Dans ce sens, il a été montré qu'une inhibition de la transcription induit une augmentation de la taille des NS, soulignant leur rôle de stockage et de redistribution des facteurs d'épissage au cours de la transcription.

Cependant, il a été montré que les NS sont directement capable d'épisser des transcrits naissants, et l'accumulation de certains facteurs d'épissage dans les NS est nécessaire pour la régulation des exons qu'ils ciblent (Xing et al., 1995; Ying et al., 2017). Les NS sont dépourvus de gènes mais elles co-localisent fréquemment avec l'ARNPII active (Ser2P). Elles sont également retrouvées à proximité de régions fortement transcrites et peuvent contribuer à stimuler l'expression des gènes (Brown et al., 2008; Kim et al., 2019; Mortillaro et al., 1996). Les composants du spliceosome, et les ARN naissants apparaissent ainsi enrichis en périphérie des NS, tandis que les ARNm matures sont retrouvés au cœur des NS, avant leur export. L'ARN naissant serait alors mûré co-transcriptionnellement à l'interface des NS et du nucléoplasme avant de pénétrer au centre de ces dernier avant l'export. Cette accumulation locale permettrait de jouer un rôle dans la régulation de la maturation et l'export de ces ARN.

Les mécanismes de formation des NS ont longtemps été débattus. Il a été démontré très récemment que ces structures répondent aux propriétés physiques de la LLPS (Liao and Regev, 2021). En effet, par des approches d'imagerie en temps réel de cellules HEK293T exprimant une version taguée et fluorescente du facteur d'épissage SRRM2, un composant majeur des

Introduction Organisation tridimensionnelle de la chromatine et impact sur l'expression des gènes

NS, Xu et ses collègues ont observé que les régions de désordre intrinsèque de SRRM2 induisent la formation de condensats par séparation de phase (Ilik et al., 2020; Xu et al., 2022).

Récemment, un nouveau modèle d'épissage à l'interface des NS a été proposé sur les observations suivantes (Liao and Regev, 2021):

- 1) Les NS sont enrichis en facteurs SR mais dépourvu de hnRNP.
- 2) Les séquences exoniques sont enrichies en motifs SR tandis que les introns sont enrichis en motifs hnRNP.
- 3) les composants du spliceosome sont enrichis en périphérie des NS.
- 4) les introns ne pénètrent pas les NS, seuls les transcrits épissés et dépourvu d'introns sont retrouvés à l'intérieur des NS.

Ces données proposent que selon un processus de transition de phase organisé par les NS, les transcrits naissants se retrouveraient à l'interface nucléoplasme-NS. Dans ce contexte, les exons pénétreraient dans les NS, les introns restant dans le nucléoplasme. Les sites d'épissage se localiseraient ainsi à l'interface NS-nucléoplasme où le spliceosome exercerait sa fonction d'épissage des introns.

2. ARNPII et échanges entre condensats

De façon intéressante, l'ARNPII est capable de transiter entre différents condensats transcriptionnellement actifs. En effet, lors de l'initiation, les condensats d'ARNPII fusionnent avec des condensats enrichis en Mediator (Guo et al., 2019). En revanche, lors de l'élongation et de la modification de la phosphorylation du CTD, l'ARNPII co-localise avec les NS. Ces données suggèrent une interface étroite entre les deux types de condensats entre lesquels les gènes transitent selon leur état transcriptionnel, permettant ainsi de réguler les phases d'initiation de la transcription puis de maturation co-transcriptionnelle des ARN naissants (Ishov et al., 2020).

d. Epissage alternatif et organisation du génome

i. Boucles promoteur-exon et impact sur l'épissage

Il a été montré par des analyses de données de ChIA-PET de l'ARNPII que certains exons partagent des marques épigénétiques avec des promoteurs, que ce soit via une proximité sur

la chromatine (exons en 5' du gène ou au sein du gène à proximité de TSS alternatifs) ou dans l'espace nucléaire tridimensionnel (Curado et al., 2015). Ces données proposent que les interactions tridimensionnelles promoteur-exon participent au mécanisme de couplage de la transcription et de l'épissage alternatif.

Les travaux de Mercer et al., ont identifié pour la première fois qu'un sous-groupe d'exons hypersensibles à la DNaseI (DHS exons) sont retrouvés enrichis en marques activatrices de la transcription, telles que H3K4me1, H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac, et certains facteurs de transcription comme p300 (Mercer et al., 2013). Par des approches de ChIA-PET ciblant l'ARNPII et de 3C, les auteurs ont démontré que ces marques correspondaient à des marques dites « fantômes », résultant d'un rapprochement spatial entre les exons et les promoteurs. En effet, les essais classiques de CHIP utilisant des agents de pontage entre les protéines (formaldéhyde...), deux régions chromatiniennes en contact proche dans l'espace peuvent être liées entre elles de façon covalente et être co-immunoprécipitées. Pour la cible H3K4me3, un CHIP natif (dépourvu de pontage protéine-protéine) ne permettait pas de confirmer l'enrichissement aux exons de la marque indiquant que cette marque était le résultat d'un contact promoteur-exon. Outre, les promoteurs, ces exons ont également été retrouvés formant des boucles d'ADN avec des enhancers, expliquant pour partie la détection par CHIP d'un enrichissement des marques H3K4me1 et H3K4me2 et du facteur p300 au niveau des exons. Ce type de rapprochement tridimensionnel des exons avec des promoteurs et des enhancers pourrait favoriser un environnement enrichi en facteurs de transcription et/ou d'épissages, qui contribuerait à la dynamique du processus d'épissage alternatif. La formation de boucles promoteur-exon de certains gènes est également due à la présence de sites CTCF au niveau de ces régions, permettant de rapprocher l'exon du promoteur. C'est ce qui a été démontré pour le gène *CD45*, dont l'exon 5 est inclus de façon corrélée à l'enrichissement de CTCF sur l'exon. Cette régulation apparaît spécifique du type cellulaire en fonction des niveaux de méthylation de l'ADN cible, qui altèrent la fixation de CTCF (Shukla et al., 2011). Cette observation a été élargie à l'ensemble du génome par des expériences de CHIP-seq démontrant une fixation de CTCF en aval de certains exons dont l'épissage est sensible à la déplétion de CTCF. D'un point de vue mécanistique, il a été montré que la fixation de CTCF au niveau de l'exon induit un ralentissement et une pause de l'ARNPII, permettant la reconnaissance de sites faibles d'épissage et l'inclusion de l'exon, en accord avec le modèle cinétique.

Une seconde étude a également démontré le rôle de CTCF dans la formation de boucles promoteur-exons (Ruiz-Velasco et al., 2017). Les auteurs ont montré ici par une approche intégrative de CHIP-seq, RNA-seq, Hi-C et 4C, que des gènes comportant des sites CTCF convergent entre leur promoteur et la région intronique en amont d'un exon. La boucle formée entre ces deux régions est alors associée à une inclusion de l'exon. Les auteurs proposent 2 mécanismes possibles : un ralentissement de l'ARNPII lié à la présence de CTCF créant un encombrement stérique bloquant l'ARNPII (modèle cinétique), ou le recrutement de facteurs d'épissages présents au niveau du promoteur (modèle de recrutement). En effet des facteurs d'épissage ont été retrouvés au niveau des promoteurs, suggérant qu'un rapprochement spatial exon-promoteur régule l'épissage alternatif (Huang et al., 2012; Terrone et al., 2022).

ii. Rapprochement de gènes et épissage alternatif

Récemment, A. Bertero et ses collègues ont montré que la différenciation cardiomyocytaire coïncide avec des changements de compartiments, et notamment des transitions de compartiments B (inactifs) vers A (actifs) (Bertero et al., 2019). Ces changements B vers A s'accompagnent d'une augmentation de l'accessibilité et de la transcription des gènes, dont plusieurs gènes engagés dans la régulation cardiaque. Ces gènes ont été retrouvés associés entre eux à la fois en *cis*- et en *trans*- dans des foci enrichis en facteur d'épissage RBM20 qui régule l'épissage alternatif des gènes en contact. Cette étude révèle également que ces rapprochements sont dépendant de la transcription du gène cardiaque *TTN*, dont le transcrit abrite de nombreux sites de fixation de RBM20. Ainsi, en concentrant de nombreuses molécules de RBM20, l'expression de *TTN* permet la nucléation des foci de RBM20. Les auteurs proposent donc que la transcription de *TTN* permet la formation de « RBM20 splicing factories » qui incluent des d'interactions *trans*-chromosomiques impliquant d'autres gènes dont l'épissage est régulé également par RBM20. Ces données montrent un exemple de réarrangement du génome transcription-dépendante, permettant la mise en place d'un programme d'épissage alternatif impliqué dans la différenciation cellulaire.

iii. Corps nucléaires et organisation du génome

En observant les sites de transcription par marquage d'ARN naissants et leur répartition par rapport aux NS, Wansink et ses collègues ont pu démontrer que l'ARNPII co-localise uniquement avec des NS faiblement enrichis en Sc35 (Wansink et al., 1993). Les auteurs suggèrent que les niveaux d'enrichissement des NS en sc35 permettrait de distinguer des NS engagés dans le stockage, l'assemblage et/ou le recyclage de la machinerie d'épissage, des NS impliqués dans les processus d'épissage co-transcriptionnels, contenant une faible proportion de Sc35 et co-localisant avec des ARN naissants (Figure 16). Des gènes co-régulés dans leur épissage ont tendance à être retrouvés à proximité d'un même NS, ce qui est en faveur de la formation de « d'usines à épissage » permettant d'orchestrer à l'échelle de l'exon la co-régulation de l'expression des gènes (Brown et al., 2006; Moen et al., 2004).

En utilisant une technique alternative aux techniques C, nommée SPRITE (Split-Pool Recognition of Interactions by Tag Extension), Sofia A. Quinodoz et ses collègues ont pu démontrer que des régions denses en gènes, fortement transcrites et comportant une forte densité en ARNPII, interagissent préférentiellement entre elles et sont retrouvées à proximité des NS (Quinodoz et al., 2018). Ces données suggèrent que les NS sont impliqués dans l'organisation du génome en jouant le rôle de « hubs » d'interactions intra- et inter-chromosomiques dépendant du niveau d'expression des gènes. Ces données sont en accord avec d'autres études montrant une interaction entre les gènes fortement transcrits et les NS, et posent la question des mécanismes qui relient la conformation tridimensionnelle de la chromatine, la transcription et des NS dans l'organisation du génome et le lien étroit avec l'épissage co-transcriptionnel (Brown et al., 2008; Crosetto and Bienko, 2020; Shopland et al., 2003).

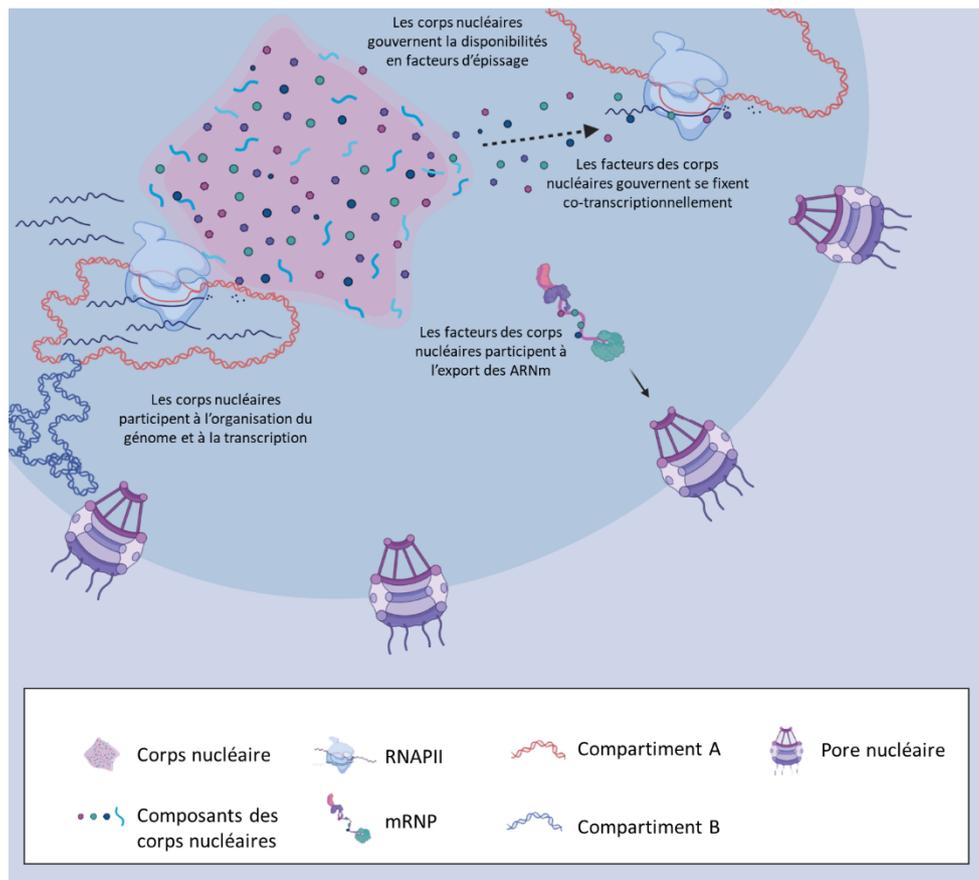


Figure 16 : représentation des Nuclear speckles et de leurs fonctions. Les nuclear speckles présentent des gènes actifs à leur périphérie, et peuvent ainsi prendre en charge l'épissage des transcrits naissants. Ils peuvent également servir de lieux de stockage et de recyclage des composants du spliceosome, et ainsi réguler l'épissage cellulaire. D'après Faber et al., 2022.

iv. Localisation nucléaire et impact sur l'épissage

De récents travaux ont pu démontrer que la localisation des gènes dans le noyau influence leur épissage alternatif et se décompose en deux sous-compartiments nucléaires (Tammer et al., 2022). Les données montrent que les gènes pauvres en GC sont plus fréquemment situés à la périphérie nucléaire et associés à la lamine, tandis que des gènes riches en GC sont plutôt retrouvés au centre du noyau. De façon élégante, les auteurs ont montré que la simple localisation d'un minigène à la périphérie ou au centre du noyau suffit à moduler le niveau d'exclusion d'exon ou de rétention d'intron, respectivement. De même, l'augmentation du %GC de ces minigènes suffit à orienter sa position vers le centre du noyau, suggérant que la composition nucléotidique d'un gène influence sa localisation nucléaire et son épissage alternatif. Ces données suggèrent que ces deux compartiments nucléaires sont le siège de régulations d'épissage différentes. Dans ce contexte, il est montré que les ARN issus des gènes périphériques sont caractérisés comme interagissant préférentiellement avec des hnRNP et

Introduction Organisation tridimensionnelle de la chromatine et impact sur l'expression des gènes

sont régulés essentiellement par exclusion d'exon. A l'inverse, les ARN issus des gènes situés au centre du noyau apparaissent enrichis en facteurs d'épissage de type SR et en hélicases à ARN de type DDX, protéines associées aux NS, et leur épissage repose sur un mécanisme de reconnaissance de l'intron. Ces données sont en accord avec le rôle des NS dans l'organisation du génome, qui pourraient être un point d'ancrage au centre du noyau pour les gènes avec un fort %GC. Dans ce sens, une seconde étude démontre que les gènes présents aux abords des NS présentent un fort niveau de rétention d'introns lors de l'épissage ayant un fort %GC, et ces introns sont de petites tailles ([Barutcu et al., 2022](#)). Ces gènes retrouvés à proximité des NS sont fonctionnellement impliqués dans des processus de maturation des ARNs, de traduction et de cycle cellulaire. Les auteurs suggèrent ainsi que ces structures joueraient un rôle dans la coordination de plusieurs processus cellulaires via la régulation de l'épissage de complexes multigéniques.

Ensemble, ces données relient les régulations de l'épissage alternatif au couplage avec la transcription et des données récentes, impliquant l'organisation tridimensionnelle de la chromatine qui influencent également l'épissage alternatif.

4. HTLV-1, Tax et l'épissage alternatif

a. Généralités et épidémiologie du HTLV-1 et des pathologies associées

i. Généralités

Le virus T-lymphotrope humain de type 1 (en anglais Human T cell Leukemia/lymphoma virus type 1 ou HTLV-1) est le premier rétrovirus humain oncogène découvert en 1980 aux Etats-Unis par Robert Gallo ([Poiesz et al., 1980](#)). Ce virus fait partie du genre *deltaretrovirus*, qui comprend quatre types HTLV (1 à 4), 3 types de l'équivalent simien STLV (1 à 3) et le virus de la leucémie bovine (BLV). HTLV-1 est l'agent étiologique de pathologies inflammatoires dont la paraparésie spastique tropicale, ou myélopathie associée à HTLV-1 (HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis ou HAM/TSP), et de la leucémie/lymphome T de l'adulte (Adult T cell Leukemia/Lymphoma ou ATLL), une hémopathie maligne de phénotype T-CD4+ très agressive.

ii. Epidémiologie

Du fait du peu d'études épidémiologiques de la population globale dans les régions endémiques et dans le monde, la prévalence de ce virus reste difficile à déterminer et reste très largement faussée dans les études ([Gessain et al., 2012](#)). Cependant, le rassemblement de toutes ces données permettent d'estimer le nombre de porteurs de HTLV-1 entre 5 et 10 millions de personne mondialement. HTLV-1 est endémique dans plusieurs régions du globe, dont l'Amérique du sud, les Caraïbes, l'Afrique de l'est et centrale, et le Japon ([Figure 17](#)). Ce virus n'est pas réparti de façon égale sur le globe, et se concentre en foyers de haute endémie. La prévalence peut donc varier énormément entre des régions non endémiques (comme la France métropolitaine avec 0,0039% de prévalence) et des régions de forte endémie (jusqu'à 36,4% dans certaines régions japonaises) ([Watanabe, 2011](#)). Cette répartition est encore mal comprise mais peut s'expliquer en partie par un effet de fondation dans certaines populations, suivi de la persistance d'un fort taux de transmission lors des primo-infections. L'épidémiologie

de ce virus se caractérise par un biais de séroprévalence pour les adultes, et également pour les femmes.

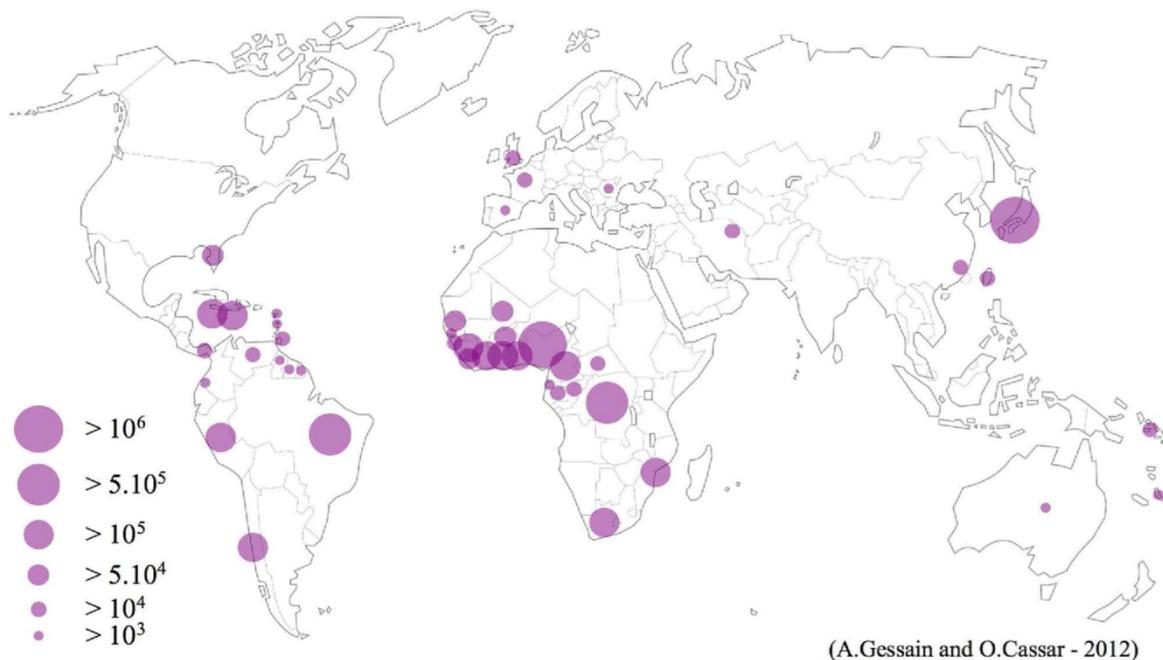


Figure 17 : Distribution mondiale de HTLV-1. Estimations du nombre de porteurs de HTLV-1 dans le monde. D'après Gessain et al., 2012.

iii. Transmission du virus

HTLV-1 se propage principalement par trois voies de transmission: la voie verticale de la mère à l'enfant (par allaitement), et les voies horizontales par les contacts sexuels et les produits contaminés par le sang infecté (transfusions ou réutilisation de seringues par exemple). HTLV-1 se distingue des autres rétrovirus par son mode de transmission. L'infection par HTLV-1 dépend très fortement des contacts de cellule à cellule, les particules virales étant très peu infectieuses par elles-mêmes (Igakura et al., 2003; Majorovits et al., 2008; Tezuka et al., 2020). Une exposition prolongée à l'infection chez les enfants allaités par une mère séropositive constitue donc le principal mode de transmission du virus, entraînant une séropositivité de 10 à 25% chez les enfants allaités. La majorité des cas d'ATLL survient chez les individus infectés par transmission verticale durant leur enfance.

iv. Pathologies associées à HTLV-1

1. La leucémie T de l'adulte (ATLL)

Les premiers cas d'ATLL furent rapportés en 1977 au Japon, trois ans avant la caractérisation de HTLV-1 ([Uchiyama et al., 1977](#)). Il s'agit d'une maladie lymphoproliférative maligne des lymphocytes T CD4+ infectés. Au Japon, l'ATLL représente plus de 700 cas par an, et se déclenche chez 3 à 5 % des hommes et 1 à 2 % des femmes infectées par HTLV-1 ([Yamaguchi and Watanabe, 2002](#)). Bien que l'incidence varie selon les régions endémiques, l'incidence globale est estimée entre 1 et 5% des patients infectés. Cette maladie se manifeste après une période de latence longue, d'au moins 20 à 40 ans suivant l'infection par HTLV-1, majoritairement chez des individus infectés pendant l'enfance via l'allaitement prolongé (transmission verticale) ([Itabashi and Miyazawa, 2021](#)). Les mécanismes de développement de la maladie restent encore mal connus. Cependant, certains facteurs génétiques, des haplotypes HLA, la charge provirale, et une transmission verticale mère-enfant semblent influencer le risque de développement d'ATLL ([Murphy et al., 2004](#); [Plancoulaine et al., 2000](#); [Takenouchi et al., 2003](#); [Yashiki et al., 2001](#)),.

D'un point de vue clinique, l'ATLL se subdivise en quatre formes ([Lunning et al., 2020](#); [Panfil et al., 2016](#)) :

- Deux formes indolentes, à pronostic défavorable, représentant 55 à 75 % des cas d'ATLL :
 - o La forme chronique, peu sévère, à évolution lente, principalement cutanée. Le taux de survie est de 17 à 24 mois.
 - o La forme subaiguë ou « smoldering », impliquant des lésions cutanées et pouvant évoluer en forme aiguë. Cette forme présente une durée de survie de 34 mois à plus de 5 ans.
- Deux formes agressives, à pronostic défavorable car pouvant mener à des résistances multi-drogues, une défaillance d'organes, une infiltration des cellules leucémiques et de nombreuses infections opportunistes du fait de l'immunodéficience engendrée par l'ATLL :
 - o La forme aiguë, s'accompagne de lymphoadénopathies, splénomégalie, hépatomégalies, lésions cutanées, et hypercalcémie. Le taux de survie est

estimé entre 4 à 6 mois. Cette forme présente de nombreuses cellules leucémiques circulantes. Les cellules immortalisées sont retrouvées dans les organes touchés ou le sang périphérique et la moelle osseuse.

- Enfin, la forme lymphomateuse présentant les mêmes signes cliniques que la forme aiguë, mais se différenciant par la présence des cellules immortalisées dans les organes lymphoïdes. Cette forme présente une durée de survie de 9 à 10 mois.

2. Autres maladies associées à HTLV-1

En plus de l'ATLL, HTLV-1 est associé à diverses pathologies inflammatoires incluant une paraparésie spastique tropicale (HAM/TSP), une uvéite associée à HTLV-1, et plusieurs pathologies cutanées ([Gonçalves et al., 2010](#)). La HAM/TSP se développe chez 3 à 5% des individus infectés par HTLV-1 et touche préférentiellement les femmes adultes de plus de 40 ans. Il s'agit d'une méningomyélite associée à une démyélinisation et une dégénération axonale des substances blanches et grises de la moelle épinière. Les lésions dans le système nerveux central sont dues à une infiltration des lymphocytes infectés pro-inflammatoires, classant la HAM/TSP comme maladie inflammatoire chronique. Cette maladie se manifeste par des faiblesses et paralysies spastiques des membres inférieurs et des problèmes sensoriels.

b. Structure du HTLV-1 et mécanismes de réplication

i. Structure de la particule virale

Le virus HTLV-1 est une particule virale enveloppée d'environ 100 nm de diamètre. Elle présente à sa surface une bicouche protéolipidique issue de la membrane cellulaire lors du bourgeonnement du virus, sur et sous laquelle s'organisent les protéines virales pour structurer la particule virale (Figure 18).

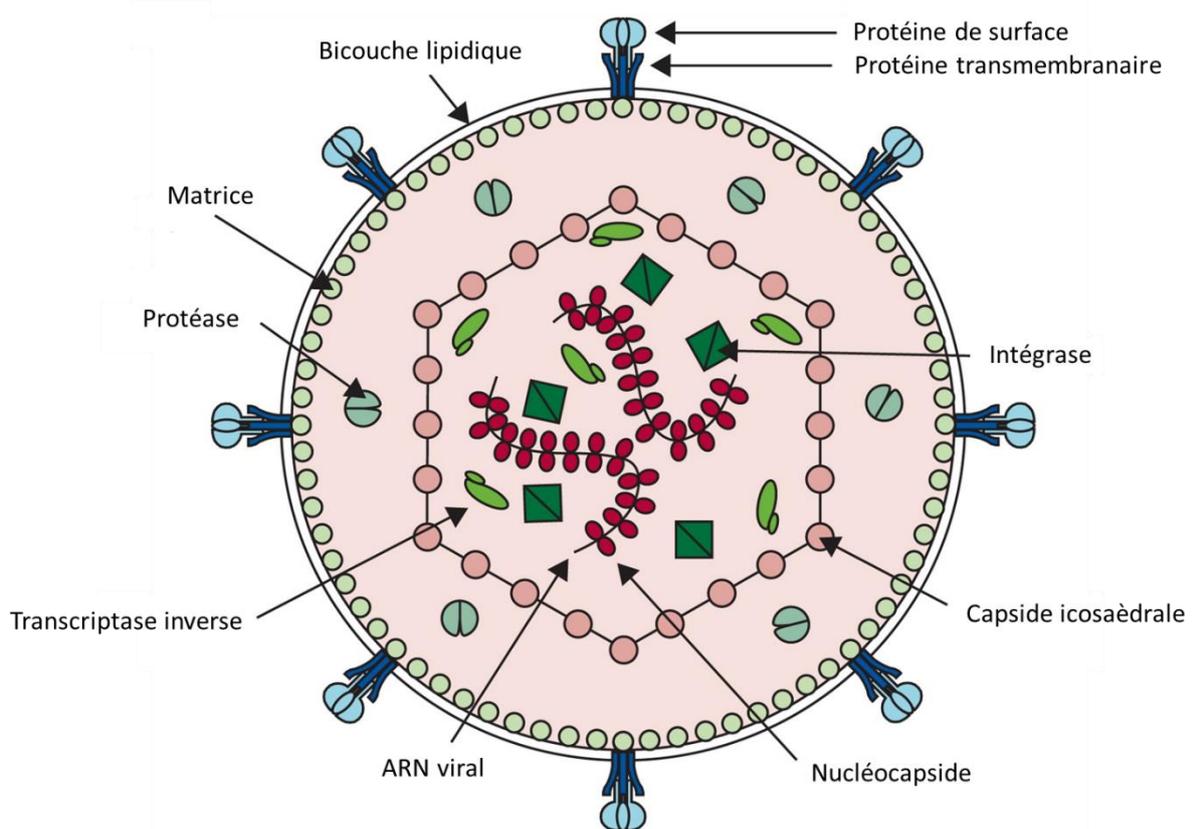


Figure 18 : Représentation schématique de la particule virale de HTLV-1 et de sa structure. L'enveloppe est constituée d'une bicouche protéolipidique et est chargée en protéines et glycoprotéines virales de surface et transmembranaires (gp46 et gp21). Sous cette enveloppe se situe la couche de matrice, constituée de p19 (ou MA) et de protéase p14 (ou pro), qui organise la capsidie icosaédrique constituée de p24 (ou CA). Cette capsidie renferme un complexe RNP constitué de deux molécules du génome viral sous forme d'ARN monocaténaire de polarité positive, habillées de protéines de nucléocapside (p15 ou NC) et d'autres protéines virales comme la transcriptase inverse ou l'intégrase). D'après Verdonck et al., 2007.

ii. Génome viral

Le génome de HTLV-1 se présente sous forme de deux copies d'ARN simple brin, compactes de 9kb (Figure 19). Lors de l'infection, cet ARN viral est rétrotranscrit pour former une molécule d'ADN bicaténaire, qui est ensuite intégrée en séquence provirale dans le génome humain, préférentiellement dans des régions actives transcriptionnellement, à proximité de certains gènes spécifique, et au niveau d'un large motif consensus (AATTAAAGTGGATATCCACTTAAATA) (Gillet et al., 2011; Kirk et al., 2016; Melamed et al., 2013). Le provirus comporte à ses extrémités 5' et 3' deux régions répétées appelées LTR (pour Long Terminal Repeats). Chaque LTR comporte trois régions (U5, R & U3). Ces LTR présentent les sites de fixation des facteurs

de transcription ATF (Activating Transcription Factor), CREB (cAMP Response Element-Binding protein) et AP-1 (Activator Protein 1) nécessaires à la transactivation du promoteur viral, ainsi que les séquences terminatrices des ARN viraux. Le génome du provirus présente sur son brin positif les gènes essentiels de la famille des rétrovirus : *gag*, *pol* et *env*. Il comporte également en partie 3' une région appelée *pX*, qui code les protéines Tax, Rev, ainsi que d'autres protéines auxiliaires (Tableau 4). Le brin négatif code quant à lui la protéine HBZ. Le provirus génère des ARN non-épissés, mono-épissés et doublement épissés, issus de l'épissage alternatif (Figure 19). Lors de la traduction, des décalages du cadre de lecture ou des sites d'initiation différents permettent de produire différentes protéines à partir d'un même ARN. De la même manière, certaines polyprotéines comme Gag ou ses précurseurs par exemple sont ensuite clivés par la protéase afin de générer l'ensemble des protéines codées par le provirus. Des études récentes montrent également que la région *pX* se caractérise par la présence d'un site CTCF viral (vCTCF) ainsi que d'un enhancer (Matsuo et al., 2022; Satou et al., 2016). Ces deux éléments ont notamment été associés à l'altération de l'expression des gènes cellulaires à proximité du site d'intégration, via la formation de boucles de chromatine longue distance entre le site vCTCF et un site CTCF endogène.

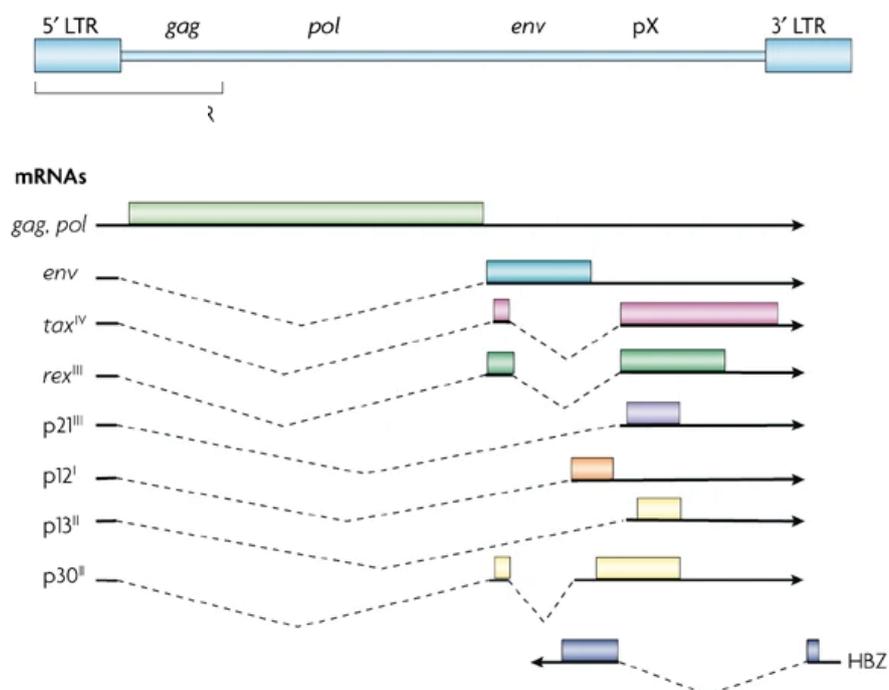


Figure 19 : Génome proviral et transcrits de HTLV-1. Les régions *gag*, *pol*, *env* et *pX* sont flanquées de deux séquences LTR en 5' et 3'. La région *pX* code via divers cadres de lecture les protéines *p21*, *p12*, *p13*, *p30* ainsi que Tax, et Rex. HBZ est transcrit via une transcription antisens à partir du LTR 3'. D'après Matsuoka and Jeang, 2007.

Protéine	Rôle
Protéines d'enveloppe	
Glycoprotéine de surface (gp46)	Fixation aux récepteurs cellulaires
Protéine transmembranaire (gp21)	Fusion
Protéines structurales codées par <i>gag</i>	
Protéine de Matrice (MA, p19)	Participe à l'organisation du virus à la membrane interne
Capside (CA, p24)	Forme la capsid qui protège le complexe RNP viral
Nucléocapside (NC, p15)	Protège l'ARN viral en le fixant
Protéines de fonction codées par <i>pol</i>	
Protéase (Pro, p14)	Permet le clivage des polyprotéines Gag/GagProPol
Transcriptase inverse (p95)	Réalise la rétrotranscription de l'ARN viral génomique
Intégrase	Permet l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte
Protéines régulatrices	
Tax	Régulateur transcriptionnel du virus, régulateur de voies de signalisation, oncoprotéine virale
HTLV-1 bZIP-factor (HBZ)	Régulateur transcriptionnel, oncoprotéine virale
Rex	Modulateur de l'export des ARN
12 ^I	Module l'activation et la réponse des cellules T
P27 ^I	Fonction inconnue
p13 ^{II}	Cible et altère les mitochondrie
p30 ^{II}	Régulateur transcriptionnel

Tableau 4 : Les protéines virales codées par HTLV-1 et leurs fonctions. D'après Verdonck et al. 2007 et Michael et al., 2004.

iii. Réplication de HTLV-1

1. Cycle répliatif et cellules cibles

Les cellules ciblées par HTLV-1 sont principalement les cellules T CD4+ et CD8+, et dans une moindre proportion les monocytes et cellules dendritiques (Koyanagi et al., 1993; Longo et al., 1984). La reconnaissance des cellules cibles par les particules virales s'opère via l'interaction des protéines d'enveloppe de HTLV-1 avec les récepteurs membranaires de Héparin Sulfate protéoglycans (HSPG), et neuropilin-1 (NRP-1) pour la fixation, et de type transporteurs de glucose (GLUT-1) pour l'étape de fusion (Jones et al., 2006, 2005; Lambert et al., 2009; Manel et al., 2003). S'opère alors un cycle viral permettant la synthèse de nouveaux virions (Figure 20).

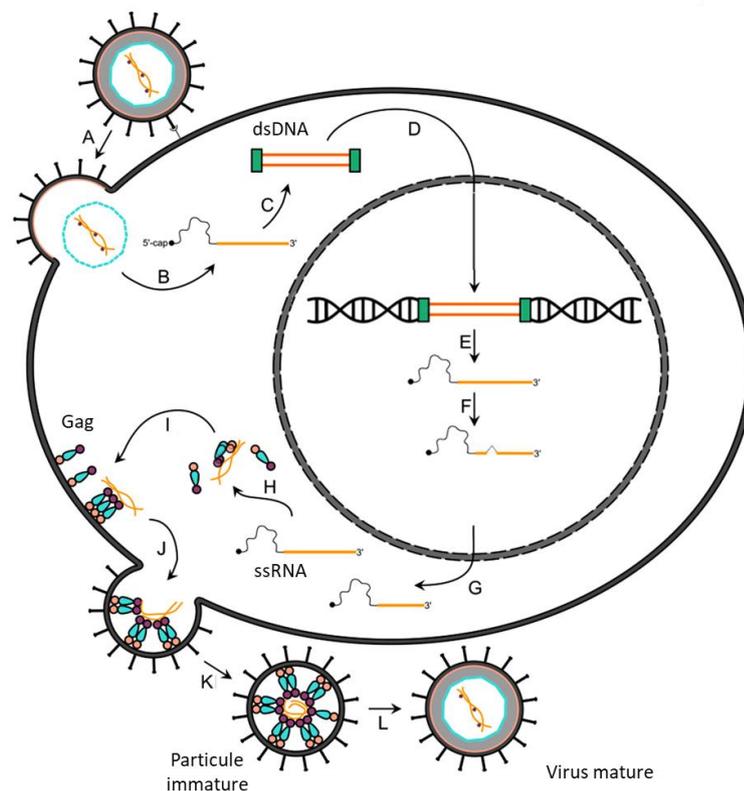


Figure 20 : Cycle répliatif du HTLV-1. A) la particule virale de HTLV-1 se fixe et fusionne avec la membrane plasmique cellulaire en reconnaissant des récepteurs de surface grâce aux protéines virales de l'enveloppe. B) La particule subit l'étape de décapsidation, libérant l'ARN génomique viral. C) L'ARN viral est alors rétrotranscrit par la transcriptase inverse pour former un ADN double brin. D) L'ADN génomique est intégré dans le génome de la cellule hôte grâce notamment à l'intégrase, lors de la division cellulaire. E, F) le provirus est transcrit par la machinerie cellulaire et mûri pour permettre la formation des transcrits viraux, G) exportés dans le cytoplasme et H) traduits. I) les protéines de structures Gag, Gag-Pol et Env sont adressées à la membrane plasmique avec deux copies d'ARN du génome viral. J) Les protéines virales s'assemblent avec l'ARN génomique pour former une particule virale immature, L) qui émergent par bourgeonnement de la surface de la membrane plasmique. K) Enfin, les polyprotéines virales sont clivées par la protéase afin de former une particule virale mature. D'après Martin et al., 2016.

2. Transmission cellule à cellule

Les virions étant peu infectieux en l'absence de cellules, l'infection de nouvelles a majoritairement lieu via une transmission directe de cellule à cellule (Fan et al., 1992). Cette transmission repose principalement sur trois phénomènes induits par HTLV-1 : les biofilms viraux, la synapse virologique, et les conduits cellulaires (Figure 21) (Gross and Thoma-Kress, 2016). Les biofilms viraux sont des structures extracellulaires composées de protéines, d'acides nucléiques et de sucres, qui permettent aux particules virales d'adhérer à la surface des cellules cibles et de faciliter la transmission du virus. La synapse virologique, une structure spécialisée formée entre une cellule infectée et une cellule cible, facilite la transmission directe du virus d'une cellule à une autre. Cette synapse virologique protégerait également le virus de la réponse immunitaire. Les conduits cellulaires, ou conduits viro-induits sont quant à eux des structures filamenteuses composées de protéines du cytosquelette qui se forment entre les cellules infectées et les cellules cibles, permettant le transfert direct du matériel viral (Van Prooyen et al., 2010).

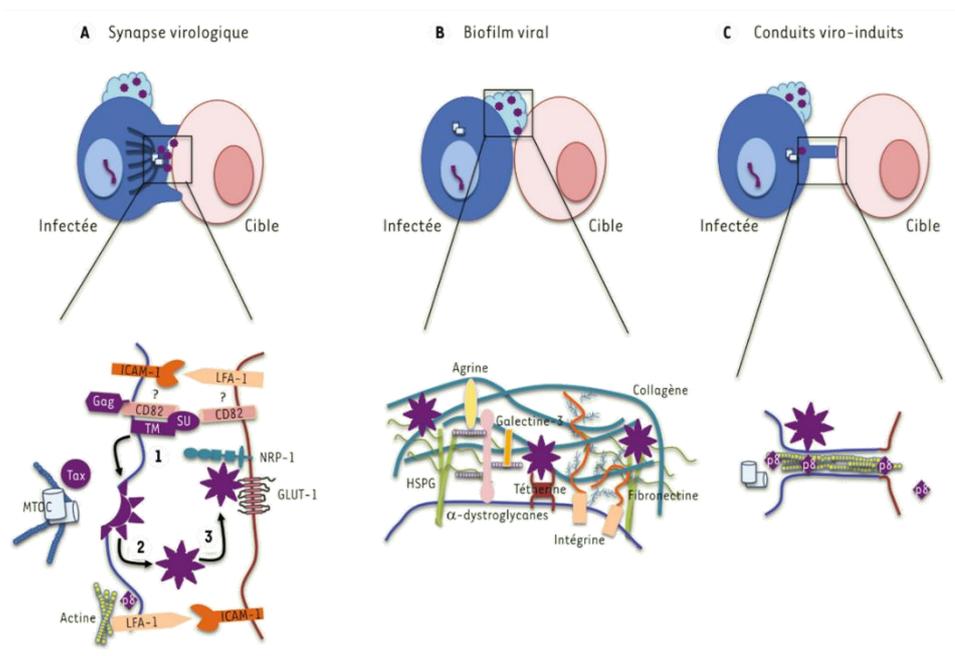


Figure 21 : Représentation des trois voies de transmission cellule à cellule du HTLV-1. A) la synapse virologique se forme entre une cellule infectée et une cellule cible. (1) L'interaction entre les deux cellules est médiée par des molécules d'adhérence (ICAM-1, LFA-1) et via l'interaction entre des protéines de la cellule et des protéines virales exprimées à la surface des cellules (CD82 et NRP-1 avec SU). (2) Au niveau de la synapse, les virions bourgeonnent. (3) Les virions se fixent sur la cellule cible, au niveau des récepteurs (ici représentés par GLUT-1) présents au niveau de la synapse. B) le biofilm viral. Les particules virales sont présentes dans la matrice extracellulaire des cellules infectées. Ce biofilm est caractérisé par la présence de nombreuses glycoprotéines (agrine, collagène, HSPG, galectine). Les virions sont incorporés dans cette matrice et retenus via leur interaction avec HSPG et la tétérine. C) Le conduit viro-induit forme un canal sortant de la cellule infectée, vers une cellule cible. Cette protubérance est formée par des faisceaux d'actine et relie directement la cellule cible. La protéine virale p8 est impliquée dans la formation de ces conduits. D'après Rizkallah et al., 2015.

3. Expansion clonale

La voie cellule à cellule de HTLV-1 est un mécanisme clé de la transmission du virus lors de la primo-infection. Cependant, lors de la phase chronique de l'infection, le virus se propage en grande majorité par l'expansion clonale des cellules hôtes infectées (Wattel et al., 1996). Ce mécanisme repose sur la capacité du provirus à induire l'accumulation de cellules infectées en favorisant leur prolifération cellulaire en particulier pour les lymphocytes T CD4+, ou en inhibant les processus pro-apoptotiques pour les lymphocytes T CD8+ infectées (Bangham, 2018; Sibon et al., 2006). Un patient infecté peut ainsi présenter jusqu'à 10^5 - 10^6 clones différents, présentant un site d'intégration du virus unique. Cependant, le nombre de clone et leur ampleur ne sont pas identiques à tous les stades de l'infection. Les patients atteints de HAM/TSP et les porteurs asymptomatiques présenteront un profil oligo/polyclonal.

En comparaison, les ATLL se caractérisent par un unique clone dominant composé d'un seul site d'intégration, pouvant représenter jusqu'à plus de 80% de la charge provirale totale, accompagné de quelques clones de plus faible ampleur (Figure 22) (Cavrois et al., 1996; Cook et al., 2014).

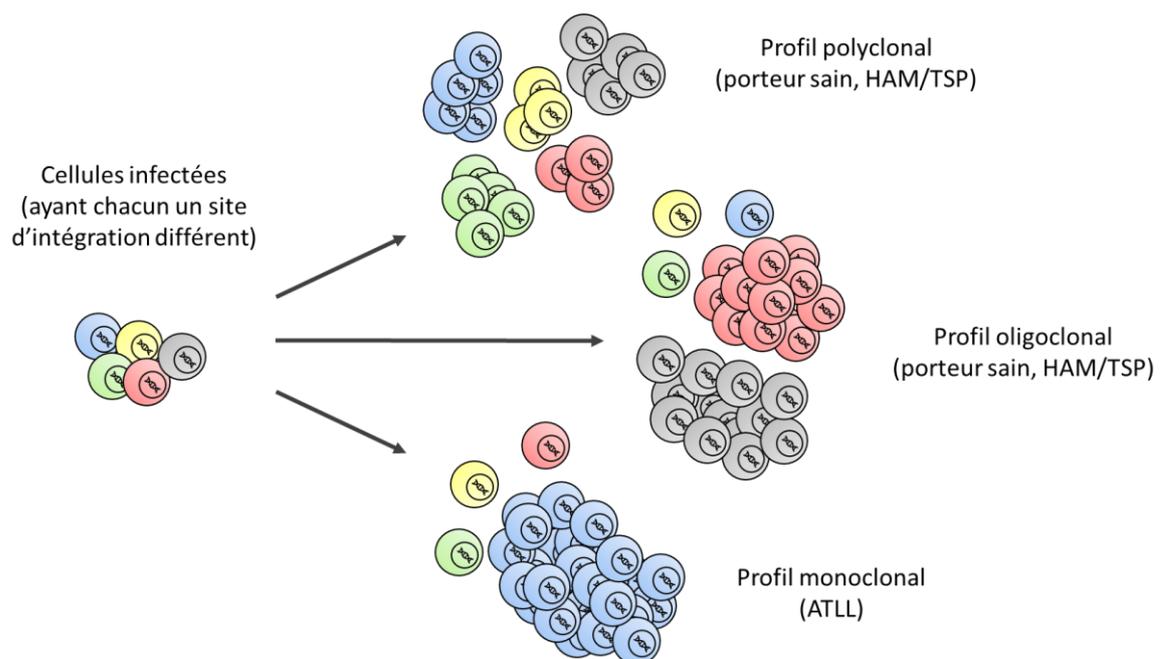


Figure 22: Les différents profils de clonalité de HTLV-1. Les cellules primo-infectées et infectées de novo par transmission cellule à cellule comportent chacune un site d'intégration unique du provirus (caractérisé par une couleur de cellule différente). Lors de l'expansion clonale de cellules infectées, plusieurs profils de clonalité seront observés, selon la propension de chaque clone à proliférer. Les porteurs asymptomatiques et les patients atteints de HAM/TSP se caractérisent par un profil polyclonal (de nombreux clones d'ampleur comparable) ou oligoclonal (de nombreux clones dont plusieurs d'ampleur majoritaire). Les patients atteints d'ATLL sont caractérisés par un profil monoclonal (un clone unique très largement majoritaire).

Ces données indiquent que l'ATLL survient à partir de la transformation maligne d'un unique clone cellulaire infecté, parmi les autres clones constituant la charge proviral de l'individu infecté (). L'expansion clonale repose sur des mécanismes complexes de perturbations géniques, en grande partie générées par les protéines régulatrices virales dont les oncogènes Tax et HBZ et leurs partenaires cellulaires. Ces mécanismes s'opèrent dans un contexte de forte instabilité génomique, médié par Tax et HBZ, et participent à la transformation des cellules infectées et développement de l'ATLL ([Kataoka et al., 2015](#); [Kogure and Kataoka, 2017](#)). Le rôle de Tax dans l'activation de la voie NF- κ B et son impact sur la transformation maligne sera particulièrement décrit dans ce mémoire de thèse. Cependant, HBZ est également impliquée dans de nombreux mécanismes de l'infection et de la pathogenèse associée à HTLV-1 ([Zhao, 2016](#)). L'expression de Tax est souvent perdue dans les cellules d'ATLL par des phénomènes de méthylation, de mutations de la séquence codante, ou de délétions du LTR 5' ([Takeda et al., 2004](#)). Cependant, des travaux récents ont montré que Tax peut être retrouvée exprimée de façon transitoire, sous forme de « bursts ». La perte totale de l'expression de Tax dans les cellules tumorales induit par ailleurs l'apoptose des cellules ([Billman et al., 2017](#); [Mahgoub et al., 2018](#)). Cela suggère donc un rôle central de Tax tant dans les processus d'initiation de la leucémogénèse que dans le développement de l'ATLL.

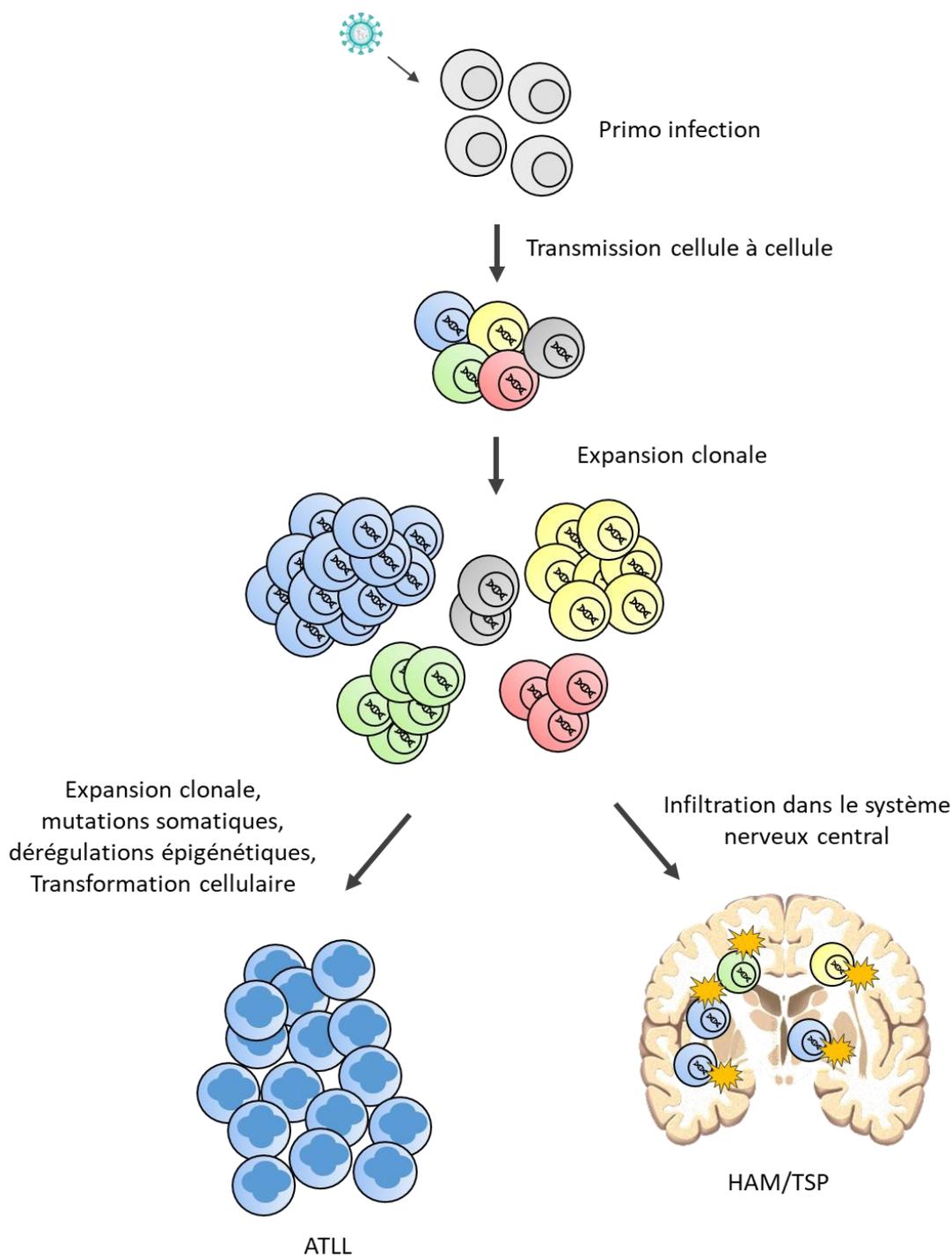


Figure 23 : Schéma des grandes étapes de l'infection par HTLV-1 et du développement de l'ATLL et de l'HAM/TSP. Après la primo infection des lymphocytes T, le virus se transmet via un contact cellule à cellule. En résulte de nombreux clones (cellules portant un site d'intégration unique, représentés par des cellules de couleurs différentes), qui prolifèrent par expansion clonale. L'accumulation de dérégulations épigénétiques et des mutations somatiques peut mener à l'immortalisation d'un clone, menant à l'ATLL. Les cellules infectées peuvent également s'infiltrer dans le système nerveux central et aboutir à son inflammation chronique, menant au développement de l'HAM/TSP.

c. L'oncoprotéine Tax

i. Généralités et interactôme

Tax est une protéine composée de 353 acides aminés (40 kDa), qui comporte de nombreux domaines d'interaction, lui permettant d'interagir avec de nombreuses protéines cellulaires (Figure 24). Tax joue un rôle majeur dans la pathogénicité de HTLV-1. En effet, Tax est capable *in vitro* d'immortaliser des cellules T (Robek and Ratner, 1999). *In vivo*, elle induit des tumeurs et un phénotype proche de l'ATLL chez des souris transgéniques (Grossman et al., 1995; Hasegawa et al., 2006). Il a été proposé que le pouvoir oncogène de Tax repose sur la large composition de son interactôme et sa capacité à altérer les fonctions et les voies de signalisation cellulaire. Tax altère de nombreux mécanismes essentiels à l'homéostasie de la cellule tels que le cycle cellulaire, la réparation des dommages à l'ADN ou encore l'apoptose et la prolifération (Boxus et al., 2008). Tax est par ailleurs la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles qui permettent de moduler la fonction de Tax, sa localisation, et son action sur son interactôme (Martella et al., 2022; Shirinian et al., 2013).

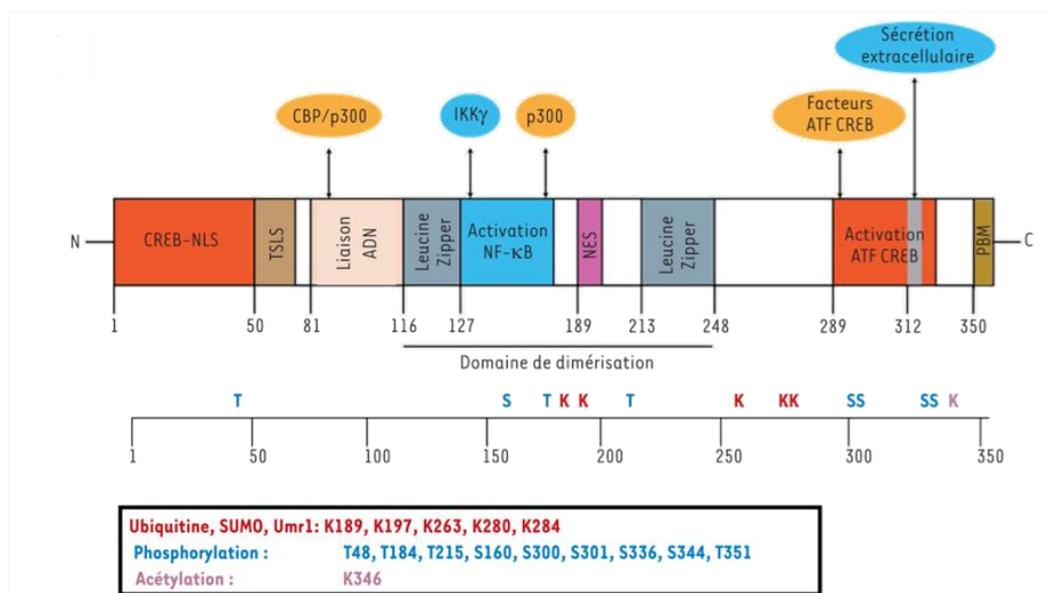


Figure 24 : Structure et domaines de la protéine Tax-1. La protéine Tax présente de nombreux domaines, notamment permettant sa dimérisation (Leucine zipper), sont import nucléaire (NLS, Nuclear localization signal) ou son export nucléaire (NES, nuclear export signal), sont ciblage dans les Tax bodies (TSLS, Tax speckles localization signal). Tax est également composé de domaines d'interaction à de nombreux facteurs cellulaires comme CBP/p300, ATF ou IKK γ , ou PBM (PDZ-binding motif). Tax est également la cible de nombreuses modifications post traductionnelles sur l'ensemble de sa séquence protéique (les résidus cibles de modifications et la nature de leurs modifications sont représentées sur l'axe de la séquence protéique et dans l'encadré). D'après Martella et al., 2022.

ii. Apoptose, cycle cellulaire et instabilité génomique

Tax est capable d'induire l'expression de plusieurs gènes anti-apoptotiques, comme les gènes *BCLX*, *cFLIP*, *survivin*, *xIAP*, *clAP1* et *clAP2*, de façon dépendante à l'activation de la voie NF- κ B. De plus Tax induit directement une résistance à l'apoptose, à travers notamment l'inactivation de p53 (Bernal-Mizrachi et al., 2006; Pise-Masison et al., 2000). Tax induit également la prolifération cellulaire via son rôle dans diverses voies contrôlant le cycle cellulaire (Figure 25). Tax interagit (directement ou non) avec plusieurs kinases dépendantes des cyclines (Cyclin-Dependant Kinases ou CDK) et leurs cyclines ou inhibiteurs associés, et est capable de réguler leur expression. Par exemple, Tax renforce l'interaction entre CDK4/CDK6 et la Cycline D2, tout en stimulant l'expression de la Cycline D2 (Fraedrich et al., 2005; Iwanaga et al., 2008). Ces CDK régulent le cycle cellulaire, et notamment le passage de la phase G1 à la phase S. Ainsi, en interagissant avec les cyclines/CDK, Tax promeut une prolifération cellulaire tout en altérant le cycle cellulaire, notamment via l'activation de la voie NF- κ B. En plus d'induire la prolifération cellulaire, Tax altère les points de contrôle du cycle cellulaire en interagissant avec les protéines Chk1 et Chk2 (Marriott and Semmes, 2005). De plus, Tax interagit avec le complexe APC (Anaphase Promoting Complex) (Kuo and Giam, 2006) et induit un passage précoce en anaphase pouvant induire des défauts de ségrégation des chromatides sœurs et donc des aberrations mitotiques comme l'aneuploïdie, qui est retrouvée dans les cellules infectées par HTLV-1. L'ensemble de ces perturbations induites par Tax contribue à la déstabilisation génomique et à la transformation cellulaire associées à HTLV-1.

Les cellules infectées par HTLV-1, *in vivo* ou *in vitro*, présentent de nombreuses anomalies chromosomiques telles que des délétions, des réarrangements chromosomiques, des duplications, translocations, ou de l'aneuploïdie (Fujimoto et al., 1999). Ces altérations peuvent s'accumuler dans les cellules infectées, en partie par la capacité de Tax à inhiber les mécanismes de réparation à l'ADN. Tax active le promoteur du gène PCNA (proliferating cell nuclear antigen), qui est un facteur influençant le passage de la polymérase au travers des lésions à l'ADN lors de la réplication (Kao and Marriott, 1999). La surexpression de PCNA augmente la processivité de l'ADN polymérase δ , qui est alors capable de polymériser au travers de lésions d'ADN (Mozzherin et al., 1997). Tax est également responsable de l'inhibition du mécanisme de réparation par excision de base (Base Excision Repair, ou BER) en réprimant

l'expression de l'ADN polymérase β (Jeang et al., 1990; Philpott and Buehring, 1999). Tax induit également des cassures double brins (Double Strand Break, ou DSB), par la formation d'espèces réactives de l'oxygène générées lors de l'activation chronique de la voie NF- κ B et la réplication (Baydoun et al., 2015, 2012; Kinjo et al., 2010). Tax influencerait également une attrition télomérique précoce par l'inhibition de l'expression de la sous-unité catalytique hTERT de la Télomérase, ce qui se traduit par une diminution de l'activité télomérase qui pourrait expliquer la présence de pont chromatiniens et de fusions télomériques fréquemment observées dans les cellules T-CD4+ infectées (Escoffier et al., 2005; Gabet et al., 2003).

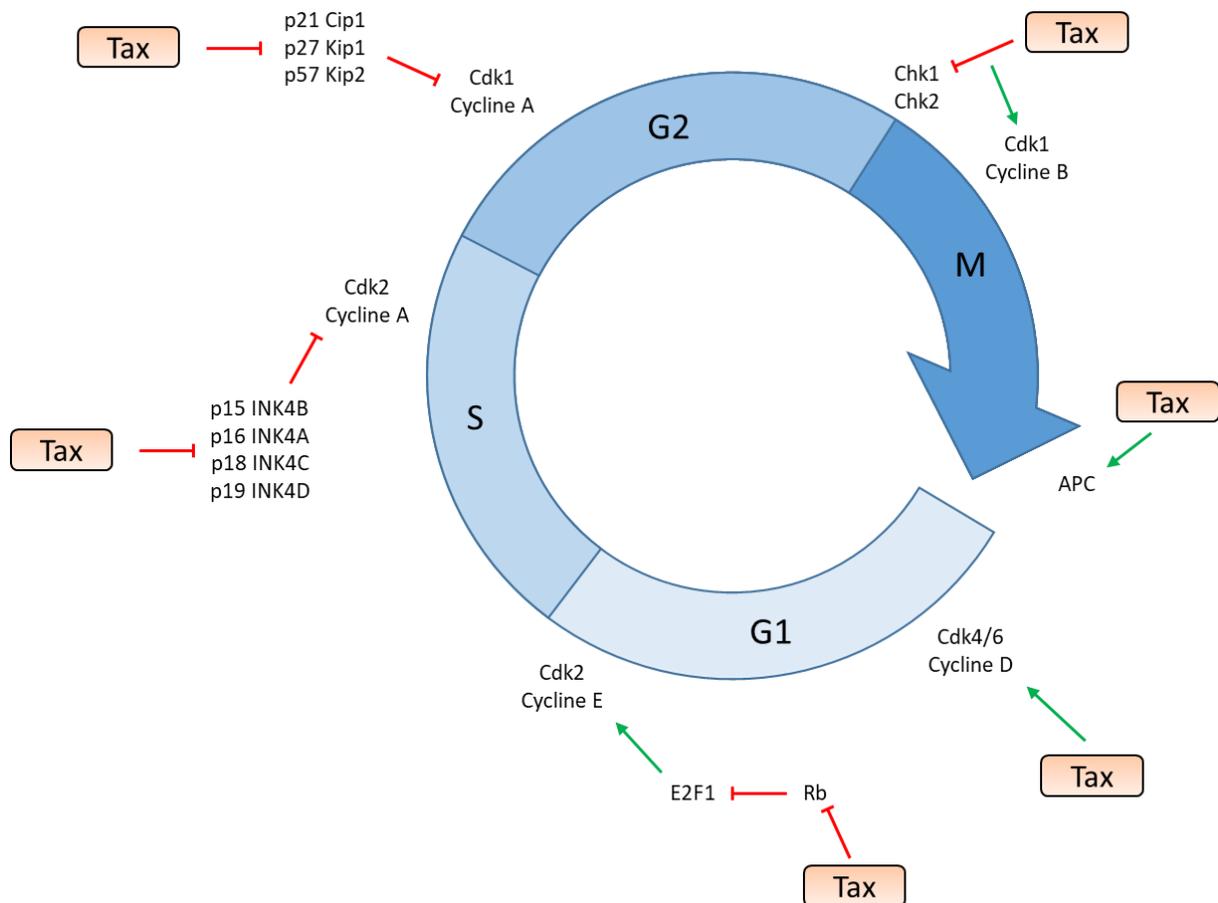


Figure 25: Schéma des effets de Tax sur la progression du cycle cellulaire. Les effets stimulateurs de Tax sont représentés en vert, et les effets inhibiteurs en rouge.

iii. Transactivation des gènes viraux et cellulaires par Tax

1. Transactivation du LTR de HTLV-1 par Tax

Tax joue un rôle clé dans la régulation de l'expression des gènes viraux, étant responsable de la transactivation du LTR (Felber et al., 1985), bien qu'il ne puisse pas fixer directement l'ADN. Trois répétitions de 21 pb situées dans la partie U3, nommées TxRE (pour Tax Responsive Elements), sont nécessaires pour l'activation du LTR par Tax. Les TxRE comportent une séquence homologue aux site consensus cAMP-responsive element (CRE), fixé par les facteurs de transcription CREB/ATF (CRE-binding/activating transcription factors) dont Tax facilite le recrutement et stabilise la fixation (Anderson and Dynan, 1994). De façon intéressante, Tax, en plus de recruter CREB, stimule son activité transcriptionnelle en détournant la machinerie de O-GlcNAcylation, et en induisant ainsi la O-GlcNAcylation de CREB, qui permet une transactivation plus forte du LTR qu'un mutant ne pouvant pas subir cette modification post-traductionnelle (Groussaud et al., 2017). Le complexe Tax-CREB-TxRE ainsi formé permet le recrutement des co-activateurs CBP (CREB binding protein), p300, et P/CAF (p300/CBP-associated factor) (Geiger et al., 2008; Jiang et al., 1999; Vendel et al., 2003). Grâce à l'acétylation des histones, ce complexe entraîne le recrutement de la machinerie de transcription nécessaire à la transcription des gènes viraux depuis le LTR (Figure 26). Des analyses de CHIP ont également révélé la présence de plusieurs facteurs de la famille ATF/CREB et AP-1 au niveau du LTR de HTLV-1 dans des cellules T infectées, et démontré la présence d'histones H3 et H4 acétylées (Bogenberger and Laybourn, 2008). Des études *in vitro* ont démontré que le recrutement de CBP/p300 par le complexe Tax/CREB permet non seulement une acétylation des histones H3, H4, H2A/H2B, mais également l'éviction des nucléosomes de l'ADN par l'action de l'histone chaperonne NAP1 (Nucleosome Assembly Protein 1) (Lemasson et al., 2006; Sharma and Nyborg, 2008). Une éviction des nucléosomes permettrait ainsi le recrutement des facteurs généraux de transcription et de la mise en place du complexe de pré-initiation transcriptionnelle.

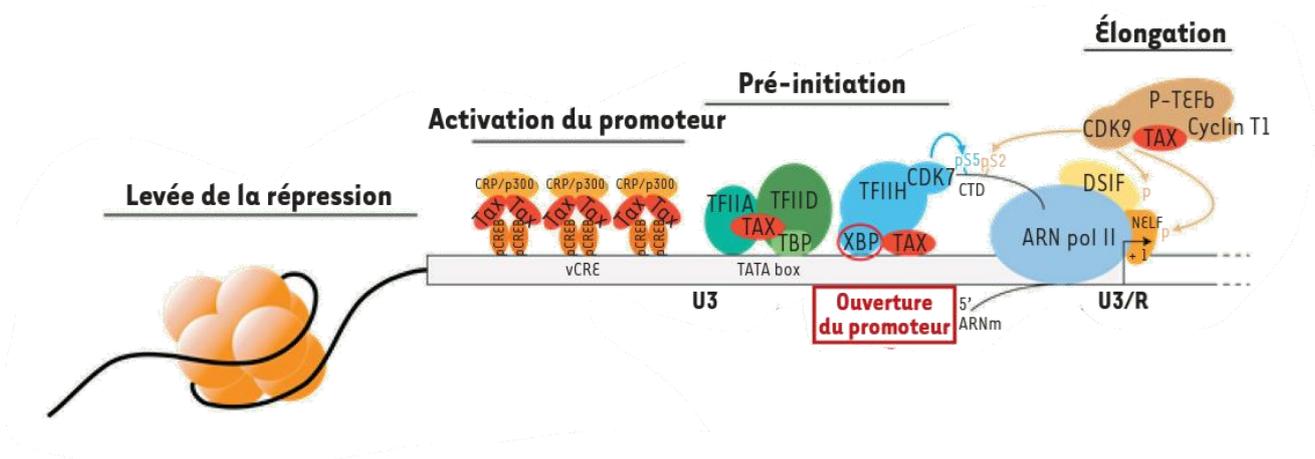


Figure 26 : transactivation du LTR de HTLV-1 par Tax. Tax interagit avec des remodeleurs chromatinienens tels que des HDAC et HMT, afin de lever la répression transcriptionnelle. Tax induit le recrutement au niveau du LTR des facteurs de transcription CREB/ATF ainsi que de remodeleurs chromatinienens supplémentaires tels que SWI/SNF, P/CAF ou CBP/p300 afin d'activer le promoteur du LTR. Additionnellement, Tax interagit avec des facteurs généraux de transcription tel que TFIID et avec l'ARNPII directement. Suite à la pause promoteur-proximale, Tax recrute P-TEFb, qui va induire la phosphorylation du CTD en sérine 2 et 5, permettant une élongation processive du génome proviral. D'après Martin et al., 2016.

2. Tax interagit avec de nombreux facteurs de transcription

Tax est capable d'interagir avec de nombreux facteurs de transcription cellulaires pour modifier l'expression des gènes cellulaires. En plus d'activer le LTR, Tax est également capable de recruter CREB (sous sa forme phosphorylée) et CBP au niveau de sites CRE de gènes cellulaires, lorsque la voie PKA est activée (Kwok et al., 1996). Certains gènes cellulaires sont par ailleurs réprimés par Tax au travers des facteurs CREB/ATF, tels que la *cycline A*, *c-myc*, ou également *p53* (Kibler and Jeang, 2001; Mulloy et al., 1998; Semmes et al., 1996). Tax interagit directement avec des facteurs de la famille ATF également, comme ATF-4 (Reddy et al., 1997).

Tax coopère avec SRF (Serum responsive factor) et des facteurs TCF (Ternary complex factor) comme Elk-1 ou SAP-1, modifiant l'expression de gènes avec des motifs SRE (Serum Responsive Element), comme les gènes *c-Jun* ou encore l'oncogène *c-fos* (Curren et al., 2012; Fujii et al., 1994). Tax renforce la fixation de SRF sur les motifs SRE, permettant une fixation sur des boîtes CARG de séquences plus divergentes (Winter and Marriott, 2007). Ceci souligne la capacité de Tax de non seulement activer des gènes cellulaires par sa coopération avec des facteurs de

transcription, mais d'induire un profil de réponse spécifique, en modulant la distribution de SRF.

Tax active de nombreux gènes de la famille des facteurs de transcription AP-1 tels que *c-Jun*, *JunD*, ou *c-Fos*, au travers de l'activation des sites AP-1 de ces gènes. Tax est en effet capable d'activer la transcription de gènes rapporteurs sous le contrôle de sites AP-1 ou d'une coopération entre les sites κ B et AP-1 (Iwai et al., 2001). Par exemple, le gène *IL-8* comporte à la fois un site κ B et AP-1 dans son promoteur, et la mutation de l'un ou l'autre de ces sites suffit à rompre l'activation Tax-dépendante de ce gène, tandis qu'une construction comportant un dimère de sites AP-1 permet une transcription Tax-dépendante (Mori et al., 1998). Ces données montrent que l'activation de certains gènes par Tax nécessite l'activation de plusieurs voies, et la fixation concomitante de plusieurs facteurs de transcription de familles différentes au sein d'un même promoteur pour induire la transcription des gènes. L'activation de gènes nécessite bien souvent l'intégration de plusieurs signaux et la fixation de plusieurs facteurs de transcription sur un même promoteur. L'intégration de la fixation de ces multiples facteurs semble donc jouer un rôle important dans la régulation des gènes cellulaires également par Tax. En effet, Tax cible de nombreux autres facteurs de transcription, interagissant avec NF-YB, C/EPB β , Sp1 et Egr1, activant des gènes cellulaires tels qu'*IL-1 β* et le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (Dittmer et al., 1997; Nadella et al., 2008; Pise-Masison et al., 1997; Tsukada et al., 1997). Enfin, Tax interagit avec des acteurs généraux de la transcription, tels que TFIIA, TFIID, TFIIF, CDK9 et la cycline T1, facilitant le recrutement de l'ARNPII et stimulant la transactivation du LTR (Caron et al., 1993; Cho et al., 2007; Clemens et al., 1996; Martella et al., 2020; Zhou et al., 2006).

3. Tax et les facteurs de remodelage de la chromatine

a. HAT/HDAC

En dehors de ses interactions directes avec des facteurs de transcription, Tax est capable d'altérer l'expression des gènes au travers de ses multiples interactions avec des facteurs de remodelage de la chromatine. En effet, comme décrit plus tôt, Tax interagit avec plusieurs HAT, comme p300/CBP et P/CAF (p300/CBP Associated Factor) (Jiang et al., 1999).

De façon intéressante, des études réalisées par CHIP des lignées intégrant un gène rapporteur sous le contrôle du LTR de HTLV-1 ont montrées que Tax et les HDAC1, -2 et -3 sont mutuellement exclusifs sur le promoteur viral (Lemasson et al., 2004). En effet, l'expression de Tax diminue la fixation de HDAC (-1, -2 et -3) présente sur le LTR inactif. Tax est capable d'interagir directement avec le répresseur HDAC-1, et de le décrocher du promoteur afin de permettre la transcription du LTR (Ego et al., 2002; Lu et al., 2004). Outre le LTR, Tax permet le recrutement HDAC-1 au niveau de promoteurs cellulaires, comme celui de *SHP-1*, où ce complexe permet de décrocher les facteurs NF- κ B préalablement fixés, et d'induire la répression du gène (Cheng et al., 2007). Tax est donc capable d'induire une activation ou une répression des gènes cellulaires en fonction des facteurs et des gènes cibles.

b. HMT/HDM

Tax interagit avec d'autres enzymes de modification des histones tels que les HMT SUV39H1 (suppressor of variegation 3–9 homologue 1) et CARM1 (coactivator-associated arginine methyltransferase), (Jeong et al., 2006). SUV39H1 induit des méthylations H3K9, marque répressive. Elle est retrouvée surexprimée à la fois dans des cellules exprimant Tax et dans des lignées infectées par HTLV-1 où elle induit la répression du LTR (Kamoi et al., 2006). Ces données suggèrent que Tax induit sa propre répression via SUV39H1, ce qui selon les auteurs permettrait de jouer un rôle de rétrocontrôle négatif afin de limiter l'expression des gènes de HTLV-1 et participer à son échappement au système immunitaire. A l'inverse, l'interaction de CARM1 avec Tax permet de faciliter son recrutement sur le LTR, d'induire une méthylation de H3 sur les arginines 2, 17 et 29, qui sont des marques activatrices de transcription, et résulte donc dans une activation du LTR.

Outre les interactions de Tax avec des enzymes de modification d'histones, il a été démontré dans plusieurs lignées chroniquement infectées par HTLV-1, mais également dans des cellules T non infectées mais exprimant Tax, une baisse du niveau d'histone global, à la fois au niveau transcriptionnel et protéique (Bogenberger and Laybourn, 2008). Une réduction globale d'histones permettrait ainsi d'affecter la transcription d'un nombre très important de gènes.

c. SWI/SNF

Tax interagit avec plusieurs facteurs du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (BAF53, BAF57, BAF155 et BRG1) (Wu et al., 2004). Plus particulièrement, BRG1 est nécessaire à la transactivation du LTR de HTLV-1 par Tax. Des lignées présentant une absence ou un faible niveau d'expression de BRG1 montrent peu ou pas d'activation du LTR en présence de Tax, mais cet effet peut être inversé lorsque BRG1 est exprimé de façon ectopique. Ces données sont en accord avec une baisse d'histones observée au niveau du LTR, évincées par le complexe SWI/SNF (Easley et al., 2010; Lemasson et al., 2006). Cependant, il y a des divergences concernant la présence de BRG1 au niveau du LTR. BRG1 apparaît enrichi dans des expériences de CHIP dans des lignées 293T transfectées par un clone moléculaire de HTLV-1 activé par TNF α , mais sa fixation semble diminuer lors de l'expression de Tax dans une autre étude utilisant des CHOK1-Luc intégrant le LTR de HTLV-1. D'autres données montrent une transactivation du LTR de HTLV-1 par Tax en absence de BRG1, sans exclure une possible participation de BRG1 et du complexe SWI/SNF dans le remodelage de la chromatine au niveau du LTR (Zhang et al., 2006).

4. Dérégulations des voies de signalisation par Tax

Tax établit des interactions avec les acteurs de nombreuses voies de signalisation (Figure 27).

a. La voie PI3K/Akt et AP-1

La voie PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) est une voie de signalisation impliquée dans la prolifération, la survie, le métabolisme, et la croissance cellulaire. Elle est activée par une multitude de stimuli qui mènent à l'activation de divers récepteurs dont les RTK (receptor tyrosine kinases). Une cascade de signalisation s'en suit menant à l'activation de Akt par sa phosphorylation (Hemmings and Restuccia, 2012) qui induit l'activation de nombreux facteurs de transcription, tels qu'AP-1. Tax interagit avec la sous-unité régulatrice p85 α de PI3K,

résultant en une déstabilisation du complexe formé par p58a et p110a qui mène à l'activation de Akt et AP-1 (Peloponese and Jeang, 2006; Ueki et al., 2002). AP-1 est retrouvée chroniquement activée dans des cellules d'ATLL et apparaît nécessaire à la transformation de cellules murines par Tax (Sun and Ballard, 1999). Notamment, dans un clone non transformé exprimant Tax, la stimulation de la voie AP-1 permet sa transformation. De façon consistante, les clones transformés par Tax présentent une importante activité PI3K (Liu et al., 2001).

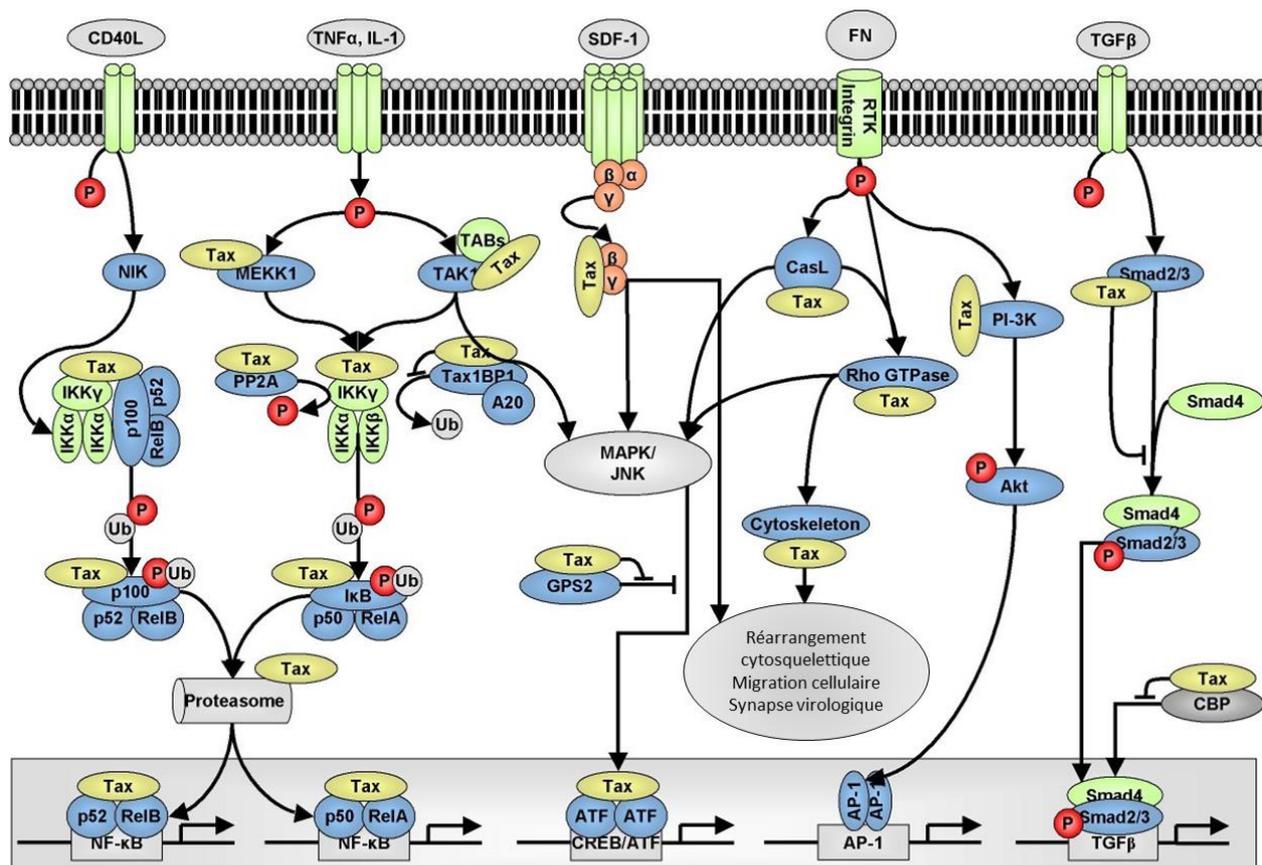
b. La voie TGF- β /SMAD

La voie TGF- β (Transforming growth factor- β) joue un rôle important dans le contrôle de la prolifération et l'activation des cellules T. Cette voie se caractérise par la fixation des ligands TGF- β sur des récepteurs sous forme de complexe oligomériques (Tzavlaki and Moustakas, 2020). Le signal est transduit par une cascade de phosphorylation via les protéines médiatrices SMAD, jusqu'à l'activation transcriptionnelle par les facteurs de transcription SMAD, activant les gènes comportant des éléments de réponse à SMAD. Le *TGF- β 1* est retrouvé surexprimé dans des lignées cellulaires T infectées par HTLV-1, ainsi que chez des patients atteints d'ATLL (Kim et al., 1990). Le gène *TGF- β 1* est transactivé par Tax car il comporte des sites AP-1 sur son promoteur. A l'inverse, Tax interagit avec plusieurs protéines Smad (Smad2, Smad3, Smad4) et déstabilise la formation de complexes entre les protéines Smad et inhibe leur fixation à l'ADN, empêchant la réponse des gènes cibles de la voie (Lee et al., 2002). Bien qu'une autre étude n'ait pas observée l'interaction Tax:Smad3, celle-ci montre que Tax, en induisant c-Jun, permet la formation de complexe c-Jun:Smad3, séquestrant ce dernier et inhibant sa fixation à l'ADN (Arnulf et al., 2002). Les facteurs Smad étant incapables de se fixer aux promoteurs et d'activer la transcription des gènes cibles de la voie, les cellules T infectées par HTLV-1 ou exprimant Tax deviennent insensibles à la voie TGF- β /SMAD.

c. La voie des MAP kinases

Les Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK) sont des kinases répondant à une multitude de stimuli externes comme le stress, les cytokines, ou les facteurs de croissance (Morrison, 2012). Cette voie repose également sur une cascade de phosphorylation au travers des MAP kinase kinase kinases (MAPKKK), phosphorylant les MAP kinase kinases (MAPKK) pour enfin activer les MAPK (Figure 27). Cette voie est impliquée dans les mécanismes de prolifération, de différenciation et de mort cellulaire. Trois familles de MAPK existent : les JNK (Jun amino-

terminal kinases), les ERK (extracellular-signal-regulated kinases) et enfin les p38/SAPK (stress-activated protein kinases). En amont de la voie, Tax interagit avec deux MAPKKK, respectivement MEKK1 et TAK1 (Yin et al., 1998). L'interaction de Tax avec MEKK1 stimule son activité kinase. MEKK1 ayant pour cible non seulement des MAPKK, mais présentant également un crosstalk avec la voie NF- κ B, la stimulation de MEKK1 par Tax induit une stimulation de l'activité kinase de IKK β , induisant une phosphorylation et la dégradation de l'inhibiteur de la voie NF- κ B I κ B α , résultant en une activation de la voie NF- κ B (Jin et al., 1997). L'interaction de Tax avec TAK1 stimule l'interaction entre TAK1 et IKK, stimulant ce dernier et activant la voie NF- κ B, et stimule également l'activation de JNK et ATF2 (Suzuki et al., 2007; Wu and Sun, 2007). Cependant, la déplétion de MEKK1 ou TAK1 n'a pas d'impact sur l'activation de la voie NF- κ B, suggérant que la voie MAPK n'est pas indispensable à l'activation de la voie NF- κ B, stimulée par ailleurs par Tax (Gohda et al., 2007). Tak1 est également activé de façon constitutive dans les cellules T infectées par HTLV-1, comme la voie JNK qui est aussi retrouvée activée dans les ATLL (Xu et al., 1996). Tax interagit également avec GPS2, un inactivateur de JNK, et empêche son inhibition, participant à l'activation de JNK (Jin et al., 1997).



Régulation transcriptionnelle
Activation, prolifération et survie cellulaire

Figure 27 : Schéma des voies de signalisation impactées par Tax. Tax interagit dans le cytoplasme avec une multitude de protéines adaptatrices et des effecteurs de la voie NF-κB, MAPK/JNK, AP-1, PI3K/Akt et AP-1, TGF-β/SMAD. Tax interagit également dans le noyau avec de nombreux facteurs de transcription comme les facteurs NF-κB ou ATF. Avec toutes ces interactions, Tax va moduler l'expression des gènes cellulaires afin d'induire la prolifération cellulaire, l'inflammation cellulaire, ainsi que les réarrangements du cytosquelette, la migration cellulaire, la formation de synapses virales et l'immortalisation cellulaire. D'après Boxus et al., 2008.

d. Tax et la voie NF- κ B, pierre angulaire de la pathogénie du HTLV-1

i. Généralités

La voie de signalisation NF- κ B est impliquée dans diverses fonctions cellulaires telles que la prolifération et la survie cellulaire, l'apoptose, la réponse immunitaire ou inflammatoire. Son activation chronique est fréquemment reliée à des processus oncogènes. Elle est activée par une multitude de stimuli (plus de 150) parmi lesquels l'activation de la voie SRF, des cytokines, le TNF α (Tumor Necrosis Factor- α), ou encore des LPS (lipopolysaccharides) et des infections bactériennes ou virales, comme HTLV-1. Elle régule l'expression de plus de 100 gènes répondeurs à cette voie tels que des chemokines, molécules d'adhésion ou protéines anti-apoptotiques (Brasier, 2006; Pahl, 1999). Bien que les facteurs NF- κ B soient exprimés de façon ubiquitaire, la réponse engendrée par l'activation de la voie est tissu- et stimuli-spécifique.

Les facteurs de transcription NF- κ B sont constitués de 5 membres : p50(NF- κ B1) et p52(NF- κ B2) tous deux dépourvus de domaine de transactivation, qui sont maturés de façon protéolytique à partir de leurs précurseurs respectifs p105 et p100 ; et p65/RelA(p65), c-Rel et RelB, qui sont tous trois des activateurs transcriptionnels (Figure 28). Ces facteurs comportent tous un domaine RHD (Rel Homology Domain), permettant leur homo- et hétéro-dimérisation en différents NF- κ B. Ces facteurs se fixent alors à l'ADN sur les gènes cibles comportant des éléments de réponse κ B. En amont des facteurs NF- κ B, au niveau cytoplasmique, se trouvent les protéines I κ B, inhibiteurs de la voie, ainsi que leurs kinases, les IKK (I κ B kinase). Cette voie se décompose en deux sous-voies distinctes selon leur mode d'activation: la voie canonique, activant principalement le dimère p65/RelA:p50, et la voie non-canonique, impliquant principalement le dimère RelB :p52, bien qu'une multitude de dimères NF- κ B existent pour les deux voies. Ces deux voies sont activées par des ligands et des stimuli distincts et, en raison des facteurs NF- κ B différents sur lesquels elles reposent, elles ciblent des gènes différents.

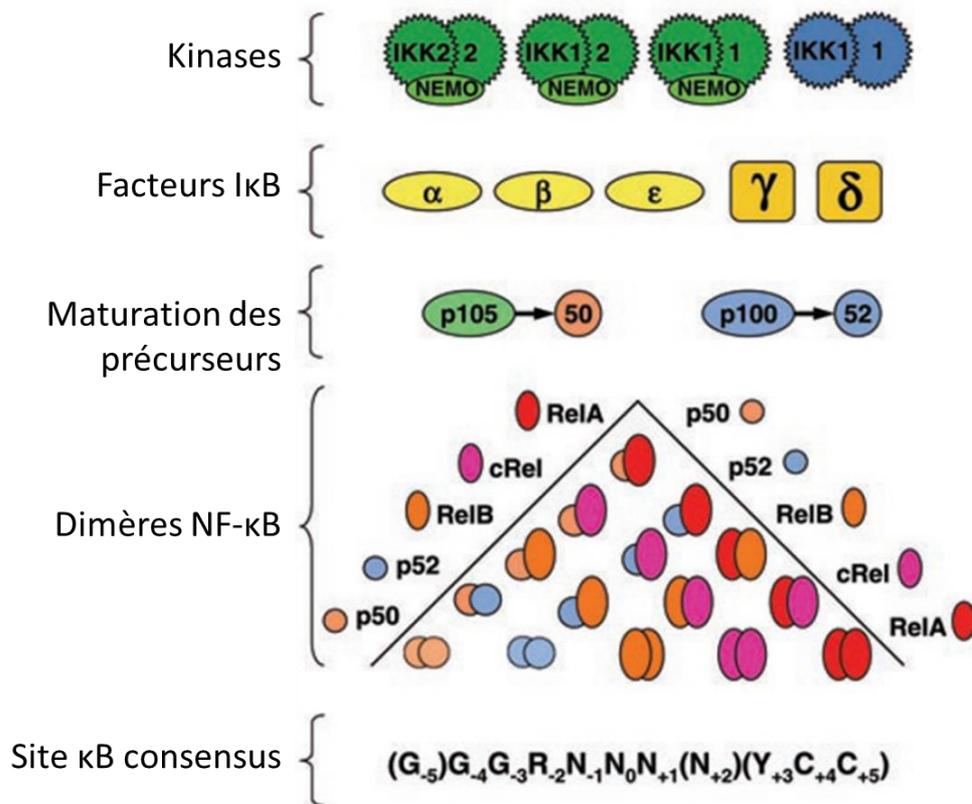


Figure 28 : les acteurs de la voie NF-κB. Les complexes IKK (IκB kinase) sont composés pour la voie canonique (vert) de la sous-unité régulatrice IKKγ (NEMO) et d'un homo- ou hétéro-dimère de IKKα(IKK1) et IKKβ(IKK2), les sous-unités catalytiques du complexe IKK. Pour la voie non-canonique, le complexe IKK (bleu) est composé d'un homodimère IKKα(IKK1). Les complexes IKK induisent la phosphorylation des protéines IκBs pour la voie canonique ou la protéolyse de p100 en p52. Les protéines IκB sont composées de IκBα mais aussi de IκBβ et IκBε, qui séquestrent les facteurs NF-κB dans le cytoplasme pour la voie canonique. Les facteurs NF-κB sont composés de p65/RelA/p65, RelB, c-Rel, et des facteurs p50 et p52, maturés par protéolyse à partir des précurseurs p105 et p100. Ces 5 facteurs s'organisent ensuite en homo- et hétérodimères ayant la capacité de se fixer à de nombreux sites κB plus ou moins dégénérés par rapport à la séquence consensus. Adapté d'après Shih et al., 2011.

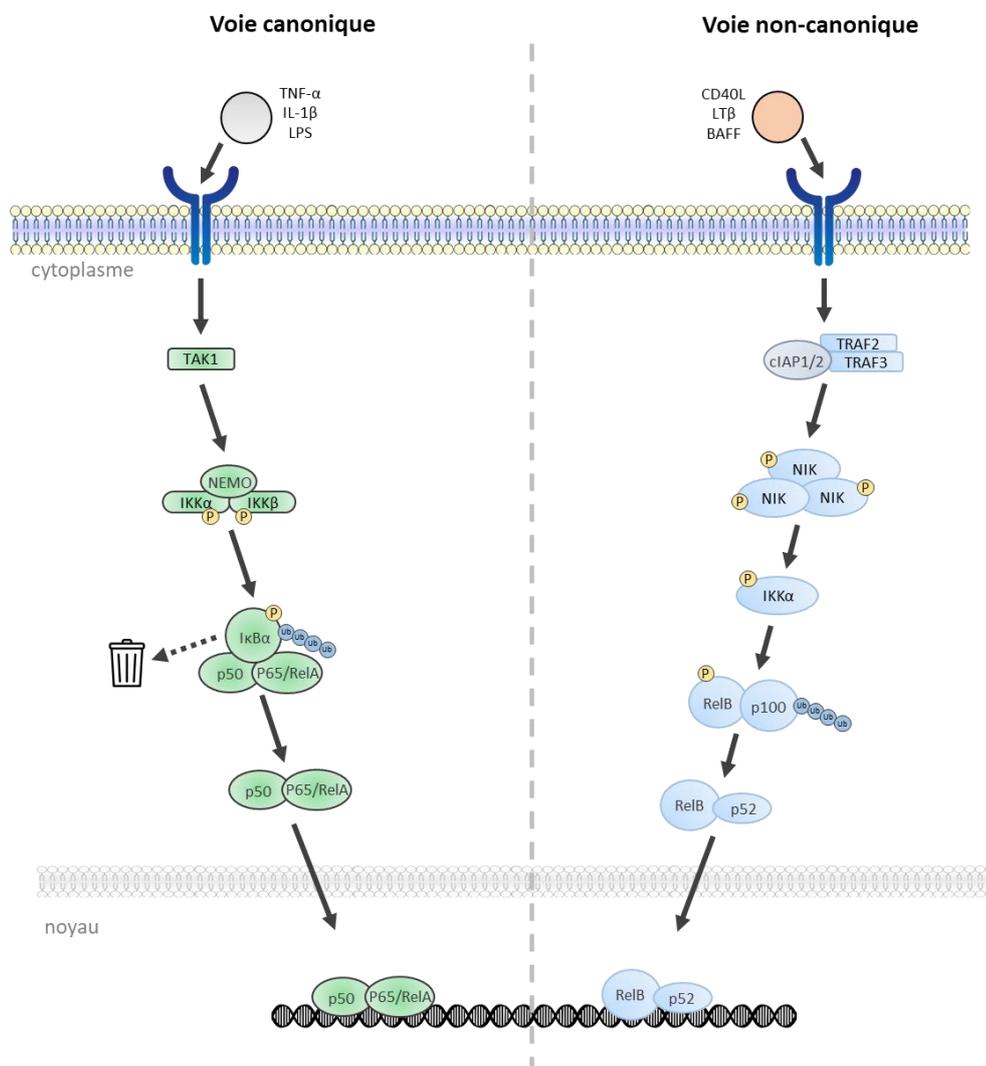
ii. Les différentes voies NF- κ B

Figure 29 : Schéma d'activation des voies canoniques et non-canoniques de NF- κ B. (A) La voie canonique est stimulée par la reconnaissance de ligands pro-inflammatoires, activant la protéine adaptatrice TAK1, qui va entraîner la phosphorylation du complexe IKK (IKK α , IKK β , IKK γ). IKK activé va à son tour entraîner la phosphorylation de I κ B α qui va être adressé au protéasome pour être dégradé, et permettre la translocation du dimère NF- κ B (majoritairement composé de p65/RelA/p50), qui va pouvoir se fixer sur ses sites cibles. (B) La voie non-canonique est stimulée par d'autres ligands, qui vont entraîner l'activation d'un complexe adaptateur composé de protéines TRAF (TNF Receptor-Associated Factor), qui va induire l'accumulation de la kinase NIK sous sa forme phosphorylée. NIK va à son tour phosphoryler IKK α , qui va induire la phosphorylation, l'ubiquitinylation et le clivage de p100 en p52. Le dimère NF- κ B RelB/p52 va ensuite transloquer et se fixer lui aussi sur ses cibles afin d'induire la transcription. Adapté d'après Lu et al., 2021.

1. La voie canonique

En absence de stimuli, le dimère NF- κ B (majoritairement formé de p65/RelA:p50 pour la voie canonique) est séquestré dans le cytoplasme par I κ B α , un facteur de la famille des inhibiteurs I κ B. I κ B α interagit avec p65/RelA grâce à son domaine ARD (Ankyrin Repeats Domain) et masque son signal de localisation nucléaire (NLS, pour Nuclear Localization Signal). La voie canonique est activée par différents stimuli dont des composants microbiens (comme le LPS) et des molécules pro-inflammatoires (telles que le TNF- α ou IL-1). Une cascade de protéines adaptatrices induit alors l'activation de la kinase TAK1, phosphorylant le complexe IKK, composé pour la voie canonique des sous-unités catalytiques IKK α (IKK1) et IKK β (IKK2) ainsi que la sous-unité régulatrice IKK γ (NEMO) (Figure 29.a). Le complexe IKK va alors phosphoryler l'inhibiteur I κ B α et induire son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome, ce qui va permettre l'exposition du signal de localisation nucléaire (NLS). L'import nucléaire de p65/RelA va permettre un enrichissement des séquences cibles en ce facteur de transcription et la régulation transcriptionnelle des gènes cibles. La voie canonique est caractérisée par une réponse transcriptionnelle rapide et transitoire.

2. La voie non-canonique

La voie NF- κ B non canonique quant à elle est activée par des cytokines de la famille TNF (hormis le TNF- α), telles que BAFF (B cell activating factor), TNSF3 (lymphotoxine β) ou encore RANKL (Receptor activator of NF- κ B). Cette voie alternative se caractérise par l'activation de la kinase NIK (NF- κ B inducing kinase), qui est indispensable à la voie non-canonique, et qui en retour va induire la phosphorylation du complexe IKK composé pour cette voie de IKK α uniquement (Figure 29.b). IKK α va alors induire la phosphorylation du précurseur p100, stimulant son ubiquitinylation et sa maturation par clivage en p52. Le dimère NF- κ B mûré (composé principalement de p52:RelB pour la voie non-canonique) va alors transloquer dans le noyau, et de la même façon que la voie canonique va pouvoir se fixer sur les sites κ B cibles.

3. Boucle de rétrocontrôle et oscillation temporelle

La voie de signalisation NF- κ B présente une boucle de rétrocontrôle et d'autorégulation afin de réguler finement la voie et sa terminaison. Un des principaux mécanismes de terminaison de la voie repose sur la transcription de *NFKBIA* (le gène codant l'inhibiteur I κ B α) (Pahl, 1999). Une surexpression de l'inhibiteur de la voie permet ainsi de stopper la translocation des

facteurs NF- κ B. De plus I κ B α est également capable de décrocher les facteurs NF- κ B liés à l'ADN, et de les exporter dans le cytoplasme afin de les séquestrer à nouveau et de réprimer la voie (Bergqvist et al., 2009). La dégradation de I κ B α et sa synthèse *de novo* induit alors une oscillation entre activation et inhibition des gènes répondants à la voie au cours du temps, après stimulation. D'autres inhibiteurs de la voie tels que I κ B β et I κ B η permettent alors de réduire cette oscillation (Fagerlund et al., 2015; Shih et al., 2009; Ting and Endy, 2002). En effet, l'expression de I κ B β et I κ B η n'est pas NF- κ B-dépendante, et permet de baisser le niveau d'oscillations d'activation de la voie, de même que le demi-temps de vie de ces inhibiteurs permet de déterminer la fréquence d'oscillation. D'autres mécanismes supplémentaires permettent de réguler la terminaison de la voie, dont la dégradation des facteurs NF- κ B fixés aux promoteurs (Natoli and Chiocca, 2008; Sacconi et al., 2004). Cette dégradation passe notamment par des régulations post-traductionnelles de p65/RelA (Lawrence et al., 2005). Certaines phosphorylations de p65 induisent son ubiquitylation et sa dégradation, afin de réprimer la transcription p65/RelA-dépendante. D'autres facteurs permettent également de déstabiliser la fixation de NF- κ B à l'ADN, de les relocaliser dans des compartiments nucléaires spécifiques où ils seront dégradés (Ghosh and Hayden, 2008).

Un autre mécanisme de rétrocontrôle est le remplacement de dimères NF- κ B. EN effet, pour le gène *IL-12*, p65/RelA:p50, qui est un dimère induisant une réponse transcriptionnelle rapide est forte, est remplacé par RelB :p52 et mène à une réduction de la présence d'ARNPII au promoteur et une baisse transcriptionnelle. De plus, la fixation résiduelle de RelB permet d'empêcher le recrutement de p65/RelA lors d'une réinduction de la voie. Dans ce sens, *IL-12* est insensible à une réinduction de la voie.

iii. Modulation transcriptionnelle de la réponse NF- κ B

1. Les différents dimères NF- κ B

Bien que, théoriquement, les facteurs NF- κ B puissent s'associer en 15 dimères différents, seuls 11 d'entre eux ont été caractérisés jusqu'ici. Le dimère le plus abondant de la voie canonique p65/RelA:p50, largement étudié, est retrouvé de façon quasi ubiquitaire (Hayden and Ghosh, 2008). Certains types cellulaires présentent cependant d'autres dimères majoritaires, comme les cellules B matures, dont la voie est activée de façon constitutive, arborant majoritairement

l'hétérodimère p50:c-Rel ([Grumont and Gerondakis, 1994](#)). Par ailleurs, les facteurs p50 et p52 ne comportant pas de domaine de transactivation, les homodimères formés par ces deux facteurs sont incapables d'induire une réponse transcriptionnelle. En effet, l'homodimère p50:p50 est capable d'induire une répression transcriptionnelle de gènes liés à la réponse interféron ([Cheng et al., 2011](#)). Egalement, il a été démontré qu'en absence de stimulus, le dimère p50:p50 est associé à HDAC-1, induisant une répression transcriptionnelle. Après stimulation, des dimères NF-κB comportant p65/RelA transloquent dans le noyau, et en interagissant avec CBP, remplacent le complexe p50-HDAC-1, permettant l'activation de la transcription ([Zhong et al., 2002](#)). De plus, bien que l'homodimère p52:p52 ne présente pas de domaine de transactivation, ce dernier est capable d'induire ou de réprimer la transcription de gènes en interagissant ou non avec des cofacteurs tels que BCL-3 ou HDAC-3, selon le site κB ([Franzoso et al., 1992](#); [Pan et al., 2023](#)).

Tous les dimères NF-κB ne comportent pas la même capacité à activer la transcription ni la même sensibilité aux inhibiteurs IκB, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* ([Lin et al., 1995](#); [Saccani et al., 2003](#)). En effet, des études du niveau d'ARNm de certains gènes répondant à la voie en fonction de la surexpression de différents facteurs NF-κB ont permis de démontrer que p65/RelA induit le plus fort niveau de transcription, tandis que RelB ne semble pas moduler le niveau de transcription. Cependant, ces données ne prennent pas en compte l'affinité différente de chaque dimère pour certains sites κB ainsi que leurs PTM lors de stimuli, de même que la formation spécifique de dimères aux promoteurs étudiés.

2. Modifications post-traductionnelles de NF-κB et modulation de l'activité transcriptionnelle

La régulation post-traductionnelle de p65/RelA est une couche supplémentaire dans la régulation de l'activité transcriptionnelle portée par les facteurs NF-κB. Un des exemples les plus étudiés concerne la phosphorylation de la sérine 276 (Ser276P) de p65/RelA. Cette modification est médiée par la sous-unité catalytique de PKA (proteine kinase A) et MSK1 (mitogen- and stress- activated protein kinase 1). Cette modification induit une meilleure affinité à l'ADN, mais également un changement d'affinité pour ses cofacteurs. En effet, suite à la phosphorylation de la sérine 276, p65/RelA aura une plus faible affinité au répresseur HDAC3, mais une plus grande affinité à CBP/p300 et à CDK9 et la Cycline T1, composants du

complexe P-TEFb, permettant leur recrutement au niveau de promoteurs afin d'induire leur transcription ([Nowak et al., 2008](#); [Reber et al., 2009](#); [Zhong et al., 1998](#)). Cette interaction est à double sens, car le recrutement de CBP/p300 (ou sa présence préalable) induit également des modifications de p65/RelA par acétylation. p65/RelA comporte de nombreuses PTM différentes ayant des effets différents sur les activités de p65/RelA. Ces modifications sont listées dans le tableau 5 ([Hoesel and Schmid, 2013](#); [Huang et al., 2010](#)). De la même façon que pour les histones, il a été proposé que les PTM de p65/RelA forment un code protéique, car il existe de nombreuses combinaisons de PTM ayant des activités spécifiques et se régulant mutuellement.

Modification	Domaine	Résidu	Enzyme modifcatrice	Effet	
Phosphorylation	Rel Homology Domain (RHD)	S205	?	Stimule l'activité transcriptionnelle	
		T254	?	Effet sur la stabilité et la localisation nucléaire	
		S276	Msk-1, Pim-1, PKAc (kinases)	Stimule l'activité transcriptionnelle	
		S281	?	Stimule l'activité transcriptionnelle	
	/	S311	PKCζ (kinase)	Stimule l'activité transcriptionnelle	
	Transactvation Domain (TAD)	T435	?	PP4 (phosphatase)	Stimule l'activité transcriptionnelle
		S468	IKKs, GSK3β (kinases)		Stimule l'activité transcriptionnelle
		T505	Chk1 (kinase)		effet pro-apoptotique
		S529	CKII (kinase)		Stimule l'activité transcriptionnelle
		S536	TBK1, RSK1, IKKs (kinases) PP2A, WIP1 (phosphatases)		Stimule l'activité transcriptionnelle, l'import nucléaire, la stabilisation et diminue l'export nucléaire médié par IκBα
Acétylation	RHD	K122	PCAF, CBP/p300 (acétylation) HDAC3 (désacétylation)	Affinité à l'ADN diminuée (acétylation)	
		K123	CBP/p300 (acétylation) HDAC3 (désacétylation)		
		K218	CBP/p300 (acétylation) HDAC3 (désacétylation)	Diminue l'interaction à IκBα (acétylation) Stimule l'interaction avec IκBα et inhibe l'activité transcriptionnelle (désacétylation)	
		K221		Affinité accrue à l'ADN (acétylation) Stimule l'interaction avec IκBα et inhibe l'activité transcriptionnelle (désacétylation)	
	/	K310	CBP/p300 (acétylation) HDAC3, HDAC1, SIRT1 (désacétylation)	Stimule l'activité transcriptionnelle (acétylation)	
	/	K314	CBP/p300 (acétylation)	Module l'expression de certains gènes suite à l'activation par le TNF-α (acétylation)	
	/	K315			
Méthylation	RHD	K37	Set9 (méthylation) ? (déméthylation)	Stabilise la fixation sur certains enhanceurs	
		K218	NSD1 (méthylation) FBXL11 (déméthylation)		
	/	K314	Set9 (méthylation)	Induit l'ubiquinylation et la dégradation de p65/RelA fixé à la chromatine	
	/	K315	? (déméthylation)		

Tableau 5 : Les modifications post-traductionnelles de Tax et leurs rôles.

3. Contribution de la chromatine et de cofacteurs

Un des mécanismes de spécification de la voie NF- κ B afin de la rendre type cellulaire dépendante est la contribution du paysage chromatinien et des cofacteurs des facteurs NF- κ B. En effet, en fonction du type cellulaire, la fixation de facteurs de développement peut moduler la susceptibilité de certains gènes à l'activation par NF- κ B. C'est par exemple le cas pour les cellules B et les macrophages, où le régulateur développemental PU.1 se fixe au niveau de l'enhancer *I12b* et est associé à des marques d'enhancer actif (H3K4me1). Cependant, l'enhancer *I12b* ne comporte des sites d'hypersensibilité à la Dnase I (caractéristique d'une chromatine ouverte et active) qu'une fois les cellules stimulées (Ghisletti et al., 2010; Heinz et al., 2010). Ces données suggèrent que pour être activés par la voie NF- κ B, certains gènes nécessitent un environnement chromatinien actif (chromatine ouverte) avant stimulation, grâce à des facteurs spécifiques du type cellulaire. Cet environnement préalable permet alors de définir les gènes pouvant répondre à la voie en fonction du type cellulaire. D'autres études à l'échelle génomique ont aussi permis de comprendre que la fixation de NF- κ B à des promoteurs permet d'induire une réponse qui sera sensible à n'importe quel stimuli, tandis que la fixation aux enhancers permet d'induire une réponse pour des gènes nécessitant une activation type cellulaire-spécifique (Tong et al., 2016).

L'environnement chromatinien basal des gènes est un paramètre de régulation de la temporalité de leur réponse à l'activation NF- κ B. Des études basées sur des données de ChIP-seq, RNA-seq et ChIA-PET dans des cellules de lymphome B humain démontrent l'existence de plusieurs classes de gènes dont la transcription varie au cours du temps (Zhao et al., 2018). Des gènes présentant une activation transitoire et oscillatoire répondent à une induction simple par fixation (et décrochage) de NF- κ B comme expliqué plus haut. Une autre classe de gène présente une activation plus tardive, qui continue même en l'absence de stimuli. Ces gènes requièrent l'activation de la voie ERK et la fixation de AP-1 pour être transcrits. La fixation de p65/RelA sur ces gènes permettrait alors d'initier et de médier la fixation de cofacteurs tels que AP-1 afin d'induire leur transcription, de façon plus tardive (Casola et al., 2000; Riedlinger et al., 2019; Sacconi et al., 2002; Vlahopoulos et al., 1999). Ces données suggèrent que la coopération de p65/RelA avec d'autres facteurs permet d'expliquer la spécificité d'activation selon la lignée cellulaire et le type de stimulation, ainsi que la spécificité temporelle d'activation

des gènes. De la même façon, des gènes répondants rapidement à l'activation de la voie se trouvent dans des régions préalablement ouvertes, accessibles aux facteurs NF- κ B, tandis que des gènes répondant de façon plus tardive se trouvent dans des régions nécessitant préalablement un remodelage de la chromatine (Brasier et al., 2011; Nowak et al., 2008). Dans ce sens, p65/RelA interagit avec d'autres cofacteurs tels que SP1, CBP/p300 ou encore SRC-1 qui sont nécessaire à l'activation transcriptionnelle par NF- κ B. Certains sont préalablement fixés aux promoteurs en absence d'activation de la voie, tandis que d'autres sont recrutés après fixation des facteurs NF- κ B (Gerritsen et al., 1997; Guo et al., 2003; Jones et al., 1997; Sheppard et al., 1998; Shiama, 1997; Yang et al., 2013). p65/RelA est également capable d'induire un remodelage de la chromatine aussi bien répresseur, qu'activateur, en interagissant avec des facteurs tels que des HDAC ou HAT permettant de moduler l'expression de certains gènes (Ashburner et al., 2001; Federman et al., 2013; Kim et al., 2012). Ensemble, ces coopérations permettent de mettre en place une réponse complexe et spécifique du type cellulaire, du stimuli d'activation de la voie NF- κ B, des facteurs NF- κ B et de leurs régulations, de l'activation d'autres voies et la présence de cofacteurs, de l'environnement chromatinien basal, et du type d'activation de la voie (transitoire, chronique).

4. Spécificité des sites κ B

Le site de fixation des facteurs NF- κ B, ou site κ B, est une séquence de 9 à 11 nucléotides dont le consensus est 5'-GGGRNWYYCC-3' (R : purines, N : n'importe quel nucléotide, W : A/T, Y : pyrimidine, et le nucléotide souligné représente la base centrale du motif), mais comporte un haut degré de variabilité. Des études structurales ont pu montrer que différents sites κ B imposent des contraintes structurales aux facteurs NF- κ B, et vont arborer des affinités différentes aux différents dimères NF- κ B. Ils déterminent également quels dimères sont recrutés par chaque site κ B (Wang et al., 2012).

De manière significative, le nucléotide central seul permet de moduler la réponse transcriptionnelle. En effet, dans le cas du recrutement de p52, une fixation sur un site κ B portant un A/T central induit un recrutement de HDAC3 par p52 afin d'induire une répression transcriptionnelle, tandis qu'un site avec un nucléotide central G/C permet de recruter Tip60 et d'induire la transcription. De même, l'échange des sites κ B entre les promoteurs de *MCMP-1* et de *IP-10*, ne différant que d'un seul nucléotide, permet le recrutement de dimères et de

cofacteurs différents selon le stimulus (TNF α ou LPS) (Leung et al., 2004). De plus, selon le site κ B, la réponse variera temporellement. Des promoteurs comportant un A/T central auront une induction rapide, tandis que des promoteurs avec un G/C central auront une induction tardive. La présence de plusieurs sites κ B sur un promoteur permet de recruter différents dimères NF- κ B et d'induire une transcription persistante. L'ensemble de ces données soulignent l'importance de la diversité des sites κ B, ainsi que la complexité des mécanismes de leur reconnaissance par les dimères NF- κ B, dans la temporalité de réponse à l'activation de la voie de signalisation.

5. Distribution des sites et facteurs NF- κ B à la chromatine

Les estimations faites par Martone et. al. portent à environ 10^4 sites κ B consensus dans le génome. Cette étude est basée sur une analyse de ChIP-seq p65/RelA dans des cellules HeLa exposées ou non au TNF α . L'analyse du chromosome 22 a mis en évidence que la fixation de p65/RelA dans les régions promotrices, définies dans cette étude par les régions (1 kbp) en amont du site d'initiation de la transcription (TSS), ne représentent que 9 % des sites de fixation de p65/RelA (Martone et al., 2003). De façon intéressante, une grande proportion des sites de fixation se situe au sein des gènes avec une majorité localisée dans les introns (40 %, contre 1 % des sites totaux dans les exons). Une seconde étude a confirmé ces observations dans des cellules Detroit 562 mettant en évidence que l'enrichissement de p65/RelA aux promoteurs ne représente que 6,6 % des sites de fixation, contre 49,1% en intragénique et 40,6 % dans des introns (Borghini et al., 2018). Ces données suggèrent que p65/RelA pourrait exercer d'autres fonctions que celles connues dans la régulation de la transcription au niveau des promoteurs.

La distribution de p65/RelA semble dépendre en partie du type de stimulation (LPS, TNF α , PolyI:C, Pam2CSK4). Elle n'est pas non plus restreinte aux motifs consensus κ B. Plus d'un tiers des sites de fixation de p65/RelA et un grand nombre (38%) de sites de fixation de p65/RelA à proximité de gènes ne sont pas associés à des modifications transcriptionnelles, soulignant la grande complexité des régulations NF- κ B-dépendantes reposant sur un mécanisme multifactoriel faisant intervenir d'autres facteurs (ou cofacteurs) de transcription, des dimères NF- κ B de composition différentes, et/ou des remodelages de la chromatine (Kolovos et al., 2016; Lim et al., 2007; Zhao et al., 2014).

6. La voie NF- κ B et l'organisation tridimensionnelle du génome

Des expériences de 3C, et de validation par RNA-FISH, ont pu démontrer que les promoteurs des gènes *TNFAIP2* et *SAMD4A* répondant à la voie NF- κ B et distants d'environ 50 Mb sont retrouvés en contact lors d'une activation par le TNF α , la région de contact évoluant entre les gènes en fonction de la position de l'ARNPII (Papantonis et al., 2010). Une étude à plus large échelle par des expériences de 4C, CHIP-seq, RNA-FISH et ChIA-PET a permis de montrer que la majorité des contacts observés avec *SAMD4A* changent au cours de l'activation de la voie par le TNF α , et qu'ils concernent des gènes également régulés transcriptionnellement par l'activation de la voie NF- κ B et la fixation de p65/RelA aux promoteurs (Papantonis et al., 2012). Ces données suggèrent qu'il existe des hubs transcriptionnels spécialisés dans la régulation des gènes répondants à la voie NF- κ B, autrement identifiés par les auteurs comme des « usines NF- κ B ».

De façon intéressante, les gènes codant les miARN en réponse à la voie NF- κ B sont également retrouvés dans les usines NF- κ B générées par l'exposition au TNF α , suggérant que ce mécanisme concerne les gènes codants et non-codants engagés dans la réponse inflammatoire. Cette spécialisation des usines à transcription a également été observé avec la voie TGF- β , à travers la formation d'« usines SMAD ». De façon intéressante, un tiers de ces gènes en contact répondent également au TNF α , ce qui est cohérent avec un certain chevauchement entre les deux voies (Sullivan et al., 2009). Les auteurs proposent que ces usines à transcription seraient « naïves » en l'absence de facteurs de transcription spécifiques. En absence d'activation de la voie, les gènes répondeurs seraient à proximité des usines à transcription, pouvant parfois diffuser aux abords et être fixés de façon transitoire par l'ARNPII. Cependant, en absence de p65/RelA (ou en quantité insuffisante), ces gènes ne seraient pas transcrits. Lors de l'activation de la voie, l'import massif de p65/RelA dans le noyau permettrait d'enrichir les promoteurs et enhancers répondeurs et stabiliserait la fixation des gènes p65/RelA-dépendants dans les usines à transcription, permettant ainsi l'initiation transcriptionnel. En fixant les promoteurs de plusieurs gènes, la concentration en p65/RelA augmente, permettant de spécialiser cette usine à transcription pour les gènes de la voie NF- κ B, mais de façon non exclusive, en regroupant d'autres gènes co-régulés par des voies de signalisation distinctes comme démontré à travers l'activation des cellules par le TNF α ou le

TGF- β . Une inter-spécialisation de ces usines à transcription permettrait de co-réguler des gènes communs entre plusieurs voies, et de rapidement mettre en place une réponse transcriptionnelle à plusieurs stimuli. De façon intéressante, une étude réalisée dans des cellules IMR90 a pu démontrer que de nombreuses boucles promoteur-enhancer formées au niveau d'enhancers TNF α spécifiques sont formés même en absence de stimulus (Jin et al., 2013). Ces boucles préexistantes définiraient les gènes cibles d'une activation transcriptionnelle et seraient spécifiques du type cellulaire. La fixation des facteurs NF- κ B aux enhancers permettraient d'activer plus rapidement les gènes cibles déjà à proximité (Jin et al., 2013).

Outre leurs effets sur l'induction d'un profil transcriptionnel lors de l'activation de la voie NF- κ B, les usines à transcription jouent un rôle dans la temporalité de la transcription des gènes répondeurs (Fanucchi et al., 2013). Une étude reposant sur l'analyse par RNA-FISH de transcrits naissants a pu montrer que lors de l'exposition des cellules au TNF α , les gènes *SAMD4A* et *TNFAIP2* sur le chromosome 14 (espacés de 50 Mb) et le gène *SLC6A5* sur le chromosome 11 co-localisent et sont transcrits dans des foci d'ARNPII active. De façon intéressante, il apparaît que ces gènes sont recrutés de façon séquentielle. *SAMD4A* et *TNFAIP2* co-localisent dans un premier temps, pour ensuite regrouper à leur contact *SL6C6A5* (Figure 30). De façon intéressante, la cassure double brin par des essais de TALEN au niveau du site de contact de *SAMD4A* induit une perte de sa transcription, mais également celle de *TNFAIP2* et *SLC6A5*. Un essai de réparation de la région de contact par recombinaison homologue de *SAMD4A* permet de rétablir son rapprochement des gènes *TNFAIP2* et *SLC6A5* et sa transcription. En revanche, la perturbation de *TNFAIP2* ou *SLC6A* n'a aucun effet sur l'expression de *SAMD4A*, permettant ainsi de définir une hiérarchie dans la coordination de la transcription de ces trois gènes lors de l'activation de la voie. *SAMD4A* serait le premier pris en charge par la machinerie de transcription et les facteurs associés. L'augmentation locale au de la concentration en facteurs de transcription et ARNPII au niveau de *SAMD4A* permettrait ainsi de recruter les gènes *TNFAIP2* et *SLC6A5*, résidant dans un espace nucléaire proche. Ces travaux révèlent un nouveau mécanisme de coordination temporelle de l'expression des gènes répondeurs à l'activation de la voie NF- κ B reliant la dynamique d'interaction des gènes dans l'espace nucléaire et leur transcription dans le temps.

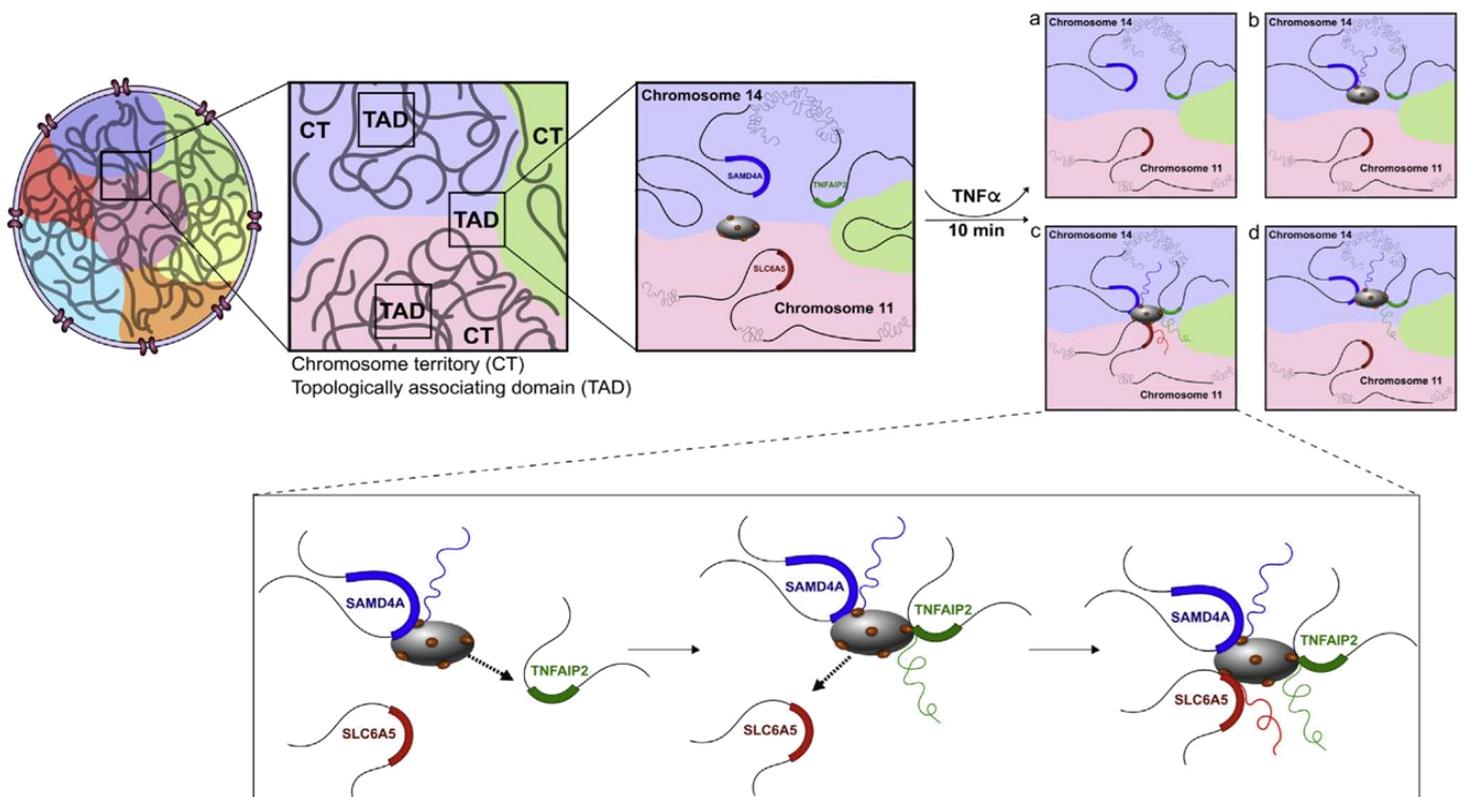


Figure 30 : modèle de la coordination hiérarchique de gènes co-régulés lors de l'activation par le TNF α . A l'état basal, les gènes *SAMD4* et *GCH1* (sur le chromosome 14) et le gène *SLC6A5* (sur le chromosome 11) sont dans un seul et même TAD, mais ne sont pas transcrits et sont éloignés physiquement les uns des autres. Lors de l'activation de la voie NF- κ B par le TNF α , ces gènes forment des interactions. a) dans un premier temps, aucun contact entre ces gènes n'est observé. b) Ensuite, le gène *SAMD4* est transcrit. c) Le gène *TNFAIP2* est ensuite recruté à proximité de *SAMD4* et est également transcrit, probablement au sein d'une transcription factor. d) Une fois ces deux gènes recrutés au sein de la transcription factor, le gène *SLC6A5* est alors à son tour recruté au sein de la même transcription factor et est transcrit également. D'après Fanucchi et al., 2013.

iv. Tax et la voie NF- κ B

L'activation de la voie NF- κ B par Tax joue un rôle central dans l'oncogenèse liée à HTLV-1. L'activation permanente de cette voie est retrouvée dans des lignées infectées par HTLV-1 et dans les cellules de patients atteints d'ATLL (Ballard et al., 1988; Higuchi et al., 2007; Sun and Ballard, 1999). L'activation chronique de la voie par Tax a pour conséquence une prolifération aberrante des cellules T qui participe à la transformation cellulaire, vraisemblablement par ses effets également sur l'inhibition des processus apoptotique, et des systèmes de maintien de l'intégrité du génome. Le mutant Tax M22 (G137A, L138S) déficient pour l'activation de la voie NF- κ B perd ses capacités d'immortalisation des cellules T, indiquant que cette voie est particulièrement engagée dans les processus oncogènes associés à l'infection (Robek and Ratner, 1999; Yamaoka et al., 1996). D'ailleurs, l'inhibition de la voie NF- κ B dans les cellules

exprimant Tax ou dans les cellules ATLL est capable d'induire la mort par apoptose, indiquant un effet d'addiction à la voie NF- κ B lors de l'infection (Kitajima et al., 1992; Portis et al., 2001).

Sur le plan moléculaire, Tax active la voie NF- κ B canonique et non-canonique au niveau cytoplasmique en outrepassant les récepteurs inducteurs de la voie via ses interactions avec plusieurs effecteurs de la cascade d'activation (Figure 31). Tax interagit avec MEKK1, TAK1, ainsi que NEMO (Jin et al., 1999; Wu and Sun, 2007; Yin et al., 1998). En stimulant ces kinases, Tax favorise la phosphorylation de IKK α et IKK β , auxquelles il se fixe également pour stimuler directement leur autophosphorylation indépendamment des kinases en amont de la voie (Chu et al., 1998). En aval, Tax interagit également avec les inhibiteurs I κ B afin de stimuler leur dégradation par le protéasome (avec lequel il interagit également afin de stimuler la protéolyse de p105 en p50) et libère ainsi les dimères NF- κ B (Suzuki et al., 1995). Le facteur p100 est aussi ciblé par Tax qui induit sa protéolyse en p52 (Xiao et al., 2001). Tax provoque ainsi un import nucléaire permanent des facteurs NF- κ B de la voie canonique et non-canonique.

Au niveau nucléaire, l'impact de Tax sur la voie NF- κ B reste encore mal compris. Tax interagit avec les facteurs NF- κ B p65/RelA, c-Rel, p50 et p52 *in vitro* (Suzuki et al., 1994). Il a également été décrit que Tax est capable de s'associer aux complexes NF- κ B et de renforcer leur fixation à l'ADN *in vitro* (Petropoulos et al., 1996; Suzuki et al., 1994). Tax induit également une surexpression de p100 (le précurseur de p52) et de c-Rel, jouant un rôle dans l'import nucléaire constitutif de ces facteurs (Lanoix et al., 1994). L'expression de Tax induit une plus grande formation des dimères NF- κ B libres, et augmente ainsi la fixation des dimères à l'ADN. En médiant la dégradation constitutive de I κ B α et en diminuant la fixation de ce dernier aux facteurs NF- κ B, Tax permet également de diminuer le décrochage des facteurs NF- κ B liés à la chromatine.

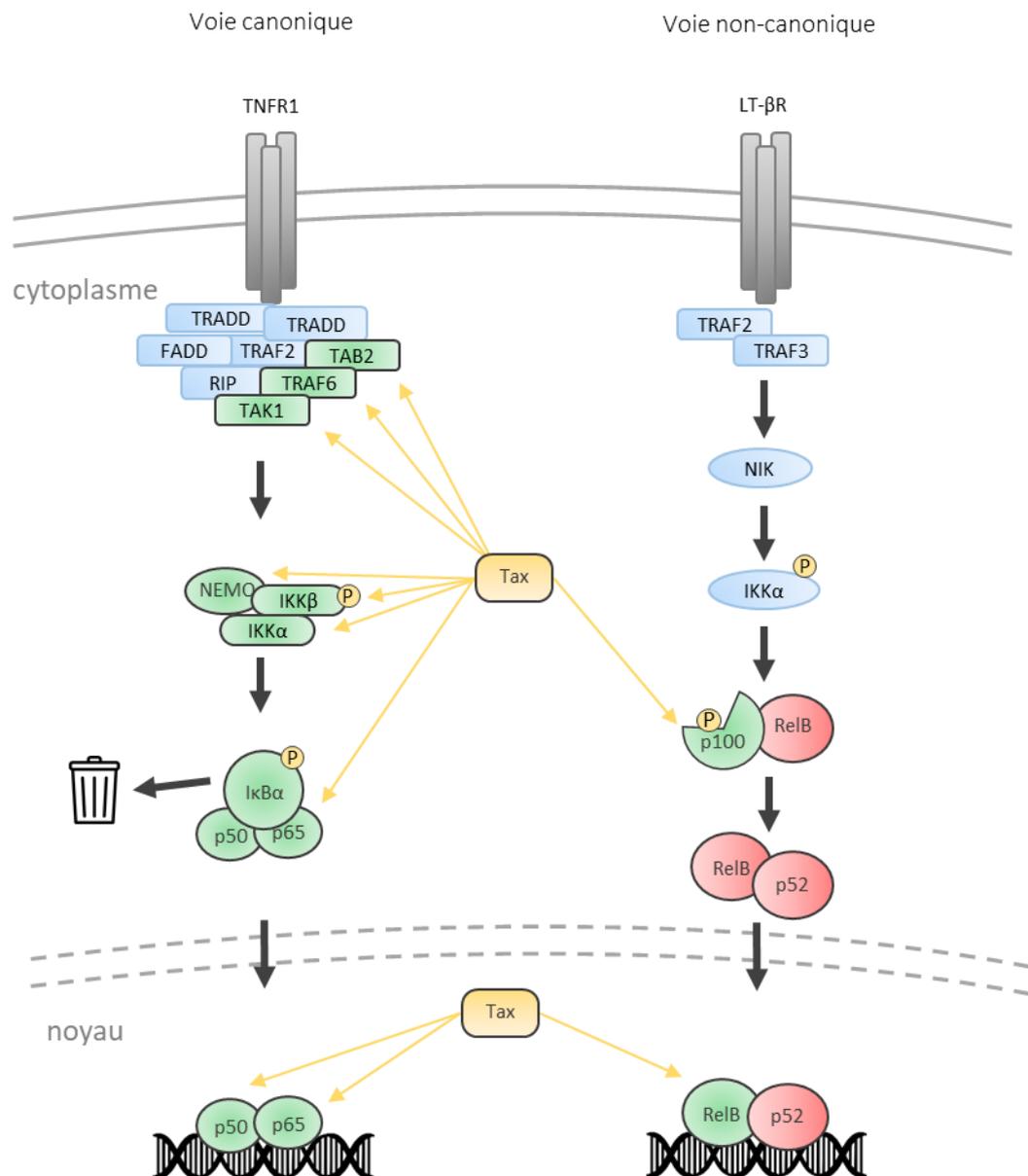


Figure 31 : Interactions de Tax avec les protéines de la voie NF-κB. Tax interagit avec de nombreux facteurs de la voie canonique et non canonique de NF-κB, et permet l'activation chronique de la voie, et l'import permanent des facteurs NF-κB. Adapté de Romanelli et al., 2013.

1. PTM de Tax et activation de la voie NF-κB

Tax est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles (PTM) (voir Figure 24) qui influencent ses fonctions. Elles jouent notamment un rôle majeur dans la relation de Tax à la voie NF-κB. L'ubiquitinylation de Tax a été démontrée comme régulant la stabilité, le trafic intracellulaire et l'activation de la voie NF-κB (Chiari et al., 2004; Peloponese et al., 2004). L'ubiquitinylation de Tax est principalement composée d'une poly-ubiquitinylation de type K63. Cette poly-ubiquitinylation agit comme une plateforme de recrutement permettant à Tax

d'interagir avec de nombreux facteurs dont les kinases de la voie NF- κ B telles que TAK1 ou IKK. L'ubiquitinylation de Tax est notamment médiée par son interaction avec l'E2 ubiquitine ligase Ubc13, dont la déplétion affecte négativement l'activation Tax-dépendante de la voie NF- κ B (Shembade et al., 2007). Tax, sous sa forme ubiquitinylée, interagit avec NRP (NEMO-related protein) et OPTN (Optineurin) pour former un complexe avec Tax1BP1 associé à l'appareil de Golgi. NRP en retour stimule l'ubiquitinylation de Tax et l'activation de la voie NF- κ B (Journo et al., 2009). De plus, la localisation de Tax aux abords de l'appareil de Golgi au sein de rafts lipidiques permet d'y recruter IKK et de participer à l'activation constitutive de la voie NF- κ B (Huang et al., 2009).

La SUMOylation de Tax sur des sites de poly-ubiquitinylation a été proposé comme régulateur de sa capacité à former des corps nucléaires (structures nucléaires enrichies en Tax). Elle permettrait également le recrutement de p65/RelA et p300 dans ces sous-compartiments (Bex et al., 1998, 1997). Le rôle de la SUMOylation de Tax dans l'activation de la voie NF- κ B a été proposé mais une autre étude a démontré qu'elle n'était pas indispensable (Lamsoul et al., 2005; Pène et al., 2014).

La phosphorylation de Tax aux sérines 300 et 301 induit également une forte diminution de l'activation des gènes répondeurs à la voie NF- κ B et ATF/CREB (Bex et al., 1999). L'absence de phosphorylation affecte la localisation nucléaire de Tax et empêche donc la formation de corps nucléaires Tax. Cette altération peut être secourue par l'introduction d'acides aminés mimant les phosphosérines. L'accumulation de la forme phosphorylée de Tax dans les corps nucléaires est également nécessaire pour son acétylation par p300 (Lodewick et al., 2009). Cette acétylation de Tax concerne la lysine 346, qui a été identifiée comme nécessaire à l'activation d'un promoteur porteur de site κ B.

v. Dérégulations de transcriptionnelles des gènes cellulaires par HTLV-1 et par Tax

1. Dérégulations transcriptionnelles lors de l'infection par HTLV-1 *in vivo*

In vivo, des études par puces à ADN de la différence du niveau d'expression des gènes cellulaires entre lymphocytes immortalisés par HTLV-1 et des cellules d'ATL ont été réalisées. Ces données ont pu mettre en évidence que lors de l'infection par HTLV-1, de nombreux gènes sont altérés au niveau transcriptionnel (Pise-Masison et al., 2002). En effet, les gènes impliqués notamment dans la voie des cytokines et de leurs récepteurs sont altérés, de même que des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN. Egalement, les précédents travaux de l'équipe ont permis de montrer que le niveau de transcription de gènes impliqués dans des voies fonctionnelles associées à la voie de signalisation MAPK, au cancer, la voie des cytokines et leurs récepteurs ou l'adhésion focale cellulaire sont altérées dans des cellules infectées par HTLV-1 et des cellules d'ATLL (Thénoz et al., 2014). Ces observations à l'échelle du génome ont par ailleurs été observées dans différentes études. Ainsi, des études ont pu montrer que plusieurs facteurs de transcription tels que c-Jun ou c-Rel sont dérégulés au niveau transcriptionnel dans les cellules immortalisées par HTLV-1 (Harhaj et al., 1999). Egalement, les gènes impliqués dans la voie du TNF α de même que ceux contrôlant les voies anti-apoptotiques sont surexprimés, tandis que des gènes pro-apoptotiques tels que Bax sont réprimés dans les cellules infectées par HTLV-1. Des analyses par puces ont également été réalisées dans des cellules de patients atteints de HAM/TSP ou de patients asymptomatiques, et révèlent l'altération d'un sous-ensemble de gènes associés à la voie de l'interféron, qui est corrélée à la sévérité de l'HAM/TSP (Tattermusch et al., 2012). Cette étude montre également que la voie de signalisation de p53 est altérée dans les cellules infectées, et que ces dérégulations peuvent être impliquées dans la pathogenèse associée à HTLV-1.

2. Dérégulations quantitatives du transcriptome par l'activation Tax-dépendante de la voie NF- κ B

Plusieurs études ont lié l'activation de la voie NF- κ B Tax-dépendante à la régulation transcriptionnelle de gènes cellulaires. C'est par exemple le cas des gènes codant des

interleukines et leurs récepteurs liés, comme IL-2 et IL2R α , et IL-21/IL21R, IL13/IL-13R α , IL-15/IL-15R α , IL-6. La surexpression de ces gènes a été reliée à la fixation de facteurs NF- κ B sur des sites κ B des promoteurs (H.-C. Lin et al., 2005; Maeda et al., 2020; Mariner et al., 2001; Mizuguchi et al., 2009; Ruben et al., 1988; Silbermann et al., 2008; Wäldele et al., 2004).

Plusieurs études ont été réalisées afin d'analyser à l'échelle génomique l'impact de Tax sur la dérégulation de l'expression des gènes par des séquençage d'ARN (RNA-seq). Des analyses d'enrichissement de gènes sur ces données révèlent le terme NF- κ B comme une voie spécifiquement enrichie en gènes surexprimés par Tax dans plusieurs types cellulaires (Mahgoub et al., 2018; Vandermeulen et al., 2021), (Annexe 1). Ces observations corroborent les données de CHIP-seq H327Ac (marque d'activation transcriptionnelle) dans des lignées d'ATLL (Kurita et al., 2018) (Communication de congrès, non publiées aujourd'hui sous forme d'article). De nombreux pics H3K27Ac apparaissant dans les cellules exprimant Tax coïncident avec des gènes de la voie NF- κ B ainsi que des super-enhancers liés à la voie. Des analyses d'ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin with highthroughput sequencing) réalisées dans cette même étude ont permis de mettre en évidence la même observation. En effet, des gènes tels que TNFR2 et IL-2 présentent une plus grande accessibilité au niveau de leurs promoteurs. Egalement, l'analyse des motifs présents dans les régions présentant une chromatine ouverte révèle que les motifs NF- κ B et AP-1 sont enrichis dans les cellules exprimant Tax, appuyant l'importance de la voie NF- κ B dans la dérégulation transcriptionnelle lors de l'expression de Tax.

3. Dérégulations qualitatives du transcriptome par Tax et HTLV-1

Tax et Rex sont impliqués dans l'altération du système de contrôle qualité des transcrits par NMD (Nonsense-Mediated Decay). Le NMD est un système permettant la dégradation des transcrits présentant un codon stop prématuré. L'interaction de Tax avec UPF1, acteur majeur du NMD, induit une baisse d'affinité et de translocation sur les acides nucléiques (Fiorini et al., 2018). De plus, Tax interagit avec d'autres facteurs du NMD tels que UPF2 ou INT6/eIF3E menant à son inhibition (Mocquet et al., 2012; Morris et al., 2007). L'inhibition du NMD par Tax permet ainsi de stabiliser des transcrits présentant un codon stop prématuré, tels que les ARNm viraux, mais également des transcrits cellulaires. La protéine Rex de HTLV-1 a été

également mis en cause dans l'inhibition du NMD et dans la stabilisation et l'export des ARN viraux non- ou mono-épissés (Nakano et al., 2013).

Par des approches de puces exons, notre laboratoire a publié les premiers profils d'épissage alternatif de patients atteints d'ATLL et de clones cellulaires infectés non transformés obtenus par culture en dilution limite de PBMC de patients (Thénoz et al., 2014). Comparés à leur contrepartie T-CD4+ non infectés, les clones porteurs d'HTLV-1 présentent une diversité transcriptomique très importante avec >2000 exons affectés dans leur épissage pour les clones non-transformés et >23000 pour les clones transformés d'ATLL. De façon intéressante, de nombreux évènements d'épissage sont retrouvés partagés par les clones infectés non transformés et les clones transformés d'ATLL, suggérant qu'ils jouent un rôle fonctionnel dans les processus oncogènes liés à l'infection. Ces épissages alternatifs affectent notamment des transcrits engagés dans les voies de régulation de l'immunité, de l'adhésion cellulaires, et des acteurs de cancers. Par ailleurs, l'analyse par cluster hiérarchisé des évènements d'épissage a permis d'isoler 4000 exons dont le degré d'inclusion dans les ARNm constitue une signature des clones transformés d'ATLL et des clones infectés non-transformés. Enfin, les voies fonctionnelles affectées par les modifications d'épissage apparaissent différentes de celles contrôlées par les gènes dérégulés quantitativement dans leur expression (Thénoz et al., 2014). Ces données suggèrent que les modifications massives de l'épissage alternatif générées par HTLV-1 constituent un nouveau mécanisme de perturbations du transcriptome cellulaire, étudiées jusqu'à présent qu'à travers des différentiels quantitatifs d'expression des transcrits.

Des approches récentes de double hybride ont permis de caractériser l'interaction de Tax avec 35 différents facteurs d'épissage. Notamment, Tax interagit avec U2AF65 et permet de stabiliser le complexe U2AF35/U2AF65, impliqué dans la reconnaissance du 3'SS et du polypyrimidine tract. Les auteurs suggèrent que l'interaction de Tax avec U2AF65 permet une reconnaissance de sites d'épissage moins conservés, et ainsi de moduler l'épissage alternatif via cette reconnaissance par le complexe U2AF. L'interaction de U2AF65 avec Tax semble ainsi être un exemple par lequel Tax induit un remodelage du transcriptome cellulaire.

Egalement, les travaux de l'équipe ont pu montrer que l'expression de Tax dans des cellules HEK293T affecte l'épissage alternatif de plus de 900 gènes cellulaires, dont 48% des évènements est également retrouvé dans des cellules d'ATLL (Annexe 1) (Ameur et al., 2020;

Vandermeulen et al., 2021). Cet épissage alternatif est indépendant des effets de Tax sur la transcription, et concerne des gènes dont les termes GO correspondent à des voies distinctes de celles régulées en transcription, telle que l'adhésion focale. Plus particulièrement, il a été montré dans les cellules exprimant Tax que le gène *CD44* présente une inclusion de l'exon variable v10 qui induit un changement d'adhésion cellulaire. Au niveau moléculaire, Tax interagit avec le facteur d'épissage DDX17 de façon NF- κ B-dépendante, et permet de réguler une majorité des exons Tax-dépendants. Dans ce sens, l'analyse de données de CHIP-seq a permis de montrer que l'enrichissement intragénique de p65/RelA est plus proche d'exons alternatifs que constitutifs, et que les exons Tax, et DDX17-dépendants, présentent un enrichissement en sites κ B. D'un point de vue mécanistique, l'expression de Tax induit un enrichissement de p65/RelA et de DDX17 proche des exons régulés (Figure 32). Des approches de recrutement par TALE (Transcription-Activator-Like-Effector) ont permis de caractériser que la fixation intragénique de p65/RelA induit le recrutement DDX17 et induit une inclusion de l'exon alternatif v10 de *CD44*.

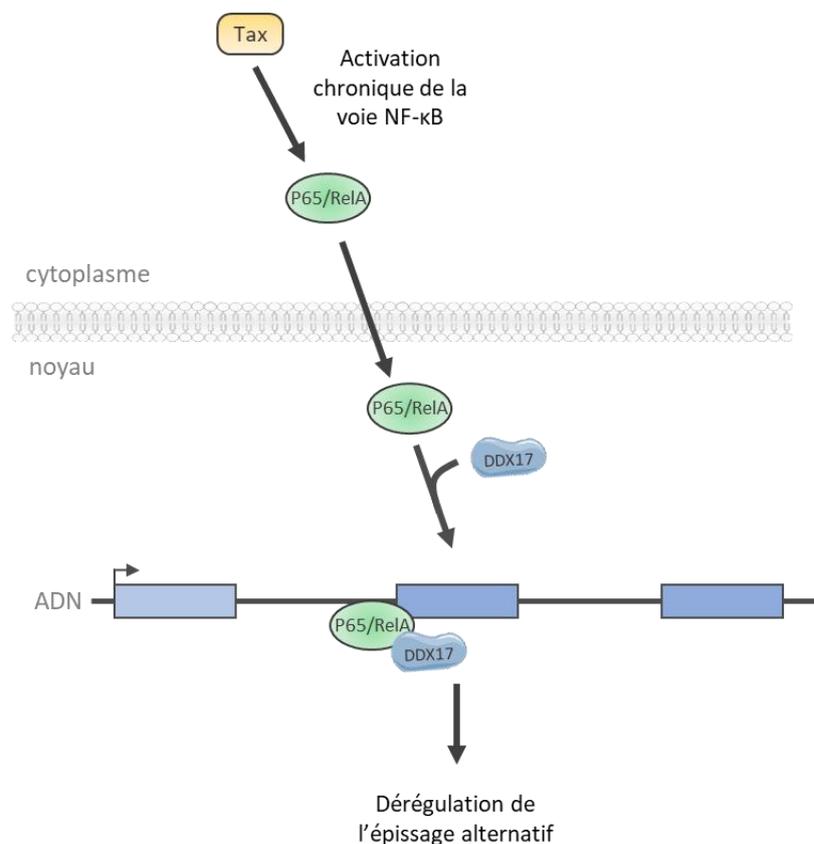


Figure 32 : Modèle de régulation de l'épissage alternatif par p65/RelA et DDX17.

Pour conclure, Tax induit des dérégulations quantitative et qualitative du transcriptome de la cellule, au travers de l'activation chronique de la voie NF- κ B. Par ailleurs, l'organisation tridimensionnelle de la chromatine est impliquée dans la régulation de l'expression des gènes lors d'une activation physiologique de la voie NF- κ B. Egalement, l'organisation de la chromatine joue un rôle dans l'organisation de l'épissage alternatif. Cependant, aucune information n'est disponible à ce jour permettant de décrire l'impact de Tax sur l'organisation tridimensionnelle de la chromatine, ni son lien avec la dérégulation quantitative et qualitative du transcriptome.

Problématique

L'oncoprotéine Tax joue un rôle central dans les altérations transcriptionnelles de la cellule hôte lors de l'infection par HTLV-1, et dans la leucomogénèse associée à HTLV-1. Notamment, l'activation chronique de la voie NF- κ B par Tax est un élément clé permettant la régulation du transcriptome des cellules hôte via la fixation des facteurs NF- κ B aux promoteurs permettant l'activation de gènes. Mes travaux (Annexe 1) ont participé dans un premier temps à démontrer que l'activation de la voie NF- κ B Tax-dépendante induit également des altérations d'épissage alternatif de façon indépendante des régulations transcriptionnelles, qui sont retrouvées chez des patients infectés par HTLV-1 et chez des patients atteints d'ATL. Sur le plan fonctionnel, ces dérégulations d'épissage alternatif Tax-dépendantes sont retrouvées dans des gènes impliqués dans des voies fonctionnelles différentes de celles contrôlées par des gènes régulés dans leur niveau d'expression par Tax. Ces données suggèrent que l'épissage alternatif médié par Tax constitue un mécanisme supplémentaire de régulation du transcriptome qui participe vraisemblablement à la pathogénèse associée à HTLV-1. Plus précisément, nous avons pu mettre en évidence la fixation intragénique de p65/RelA à proximité des exons régulés par Tax. Notamment, ces exons régulés par Tax sont majoritairement dépendant de DDX17. Dans ce sens, nous avons montré que lors de l'activation de la voie NF- κ B par Tax, RelA recrute le facteur DDX17 qui va induire une régulation de l'épissage alternatif de l'exon cible via son activité hélicase (Annexe 1). Ces données ont ainsi mis en évidence pour la première fois un rôle fonctionnel de la fixation des facteurs NF- κ B au niveau des corps de gènes. Ces travaux m'ont valu d'être second auteur sur le papier publié dans Nature Communications en 2020. Ces résultats ne seront pas détaillés ici mais l'article est présenté en annexe 1.

En dehors du contexte HTLV-1, plusieurs études ont montré le rôle de l'organisation tridimensionnelle de la chromatine dans la régulation de la transcription lors de la voie NF- κ B. En effet, l'organisation tridimensionnelle du génome joue un rôle important dans l'expression des gènes. Il apparaît également à travers de nombreux travaux que des gènes co-régulés par une voie de signalisation sont retrouvés à proximité les uns des autres, et que leur rapprochement joue un rôle important dans leur co-régulation (Clowney et al., 2012; Fanucchi et al., 2013; Fullwood et al., 2009; Karki et al., 2019a; Papantonis et al., 2012). Cependant, ces données ne renseignent que les processus de régulation quantitative de l'expression des gènes. Mes travaux ont abordé, à travers une étude intégrative, l'étude des effets de Tax dans l'altération de l'organisation tridimensionnelle de la chromatine et de leurs implications dans

la co-régulation de l'expression quantitative et qualitative des gènes cellulaires par les facteurs NF- κ B.

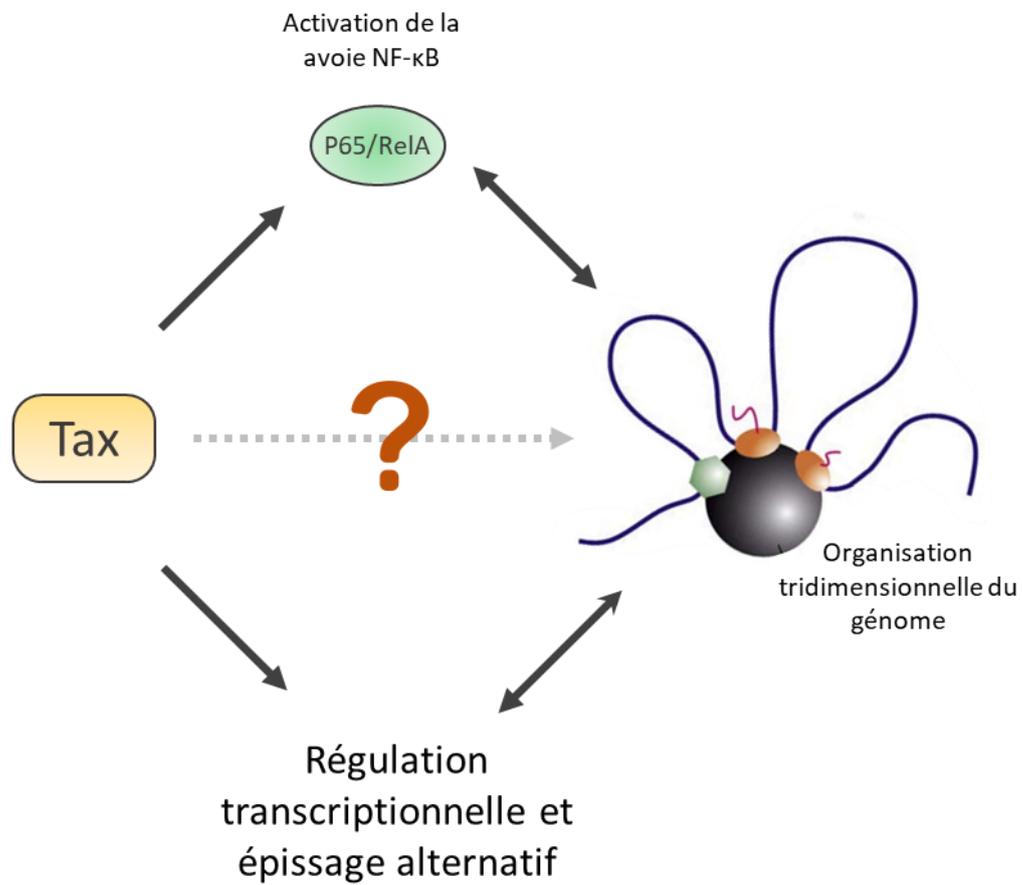


Figure 33 : illustration de la problématique posée.

Résultats

Résumé :

Les travaux présentés dans l'article qui suit démontrent l'impact de l'oncoprotéine virale Tax dans l'organisation tridimensionnelle du génome. Pour ce faire, des essais de Hi-C, de 4C et de 3C ont été réalisés dans des lignées HEK293T exprimant ou non Tax. Ces expériences nous ont permis de caractériser que Tax induit des changements des interactions de chromatine en renforçant les interactions longue-distance, mais altère également des contacts entre les compartiments A/B et les contacts inter-TAD, sans pour autant affecter la définition des TADs. En comparant ces altérations de contacts de chromatine et nos données de RNA-seq précédemment publiées, nous avons pu mettre en évidence que la majorité des gènes régulés par Tax (au niveau transcriptionnel ou d'épissage alternatif) sont présent dans un réseau de contacts multigéniques à la fois de façon intra- et inter-chromosomique, suggérant que de tels complexes multigéniques puissent permettre la coordination de l'épissage alternatif et de la transcription des gènes co-régulés par Tax.

En analysant la nature des gènes présents dans les régions de contacts, nous avons pu constater par analyse d'ontologie un enrichissement de termes impliqués dans les voies de signalisation NF- κ B et TNF α ainsi que d'infection virale par HTLV-1. Par ailleurs, l'analyse des motifs présents dans les promoteurs des gènes impliqués dans des contacts longue-distance révèle l'enrichissement de sites κ B, suggérant que l'altération des contacts de chromatine puisse coordonner la co-régulation des gènes de la voie NF- κ B. Dans ce sens, nous avons identifiés plusieurs contacts entre gènes dérégulés par Tax, à la fois sur le plan transcriptionnel ou de l'épissage alternatif. Plus particulièrement, nous montrons que l'activation de la voie NF- κ B par Tax induit un contact entre les gènes *NFKBIA* et *RELA*, qui est concomitant à la surexpression de *NFKBIA* et l'exclusion de l'exon 6 de *RELA*.

Sur le plan fonctionnel, nous montrons par expression ectopique de la forme *RELA* alternativement épissée, que cette isoforme tronquée n'induit pas de transactivation des gènes de la voie NF- κ B en l'absence de Tax. En revanche, lorsque Tax est exprimée, cette isoforme agit comme modulateur positif ou négatif (selon le gène cible) de l'expression de gènes NF- κ B-dépendants, suggérant que l'induction de cette isoforme contribue à définir une signature transcriptionnelle de l'activation de la voie NF- κ B par Tax.

Au niveau mécanistique, nous démontrons que le contact entre *NFKBIA* et *RELA* lors de l'expression de Tax s'accompagne d'un enrichissement de p65/RelA au niveau du promoteur de *NFKBIA* et au niveau de l'exon génomique E6 de *RELA*. En utilisant une approche dérivée du système CRISPR/dCas9 capable de perturber le contact entre *NFKBIA* et *RELA* (*dCas9-KRAB*), nous montrons que la perte du contact entre ces deux gènes altère la régulation de l'épissage alternatif de *RELA* par Tax qui s'accompagne également d'une diminution de la présence de RelA/p65 au promoteur de *NFKBIA* et au niveau de l'exon E6 de *RELA*. L'utilisation d'un second système de CRISPR/dCas9 fusionné à p65/RelA, nous a permis de montrer que le recrutement expérimental de p65/RelA à la chromatine de l'exon 6 de *RELA* induit le contact entre *NFKBIA* et *RELA* et la régulation de l'épissage alternatif de *RELA*.

Ensemble, ces résultats indiquent que p65/RelA joue un rôle central dans l'établissement de complexes multigéniques permettant la coordination des régulations de transcription et d'épissage alternatif des gènes lors de l'activation la voie NF- κ B par Tax.

Les tables supplémentaires ainsi que les figures en haute résolutions ont disponibles sur demande aux auteurs, et jusqu'au 28/06/2023 à l'adresse suivante :

<https://filesender.ens-lyon.fr/?vid=29f818cb-2ef0-7769-cbd5-00007bc90bd7>

Coordinated Regulation of Transcription and Alternative Splicing by 3D Chromatin Remodeling upon HTLV-1 TAX-induced NF- κ B activation

Paul Marie¹, Julien Ladet¹, Matéo Bazire¹, Lamya Ben Ameer^{1§}, Sanjay Chahar², Nicolas Fontrodona¹, Tom Sexton², Cyril F. Bourgeois¹, Didier Auboeuf¹, Franck Mortreux^{1*}

1. Univ Lyon, ENS de Lyon, Univ Claude Bernard, CNRS UMR 5239, INSERM U1210, Laboratory of Biology and Modelling of the Cell, 46 Allée d'Italie Site Jacques Monod, F-69007, Lyon, France

2. Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology (IGBMC), UMR7104, Centre National de la Recherche Scientifique, U1258, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, University of Strasbourg, 6704 Illkirch, France

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 472728663 ; Email: franck.mortreux@ens-lyon.fr

Present Address: [Lamya Ben Ameer], Vollum Institute, Oregon Health & Science University, Portland, OR 97239, USA

Summary

The p65/RelA factor of NF- κ B plays a pivotal role in coordinating gene expression in response to diverse stimuli, including viral infections. At the chromatin level, p65/RelA governs gene transcription and alternative splicing (AS) through promoter enrichment and genomic exon occupancy, respectively. However, the mechanisms underlying the coordination of these processes remain elusive. In this study, we employed the HTLV-1 TAX viral oncoprotein, a potent activator of NF- κ B, to investigate the integrative relationship between 3D chromatin architecture and NF- κ B-regulated AS. Our analysis revealed that TAX induces a significant reorganization of the 3D genome, resulting in the formation of multigene complexes that comprise genes co-regulated in transcription and in AS. Notably, we found that the TAX-induced gene-gene contact between the two master genes *NFKBIA* and *RELA* is associated with their differential regulation in gene expression and alternative splicing, respectively. Through dCas9-mediated approaches, we demonstrated that *NFKBIA-RELA* interaction is required for alternative splicing regulation and is caused by an intragenic enrichment of p65/RelA on *RELA*. Via this mechanism, TAX promotes the expression of the splice isoform *RELA* Δ E6 that exhibits specific gene transactivation capacity at the protein level. Our findings shed light on new regulatory mechanisms upon HTLV-1 TAX and underscore the crucial role of p65/RelA in coordinated regulation of NF- κ B-responsive genes at both transcriptional and alternative splicing levels in the context of the 3D genome.

INTRODUCTION

The process of gene expression involves multiple steps, including transcription and splicing, that work together to shape the transcriptome and ultimately determine cell behavior. Coordination between transcription and alternative splicing is thus required for proper cell response to stimulus. Cellular pathogens such as viruses can disturb this coordination, leading to both quantitative and qualitative alterations in transcriptome diversity, which can ultimately disturb cellular homeostasis and promote viral replication and persistence. A better understanding of mechanisms involved in coordinating transcription and splicing is thus necessary to comprehend the cellular response to viral infections.

The retrovirus Human T-cell Leukemia Virus type 1 (HTLV-1) primarily infects T lymphocytes, leading to a range of diseases, including adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) and various inflammatory diseases (1). HTLV-1 replication initially involves cell-to-cell transmission followed by clonal expansion of infected cells which is responsible for the persistence of the virus and associated diseases (2). One of the key viral proteins involved in HTLV-1 infection is the oncoprotein Tax that has been first described as a transcriptional activator interacting with a variety of host cell proteins, including the NF- κ B family of transcription factors. By hijacking NF- κ B signaling, TAX deeply affects crucial mechanisms involved in immune response, cell survival, and inflammation, and plays critical role in HTLV-1 pathogenesis (3).

At the molecular level, Tax interacts with multiple NF- κ B and I κ B proteins, including p65/RelA (4), p50 (5), c-Rel (4), p100 (6-8), p105 (9), I κ B α (10,11), and NEMO (10,12). Tax activates the NF- κ B pathway by promoting the degradation of the inhibitory protein I κ B α , which controls the oscillating dynamics of NF- κ B signaling (13,14). Tax induces a constitutive nuclear translocation of p65/RelA, resulting in chronic activation of target genes. Through post-translational modifications (15), TAX is able to form nuclear bodies enriched in NF- κ B p65/RelA and splicing factors SFRS2/SC35 that have been proposed to participate in Tax-mediated activation of gene expression via NF- κ B pathway (16,17). In this setting, we have recently demonstrated that when TAX is expressed, p65/RelA not only impacts promoters but also enriches gene bodies and induces alternative splicing changes, thereby broadening the influence of NF- κ B on

transcriptome diversity both quantitatively and qualitatively (18). The transcription factor p65/RelA interacts with various splicing factors (18-22), among which DDX17 that regulates splicing of GC-rich exons when recruited by p65/RelA in close proximity to the genomic target exon (18). It is noteworthy that Tax-induced alternative splicing primarily impacts genes that are not modified at the gene expression level (18,23), yet experimental tethering of p65/RelA to its genomic target exon is sufficient to locally affect alternative splicing, indicating that p65/RelA acts on splicing regardless of its activity on the target gene promoter (18). Given the tightly controlled coordination of NF- κ B-regulated genes to mediate cellular functions and responses to stimuli, these findings raise questions whether these two distinct activities of p65/RelA are coordinated.

The transcriptional coordination of NF- κ B-responsive genes is regulated through a complex interplay of mechanisms that includes the oscillating dynamics of NF- κ B signaling (13,14,24), the differential DNA affinity of homo- or heterodimers formed by NF- κ B subunits (25,26), the recognition of κ B sites and flanking sequences (26-28), as well as specific co-factors and post-translational modifications of NF- κ B (29,30). More recently, the 3D conformation of chromatin has emerged as a critical determinant of NF- κ B-mediated gene expression regulation (31). NF- κ B p65/RelA is able to promote DNA looping through interactions with various transcription and chromatin remodeling factors (32,33). NF- κ B signaling upon TNF- α has been associated with the formation of specialized transcription factories, also called NF- κ B factories, where responsive-coding and -miRNA genes are transcribed in a coordinated manner (34). Such long-range interactions of co-transcribed genes can occur in a hierarchical relationship that contributes to the temporal coordinated regulation of responsive genes (35). The question arises whether these mechanisms could play a role in coordinating transcription and alternative splicing events promoted by p65/RELA upon TAX expression.

Alternative splicing is a co-transcriptional process regulated by the combination of various factors, such as RNA binding proteins, elongation rate of transcription, and chromatin remodeling factors (36,37). Additional studies have provided evidence for the involvement of 3D chromatin conformation in alternative splicing regulation (33-35,38-41). Using chromosome conformation capture (3C)-based approaches such as Hi-C, active chromatin has

been observed highly concentrated in the nuclear center and around nuclear speckles (NS), which are dynamic subnuclear structures enriched in splicing factors and other RNA processing proteins (42). NS are enriched in GC-rich genomic sequences in their close vicinity (43). In particular, it appears that exon-intron units with high-GC content are preferentially localized in the nuclear center in association with NS, compared to their low-GC counterparts (44,45). Importantly, high- and low-GC exon-intron units display different splicing patterns, and their experimental shifting from one genomic location to another affects both their transcription and splicing regulation, indicating that the nuclear location of the gene determines its regulation in alternative splicing (45). In line with this, the formation of multigene complexes via trans-chromosomal contacts in foci enriched in splicing factor RBM20 has been shown to function as a splicing factory, suggesting that nuclear condensates may act as hubs regulating both transcription and alternative splicing of cell-signaling responsive genes (46).

Here, we provide molecular evidence that the viral oncogene HTLV-1 TAX induces drastic changes in the 3D conformation of the cell genome that are accompanied by differential gene expression and alternative splicing modifications. In particular, we show that a trans-chromosomal interaction involving *NFKBIA* and *RELA* genes is required for TAX-induced skipping of exon E6 of *RELA*, leading to the expression of an isoform of p65/RelA with a unique gene expression activation pattern. Engineering-based approaches via dCas9 demonstrate that *NFKBIA-RELA* contacts are caused by the DNA binding of p65/RelA at the close vicinity of the genomic *RELA* E6, without affecting target gene expression. These results provide insight into the interplay between HTLV-1, NF- κ B signaling, and 3D genome conformation in reprogramming cellular function, demonstrating how the formation of a p65/RelA dependent multigene complex coordinates NF- κ B-related transcription and alternative splicing events.

MATERIAL & METHODS

Cell culture and transfections

The human embryonic kidney (HEK) 293T-LTR-GFP cell contains an integrated GFP reporter gene under the control of the viral HTLV-1 long terminal repeat (LTR). HEK293T-LTR-GFP were cultured in DMEM + 4.5 g/L D-Glucose + Pyruvate + GlutaMAX™, supplemented with 10 % heat-inactivated FBS and 1 % Penicillin/Streptomycin. The transfection efficiency of cells with Tax, Tax-M22, and dCas9-T2a-GFP constructs was assessed by measuring GFP fluorescence with EVOS® FL Imaging System. RNA guides for dCas9 (sgRNA) (Supplementary Table 1) were designed using UCSC 'CRISPR targets' tracks and sequences with overall highest prediction scores and lowest off-targets. The sgRNAs were cloned into the BsmBI sites of the CRIZI plasmid (generously gifted by Philippe Mangeot, CIRI, Lyon, France). For dCas9-p65 cloning, WT-p65 was amplified from HEK-293T-LTR-GFP cDNA and cloned into the BamHI and XbaI sites of dCas9-empty-GFP plasmid (generously gifted by Reini F. Luco, Institut Curie, Orsay, France). The expression vectors pRELA-WT and pRELA Δ E6 were produced using sequences amplified from HEK293T cDNA and the V5 sequence was added in 5'. Sequences were then cloned in pXJ41 plasmid using NotI and BamHI restriction sites. All sequences were verified by Sanger sequencing.

Transfections were performed using pSG5M-Tax-WT, pSG5M-Tax-M22, pLV hU6-sgRNA hUbC-dCas9-KRAB-T2a-GFP (addgene plasmid #71237), sgRNA-CRIZI, pBabe-Puro-IKBalphawt (Addgene plasmid #15290), dCas9-p65, dCas9-empty using Jeprime (Polyplus Transfection) following manufacturer's instructions, and cells were harvested 48h post transfection.

HTLV-1-chronically infected lymphocytes C91PL and non-infected Jurkat (both kindly gifted by Renaud Mahieux CIRI, Lyon, France) were cultivated in RPMI 1640 medium (Gibco, Life Technologies) supplemented with 25 mM HEPES, 10 % heat-inactivated FBS and 1 % Penicillin/Streptomycin.

RNA-seq analysis

RNA-seq data have been previously published (18) and deposited on NCBI GEO under the accession number GSE123752. Briefly, poly-A transcripts were extracted at 48h post-transfection from 293T-LTR-GFP cells transfected with pSG5M-Tax or pSG5M empty vectors. RNA-seq libraries were prepared from biological triplicates and sequenced using the illumina HiSeq 2500. Paired-end pairs of reads were then analyzed using the pipeline FaRLine and the FasterDB database (47). HTSeq-count (v0.7.2)(48) and DESeq2 (v1.10.1) (49) were used calculating gene expression level and for computing differential gene expression levels, respectively. The significance thresholds were set to 5% for Δ PSI (differential percentage of spliced-in sequence) ($p < 0.01$, Fisher's exact test) and 0.6 for log₂-gene expression changes ($p < 0.05$, Wald test using Benjamini and Hochberg method), respectively. Relative genomic distance analysis between alternative splicing events (ASE) and differential gene expression was carried out using reldist from Bedtools. Control set of ASE was generated using the shuffle function of Bedtools.

Hi-C assays and data processing

The Hi-C experiment and library preparation were conducted following the *in situ* method described by Rao and colleagues with slight modifications (50). Briefly, HindIII enzyme was used to digest cells overnight at 37°C with 500U, followed by biotin filling and proximity ligation for 4 hours at 18°C with 2000U T4 DNA Ligase. After reverse-crosslinking, DNA was purified and sheared to ~300 bp fragments using Covaris S220 sonicator. The biotin-containing fragments were then immobilized on MyOne Streptavidin T1 beads. The NEXTflex adaptors were ligated, and the fragments were PCR amplified for 8 cycles using the KAPA HiFi Library Amplification Kit. Double-size selection was performed using AMPure XP beads to isolate fragments between 300 and 800bp. Sequencing of Hi-C libraries was performed on Illumina Nextseq 550 with 150 bp single-end reads (Genomeast, IGBMC, Illkirch, France). The raw reads were independently mapped to the hg19 reference genome using the HiC-Pro pipeline (version v3.1.0), and the output statistics, including the total number of sequenced reads and the number of valid interactions after filtering, are presented in Sup Fig 1.

The Hic explorer pipeline (v3.7.2) was used to process the Hi-C data and plot the matrices (51). The matrices were first normalized to each other (hicNormalize), then corrected (hicCorrectMatrix) for removing bins with low numbers of reads and balanced using ICE (52) at

resolutions of 10k, 50k, 100k, and 500k bp. Corrected matrices were plotted (hicPlotMatrix) on a log scale at a resolution of 500k. The differential matrix was obtained using a log₂ratio comparison between TAX and CTL cells on corrected matrices at the 500k resolution (hicCompareMatrices). The ratio between short-range and long-range contacts was computed using hicPlotSVL with the threshold distance set to 1e6 nucleotides.

The inference of A/B compartments and changes in compartmentation between TAX and CTL matrices were analyzed using the pipeline dcHiC with matrices at a resolution of 100k (53). The full genome compartment strength was calculated as $(AA + BB) / (AB + BA)$ from the log₂ ratio of observed versus expected contacts sorted by their eigen vector values (hicCompartmentalization). A saddle plot was generated with cooltools (<https://github.com/open2c/cooltools>) using cis-contacts from matrices at a resolution of 50k. The eight subcompartments were assigned by the pipeline CALDER with matrices at a resolution of 10k and the binning variable set to 50k (54). The Deeptools' PlotEnrichment (55) function was then used to validate CALDER predictions regarding their subcompartment enrichment levels in histone marks H3K27ac, H3K4me3, and H3K9me3 publicly available for HEK293T cells in ENCODE (ENCF706GDY, ENCF219COP, ENCF800LFN, ENCF063WXN, ENCF626VTP, and ENCF295FIO). Comparison of both compartment and subcompartment orientations between TAX and CTL conditions was carried out using Bedtools (56). Sankey diagram was built in R using the networkD3 package. Genomic regions corresponding to both subcompartment transition and inter-chromosomal changes upon TAX were obtained using bedtools intersect function with coordinates of TAXvsCTL log₂ratio contact matrix computed at 50kbp and those of the subcompartment changes grouped as follows: A.1 (A.1.1 + A.1.2), A.2 (A.1.1 + A.1.2), B.1 (B.1.1 + B.1.2), and B.2 (B.2.1 + B.2.1). Gene ontology analysis and motif enrichment in promoters involved in 3D chromatin contacts in TAX expressing cells was performed with ShinyGO 0.76.3.

The identification of topologically associating domains (TADs) was carried out using the HicFindTADs function of the hicexplorer software with a matrix resolution of 50k. A minimum and maximum window length of 150k and 500k, respectively, were set for the analysis, and a q-value threshold of false discovery rate (FDR) was set to 0.05. The putative boundary and surrounding bins were differentiated by setting a minimum differential threshold (delta) to 0.01. The similarity of TAD boundaries between the control (CTL) and TAX-expressing cells was

assessed by using the Bedtools' Jaccard statistic with a tolerance window of 50 kbp. Intra-TAD and inter-TAD interactions were analyzed by merging the TAD domains obtained from both CTL and TAX conditions using the hiCMergeDomains function of Hicexplorer. The CTCF binding sites (ENCODE ENCF895AOX) were used to delineate TAD boundaries, considering that boundaries within 20Kb of each other were merged as one. The merged TAD boundaries were then utilized to calculate the intra-TAD and inter-TAD differential contacts between TAX and CTL matrices (hicDifferentialTAD). Significant intra-TAD and inter-TAD interactions were defined thanks to the Wilcoxon rank-sum test with a p-value threshold set to 0.05. Bedtools intersect function allowed assigning gene deregulations to differential chromatin interactions between TAX vs CTL ($\log_2(\text{obs}/\text{exp})$ at 50 k). Network analysis of ASE, DGE, and chromatin contacts was performed with Cytoscape (3.9.1).

Western Blot

Cells were washed twice with 1 X PBS, harvested and incubated with lysis buffer (10 mM Tris HCl pH 8, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 % NP-40, 1 % SDS, 1 mM DTT, supplemented with protease inhibitors and 10 mM NaF) for 30 min on ice. Total proteins were sonicated on a Bioruptor Plus (Diagenode) (position high, 5 x 30'/30' cycles), and cell debris were pelleted and discarded. 20 μ g of total proteins were used for SDS-PAGE electrophoresis on NuPAGE™ 4–12% Bis-Tris Protein Gels and transferred on nitrocellulose membranes using the Trans-Blot® Turbo™ Blotting System. Membranes were saturated in 1 X TBS-Tween containing 5% non-fat milk for 1 h and were incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in 1 X TBS-Tween containing 5% non-fat milk. The primary antibodies used were the following: RELA (sc-109, Santa Cruz), Tax (1A3, Covalab), Vinculin (ab129002, abcam), I κ Ba (L35A5 Cell Signaling Technology). Membranes were washed three times in 1X TBS-Tween and incubated with HRP-conjugated secondary antibodies for 1 h before washing for three times. HRP substrate (Immobilon Forte (Millipore)) was deposited onto the membrane before reading chemiluminescence on a Chemidoc (BioRad).

RNA extraction, PCR, and real-time quantitative PCR

Total RNAs were extracted using TRIzol (Invitrogen). 2,5 μ g of total RNA was treated with dsDNase (Thermo Scientific) and retro-transcribed using Maxima First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific) according to manufacturer's instructions. PCRs were performed with

GoTaq polymerase (Promega, Madison, WI, USA) using 7.5 ng cDNA as template, were run on agarose gel electrophoresis and read using Geldoc (BioRad). Quantitative PCR were performed with SYBR[®] Premix Ex Taq TM II (Tli RNaseH Plus) on LightCycler 480 II using 7.5 ng of cDNAs. Melting curves were checked for non-specific product absence. Relative expression levels were calculated using the $\Delta\Delta$ Ct method on technical duplicates or triplicates and normalized to GAPDH expression. Alternative exons inclusion rates were calculated using $\Delta\Delta$ Ct method and were normalized to a constitutive exon. Oligonucleotide sequences used are listed in Supplementary table 1.

Chromatin immunoprecipitation

2×10^7 cells were crosslinked with 1% formaldehyde for 10 min at room temperature. Crosslinking was quenched by addition of Glycin to a final concentration of 0.125 M. Cells were harvested and incubated 30 min at 4°C in lysis buffer (1% Triton X-100, 0.1 % Sodium Deoxycholate, 0.1 % SDS, 140 mM NaCl, 50 mM HEPES-KOH pH 7.5, 1 mM EDTA, supplemented with protease inhibitor and phosphatase inhibitor). Nuclei were pelleted and resuspended in shearing buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, supplemented with protease inhibitor and phosphatase inhibitor). Chromatin was sheared to an average fragments size of 100-500 bp using Covaris S220 (Peak Power: 140; Duty Factor: 5; Cycles/burst: 200, 20 min). Immunoprecipitations were performed using 25 μ g of chromatin diluted in dilution buffer (1% Triton X-100, 0.01% SDS, 150 mM NaCl, 10 mM Tris HCl pH 8, 1 mM EDTA, supplemented with protease inhibitor and phosphatase inhibitor), and incubated with 5 μ g of anti-RELA (#36369, Active Motif), anti HA (H3663, Sigma-Aldrich) or control Rabbit or Mouse IgG (10500C and 10400C respectively, ThermoFisher) overnight at 4°C under rotation. chromatin-antibodies complexes were recovered by incubation with 30 μ l of Dynabeads[®] Protein A/G 1:1 mix (ThermoFisher) for 2 h at 4°C under rotation. Complexes were washed for 5 min at 4°C under rotation with the following buffers : Wash 1 (1% Triton X-100, 0.1% NaDOC, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8), Wash 2 (1% NP-40, 1% NaDOC, 150 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8), Wash 3 (0.5% Triton X-100, 0.1% NaDOC, 500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8), Wash 4 (0.5% NP-40, 0.5% NaDOC, 250 mM LiCl, 20 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA), Wash 5 (0.1% NP-40, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA) and twice with Tris-EDTA buffer (10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA). The immunoprecipitated chromatin was eluted in elution buffer (1 % SDS, 200 mM NaCl, 100 mM NaHCO₃) and crosslink was reversed

by adding 100 μ g proteinase K and incubating overnight at 65°C. Immunoprecipitated chromatin was purified by phenol-chloroform extraction, and quantitative PCR was performed using SYBR[®] Premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (Takara) on a LightCycler 480 II (Roche, Mannheim, Germany), using manufacturer's recommended thermocycling conditions. Values were expressed as fold enrichment relative to the signal obtained for the control IgG immunoprecipitation. Primers used for quantitative ChIP experiments are available in Supplementary Table 1.

Chromosome Conformation Capture (3C)

1 x 10⁷ cells were cross-linked with 1 % formaldehyde (ThermoFisher) for 10 min at RT. Formaldehyde cross-linking was stopped by addition of Glycine for 5 min to a final concentration of 0.125 M. Cells were washed twice with cold PBS and harvested. Cells pellets were lysed for 20 min on ice using lysis buffer (50 mM Tris HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 % NP-40, 1 % Triton X-100, 5 mM EDTA and supplemented with protease inhibitor cocktail). Nuclei were harvested by centrifugation and washed in 1,2 X restriction buffer (depending on the restriction enzyme used) and resuspended in 500 μ l of the same buffer. For nuclear membrane permeabilization, SDS was added to a final concentration of 0.3 % followed by incubation at 37°C for 1 h under agitation (800 rpm). SDS was neutralized by addition of Triton X-100 to a final concentration of 2.5 % at 37 °C for 1h h at 900 rpm. Digestion was realized by addition of 50 U DpnII or ApoI at 37 °C for 3h at 900 rpm followed by another 50 U and overnight incubation at 37 °C at 900 rpm. Digestion efficiency was assessed on a reverse cross-linked and purified aliquot by agarose gel electrophoresis (data not shown). Restriction enzyme was inactivated by incubation at 65 °C for 20 min at 900 rpm. Digested chromatin was proximity-ligated by diluting restriction reaction in 7 ml of 1X ligation buffer. Ligation was performed by addition of 50 U T4 DNA ligase and 3h incubation at 16 °C at 750 rpm followed by another 50 U and overnight incubation at 16 °C at 750 rpm. Ligation efficiency was assessed on a reverse cross-linked and purified aliquot by agarose gel electrophoresis (data not shown). Cross-link was reversed by addition of 30 μ g proteinase K and overnight incubation at 65 °C at 900 rpm. 3C templates were purified by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation.

3C-PCR were performed using semi nested primers (Supplementary Table 1) and two rounds of PCR. for the first round, 50 ng of 3C template was used and amplified using Phusion Green

HSII High-Fidelity PCR Master Mix and a final primer concentration of 0.5 μ M using the following program : 3 min of denaturation at 98°C, followed by 20 \times (98°C for 10 s, primer-specific annealing temperature for 30 s, 72 °C for 45 s) and 10 min final extension at 72 °C. The first-round of 3C-PCR was analyzed by gel agarose electrophoresis to check the absence of any significant amplification band before performing second-round 3C-PCR. Second-round 3C-PCR was performed using the same primer than the first round for RELA viewpoint, and a different primer closer to the restriction site for NFKBIA viewpoint. 1 μ l of the first round PCR was amplified using Phusion Green HSII High-Fidelity PCR Master Mix and a final primer concentration of 0.5 μ M using the following program: 3 min of denaturation at 98°C, followed by 25 \times (98°C for 10 s, primer-specific annealing temperature for 30 s, 72 °C for 45 s) and 10 min final extension at 72 °C. Optimal annealing temperatures were determined using Thermofisher Phusion tm calculator (www.thermofisher.com/tmcalculator). 3C-PCR products were analyzed by gel agarose electrophoresis.

Circular Chromosome Conformation Capture (4C-seq) and data processing

For Circular Chromosome Conformation Capture, the same protocol as for 3C was performed. 50 μ g of 3C template was digested by 50 U second restriction enzyme (Csp6I, ThermoFisher) in 1X Buffer B (ThermoFisher) for 2 h at 37 °C at 500 rpm. Digestion efficiency was assessed on a purified aliquot by agarose gel electrophoresis (data not shown). Restriction enzyme was inactivated by incubation at 65 °C for 20 min at 900 rpm. The second ligation was performed under diluted conditions by addition of 50 U T4 DNA ligase and 2 h incubation at 16 °C at 750 rpm followed by another 50 U and 2 h incubation at 16 °C at 750 rpm. Ligation efficiency was assessed on a reverse cross-linked and purified aliquot by agarose gel electrophoresis (data not shown). 4C templates were purified by phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation followed by an additional JetSeq™ Clean purification.

4C sequencing primers (Supplementary Table 1) were designed as previously described (57) and tested on a small portion of 4C template with increasing templates amounts to determine linear range, efficiency, minimal primer dimer amplification, and optimal annealing temperature of each primer pairs. 4C libraries were prepared in two steps of PCR. The first step consisted in an amplification of ligation fragments specific of each viewpoint using 100 to 400 ng template depending on primer linearity. Expand™ Long Template PCR System (Roche) was

used with the following thermocycling program: 2 min of denaturation at 94°C, followed by 16× (94°C for 15 s, primer-specific annealing temperature for 1 min, 68°C for 3 min) and 7 min final extension at 68 °C. All first step PCR primers are listed in Supplementary Table 1. Multiple PCR reactions were performed, pooled together and purified using JetSeq™ Clean purification according to manufacturer's instructions. The second PCR step (used to add illumina adapters, indexes and sequencing sequences) was performed on 5 μ l of purified first step PCR products using Expand™ Long Template PCR System (Roche) with the following thermocycling program: 2 min of denaturation at 94°C, followed by 20× (94°C for 15 s, 60 °C for 1 min, 68°C for 3 min) and 5 min final extension at 68 °C. All second step PCR primers are listed in Supplementary Table 1. 4C templates were purified using JetSeq™ Clean purification according to manufacturer's instructions. Libraries quantity and purity were determined on a 2200 TapeStation (Agilent) with a D500 ScreenTape (Agilent). Sequencing of 4C libraries was performed on Illumina Nextseq 550 with 150 bp single-end reads (Genomeeast, IGBMC, Illkirch, France).

Computational analysis of 4C-seq data was performed for each replicate and viewpoint using the fourSig pipeline (58) with the following parameters: window.size=5, iterations=1000, fdr=0.001, and fdr.prob=0.01. For each viewpoint, triplicate outputs were normalized to each other using multiBamsummary and Bamcompare from deepTools (55). Differential chromatin contacts between CTL and TAX conditions were determined using the DESeq2 R package (FDR=0.05). Figures were generated using pygenometrack (version 3.6) (59).

RESULTS

TAX reshapes the 3D genome.

To evaluate the impact of TAX on 3D chromatin organization, we performed an unbiased chromatin interaction mapping using Hi-C analysis of HEK293T cells with and without TAX expression. Hi-C data were analyzed using the HiC-pro pipeline (60), which ensured high-quality experiments as evidenced by high mapping rates (Sup Fig 1). We identified over 160 million interactions, including over 20 million trans-chromosomal contacts, in both control (CTL) and TAX-expressing cells (Sup Table 2). Consistent with previous studies on chromosome territories (61,62), the Hi-C contact maps demonstrated higher frequencies of cis- versus trans-chromosomal interactions (Figure 1A). While the Hi-C maps from CTL and TAX-expressing cells showed similar shapes (Figure 1A and Sup Fig 2), we noticed a decrease in short-range (<1 Mb) and an increase in long-range (>1 Mb) interaction frequencies upon Tax expression (Sup Fig 3 A-B). These changes were particularly evident in differential heatmaps (Figure 1A, right panel).

Principal component analysis (PCA) of the Hi-C contact matrices allowed us to assess the effect of TAX on genomic compartments A and B, which correspond to euchromatin and heterochromatin regions, respectively (Figure 1B). The eigen vectors calculated from CTL and TAX samples were highly correlated (Pearson test, $R=0.948$, $p\text{-value} < 0.0001$) (Sup Fig 3 C), indicating no significant changes in genomic locations of A and B compartments between the two experimental conditions. Homotypic compartment interactions (AA and BB) were predominant in CTL cells (Figure 1C). In comparison, TAX-expressing cells presented increased heterotypic compartment interactions and decreased AA contacts (Figure 1C), indicating that TAX weakens chromatin compartmentalization. Comparative analysis of compartment distribution between CTL and TAX-expressing cells revealed 13% compartment switching (A to B and B to A, Figure 1D), suggesting that the viral oncoprotein structurally affects both large heterochromatin and euchromatin regions.

Trans-chromosomal interactions have been linked to the definition of sub-compartment domains that associated with distinct epigenetic regulations (50). Subcompartments A1 have been identified as highly active chromatin regions that are closely localized to nuclear speckles

(63,64), while B1 and B2 are typically enriched in repressive marks, such as H3K27me3 and H3K9me3 (50,54). We used the CALDER algorithm (54) to infer eight subcompartments in both CTL and TAX-expressing cells (Figure 1E and Sup Fig 3 E-F). Using publicly available ChIP-seq datasets for HEK 293T cells, we confirmed that the predicted subcompartments A.1.1 and A.1.2 in control cells were markedly enriched in active marks H3K27ac and H3K4me3, while compartments B.2.1 and B.2.2 corresponded to H3K9me3 embedded regions (Sup Fig 3 E). We then compared the subcompartment annotations between the two experimental conditions by considering 4 large subcompartments: A.1 (A.1.1 + A.1.2), A.2 (A.1.1 + A.1.2), B.1 (B.1.1 + B.1.2), and B.2 (B.2.1 + B.2.1). Subcompartment transitions were observed in TAX expressing cells, as demonstrated in Figure 1E and Sup Fig 3F. These transitions involved shifts from active to inactive subcompartments, with some coinciding with differential trans-chromosomal interactions (Figure 1F). Overall, these data indicated that TAX promotes a profound reorganization of the 3D genome that likely follows from dynamic chromatin regulation.

We next investigated the effects of TAX on topologically associating domains (TADs). To this end, we employed the HiC-explorer pipeline to assess the TAD-separation score, which measures the degree of separation between the left and right regions in each Hi-C matrix. We set the minimum distance between two boundaries to 50 kilobase pairs (kbp) and used publicly available CTCF binding sites for determining TAD boundaries (ENCF895A0X) (Sup Fig 3G). Our analysis revealed 3539 TADs shared by control cells and TAX-expressing cells, indicating that TAD boundaries were largely unmodified between samples (Figure 1G and Sup Fig 3G). Nevertheless, we observed differential chromatin contacts at both intra- and inter-TAD levels, accounting for 40.3% and 23.4% of TADs, respectively (Figure 1H). Notably, we found a statistically significant increase in inter-TAD contacts in TAX-expressing cells (one-way ANOVA, $p=0.004$), indicating that TAX functions as a potent modifier of host 3D chromatin architecture.

TAX-induced 3D chromatin contacts associate with changes in both gene expression and alternative splicing.

We next sought to assess the functional significance of TAX-induced 3D chromatin remodeling. Gene expression profiles including alternative splicing events of CTL and TAX(+) cells have been previously published (18). Using stringent thresholds to analyze differential gene expression

(DGE) (glm-adjusted p -value < 0.05 , Log₂-fold change ≥ 0.6) and alternative splicing events (ASE) ($p < 0.01$ adjusted Fisher test, Δ PSI ≥ 0.05), we identified 523 genes with altered whole gene expression and 1,104 genes producing alternatively spliced transcripts upon TAX expression (Figure 2A). A total of 1345 alternative splicing events consisted of 1020 skipped exon (SE), 15 alternative 5' splice site (A5SS), 62 alternative 3' splice site (A3SS), 244 multi-exon skipping (MES), and 4 mutually exclusive exons (MXE) (Figure 2B). In line with previously published data (18,23), a minority of TAX-regulated genes (5%, 23/523) were affected at both DGE and ASE levels (Figure 2A), suggesting that TAX-induced transcription and alternative splicing are two distinct and complementary mechanisms that profoundly modify the host transcriptome upon HTLV-1 infection. We examined the relative distribution of TAX-regulated genes across the genome and found that genes producing alternatively spliced transcripts tended to be located closer to differentially expressed genes than expected by chance, suggesting that these two independent mechanisms could be locally interrelated (Figure 2C). The coordinates of TAX-regulated genes (DGE + ASE) significantly overlapped with differential topologically associating domains (TADs) (Figure 2D), leading us to examine whether TAX-induced gene regulations could colocalize with differential 3D chromatin interactions. To this end, we cross-compared the differential Hi-C contact matrix with genome coordinates of TAX-regulated genes and found that the majority of TAX-regulated genes appear to be intertwined in a highly interconnected network of 3D chromatin contacts that occur at both cis-chromosomal and trans-chromosomal levels (Figure 2E and Sup Fig 4). Using differential Hi-C matrix binned to 30 kbp, we identified 73% deregulated genes (including both DGE and ASE, 1173/1604) distributed in 1451 differential 3D chromatin interactions (Log₂FC ≥ 0.5). Of those, 237 chromatin contacts involved genes affected in expression, consistent with previously described transcriptional condensates clustering multiple genes co-regulated in transcription (34,35,39). Additionally, 1047 chromatin contacts involved genes undergoing alternative splicing, of which 731 were spatially gathered with genes differentially expressed, suggesting that multigene complexes might coordinate both transcription and alternative splicing of co-regulated genes.

To further improve this Hi-C prediction, we conducted 4C assays to investigate physical interactions between genes expressing alternative spliced isoforms and distant genes that were concomitantly deregulated at the gene expression level by TAX. We selected three

distinct viewpoints in genes *CCNL1*, *SEC31B*, and *RFX2*, which were identified above as TAX-regulated targets for alternative splicing of exons E4, E9, and E18, respectively (Figure 2F-H) (18). Using these viewpoints in triplicate 4C assays, we found that upon TAX expression, *CCNL1*, *SEC31B*, and *RFX2* were connected more frequently with distal TAX-regulated genes *PTX3*, *ABCC2*, and *FUT3*, respectively (see Figure 2F-H). Overall, these results provide compelling evidence that TAX triggers long-range chromatin interactions that involve genes undergoing differential expression and/or alternative splicing regulation.

TAX-induced NF-κB activation promotes gene-gene contacts and coordinated gene regulation between *NFKBIA* and *RELA*.

To gain insight into the molecular mechanism underlying gene-gene contacts, we next aimed to assess whether specific gene subsets were enriched in chromatin interactions generated by TAX. Gene ontology analysis of TAX-regulated genes (including both DGE and ASE) identified in 3D chromatin contacts pointed to a significant enrichment in TNF-α and NF-κB signaling pathways, while remaining terms were related to oncoviral infection including that of HTLV-1 (Figure 3A). In line with this, analysis of transcription factor motifs in promoter sequences involved in chromatin contacts revealed a significant enrichment in NF-κB motifs (Sup Fig 5A). These results were reminiscent of previous studies reporting the formation of multigene complexes in which interacting genes are especially activated by NF-κB upon TNF-α stimulation (34,35). Accordingly, we sought to assess by chromosome conformation capture (3C) whether such NF-κB multigene complexes could pertain into TAX expressing cells. To this end, we developed a 3C assay and an inverse PCR (IPCR) assay (with no crosslinked chromatin) used as negative control. Validating our approach and ruling out false positive products derived from ligation of free DNA fragments, the 3C analysis, but not IPCR assay, allowed to detect a previously described TNF-α-related gene-gene interaction between *SAMD4A* and *GCH1* genes (distant of ~0.8 Mbp on chromosome 14) (Figure 3B) (34). Similar results were obtained in cells expressing TAX, indicating that TAX mimics TNF-α-activated *cis*-contacts (Figure 3B). In both experimental conditions, the *SAMD4A-GCH1* interaction coincided with a significant increase in *SAMD4A* expression (Figure 3B, right panel), thereby proposing that, as described for TNF-α, TAX promotes the formation of multigene complexes in which genes are coregulated in transcription.

As a logical progression, we next examined whether *trans*-chromosomal contacts previously evidenced upon TNF- α between chromosomes 11 and 14 (34,35) may involve TAX-deregulated genes. Our attention was drawn to *RELA* (chr11:65421067-65430443) and *NFKBIA* (chr14:35870716-35873960), which were the only genes regulated by TAX found in both chromosomes and because of their critical roles in NF- κ B signaling, as well as in viral persistence and ATL development (65). Both *NFKBIA* and *RELA*, which respectively encode the inhibitor I κ B α and the effector p65/RelA of NF- κ B signaling, have been identified among the most critical genes encoding TAX interactome and frequently affected by activating somatic mutations in ATLL (65,66). RNA-seq data showed that *NFKBIA* was significantly upregulated upon TAX expression, while *RELA* displayed no significant changes in gene expression but was regulated at the alternative splicing level by the exon skipping of exon 6 (Sup Table 3). We confirmed these RNA-seq predictions by RT-qPCR assays in HEK cells expressing TAX as well as in HTLV-1-transformed C91PL cells (Figure 3C and Sup Fig 5C). Of note, the protein level of p65/RelA in HEK cells appeared unaffected by TAX, whereas that of I κ B α was downregulated, which was consistent with its proteasomal degradation described upon TAX expression (Sup Fig 5B) (67,68). In contrast to the wild-type TAX, the ectopic expression of TAXM22, a mutant deficient for NF- κ B activation, failed to influence both *NFKBIA* expression and *RELA* exon skipping (Figure 3C), indicating that both transcriptomic events affecting *NFKBIA* and *RELA* upon TAX expression relied on NF- κ B activation.

To assess the impact of exon E6 skipping on protein translation, we used the GenBank sequence NM_021975 as reference for the full transcript of *RELA*. An open-reading frame prediction using ExPASy tools revealed that, in comparison to the wild-type isoform that encodes 551 amino acids, the mRNA isoform lacking exon E6 - referred to as RelA Δ E6 - encodes a truncated protein isoform of p65/RelA that consists of 153 amino acids (predicted at 44 kDa) (Supplemental Figure 5D). This truncated isoform shares the rel homology domain with its wild-type counterpart but lacks other domains that are involved in DNA binding and protein-protein interactions. Ectopic expression of RelA Δ E6 demonstrated that this p65/RelA isoform does not possess transactivating effects in the absence of TAX when compared to its wild-type counterparts (Figure 3D and Sup Fig 5E-F). In contrast, upon Tax expression, RelA Δ E6 acts as a

repressive regulator for a subset of NF- κ B-responsive genes, including *A20* and *BCL3*, while having no significant effects on *NFKB2* expression (Figure 3D and Sup Fig 5F). Additionally, RelA Δ E6 displays an enhanced transactivating effect on the expression of other genes, such as *IL8* (Figure 3D). These data indicate that the RelA Δ E6 isoform induced by TAX is capable of fine-tuning gene expression related to NF- κ B.

We next sought to test whether the concomitant deregulation of *NFKBIA* and *RELA* corresponded to increased *trans*-chromosomal contacts between chromosomes 11 and 14 upon TAX expression. To this end, we developed semi-nested 3C assays using both promoters of *RELA* and *NFKBIA* as anchors (Figure 3E). This approach revealed a single PCR signal attributed to *RELA-NFKBIA* contacts in TAX expressing cells, but not in CTL cells (Figure 3F). In comparison, there was no change in PCR signals deriving from an intragenic fragment of *RELA* used as loading control, as well as from an intra-*GAPDH* chromatin loop used as 3C control (34). These data demonstrated that TAX induced chromatin contacts between *NFKBIA* and *RELA* genes localized on chromosomes 14 and 11, respectively.

To determine whether the formation of a TAX-induced multigene complex involving *NFKBIA* and *RELA* participates in regulating the alternative splicing of *RELA* transcripts, we aimed to examine the *RELA* E6 skipping event in cells that are impaired for *NFKBIA-RELA* interaction. To this end, we used the dCas9-KRAB system (69), already identified as an effective steric barrier of chromatin contacts (70), to disrupt the contact between *NFKBIA* and *RELA* genes. Four distinct guide RNAs were designed to tether the dCas9-KRAB construct to the *RELA*-interacting genomic region of *NFKBIA* (Figure 3E). Quantitative ChIP (qChIP) experiments confirmed the specific tethering of dCas9-KRAB onto the *NFKBIA* target when compared to a gRNA-free experiment (Figure 3G). Under these conditions, the effect of TAX on the *RELA-NFKBIA* interaction was impaired (Figure 3H). Tethering the dCas9-KRAB on *NFKBIA* promoter did not interfere with the expression level of *RELA* but it significantly reduced the effect of TAX on *RELA* E6 exon skipping (Figure 3I). Importantly, we ascertained that the overexpression of ectopic I κ B α had no impact on this negative effect of dCas9-KRAB (Sup Fig 5F-G), indicating that the loss of TAX-induced skipping of *RELA* E6 through dCas9-KRAB tethering to *NFKBIA* is due to disrupted contacts between *NFKBIA* and *RELA* rather than a reduced cellular abundance of I κ B α . Collectively, these data define *trans*-chromosomal contacts between chromosomes 11

and 14 as an underlying mechanism for the concomitant TAX-driven regulation of *NFKBIA* expression and alternative splicing of *RELA* transcripts.

Intragenic p65/RELA occupancy of *RELA* leads to *RELA-NFKBIA* contacts and alternative splicing of *RELA* E6.

In light of our previous findings that p65/RelA occupancy of genomic exons can influence gene expression through alternative splicing (18), we next conducted qChIP assays to assess the chromatin distribution of p65/RelA across *RELA* and *NFKBIA* in cells with or without TAX expression. As shown in Figure 4A, TAX induced an average 2-fold enrichment of p65/RelA binding on the *NFKBIA* promoter, whereas it had no significant effects on *RELA* promoter occupancy. These data reflected the effects of TAX on the expression levels of *NFKBIA* and *RELA* genes (Figure 3C). In addition, we observed a significant increase in p65/RelA occupancy at the genomic exon E6 of *RELA* of TAX-expressing cells compared to control cells, suggesting that exon E6 belongs to exon subsets that are regulated by p65/RELA (Figure 4A). Moreover, disrupting *NFKBIA-RELA* contacts with the dCas9-KRAB in TAX-expressing cells led to a marked reduction in p65/RelA recruitment at the *NFKBIA* promoter, along with a significant decrease in p65/RelA occupancy of genomic exon E6, while there was no significant impact on p65/RelA occupancy of the *RELA* promoter. These findings suggest a direct relationship between p65/RelA, alternative splicing, and gene-gene contact regulation.

We previously demonstrated that experimental chromatin enrichment of p65/RELA in proximity to its genomic exon target can effectively lead to alternative splicing modification (18). To further investigate the role of p65/RelA in alternative splicing and 3D chromatin contacts, we designed dCas9 constructs fused or not to p65/RelA to assess the effect of p65/RelA locally tethered to the genomic *RELA* E6. We validated the specific tethering of the dCas9 constructs to this region using qChIP assays, compared to a dCas9-empty construct (Figure 4C). At the RNA level, this dCas9-mediated local p65/RelA enrichment resulted in exon skipping of E6 (Figure 4D), confirming that *RELA* E6 is an NF-κB responsive exon. Additionally, semi-nested 3C analysis of *NFKBIA-RELA* interactions revealed that E6-tethered dCas9-p65/RelA was sufficient to promote gene-gene interactions between *NFKBIA* and *RELA* (Figure 4E), thus identifying p65/RelA as an effector of multigene complex formation where NF-κB

responsive genes are coordinated in their regulation at both transcriptional and alternative splicing levels.

DISCUSSION

The 3D genome conformation is crucial for gene regulation, and understanding how viruses manipulate it can reveal fundamental principles of gene regulation and cell behavior. Here, we present evidence that the HTLV-1 viral oncoprotein TAX remodels the 3D chromatin architecture of its host cells. Using Hi-C and 4C analyses, we found that TAX-induced changes in long range chromatin interaction frequencies, compartmentalization, and inter-TAD interactions coincided with differential gene expression and alternative splicing. We demonstrated that gene-gene interactions led to coordinated splicing and transcriptional events upon NF- κ B activation. Our data show that TAX-induced NF- κ B activation promotes contacts between *NFKBIA* and *RELA* genes, which coincides with the skipping of exon E6 of *RELA* and upregulation of *NFKBIA* expression. Disrupting the *NFKBIA-RELA* interaction impacted *RELA* E6 exclusion at the RNA level, while targeted chromatin recruitment of dCas9-p65/RelA triggered *NFKBIA-RELA* interaction and *RELA* E6 skipping. Our findings suggest that p65/RelA plays a role in assembling multigene complexes, coordinating transcription and alternative splicing regulation of NF- κ B-responsive genes. This highlights a new mechanism coordinating transcriptional and post-transcriptional changes through the NF- κ B pathway and shows how HTLV-1 TAX impacts molecular mechanisms linking 3D genome conformation to transcriptome diversity.

Numerous cellular signaling pathways are known to influence alternative splicing (71,72), in addition to their effects on gene transcription. However, the specific mechanisms responsible for fine-tuning cellular responses to stimuli are not yet fully understood. In this context, studies examining the dynamics of 3D genome conformation have revealed the importance of multigene complex formation in gene coregulation upon cell signaling (34,35,40), where long-range interactions between cotranscribed genes help to organize transcription within nuclear condensates by establishing hierarchical relationships between gene loops. In light of our findings, we propose a model in which TAX-induced NF- κ B activation leads to a persistent accumulation of p65/RelA at promoters and enhancers, forming nuclear condensates that assemble NF- κ B-responsive genes for coordinated transcription, in line with previous reports (34,35,40). Simultaneously, based on the same physicochemical properties, genes with p65/RelA bound to genomic exons might be attracted to NF- κ B factories without any

consequence on their transcriptional activity, due to the absence of NF- κ B factors at their promoters. However, these multigene complexes could create a suitable environment for facilitating p65/RelA-dependent alternative splicing regulation.

Accordingly, the exon target specificity and the resulting splicing outcomes may then depend on the p65/RelA interactome, in which the presence of various RNA helicases like DDX17, DDX5, DHX9, DDX3X, G3BP1, DHX15, DDX1, and DDX21 is notable, as well as other splicing regulators including SF3B130 (19) and FUS (22,73). Interestingly, these factors have been recently linked to splicing regulatory subnetworks associated with genes located in the center of nucleus and composed of GC-rich intron-exon units (45). This observation is consistent with the features of splicing events initiated by TAX, which predominantly affect GC-rich exons (18). Furthermore, as an additional layer, splicing-associated chromatin signatures (SACS) have been shown to potentially recruit distinct splicing regulators to pre-mRNA of genes within the same functional pathway (74,75). Given its capacity to recruit diverse chromatin remodelers and splicing factors, p65/RelA emerges as a strong candidate for facilitating SACS. Since histone modifications influence both local and global 3D genome organization, p65/RelA could act as a key initiator of intricate and interconnected mechanisms that govern gene movements and splicing decisions upon NF- κ B activation. Future studies should examine these points, focusing on characterizing the p65/RelA interactome and its role in alternative splicing regulation in the context of 3D genome.

Although the long-term effects of TAX-induced NF- κ B activation have been widely studied, it remains unclear whether this activation leads to unique expression patterns of NF- κ B-responsive genes that are specific to TAX. Our study reveals that TAX-induced NF- κ B activation leads to gene-gene contact-dependent regulation of alternative splicing for exon E6 of *RELA* in both HEK and HTLV-1 transformed cells, resulting in the expression of a spliced isoform lacking E6. This isoform encodes a shorter p65/RelA protein of approximately 44 kDa (p65/RelA Δ E6), which, unlike its wild-type counterpart, does not independently alter the expression levels of NF- κ B-responsive genes. However, when TAX is expressed, ectopic expression of p65/RelA Δ E6 appears to repress *A20* and *BCL3* while upregulating *IL8* (Figure 3D and Sup Fig 5F). These findings suggest that *NFKBIA-RELA* contacts upon TAX-induced NF- κ B activation allow the

generation of a *RELA* spliced isoform that might contribute to refining TAX activation-specific gene expression profiles.

Recent studies have reported that other oncogenic viruses, including human papillomavirus (HPV) (76), Epstein-Barr virus (EBV) (77), and hepatitis B virus (HBV)(78), reshape the 3D structure of their host cell genome, potentially contributing to complex mechanisms underlying gene perturbations that lead to cancer development. Regarding HTLV-1, its integration has been demonstrated to alter the 3D genome structure by forming loops between the proviral CTCF binding site and host genome regions located in *cis* (79). It has been proposed that the integration of an HTLV-1 provirus into a genomic region that typically occupies a transcriptionally repressive compartment in the nucleus, such as lamina-associated domains (LADs), could favor the survival of HTLV-1-infected cellular clones *in vivo* (80). However, some gene promoters associated with the nuclear lamina have been shown to escape transcription repression (81), suggesting a more complex and dynamic regulation in peripheral region of the nucleus. Given our findings that TAX can promote changes in long-range chromatin interactions affecting both *cis*- and *trans*-chromosomal regions, future investigations should examine how bursts of TAX expression influence the magnitude of proviral-genome contacts and their consequences on the clonal selection of infected cellular clones and the development of HTLV-1-associated diseases.

In summary, our study demonstrates that the HTLV-1 viral oncoprotein TAX remodels the 3D chromatin architecture of its host cell, influencing gene-gene interactions and coordinating transcription and alternative splicing regulation upon NF- κ B activation. This sheds new light on the orchestration of the interplay between 3D genome conformation and transcriptome diversity, building upon earlier works from our group and others that demonstrated the role of intragenic chromatin loops in regulating transcription and alternative splicing (41,82-84). Our findings raise the question whether similar mechanisms could pertain to other cellular signaling pathways, such as TGF β that has been linked to TGF β factories and splicing regulation through a SMAD3:HNRNPE1 axis (34,85). Further investigations are needed to fully understand the complex relationship between cellular signaling pathways, chromatin architecture, coordinated transcriptional and alternative splicing regulation, and the impact of HTLV-1.

DATA AVAILABILITY

The raw data for Hi-C, 4C and RNA-seq have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus and are accessible through GEO Series accession number XXXXX, XXXX, and XXXX, respectively.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR online.

Supplementary Figure 1: Hi-C data quality control analysis by HiC-Pro pipeline for TAX(+) and CTL conditions. (A-B) Quality control of read alignment and pairing for the CTL and TAX conditions, respectively. During this step, low-quality alignment, singleton, and multiple hits are removed. (C-D) represent the read pair filtering step, where read pairs are assigned to a restriction fragment and invalid pairs such as dangling-ends and self-circles are tracked but excluded from downstream analysis.

Supplementary Figure 2: Hi-C heatmaps and compartment analysis at 500kbp resolution. The figure shows Hi-C contact maps for each chromosome, visualized in logarithmic scale. Each heatmap represents the contact frequencies between genomic loci at a resolution of 500kbp. Below each heatmap, the eigen vector value of the corresponding chromosomal segment is presented. This value characterizes the compartmentalization of the genome into A (positive) and B (negative) compartments, which correspond to open and closed chromatin, respectively. The data were preprocessed and normalized using ICE algorithm. The visualization was generated using hicexplorer software.

Supplementary Figure 3: TAX alters long range chromosomal interaction and the compartmentalization of the genome. (A) Contact probability was calculated using hicexplorer as a function of genomic distance for interactions within individual chromosome arms across the whole genome. Lower panel indicates the log₂FC of differential contact frequency between TAX and CTL condition. (B) The ratio of short-range (≤ 1 Mb) versus long-range (≥ 1 Mb) interactions (SVL) was calculated for each chromosome arm across the whole genome using hicexplorer. The SVL is significantly lower in Tax-expressing cells than in CTL cells (****P < 0.0001). (C) cis-eigen values are not affected genome wide by the expression of TAX Pearson test, R=0.948, p-value <0.0001). (D) Compartmentalization strength in CTL and TAX expressing cells. The global strength for compartmentalization is computed genome-wide as $(AA + BB) / (AB + BA)$ after rearranging the bins of obs/exp based on their corresponding eigen values. (E) Correlation of 8 subcompartments identified by CALDER in CTL cells and histone mark enrichment for H3K27ac, H3K4me3, H3K9me3 obtained from publicly available Chip-seq data in HEK cells. (F) Sankey plot showing subcompartments switching upon TAX expression. (G) Stacked Hi-C data showing Hi-C heatmap matrix of CTL and TAX, eigen vector values indicating compartments A (red) and B

(bleu), insulation score of CTL (grey) and TAX expressing cells (orange) calculated using CTCF binding sites (below) obtained from public data.

Supplementary Figure 4: Network analysis of TAX-regulated genes (DGE and ASE) involved in 3D chromatin contacts. Overall, 1369 genes were identified to be involved in 3D chromatin contacts in TAX expressing cells, forming a main network consisting of 1247 TAX-regulated genes that are connected through 2671 chromatin contacts. Genes that belong to the same chromosome are color-coded uniformly. The shape of nodes representing genes indicates their modification upon TAX expression. The edges between the nodes (chromatin contacts) are indicated by different shapes, representing whether the interactions involved two genes deregulated both in transcription (dashed line), in alternative splicing (backward slash line), or one gene in transcription and the other at the alternative splicing level. Red edges indicate differential contact frequency between TAX expressing cells and CTL cells ($\text{abs}(\text{Log}_2\text{FC}) > 0.5$).

Supplementary Figure 5: DNA binding of p65/RelA to the genomic exon E6 of *RELA* leads to concomitant *RELA-NFKBIA* interactions and exon skipping of *RELA* E6. (A) DNA motifs enrichment analysis in the promoter regions of genes involved in 3D chromatin contacts in TAX-expressing cells using ShinyGO. (B) Quantitative RT-PCR analysis of gene expression levels of *NFKBIA* and *RELA*, as well as E6 exon skipping of *RELA* in Jurkat cells and HTLV-1 transformed T-cells C91PL. (C) Western blot analysis of p65/RelA, I κ B α , and TAX in cells expressing TAX, TAX M22, and control cells. Vinculin was used as a loading control. (D) Prediction of the protein encoded by the splicing isoform of *RELA* skipped for exon E6 using ExPasy-based tools. (E) Western blot analysis of RelA-WT and RelA Δ E6 constructs using V5 antibodies. HEK293T cells transiently transfected with 200ng and 400ng of expression vectors for p65/RelA-WT (pRelA-WT) and p65/RelA Δ E6 (pRelA Δ E6) or empty vectors. (F) Effect of ectopic expression of p65/RelA-WT and the splicing isoform p65/RelA Δ E6 on gene expression levels of *NFKB2* and *BCL3*. HEK293T cells were transiently transfected with 400ng of expression vectors as described in Figure 3D. (G) Western blot analysis of p65/RelA, I κ B α , and TAX in control cells and TAX-expressing cells transfected with pdCas9-KRAB along with the expression or not of guide RNAs and the vector pNFKBIA encoding I κ B α . Vinculin was used as a loading control. (H) The ectopic expression of I κ B α does not affect the effect of TAX, and that of *RELA* E6-tethered dCas9-KRAB, on exon skipping of *RELA* E6 (compared to Figure 3C). Quantitative RT-PCR analysis was carried out as described in Figure 3C.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully acknowledge support from Laurent Modolo at the LBMC for bio-informatic advice, and from the PSMN (Pôle Scientifique de Modélisation Numérique) of the ENS de Lyon for computing resources.

FUNDING

This work was supported by the Ligue Contre le Cancer (Comité de du Rhône), the Fondation ARC (ARC PJA20151203399), and the Agence Nationale pour la Recherche (program INFLASPLICE). P.M. was supported by a bursary from the French Ministry of Higher Education and Science, the Fondation de France, and ANR INFLASPLICE; J.L., M.B., and L.B.A. by the Ligue Contre le Cancer; S.C. by XXXXX; N.F by ENS-Lyon; and T.S., C.F.B, D.A., and F.M. by INSERM.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing interests.

FIGURES LEGENDS

Figure 1. Tax reshapes the 3D chromatin conformation of the genome. (A) Heatmap showing the normalized Hi-C interaction frequency map of chromosomes in control cells (CTL) and cells expressing the Tax protein (TAX). The upper panel depicts all chromosome matrices with diagonal line representing the intra-chromosomal contacts, while the off-diagonal regions show the inter-chromosomal interactions. The lower panel zooms at 500 kb resolution across entire chromosome 11. The right panel represents the differential heatmap between TAX and CTL conditions, with the log₂ ratio indicated by the color scale. (B) compartment A and B in both TAX and CTL conditions. Compartment A and B are respectively shown in red and blue. The panel demonstrates all possible switch between compartment A and B (bleu square). The x-axis shows the genomic coordinates, and the y-axis represents the normalized compartment score. (C) Saddle plot of Hi-C data showing the homotypic (A-A and B-B) and heterotypic (A-B and B-A) cis-interaction frequencies. The right panel shows the differential saddle plot between TAX and CTL in log₂ ratio contacts. (D) Percentage of switching compartments in cells expressing Tax (TAX) compared to control cells (CTL). (E) Sankey plot showing the proportion of genomic segments that switch between each subcompartment in TAX and CTL conditions. (F) Circos plot showing trans-chromosomal contacts identified by Hi-C data involved in the switching of subcompartments from control cells to TAX-expressing cells. (G) Venn diagram showing the overlap of TADs boundaries identified in control cells and cells expressing Tax. (H) Boxplots of the observed over expected (obs/exp) interaction frequencies for intra-TAD and inter-TAD interactions in control cells and TAX expressing cells. The obs/exp ratios are expressed as logarithmic value.

Figure 2. TAX-induced 3D chromatin contacts associate with changes in both gene expression and alternative splicing. (A) Venn diagram illustrating the genes affected by TAX expression in alternative splicing events (ASE) and those that are differentially expressed (DGE). The gene expression threshold is set at log₂fc = 0.6 with a p-value of <0.05 (glm test), and the significant threshold for Δ psi is set at 5% with a p-value of <0.01 (Fisher test). (B) Number of different types of ASE that occur upon TAX expression. (C) Bedtools analysis (reldist) of the relative distance of gene submitted to alternative splicing modification to genes differentially expressed upon TAX. Control set was generated using shuffle function of bedtools that randomly permutes the genomic locations among the genome hg19. (D) Venn diagram displaying the number of TAX-regulated genes (DGE + ASE) that are located in differential TADs (Figure 1H). A hypergeometric statistical test was used to determine the significance of the overlap. (E) Cytoscape view of the network of genes that are connected to each other via 3D chromatin contacts. Genes that belong to the same chromosome are color-coded uniformly. The shape of nodes representing genes indicates their modification upon TAX expression. The edges between the

nodes (chromatin contacts) are indicated by different shapes, representing whether the interactions involved two genes deregulated both in transcription (dashed line), in alternative splicing (backward slash line), or one gene in transcription and the other at the alternative splicing level. The complete image is shown in Supplementary Figure 4. **(F-H)** chromatin contacts evidenced in triplicated 4C analysis of *CCNL1* (E), *SEC31B* (F), and *RFX2* (G), which were used as anchors (VP stands for viewpoint). Gene expression levels are shown for CTL (blue) and TAX(+) (red) conditions. The differentially expressed genes (DGE) and alternative splicing events (ASE) are specified above annotated genes (hg19), and TAX vs CTL values are indicated. The right panels show a zoom of the highlighted region (blue). The standard deviation across the 3 replicates of 4C assays is displayed in grey, and asterisks indicate significant changes in 4C signal (p-value <0.05, Fisher test).

Figure 3. TAX-mediated changes in the 3D genome involved contacts of NF- κ B responsive genes in both gene expression and alternative splicing.

(A) Gene Ontology (GO) analysis (KEGG pathways) of TAX-regulated genes involved in 3D chromatin contacts. The histogram indicates the significant enrichment of certain gene sets in the TAX-regulated genes (DGE+ASE). **(B)** Chromosome Conformation Capture (3C) analysis of *SAMD4A* and *GCH1* upon either 24h TNF α exposure or TAX expression is depicted. The 3C templates were prepared using HindIII, and PCR was conducted using equal weights of DNA. The resulting gels were subjected to gel electrophoresis and SYBR green staining. The presence of a band indicates a high contact frequency between the respective primer targets. Internal *SAMD4A* primers were used as loading control amplimers. *GAPDH* primers were used for amplifying an intra-*GAPDH* loop as previously described (34). IPCR (inverse PCR) was conducted as 3C experiments with no chromatin crosslinking steps and was used to rule out signal providing from intra-looping of HindIII-undigested fragments. The 3C products were analyzed on agarose gels stained by SYBR green. The right panel shows the relative gene expression levels induced upon TNF α exposure and TAX expression. **(C)** Effects of TAX-WT and mutant TAX-M22, deficient for NF- κ B activation, on gene expression levels of *NFKBIA* and *RELA* and on skipping of *RELA* exon E6. **(D)** Effect of ectopic expression of RelA-WT and the splicing isoform RelA Δ E6 on gene expression levels of *A20* and *IL8*. HEK cells were transiently transfected with 400 ng of expression vectors for p65/RelA-WT (pRelA-WT) and p65/ (pRelA Δ E6) (or empty vector as control) along with TAX expression vector or its empty vector control. Total RNA was extracted from the cells at 48 hours post-transfection, and RTqPCR was performed as described in the Methods section. **(E)** Design of semi-nested 3C experiments targeting *NFKBIA* and *RELA*. Black arrows represent primers used for semi-nested 3C PCR, and grey arrows represent *RELA* primers used for loading control. **(F)** Semi-nested 3C analysis of chromatin contacts between *RELA* and *NFKBIA* in CTL and TAX-expressing cells. The resulting 3C products were analyzed in an agarose gel stained with Sybr-green. *GAPDH* primers were used for amplifying an intra-*GAPDH* loop as in panel B **(G)** Validation by qChIP of dCas9-

KRAB tethering using four gRNAs (see Methods) on the *NFKBIA* promoter. The percentage input is presented for cells expressing TAX and those not expressing TAX. **(H)** Effect of dCas9-KRAB tethered to the *NFKBIA* promoter on *NFKBIA-RELA* contacts. Semi-nested 3C analysis of contacts between *RELA* and *NFKBIA* was conducted in CTL and TAX-expressing cells transected with the dCas9-KRAB expression vector along with the vector expressing the four gRNAs or its empty counterpart. The resulting 3C products were analyzed in an agarose gel stained with Sybr-green, as described in Panel F. **(I)** Functional impact of dCas9-KRAB-mediated inhibition of *NFKBIA-RELA* contacts on gene expression levels of *RELA* and exon skipping of exon *RELA* E6. For all panels, asterisks correspond to statistical significance calculated using Fisher's exact test (p-value threshold: *0.05, **0.01, ***0.001, ****0.0001).

Figure 4. The recruitment of p65/RelA to the gene body of *RELA* leads to an increase in exon skipping of *RELA* E6 concomitantly to an enrichment of chromatin contacts between *RELA* and *NFKBIA* **(A)** Quantitative ChIP analysis of p65/RelA occupancy of *NFKBIA* promoter, *RELA* promoter, and genomic exon E6 of *RELA* in cells with and without TAX expression, and with or without disruption of *NFKBIA-RELA* contacts by dCas9-KRAB. Histograms show the mean fold enrichment relative to input DNA, with error bars indicating SEM. **(B)** Design of semi-nested 3C experiment for analyzing *NFKBIA-RELA* contacts in cells expressing dCas9-p65/RelA tethered to the genomic exon E6 of *RELA* using 4 distinct gRNAs. **(C)** Validation of dCas9-p65/RelA tethering to the genomic exon *RELA* E6 by qChIP against the HA tag and p65/RelA. HEK cells were transfected with the expression vector of HA-dCas9-p65/RelA or the empty vector expressing HA-dCas9-empty (with no p65/RelA fused). **(D)** Effect of genomic *RELA* E6-tethered dCas9-empty and dCas9-p65/RelA on exon skipping of *RELA* E6. RT-qPCR analysis was performed using RNA extracted from cells expressing HA-dCas9-empty or HA-dCas9-p65/RelA and with or without TAX expression. **(E)** Effect of tethered dCas9-empty and dCas9-p65/RelA into genomic exon E6 on gene-gene contacts between *NFKBIA* and *RELA*. Semi-nested 3C experiments were carried out in cells expressing dCas9-p65/RelA tethered to the genomic exon E6, as illustrated in panel B. Cells with and without TAX expression were used as controls. For all panels, asterisk correspond to statistical significance assessed using the Fisher test (*p < 0.05).

Supplementary Tables :

All supplementary tables are available at the following link until 2023/06/12 :

<https://filesender.ens-lyon.fr/?vid=57848aa5-0566-2588-33a9-000008d25e86>

Supplementary Table 1: list of oligonucleotides

Supplementary Table 2: comprehensive Overview of Interaction Data

Supplementary Table 3: Whole gene expression and alternative splicing changes upon Tax expression. Whole gene expression threshold was set to $\log_2(\text{FC})=0.6$, $p<0.05$ (glm and Wald test). For differential splicing, deltaPsi threshold was set to 0.5 $p<0.01$ (Fisher test). These data have been already published in Ameer LB, *et al.* in Nature Communications 2020.

REFERENCES

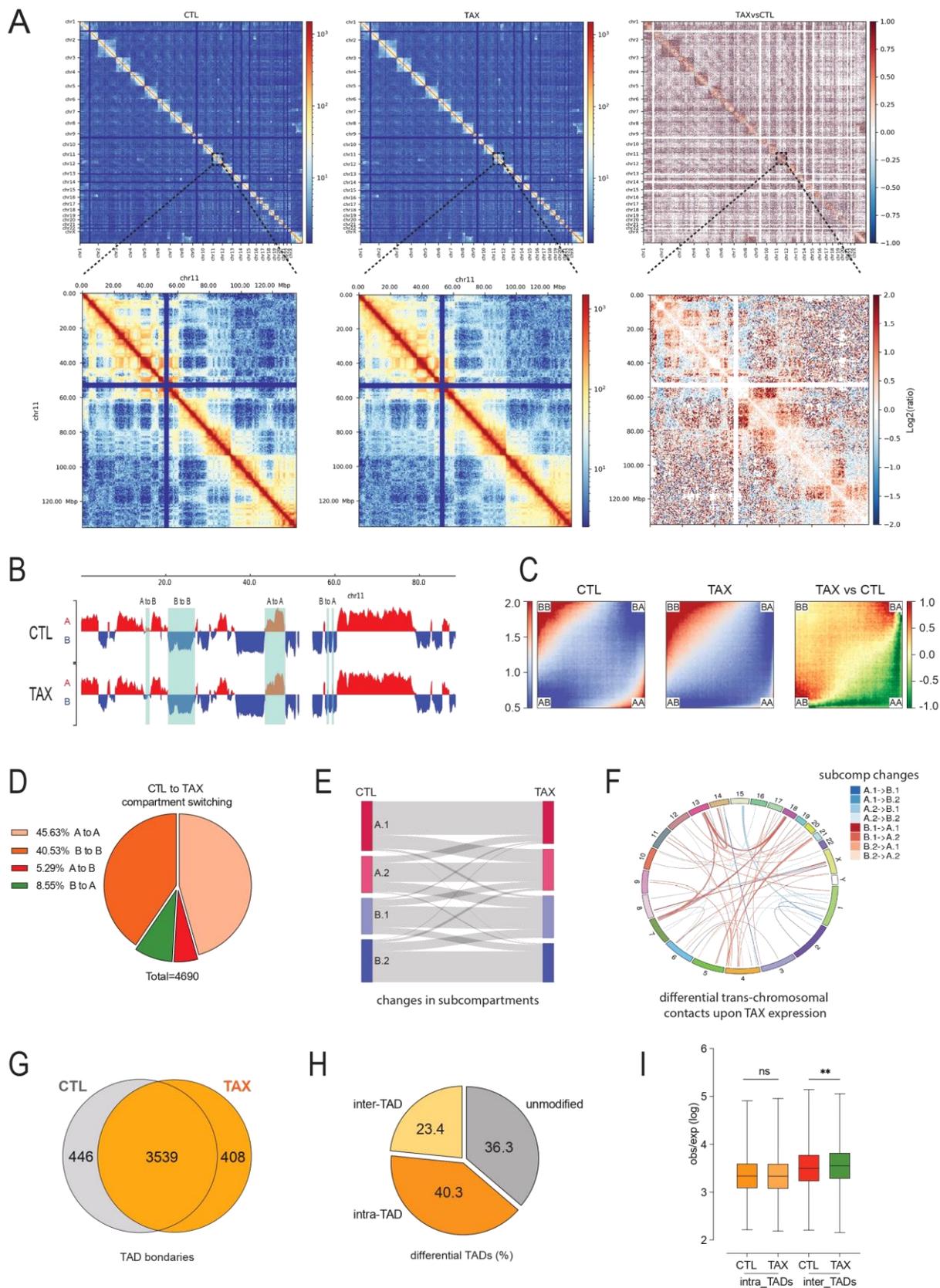
1. Legrand, N., McGregor, S., Bull, R., Bajis, S., Valencia, B.M., Ronnachit, A., Einsiedel, L., Gessain, A., Kaldor, J. and Martinello, M. (2022) Clinical and Public Health Implications of Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Infection. *Clin Microbiol Rev*, **35**, e0007821.
2. Tan, B.J.Y., Sugata, K., Ono, M. and Satou, Y. (2022) HTLV-1 persistence and leukemogenesis: A game of hide-and-seek with the host immune system. *Front Immunol*, **13**, 991928.
3. Harhaj, E.W. and Giam, C.Z. (2018) NF-kappaB signaling mechanisms in HTLV-1-induced adult T-cell leukemia/lymphoma. *FEBS J*, **285**, 3324-3336.
4. Suzuki, T., Hirai, H. and Yoshida, M. (1994) Tax protein of HTLV-1 interacts with the Rel homology domain of NF-kappa B p65 and c-Rel proteins bound to the NF-kappa B binding site and activates transcription. *Oncogene*, **9**, 3099-3105.
5. Suzuki, T., Hirai, H., Fujisawa, J., Fujita, T. and Yoshida, M. (1993) A trans-activator Tax of human T-cell leukemia virus type 1 binds to NF-kappa B p50 and serum response factor (SRF) and associates with enhancer DNAs of the NF-kappa B site and CArG box. *Oncogene*, **8**, 2391-2397.
6. Murakami, T., Hirai, H., Suzuki, T., Fujisawa, J. and Yoshida, M. (1995) HTLV-1 Tax enhances NF-kappa B2 expression and binds to the products p52 and p100, but does not suppress the inhibitory function of p100. *Virology*, **206**, 1066-1074.
7. Munoz, E., Courtois, G., Veschambre, P., Jalinot, P. and Israel, A. (1994) Tax induces nuclear translocation of NF-kappa B through dissociation of cytoplasmic complexes containing p105 or p100 but does not induce degradation of I kappa B alpha/MAD3. *J Virol*, **68**, 8035-8044.
8. Beraud, C., Sun, S.C., Ganchi, P., Ballard, D.W. and Greene, W.C. (1994) Human T-cell leukemia virus type I Tax associates with and is negatively regulated by the NF-kappa B2 p100 gene product: implications for viral latency. *Mol Cell Biol*, **14**, 1374-1382.
9. Hirai, H., Fujisawa, J., Suzuki, T., Ueda, K., Muramatsu, M., Tsuboi, A., Arai, N. and Yoshida, M. (1992) Transcriptional activator Tax of HTLV-1 binds to the NF-kappa B precursor p105. *Oncogene*, **7**, 1737-1742.
10. Sun, S.C. and Ballard, D.W. (1999) Persistent activation of NF-kappaB by the tax transforming protein of HTLV-1: hijacking cellular I kappa B kinases. *Oncogene*, **18**, 6948-6958.
11. Rousset, R., Desbois, C., Bantignies, F. and Jalinot, P. (1996) Effects on NF-kappa B1/p105 processing of the interaction between the HTLV-1 transactivator Tax and the proteasome. *Nature*, **381**, 328-331.
12. Harhaj, E.W., Good, L., Xiao, G., Uhlik, M., Cvijic, M.E., Rivera-Walsh, I. and Sun, S.C. (2000) Somatic mutagenesis studies of NF-kappa B signaling in human T cells: evidence for an essential role of IKK gamma in NF-kappa B activation by T-cell costimulatory signals and HTLV-1 Tax protein. *Oncogene*, **19**, 1448-1456.
13. Cheng, Q.J., Ohta, S., Sheu, K.M., Spreafico, R., Adelaja, A., Taylor, B. and Hoffmann, A. (2021) NF-kappaB dynamics determine the stimulus specificity of epigenomic reprogramming in macrophages. *Science*, **372**, 1349-1353.
14. Hoffmann, A. and Baltimore, D. (2006) Circuitry of nuclear factor kappaB signaling. *Immunol Rev*, **210**, 171-186.
15. Shirinian, M., Kfoury, Y., Dassouki, Z., El-Hajj, H. and Bazarbachi, A. (2013) Tax-1 and Tax-2 similarities and differences: focus on post-translational modifications and NF-kappaB activation. *Front Microbiol*, **4**, 231.
16. Bex, F., Yin, M.J., Burny, A. and Gaynor, R.B. (1998) Differential transcriptional activation by human T-cell leukemia virus type 1 Tax mutants is mediated by distinct interactions with CREB binding protein and p300. *Mol Cell Biol*, **18**, 2392-2405.
17. Semmes, O.J. and Jeang, K.T. (1996) Localization of human T-cell leukemia virus type 1 tax to subnuclear compartments that overlap with interchromatin speckles. *J Virol*, **70**, 6347-6357.

18. Ameer, L.B., Marie, P., Thenoz, M., Giraud, G., Combe, E., Claude, J.B., Lemaire, S., Fontrodona, N., Polveche, H., Bastien, M. *et al.* (2020) Intragenic recruitment of NF- κ B drives splicing modifications upon activation by the oncogene Tax of HTLV-1. *Nat Commun*, **11**, 3045.
19. Feldman, I., Feldman, G.M., Mobarak, C., Dunkelberg, J.C. and Leslie, K.K. (2007) Identification of proteins within the nuclear factor- κ B transcriptional complex including estrogen receptor- α . *Am J Obstet Gynecol*, **196**, 394 e391-311; discussion 394 e311-393.
20. Sammons, M., Wan, S.S., Vogel, N.L., Mientjes, E.J., Grosveld, G. and Ashburner, B.P. (2006) Negative regulation of the RelA/p65 transactivation function by the product of the DEK proto-oncogene. *J Biol Chem*, **281**, 26802-26812.
21. Tetsuka, T., Uranishi, H., Sanda, T., Asamitsu, K., Yang, J.P., Wong-Staal, F. and Okamoto, T. (2004) RNA helicase A interacts with nuclear factor κ B p65 and functions as a transcriptional coactivator. *Eur J Biochem*, **271**, 3741-3751.
22. Uranishi, H., Tetsuka, T., Yamashita, M., Asamitsu, K., Shimizu, M., Itoh, M. and Okamoto, T. (2001) Involvement of the pro-oncoprotein TLS (translocated in liposarcoma) in nuclear factor- κ B p65-mediated transcription as a coactivator. *J Biol Chem*, **276**, 13395-13401.
23. Vandermeulen, C., O'Grady, T., Wayet, J., Galvan, B., Maseko, S., Cherkaoui, M., Desbuleux, A., Coppin, G., Olivet, J., Ben Ameer, L. *et al.* (2021) The HTLV-1 viral oncoproteins Tax and HBZ reprogram the cellular mRNA splicing landscape. *PLoS Pathog*, **17**, e1009919.
24. Nelson, D.E., Ihekwaba, A.E., Elliott, M., Johnson, J.R., Gibney, C.A., Foreman, B.E., Nelson, G., See, V., Horton, C.A., Spiller, D.G. *et al.* (2004) Oscillations in NF- κ B signaling control the dynamics of gene expression. *Science*, **306**, 704-708.
25. Gilmore, T.D. (2006) Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, **25**, 6680-6684.
26. Siggers, T., Chang, A.B., Teixeira, A., Wong, D., Williams, K.J., Ahmed, B., Ragoussis, J., Udalova, I.A., Smale, S.T. and Bulyk, M.L. (2011) Principles of dimer-specific gene regulation revealed by a comprehensive characterization of NF- κ B family DNA binding. *Nat Immunol*, **13**, 95-102.
27. Baeuerle, P.A. and Baltimore, D. (1988) Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF- κ B transcription factor. *Cell*, **53**, 211-217.
28. Siggers, T., Gilmore, T.D., Barron, B. and Penvose, A. (2015) Characterizing the DNA binding site specificity of NF- κ B with protein-binding microarrays (PBMs). *Methods Mol Biol*, **1280**, 609-630.
29. Siggers, T. and Gordan, R. (2014) Protein-DNA binding: complexities and multi-protein codes. *Nucleic Acids Res*, **42**, 2099-2111.
30. Huang, B., Yang, X.D., Lamb, A. and Chen, L.F. (2010) Posttranslational modifications of NF- κ B: another layer of regulation for NF- κ B signaling pathway. *Cell Signal*, **22**, 1282-1290.
31. Yang, B., Kim, S., Jung, W.J., Kim, K., Kim, S., Kim, Y.J., Kim, T.G., Lee, E.C., Joo, J.S., Park, C.G. *et al.* (2023) CTCF controls three-dimensional enhancer network underlying the inflammatory response of bone marrow-derived dendritic cells. *Nat Commun*, **14**, 1277.
32. Zhao, W., Wang, L., Zhang, M., Wang, P., Zhang, L., Yuan, C., Qi, J., Qiao, Y., Kuo, P.C. and Gao, C. (2011) NF- κ B- and AP-1-mediated DNA looping regulates osteopontin transcription in endotoxin-stimulated murine macrophages. *J Immunol*, **186**, 3173-3179.
33. Salem, T., Gomard, T., Court, F., Moquet-Torcy, G., Brockly, F., Forne, T. and Piechaczyk, M. (2013) Chromatin loop organization of the junb locus in mouse dendritic cells. *Nucleic Acids Res*, **41**, 8908-8925.
34. Papantonis, A., Kohro, T., Baboo, S., Larkin, J.D., Deng, B., Short, P., Tsutsumi, S., Taylor, S., Kanki, Y., Kobayashi, M. *et al.* (2012) TNF α signals through specialized factories where responsive coding and miRNA genes are transcribed. *EMBO J*, **31**, 4404-4414.
35. Fanucchi, S., Shibayama, Y., Burd, S., Weinberg, M.S. and Mhlanga, M.M. (2013) Chromosomal contact permits transcription between coregulated genes. *Cell*, **155**, 606-620.

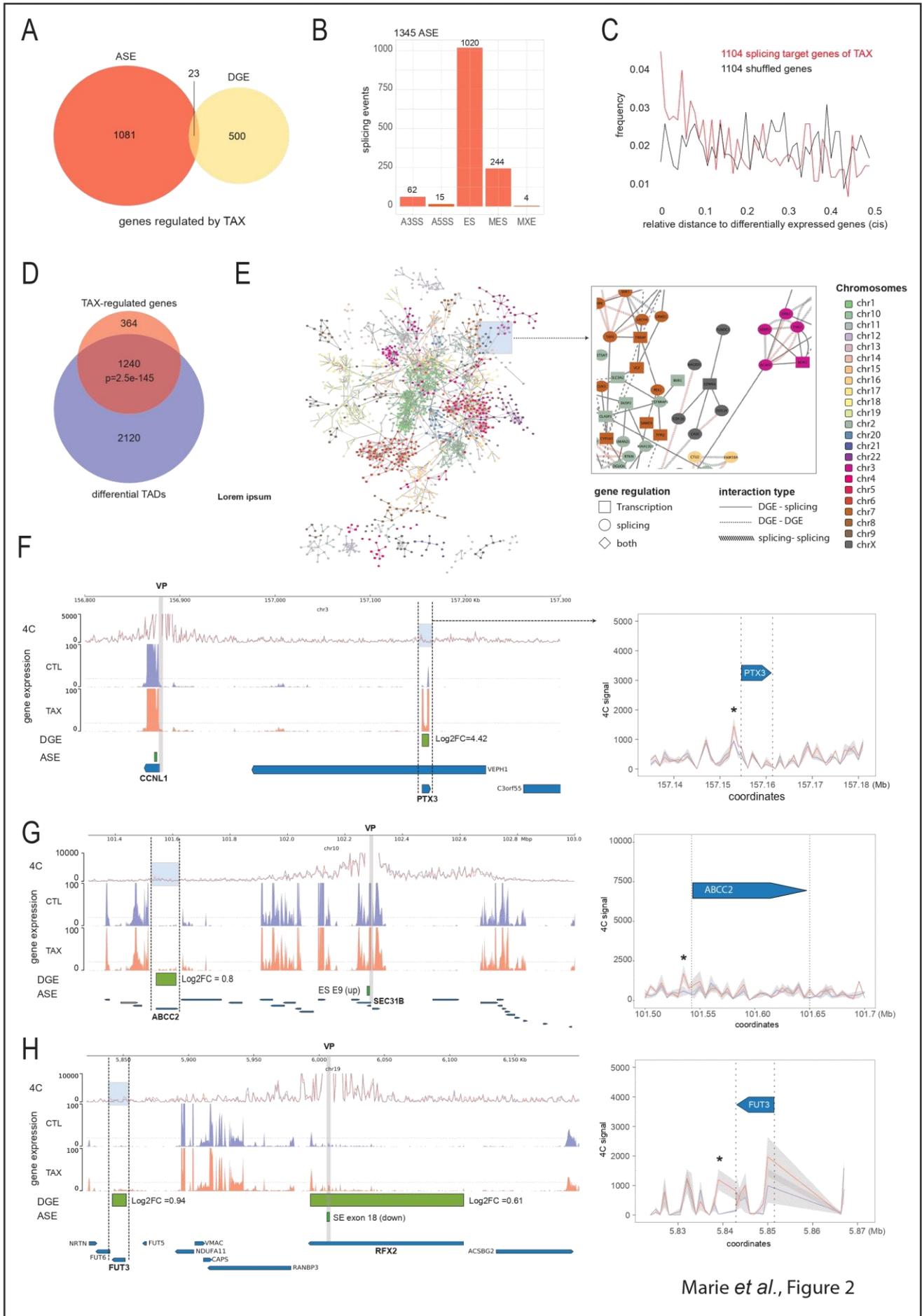
36. Luco, R.F., Allo, M., Schor, I.E., Kornblihtt, A.R. and Misteli, T. (2011) Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell*, **144**, 16-26.
37. Giono, L.E. and Kornblihtt, A.R. (2020) Linking transcription, RNA polymerase II elongation and alternative splicing. *Biochem J*, **477**, 3091-3104.
38. Brackley, C.A., Taylor, S., Papantonis, A., Cook, P.R. and Marenduzzo, D. (2013) Nonspecific bridging-induced attraction drives clustering of DNA-binding proteins and genome organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110**, E3605-3611.
39. Diermeier, S., Kolovos, P., Heizinger, L., Schwartz, U., Georgomanolis, T., Zirkel, A., Wedemann, G., Grosveld, F., Knoch, T.A., Merkl, R. *et al.* (2014) TNF α signalling primes chromatin for NF- κ B binding and induces rapid and widespread nucleosome repositioning. *Genome Biol*, **15**, 536.
40. Weiterer, S.S., Meier-Soelch, J., Georgomanolis, T., Mizi, A., Beyerlein, A., Weiser, H., Brant, L., Mayr-Buro, C., Jurida, L., Beuerlein, K. *et al.* (2020) Distinct IL-1 α -responsive enhancers promote acute and coordinated changes in chromatin topology in a hierarchical manner. *EMBO J*, **39**, e101533.
41. Terrone, S., Valat, J., Fontrodona, N., Giraud, G., Claude, J.B., Combe, E., Lapendry, A., Polveche, H., Ameer, L.B., Duvermy, A. *et al.* (2022) RNA helicase-dependent gene looping impacts messenger RNA processing. *Nucleic Acids Res*, **50**, 9226-9246.
42. Crosetto, N. and Bienko, M. (2020) Radial Organization in the Mammalian Nucleus. *Front Genet*, **11**, 33.
43. Chen, Y., Zhang, Y., Wang, Y., Zhang, L., Brinkman, E.K., Adam, S.A., Goldman, R., van Steensel, B., Ma, J. and Belmont, A.S. (2018) Mapping 3D genome organization relative to nuclear compartments using TSA-Seq as a cytological ruler. *J Cell Biol*, **217**, 4025-4048.
44. Barutcu, A.R., Wu, M., Braunschweig, U., Dyakov, B.J.A., Luo, Z., Turner, K.M., Durbic, T., Lin, Z.Y., Weatheritt, R.J., Maass, P.G. *et al.* (2022) Systematic mapping of nuclear domain-associated transcripts reveals speckles and lamina as hubs of functionally distinct retained introns. *Mol Cell*, **82**, 1035-1052 e1039.
45. Tammer, L., Hameiri, O., Keydar, I., Roy, V.R., Ashkenazy-Titelman, A., Custodio, N., Sason, I., Shayevitch, R., Rodriguez-Vaello, V., Rino, J. *et al.* (2022) Gene architecture directs splicing outcome in separate nuclear spatial regions. *Mol Cell*, **82**, 1021-1034 e1028.
46. Bertero, A., Fields, P.A., Ramani, V., Bonora, G., Yardimci, G.G., Reinecke, H., Pabon, L., Noble, W.S., Shendure, J. and Murry, C.E. (2019) Dynamics of genome reorganization during human cardiogenesis reveal an RBM20-dependent splicing factory. *Nat Commun*, **10**, 1538.
47. Benoit-Pilven, C., Marchet, C., Chautard, E., Lima, L., Lambert, M.P., Sacomoto, G., Rey, A., Cologne, A., Terrone, S., Dulaurier, L. *et al.* (2018) Complementarity of assembly-first and mapping-first approaches for alternative splicing annotation and differential analysis from RNAseq data. *Sci Rep*, **8**, 4307.
48. Anders, S., Pyl, P.T. and Huber, W. (2015) HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, **31**, 166-169.
49. Love, M.I., Huber, W. and Anders, S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, **15**, 550.
50. Rao, S.S., Huntley, M.H., Durand, N.C., Stamenova, E.K., Bochkov, I.D., Robinson, J.T., Sanborn, A.L., Machol, I., Omer, A.D., Lander, E.S. *et al.* (2014) A 3D map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell*, **159**, 1665-1680.
51. Ramirez, F., Bhardwaj, V., Arrigoni, L., Lam, K.C., Gruning, B.A., Villaveces, J., Habermann, B., Akhtar, A. and Manke, T. (2018) High-resolution TADs reveal DNA sequences underlying genome organization in flies. *Nat Commun*, **9**, 189.
52. Imakaev, M., Fudenberg, G., McCord, R.P., Naumova, N., Goloborodko, A., Lajoie, B.R., Dekker, J. and Mirny, L.A. (2012) Iterative correction of Hi-C data reveals hallmarks of chromosome organization. *Nat Methods*, **9**, 999-1003.

53. Chakraborty, A., Wang, J.G. and Ay, F. (2022) dcHiC detects differential compartments across multiple Hi-C datasets. *Nat Commun*, **13**, 6827.
54. Liu, Y., Nanni, L., Sungalee, S., Zufferey, M., Tavernari, D., Mina, M., Ceri, S., Oricchio, E. and Ciriello, G. (2021) Systematic inference and comparison of multi-scale chromatin sub-compartments connects spatial organization to cell phenotypes. *Nat Commun*, **12**, 2439.
55. Ramirez, F., Dundar, F., Diehl, S., Gruning, B.A. and Manke, T. (2014) deepTools: a flexible platform for exploring deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res*, **42**, W187-191.
56. Quinlan, A.R. and Hall, I.M. (2010) BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, **26**, 841-842.
57. Krijger, P.H.L., Geeven, G., Bianchi, V., Hilvering, C.R.E. and de Laat, W. (2020) 4C-seq from beginning to end: A detailed protocol for sample preparation and data analysis. *Methods*, **170**, 17-32.
58. Williams, R.L., Jr., Starmer, J., Mugford, J.W., Calabrese, J.M., Mieczkowski, P., Yee, D. and Magnuson, T. (2014) fourSig: a method for determining chromosomal interactions in 4C-Seq data. *Nucleic Acids Res*, **42**, e68.
59. Lopez-Delisle, L., Rabbani, L., Wolff, J., Bhardwaj, V., Backofen, R., Gruning, B., Ramirez, F. and Manke, T. (2021) pyGenomeTracks: reproducible plots for multivariate genomic datasets. *Bioinformatics*, **37**, 422-423.
60. Servant, N., Varoquaux, N., Lajoie, B.R., Viara, E., Chen, C.J., Vert, J.P., Heard, E., Dekker, J. and Barillot, E. (2015) HiC-Pro: an optimized and flexible pipeline for Hi-C data processing. *Genome Biol*, **16**, 259.
61. Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O. *et al.* (2009) Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science*, **326**, 289-293.
62. Cremer, T. and Cremer, M. (2010) Chromosome territories. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2**, a003889.
63. Galganski, L., Urbanek, M.O. and Krzyzosiak, W.J. (2017) Nuclear speckles: molecular organization, biological function and role in disease. *Nucleic Acids Res*, **45**, 10350-10368.
64. Quinodoz, S.A., Ollikainen, N., Tabak, B., Palla, A., Schmidt, J.M., Detmar, E., Lai, M.M., Shishkin, A.A., Bhat, P., Takei, Y. *et al.* (2018) Higher-Order Inter-chromosomal Hubs Shape 3D Genome Organization in the Nucleus. *Cell*, **174**, 744-757 e724.
65. Kataoka, K., Nagata, Y., Kitanaka, A., Shiraiishi, Y., Shimamura, T., Yasunaga, J., Totoki, Y., Chiba, K., Sato-Otsubo, A., Nagae, G. *et al.* (2015) Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nat Genet*, **47**, 1304-1315.
66. Marçais, A., Lhermitte, L., Artesi, M., Laurent, C., Durkin, K., Hahaut, V., Rosewick, N., Suarez, F., Sibon, D., Cheminant, M. *et al.* (2021) Targeted deep sequencing reveals clonal and subclonal mutational signatures in Adult T-cell leukemia/lymphoma and defines an unfavorable indolent subtype. *Leukemia*, **35**, 764-776.
67. Chu, Z.L., Shin, Y.A., Yang, J.M., DiDonato, J.A. and Ballard, D.W. (1999) IKKgamma mediates the interaction of cellular I κ B kinases with the tax transforming protein of human T cell leukemia virus type 1. *J Biol Chem*, **274**, 15297-15300.
68. Good, L. and Sun, S.C. (1996) Persistent activation of NF-kappa B/Rel by human T-cell leukemia virus type 1 tax involves degradation of I kappa B beta. *J Virol*, **70**, 2730-2735.
69. Yeo, N.C., Chavez, A., Lance-Byrne, A., Chan, Y., Menn, D., Milanova, D., Kuo, C.C., Guo, X., Sharma, S., Tung, A. *et al.* (2018) An enhanced CRISPR repressor for targeted mammalian gene regulation. *Nat Methods*, **15**, 611-616.
70. Gao, X., Tsang, J.C., Gaba, F., Wu, D., Lu, L. and Liu, P. (2014) Comparison of TALE designer transcription factors and the CRISPR/dCas9 in regulation of gene expression by targeting enhancers. *Nucleic Acids Res*, **42**, e155.

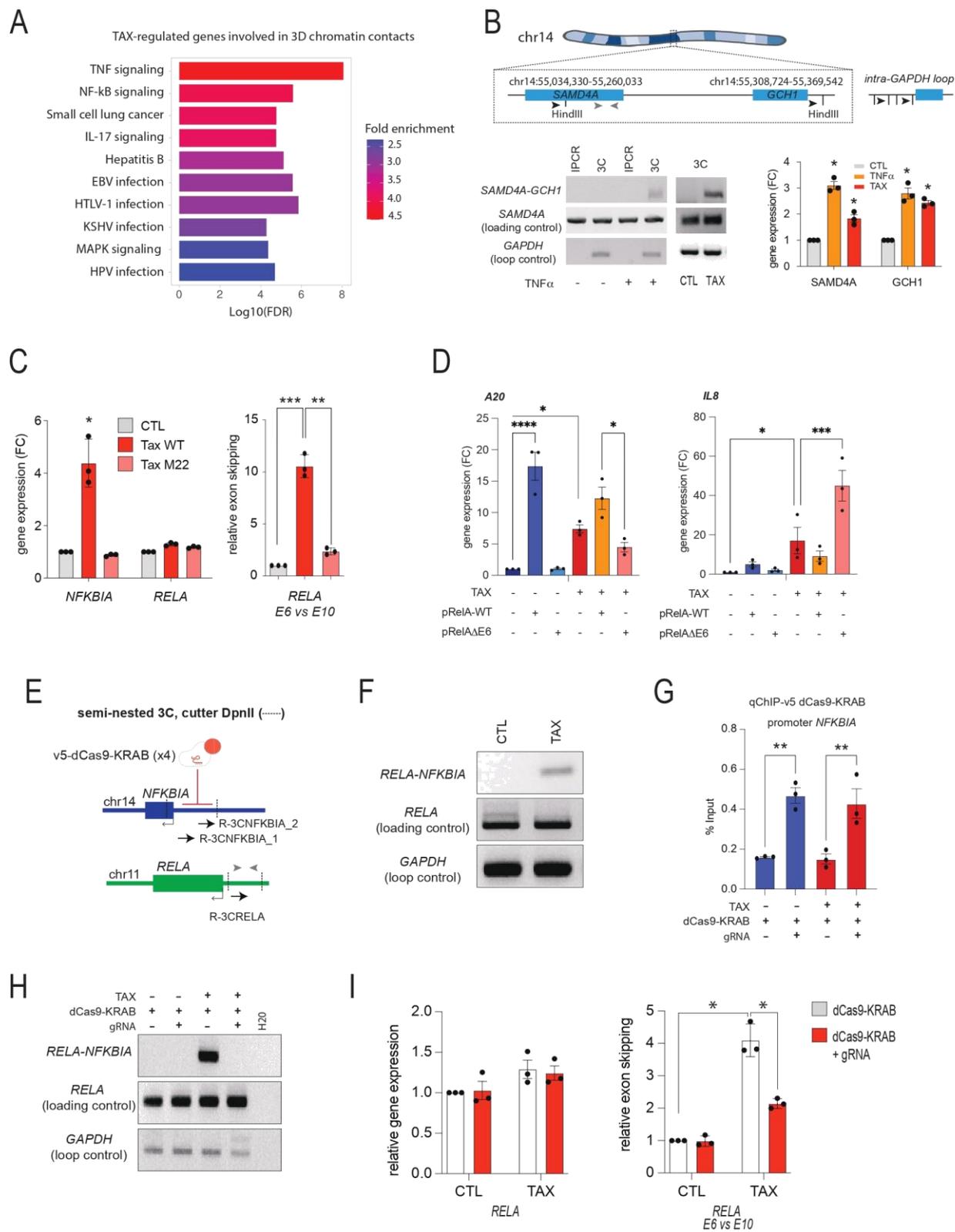
71. Hartmann, B., Castelo, R., Blanchette, M., Boue, S., Rio, D.C. and Valcarcel, J. (2009) Global analysis of alternative splicing regulation by insulin and wingless signaling in *Drosophila* cells. *Genome Biol*, **10**, R11.
72. Martinez, N.M., Pan, Q., Cole, B.S., Yarosh, C.A., Babcock, G.A., Heyd, F., Zhu, W., Ajith, S., Blencowe, B.J. and Lynch, K.W. (2012) Alternative splicing networks regulated by signaling in human T cells. *RNA*, **18**, 1029-1040.
73. Li, X., Zhao, Y., Tian, B., Jamaluddin, M., Mitra, A., Yang, J., Rowicka, M., Brasier, A.R. and Kudlicki, A. (2014) Modulation of gene expression regulated by the transcription factor NF-kappaB/RelA. *J Biol Chem*, **289**, 11927-11944.
74. Agirre, E., Oldfield, A.J., Bellora, N., Segelle, A. and Luco, R.F. (2021) Splicing-associated chromatin signatures: a combinatorial and position-dependent role for histone marks in splicing definition. *Nat Commun*, **12**, 682.
75. Segelle, A., Nunez-Alvarez, Y., Oldfield, A.J., Webb, K.M., Voigt, P. and Luco, R.F. (2022) Histone marks regulate the epithelial-to-mesenchymal transition via alternative splicing. *Cell Rep*, **38**, 110357.
76. Adeel, M.M., Jiang, H., Arega, Y., Cao, K., Lin, D., Cao, C., Cao, G., Wu, P. and Li, G. (2021) Structural Variations of the 3D Genome Architecture in Cervical Cancer Development. *Front Cell Dev Biol*, **9**, 706375.
77. Morgan, S.M., Tanizawa, H., Caruso, L.B., Hulse, M., Kossenkov, A., Madzo, J., Keith, K., Tan, Y., Boyle, S., Lieberman, P.M. *et al.* (2022) The three-dimensional structure of Epstein-Barr virus genome varies by latency type and is regulated by PARP1 enzymatic activity. *Nat Commun*, **13**, 187.
78. Dias, J.D., Sarica, N., Cournac, A., Koszul, R. and Neuveut, C. (2022) Crosstalk between Hepatitis B Virus and the 3D Genome Structure. *Viruses*, **14**.
79. Melamed, A., Yaguchi, H., Miura, M., Witkover, A., Fitzgerald, T.W., Birney, E. and Bangham, C.R. (2018) The human leukemia virus HTLV-1 alters the structure and transcription of host chromatin in cis. *Elife*, **7**.
80. Melamed, A., Fitzgerald, T.W., Wang, Y., Ma, J., Birney, E. and Bangham, C.R.M. (2022) Selective clonal persistence of human retroviruses in vivo: Radial chromatin organization, integration site, and host transcription. *Sci Adv*, **8**, eabm6210.
81. Leemans, C., van der Zwalm, M.C.H., Brueckner, L., Comoglio, F., van Schaik, T., Pagie, L., van Arensbergen, J. and van Steensel, B. (2019) Promoter-Intrinsic and Local Chromatin Features Determine Gene Repression in LADs. *Cell*, **177**, 852-864 e814.
82. Hsieh, T.S., Cattoglio, C., Slobodyanyuk, E., Hansen, A.S., Rando, O.J., Tjian, R. and Darzacq, X. (2020) Resolving the 3D Landscape of Transcription-Linked Mammalian Chromatin Folding. *Mol Cell*, **78**, 539-553 e538.
83. Mercer, T.R., Edwards, S.L., Clark, M.B., Neph, S.J., Wang, H., Stergachis, A.B., John, S., Sandstrom, R., Li, G., Sandhu, K.S. *et al.* (2013) DNase I-hypersensitive exons colocalize with promoters and distal regulatory elements. *Nat Genet*, **45**, 852-859.
84. Ruiz-Velasco, M., Kumar, M., Lai, M.C., Bhat, P., Solis-Pinson, A.B., Reyes, A., Kleinsorg, S., Noh, K.M., Gibson, T.J. and Zaugg, J.B. (2017) CTCF-Mediated Chromatin Loops between Promoter and Gene Body Regulate Alternative Splicing across Individuals. *Cell Syst*, **5**, 628-637 e626.
85. Tripathi, V., Sixt, K.M., Gao, S., Xu, X., Huang, J., Weigert, R., Zhou, M. and Zhang, Y.E. (2016) Direct Regulation of Alternative Splicing by SMAD3 through PCBP1 Is Essential to the Tumor-Promoting Role of TGF-beta. *Mol Cell*, **64**, 549-564.



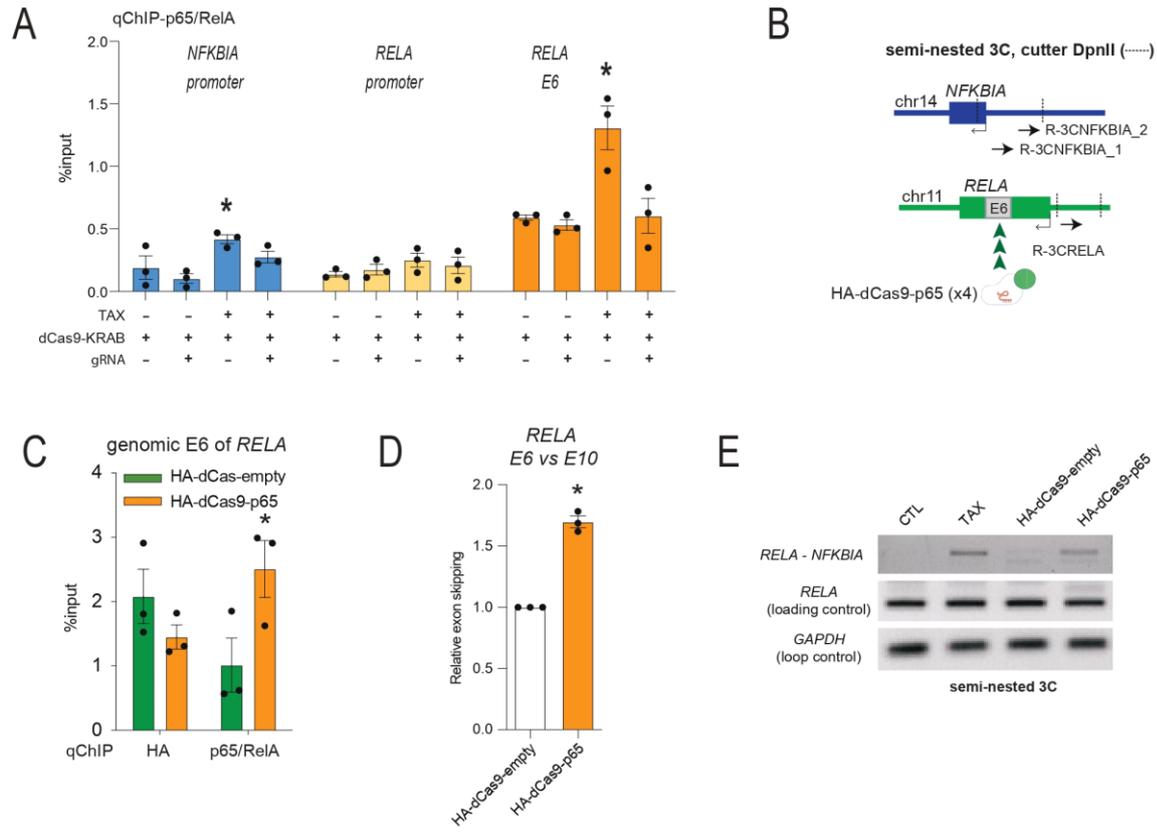
Marie *et al.*, Figure 1



Marie *et al.*, Figure 2

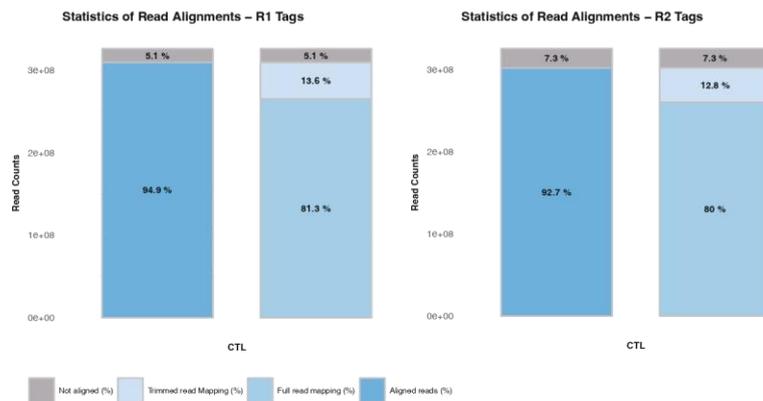


Marie et al., Figure 3

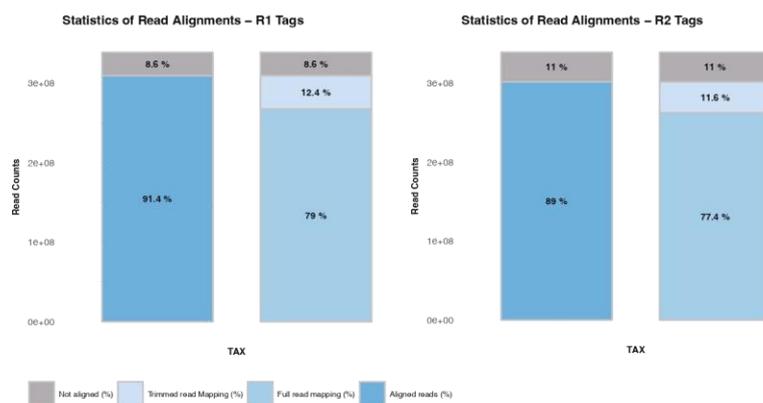


Marie *et al.*, Figure 4

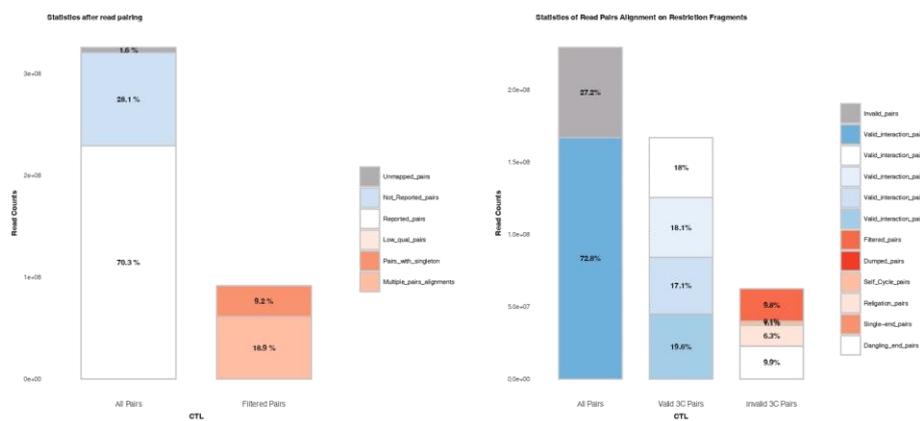
A



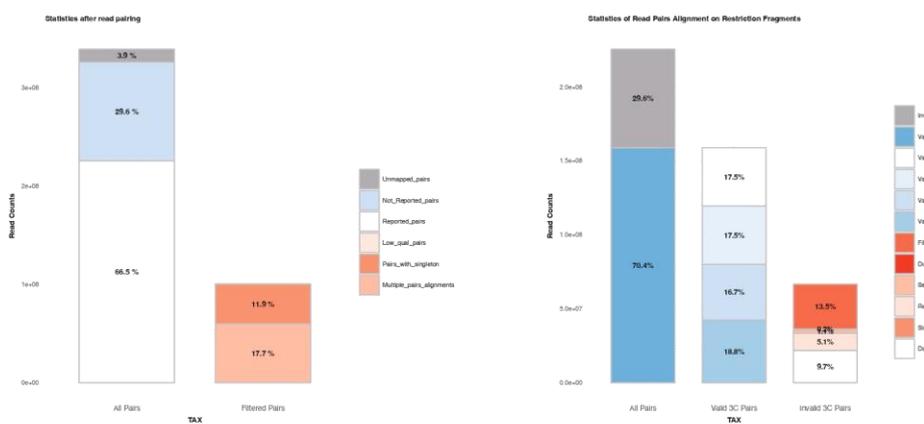
B



C

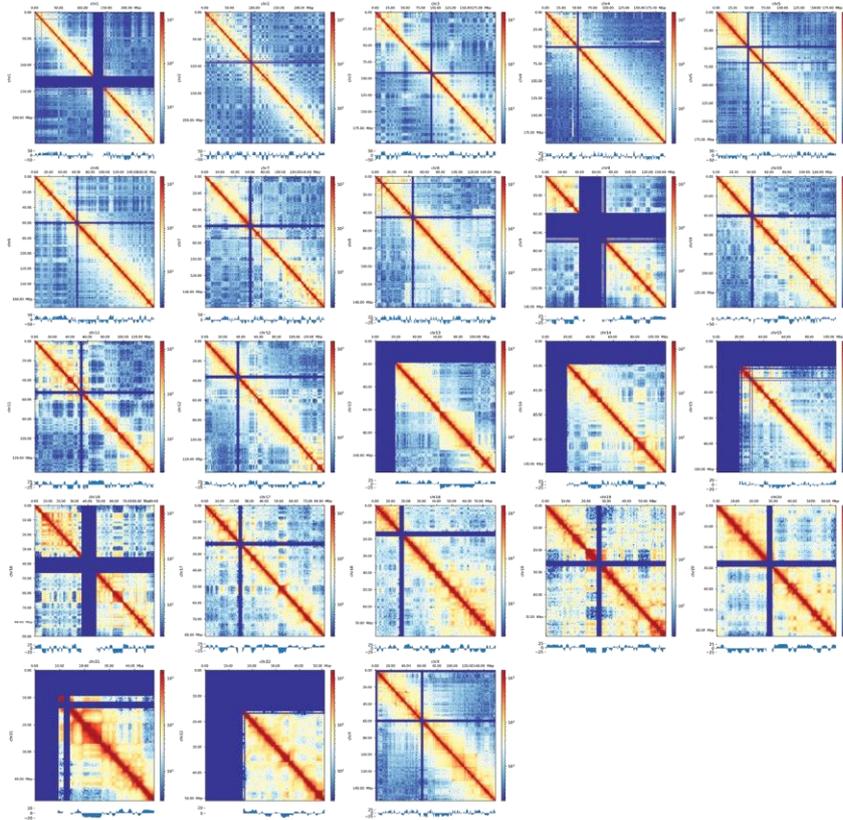


D

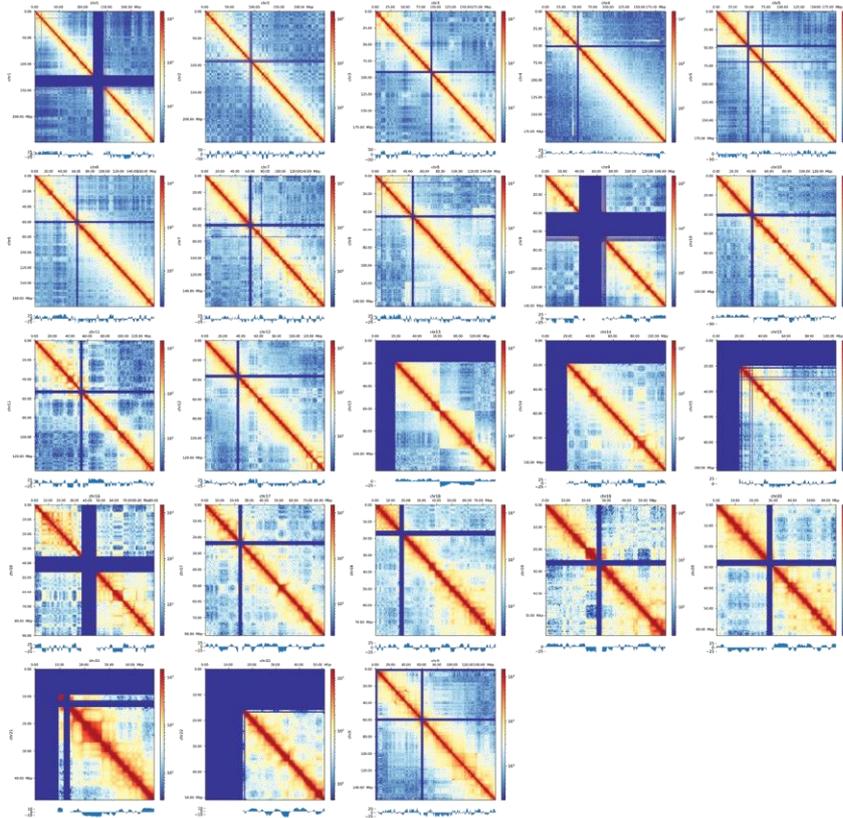


Marie et al., Figure 15

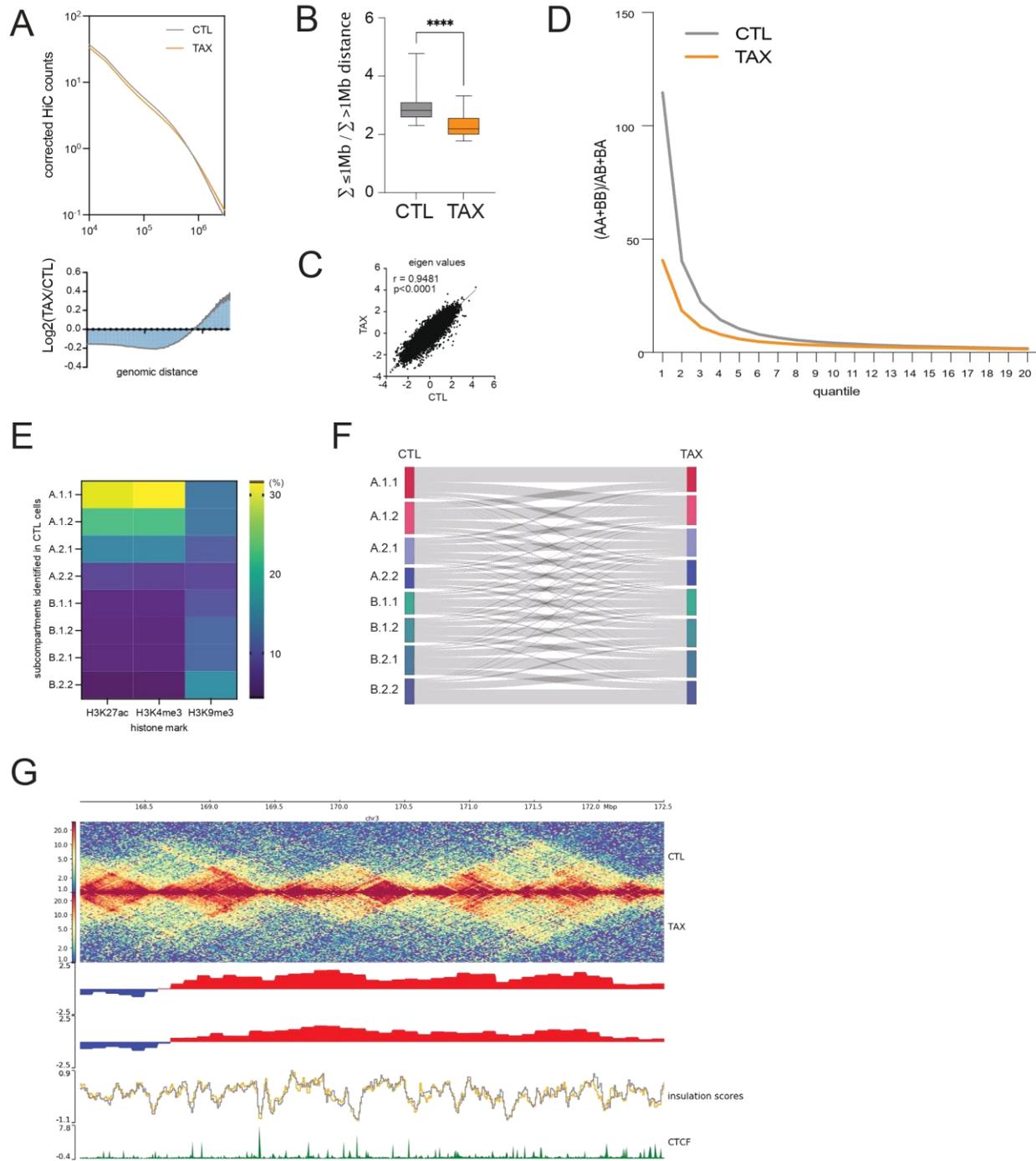
CTL



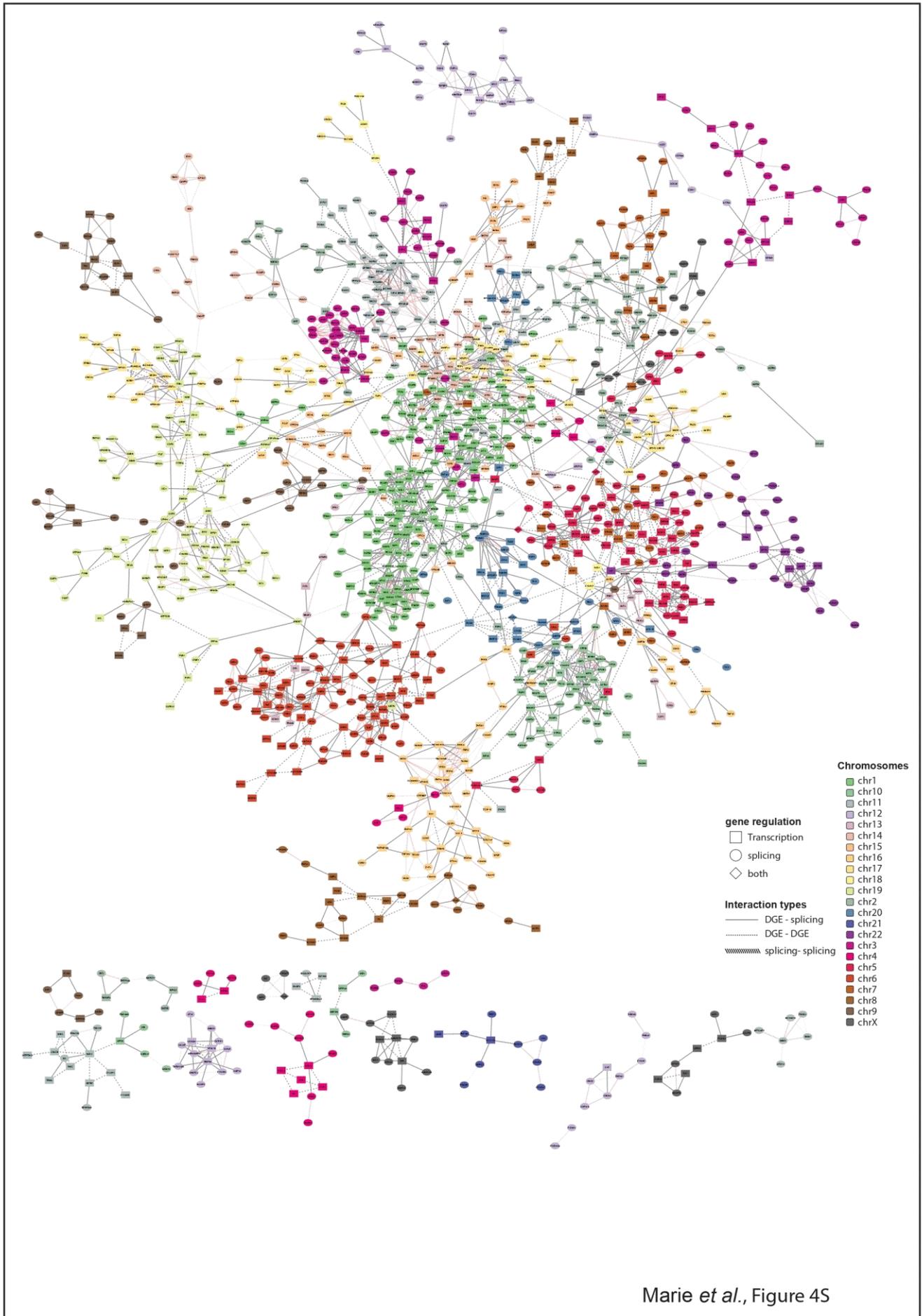
TAX



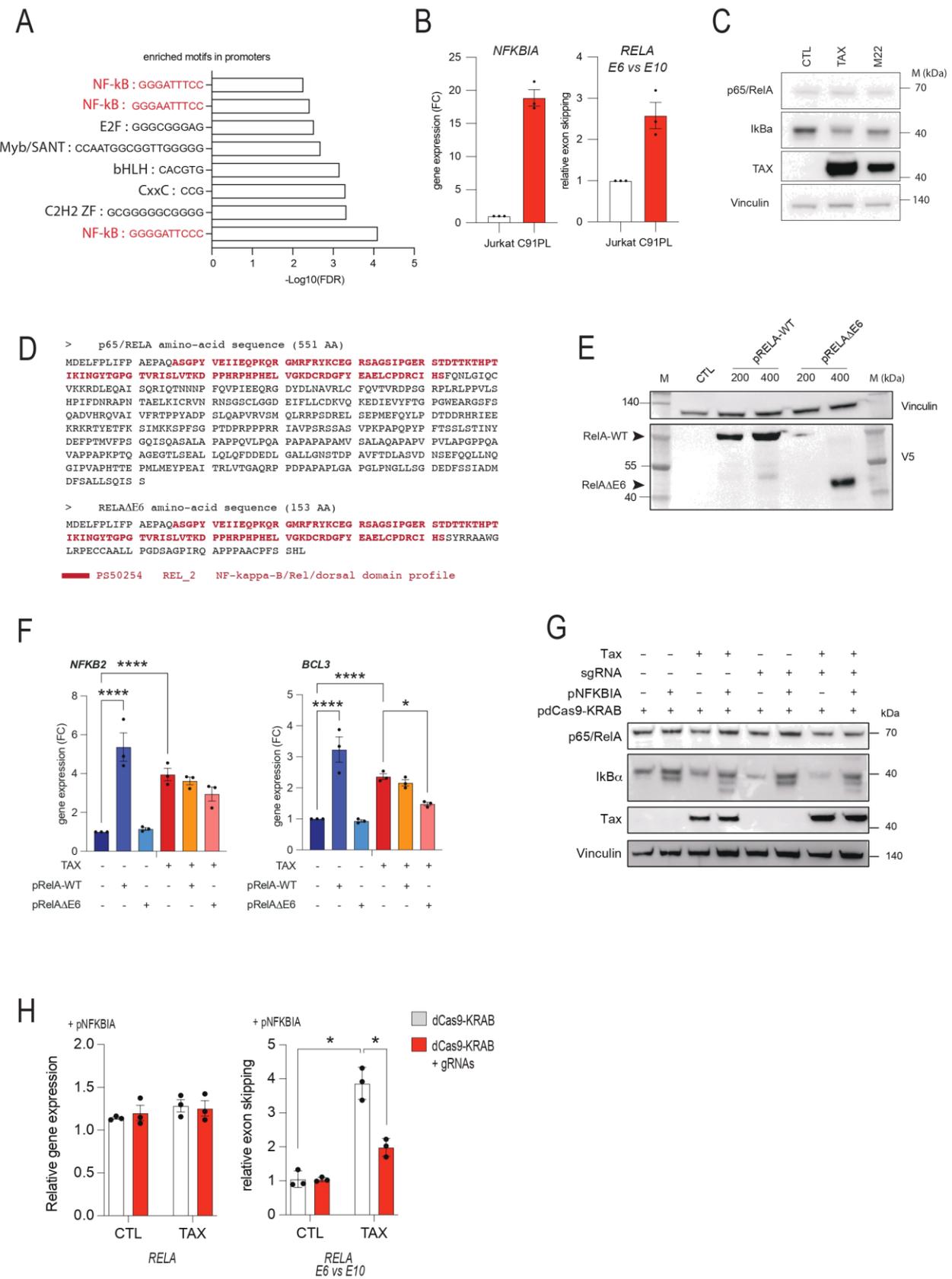
Marie *et al.*, Figure 2S



Marie *et al.*, Figure 3S



Marie *et al.*, Figure 4S



Marie et al., Figure 5S

Discussion générale et perspectives

Dans une première partie de mes travaux, j'ai contribué à mettre en évidence les effets de l'oncogène viral Tax du HTLV-1 sur les mécanismes de régulation de l'épissage alternatif. Nous avons montré que Tax pouvait altérer les profils d'épissage des transcrits cellulaires et aboutir à la synthèse d'isoformes retrouvées *in vivo* dans des cellules infectées non-transformées et les ATLL (Thénoz et al., 2014) (Annexe 1). Nous avons notamment identifié un nouveau mécanisme de contrôle de l'épissage alternatif qui s'opère lors de l'activation de la voie NF- κ B à travers l'enrichissement intragénique du facteur NF- κ B p65/RelA qui, par ces capacités à interagir avec les facteurs d'épissage, permet de définir des exons cibles propres à l'activation de la signalisation NF- κ B. En particulier, via le recrutement de DDX17, nous avons montré que p65/RelA est capable de contrôler l'inclusion d'un grand nombre d'exons cassette (58%) régulés par Tax. L'enrichissement local de p65/RelA à lui seul par des essais de TALE est suffisant pour induire le recrutement du facteur d'épissage et influencer en conséquence le choix d'épissage de l'exon cible (Annexe 1). De façon intéressante, ce mécanisme est indépendant de la présence de Tax car il est retrouvé lors d'une activation de la voie NF- κ B par le PMA, suggérant que Tax exacerbe un mécanisme physiologique qui permet de fournir des cibles de régulation d'épissage à travers p65/RELA lors de la signalisation NF- κ B. Enfin, les régulations d'épissage par p65/RelA sont indépendantes de ses fonctions au promoteur du gène, posant la question des mécanismes de coordination des fonctions de régulation transcriptionnelle et d'épissage de p65/RelA à l'échelle du génome au cours de l'activation chronique de la voie NF- κ B par Tax.

La seconde partie de mon travail a abordé cette question à travers une étude intégrative des régulations de l'expression des gènes et de la conformation tridimensionnelle de la chromatine lors de l'expression de Tax. Nos résultats montrent que Tax induit un remaniement des interactions chromatinienne à longue distance et trans-chromosomiques. Les bordures de TADs semblent largement conservées lorsque Tax est exprimé, mais de nombreuses interactions intra-TADs, inter-TADs et également entre les compartiments A et B sont altérées. De façon intéressante, ces modifications des contacts chromatiniens à l'échelle tridimensionnelle coïncident avec des régions génomiques comportant des gènes dont les niveaux de transcription ou d'épissage alternatif sont affectés par Tax.

D'un point de vue moléculaire, nos données révèlent que l'activation de la voie NF- κ B par Tax induit un rapprochement spatial entre les gènes *NFKBIA* et *RELA* qui dépend de l'enrichissement de p65/RelA dans la région génomique de l'exon E6 de *RELA* et qui induit une exclusion de l'exon 6 au niveau de l'ARNm de *RELA*. L'utilisation de constructions dCas9 nous ont permis de valider la relation de cause à effet entre l'enrichissement de p65/RelA intragénique, la formation des contacts chromatiniens entre les deux gènes et la régulation de l'épissage alternatif. Ces données révèlent un nouveau mécanisme de coordination des régulations transcriptionnelles et co-transcriptionnelles de la voie NF- κ B à travers la formation de complexes multigéniques dans un contexte de modification de la conformation tridimensionnelle du génome par Tax.

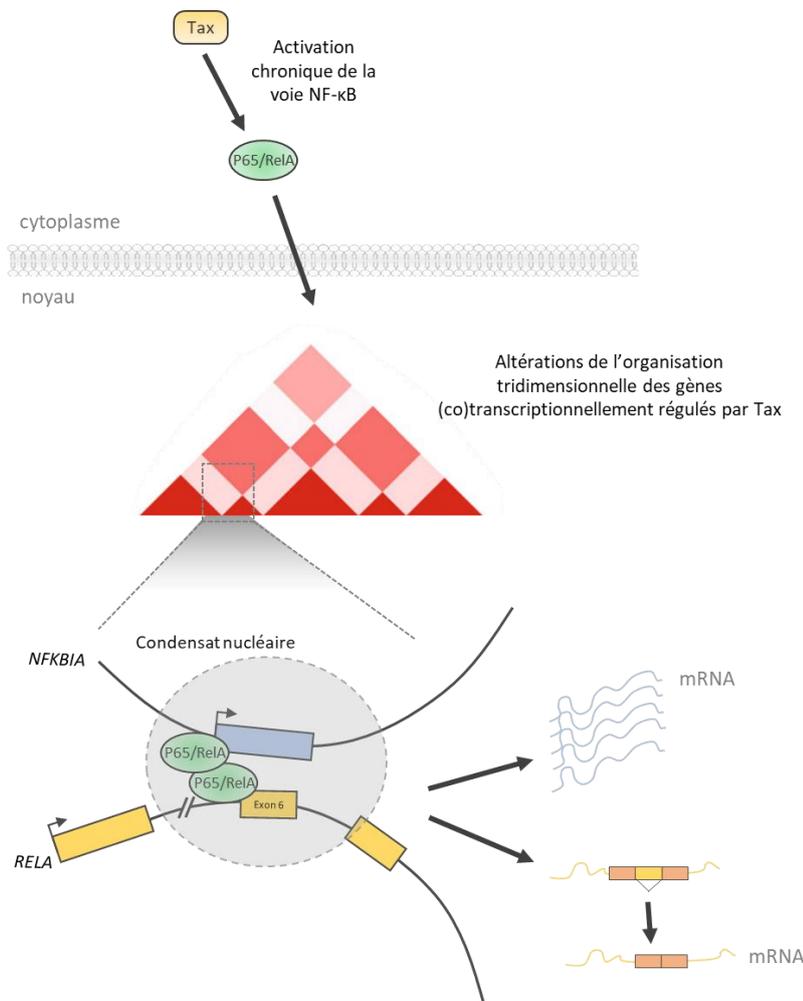


Figure 34 : modèle de la coordination de la régulation transcriptionnelle et co-transcriptionnelle de la voie NF- κ B par Tax.

Spécificité de l'activation de la voie NF- κ B Tax-dépendante

Intégration de plusieurs voies de signalisations par les stimuli d'activation de NF- κ B

Nous avons montré que l'activation de la voie NF- κ B par Tax et la présence de p65/RelA à la chromatine sont nécessaires au rapprochement de *RELA* et *NFKBIA* et à la régulation de l'épissage alternatif de l'exon *RELA* E6. De façon intéressante, l'exclusion de l'exon E6 de *RELA* n'est pas retrouvée lorsque la voie est activée par le TNF α (Figure 35) mais nous pouvons l'induire lors de l'exposition des cellules au PMA. Nous n'avons pas à ce jour de données permettant de corréler ces régulations à des contacts entre les deux gènes. Cela peut être dû au fait que Tax n'active pas seulement la voie NF- κ B, mais module de nombreuses voies qui peuvent également influencer des gènes co-régulés par la voie NF- κ B, tels que certains gènes contrôlés par la voie MAPK contrôlée également par Tax. Il a été observé que les complexes multigéniques observés lors de l'activation de la voie NF- κ B comportent un certain chevauchement avec les complexes multigéniques générés lors d'une activation de la voie TGF- β (Papantonis et al., 2012). Les auteurs avancent l'hypothèse selon laquelle des usines à transcription pourraient permettre l'intégration de multiples signaux présentant des chevauchements dans leurs gènes cibles. Ainsi, Tax pourrait influencer le fonctionnement de ces usines à transcription et détourner l'activation de gènes contrôlés par plusieurs voies à la fois. Nous avons notamment identifié que les gènes formant des contacts et régulés dans leur expression, quantitativement ou qualitativement, par Tax présentent un enrichissement en motifs κ B mais également bHLH et E2F (voir partie résultat, figure supplémentaire 5.A). Il serait ainsi intéressant de comprendre par des essais de CHIP et CHIP-seq si ces facteurs sont présents au niveau des gènes modulés et s'ils participent à la mise en place de contacts de chromatine et à la régulation de la transcription et de l'épissage alternatif par p65/RelA.

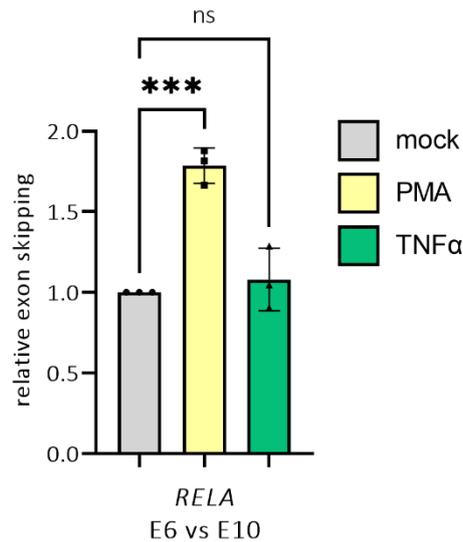


Figure 35 : Effets de la PMA et du TNF α sur l'exclusion de l'exon 6 de RELA.

Coopération de p65/RelA avec des cofacteurs

Les enrichissements de motifs décrits ci-dessus pourraient signer la participation d'autres facteurs dans la formation de contacts entre les gènes induits par Tax. Des boucles de chromatine ont en effet déjà été observées au sein d'un même gène entre les sites AP-1/c-Jun et les sites κ B, montrant que p65/RelA est capable de coopérer avec d'autres facteurs pour mettre en place de tels contacts (Chen and Chang, 2015; Zhao et al., 2011). Tax pourrait ainsi altérer ce type de mécanisme en modifiant l'expression des cofacteurs de p65/RelA ou via des interactions directes, et ainsi modifier, positivement ou négativement, certains contacts générés par p65/RelA lors d'une activation physiologique. Ces observations vont dans le sens des données de la littérature montrant que seulement un tiers des sites de fixations de p65/RelA à la chromatine sont communs quel que soit le stimulus d'activation de la voie NF- κ B, montrant donc une très grande spécificité de la distribution de p65/RelA en fonction des stimuli (Borghini et al., 2018). C'est ce que nous observons ici pour la régulation de RELA E6, qui semble stimulus-spécifique. Tax semble ainsi induire une répartition spécifique de RelA à la chromatine et donc une activation singulière de la voie NF- κ B.

Nos précédents travaux ont pu montrer que l'hélicase à ARN DDX17 est recrutée par p65/RelA à la chromatine (Annexe 1). L'activité hélicase de DDX17 permet de réguler au niveau de l'ARN l'inclusion de l'exon à proximité de la fixation intragénique de p65/RelA. Nous avons évalué que près de 58% des événements d'épissage alternatifs générés par Tax sont sensibles à

l'extinction de DDX17 et de son orthologue DDX5 par siRNA. L'interactôme de p65/RelA est en réalité riche en facteurs d'épissage, incluant d'autre hélicase à ARN telles que DDX3X, DDX1, DDX21, ou DHX15 (Feldman et al., 2007; Li et al., 2014). Ces hélicases à domaine DEAD-box sont par ailleurs des acteurs majeurs dans la formation de condensats transcriptionnels (Hondele et al., 2019). Il serait donc intéressant de réaliser des essais de marquage de proximité *in vivo* des protéines interagissant avec p65/RelA à la chromatine, comme par exemple en utilisant des technologies telles que Bio-ID ou APEX, techniques reposant sur une protéine de fusion induisant une biotinylation de proximité, suivie d'une purification et d'une identification protéomique des protéines biotinylées (Qin et al., 2021). Ces technologies permettraient de déterminer les interactions de p65/RelA en l'absence ou en présence de l'activation de la voie par Tax, et ainsi d'identifier des facteurs autres que DDX17 pouvant relier p65/RelA aux contrôle des interactions gène-gène et de l'épissage alternatif.

Outre les facteurs d'épissage, les marques d'histone peuvent aussi permettre le recrutement de facteurs d'épissage, ou influencer la vitesse d'élongation de l'ARNPII via un remodelage de la chromatine, et dans les deux cas moduler l'épissage des gènes (voir introduction partie 2.b.iii). Ainsi, outre DDX17, la fixation de p65/RelA à proximité d'exons régulés pourrait induire des modifications des marques d'histones permettant d'influencer l'épissage alternatif selon un modèle de recrutement ou un modèle de cinétique. Dans ce sens, le facteur de transcription p65/RelA interagit avec de nombreux facteurs de remodelage de la chromatine tels que des HDACs ou des HAT comme CBP/p300 (Zhong et al., 1998). Pour aborder cette question, il serait intéressant de générer des données de Chip-seq de différentes marques d'histones lors de l'expression de Tax, et notamment des marques déjà identifiés dans la régulation de l'épissage alternatif comme par exemple H3K27Ac, H3K36me3, ou H3K4me3 (Luco et al., 2010).

Outre p65/RelA, les facteurs NF- κ B agissent en dimères à la chromatine, et la composition des dimères permet de moduler leur fixation au niveau des sites κ B et la transactivation transcriptionnelle des gènes (Saccani et al., 2003). Il est fort probable que ces effets de composition de dimères NF- κ B puissent exister lors de la reconnaissance des sites κ B intragéniques proches des exons cibles. Cependant, les études par CHIP-seq de la distribution de NF- κ B à la chromatine ne ciblent pour la plupart que le facteur p65/RelA. Il serait intéressant

de pouvoir évaluer par CHIP-seq la distribution des autres membres NF-κB lors de l'activation par Tax, et d'aborder par ChIA-PET l'engagement de ces facteurs dans la formation de boucles de chromatine pour mieux comprendre le rôle de chaque dimère dans les mécanismes qui relient le remodelage de l'organisation tridimensionnelle du génome et l'épissage alternatif lors de l'expression de Tax.

Epissage alternatif et structures subnucléaires

Localisation nucléaire et épissage alternatif

Des données récentes montrent que le mode de régulation de l'épissage alternatif est dépendant de la position radiale des gènes dans le noyau (central vs périphérique) et notamment de leur proximité avec les nuclear speckles (NS) ([Barutcu et al., 2022](#); [Tammer et al., 2022](#)). Les NS situées au centre du noyau sont associées à une régulation des exons riches en GC. De façon intéressante, les exons régulés par Tax sont également des exons riches en GC ([Annexe 1](#)). Dans ce contexte, nous proposons un modèle dynamique qui concernerait la régulation de gènes localisés au centre du noyau qui pourraient modifier leurs interactions avec d'autres gènes par la formation de complexe multigéniques lors de l'activation de la voie NF-κB par Tax.

D'un point de vue mécanistique, notre modèle propose que lors de l'activation de la voie NF-κB par Tax, l'import nucléaire de p65/RelA permet un enrichissement massif des promoteurs comme des régions intragéniques cibles de p65/RelA. Comme précédemment décrit ([Bertero et al., 2019](#); [Papantonis et al., 2012](#)), les complexes p65/RelA à la chromatine participent à la formation de condensat multigénique, vraisemblablement par des processus de transition de phase (LLPS), qui favorise la génération d'un microenvironnement riche en facteurs de transcription et d'épissage, comme déjà démontré pour les usines à transcription ([Caudron-Herger et al., 2015](#); [Melnik et al., 2011](#)). Dans ces structures, seuls les gènes porteurs de p65/RelA au niveau de leur promoteur seraient régulés au plan transcriptionnel. En revanche, les gènes porteurs de p65/RelA à proximité des exons subiraient des régulations co-transcriptionnelles propres aux facteurs qui partagent des interactions directes ou indirectes avec p65/RelA, tels que des modifications des histones par le recrutement d'HDAC et ou HAT (comme CBP/p300) et/ou le recrutement de régulateurs de l'épissage tels que DDX17. Ce

mécanisme permettrait vraisemblablement de contrôler à travers l'enrichissement d'un unique effecteur de la voie, p65/RelA, un programme transcriptionnel et post-transcriptionnel approprié à la réponse cellulaire.

Reste à préciser les fonctions exactes de Tax dans ce mécanisme. Néanmoins, nos expériences de CHIP dirigées contre Tax ne permettent pas aujourd'hui d'affirmer la présence de Tax à la chromatine avec p65/RelA. Un tel complexe à la chromatine permettrait de recruter de nombreux facteurs transcriptionnels avec lesquels interagit Tax à la chromatine, et ainsi proposer que Tax puisse affecter la composition et les activités des transcriptions factories spécialisées pour ces facteurs. Il serait donc intéressant de pouvoir obtenir des données de CHIP-seq de la distribution de Tax et de p65 à la chromatine, et encore plus intéressant de réaliser des essais de CHIA-PET en immunoprécipitant Tax ou RelA afin d'obtenir un paysage des interactions longues distances dépendant directement de RelA et/ou de Tax, et relier ces dernières aux dérégulation en transcription et en épissage alternatif. Dans ce but, nous avons récemment développé une construction Avitag-Tax (tag cible de biotinylation) afin de pouvoir générer une protéine immunoprécipitable avec une grande spécificité et ainsi pouvoir générer des données de CHIP et CHIP-seq ou également de CHIA-PET de Tax.

Tax speckles, nuclear speckles et usines à transcription

Dans le noyau, Tax est capable de former des corps nucléaires denses appelés Tax speckles (Bex et al., 1997; Semmes and Jeang, 1996). Ces structures sont enrichies en facteurs d'épissage tels que Sc35 et Sm, en facteurs NF- κ B, en ARNPII active, et en ARN naissants à leur périphérie. Ces structures partagent donc des composantes avec les nuclear speckles (NS) habituellement marqués par Sc35, compartiments jouant un rôle important dans l'épissage. Mais la présence d'ARNPII active et de transcrits néo-synthétisés à la périphérie des Tax speckles pourrait suggérer que ces structures partagent également des fonctions avec les usines à transcription (Papantonis and Cook, 2013). Nous ne savons cependant pas si les Tax speckles sont des structures propres à Tax ou s'il s'agit de nuclear speckles, ou bien de usines à transcription, infiltrées et remodelées structurellement et fonctionnellement par Tax. Si c'était le cas, un tel mécanisme permettrait vraisemblablement de coordonner une régulation à la fois de la transcription et de l'épissage alternatif de certains gènes cibles pour générer un

profil d'expression d'isoformes transcriptionnelles propices à la prolifération des cellules infectées et à l'oncogenèse liée à HTLV-1.

Il a été récemment observé que l'ARNPII est capable de transiter entre condensats d'initiation (enrichis en Mediator) et les nuclear speckles, participant ainsi à la régulation de l'épissage des transcrits naissants (Guo et al., 2019). Les structures subnucléaires dédiées à la transcription, et à l'épissage semblent ainsi intimement liées. Une des hypothèses serait que Tax pourrait transiter entre ces condensats de régulation de la transcription et de l'épissage. Nous avons récemment observé que RelA co-localise avec DDX17 dans les corps nucléaires Tax (Figure 36). La présence de DDX17 dans ces structures suggère que les modifications d'épissage régulées par le complexe p65/RelA::DDX17 lors de l'activation de la voie NF-κB par Tax pourrait avoir lieu au sein de ces structures qui pourraient alors être considérées comme des « Tax factories » ou des « NF-κB factories » infiltrées et détournées par Tax.

Il serait intéressant d'étudier cette hypothèse en réalisant des essais de RNA-FISH sur des transcrits altérés par RelA (comme *NFKBIA* et *RELA*) combinés à des essais d'immunofluorescences de l'ARNPII (sous sa forme active S2P/S5P), afin de voir leur co-localisation. Il serait également possible d'envisager de pouvoir purifier de façon native ces structures subnucléaires, afin d'en déterminer la composition protéique par des approches de protéomique (Melnik et al., 2011).

Tax est-elle impliquée dans les processus de transition de phase liquide-liquide (LLPS)

La formation d'usines à transcription et de nuclear speckles est en partie expliquée par la capacité de facteurs à former une séparation de phase liquide-liquide (LLPS) pour générer un condensat nucléaire. Parmi les caractéristiques de la formation de LLPS, les propriétés physico-chimiques et notamment la composition des protéines joue un rôle important ([Martin and Holehouse, 2020](#)). Notamment, la présence de régions de désordre intrinsèque (IDR) dans les séquences protéiques est en particulier un élément prédictif de formation de nombreuses interactions multivalentes non spécifiques de faible force pouvant mener à la formation de condensats par LLPS. Une étude récente indique que Tax porte une IDR, ce qui permet par ailleurs d'expliquer les difficultés rencontrées dans les analyses cristallographiques de la structure de Tax ([Boxus et al., 2008](#); [Lyngdoh et al., 2019](#)). Il serait donc intéressant d'étudier les capacités de Tax à former de la LLPS *in vitro* et d'évaluer si ses partenaires, tels que les hélicases de la famille DEAD-box particulièrement engagées dans la formation de condensat transcriptionnels, pourraient contribuer à former ces corps nucléaires Tax ([Hondele et al., 2019](#)). La co-localisation entre Tax et DDX17 dans les condensats Tax semblent soutenir cette hypothèse (Figure 36). Il faudra rechercher par RNA-FISH si ces structures Tax::p65/RelA::DDX17 peuvent participer à regrouper des gènes co-régulés transcriptionnellement et post-transcriptionnellement. Dans cette voie, il a récemment été observé que le facteur de transcription viral d'EBV EBNA2 est capable d'induire de la LLPS avec des composants du splicéosome pour réguler l'épissage alternatif cellulaire ([Peng et al., 2021](#)).

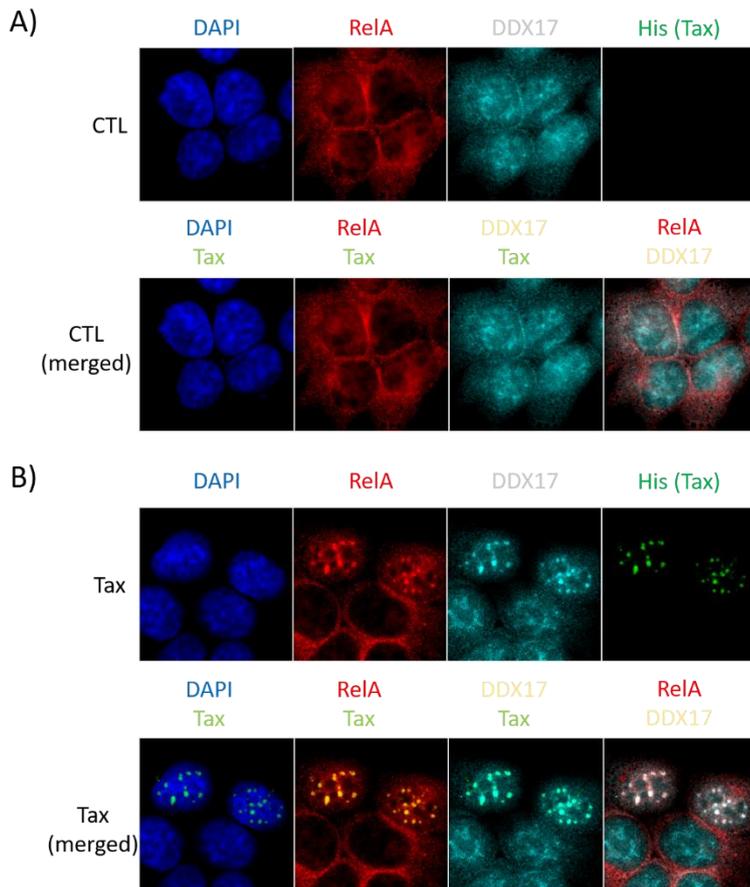


Figure 36 : Tax co-localise avec RelA et DDX17 dans des structures discrètes subnucléaires. Des cellules HEK293T ont été transfectées transitoirement par des plasmides exprimant His-Tax (B) ou par un plasmide contrôle (A). 48 heures après transfection, les cellules ont été fixées, perméabilisées et marquées par des anticorps anti RelA, DDX17 ou His. Les cellules ont été montées dans du milieu de montage contenant du 4,6-diamidino-2-phenylindole. Les cellules ont été imagées sur un ZEISS LSM 980 avec Airyscan 2. Les images sont représentatives de la population cellulaire après transfection.

La réorganisation tridimensionnelle du génome par Tax dans les processus mutagènes.

La formation de complexe multigéniques par Tax et l'activation de la voie NF- κ B pourraient-elles être impliquées dans l'incidence élevée de mutations somatiques observées dans les ATLL ? En effet, il a été démontré que l'organisation tridimensionnelle du génome est impliquée dans la cooccurrence de mutations entre des régions impliquées dans des contacts chromatinien (Shi et al., 2016). De façon similaire, *NFKBIA* et *RELA* sont fréquemment retrouvés mutés dans des cellules d'ATLL (Kataoka et al., 2015). Le renforcement des contacts longue-distance vs courte distance par Tax pourrait refléter un relâchement de la chromatine qui permettrait sa diffusion plus facile dans le noyau, permettant ainsi à des régions chromatiniennes distantes d'entrer en contact. Une chromatine plus ouverte serait donc plus sensible à subir des mutations, car plus exposée aux espèces réactives de l'oxygène et aux agents mutagènes. Dans ce sens, il a été montré que les mutations apparaissant dans des régions de chromatine ouvertes sont associées à de nombreux cancers (Kikutake and Suyama,

2022). Il serait ainsi intéressant de pouvoir obtenir des données de Hi-C de cellules d'ATLL afin de comprendre si les régions fréquemment mutées dans les ATLL coïncident avec des fréquences de contacts plus importantes pour ces régions chromosomiques, en particulier si les gènes répondeurs à NF- κ B mutés fréquemment dans les ATLL partagent les mêmes complexes multigéniques.

Limites du modèle utilisé

Les travaux présentés ont été réalisés dans des cellules 293T, cellules n'étant pas la cible de l'infection par HTLV-1. Cependant, il existe un recouvrement entre les événements d'épissage observés dans ce modèle et des cellules d'ATLL. En effet, 48% des événements d'épissage alternatif observés dans les 293T exprimant Tax sont retrouvés *in vivo* dans des cellules d'ATLL. De plus, les régulations transcriptionnelles de *RELA* et *NFKBIA* observées dans les 293T exprimant Tax sont également retrouvées dans les cellules C91PL, infectées par HTLV-1. Bien que le paysage transcriptionnel et tridimensionnel des 293T puisse différer des lymphocytes T cibles du HTLV-1, et donc que la nature des gènes affectés de manière tridimensionnelle et (co)transcriptionnelle par Tax puissent différer, les effets de Tax seront les mêmes. De plus, ces travaux se concentrent uniquement sur Tax, et ne prennent pas en compte l'expression de l'ensemble des protéines virales, qui pourraient influencer les effets de Tax à la fois sur le transcriptome et sur l'organisation du génome. Le modèle utilisé ici est cependant adéquat afin d'étudier l'effet de Tax seul, de façon simplifiée (facilité de manipulation des cellules 293T pour les méthodes employées), afin de disséquer un mécanisme général de Tax dans une cellule. Il serait cependant intéressant de comprendre quels sont les effets de Tax dans des lymphocytes T ou même dans des lignées HTLV-1 dans la réorganisation du génome.

L'intégration de HTLV-1 dans le génome altère l'organisation tridimensionnelle du génome

Les modifications de la structure tridimensionnelle du génome hôte lors de l'infection par HTLV-1 ont déjà été suggérées à travers les fonctions d'un site CTCF (vCTCF) dans la séquence provirale (Satou et al., 2016). Des essais de 4C ciblant vCTCF ont montrés que le provirus forme des contacts avec les régions flanquantes et des régions distantes (>300kb) du site d'intégration. La mutation de vCTCF abouti à l'inhibition de la formation des boucles de

chromatine ainsi qu'à une dérégulation des gènes à proximité des régions en contact. Il a été proposé que l'insertion du provirus permettrait de former des néo-TAD et/ou de modifier les TADs présents dans la cellule, et d'interférer avec l'expression des gènes cellulaires. Cependant, cette étude n'apporte pas de données concernant des contacts très longue distance (à plusieurs Mb) ou inter-chromosomiques, qui permettraient d'avoir une vision plus large des contacts et dérégulations engendrées par le provirus. Plus récemment, il a été identifié que la région pX comporte une séquence enhancer pouvant également être mise en jeu dans la formation de boucles de la chromatine et l'altération de l'expression des gènes cellulaires (Matsuo et al., 2022). Il serait important de comprendre le rôle de Tax dans la dynamique des contacts générés par le provirus HTLV-1, et d'en étudier les conséquences fonctionnelles, à la fois en transcription et en épissage alternatif, comme dans la progression de l'infection via l'expansion clonale des cellules infectées. Les analyses récentes de la distribution des sites d'intégration suggèrent que la présence du provirus dans les régions proches de la lamine seraient enrichies dans les clones cellulaires infectés retrouvés *in vivo* (Melamed et al., 2022). Les auteurs proposent que ce type de localisation en périphérie du noyau permettrait une extinction de l'expression d'HTLV-1 et un meilleur échappement des cellules infectées à la pression du système immunitaire. La localisation du provirus dans l'espace nucléaire participerait ainsi à la sélection clonale des cellules infectées *in vivo*. Il serait intéressant de réaliser des analyses Hi-C dans des cellules infectées par HTLV-1 ou encore dans des cellules d'ATLL afin d'obtenir une vision d'ensemble des dérégulations de l'organisation du génome par HTLV-1. Il serait également important de mesurer l'impact de l'expression de Tax sur la localisation du provirus dans l'espace nucléaire et de ses contacts cis- et trans-chromosomique. Il serait pour cela envisageable de réaliser des essais de 4C en ciblant le génome proviral dans des cellules issues de patients et cellules cultivées ex-vivo pour permettre la réactivation de l'expression virale. La comparaison des données de ce type d'approche combinée aux analyses transcriptomiques (expression de gène et épissage) réalisées chez les individus asymptomatiques et les patients atteints de TSP/HAM et d'ATLL, permettrait de mieux comprendre le rôle de cette nouvelle composante fonctionnelle d'HTLV-1 sur la dynamique des interactions tridimensionnelle du génome dans le développement des pathologies associées au virus.

Conclusion

Pour conclure, mes travaux de thèse ont permis de montrer que l'activation de la voie NF- κ B par l'oncogène Tax de HTLV-1 induit une réorganisation du génome qui induit la formation de complexes multigéniques composés de gènes régulés par p65/RelA dans leur niveau transcriptionnel mais également dans leur épissage alternatif. Ces données démontrent pour la première fois que la formation de ces complexes multigéniques permet à p65/RelA de coordonner à la fois la régulation de la transcription et de l'épissage alternatif des transcrits de façon NF- κ B-dépendante. Ces données redéfinissent la fonction de p65/RelA, initialement défini comme un facteur de transcription, comme un facteur régulant à la fois de manière quantitative et qualitative le transcriptome. Son action n'est pas restreinte aux régions flanquantes de sa fixation au niveau d'un promoteur ou d'un corps de gènes mais elle affecte la régulation d'autres gènes à distance (en cis ou en trans-chromosomique) via des modifications de la conformation tridimensionnelle du génome. Ces données révèlent un mécanisme supplémentaire dans la complexité de régulation des gènes associés à l'activation de la voie NF- κ B qui pourrait concerner d'autres voies de signalisation de manière plus générale. Enfin, ces travaux permettent d'apporter un regard nouveau sur les mécanismes moléculaires impliqués dans les phénomènes d'inflammation cellulaire et d'oncogenèse, reliés à HTLV-1 ou à d'autres situations pathologiques associées à l'activation chronique de la voie NF- κ B.

Annexes

Annexe 1

ARTICLE


<https://doi.org/10.1038/s41467-020-16853-x>

OPEN

Intragenic recruitment of NF- κ B drives splicing modifications upon activation by the oncogene Tax of HTLV-1

Lamya Ben Ameer ¹, Paul Marie ^{1,8}, Morgan Thenoz^{1,2,8}, Guillaume Giraud^{1,8}, Emmanuel Combe ¹, Jean-Baptiste Claude¹, Sebastien Lemaire¹, Nicolas Fontrodona¹, H el ene Polveche³, Marine Bastien^{1,4}, Antoine Gessain⁵, Eric Wattel ^{6,7}, Cyril F. Bourgeois ¹, Didier Auboeuf ¹  & Franck Mortreux ¹ 

Chronic NF- κ B activation in inflammation and cancer has long been linked to persistent activation of NF- κ B-responsive gene promoters. However, NF- κ B factors also massively bind to gene bodies. Here, we demonstrate that recruitment of the NF- κ B factor RELA to intragenic regions regulates alternative splicing upon NF- κ B activation by the viral oncogene Tax of HTLV-1. Integrative analyses of RNA splicing and chromatin occupancy, combined with chromatin tethering assays, demonstrate that DNA-bound RELA interacts with and recruits the splicing regulator DDX17, in an NF- κ B activation-dependent manner. This leads to alternative splicing of target exons due to the RNA helicase activity of DDX17. Similar results were obtained upon Tax-independent NF- κ B activation, indicating that Tax likely exacerbates a physiological process where RELA provides splice target specificity. Collectively, our results demonstrate a physical and direct involvement of NF- κ B in alternative splicing regulation, which significantly revisits our knowledge of HTLV-1 pathogenesis and other NF- κ B-related diseases.

¹Laboratory of Biology and Modelling of the Cell, Univ Lyon, ENS de Lyon, Univ Claude Bernard, CNRS UMR 5239, INSERM U1210, 46 All ee d'Italie Site Jacques Monod, 69007 Lyon, France. ²Department of Pediatrics and Medical Genetics, Faculty of Medicine and Health Sciences, 9000 Gent, Belgium. ³CECS, I-Stem, Corbeil-Essonnes 91100, France. ⁴School of Pharmacy and Biomolecular Sciences, Liverpool John Moores University, Liverpool, UK. ⁵Unit  d'Epidémiologie et Physiopathologie des Virus Oncogènes, Institut Pasteur, Paris, France. ⁶Universit  Lyon 1, CNRS UMR5239, Oncovirologie et Biothérapies, Faculté de Médecine Lyon Sud, ENS - HCL, Pierre Bénite, France. ⁷Universit  Lyon 1, Service d'H matologie, Pavillon Marcel Bérard, Centre Hospitalier Lyon-Sud, Pierre B nite, France. ⁸These authors contributed equally: Paul Marie, Morgan Thenoz, Guillaume Giraud. email: didier.auboeuf@inserm.fr; franck.mortreux@ens-lyon.fr

The human T-cell leukemia virus (HTLV-1) is the etiologic agent of numerous diseases, including adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL)¹, an aggressive CD4⁺ T-cell malignancy, and various inflammatory diseases, such as HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP)². Changes at the gene expression level participate in the persistent clonal expansion of HTLV-1-infected CD4⁺ and CD8⁺ T-cells, leading ultimately to HTLV-1-associated diseases³. We recently reported that alternative splicing events help to discriminate between ATLL cells, untransformed infected cells, and their uninfected counterparts derived from patients⁴. Alternative splicing of pre-messenger RNAs is a co-transcriptional processing step that controls diversity in both the transcriptome and the proteome and that governs cell fate. Its regulation relies on a complex and still incompletely understood interplay between splicing factors, chromatin regulators, and transcription factors^{5,6}. For instance, we still do not fully understand the molecular mechanisms of HTLV-1-induced splicing modifications, or whether these effects rely on interplay between transcription and splicing.

Tax is an HTLV-1-encoded protein that regulates viral and cellular gene transcription. Tax also alters host signaling pathways that sustain cell proliferation, leading ultimately to cell immortalization⁷. The nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway is the most critical target of Tax for cell transformation⁸. The NF- κ B transcription factors (RELA, p50, c-Rel, RelB, and p52) govern immune functions, cell differentiation, and proliferation⁹. NF- κ B activation involves the degradation of I κ B, which sequesters NF- κ B factors in the cytoplasmic compartment; this leads to NF- κ B nuclear translocation and binding of NF- κ B dimers (of which RELA:p50 is the most abundant) to their target promoters^{10,11}. Tax induces IKK phosphorylation and I κ B degradation, leading to persistent nuclear translocation of NF- κ B^{12,13}. In addition, Tax interacts with nuclear NF- κ B factors and enhances their effects on transcription^{14,15}.

Interestingly, genome-wide analyses of NF- κ B distribution have unveiled that the vast majority of RELA peaks is outside promoter regions and can be localized in introns and exons^{16–19}. Some of those promoter-distant RELA-binding sites correspond to *cis*-regulatory transcriptional elements^{20,21} but globally, there is a weak correlation between the binding of RELA to genes and regulation of their steady-state expression^{17,18}. These data suggest that NF- κ B could have other functions than its initially described function as a transcription factor.

Here, we show that NF- κ B activation accounts for alternative splicing modifications generated upon Tax expression. These effects rely on a tight physical and functional interplay between RELA and the DDX17 splicing factor, which dynamically occurs upon NF- κ B activation. Our results reveal that RELA DNA binding in the vicinity of genomic exons regulates alternative splicing through DDX17 recruitment, which then modulates exon inclusion via its RNA helicase activity.

Results

Tax regulates splicing regardless of its transcriptional effects.

We performed RNA-seq analyses on 293T-LTR-GFP cells transiently transfected with a Tax expression vector. We then identified Tax-induced changes in gene expression level and in alternative splicing and annotated them as previously described^{22,23} (Supplementary Data 1 and 2). Notably, the ectopic expression of Tax affected the splicing and gene expression levels of 939 and 523 genes, respectively (Fig. 1a). A total of 1108 alternative splicing events was predicted, including 710 exon skipping events (Fig. 1b). A small percentage of genes (3.5%, 33/939) was altered at both their expression and splicing levels,

indicating that Tax largely affects alternative splicing independently of its transcriptional activity. We validate a subset of splicing events by RT-PCR (Fig. 1c). To test whether Tax-induced splicing modifications occurred *in vivo*, we took advantage of a publicly available RNA-seq dataset (EGAS00001001296²⁴) from three healthy control donors, three asymptomatic carriers (AC), and 55 ATLL patients (Supplementary Data 1). Although lowly expressed, Tax mRNA was detected in the vast majority of infected samples (Supplementary Fig. 1). It is important to note that ATL can sporadically express Tax in bursts^{25,26}; thereby explaining, at least in part, their Tax-like features even though Tax is poorly detected in ATL samples²⁴. Based on this, we examined the percent spliced-in (PSI) values of exons expressed in samples from donors, carriers, and patients with ATLL (Supplementary Data 1). Overall, 542 (48%) Tax-induced splicing modifications were detected at least once in 55 ATL samples (Supplementary Data 1). This low frequency was anticipated due to the high fluctuations between individuals of Tax expression levels, proviral loads, and infected cell clonality, as well as somatic alterations (e.g., gene mutations, deletions, and duplications), which accumulate in ATLL cells²⁴. Some Tax-related splicing events were recurrently detected in asymptomatic and ATLL samples (Fig. 1d). In addition, using exon-specific RT-PCR assays, we confirmed that Tax promotes splicing events that have been previously described in HTLV-1-infected individuals, including in the *AASS*, *CASK*, *RFX2*, and *CD44* genes^{4,27} (Fig. 1c). Altogether, these results uncovered a large number of splicing modifications that occurred upon Tax expression, which to a degree coincide with alternative splicing events observed in HTLV-1 patients.

DDX17 interacts with RELA upon Tax-induced NF- κ B activation.

As Tax is a well-known *trans*-acting transcription regulator, we first analyzed whether Tax could affect gene expression levels of splicing factors. However, no significant change was measured for 227 genes encoding splicing regulators (Supplementary Data 1, Fig. 2a), thereby suggesting a direct role of Tax in alternative splicing regulatory mechanisms. To tackle this question, we focused on the auxiliary component of the spliceosome DDX17, which has been previously identified, but not validated, in a recent mass spectrometry screen for putative protein partners of Tax²⁸.

We therefore aimed to validate the interaction between Tax and DDX17. As shown in Fig. 2b, Tax co-immunoprecipitated with the two endogenous isoforms of DDX17, namely p72 and p82. Reciprocal IP confirmed this interaction (Fig. 2c). Due to the involvement of NF- κ B signaling in Tax-positive cells (Fig. 1d¹¹), we examined whether DDX17 interacts with a Tax mutated form, namely M22 (G137A, L138S), which is defective for IKK and NF- κ B activation^{29–32}. Despite similar expression levels and immunoprecipitation efficiencies of Tax and M22 (Fig. 2d), we failed to detect any interaction between M22 and DDX17 (Fig. 2b,c), suggesting that NF- κ B is required for recruiting DDX17. In this setting, RELA co-immunoprecipitated with DDX17 and Tax, but not with M22 (Fig. 2b, c). Moreover, DDX17 was co-immunoprecipitated with RELA in a Tax-dependent manner (Fig. 2e). This interaction did not require RNA as the DDX17:RELA complex remained detected when cell extracts were pretreated with RNase A (Fig. 2f).

As DDX17:RELA complexes were observed neither in control cells (that do not express Tax) nor in M22-expressing cells, this suggested that NF- κ B activation is necessary for the binding of DDX17 to RELA. This hypothesis was confirmed by exposing M22-expressing cells to TNF α , a potent NF- κ B activator that allowed retrieving DDX17:RELA complexes (Fig. 2g). Altogether,

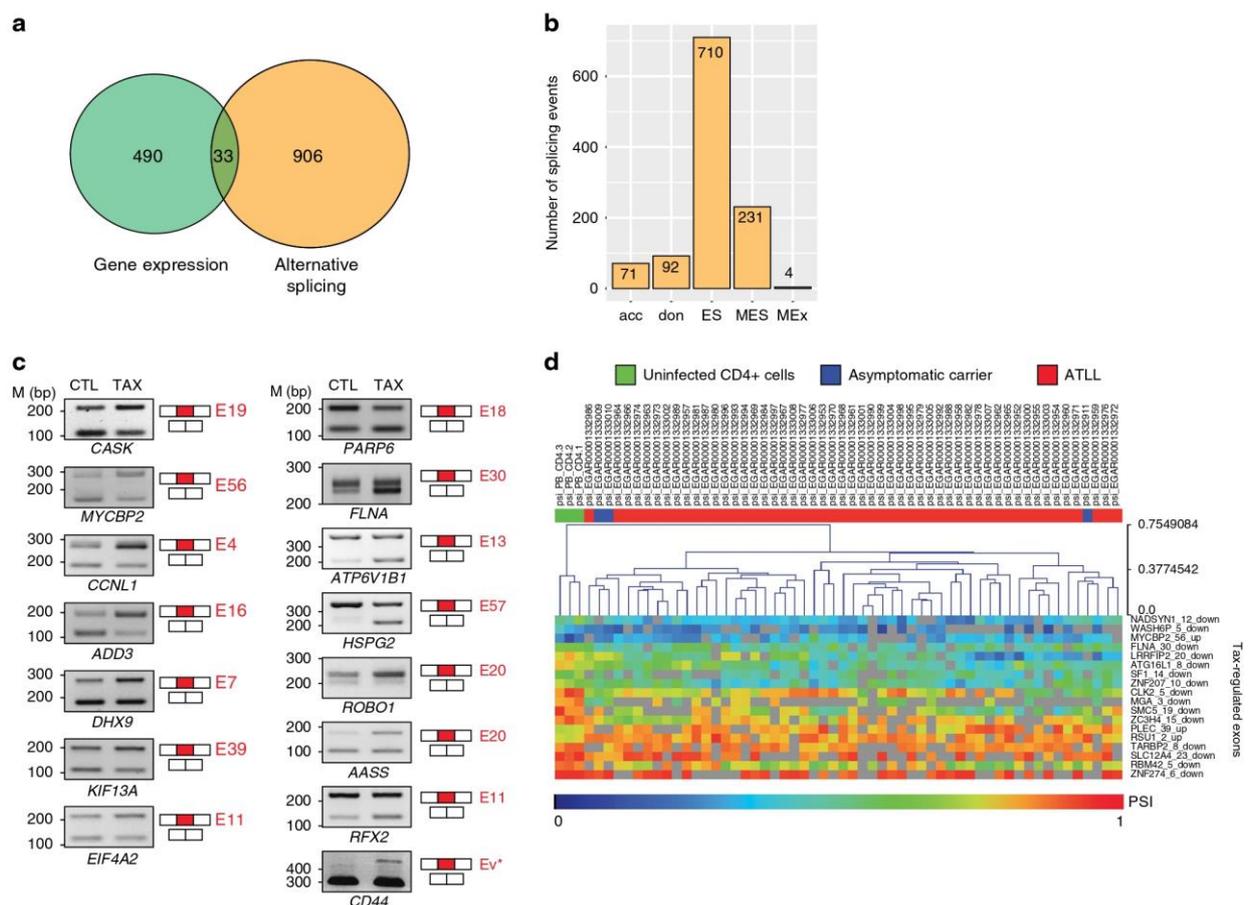


Fig. 1 Tax induces alternative splicing modifications independently of its transcriptional effects. **a** Genes regulated at the steady-state expression level and at the splicing level upon Tax expression in HEK cells. The significance thresholds were typically set to 10% for Δ PSI (differential percentage of spliced-in sequence) and 0.6 for \log_2 -gene expression changes ($p < 0.05$, Fisher's exact test), respectively. **b** Different alternative splicing events induced by Tax: alternative acceptor (acc), alternative donor (don), exon skipping (ES), multi-exon skipping (MES), and multi-exclusive exon skipping (MEx). **c** Validation of alternative splicing predictions by RT-PCR (using 35 cycles). The exon number is indicated in red. CD44 full variants (Ev*) were assessed using primers C13 and C12A (Supplementary Fig. 5). Representative image from three independent experiments is shown. **d** Exon-based hierarchical clustering. Kruskal-Wallis ANOVA ($p < 0.05$) was carried out with Mev4.0 software (<http://www.tm4.org/>) using the PSI values of exons that share similar regulations upon Tax and in clinical samples (EGAS00001001296). Only the most significant exon regulations are presented. Source data are provided as a Source Data file.

these results revealed that Tax dynamically orchestrates interactions between the transcription factor RELA and the splicing regulator DDX17 by activating the NF- κ B signaling pathway (Fig. 2h).

Tax-mediated effects on splicing depend on DDX5/17. To estimate the role of DDX17 in Tax-regulated splicing events, RNA-sequencing was performed using 293T-LTR-GFP cells expressing or not Tax and depleted or not for DDX17 and its paralog DDX5, which cross-regulate and complement each other^{22,33,34}. Tax had no effect on the expression of DDX5 and DDX17 (Figs. 2a and 3a) and RELA protein level was not significantly changed upon both Tax expression and DDX5/17 silencing (Fig. 3b).

Overall, 58.5% (648/1108) of Tax-regulated exons were affected by DDX5/17 knockdown, a significantly higher proportion than expected by chance (Fig. 3c, Supplementary Fig. 2a). Of particular significance, 423 Tax-induced splicing events were completely dependent on the presence of DDX5/17 (Supplementary Data 3). For example, DDX5/17 silencing completely abolished the

Tax-mediated effect on splicing of *SEC31B*, *CASK*, *MYCBP2*, *CCNL1*, *ROBO1*, and *ADD3* transcripts (Fig. 3d). Tax, as well as siRNA-mediated DDX5/17 depletion, had no marked effects on gene expression levels of those genes (Supplementary Fig. 2c, d). Of note, splicing specific RT-PCR assays permitted to validate the effect of DDX5/17 on Tax-dependent splicing changes for *CD44*, *ADD3*, and *EIF4A2* transcripts, even though their predicted differential inclusion fell below the arbitrary computational threshold (Fig. 3d and Supplementary Fig. 2b). This suggested that the contribution of DDX5/17 to Tax-mediated alternative splicing regulation might be under-estimated.

As NF- κ B activation modified the interactions between DDX17, RELA, and Tax (Fig. 2), we next examined the interplay between NF- κ B activation and DDX17-mediated splicing regulation. As shown in Fig. 3d, M22 did not have any effect on DDX5/17-sensitive splicing events, arguing that Tax splicing targets are regulated by RNA helicases DDX5/17 in an NF- κ B-dependent manner. This was further confirmed using siRNA-mediated depletion of RELA that abolished DDX17-dependent splicing regulations by Tax (Fig. 3d).

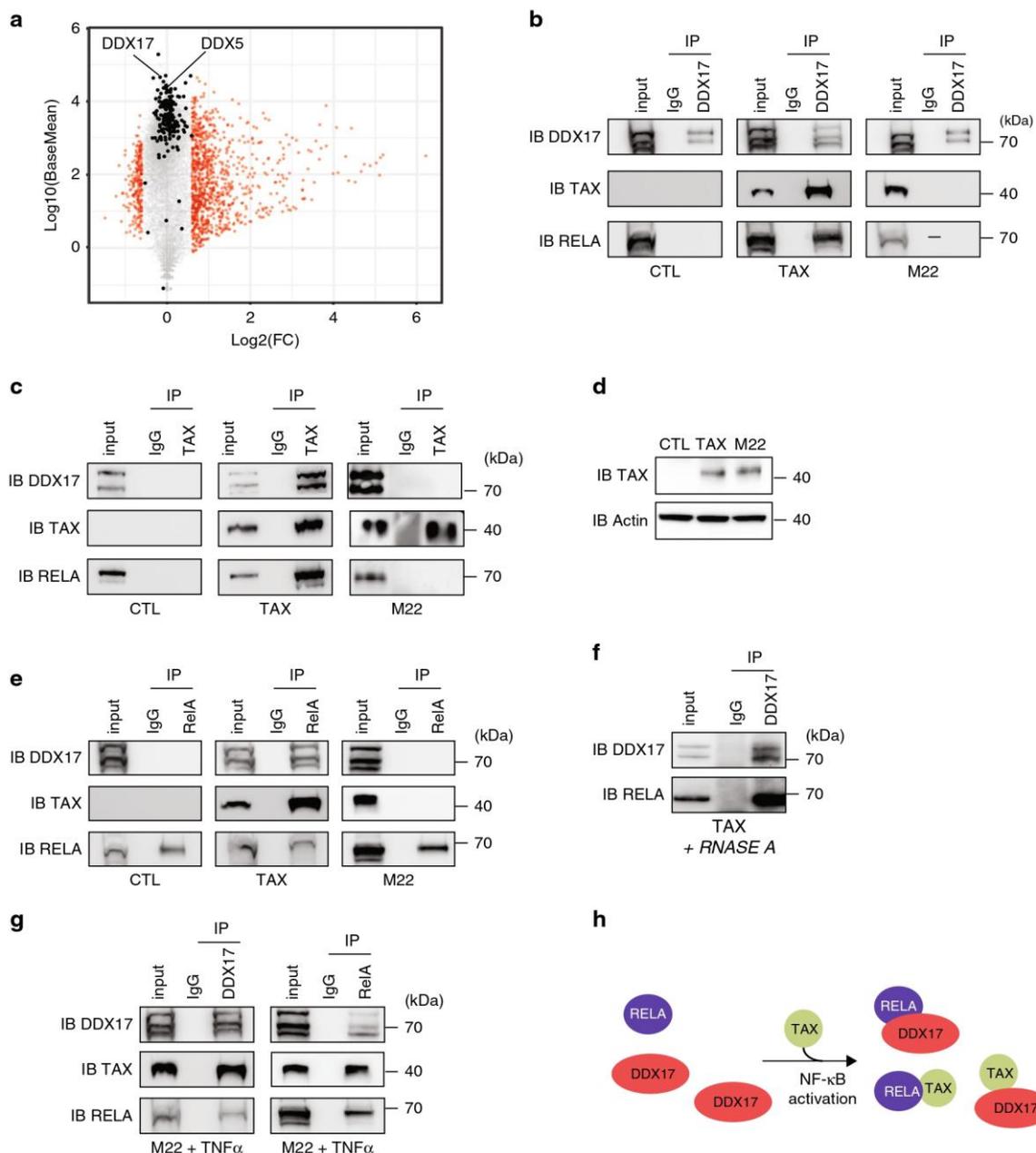


Fig. 2 Physical interactions between Tax, RELA, and DDX17 in an NF- κ B dependent manner. **a** Mean average plot ($n = 3$, $p < 0.05$) of cellular gene expressions upon Tax. Each gene is plotted according to its expression level ($\log_{10}(\text{BaseMean})$) from DESeq2 analysis and to fold change ($\log_2(\text{FC})$) upon Tax. Red dots show significant gene expression changes in HEK cells ($\log_2(\text{FC}) > 0.6$, $p < 0.05$, Fisher's exact test). Black dots highlight genes encoding splicing factors. DDX5 and DDX17 are indicated. **b** Immunoprecipitation assays (IP) were carried out in HEK cells using isotype IgG or anti-DDX17 (**b**, **g**), anti-RELA (**e**, **g**), and anti-Tax (**c**, **g**) antibodies, followed by immunoblotting (IB) with indicated antibodies. **d** Western blot analysis of Tax and M22 expression 48-h post-transfection. **f** RNA-free IP assays. **g** TNF α exposure of M22-expressing cells promotes RELA- DDX17 interactions. **h** Model of NF- κ B-dependent interplay between Tax, RELA, and DDX17. For **b-g**, a representative image from three independent experiments is shown. Source data are provided as a Source Data file.

Functional insight of Tax and DDX17-dependent spliced genes. Gene ontology (GO) analysis of quantitatively altered genes revealed several signaling pathways that are well described in Tax-expressing cells, including NF- κ B, TNF, and MAPK signaling (Supplementary Fig. 3C)^{11,35}. In contrast, genes modified at the splicing level belong to membrane-related regulatory processes including focal adhesion and ABC transporters (Supplementary Fig. 3C). In particular, the term *Focal Adhesion* was

shared between Tax splicing targets identified in infected samples (RNA-seq datasets, Supplementary Data 1) and those regulated by DDX17 (Supplementary Data 3) (Supplementary Fig. 3C). In addition, using an exon ontology (EO) approach that we recently developed to estimate enrichment in protein features encoded by exons³⁶, we found that Tax- and DDX17-regulated exons encoded for regions involved in functionally validated post-translational modifications (PTM), protein structure and

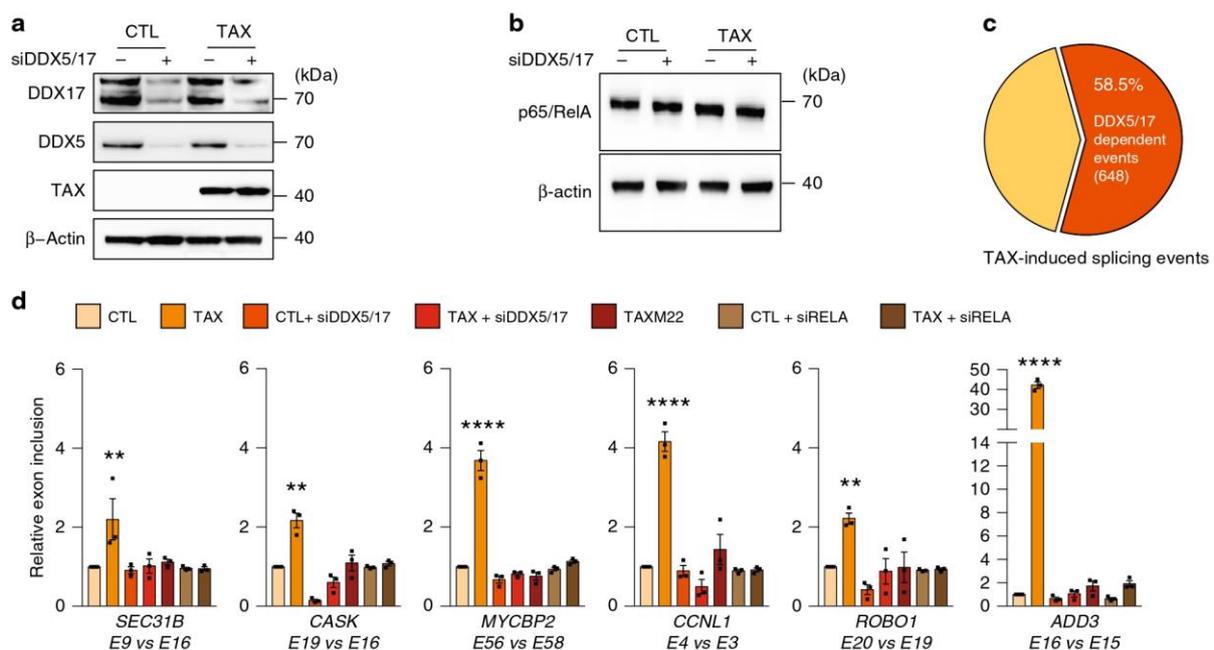


Fig. 3 DDX5/17 regulates Tax splicing targets in an NF-κB-dependent manner. **a** Western blot analysis of DDX5 and DDX17 expression in HEK cells expressing or not Tax and depleted or not of DDX5 and DDX17 by siRNA. **b** Western blot analysis of RELA and β-actin upon Tax expression and siRNA-DDX5/17 delivery. **c** Splicing events modified upon the depletion of DDX5/17 in Tax-positive HEK cells. The significant threshold was set to ≥ 2 in comparisons between TaxvsCTL and TaxvsDDX5/17vsCTL. For **b** and **c**, a representative image from three independent experiments is shown. **d** Validation of alternative splicing predictions of a set of Tax- and DDX5/17-regulated exons. TaxM22 and siRNA-mediated RELA depletion were used in order to assess the dependency of splicing events on NF-κB activation. Histograms represent the results of exon-specific quantitative RT-PCR measurements computed as a relative exon inclusion (alternatively spliced exon vs constitutive exon reflecting the total gene expression level). All genes but MYCBP2 were unmodified at the whole transcript level upon Tax expression (Supplementary Fig. 2c). Data are presented as the mean \pm SEM values from biological replicates. Each black square represents a biological replicate. Statistical significance was determined with two-way ANOVA followed by Fisher's LSD test (** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$). Exact p -values for Tax vs CTL: 0.0068 for SEC31B; 0.0084 for CASK; <0.0001 for MYCBP2; <0.0001 for CCNL1; 0.0063 for ROBO1; <0.0001 for ADD3. Source data are provided as a Source Data file.

binding functions (Supplementary Data 4 and Supplementary Fig. 3C). These data are reminiscent of PTM related to protein regions encoded by variable CD44 exons that also control the cell-adhesion properties of CD44 (Supplementary Fig. 3D). Accordingly, we observed that Tax-expressing HEK cells displayed switched cell-adhesion properties from hyaluronate- to type IV collagen-coated surfaces, which is in accordance with the substrate affinity of the CD44 v10 isoform³⁷ (Supplementary Fig. 3E).

RELA recruits DDX17 at the vicinity of genomic exons. The results described above prompted us to focus on CD44 as gene model to further examine the mechanisms underlying RELA and DDX17 splicing regulations upon Tax. CD44 is composed of 10 constitutive exons and 10 variable exons. The constitutive exons 1–5 and 15–20 encode the standard CD44 transcripts, while CD44 variants (CD44v) are produced by extensive splicing leading to alternative inclusion of variable exons 5a–14 also named v1–v10 (Fig. 4b)³⁸. As shown in Fig. 4a, the exon v10 inclusion rate is markedly influenced by Tax in a DDX5/17- and NF-κB activation-dependent manner. The importance of NF-κB in this process was further confirmed as the inactivation of NF-κB via the ectopic expression of the IκBα super repressor (IκBSR) abolished the effects of Tax on CD44 v10 inclusion (Supplementary Fig. 4A). Remarkably, in line with previous work suggesting that NF-κB directly regulates the CD44 promoter, we also noticed a slight reduction in CD44 expression in Tax-expressing cells knocked down for RELA (Supplementary Fig. 4B), thereby defining CD44

regulations as an appropriate situation to address whether or not RELA-dependent transcription and splicing are two interrelated processes.

Using quantitative ChIP (qChIP) analyses, we first observed that Tax expression led to recruit RELA not only to the CD44 promoter, but also to a genomic region spanning the alternative exon v10, but not a downstream constitutive exon (E16) (Fig. 4b, c, left panel). To assess whether RELA occupancies at the v10 exon and CD44 promoter are interrelated, a stable cell line was generated in which the κB site localized at -218 bp from the transcription start site (TSS) was deleted using a CRISPR-Cas9 approach. Positive clones (CD44ΔκB) were screened and sequenced to confirm the 40 bp deletion in the promoter region (Fig. 4b). As expected, Tax expression failed to promote RELA binding at the promoter in CD44ΔκB cells (Fig. 4c, right panel), coinciding with a decreased CD44 expression comparable to that observed upon RELA depletion (Supplementary Fig. 4B, C). Nevertheless, Tax still promoted RELA binding at the v10 region. Importantly, Tax expression induced v10 inclusion at a similar level in both CD44ΔκB and parental cells (Fig. 4d). These results suggested that Tax-mediated effect on exon v10 splicing could depend on RELA binding in the vicinity of the alternative v10 exon. Supporting this hypothesis, the analysis of publicly available RELA ChIP-seq datasets revealed that intragenic RELA peaks are significantly closer to alternative exons than to constitutive exons (Supplementary Fig. 4D). More particularly, alternative exons regulated by Tax, including those sensitive to DDX5/17 depletion, were identified in genomic regions enriched in NF-κB-binding sites compared to alternative exons non-regulated by Tax (Fig. 4e).

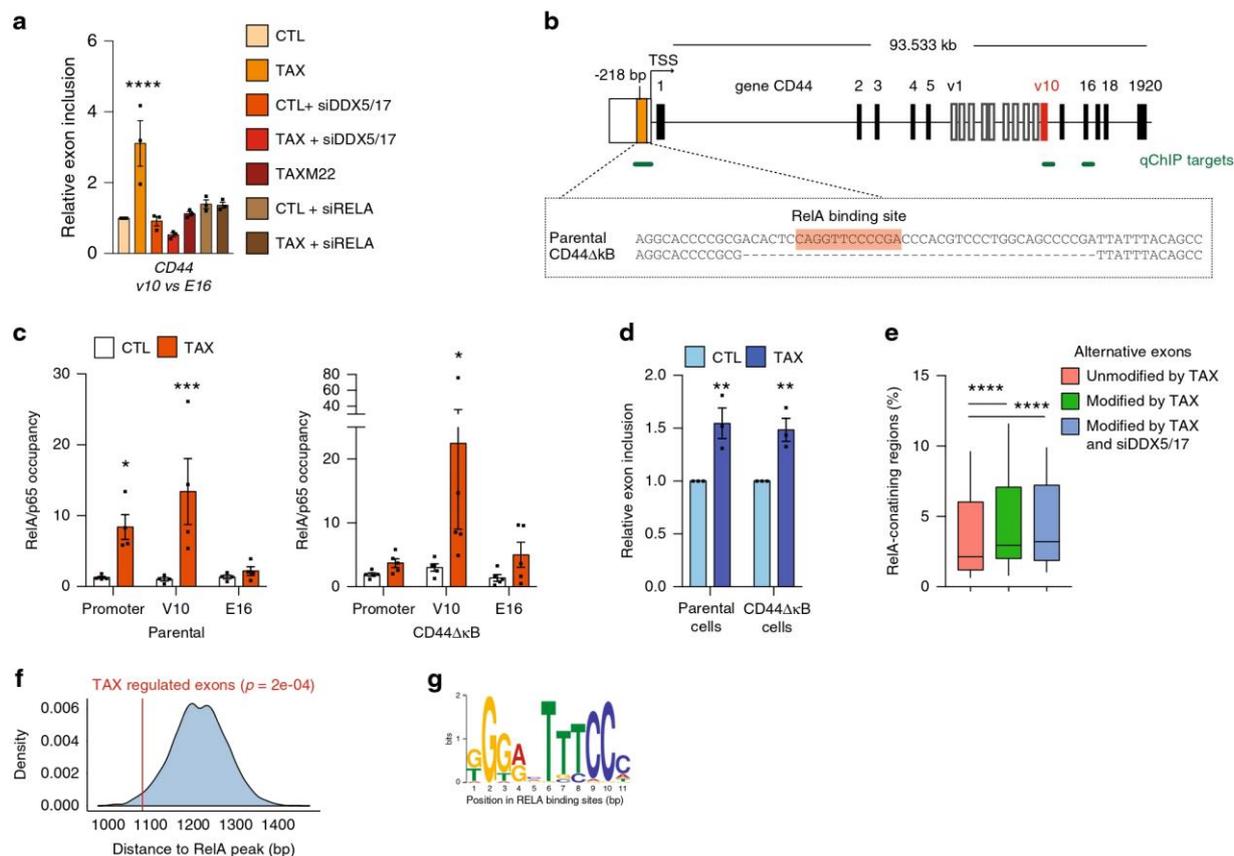


Fig. 4 Intragenic RELA-binding sites associate with alternative splicing events. **a** Alternative splicing modifications of the *CD44* exon v10 upon in HEK cells expressing or not Tax and knocked down or not for RELA or DDX5/17 expressions. TaxM22 and siRNA-mediated RELA depletion were used to assess the dependency of splicing events after NF- κ B activation. Histograms represent the results of exon-specific quantitative RT-PCR measurements computed as a relative exon inclusion (alternatively spliced exon vs constitutive exon reflecting the total gene expression level). **b** Schematic representation of the human *CD44* gene. Black and white boxes represent constitutive and alternative exons, respectively, as previously annotated (50). The orange box represents the kB site localized at -218 bp from the TSS and the 40 bp fragment deleted by CRISPR/Cas9 in *CD44ΔkB* HEK cells. **c** qChIP analysis of RELA occupancy across the promoter, the exon v10, and the constitutive exon E16 of *CD44*. RELA enrichment is expressed as the fold-increase in signal relative to the background signal obtained using a control IgG. **d** Relative exon inclusion of *CD44* exon v10 was quantified by qRT-PCR in parental cells and its *CD44ΔkB* counterparts. **e** Distribution of alternative exons that are regulated or not by Tax and DDX5/17 in RELA-enriched intragenic regions. The analysis was restricted to alternative exons expressed in HEK cells and regulated or not by Tax. Boxes extend from the 25th to 75th percentiles, the mid line represents the median and the whiskers indicate the maximum and the minimum values. **f** Bootstrapped distribution of median distance between intragenic RELA peaks and either Tax-regulated exons (red line, 1079 bp) or randomly chosen exons (10^5 repetitions) (blue). p -values were determined by sample t -test. **g** Consensus de novo motif for RELA-binding sites <1 kb of Tax-regulated exons. Data are presented as the mean \pm SEM values from biological replicates. Each black square represents a biological replicate. Statistical significance was determined with two-way ANOVA followed by Fisher's LSD test ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$) (**a**, **c**, and **d**) and two-tailed Wilcoxon test (**e**, $****p < 0.0001$). Exact p -values for Tax vs CTL: **a** < 0.0001 , **c** parental, promoter: 0.0248 and V10: 0.0005; *CD44ΔkB*, V10: 0.021; **d** parental: 0.0028; *CD44ΔkB*: 0.0054. Source data are provided as a Source Data file.

Accordingly, we observed that RELA-binding sites are often found in the vicinity of Tax-regulated exons (Fig. 4f). Using the MEME-ChIP suite as motif discovery algorithm³⁹, we uncovered that RELA-binding sites located within the closest range (<1 kb) of Tax-regulated exons coincided with the typical NF- κ B consensus motif (Fig. 4g). Furthermore, this subset of Tax-regulated exons displayed weak 3' and 5' splice sites together with significant low minimum free energy (MFE) value (Supplementary Fig. 4E) and high GC-content (Supplementary Fig. 4F) when compared to all human exons. This emphasizes the high potential of these splice sites to form stable secondary RNA structures, a typical feature of exons regulated by RNA helicases DDX5/17³³.

Taken together, these data define a signature of splicing target specificity for RELA, and they suggest that RELA and DDX17 might control together the inclusion of a subset of Tax-regulated exons. We therefore investigated the genomic occupancy of some

target exons by RELA and DDX17 by qChIP analysis of cells expressing or not Tax. For all tested genes (*CD44*, *SEC31B*, *CASK*, and *MYCBP2*), both RELA and DDX17 bound specifically the regulated alternative exon in a Tax-dependent manner, compared to a downstream constitutive exon (Fig. 5a and Supplementary 4g). Remarkably, the knockdown of RELA expression by siRNA affected DDX17 chromatin occupancy on Tax-regulated exons (Fig. 5a), despite its slight positive impact on DDX17 expression (Supplementary Fig. 2d). We further validated the RELA/DDX17-dependent alternative splicing events in C91PL and ATL2 cells compared to the non-infected MOLT4 cells (Fig. 5c). The magnitude of splicing regulation was higher in ATL2 than in C91PL cells, and appeared to positively correlate to a higher expression level of both DDX17 and RELA, and a high level of constitutive NF- κ B activation, as reflected by IL8 expression (Fig. 5b). As formerly observed in HEK cells expressing Tax, these

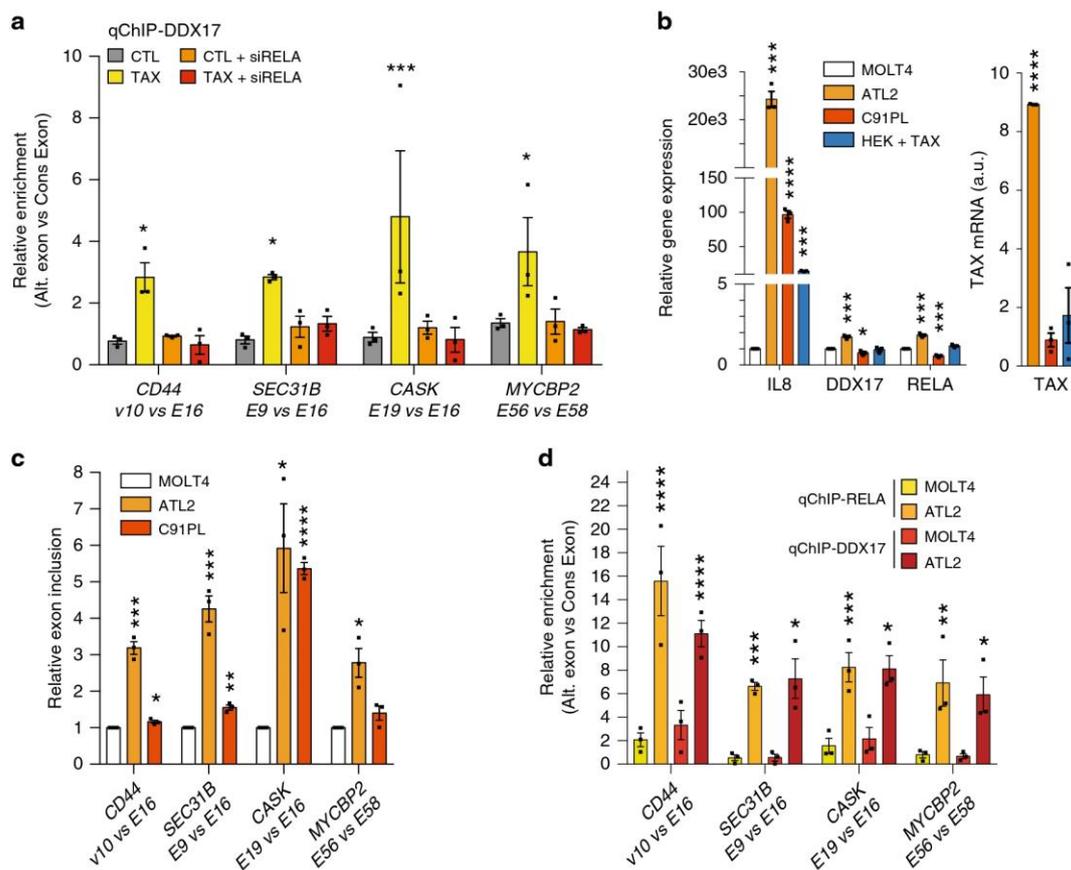


Fig. 5 RELA locally recruits DDX17 at the genomic target exons, leading to splicing regulation. **a** Relative occupancy of DDX17 at Tax-regulated genomic exons in cells that did or did not express Tax and knocked down or not with RELA-specific siRNA. **b** Relative gene expression levels of *IL8*, *DDX17*, and *RELA* in ATL2, C91PL, or HEK cells transiently transfected by pSG5M-Tax as compared to uninfected MOLT4 cells. Tax mRNAs levels are expressed in arbitrary units (a.u.). **c** Alternative splicing modifications in the HTLV-1-infected cell lines ATL2 and C91PL as compared to those in the uninfected cell line MOLT4. Relative exon inclusion was measured as described in Fig. 3. **d** Relative RELA and DDX17 occupancies of regulated exons in ATL2 cells as compared to MOLT4 cells. Each occupancy of regulated exon by RELA and DDX17 is represented as a fold of that measured at its neighboring constitutive exon. Source data are provided as a Source Data file. Data are presented as the mean \pm SEM values from biological replicates. Each black square represents a biological replicate. Statistical significance was determined with two-way ANOVA followed by Fisher's LSD test (**a, d**) and two-tailed unpaired t-test (**b, c**) ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$). Exact *p*-values for Tax vs CTL (**a**): 0.0312 (*CD44*), 0.0337 (*SEC31B*), 0.0002 (*CASK*), 0.0171 (*MYCBP2*). Exact *p*-values for ATL2- and C91PL vs MOLT4 (**b**): 0.0001, 0.0004, 0.0003 and <0.0001 , 0.0365, 0.0007 corresponding to *IL8*, *DDX17*, and *RELA*, respectively. For Tax expression, $p = 0.0016$ HEK + Tax vs ATL2. Exact *p*-values for ATL2- and C91PL vs MOLT4 (**c**): 0.0002, 0.0008, 0.0153, 0.0105 and 0.019, 0.0013, <0.0001 , 0.11 for *CD44*, *SEC31B*, *CASK*, and *MYCBP2* respectively. Exact *p*-values (**d**) for ATL2 vs MOLT4: qChIP-RELA <0.0001 (*CD44*), 0.0003 (*SEC31B*), 0.0004 (*CASK*), 0.0029 (*MYCBP2*); qChIP-DDX17 0.0004 (*CD44*), 0.0211 (*SEC31B*), 0.0207 (*CASK*), 0.0184 (*MYCBP2*). Source data are provided as a Source Data file.

splicing events in HTLV-1-infected cells coincided with a high and significant increase in chromatin occupancy of both RELA and DDX17 at the vicinity of regulated exons (Fig. 5d). These data reveal that the RELA:DDX17 axis in the splicing regulatory network pertains to both HEK293T and CD4⁺-infected cells expressing Tax.

Causal relationship linking RELA and DDX17 to splicing regulation. To more confidently assess the causative relationship linking RELA and DDX17 to alternative splicing, we experimentally tethered DDX17 or RELA to the *CD44* v10 exon locus using modified TALE (Transcription-Activator-Like-Effector)⁴⁰. For this, we designed a TALE domain that recognizes specifically an exonic 20 bp DNA sequence located 12 bp upstream from the 5' splice site (SS) of exon v10. This TALE domain was fused to either RELA or DDX17 proteins. We also used an additional construct consisting in the same TALE fused to GFP to rule out

non-specific effects resulting from the DNA binding of the TALE. After transient transfection of each TALE construct into 293T-LTR-GFP cells (Fig. 6a), we monitored the relative effects on the recruitment of endogenous RELA and DDX17 as well as on exon v10 splicing; all results were normalized and expressed as relative effects compared to the TALE-GFP (Fig. 6a–c). As expected, and validating our approach, TALE-RELA tethering to the exon v10 led to a significant chromatin recruitment of RELA to its target site, and not to the downstream exon E16 used as control (Fig. 6a, left panel). Further, a significant and specific DDX17 enrichment was observed at exon v10 after expression of TALE-RELA as compared to TALE-GFP (Fig. 6a, left panel), indicating that tethering RELA to exon v10 induced local recruitment of the endogenous DDX17 protein. At the RNA level, this TALE-RELA-mediated recruitment of DDX17 coincided with a significant increase in the exon v10 inclusion rate (Fig. 6a, right panel).

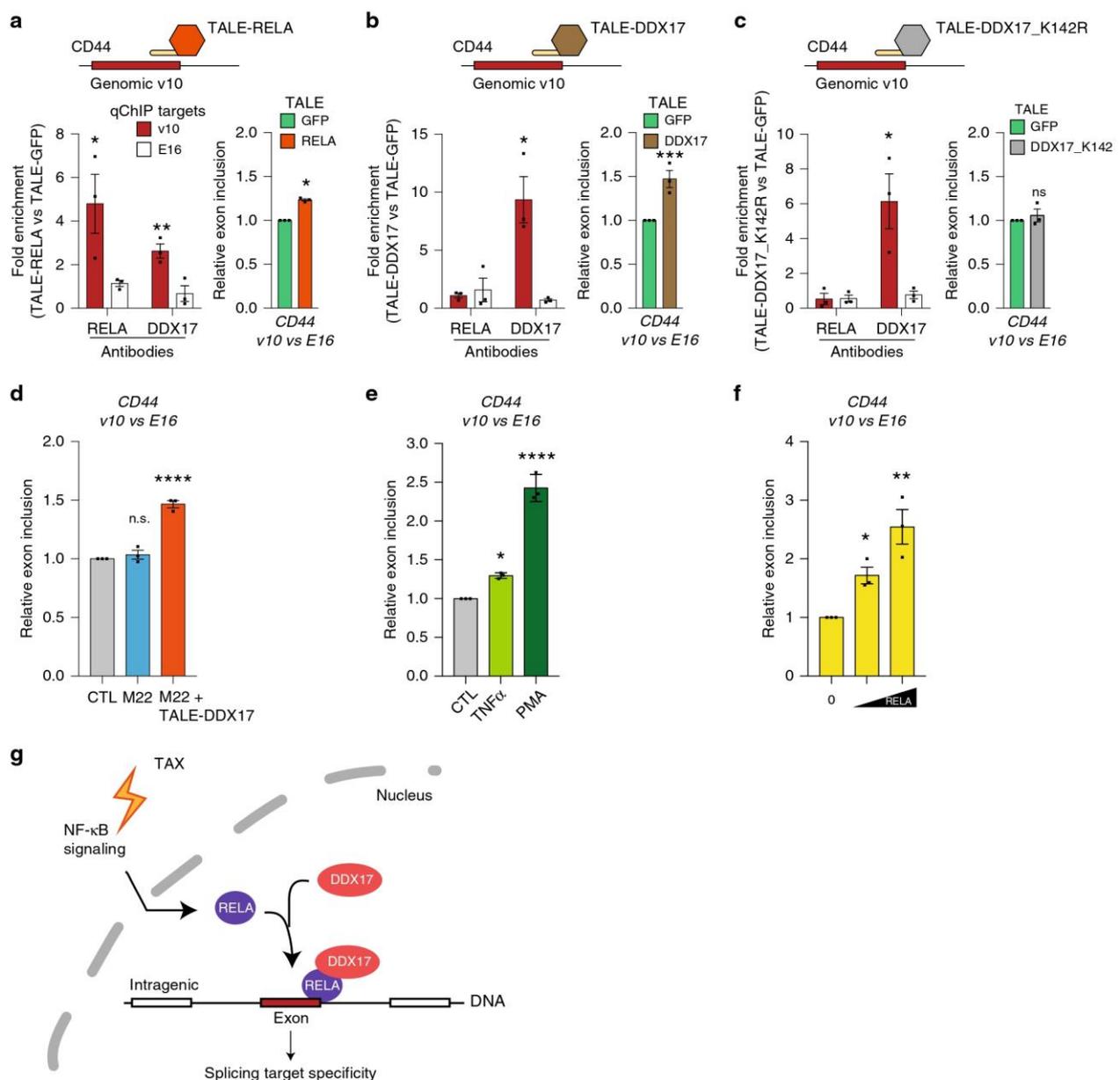


Fig. 6 Chromatin relationship between RELA and DDX17. **a–c** Chromatin and splicing regulation upon TALE-mediated tethering of RELA and DDX17. The TALE domain was designed to bind the v10 exon of *CD44* and fused to either GFP (**a–c**), RELA (**a**), DDX17, (**b**), or a helicase-deficient mutant DDX17_K142R (**c**). The effect of TALEs on RELA and DDX17 chromatin enrichment (left panels) and on the relative v10 exon inclusion (right panels) was monitored in HEK cells by qChIP and qRT-PCR, respectively. Results were normalized to measures obtained in TALE-GFP assays. (**d**) Relative exon inclusion rate of exon v10 of *CD44* in HEK cells expressing or not the Tax mutant M22 and the TALE-DDX17 construct. **e** Relative exon inclusion rate of exon v10 of *CD44* in HEK cells exposed to TNF α and PMA. **f** Relative exon inclusion rate of exon v10 of *CD44* in HEK cells transiently transfected with increasing amounts of RELA expression vector (200 and 500 ng). **g** Model of NF- κ B-dependent regulation of alternative splicing. Upon NF- κ B activation, DNA-bound RELA proteins act as chromatin anchors for DDX17, which then provides splicing target specificity due to its RNA helicase activity. Data are presented as the mean \pm SEM values from biological replicates. Each black square represents a biological replicate. Statistical significance was determined with two-tailed unpaired *t*-test (qChIP in **a–c**) and one-way ANOVA followed by Fisher's LSD test (relative exon inclusion (REI) in **a–f**) (**p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001). In **a–c**, exact *p*-values for TALE-RELA vs TALE-GFP on V10: 0.049 (qChIP RELA), 0.0079 (qChIP DDX17), 0.0276 (REI). Exact *p*-values for TALE-DDX17 vs TALE-GFP on V10: 0.0139 (qChIP DDX17), 0.0276 (REI). Exact *p*-values for TALE-DDX17_K142R vs TALE-GFP on V10: 0.0312 (qChIP DDX17). In **d–f**, exact *p*-values are <0.0001 (M22 + TALE-DDX17 (**d**)), 0.0125 (TNF α (**e**)), <0.0001 (PMA (**e**)), 0.0369 (0.2 μ g (**f**)), 0.0012 (0.5 μ g (**f**)). Source data are provided as a Source Data file.

We next investigated whether DDX17 tethering could result in similar effects. Quantitative ChIP analysis demonstrated that DDX17 was properly tethered to exon v10 when fused to the designed TALE, but TALE-DDX17 had no effect on RELA

recruitment (Fig. 6b, left panel). This was expected since the formation of RELA:DDX17 complexes only occurs upon NF- κ B activation (Fig. 2). Nevertheless, TALE-DDX17-expressing cells exhibited a reproducible and significant increase in v10 inclusion

(Fig. 6b, right panel), indicating that chromatin-bound DDX17 alone (e.g., without RELA) can modulate splicing efficiency. Of note, the levels of v10 exon inclusion induced by TALE-RELA and TALE-DDX17 were comparable to that measured in cells transiently transfected with a Tax expression vector (Fig. 4d and Supplementary Fig. 4A). Although less quantitative, a nested RT-PCR assay clearly confirmed these results (Supplementary Fig. 5b). Strikingly, however, the mutant TALE-DDX17_K142R (a DDX17 helicase mutant^{33,41–43}) failed to increase the levels of exon v10 inclusion, despite a clear chromatin enrichment of the DDX17 mutant (Fig. 6c and Supplementary Fig. 5b). Collectively, these results demonstrate that RELA binding in the vicinity of genomic exons recruits the RNA helicase DDX17, which positively regulates the inclusion rate of the target exon due to its RNA helicase activity. Of note, this causal relationship between RELA, DDX17, and splicing regulation was observed irrespectively of the expression of Tax. Indeed, TALE-DDX17 rescued the inclusion of exon v10 in cells expressing the NF- κ B defective mutant M22 (Fig. 6d). In addition, Tax-independent activation of NF- κ B in HEK cells (using either TNF α or Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)) mimicked the effects of Tax on splicing regulation (Fig. 6e). More importantly, ectopic RELA expression had similar effects, in a dose-dependent manner (Fig. 6f). Further, we observed a dynamic induction of RELA:DDX17 interactions after RELA expression or PMA activation (Supplementary Fig. 5c), but not after TNF α activation, likely due to a lower level of RELA nuclear translocation in this condition (Supplementary Fig. 5d). Collectively, these results suggest that the mechanistic role of Tax is to promote DDX17-dependent splicing regulation by promoting constitutive activation of NF- κ B pathway.

Discussion

Since the finding of splicing dysregulations in HTLV-1-infected individuals^{4,24,27,44}, deciphering how HTLV-1 interferes with the splicing regulatory network has become a new challenging issue for improving our knowledge of HTLV-1 infection and its associated diseases. Here, we provide the molecular evidence that upon Tax-induced NF- κ B activation, RELA directly regulates splicing by binding to gene bodies at the vicinity of GC-rich exons and by locally recruiting the splicing factor DDX17, which regulates splicing via its RNA helicase activity.

Our results demonstrate that Tax deeply impacts alternative splicing independently from its effects on transcription. In addition, Tax-regulated exons were found in transcripts enriched in functional pathways that are distinct from those enriched by Tax transcriptional targets, suggesting that splicing reprogramming may constitute an additional layer of regulation by which HTLV-1 modifies the host cell phenotype. Supporting this, we also showed that the Tax-induced splicing variant *CD44 v10*, which was previously identified in circulating blood of HAM/TSP patients²⁷ and confirmed here *ex vivo* in infected CD4⁺ T-cell clones, contributes to modulating cell-adhesion affinity *in vitro*. GO analyses of Tax splicing targets also identified the GO terms phosphatidylinositol signaling system and inositol phosphate metabolism, two processes that are particularly connected to NF- κ B signaling and that have critical roles in oncogenesis and disease progression of malignant diseases, including ATLL^{45,46}. Furthermore, exon ontology analysis predicted that critical changes at the protein level would affect the experimentally validated protein structure and post-translational modifications, which together are likely to affect the connectivity network between proteins, and subsequently contribute to modifying cell phenotypes. This suggests that, beside its transcriptional effects, splicing regulatory functions of Tax might contribute to its oncogenic properties. Indeed, a large number of Tax-regulated

exons could be observed in ATLL samples, which rarely express Tax but typically exhibit NF- κ B addiction for survival and proliferation^{24,26,47}.

At the molecular level, we showed that increased chromatin occupancy of RELA upon Tax expression is not restricted to promoter regions but also occurs in the vicinity of exons that are regulated at the splicing level (Figs. 4 and 5). Exons regulated by Tax, especially those localized within 1 kb of intragenic RELA-binding sites, are characterized by a high GC-content, a typical feature of exons regulated by the DDX5 and DDX17 RNA helicases³³ (Supplementary Fig. 4E, F). Accordingly, we found that a majority of Tax-regulated exons depend on the expression of these proteins (Fig. 3c). A local chromatin recruitment of DDX17 and RELA was validated on several Tax-regulated exons (Figs. 4 and 5). More importantly, we identified a confident causal relationship between exon tethering of RELA, local recruitment to chromatin of DDX17, and subsequent splicing regulation via DDX17 RNA helicase activity (Fig. 6). This catalytic activity of DDX17 was strictly required for its splicing regulatory functions (Fig. 6), as previously reported³³. Indeed, the RNA helicase activities of DDX5 and DDX17 have been implicated in resolving RNA structures, facilitating the recognition of the 5' splice site (which can be embedded in secondary structures), and exposing RNA-binding motifs to additional splicing regulators^{33,42,48–50}. However, even though some RNA-binding specificity has been reported for DDX17^{51,52}, these RNA helicases are devoid of a proper RNA-binding domain, and their activity in splicing likely depends on additional factors that are able to provide target specificity. Here, we suggest that RELA is a DDX17 recruiter, acting as a chromatin anchor for DDX17 in the vicinity of exons dynamically selected upon NF- κ B activation. While performing complementary experiments, we notified that siRNA-DDX5/17 affected the RELA chromatin occupancy of both exons and promoters regulated by Tax (Supplementary Fig. 6). This is reminiscent of recent report indicating that DDX5/17 depletion affects interactions between the transcription factor REST and DNA, defining DDX5/17 as REST transcriptional coregulators²². Altogether, these data indicate that the RELA–DDX17 chromatin interplay relies on complex mechanisms that deserve future investigations.

The target specificity of NF- κ B factors remains a complex question. It has been estimated that ~30–50% of genomic RELA-binding sites do not harbor a typical NF- κ B site, and only a minority of RELA-binding events have been associated with transcriptional change^{16–19}, thereby indicating that neither having a consensus site nor significant NF- κ B occupancy are sufficient criteria for defining RELA's target specificity. Here, we identified a typical NF- κ B consensus motif at RELA-binding loci that are close to alternatively spliced exons but we also uncovered that weak splice sites, low MFE, and significant GC-content bias of exons likely contribute to RELA's target specificity. Because low MFE and high GC-content confer a high propensity to form stable RNA secondary structures, the recognition and the selection of such GC-rich exons with weak splice sites by the splicing machinery typically depend on the RNA helicases DDX5/17³³. Based on these observations, we propose a model of RELA-induced splicing target specificity (Fig. 6g), whereby, upon NF- κ B activation, RELA binds to intragenic-binding consensus motifs and locally recruits DDX17. When the RELA:DDX17 complex is located in close proximity of GC-rich exons flanked by weak splice sites, DDX17 can increase their inclusion rate by unwinding GC-rich secondary structures of the nascent RNA transcript, and potentially also by unmasking binding motifs for additional splicing regulators. Of note, although Tax was identified in both RELA- and DDX17-containing complexes, we demonstrated that Tax-independent NF- κ B activation is sufficient

for promoting interactions between RELA and DDX17 and the corresponding splicing regulation. Without ruling out possible additional effects of Tax on the RELA:DDX17 complex, such as favoring dimer formation (as already proposed for NF- κ B dimers⁴⁵), these data indicate that Tax exacerbates a dynamic and physiologic process involving RELA in splicing target specificity.

In conclusion, our results provide conceptual advances for understanding how cell signaling pathways may drive target specificity in splicing by dynamically recruiting cognate transcription factors at the vicinity of target exons that act as chromatin anchor for splicing regulators. In the context of NF- κ B signaling, such a mechanism likely has a significant impact on cell fate determination and disease development associated with HTLV-1 infection and other situations linked to chronic NF- κ B activation, such as human inflammatory diseases and cancer.

Methods

Cell culture and transfections. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by Ficoll separation of whole blood from HTLV-1-infected individuals in the context of a Biomedical Research Program approved by the Committee for the Protection of Persons, Ile-de-France II, Paris (2012-10-04 SC). All individuals gave informed consent. PBMCs were cloned by limiting dilution in RPMI 1640 supplemented with penicillin and streptomycin, sodium pyruvate, non-essential amino acids, 2-mercaptoethanol, 10% filtered human AB serum, 100 U/ml recombinant IL-2 (Chiron Corporation), and 75 μ M HTLV-1 integrase inhibitor L-731,988. Clones were phenotyped by flow cytometry using antibodies against CD4 (Dako-Cytomation) and isotype-matched controls on a FACScan system using CellQuest software (Becton Dickinson). HTLV-1-positive clones were assessed by PCR. The human embryonic kidney 293T-LTR-GFP cells⁵³, which contain an integrated GFP reporter gene under the control of the Tax-responsive HTLV-1 LTR, were cultured in DMEM + glutamax medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 1% penicillin/streptomycin. This cell line was used to measure transfection efficiency in Tax and TaxM22 conditions. In standard transfection experiments, siRNAs (Supplementary Data 5) and/or expression vectors (pSG5M empty, pSG5M-Tax-WT, pSG5M-M22) were mixed with JetPrime (Polyplus Transfection) following the manufacturer's instructions, and cells were harvested 48 h after transfection. TNF α exposure consisted in treating cells with 10 ng/ml of TNF α for 24 h. HTLV-1-chronically infected lymphocytes ATL2 (kind gift from Masao Matsuoka (Kyoto University, Kyoto, Japan) and Roberto Accolla (Università degli Studi dell'Insubria, Varese, Italia)), C91PL (kind gift from Cynthia Pise-Masison (National Cancer Institute, NIH, Bethesda, MD)) and Renaud Mahieux (Center for Research in Infectious Diseases, Lyon, France) and non-infected MOLT4 cells (CRL-1582, ATCC) were grown in RPMI 1640 medium (Gibco, Life Technologies) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 20 IU/ml penicillin, 20 μ g/ml streptomycin, and 25 mM HEPES.

Cell-adhesion assays. Culture plates were prepared by coating with 40 μ g/ml hyaluronic acid from human umbilical cord (Sigma) and 25 μ g/ml type IV collagen from human placenta (Sigma) overnight at 4 °C. Non-specific binding sites were blocked for 1 h with PBS containing 1 mg/ml heat-denatured BSA. After three washes with 1 \times PBS, 5 \times 10⁴ cells transiently transfected with pSG5M-Tax vector or its empty control were added at 48-h post-transfection. Cell adhesion was allowed to proceed for 20 min at room temperature. Non-adherent cells were removed with three washes with 1 \times PBS, and adherent cells were quantified. All experiments were done in triplicate.

Cell fractionation. HEK cells were resuspended in A buffer complemented with DTT, PhosSTOP[™] and protease inhibitor cocktail (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 1 \times PhosSTOP[™], 1 \times protease inhibitor cocktail) then incubated on ice for 10 min. The lysates were then centrifuged at 4 °C for 3 min at 1000 \times g. Supernatants were next resuspended in A* buffer complemented with DTT, PhosSTOP[™] and protease inhibitor cocktail (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2% IGEPAL[®] CA-630, 0.5 mM DTT, 1 \times PhosSTOP[™], 1 \times protease inhibitor cocktail) then incubated on ice for 2 min. Lysates were then centrifuged at 4 °C for 1 min at 1000 \times g and supernatant were kept as cytoplasmic extract. Pellets were extensively washed with A* buffer and centrifuged, then resuspended in Lysis Buffer complemented with DTT, PhosSTOP[™] and protease inhibitor cocktail (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 400 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 1% IGEPAL[®] CA-630, 1 mM DTT, 1 \times PhosSTOP[™], 1 \times cOmplete[™] EDTA free protease inhibitor cocktail (Roche)) and incubated 30 min on ice before sonication using Diagenode Bioruptor[®] Plus (6 cycles 30"/30", high power). Nuclei lysates were centrifuged at 4 °C for 10 min at 16,000 \times g and the supernatant were kept as nuclear extracts.

Western blot. Cells were washed twice with 1 \times PBS and total proteins were directly extracted in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 1 \times PhosSTOP[™], 1 \times cOmplete[™] EDTA free protease inhibitor cocktail (Roche)). A total of 20 μ g of whole-cell proteins were separated on a NuPAGE[™] 4–12% Bis-Tris Protein Gels and transferred on a nitrocellulose membrane using Trans-Blot[®] Turbo[™] Blotting System. Membranes were saturated with 5% milk and incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies against RELA (sc-109, Santa Cruz, 1:1000), Tax (1A3, Covalab, 1:500), DDX17 (ab24601, Abcam, 1:2000), DDX5 (ab10261, Abcam, 1:2000), actin (sc-1616, Santa Cruz, 1:1000), GAPDH (sc-32233, Santa Cruz, 1:10,000), H3 (ab1791, Abcam, 1:10,000), V5 (AB3792, Millipore, 1:1000), and α -Tubulin (sc-32293, Santa Cruz, 1:2000). After three washes with 1 \times TBS-Tween, membranes were incubated 1 h at room temperature with the secondary antibodies conjugated with the HRP enzyme and washed three times as above. Finally, the HRP substrate (GE Healthcare or Immobilon Forte (Millipore)) was applied to the membrane for 5 min, and the chemiluminescence was read on Chemidoc (BioRad).

Co-immunoprecipitation. Cells were harvested in IP lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 10% glycerol). Extracts were incubated overnight with 5 μ g of antibodies recognizing RELA (C20 sc-372, Santa Cruz), Tax (1A3, Covalab), and DDX17 (ProteinTech) in the presence of 30 μ l Dynabeads[®] Protein A/G (ThermoFisher). Isotype IgG rabbit (Invitrogen) or mouse (Santa Cruz) was also used as negative control. The immunoprecipitated complexes were washed three times with IP lysis buffer.

Chromatin immunoprecipitation. A total of 10⁷ cells were crosslinked with 1% formaldehyde for 10 min at room temperature. Crosslinking was quenched by addition of 0.125 M glycine. Nuclei were isolated by sonication using a Covaris S220 (2 min, Peak Power: 75; Duty Factor: 2; Cycles/burst: 200), pelleted by centrifugation at 1000 \times g for 5 min at 4 °C, washed once with FL buffer (5 mM HEPES pH 8.0, 85 mM KCl, 0.5% NP-40) and resuspended in 1 ml shearing buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 2 mM EDTA, 0.1% SDS). Chromatin was sheared in order to obtain fragments ranging from 200 to 800 bp using Covaris S220 (20 min, Peak Power: 140; Duty Factor: 5; Cycles/burst: 200). Chromatin was next immunoprecipitated overnight at 4 °C with 5 μ g of antibodies, of anti-RELA (C20 sc-372, Santa Cruz), anti-DDX17 (19910-1-AP, ProteinTech), or anti-V5 (AB3792, Millipore), and 30 μ l Dynabeads[®] Protein A/G (ThermoFisher) were added. Complexes were washed with 5 different buffers: Wash 1 (1% Triton, 0.1% NaDOC, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8), Wash 2 (1% NP-40, 1% NaDOC, 150 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8), Wash 3 (0.5% Triton, 0.1% NaDOC, 500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8), Wash 4 (0.5% NP-40, 0.5% NaDOC, 250 mM LiCl, 20 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA), and Wash 5 (0.1% NP-40, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA). The immunoprecipitated chromatin was purified by phenol-chloroform extraction, and quantitative PCR was performed using Rotor-Gene 3000 cyclor (Corbett) or LightCycler 480 II (Roche, Mannheim, Germany). Values were expressed relative to the signal obtained for the immunoprecipitation with control IgG. Primers used for ChIP experiments were designed for exon/intron junction (Supplementary Data 5). For TALE ChIP experiments, DDX17 and RelA enrichment were normalized to the signal observed with V5 antibody corresponding to TALE recruitment. The TALE-GFP condition was used as control and set to 1. Note that in TALE assays qChIP experiments and exon-specific RT-qPCR were carried out at 24-h post-transfection.

RNA extraction, PCR, and real-time quantitative PCR. Total RNAs were extracted using TRIzol (Invitrogen). RNAs (2.5 μ g) were retro-transcribed with Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit after treatment with dsDNase (Thermo Scientific) following the manufacturer's instructions. PCRs were performed using 7.5 ng of cDNAs with GoTaq polymerase (Promega, Madison, WI, USA). PCR products were separated by ethidium bromide-labeled agarose gel electrophoresis. Band intensity was quantified using the ImageLab software (BioRad). Quantitative PCR was then performed using 5 ng of cDNAs with SYBR[®] Premix Ex Taq TM II (Tli RNaseH Plus) on LightCycler 480 II. Relative levels of the target sequence were normalized to the 18 S or GAPDH gene expression (Δ Ct), and controls were set to 1 ($\Delta\Delta$ Ct). The inclusion rate of alternative exons was calculated as $2^{-\Delta\Delta$ Ct} (included exon)/ $2^{-\Delta\Delta$ Ct} (constitutive exon). Oligonucleotide sequences used are listed in Supplementary Data 5.

RNA-seq and bio-informatic analysis. RNA-seq analyses were performed with poly-A transcripts extracted from 293T-LTR-GFP cells transfected with pSG5M-Tax or pSG5M empty vectors and knocked down or not for DDX5-17. RNA-seq libraries were generated at Aros Applied Biotechnology (Aarhus, Denmark) using Stranded mRNA Sample Prep kit (Illumina) and sequenced using illumina HiSeq 2500 technology. Each sample had in average 6 \times 10⁷ of paired-end pairs of reads. RNA-seq data were analyzed using FaRLINE, a computational program dedicated to analyzing alternative splicing with FasterDB database^{23,54}. The gene expression level in each sample was calculated with HTSeq-count (v0.7.2)⁵⁵, and differential expression between conditions was computed with DESeq2 (v1.10.1) (abs(log2-FoldChange) \geq 0.4, $p \leq$ 0.05)⁵⁶. Tax expression in the RNA-seq dataset EGAS00001001296 was examined by Kallisto⁵⁷ using the nucleotide sequence of Tax/Rex sequence (coordinates 6951-8078) from NC_001436.1 as a reference.

Ontology analysis were performed using DAVID software for gene ontology and Exon Ontology v1.5.0³⁶.

In silico screening of NF- κ B-responsive elements in the *CD44* promoter sequence was carried out using the PROMO database (based on TRANSFAC v8.3)⁵⁸. The MEME-CHIP suite was used to discover the regulatory motifs in the NF- κ B ChIP-seq data⁵⁹.

To predict splice site strengths, scores were computed using MaxEntScan⁵⁹ for the sequence covering both sides of the splicing site (using 3 bases into the exon and 6 bases into the intron for 5' splice sites, and 20 bases into the intron and 3 bases into the exon for 3' splice sites). MaxEntScan uses Maximum Entropy Models (MEMs) to compute log-odds ratios. The minimum free energy was computed from exon-intron junction sequences using RNAfold from the ViennaRNA package (v 2.4.1; <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>). Analyzed sequences include 25 nucleotides within the intron and 25 nucleotides within the exon. The GC-content was calculated for exons defined in FasterDB⁵⁴.

The distribution of RELA peaks across alternative and constitutive exons, and the average distance between RELA peaks and Tax exon targets was measured using ChIP-seq datasets from GEO⁶⁰, ENCODE⁶¹, and CISTROME⁶² databases: from GEO GSE63736, GSM1239484, GSM486271, GSM486293, GSM486298, GSM486318, GSM847876, GSM847877, GSM2394419, GSM2394421, GSM2394423, from ENCODE ENCFF002CPA, ENCFF002CQB, ENCFF002CQJ, ENCFF002CQN, ENCFF580QGA, and from CISTROME 53597, 5388, 5389, 4940, 36310, 36316, 4971. For another GEO dataset, GSM2628088, reads were mapped to the hg19 build of the human genome with Bowtie⁶³ and RELA peaks were identified with Macs2⁶⁴. Alternative and Constitutive spliced exons were obtained from FasterDB⁵⁴. To focus on intragenic RELA peaks, we used the bedtools⁶⁵ intersect command to remove all intergenic RELA peaks and all RELA peaks localized on first exon (or at least at less than 500 nt distance) for each gene. A Perl script was specifically created to measure the distance between RELA peaks and Tax-regulated exons. Briefly, RELA peaks and exons are provided as BED files, and the script reports for each exon the distance in nucleotides of the nearest RELA peak. Closest peak distances from the 710 Tax-regulated exon-cassettes were compared to closest peak distances from 710 exons chosen by chance (10^5 runs). Using bootstrap analysis, the random samples were compared with the set of Tax-regulated exons, and the normal distribution of these counts was used in a sample *t*-test to assess the significance of the RELA-binding sites enrichment at the vicinity of Tax-regulated exons. $p = 2e - 4$ was considered significant.

TALE design and construct. The TALE constructs were obtained from ThermoFisher Scientific. TALEs were constructed using the Golden Gate Assembly method⁴⁰. The RVDs HD, NI, NG, and NN were chosen to specifically recognize the nucleotides C, A, T, and G, respectively. The TALE-targeting CD44 v10 sequence was 5'-TCCAACCTCTAATGTCAATC-3'. This TALE construct was fused to a V5 sequence and a SV40 NLS at its 5' end and cloned in the *NotI*-*HindIII* fragment of the pXJ41 backbone plasmid. DDX17-WT and DDX17-K142R cDNA were obtained by PCR from pCDNA3-HA-DDX17 and pCDNA3-HA-DDX17-K142R and were cloned in the *HindIII*-*BglII* fragment in the MCS downstream to the TALE sequence.

CRISPR design and construct. The sequence-specific sgRNA for site-specific interference of genomic targets were designed using CRISPRseek R package, and sequences were selected to minimize off-target effect⁶⁶. Two complementary oligonucleotides were annealed and cloned into *BbsI* site of pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (Addgene plasmid #62988)⁶⁷ for co-expression with Cas9 using 5U of T4 DNA ligase, T4 DNA ligase buffer (1 \times) (Roche). 293T-LTR-GFP cells were transfected with the mix of equimolar ratio of PX459-sgRNA1 and PX459-sgRNA2 (Supplementary Data 5). At 24-h post-transfection, the medium was changed, 1 μ g/ml puromycin was added for selection, and cells were cloned by serial dilution method.

Reporting summary. Further information on research design is available in the Nature Research Reporting Summary linked to this article.

Data availability

RNA-seq data produced in this study have been deposited on NCBI GEO under the accession number GSE123752. The source data underlying Figs. 1c, 2b–f, 3a, b, d, 4a, c–f, 5a–d, 6a–f, and Supplementary Figs. 1, 2b–d, 3a, b, e, 4a–g, 5a–d, and 6a–c are provided as a Source Data file. All data supporting the findings of this study are available within the article and its supplementary information files and from the corresponding author upon reasonable request. Source data are provided with this paper.

Code availability

FaRLINE is publicly available (<http://fasterdb.ens-lyon.fr/FARLINE.tgz>). Other custom codes used in this study are available from the corresponding author upon reasonable request. Source data are provided with this paper.

Received: 25 March 2019; Accepted: 26 May 2020;

Published online: 16 June 2020

References

- Uchiyama, T., Yodoi, J., Sagawa, K., Takatsuki, K. & Uchino, H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* **50**, 481–492 (1977).
- Gessain, A. et al. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* **2**, 407–410 (1985).
- Vernin, C. et al. HTLV-1 bZIP factor HBZ promotes cell proliferation and genetic instability by activating OncomiRs. *Cancer Res.* **74**, 6082–6093 (2014).
- Thenoz, M. et al. HTLV-1-infected CD4+ T-cells display alternative exon usages that culminate in adult T-cell leukemia. *Retrovirology* **11**, 119 (2014).
- Naftelberg, S., Schor, I. E., Ast, G. & Kornblihtt, A. R. Regulation of alternative splicing through coupling with transcription and chromatin structure. *Annu Rev. Biochem.* **84**, 165–198 (2015).
- Herzel, L., Ottoz, D. S. M., Alpert, T. & Neugebauer, K. M. Splicing and transcription touch base: co-transcriptional spliceosome assembly and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 637–650 (2017).
- Matsuoka, M. & Jeang, K. T. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 270–280 (2007).
- Sun, S. C. & Yamaoka, S. Activation of NF- κ B by HTLV-1 and implications for cell transformation. *Oncogene* **24**, 5952–5964 (2005).
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D. & Sun, S. C. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target Ther.* **2**, 17023 (2017).
- Hoesel, B. & Schmid, J. A. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* **12**, 86 (2013).
- Harhaj, E. W. & Giam, C. Z. NF- κ B signaling mechanisms in HTLV-1-induced adult T-cell leukemia/lymphoma. *FEBS J.* **285**, 3324–3336 (2018).
- Harhaj, E. W. & Sun, S. C. IKK γ serves as a docking subunit of the I κ B kinase (IKK) and mediates interaction of IKK with the human T-cell leukemia virus Tax protein. *J. Biol. Chem.* **274**, 22911–22914 (1999).
- Jin, D. Y., Giordano, V., Kibler, K. V., Nakano, H. & Jeang, K. T. Role of adapter function in oncoprotein-mediated activation of NF- κ B. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax interacts directly with I κ B kinase γ . *J. Biol. Chem.* **274**, 17402–17405 (1999).
- Lacoste, J., Lanoix, J., Pepin, N. & Hiscott, J. Interactions between HTLV-1 Tax and NF- κ B/Rel proteins in T cells. *Leukemia* **8**, S71–S76 (1994).
- Suzuki, T., Hirai, H. & Yoshida, M. Tax protein of HTLV-1 interacts with the Rel homology domain of NF- κ B p65 and c-Rel proteins bound to the NF- κ B binding site and activates transcription. *Oncogene* **9**, 3099–3105 (1994).
- Martone, R. et al. Distribution of NF- κ B-binding sites across human chromosome 22. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **100**, 12247–12252 (2003).
- Lim, C. A. et al. Genome-wide mapping of RELA(p65) binding identifies E2F1 as a transcriptional activator recruited by NF- κ B upon TLR4 activation. *Mol. Cell* **27**, 622–635 (2007).
- Zhao, B. et al. The NF- κ B genomic landscape in lymphoblastoid B cells. *Cell Rep.* **8**, 1595–1606 (2014).
- Xing, Y., Yang, Y., Zhou, F. & Wang, J. Characterization of genome-wide binding of NF- κ B in TNF α -stimulated HeLa cells. *Gene* **526**, 142–149 (2013).
- Kolovos, P. et al. Binding of nuclear factor κ B to noncanonical consensus sites reveals its multimodal role during the early inflammatory response. *Genome Res* **26**, 1478–1489 (2016).
- Farnham, P. J. Insights from genomic profiling of transcription factors. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 605–616 (2009).
- Lambert, M. P. et al. The RNA helicase DDX17 controls the transcriptional activity of REST and the expression of proneural microRNAs in neuronal differentiation. *Nucleic Acids Res.* **46**, 7686–7700 (2018).
- Benoit-Pilven, C. et al. Complementarity of assembly-first and mapping-first approaches for alternative splicing annotation and differential analysis from RNA-seq data. *Sci. Rep.* **8**, 4307 (2018).
- Kataoka, K. et al. Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nat. Genet.* **47**, 1304–1315 (2015).
- 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.* **2**, 87 (2017).
- Mahgoub, M. et al. 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. USA* **115**, E1269–E1278 (2018).
- Matsuoka, E. et al. CD44 splice variant involvement in the chronic inflammatory disease of the spinal cord: HAM/TSP. *J. Neuroimmunol.* **102**, 1–7 (2000).
- Gao, L. & Harhaj, E. W. HSP90 protects the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) tax oncoprotein from proteasomal degradation to support NF- κ B activation and HTLV-1 replication. *J. Virol.* **87**, 13640–13654 (2013).
- Robek, M. D. & Ratner, L. Immortalization of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type 1 Tax mutants expressed in a functional molecular clone. *J. Virol.* **73**, 4856–4865 (1999).

30. Harhaj, E. W., Good, L., Xiao, G. & Sun, S. C. Gene expression profiles in HTLV-I-immortalized T cells: deregulated expression of genes involved in apoptosis regulation. *Oncogene* **18**, 1341–1349 (1999).
31. Smith, M. R. & Greene, W. C. Identification of HTLV-I tax trans-activator mutants exhibiting novel transcriptional phenotypes. *Genes Dev.* **4**, 1875–1885 (1990).
32. Xiao, G., Harhaj, E. W. & Sun, S. C. Domain-specific interaction with the I kappa B kinase (IKK) regulatory subunit IKK gamma is an essential step in tax-mediated activation of IKK. *J. Biol. Chem.* **275**, 34060–34067 (2000).
33. Dardenne, E. et al. RNA helicases DDX5 and DDX17 dynamically orchestrate transcription, miRNA, and splicing programs in cell differentiation. *Cell Rep.* **7**, 1900–1913 (2014).
34. Geissler, V., Altmeyer, S., Stein, B., Uhlmann-Schiffler, H. & Stahl, H. The RNA helicase Ddx5/p68 binds to hUpf3 and enhances NMD of Ddx17/p72 and Smg5 mRNA. *Nucleic Acids Res.* **41**, 7875–7888 (2013).
35. Mizuguchi, M. et al. Induction of cell death in growing human T-cells and cell survival in resting cells in response to the human T-cell leukemia virus type 1 Tax. *PLoS ONE* **11**, e0148217 (2016).
36. Tranchevent, L. C. et al. Identification of protein features encoded by alternative exons using Exon ontology. *Genome Res.* **27**, 1087–1097 (2017).
37. Weimann, T. K., Wagner, C., Goos, M. & Wagner, S. N. CD44 variant isoform v10 is expressed on tumor-infiltrating lymphocytes and mediates hyaluronan-independent heterotypic cell-cell adhesion to melanoma cells. *Exp. Dermatol.* **12**, 204–212 (2003).
38. Ponta, H., Sherman, L. & Herrlich, P. A. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 33–45 (2003).
39. Bailey, T. L. et al. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res.* **37**, W202–W208 (2009).
40. Cermak, T. et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Res.* **39**, e82 (2011).
41. Laurent, F. X. et al. New function for the RNA helicase p68/DDX5 as a modifier of MBNL1 activity on expanded CUG repeats. *Nucleic Acids Res.* **40**, 3159–3171 (2012).
42. Kar, A. et al. RNA helicase p68 (DDX5) regulates tau exon 10 splicing by modulating a stem-loop structure at the 5' splice site. *Mol. Cell Biol.* **31**, 1812–1821 (2011).
43. Dardenne, E. et al. Splicing switch of an epigenetic regulator by RNA helicases promotes tumor-cell invasiveness. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 1139–1146 (2012).
44. Rosewick, N. et al. Cis-perturbation of cancer drivers by the HTLV-1/BLV proviruses is an early determinant of leukemogenesis. *Nat. Commun.* **8**, 15264 (2017).
45. Nakahata, S. et al. Loss of NDRG2 expression activates PI3K-AKT signalling via PTEN phosphorylation in ATLL and other cancers. *Nat. Commun.* **5**, 3393 (2014).
46. Bai, D., Ueno, L. & Vogt, P. K. Akt-mediated regulation of NFkappaB and the essentialness of NFkappaB for the oncogenicity of PI3K and Akt. *Int J. Cancer* **125**, 2863–2870 (2009).
47. Yamagishi, M. et al. Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF-kappaB pathway in adult T cell leukemia and other cancers. *Cancer Cell* **21**, 121–135 (2012).
48. Sithole, N., Williams, C. A., Vaughan, A. M., Kenyon, J. C. & Lever, A. M. L. DDX17 specifically, and independently of DDX5, controls use of the HIV A4/5 splice acceptor cluster and is essential for efficient replication of HIV. *J. Mol. Biol.* **430**, 3111–3128 (2018).
49. Lin, C., Yang, L., Yang, J. J., Huang, Y. & Liu, Z. R. ATPase/helicase activities of p68 RNA helicase are required for pre-mRNA splicing but not for assembly of the spliceosome. *Mol. Cell Biol.* **25**, 7484–7493 (2005).
50. Camats, M., Guil, S., Kokolo, M. & Bach-Elias, M. P68 RNA helicase (DDX5) alters activity of cis- and trans-acting factors of the alternative splicing of H-Ras. *PLoS ONE* **3**, e2926 (2008).
51. Moy, R. H. et al. Stem-loop recognition by DDX17 facilitates miRNA processing and antiviral defense. *Cell* **158**, 764–777 (2014).
52. Mori, M. et al. Hippo signaling regulates microprocessor and links cell-density-dependent miRNA biogenesis to cancer. *Cell* **156**, 893–906 (2014).
53. Delebecque, F., Pramberger, K., Prevost, M. C., Brahm, M. & Tangy, F. A chimeric human T-cell lymphotropic virus type 1 with the envelope glycoprotein of Moloney murine leukemia virus is infectious for murine cells. *J. Virol.* **76**, 7883–7889 (2002).
54. Mallinroud, P. et al. Endothelial, epithelial, and fibroblast cells exhibit specific splicing programs independently of their tissue of origin. *Genome Res.* **24**, 511–521 (2014).
55. Anders, S., Pyl, P. T. & Huber, W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**, 166–169 (2015).
56. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550 (2014).
57. Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P. & Pachter, L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat. Biotechnol.* **34**, 525–527 (2016).
58. Messeguer, X. et al. PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* **18**, 333–334 (2002).
59. Yeo, G. & Burge, C. B. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J. Comput. Biol.* **11**, 377–394 (2004).
60. Barrett, T. et al. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—update. *Nucleic Acids Res.* **41**, D991–D995 (2013).
61. Consortium, E. P. An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489**, 57–74 (2012).
62. Zheng, R. et al. Cistrome Data Browser: expanded datasets and new tools for gene regulatory analysis. *Nucleic Acids Res.* **47**, D729–D735 (2018).
63. Langmead, B. & Salzberg, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* **9**, 357–359 (2012).
64. Zhang, Y. et al. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol.* **9**, R137 (2008).
65. Quinlan, A. R. & Hall, I. M. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **26**, 841–842 (2010).
66. Zhu, L. J., Holmes, B. R., Aronin, N. & Brodsky, M. H. CRISPRseek: a bioconductor package to identify target-specific guide RNAs for CRISPR-Cas9 genome-editing systems. *PLoS ONE* **9**, e108424 (2014).
67. Ran, F. A. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8**, 2281–2308 (2013).

Acknowledgements

This study makes use of data (EGAS00001001296) generated by Department of Pathology and Tumor Biology, Kyoto University²⁴. We gratefully acknowledge support from Laurent Modolo at the LBMC for bio-informatic advice, and from the PSMN (Pôle Scientifique de Modélisation Numérique) of the ENS de Lyon for computing resources. This work was supported by the Ligue Contre le Cancer (Comité de la Savoie, de la Drome et du Rhône), the Fondation ARC (ARC PJA20151203399), and the Agence Nationale pour la Recherche (program EPVIR and CHROTOPAS). L.B.A. was supported by Ligue Contre le Cancer; G.G., by ANR CHROTOPAS; M.T., by a bursary from the French Ministry of Higher Education and Science; F.M., C.F.B., and D.A., by INSERM; and E.W., by Hospices Civils de Lyon and Lyon I University (France).

Author contributions

Conceptualization, L.B.A., D.A., and F.M.; resources, A.G. and E.W.; experiments, L.B.A., P.M., M.T., and G.G.; technical support, E.C. and M.B.; bioinformatics, J.B.-C., H.P., N.F., and S.L.; formal analysis, L.B.A., M.T., G.G., and F.M.; supervision, D.A. and F.M.; funding acquisition, C.F.B., D.A. and F.M.; writing—original draft, F.M.; writing—review and editing, L.B.A., M.T., G.G., C.F.B., D.A., and F.M.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16853-x>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to D.A. or F.M.

Peer review information *Nature Communications* thanks Neil Perkins, Claus Scheidereit and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

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



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

© The Author(s) 2020

Bibliographie

- Ahn, J.H., Davis, E.S., Daugird, T.A., Zhao, S., Quiroga, I.Y., Uryu, H., Li, J., Storey, A.J., Tsai, Y.-H., Keeley, D.P., Mackintosh, S.G., Edmondson, R.D., Byrum, S.D., Cai, L., Tackett, A.J., Zheng, D., Legant, W.R., Phanstiel, D.H., Wang, G.G., 2021. Phase separation drives aberrant chromatin looping and cancer development. *Nature* 595, 591–595. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03662-5>
- Akhade, V.S., Arun, G., Donakonda, S., Rao, M.R.S., 2014. Genome wide chromatin occupancy of mrhl RNA and its role in gene regulation in mouse spermatogonial cells. *RNA Biol.* 11, 1262–1279. <https://doi.org/10.1080/15476286.2014.996070>
- Allfrey, V.G., Faulkner, R., Mirsky, A.E., 1964. ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 51, 786–794. <https://doi.org/10.1073/pnas.51.5.786>
- Ameur, A., Zaghlool, A., Halvardson, J., Wetterbom, A., Gyllensten, U., Cavelier, L., Feuk, L., 2011. Total RNA sequencing reveals nascent transcription and widespread co-transcriptional splicing in the human brain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 1435–1440. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2143>
- Ameur, L.B., Marie, P., Thenoz, M., Giraud, G., Combe, E., Claude, J.-B., Lemaire, S., Fontrodona, N., Polveche, H., Bastien, M., Gessain, A., Wattel, E., Bourgeois, C.F., Auboeuf, D., Mortreux, F., 2020. Intragenic recruitment of NF- κ B drives splicing modifications upon activation by the oncogene Tax of HTLV-1. *Nat. Commun.* 11, 3045. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16853-x>
- Anderson, M.G., Dynan, W.S., 1994. Quantitative studies of the effect of HTLV-I Tax protein on CREB protein–DNA binding. *Nucleic Acids Res.* 22, 3194–3201. <https://doi.org/10.1093/nar/22.15.3194>
- Andersson, R., Enroth, S., Rada-Iglesias, A., Wadelius, C., Komorowski, J., 2009. Nucleosomes are well positioned in exons and carry characteristic histone modifications. *Genome Res.* 19, 1732–1741. <https://doi.org/10.1101/gr.092353.109>
- Ansari, A., Hampsey, M., 2005. A role for the CPF 3'-end processing machinery in RNAP II-dependent gene looping. *Genes Dev.* 19, 2969–2978. <https://doi.org/10.1101/gad.1362305>
- Arnulf, B., Villemain, A., Nicot, C., Mordelet, E., Charneau, P., Kersual, J., Zermati, Y., Mauviel, A., Bazarbachi, A., Hermine, O., 2002. Human T-cell lymphotropic virus oncoprotein Tax represses TGF-beta 1 signaling in human T cells via c-Jun activation: a potential mechanism of HTLV-I leukemogenesis. *Blood* 100, 4129–4138. <https://doi.org/10.1182/blood-2001-12-0372>
- Ashburner, B.P., Westerheide, S.D., Baldwin, A.S., 2001. The p53 (RelA) Subunit of NF- κ B Interacts with the Histone Deacetylase (HDAC) Corepressors HDAC1 and HDAC2 To Negatively Regulate Gene Expression. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7065–7077. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.20.7065-7077.2001>

- Auweter, S.D., Oberstrass, F.C., Allain, F.H.-T., 2006. Sequence-specific binding of single-stranded RNA: is there a code for recognition? *Nucleic Acids Res.* 34, 4943–4959. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl620>
- Ballard, D.W., Böhnlein, E., Lowenthal, J.W., Wano, Y., Franza, B.R., Greene, W.C., 1988. HTLV-I tax induces cellular proteins that activate the kappa B element in the IL-2 receptor alpha gene. *Science* 241, 1652–1655. <https://doi.org/10.1126/science.241.4873.1652>
- Bangham, C.R.M., 2018. Human T Cell Leukemia Virus Type 1: Persistence and Pathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 36, 43–71. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053222>
- Banigan, E.J., Mirny, L.A., 2020. Loop extrusion: theory meets single-molecule experiments. *Curr. Opin. Cell Biol., Cell Nucleus* 64, 124–138. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2020.04.011>
- Barash, Y., Calarco, J.A., Gao, W., Pan, Q., Wang, X., Shai, O., Blencowe, B.J., Frey, B.J., 2010. Deciphering the splicing code. *Nature* 465, 53–59. <https://doi.org/10.1038/nature09000>
- Barutcu, A.R., Wu, M., Braunschweig, U., Dyakov, B.J.A., Luo, Z., Turner, K.M., Durbic, T., Lin, Z.-Y., Weatheritt, R.J., Maass, P.G., Gingras, A.-C., Blencowe, B.J., 2022. Systematic mapping of nuclear domain-associated transcripts reveals speckles and lamina as hubs of functionally distinct retained introns. *Mol. Cell* 82, 1035-1052.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.12.010>
- Batsché, E., Yaniv, M., Muchardt, C., 2006. The human SWI/SNF subunit Brm is a regulator of alternative splicing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 22–29. <https://doi.org/10.1038/nsmb1030>
- Baydoun, H.H., Bai, X.T., Shelton, S., Nicot, C., 2012. HTLV-I Tax Increases Genetic Instability by Inducing DNA Double Strand Breaks during DNA Replication and Switching Repair to NHEJ. *PLoS ONE* 7, e42226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042226>
- Baydoun, H.H., Cherian, M.A., Green, P., Ratner, L., 2015. Inducible nitric oxide synthase mediates DNA double strand breaks in Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-induced leukemia/lymphoma. *Retrovirology* 12, 71. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0196-y>
- Bergqvist, S., Alverdi, V., Mengel, B., Hoffmann, A., Ghosh, G., Komives, E.A., 2009. Kinetic enhancement of NF- κ B-DNA dissociation by I κ B α . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 19328–19333. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908797106>
- Berlivet, S., Paquette, D., Dumouchel, A., Langlais, D., Dostie, J., Kmita, M., 2013. Clustering of Tissue-Specific Sub-TADs Accompanies the Regulation of HoxA Genes in Developing Limbs. *PLoS Genet.* 9, e1004018. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004018>

- Bernal-Mizrachi, L., Lovly, C.M., Ratner, L., 2006. The role of NF- κ B-1 and NF- κ B-2-mediated resistance to apoptosis in lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 9220–9225. <https://doi.org/10.1073/pnas.0507809103>
- Bertero, A., Fields, P.A., Ramani, V., Bonora, G., Yardimci, G.G., Reinecke, H., Pabon, L., Noble, W.S., Shendure, J., Murry, C.E., 2019. Dynamics of genome reorganization during human cardiogenesis reveal an RBM20-dependent splicing factory. *Nat. Commun.* 10, 1538. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09483-5>
- Bex, F., McDowall, A., Burny, A., Gaynor, R., 1997. The human T-cell leukemia virus type 1 transactivator protein Tax colocalizes in unique nuclear structures with NF-kappaB proteins. *J. Virol.* 71, 3484–3497. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.5.3484-3497.1997>
- Bex, F., Murphy, K., Wattiez, R., Burny, A., Gaynor, R.B., 1999. Phosphorylation of the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Transactivator Tax on Adjacent Serine Residues Is Critical for Tax Activation. *J. Virol.* 73, 738–745.
- Bex, F., Yin, M.J., Burny, A., Gaynor, R.B., 1998. Differential transcriptional activation by human T-cell leukemia virus type 1 Tax mutants is mediated by distinct interactions with CREB binding protein and p300. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2392–2405. <https://doi.org/10.1128/MCB.18.4.2392>
- Beyer, A.L., Osheim, Y.N., 1988. Splice site selection, rate of splicing, and alternative splicing on nascent transcripts. *Genes Dev.* 2, 754–765. <https://doi.org/10.1101/gad.2.6.754>
- Bhat, P., Honson, D., Guttman, M., 2021. Nuclear compartmentalization as a mechanism of quantitative control of gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 22, 653–670. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00387-1>
- Bickmore, W.A., 2013. The spatial organization of the human genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 14, 67–84. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-091212-153515>
- Bielli, P., Busà, R., Di Stasi, S.M., Munoz, M.J., Botti, F., Kornblihtt, A.R., Sette, C., 2014. The transcription factor FBI-1 inhibits SAM68-mediated BCL-X alternative splicing and apoptosis. *EMBO Rep.* 15, 419–427. <https://doi.org/10.1002/embr.201338241>
- Billman, M.R., Rueda, D., Bangham, C.R.M., 2017. Single-cell heterogeneity and cell-cycle-related viral gene bursts in the human leukaemia virus HTLV-1. *Wellcome Open Res.* 2, 87. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.12469.2>
- Bird, G., Zorio, D.A.R., Bentley, D.L., 2004. RNA Polymerase II Carboxy-Terminal Domain Phosphorylation Is Required for Cotranscriptional Pre-mRNA Splicing and 3'-End Formation. *Mol. Cell. Biol.* 24, 8963–8969. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.20.8963-8969.2004>
- Bogenberger, J.M., Laybourn, P.J., 2008. Human T Lymphotropic Virus Type 1 protein Tax reduces histone levels. *Retrovirology* 5, 9. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-9>

- Bonev, B., Cavalli, G., 2016. Organization and function of the 3D genome. *Nat. Rev. Genet.* 17, 661–678. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.112>
- Borghini, L., Lu, J., Hibberd, M., Davila, S., 2018. Variation in Genome-Wide NF- κ B RELA Binding Sites upon Microbial Stimuli and Identification of a Virus Response Profile. *J. Immunol.* 201, 1295–1305. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800246>
- Boumpas, P., Merabet, S., Carnesecchi, J., 2023. Integrating transcription and splicing into cell fate: Transcription factors on the block. *WIREs RNA* 14, e1752. <https://doi.org/10.1002/wrna.1752>
- Bourgeois, C.F., Mortreux, F., Auboeuf, D., 2016. The multiple functions of RNA helicases as drivers and regulators of gene expression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 426–438. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.50>
- Boxus, M., Twizere, J.-C., Legros, S., Dewulf, J.-F., Kettmann, R., Willems, L., 2008. The HTLV-1 Tax interactome. *Retrovirology* 5, 76. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-76>
- Brasier, A.R., 2006. The NF- κ B Regulatory Network. *Cardiovasc. Toxicol.* 6, 111–130. <https://doi.org/10.1385/CT:6:2:111>
- Brasier, A.R., Tian, B., Jamaluddin, M., Kalita, M.K., Garofalo, R.P., Lu, M., 2011. RelA Ser276 phosphorylation-coupled Lys310 acetylation controls transcriptional elongation of inflammatory cytokines in respiratory syncytial virus infection. *J. Virol.* 85, 11752–11769. <https://doi.org/10.1128/JVI.05360-11>
- Brodsky, A.S., Meyer, C.A., Swinburne, I.A., Hall, G., Keenan, B.J., Liu, X.S., Fox, E.A., Silver, P.A., 2005. Genomic mapping of RNA polymerase II reveals sites of co-transcriptional regulation in human cells. *Genome Biol.* 6, R64. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-8-r64>
- Brown, J.M., Green, J., das Neves, R.P., Wallace, H.A.C., Smith, A.J.H., Hughes, J., Gray, N., Taylor, S., Wood, W.G., Higgs, D.R., Iborra, F.J., Buckle, V.J., 2008. Association between active genes occurs at nuclear speckles and is modulated by chromatin environment. *J. Cell Biol.* 182, 1083–1097. <https://doi.org/10.1083/jcb.200803174>
- Brown, J.M., Leach, J., Reittie, J.E., Atzberger, A., Lee-Prudhoe, J., Wood, W.G., Higgs, D.R., Iborra, F.J., Buckle, V.J., 2006. Coregulated human globin genes are frequently in spatial proximity when active. *J. Cell Biol.* 172, 177–187. <https://doi.org/10.1083/jcb.200507073>
- Buratti, E., Baralle, F.E., 2004. Influence of RNA Secondary Structure on the Pre-mRNA Splicing Process. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10505–10514. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.24.10505-10514.2004>
- Busch, A., Hertel, K.J., 2012. EVOLUTION OF SR PROTEIN AND HnRNP SPLICING REGULATORY FACTORS. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 3, 1–12. <https://doi.org/10.1002/wrna.100>

- Caggiano, C., Pieraccioli, M., Panzeri, V., Sette, C., Bielli, P., 2019. c-MYC empowers transcription and productive splicing of the oncogenic splicing factor Sam68 in cancer. *Nucleic Acids Res.* 47, 6160–6171. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz344>
- Cai, S., Lee, C.C., Kohwi-Shigematsu, T., 2006. SATB1 packages densely looped, transcriptionally active chromatin for coordinated expression of cytokine genes. *Nat. Genet.* 38, 1278–1288. <https://doi.org/10.1038/ng1913>
- Camats, M., Guil, S., Kokolo, M., Bach-Elias, M., 2008. P68 RNA helicase (DDX5) alters activity of cis- and trans-acting factors of the alternative splicing of H-Ras. *PLoS One* 3, e2926. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002926>
- Carneseccchi, J., Boumpas, P., van Nierop y Sanchez, P., Domsch, K., Pinto, H.D., Borges Pinto, P., Lohmann, I., 2021. The Hox transcription factor Ultrabithorax binds RNA and regulates co-transcriptional splicing through an interplay with RNA polymerase II. *Nucleic Acids Res.* 50, 763–783. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1250>
- Carneseccchi, J., Sigismondo, G., Domsch, K., Baader, C.E.P., Rafiee, M.-R., Krijgsveld, J., Lohmann, I., 2020. Multi-level and lineage-specific interactomes of the Hox transcription factor Ubx contribute to its functional specificity. *Nat. Commun.* 11, 1388. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15223-x>
- Caron, C., Rousset, R., Béraud, C., Moncollin, V., Egly, J.M., Jalinot, P., 1993. Functional and biochemical interaction of the HTLV-I Tax1 transactivator with TBP. *EMBO J.* 12, 4269–4278. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06111.x>
- Casola, A., Garofalo, R.P., Jamaluddin, M., Vlahopoulos, S., Brasier, A.R., 2000. Requirement of a novel upstream response element in respiratory syncytial virus-induced IL-8 gene expression. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 164, 5944–5951. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.11.5944>
- Caudron-Herger, M., Cook, P.R., Rippe, K., Papantonis, A., 2015. Dissecting the nascent human transcriptome by analysing the RNA content of transcription factories. *Nucleic Acids Res.* 43, e95–e95. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv390>
- Cavrois, M., Wain-Hobson, S., Gessain, A., Plumelle, Y., Wattel, E., 1996. Adult T-cell leukemia/lymphoma on a background of clonally expanding human T-cell leukemia virus type-1-positive cells. *Blood* 88, 4646–4650.
- Chen, Y., Bates, D.L., Dey, R., Chen, P.-H., Machado, A.C.D., Laird-Offringa, I.A., Rohs, R., Chen, L., 2012. DNA Binding by GATA Transcription Factor Suggests Mechanisms of DNA Looping and Long-Range Gene Regulation. *Cell Rep.* 2, 1197–1206. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.10.012>
- Chen, Y., Zhang, Y., Wang, Y., Zhang, L., Brinkman, E.K., Adam, S.A., Goldman, R., van Steensel, B., Ma, J., Belmont, A.S., 2018. Mapping 3D genome organization relative to nuclear compartments using TSA-Seq as a cytological ruler. *J. Cell Biol.* 217, 4025–4048. <https://doi.org/10.1083/jcb.201807108>

- Chen, Y.-J., Chang, L.-S., 2015. NF κ B- and AP-1-mediated DNA looping regulates matrix metalloproteinase-9 transcription in TNF- α -treated human leukemia U937 cells. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1849, 1248–1259. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.07.016>
- Cheng, C.S., Feldman, K.E., Lee, J., Verma, S., Huang, D.-B., Huynh, K., Chang, M., Ponomarenko, J.V., Sun, S.-C., Benedict, C.A., Ghosh, G., Hoffmann, A., 2011. The specificity of innate immune responses is enforced by repression of interferon response elements by NF- κ B p50. *Sci. Signal.* 4, ra11. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2001501>
- Chiari, E., Lamsoul, I., Lodewick, J., Chopin, C., Bex, F., Pique, C., 2004. Stable ubiquitination of human T-cell leukemia virus type 1 tax is required for proteasome binding. *J. Virol.* 78, 11823–11832. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.21.11823-11832.2004>
- Cho, W.-K., Spille, J.-H., Hecht, M., Lee, C., Li, C., Grube, V., Cisse, I.I., 2018. Mediator and RNA polymerase II clusters associate in transcription-dependent condensates. *Science* 361, 412–415. <https://doi.org/10.1126/science.aar4199>
- Cho, W.-K., Zhou, M., Jang, M.K., Huang, K., Jeong, S.-J., Ozato, K., Brady, J.N., 2007. Modulation of the Brd4/P-TEFb interaction by the human T-lymphotropic virus type 1 tax protein. *J. Virol.* 81, 11179–11186. <https://doi.org/10.1128/JVI.00408-07>
- Chu, Z.L., DiDonato, J.A., Hawiger, J., Ballard, D.W., 1998. The tax oncoprotein of human T-cell leukemia virus type 1 associates with and persistently activates I κ B kinases containing IKK α and IKK β . *J. Biol. Chem.* 273, 15891–15894. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.26.15891>
- Cisse, I.I., Izeddin, I., Causse, S.Z., Boudarene, L., Senecal, A., Muresan, L., Dugast-Darzacq, C., Hajj, B., Dahan, M., Darzacq, X., 2013. Real-Time Dynamics of RNA Polymerase II Clustering in Live Human Cells. *Science* 341, 664–667. <https://doi.org/10.1126/science.1239053>
- Clemens, K.E., Piras, G., Radonovich, M.F., Choi, K.S., Duvall, J.F., DeJong, J., Roeder, R., Brady, J.N., 1996. Interaction of the human T-cell lymphotropic virus type 1 tax transactivator with transcription factor IIA. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4656–4664. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.9.4656>
- Clowney, E.J., LeGros, M.A., Mosley, C.P., Clowney, F.G., Markenskoff-Papadimitriou, E.C., Myllys, M., Barnea, G., Larabell, C.A., Lomvardas, S., 2012. Nuclear Aggregation of Olfactory Receptor Genes Governs Their Monogenic Expression. *Cell* 151, 724–737. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.043>
- Collins, N., Poot, R.A., Kukimoto, I., García-Jiménez, C., Dellaire, G., Varga-Weisz, P.D., 2002. An ACF1–ISWI chromatin-remodeling complex is required for DNA replication through heterochromatin. *Nat. Genet.* 32, 627–632. <https://doi.org/10.1038/ng1046>
- Cook, L.B., Melamed, A., Niederer, H., Valganon, M., Laydon, D., Foroni, L., Taylor, G.P., Matsuoka, M., Bangham, C.R.M., 2014. The role of HTLV-1 clonality, proviral structure,

- and genomic integration site in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 123, 3925–3931. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-02-553602>
- Corcoran, A.E., 2010. The epigenetic role of non-coding RNA transcription and nuclear organization in immunoglobulin repertoire generation. *Semin. Immunol., Epigenetic regulation of V(D)J recombination* 22, 353–361. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2010.08.001>
- Cremer, T., Cremer, M., 2010. Chromosome Territories. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a003889. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003889>
- Crosetto, N., Bienko, M., 2020. Radial Organization in the Mammalian Nucleus. *Front. Genet.* 11.
- Curado, J., Iannone, C., Tilgner, H., Valcárcel, J., Guigó, R., 2015. Promoter-like epigenetic signatures in exons displaying cell type-specific splicing. *Genome Biol.* 16. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0797-8>
- Currer, R., Van Duyne, R., Jaworski, E., Guendel, I., Sampey, G., Das, R., Narayanan, A., Kashanchi, F., 2012. HTLV Tax: A Fascinating Multifunctional Co-Regulator of Viral and Cellular Pathways. *Front. Microbiol.* 3, 406. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00406>
- Dardenne, E., Polay Espinoza, M., Fattet, L., Germann, S., Lambert, M.-P., Neil, H., Zonta, E., Mortada, H., Gratadou, L., Deygas, M., Chakrama, F.Z., Samaan, S., Desmet, F.-O., Tranchevent, L.-C., Dutertre, M., Rimokh, R., Bourgeois, C.F., Auboeuf, D., 2014. RNA helicases DDX5 and DDX17 dynamically orchestrate transcription, miRNA, and splicing programs in cell differentiation. *Cell Rep.* 7, 1900–1913. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.010>
- Das, R., Yu, J., Zhang, Z., Gygi, M.P., Krainer, A.R., Gygi, S.P., Reed, R., 2007. SR proteins function in coupling RNAP II transcription to pre-mRNA splicing. *Mol. Cell* 26, 867–881. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.036>
- de la Mata, M., Alonso, C.R., Kadener, S., Fededa, J.P., Blaustein, M., Pelisch, F., Cramer, P., Bentley, D., Kornblihtt, A.R., 2003. A Slow RNA Polymerase II Affects Alternative Splicing In Vivo. *Mol. Cell* 12, 525–532. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2003.08.001>
- de la Mata, M., Kornblihtt, A.R., 2006. RNA polymerase II C-terminal domain mediates regulation of alternative splicing by SRp20. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 973–980. <https://doi.org/10.1038/nsmb1155>
- Dekker, J., Rippe, K., Dekker, M., Kleckner, N., 2002. Capturing Chromosome Conformation. *Science* 295, 1306–1311. <https://doi.org/10.1126/science.1067799>
- Deng, W., Rupon, J.W., Krivega, I., Breda, L., Motta, I., Jahn, K.S., Reik, A., Gregory, P.D., Rivella, S., Dean, A., Blobel, G.A., 2014. Reactivation of Developmentally Silenced Globin Genes by Forced Chromatin Looping. *Cell* 158, 849–860. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.050>

- Denker, A., Laat, W. de, 2016. The second decade of 3C technologies: detailed insights into nuclear organization. *Genes Dev.* 30, 1357–1382. <https://doi.org/10.1101/gad.281964.116>
- Devaiah, B.N., Lewis, B.A., Cherman, N., Hewitt, M.C., Albrecht, B.K., Robey, P.G., Ozato, K., Sims, R.J., Singer, D.S., 2012. BRD4 is an atypical kinase that phosphorylates Serine2 of the RNA Polymerase II carboxy-terminal domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 6927–6932. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120422109>
- Dittmer, J., Pise-Masison, C.A., Clemens, K.E., Choi, K.S., Brady, J.N., 1997. Interaction of human T-cell lymphotropic virus type I Tax, Ets1, and Sp1 in transactivation of the PTHR P2 promoter. *J. Biol. Chem.* 272, 4953–4958. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.8.4953>
- Dixon, J.R., Jung, I., Selvaraj, S., Shen, Y., Antosiewicz-Bourget, J.E., Lee, A.Y., Ye, Z., Kim, A., Rajagopal, N., Xie, W., Diao, Y., Liang, J., Zhao, H., Lobanenko, V.V., Ecker, J.R., Thomson, J., Ren, B., 2015. Chromatin Architecture Reorganization during Stem Cell Differentiation. *Nature* 518, 331–336. <https://doi.org/10.1038/nature14222>
- Dixon, J.R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J.S., Ren, B., 2012. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 485, 376–380. <https://doi.org/10.1038/nature11082>
- Easley, R., Carpio, L., Guendel, I., Klase, Z., Choi, S., Kehn-Hall, K., Brady, J.N., Kashanchi, F., 2010. Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Transcription and Chromatin-Remodeling Complexes. *J. Virol.* 84, 4755–4768. <https://doi.org/10.1128/JVI.00851-09>
- Ego, T., Ariumi, Y., Shimotohno, K., 2002. The interaction of HTLV-1 Tax with HDAC1 negatively regulates the viral gene expression. *Oncogene* 21, 7241–7246. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205701>
- Escoffier, E., Rezza, A., Roborel de Climens, A., Belleville, A., Gazzolo, L., Gilson, E., Duc Dodon, M., 2005. A balanced transcription between telomerase and the telomeric DNA-binding proteins TRF1, TRF2 and Pot1 in resting, activated, HTLV-1-transformed and Tax-expressing human T lymphocytes. *Retrovirology* 2, 77. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-2-77>
- Eskiw, C.H., Rapp, A., Carter, D.R.F., Cook, P.R., 2008. RNA polymerase II activity is located on the surface of protein-rich transcription factories. *J. Cell Sci.* 121, 1999–2007. <https://doi.org/10.1242/jcs.027250>
- Estes, P.A., Cooke, N.E., Liebhaber, S.A., 1992. A native RNA secondary structure controls alternative splice-site selection and generates two human growth hormone isoforms. *J. Biol. Chem.* 267, 14902–14908. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)42125-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)42125-4)
- Faber, G.P., Nadav-Eliyahu, S., Shav-Tal, Y., 2022. Nuclear speckles – a driving force in gene expression. *J. Cell Sci.* 135, jcs259594. <https://doi.org/10.1242/jcs.259594>

- Fagerlund, R., Behar, M., Fortmann, K.T., Lin, Y.E., Vargas, J.D., Hoffmann, A., 2015. Anatomy of a negative feedback loop: the case of I κ B α . *J. R. Soc. Interface* 12, 20150262. <https://doi.org/10.1098/rsif.2015.0262>
- Fan, N., Gavalchin, J., Paul, B., Wells, K.H., Lane, M.J., Poiesz, B.J., 1992. Infection of peripheral blood mononuclear cells and cell lines by cell-free human T-cell lymphoma/leukemia virus type I. *J. Clin. Microbiol.* 30, 905–910.
- Fanucchi, S., Shibayama, Y., Burd, S., Weinberg, M.S., Mhlanga, M.M., 2013. Chromosomal Contact Permits Transcription between Coregulated Genes. *Cell* 155, 606–620. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.051>
- Federman, N., Fuente, V. de la, Zalzman, G., Corbi, N., Onori, A., Passananti, C., Romano, A., 2013. Nuclear Factor κ B-Dependent Histone Acetylation is Specifically Involved in Persistent Forms of Memory. *J. Neurosci.* 33, 7603–7614. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4181-12.2013>
- Felber, B.K., Paskalis, H., Kleinman-Ewing, C., Wong-Staal, F., Pavlakis, G.N., 1985. The pX Protein of HTLV-I Is a Transcriptional Activator of Its Long Terminal Repeats. *Science* 229, 675–679. <https://doi.org/10.1126/science.2992082>
- Feldman, I., Feldman, G.M., Mobarak, C., Dunkelberg, J.C., Leslie, K.K., 2007. Identification of Proteins within the Nuclear Factor- κ B Transcriptional Complex Including Estrogen Receptor- α . *Am. J. Obstet. Gynecol.* 196, 394.e1-394.e13. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2006.12.033>
- Fiorini, F., Robin, J.-P., Kanaan, J., Borowiak, M., Croquette, V., Le Hir, H., Jalinet, P., Mocquet, V., 2018. HTLV-1 Tax plugs and freezes UPF1 helicase leading to nonsense-mediated mRNA decay inhibition. *Nat. Commun.* 9, 431. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02793-6>
- Fong, N., Bentley, D.L., 2001. Capping, splicing, and 3' processing are independently stimulated by RNA polymerase II: different functions for different segments of the CTD. *Genes Dev.* 15, 1783–1795. <https://doi.org/10.1101/gad.889101>
- Fong, N., Kim, H., Zhou, Y., Ji, X., Qiu, J., Saldi, T., Diener, K., Jones, K., Fu, X.-D., Bentley, D.L., 2014. Pre-mRNA splicing is facilitated by an optimal RNA polymerase II elongation rate. *Genes Dev.* 28, 2663–2676. <https://doi.org/10.1101/gad.252106.114>
- Fong, Y.W., Zhou, Q., 2001. Stimulatory effect of splicing factors on transcriptional elongation. *Nature* 414, 929–933. <https://doi.org/10.1038/414929a>
- Fraedrich, K., Müller, B., Grassmann, R., 2005. The HTLV-1 Tax protein binding domain of cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) includes the regulatory PSTAIRE helix. *Retrovirology* 2, 54. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-2-54>
- Franke, M., Ibrahim, D.M., Andrey, G., Schwarzer, W., Heinrich, V., Schöpflin, R., Kraft, K., Kempfer, R., Jerković, I., Chan, W.-L., Spielmann, M., Timmermann, B., Wittler, L., Kurth, I., Cambiaso, P., Zuffardi, O., Houge, G., Lambie, L., Brancati, F., Pombo, A., Vingron, M.,

- Spitz, F., Mundlos, S., 2016. Formation of new chromatin domains determines pathogenicity of genomic duplications. *Nature* 538, 265–269. <https://doi.org/10.1038/nature19800>
- Franzoso, G., Bours, V., Park, S., Tomfta-Yamaguchi, M., Kelly, K., Siebenlist, U., 1992. The candidate oncoprotein Bcl-3 is an antagonist of p50/NF- κ B-mediated inhibition. *Nature* 359, 339–342. <https://doi.org/10.1038/359339a0>
- Fujii, M., Tsuchiya, H., Chuhjo, T., Minamino, T., Miyamoto, K., Seiki, M., 1994. Serum response factor has functional roles both in indirect binding to the CA_TG box and in the transcriptional activation function of human T-cell leukemia virus type I Tax. *J. Virol.* 68, 7275–7283. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.11.7275-7283.1994>
- Fujimoto, T., Hata, T., Itoyama, T., Nakamura, H., Tsukasaki, K., Yamada, Y., Ikeda, S., Sadamori, N., Tomonaga, M., 1999. High rate of chromosomal abnormalities in HTLV-I-infected T-cell colonies derived from prodromal phase of adult T-cell leukemia: a study of IL-2-stimulated colony formation in methylcellulose. *Cancer Genet. Cytogenet.* 109, 1–13. [https://doi.org/10.1016/s0165-4608\(98\)00141-1](https://doi.org/10.1016/s0165-4608(98)00141-1)
- Fullwood, M.J., Liu, M.H., Pan, Y.F., Liu, J., Xu, H., Mohamed, Y.B., Orlov, Y.L., Velkov, S., Ho, A., Mei, P.H., Chew, E.G.Y., Huang, P.Y.H., Welboren, W.-J., Han, Y., Ooi, H.S., Ariyaratne, P.N., Vega, V.B., Luo, Y., Tan, P.Y., Choy, P.Y., Wansa, K.D.S.A., Zhao, B., Lim, K.S., Leow, S.C., Yow, J.S., Joseph, R., Li, H., Desai, K.V., Thomsen, J.S., Lee, Y.K., Karuturi, R.K.M., Herve, T., Bourque, G., Stunnenberg, H.G., Ruan, X., Cacheux-Rataboul, V., Sung, W.-K., Liu, E.T., Wei, C.-L., Cheung, E., Ruan, Y., 2009. An oestrogen-receptor- α -bound human chromatin interactome. *Nature* 462, 58–64. <https://doi.org/10.1038/nature08497>
- Fyodorov, D.V., Kadonaga, J.T., 2002. Dynamics of ATP-dependent chromatin assembly by ACF. *Nature* 418, 897–900. <https://doi.org/10.1038/nature00929>
- Gabet, A.-S., Mortreux, F., Charneau, P., Riou, P., Duc-Dodon, M., Wu, Y., Jeang, K.-T., Wattel, E., 2003. Inactivation of hTERT transcription by Tax. *Oncogene* 22, 3734–3741. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206468>
- Galganski, L., Urbanek, M.O., Krzyzosiak, W.J., 2017. Nuclear speckles: molecular organization, biological function and role in disease. *Nucleic Acids Res.* 45, 10350–10368. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx759>
- Gates, L.A., Foulds, C.E., O'Malley, B.W., 2017. Histone Marks in the 'Driver's Seat': Functional Roles in Steering the Transcription Cycle. *Trends Biochem. Sci.* 42, 977–989. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.10.004>
- Geiger, T.R., Sharma, N., Kim, Y.-M., Nyborg, J.K., 2008. The human T-cell leukemia virus type 1 tax protein confers CBP/p300 recruitment and transcriptional activation properties to phosphorylated CREB. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1383–1392. <https://doi.org/10.1128/MCB.01657-07>

- Gerritsen, M.E., Williams, A.J., Neish, A.S., Moore, S., Shi, Y., Collins, T., 1997. CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 2927–2932. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.7.2927>
- Gessain, A., Gessain, A., Cassar, O., 2012. Epidemiological Aspects and World Distribution of HTLV-1 Infection. *Front. Microbiol.* 3.
- Geuens, T., Bouhy, D., Timmerman, V., 2016. The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Hum. Genet.* 135, 851–867. <https://doi.org/10.1007/s00439-016-1683-5>
- Ghisletti, S., Barozzi, I., Mietton, F., Polletti, S., De Santa, F., Venturini, E., Gregory, L., Lonie, L., Chew, A., Wei, C.-L., Ragoussis, J., Natoli, G., 2010. Identification and Characterization of Enhancers Controlling the Inflammatory Gene Expression Program in Macrophages. *Immunity* 32, 317–328. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.02.008>
- Ghosh, S., Hayden, M.S., 2008. New regulators of NF- κ B in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 837–848. <https://doi.org/10.1038/nri2423>
- Gibson, B.A., Doolittle, L.K., Schneider, M.W.G., Jensen, L.E., Gamarra, N., Henry, L., Gerlich, D.W., Redding, S., Rosen, M.K., 2019. Organization of Chromatin by Intrinsic and Regulated Phase Separation. *Cell* 179, 470-484.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.037>
- Gillet, N.A., Malani, N., Melamed, A., Gormley, N., Carter, R., Bentley, D., Berry, C., Bushman, F.D., Taylor, G.P., Bangham, C.R.M., 2011. The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1–infected T-cell clones. *Blood* 117, 3113–3122. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-312926>
- Giraud, G., Terrone, S., Bourgeois, C.F., 2018. Functions of DEAD box RNA helicases DDX5 and DDX17 in chromatin organization and transcriptional regulation. *BMB Rep.* 51, 613–622. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2018.51.12.234>
- Gohda, J., Irisawa, M., Tanaka, Y., Sato, S., Ohtani, K., Fujisawa, J., Inoue, J., 2007. HTLV-1 Tax-induced NF κ B activation is independent of Lys-63-linked-type polyubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 357, 225–230. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.03.125>
- Gonçalves, D.U., Proietti, F.A., Ribas, J.G.R., Araújo, M.G., Pinheiro, S.R., Guedes, A.C., Carneiro-Proietti, A.B.F., 2010. Epidemiology, Treatment, and Prevention of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1-Associated Diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 577–589. <https://doi.org/10.1128/CMR.00063-09>
- Grinev, V.V., Barneh, F., Ilyushonak, I.M., Nakjang, S., Smink, J., van Oort, A., Clough, R., Seyani, M., McNeill, H., Reza, M., Martinez-Soria, N., Assi, S.A., Ramanouskaya, T.V., Bonifer, C., Heidenreich, O., 2021. RUNX1/RUNX1T1 mediates alternative splicing and reorganises the transcriptional landscape in leukemia. *Nat. Commun.* 12, 520. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20848-z>

- Gross, C., Thoma-Kress, A.K., 2016. Molecular Mechanisms of HTLV-1 Cell-to-Cell Transmission. *Viruses* 8, 74. <https://doi.org/10.3390/v8030074>
- Grossman, W.J., Kimata, J.T., Wong, F.H., Zutter, M., Ley, T.J., Ratner, L., 1995. Development of leukemia in mice transgenic for the tax gene of human T-cell leukemia virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 1057–1061. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.4.1057>
- Groussaud, D., Khair, M., Tollenaere, A.I., Waast, L., Kuo, M.-S., Mangeney, M., Martella, C., Fardini, Y., Coste, S., Souidi, M., Benit, L., Pique, C., Issad, T., 2017. Hijacking of the O-GlcNAcZYME complex by the HTLV-1 Tax oncoprotein facilitates viral transcription. *PLoS Pathog.* 13, e1006518. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006518>
- Grumont, R.J., Gerondakis, S., 1994. The subunit composition of NF-kappa B complexes changes during B-cell development. *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 5, 1321–1331.
- Gu, B., Eick, D., Bensaude, O., 2013. CTD serine-2 plays a critical role in splicing and termination factor recruitment to RNA polymerase II in vivo. *Nucleic Acids Res.* 41, 1591–1603. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1327>
- Guo, Y., Monahan, K., Wu, H., Gertz, J., Varley, K.E., Li, W., Myers, R.M., Maniatis, T., Wu, Q., 2012. CTCF/cohesin-mediated DNA looping is required for protocadherin α promoter choice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 21081–21086. <https://doi.org/10.1073/pnas.1219280110>
- Guo, Y.E., Manteiga, J.C., Henninger, J.E., Sabari, B.R., Dall’Agnese, A., Hannett, N.M., Spille, J.-H., Afeyan, L.K., Zamudio, A.V., Shrinivas, K., Abraham, B.J., Boija, A., Decker, T.-M., Rimel, J.K., Fant, C.B., Lee, T.I., Cisse, I.I., Sharp, P.A., Taatjes, D.J., Young, R.A., 2019. Pol II phosphorylation regulates a switch between transcriptional and splicing condensates. *Nature* 572, 543–548. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1464-0>
- Guo, Z., Boekhoudt, G.H., Boss, J.M., 2003. Role of the intronic enhancer in tumor necrosis factor-mediated induction of manganous superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 278, 23570–23578. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303431200>
- Hakim, O., Sung, M.-H., Nakayamada, S., Voss, T.C., Baek, S., Hager, G.L., 2013. Spatial congregation of STAT binding directs selective nuclear architecture during T-cell functional differentiation. *Genome Res.* 23, 462–472. <https://doi.org/10.1101/gr.147652.112>
- Han, H., Braunschweig, U., Gonatopoulos-Pournatzis, T., Weatheritt, R.J., Hirsch, C.L., Ha, K.C.H., Radovani, E., Nabeel-Shah, S., Sterne-Weiler, T., Wang, J., O’Hanlon, D., Pan, Q., Ray, D., Zheng, H., Vizeacoumar, F., Datti, A., Magomedova, L., Cummins, C.L., Hughes, T.R., Greenblatt, J.F., Wrana, J.L., Moffat, J., Blencowe, B.J., 2017. Multilayered Control of Alternative Splicing Regulatory Networks by Transcription Factors. *Mol. Cell* 65, 539-553.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.01.011>
- Han, X., Yu, D., Gu, R., Jia, Y., Wang, Q., Jaganathan, A., Yang, X., Yu, M., Babault, N., Zhao, C., Yi, H., Zhang, Q., Zhou, M.-M., Zeng, L., 2020. Roles of the BRD4 short isoform in phase

- separation and active gene transcription. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 27, 333–341. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0394-8>
- Hansen, A.S., Hsieh, T.-H.S., Cattoglio, C., Pustova, I., Saldaña-Meyer, R., Reinberg, D., Darzacq, X., Tjian, R., 2019. Distinct Classes of Chromatin Loops Revealed by Deletion of an RNA-Binding Region in CTCF. *Mol. Cell* 76, 395–411.e13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.039>
- Harhaj, E.W., Good, L., Xiao, G., Sun, S.-C., 1999. Gene expression profiles in HTLV-I-immortalized T cells: deregulated expression of genes involved in apoptosis regulation. *Oncogene* 18, 1341–1349. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202405>
- Hasegawa, H., Sawa, H., Lewis, M.J., Orba, Y., Sheehy, N., Yamamoto, Y., Ichinohe, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Katano, H., Takahashi, H., Matsuda, J., Sata, T., Kurata, T., Nagashima, K., Hall, W.W., 2006. Thymus-derived leukemia-lymphoma in mice transgenic for the Tax gene of human T-lymphotropic virus type I. *Nat. Med.* 12, 466–472. <https://doi.org/10.1038/nm1389>
- Hayden, M.S., Ghosh, S., 2008. Shared Principles in NF- κ B Signaling. *Cell* 132, 344–362. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.020>
- Heinz, S., Benner, C., Spann, N., Bertolino, E., Lin, Y.C., Laslo, P., Cheng, J.X., Murre, C., Singh, H., Glass, C.K., 2010. Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. *Mol. Cell* 38, 576–589. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.004>
- Hemmings, B.A., Restuccia, D.F., 2012. PI3K-PKB/Akt Pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a011189. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011189>
- Henikoff, S., Smith, M.M., 2015. Histone Variants and Epigenetics. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a019364. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019364>
- Henninger, J.E., Oksuz, O., Shrinivas, K., Sagi, I., LeRoy, G., Zheng, M.M., Andrews, J.O., Zamudio, A.V., Lazaris, C., Hannett, N.M., Lee, T.I., Sharp, P.A., Cissé, I.I., Chakraborty, A.K., Young, R.A., 2021. RNA-Mediated Feedback Control of Transcriptional Condensates. *Cell* 184, 207–225.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.030>
- Higuchi, M., Tsubata, C., Kondo, R., Yoshida, S., Takahashi, M., Oie, M., Tanaka, Y., Mahieux, R., Matsuoka, M., Fujii, M., 2007. Cooperation of NF- κ B2/p100 activation and the PDZ domain binding motif signal in human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax1 but not HTLV-2 Tax2 is crucial for interleukin-2-independent growth transformation of a T-cell line. *J. Virol.* 81, 11900–11907. <https://doi.org/10.1128/JVI.00532-07>
- Hnilicová, J., Hozeifi, S., Dušková, E., Icha, J., Tománková, T., Staněk, D., 2011. Histone Deacetylase Activity Modulates Alternative Splicing. *PLOS ONE* 6, e16727. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016727>

- Hnisz, D., Shrinivas, K., Young, R.A., Chakraborty, A.K., Sharp, P.A., 2017. A phase separation model predicts key features of transcriptional control. *Cell* 169, 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.007>
- Hoesel, B., Schmid, J.A., 2013. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* 12, 86. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-86>
- Hondele, M., Sachdev, R., Heinrich, S., Wang, J., Vallotton, P., Fontoura, B.M.A., Weis, K., 2019. DEAD-box ATPases are global regulators of phase-separated organelles. *Nature* 573, 144–148. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1502-y>
- Hong, L., Schroth, G.P., Matthews, H.R., Yau, P., Bradbury, E.M., 1993. Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 “tail” to DNA. *J. Biol. Chem.* 268, 305–314.
- Hong, X., Scofield, D.G., Lynch, M., 2006. Intron Size, Abundance, and Distribution within Untranslated Regions of Genes. *Mol. Biol. Evol.* 23, 2392–2404. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl111>
- Hönig, A., Auboeuf, D., Parker, M.M., O’Malley, B.W., Berget, S.M., 2002. Regulation of Alternative Splicing by the ATP-Dependent DEAD-Box RNA Helicase p72. *Mol. Cell. Biol.* 22, 5698–5707. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.16.5698-5707.2002>
- Hozak, P., Cook, P.R., Schofer, C., Mosgoller, W., Wachtler, F., 1994. Site of transcription of ribosomal RNA and intranucleolar structure in HeLa cells. *J. Cell Sci.* 107, 639–648. <https://doi.org/10.1242/jcs.107.2.639>
- Hu, Q., Kim, E.J., Feng, J., Grant, G.R., Heller, E.A., 2017. Histone posttranslational modifications predict specific alternative exon subtypes in mammalian brain. *PLOS Comput. Biol.* 13, e1005602. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005602>
- Huang, B., Yang, X.-D., Lamb, A., Chen, L.-F., 2010. Posttranslational modifications of NF- κ B: another layer of regulation for NF- κ B signaling pathway. *Cell. Signal.* 22, 1282–1290. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.03.017>
- Huang, J., Ren, T., Guan, H., Jiang, Y., Cheng, H., 2009. HTLV-1 Tax is a critical lipid raft modulator that hijacks I κ B kinases to the microdomains for persistent activation of NF- κ B. *J. Biol. Chem.* 284, 6208–6217. <https://doi.org/10.1074/jbc.M806390200>
- Huang, Y., Li, W., Yao, X., Lin, Q., Yin, J., Liang, Y., Heiner, M., Tian, B., Hui, J., Wang, G., 2012. Mediator Complex Regulates Alternative mRNA Processing via the Med23 Subunit. *Mol. Cell* 45, 459–469. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.12.022>
- Huo, X., Ji, L., Zhang, Y., Lv, P., Cao, X., Wang, Q., Yan, Z., Dong, S., Du, D., Zhang, F., Wei, G., Liu, Y., Wen, B., 2020. The Nuclear Matrix Protein SAFB Cooperates with Major Satellite RNAs to Stabilize Heterochromatin Architecture Partially through Phase Separation. *Mol. Cell* 77, 368–383.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.001>

- Iborra, F.J., Pombo, A., Jackson, D.A., Cook, P.R., 1996. Active RNA polymerases are localized within discrete transcription “factories” in human nuclei. *J. Cell Sci.* 109, 1427–1436. <https://doi.org/10.1242/jcs.109.6.1427>
- Igakura, T., Stinchcombe, J.C., Goon, P.K.C., Taylor, G.P., Weber, J.N., Griffiths, G.M., Tanaka, Y., Osame, M., Bangham, C.R.M., 2003. Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* 299, 1713–1716. <https://doi.org/10.1126/science.1080115>
- Ilik, İ.A., Malszycki, M., Lübke, A.K., Schade, C., Meierhofer, D., Aktaş, T., 2020. SON and SRRM2 are essential for nuclear speckle formation. *eLife* 9, e60579. <https://doi.org/10.7554/eLife.60579>
- Ip, J.Y., Schmidt, D., Pan, Q., Ramani, A.K., Fraser, A.G., Odom, D.T., Blencowe, B.J., 2011. Global impact of RNA polymerase II elongation inhibition on alternative splicing regulation. *Genome Res.* 21, 390–401. <https://doi.org/10.1101/gr.111070.110>
- Ishov, A.M., Gurumurthy, A., Bungert, J., 2020. Coordination of transcription, processing, and export of highly expressed RNAs by distinct biomolecular condensates. *Emerg. Top. Life Sci.* 4, 281–291. <https://doi.org/10.1042/ETLS20190160>
- Itabashi, K., Miyazawa, T., 2021. Mother-to-Child Transmission of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1: Mechanisms and Nutritional Strategies for Prevention. *Cancers* 13, 4100. <https://doi.org/10.3390/cancers13164100>
- Iwai, K., Mori, N., Oie, M., Yamamoto, N., Fujii, M., 2001. Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Protein Activates Transcription through AP-1 Site by Inducing DNA Binding Activity in T Cells. *Virology* 279, 38–46. <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0669>
- Iwanaga, R., Ozono, E., Fujisawa, J., Ikeda, M.-A., Okamura, N., Huang, Y., Ohtani, K., 2008. Activation of the cyclin D2 and cdk6 genes through NF- κ B is critical for cell-cycle progression induced by HTLV-I Tax. *Oncogene* 27, 5635–42. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.174>
- Jackson, D.A., Hassan, A.B., Errington, R.J., Cook, P.R., 1993. Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *EMBO J.* 12, 1059–1065.
- Jackson, D.A., Iborra, F.J., Manders, E.M.M., Cook, P.R., 1998. Numbers and Organization of RNA Polymerases, Nascent Transcripts, and Transcription Units in HeLa Nuclei. *Mol. Biol. Cell* 9, 1523–1536.
- Jeang, K.T., Widen, S.G., Semmes, O.J., Wilson, S.H., 1990. HTLV-I trans-activator protein, tax, is a trans-repressor of the human beta-polymerase gene. *Science* 247, 1082–1084. <https://doi.org/10.1126/science.2309119>
- Jeong, S.-J., Lu, H., Cho, W.-K., Park, H.U., Pise-Masison, C., Brady, J.N., 2006. Coactivator-Associated Arginine Methyltransferase 1 Enhances Transcriptional Activity of the Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Long Terminal Repeat through Direct Interaction with Tax. *J. Virol.* 80, 10036–10044. <https://doi.org/10.1128/JVI.00186-06>

- Jiang, H., Lu, H., Schiltz, R.L., Pise-Masison, C.A., Ogryzko, V.V., Nakatani, Y., Brady, J.N., 1999. PCAF interacts with tax and stimulates tax transactivation in a histone acetyltransferase-independent manner. *Mol. Cell. Biol.* 19, 8136–8145. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.12.8136>
- Jin, D.Y., Giordano, V., Kibler, K.V., Nakano, H., Jeang, K.T., 1999. Role of adapter function in oncoprotein-mediated activation of NF-kappaB. Human T-cell leukemia virus type I Tax interacts directly with IkappaB kinase gamma. *J. Biol. Chem.* 274, 17402–17405. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.25.17402>
- Jin, D.Y., Teramoto, H., Giam, C.Z., Chun, R.F., Gutkind, J.S., Jeang, K.T., 1997. A human suppressor of c-Jun N-terminal kinase 1 activation by tumor necrosis factor alpha. *J. Biol. Chem.* 272, 25816–25823. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.41.25816>
- Jin, F., Li, Y., Dixon, J.R., Selvaraj, S., Ye, Z., Lee, A.Y., Yen, C.-A., Schmitt, A.D., Espinoza, C.A., Ren, B., 2013. A high-resolution map of the three-dimensional chromatin interactome in human cells. *Nature* 503, 290–294. <https://doi.org/10.1038/nature12644>
- Jones, K.S., Fugo, K., Petrow-Sadowski, C., Huang, Y., Bertolette, D.C., Lisinski, I., Cushman, S.W., Jacobson, S., Ruscetti, F.W., 2006. Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 (HTLV-1) and HTLV-2 Use Different Receptor Complexes To Enter T Cells. *J. Virol.* 80, 8291–8302. <https://doi.org/10.1128/JVI.00389-06>
- Jones, K.S., Petrow-Sadowski, C., Bertolette, D.C., Huang, Y., Ruscetti, F.W., 2005. Heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of human T-cell leukemia virus type 1 virions into CD4+ T cells. *J. Virol.* 79, 12692–12702. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.20.12692-12702.2005>
- Jones, P.L., Ping, D., Boss, J.M., 1997. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta regulate the murine manganese superoxide dismutase gene through a complex intronic enhancer involving C/EBP-beta and NF-kappaB. *Mol. Cell. Biol.* 17, 6970–6981. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.12.6970>
- Journo, C., Filipe, J., About, F., Chevalier, S.A., Afonso, P.V., Brady, J.N., Flynn, D., Tangy, F., Israël, A., Vidalain, P.-O., Mahieux, R., Weil, R., 2009. NRP/Optineurin Cooperates with TAX1BP1 to Potentiate the Activation of NF-κB by Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Tax Protein. *PLoS Pathog.* 5, e1000521. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000521>
- Kamoi, K., Yamamoto, K., Misawa, A., Miyake, A., Ishida, T., Tanaka, Y., Mochizuki, M., Watanabe, T., 2006. SUV39H1 interacts with HTLV-1 Tax and abrogates Tax transactivation of HTLV-1 LTR. *Retrovirology* 3, 5. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-3-5>
- Kao, S.Y., Marriott, S.J., 1999. Disruption of nucleotide excision repair by the human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *J. Virol.* 73, 4299–4304. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.5.4299-4304.1999>
- Kar, A., Fushimi, K., Zhou, X., Ray, P., Shi, C., Chen, X., Liu, Z., Chen, S., Wu, J.Y., 2011. RNA Helicase p68 (DDX5) Regulates tau Exon 10 Splicing by Modulating a Stem-Loop

- Structure at the 5' Splice Site. *Mol. Cell. Biol.* 31, 1812–1821. <https://doi.org/10.1128/MCB.01149-10>
- Karki, S., Banerjee, S., Mclean, K., Dinner, A., Clark, M.R., 2019a. Transcription factories in Igk allelic choice and diversity. *Adv. Immunol.* 141, 33–49. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2018.11.001>
- Karki, S., Banerjee, S., Mclean, K., Dinner, A., Clark, M.R., 2019b. Chapter Two - Transcription factories in Igk allelic choice and diversity, in: Alt, F. (Ed.), *Advances in Immunology*. Academic Press, pp. 33–49. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2018.11.001>
- Kataoka, K., Nagata, Y., Kitanaka, A., Shiraishi, Y., Shimamura, T., Yasunaga, J., Totoki, Y., Chiba, K., Sato-Otsubo, A., Nagae, G., Ishii, R., Muto, S., Kotani, S., Watatani, Y., Takeda, J., Sanada, M., Tanaka, H., Suzuki, H., Sato, Y., Shiozawa, Y., Yoshizato, T., Yoshida, K., Makishima, H., Iwanaga, M., Ma, G., Nosaka, K., Hishizawa, M., Itonaga, H., Imaizumi, Y., Munakata, W., Ogasawara, H., Sato, T., Sasai, K., Muramoto, K., Penova, M., Kawaguchi, T., Nakamura, H., Hama, N., Shide, K., Kubuki, Y., Hidaka, T., Kameda, T., Nakamaki, T., Ishiyama, K., Miyawaki, S., Yoon, S.-S., Tobinai, K., Miyazaki, Y., Takaori-Kondo, A., Matsuda, F., Takeuchi, K., Nureki, O., Aburatani, H., Watanabe, T., Shibata, T., Matsuoka, M., Miyano, S., Shimoda, K., Ogawa, S., 2015. Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nat. Genet.* 47, 1304–1315. <https://doi.org/10.1038/ng.3415>
- Khan, D.H., Gonzalez, C., Cooper, C., Sun, J.-M., Chen, H.Y., Healy, S., Xu, W., Smith, K.T., Workman, J.L., Leygue, E., Davie, J.R., 2014. RNA-dependent dynamic histone acetylation regulates MCL1 alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 42, 1656–1670. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1134>
- Khodor, Y.L., Rodriguez, J., Abruzzi, K.C., Tang, C.-H.A., Marr, M.T., Rosbash, M., 2011. Nascent-seq indicates widespread cotranscriptional pre-mRNA splicing in *Drosophila*. *Genes Dev.* 25, 2502–2512. <https://doi.org/10.1101/gad.178962.111>
- Kibler, K.V., Jeang, K.T., 2001. CREB/ATF-dependent repression of cyclin a by human T-cell leukemia virus type 1 Tax protein. *J. Virol.* 75, 2161–2173. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.5.2161-2173.2001>
- Kikutake, C., Suyama, M., 2022. Pan-cancer analysis of mutations in open chromatin regions and their possible association with cancer pathogenesis. *Cancer Med.* 11, 3902–3916. <https://doi.org/10.1002/cam4.4749>
- Kim, J., Venkata, N.C., Hernandez Gonzalez, G.A., Khanna, N., Belmont, A.S., 2019. Gene expression amplification by nuclear speckle association. *J. Cell Biol.* 219, e201904046. <https://doi.org/10.1083/jcb.201904046>
- Kim, J.-W., Jang, S.-M., Kim, C.-H., An, J.-H., Kang, E.-J., Choi, K.-H., 2012. New Molecular Bridge between RelA/p65 and NF- κ B Target Genes via Histone Acetyltransferase TIP60 Cofactor. *J. Biol. Chem.* 287, 7780–7791. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.278465>

- Kim, S., Shendure, J., 2019. Mechanisms of Interplay between Transcription Factors and the 3D Genome. *Mol. Cell* 76, 306–319. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.010>
- Kim, S.J., Kehrl, J.H., Burton, J., Tendler, C.L., Jeang, K.T., Danielpour, D., Thevenin, C., Kim, K.Y., Sporn, M.B., Roberts, A.B., 1990. Transactivation of the transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) gene by human T lymphotropic virus type 1 tax: a potential mechanism for the increased production of TGF-beta 1 in adult T cell leukemia. *J. Exp. Med.* 172, 121–129. <https://doi.org/10.1084/jem.172.1.121>
- Kinjo, T., Ham-Terhune, J., Peloponese, J.-M., Jeang, K.-T., 2010. Induction of Reactive Oxygen Species by Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Correlates with DNA Damage and Expression of Cellular Senescence Marker. *J. Virol.* 84, 5431–5437. <https://doi.org/10.1128/JVI.02460-09>
- Kirk, P.D.W., Huvet, M., Melamed, A., Maertens, G.N., Bangham, C.R.M., 2016. Retroviruses integrate into a shared, non-palindromic DNA motif. *Nat. Microbiol.* 2, 1–6. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.212>
- Kitajima, I., Shinohara, T., Bilakovics, J., Brown, D.A., Xu, X., Nerenberg, M., 1992. Ablation of Transplanted HTLV-I Tax-Transformed Tumors in Mice by Antisense Inhibition of NF- κ B. *Science* 258, 1792–1795. <https://doi.org/10.1126/science.1299224>
- Kogure, Y., Kataoka, K., 2017. Genetic alterations in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Sci.* 108, 1719–1725. <https://doi.org/10.1111/cas.13303>
- Kolasinska-Zwierz, P., Down, T., Latorre, I., Liu, T., Liu, X.S., Ahringer, J., 2009. Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. *Nat. Genet.* 41, 376–381. <https://doi.org/10.1038/ng.322>
- Kolovos, P., Georgomanolis, T., Koeflerle, A., Larkin, J.D., Brant, L., Nikolicć, M., Gusmao, E.G., Zirkel, A., Knoch, T.A., van Ijcken, W.F., Cook, P.R., Costa, I.G., Grosveld, F.G., Papantonis, A., 2016. Binding of nuclear factor κ B to noncanonical consensus sites reveals its multimodal role during the early inflammatory response. *Genome Res.* 26, 1478–1489. <https://doi.org/10.1101/gr.210005.116>
- Kornblihtt, A.R., Schor, I.E., Alló, M., Dujardin, G., Petrillo, E., Muñoz, M.J., 2013. Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 153–165. <https://doi.org/10.1038/nrm3525>
- Koyanagi, Y., Itoyama, Y., Nakamura, N., Takamatsu, K., Kira, J.-I., Iwamasa, T., Goto, I., Yamamoto, N., 1993. In Vivo Infection of Human T-Cell Leukemia Virus Type I in Non-T Cells. *Virology* 196, 25–33. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1451>
- Kuo, L.J., Yang, L.-X., 2008. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *Vivo Athens Greece* 22, 305–309.
- Kuo, Y.-L., Giam, C.-Z., 2006. Activation of the anaphase promoting complex by HTLV-1 tax leads to senescence. *EMBO J.* 25, 1741–1752. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601054>

- Kurita, D., Yasunaga, J., Tanaka, A., Mohamed, M., Matsuoka, M., 2018. Dynamic Changes of Chromatin Structure and Transcriptome By Transient Expression of HTLV-1 Tax in ATL Cells. *Blood* 132, 4094. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-111125>
- Lambert, M.-P., Terrone, S., Giraud, G., Benoit-Pilven, C., Cluet, D., Combaret, V., Mortreux, F., Auboeuf, D., Bourgeois, C.F., 2018. The RNA helicase DDX17 controls the transcriptional activity of REST and the expression of proneural microRNAs in neuronal differentiation. *Nucleic Acids Res.* 46, 7686–7700. <https://doi.org/10.1093/nar/gky545>
- Lambert, S., Bouttier, M., Vassy, R., Seigneuret, M., Petrow-Sadowski, C., Janvier, S., Heveker, N., Ruscetti, F.W., Perret, G., Jones, K.S., Pique, C., 2009. HTLV-1 uses HSPG and neuropilin-1 for entry by molecular mimicry of VEGF165. *Blood* 113, 5176–5185. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-150342>
- Lamsoul, I., Lodewick, J., Lebrun, S., Brasseur, R., Burny, A., Gaynor, R.B., Bex, F., 2005. Exclusive ubiquitination and sumoylation on overlapping lysine residues mediate NF-kappaB activation by the human T-cell leukemia virus tax oncoprotein. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10391–10406. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.23.10391-10406.2005>
- Lanoix, J., Lacoste, J., Pepin, N., Rice, N., Hiscott, J., 1994. Overproduction of NFkB2 (I κ B) and c-Rel: a mechanism for HTLV-I Tax-mediated trans-activation via the NF-kappa B signalling pathway. *Oncogene* 9, 841–852.
- Larkin, J.D., Papantonis, A., Cook, P.R., Marenduzzo, D., 2013. Space exploration by the promoter of a long human gene during one transcription cycle. *Nucleic Acids Res.* 41, 2216–2227. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1441>
- Larson, A.G., Elnatan, D., Keenen, M.M., Trnka, M.J., Johnston, J.B., Burlingame, A.L., Agard, D.A., Redding, S., Narlikar, G.J., 2017. Liquid droplet formation by HP1 α suggests a role for phase separation in heterochromatin. *Nature* 547, 236–240. <https://doi.org/10.1038/nature22822>
- Lawrence, T., Bebiec, M., Liu, G.Y., Nizet, V., Karin, M., 2005. IKK α limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature* 434, 1138–1143. <https://doi.org/10.1038/nature03491>
- Lee, D.K., Kim, B.-C., Brady, J.N., Jeang, K.-T., Kim, S.-J., 2002. Human T-cell lymphotropic virus type 1 tax inhibits transforming growth factor-beta signaling by blocking the association of Smad proteins with Smad-binding element. *J. Biol. Chem.* 277, 33766–33775. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200150200>
- Lee, J.-H., Wang, R., Xiong, F., Krakowiak, J., Liao, Z., Nguyen, P.T., Moroz-Omori, E.V., Shao, J., Zhu, X., Bolt, M.J., Wu, H., Singh, P.K., Bi, M., Shi, C.J., Jamal, N., Li, G., Mistry, R., Jung, S.Y., Tsai, K.-L., Ferreon, J.C., Stossi, F., Cafilisch, A., Liu, Z., Mancini, M.A., Li, W., 2021. Enhancer RNA m6A methylation facilitates transcriptional condensate formation and gene activation. *Mol. Cell* 81, 3368–3385.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.07.024>

- Lee, Y., Rio, D.C., 2015. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annu. Rev. Biochem.* 84, 291–323. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060614-034316>
- Lemasson, I., Polakowski, N.J., Laybourn, P.J., Nyborg, J.K., 2006. Tax-dependent displacement of nucleosomes during transcriptional activation of human T-cell leukemia virus type 1. *J. Biol. Chem.* 281, 13075–13082. <https://doi.org/10.1074/jbc.M512193200>
- Leung, T.H., Hoffmann, A., Baltimore, D., 2004. One Nucleotide in a κ B Site Can Determine Cofactor Specificity for NF- κ B Dimers. *Cell* 118, 453–464. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.007>
- Li, G., Ruan, X., Auerbach, R.K., Sandhu, K.S., Zheng, M., Wang, P., Poh, H.M., Goh, Y., Lim, J., Zhang, J., Sim, H.S., Peh, S.Q., Mulawadi, F.H., Ong, C.T., Orlov, Y.L., Hong, S., Zhang, Z., Landt, S., Raha, D., Euskirchen, G., Wei, C.-L., Ge, W., Wang, H., Davis, C., Fisher, K., Mortazavi, A., Gerstein, M., Gingeras, T., Wold, B., Sun, Y., Fullwood, M.J., Cheung, E., Liu, E., Sung, W.-K., Snyder, M., Ruan, Y., 2012. Extensive Promoter-centered Chromatin Interactions Provide a Topological Basis for Transcription Regulation. *Cell* 148, 84–98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.014>
- Li, X., Zhao, Y., Tian, B., Jamaluddin, M., Mitra, A., Yang, J., Rowicka, M., Brasier, A.R., Kudlicki, A., 2014. Modulation of Gene Expression Regulated by the Transcription Factor NF- κ B/RelA. *J. Biol. Chem.* 289, 11927–11944. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.539965>
- Liao, S.E., Regev, O., 2021. Splicing at the phase-separated nuclear speckle interface: a model. *Nucleic Acids Res.* 49, 636–645. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1209>
- Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., Sandstrom, R., Bernstein, B., Bender, M.A., Groudine, M., Gnirke, A., Stamatoyannopoulos, J., Mirny, L.A., Lander, E.S., Dekker, J., 2009. Comprehensive mapping of long range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* 326, 289–293. <https://doi.org/10.1126/science.1181369>
- Lim, C.-A., Yao, F., Wong, J.J.-Y., George, J., Xu, H., Chiu, K.P., Sung, W.-K., Lipovich, L., Vega, V.B., Chen, J., Shahab, A., Zhao, X.D., Hibberd, M., Wei, C.-L., Lim, B., Ng, H.-H., Ruan, Y., Chin, K.-C., 2007. Genome-wide Mapping of RELA(p65) Binding Identifies E2F1 as a Transcriptional Activator Recruited by NF- κ B upon TLR4 Activation. *Mol. Cell* 27, 622–635. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.06.038>
- Lin, C., Yang, L., Yang, J.J., Huang, Y., Liu, Z.-R., 2005. ATPase/Helicase Activities of p68 RNA Helicase Are Required for Pre-mRNA Splicing but Not for Assembly of the Spliceosome. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7484–7493. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.17.7484-7493.2005>
- Lin, H.-C., Hickey, M., Hsu, L., Medina, D., Rabson, A.B., 2005. Activation of human T cell leukemia virus type 1 LTR promoter and cellular promoter elements by T cell receptor signaling and HTLV-1 Tax expression. *Virology* 339, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.05.015>

- Lin, R., Gewert, D., Hiscott, J., 1995. Differential Transcriptional Activation in Vitro by NF- κ B/Rel Proteins (*). *J. Biol. Chem.* 270, 3123–3131. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.7.3123>
- Lin, S., Coutinho-Mansfield, G., Wang, D., Pandit, S., Fu, X.-D., 2008. The splicing factor SC35 has an active role in transcriptional elongation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 819–826. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1461>
- Liu, Y., Nanni, L., Sungalee, S., Zufferey, M., Tavernari, D., Mina, M., Ceri, S., Oricchio, E., Ciriello, G., 2021. Systematic inference and comparison of multi-scale chromatin sub-compartments connects spatial organization to cell phenotypes. *Nat. Commun.* 12, 2439. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22666-3>
- Liu, Y., Wang, Y., Yamakuchi, M., Masuda, S., Tokioka, T., Yamaoka, S., Maruyama, I., Kitajima, I., 2001. Phosphoinositide-3 kinase-PKB/Akt pathway activation is involved in fibroblast Rat-1 transformation by human T-cell leukemia virus type I tax. *Oncogene* 20, 2514–2526. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204364>
- Llères, D., Moindrot, B., Pathak, R., Piras, V., Matelot, M., Pignard, B., Marchand, A., Poncelet, M., Perrin, A., Tellier, V., Feil, R., Noordermeer, D., 2019. CTCF modulates allele-specific sub-TAD organization and imprinted gene activity at the mouse Dlk1-Dio3 and Igf2-H19 domains. *Genome Biol.* 20, 272. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1896-8>
- Lodewick, J., Lamsoul, I., Polania, A., Lebrun, S., Burny, A., Ratner, L., Bex, F., 2009. Acetylation of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein by p300 promotes activation of the NF-kappaB pathway. *Virology* 386, 68–78. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.12.043>
- Long, J.C., Caceres, J.F., 2008. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem. J.* 417, 15–27. <https://doi.org/10.1042/BJ20081501>
- Longo, D.L., Gelmann, E.P., Cossman, J., Young, R.A., Gallo, R.C., O'Brien, S.J., Matis, L.A., 1984. Isolation of HTLV-transformed B-lymphocyte clone from a patient with HTLV-associated adult T-cell leukaemia. *Nature* 310, 505–506. <https://doi.org/10.1038/310505a0>
- Loomis, R.J., Naoe, Y., Parker, J.B., Savic, V., Bozovsky, M.R., Macfarlan, T., Manley, J.L., Chakravarti, D., 2009. Chromatin Binding of SRp20 and ASF/SF2 and Dissociation from Mitotic Chromosomes Is Modulated by Histone H3 Serine 10 Phosphorylation. *Mol. Cell* 33, 450–461. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.02.003>
- Lu, H., Pise-Masison, C.A., Linton, R., Park, H.U., Schiltz, R.L., Sartorelli, V., Brady, J.N., 2004. Tax relieves transcriptional repression by promoting histone deacetylase 1 release from the human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *J. Virol.* 78, 6735–6743. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.13.6735-6743.2004>
- Lu, X., Chen, Q., Liu, H., Zhang, X., 2021. Interplay Between Non-Canonical NF- κ B Signaling and Hepatitis B Virus Infection. *Front. Immunol.* 12.

- Luco, R.F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B.J., Pereira-Smith, O.M., Misteli, T., 2010. Regulation of Alternative Splicing by Histone Modifications. *Science* 327, 996–1000. <https://doi.org/10.1126/science.1184208>
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., Richmond, T.J., 1997. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260. <https://doi.org/10.1038/38444>
- Lunning, M.A., Mehta-Shah, N., Horwitz, S.M., 2020. Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma, in: *Abeloff's Clinical Oncology*. Elsevier, pp. 1965-1974.e3. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47674-4.00105-5>
- Lupiáñez, D.G., Kraft, K., Heinrich, V., Krawitz, P., Brancati, F., Klopocki, E., Horn, D., Kayserili, H., Opitz, J.M., Laxova, R., Santos-Simarro, F., Gilbert-Dussardier, B., Wittler, L., Borschiwer, M., Haas, S.A., Osterwalder, M., Franke, M., Timmermann, B., Hecht, J., Spielmann, M., Visel, A., Mundlos, S., 2015. Disruptions of Topological Chromatin Domains Cause Pathogenic Rewiring of Gene-Enhancer Interactions. *Cell* 161, 1012–1025. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.004>
- Lyngdoh, D.L., Shukla, H., Sonkar, A., Anupam, R., Tripathi, T., 2019. Portrait of the Intrinsically Disordered Side of the HTLV-1 Proteome. *ACS Omega* 4, 10003–10018. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b01017>
- Maeda, M., Tanabe-Shibuya, J., Miyazato, P., Masutani, H., Yasunaga, J., Usami, K., Shimizu, A., Matsuoka, M., 2020. IL-2/IL-2 Receptor Pathway Plays a Crucial Role in the Growth and Malignant Transformation of HTLV-1-Infected T Cells to Develop Adult T-Cell Leukemia. *Front. Microbiol.* 11, 356. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00356>
- Mahgoub, M., Yasunaga, J., Iwami, S., Nakaoka, S., Koizumi, Y., Shimura, K., Matsuoka, M., 2018. 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.* 115, E1269–E1278. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715724115>
- Majorovits, E., Nejmeddine, M., Tanaka, Y., Taylor, G.P., Fuller, S.D., Bangham, C.R.M., 2008. Human T-Lymphotropic Virus-1 Visualized at the Virological Synapse by Electron Tomography. *PLOS ONE* 3, e2251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002251>
- Manel, N., Kim, F.J., Kinet, S., Taylor, N., Sitbon, M., Battini, J.-L., 2003. The Ubiquitous Glucose Transporter GLUT-1 Is a Receptor for HTLV. *Cell* 115, 449–459. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00881-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00881-X)
- Mao, Y.S., Zhang, B., Spector, D.L., 2011. Biogenesis and Function of Nuclear Bodies. *Trends Genet.* TIG 27, 295–306. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.05.006>
- Mariner, J.M., Lantz, V., Waldmann, T.A., Azimi, N., 2001. Human T Cell Lymphotropic Virus Type I Tax Activates IL-15R α Gene Expression Through an NF- κ B Site. *J. Immunol.* 166, 2602–2609. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.4.2602>

- Marino, M.M., Rega, C., Russo, R., Valletta, M., Gentile, M.T., Esposito, S., Baglivo, I., De Feis, I., Angelini, C., Xiao, T., Felsenfeld, G., Chambery, A., Pedone, P.V., 2019. Interactome mapping defines BRG1, a component of the SWI/SNF chromatin remodeling complex, as a new partner of the transcriptional regulator CTCF. *J. Biol. Chem.* 294, 861–873. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004882>
- Marriott, S.J., Semmes, O.J., 2005. Impact of HTLV-I Tax on cell cycle progression and the cellular DNA damage repair response. *Oncogene* 24, 5986–5995. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208976>
- Martella, C., Tollenaere, A.I., Waast, L., Lacombe, B., Groussaud, D., Margottin-Goguet, F., Ramirez, B.C., Pique, C., 2020. Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Transactivator Tax Exploits the XPB Subunit of TFIIH during Viral Transcription. *J. Virol.* 94, e02171-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.02171-19>
- Martella, C., Waast, L., Pique, C., 2022. Tax, marionnettiste de la transcription du HTLV-1. *médecine/sciences* 38, 359–365. <https://doi.org/10.1051/medsci/2022039>
- Martin, E.W., Holehouse, A.S., 2020. Intrinsically disordered protein regions and phase separation: sequence determinants of assembly or lack thereof. *Emerg. Top. Life Sci.* 4, 307–329. <https://doi.org/10.1042/ETLS20190164>
- Martin, J.L., Maldonado, J.O., Mueller, J.D., Zhang, W., Mansky, L.M., 2016. Molecular Studies of HTLV-1 Replication: An Update. *Viruses* 8, 31. <https://doi.org/10.3390/v8020031>
- Martin, S., Pombo, A., 2003. Transcription factories: quantitative studies of nanostructures in the mammalian nucleus. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* 11, 461–470. <https://doi.org/10.1023/a:1024926710797>
- Martone, R., Euskirchen, G., Bertone, P., Hartman, S., Royce, T.E., Luscombe, N.M., Rinn, J.L., Nelson, F.K., Miller, P., Gerstein, M., Weissman, S., Snyder, M., 2003. Distribution of NF-B-binding sites across human chromosome 22. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 12247–12252. <https://doi.org/10.1073/pnas.2135255100>
- Matsuo, M., Ueno, T., Monde, K., Sugata, K., Tan, B.J.Y., Rahman, A., Miyazato, P., Uchiyama, K., Islam, S., Katsuya, H., Nakajima, S., Tokunaga, M., Nosaka, K., Hata, H., Utsunomiya, A., Fujisawa, J., Satou, Y., 2022. Identification and characterization of a novel enhancer in the HTLV-1 proviral genome. *Nat. Commun.* 13, 2405. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30029-9>
- Matsuoka, M., Jeang, K.-T., 2007. Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. *Nat. Rev. Cancer* 7, 270–280. <https://doi.org/10.1038/nrc2111>
- McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S.D., Wickens, M., Bentley, D.L., 1997. The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* 385, 357–361. <https://doi.org/10.1038/385357a0>

- McGinty, R.K., Tan, S., 2015. Nucleosome Structure and Function. *Chem. Rev.* 115, 2255–2273. <https://doi.org/10.1021/cr500373h>
- McManus, C.J., Graveley, B.R., 2011. RNA structure and the mechanisms of alternative splicing. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 373–379. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.04.001>
- Melamed, A., Fitzgerald, T.W., Wang, Y., Ma, J., Birney, E., Bangham, C.R.M., 2022. Selective clonal persistence of human retroviruses in vivo: Radial chromatin organization, integration site, and host transcription. *Sci. Adv.* 8, eabm6210. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abm6210>
- Melamed, A., Laydon, D.J., Gillet, N.A., Tanaka, Y., Taylor, G.P., Bangham, C.R.M., 2013. Genome-wide Determinants of Proviral Targeting, Clonal Abundance and Expression in Natural HTLV-1 Infection. *PLOS Pathog.* 9, e1003271. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003271>
- Melnik, S., Deng, B., Papantonis, A., Baboo, S., Carr, I.M., Cook, P.R., 2011. The proteomes of transcription factories containing RNA polymerases I, II or III. *Nat. Methods* 8, 963–968. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1705>
- Mercer, T.R., Edwards, S.L., Clark, M.B., Neph, S.J., Wang, H., Stergachis, A.B., John, S., Sandstrom, R., Li, G., Sandhu, K.S., Ruan, Y., Nielsen, L.K., Mattick, J.S., Stamatoyannopoulos, J.A., 2013. DNase I-hypersensitive exons colocalize with promoters and distal regulatory elements. *Nat. Genet.* 45, 852–859. <https://doi.org/10.1038/ng.2677>
- Misteli, T., Cáceres, J.F., Spector, D.L., 1997. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. *Nature* 387, 523–527. <https://doi.org/10.1038/387523a0>
- Mitchell, J.A., Fraser, P., 2008. Transcription factories are nuclear subcompartments that remain in the absence of transcription. *Genes Dev.* 22, 20–25. <https://doi.org/10.1101/gad.454008>
- Mizuguchi, M., Asao, H., Hara, T., Higuchi, M., Fujii, M., Nakamura, M., 2009. Transcriptional activation of the interleukin-21 gene and its receptor gene by human T-cell leukemia virus type 1 Tax in human T-cells. *J. Biol. Chem.* 284, 25501–25511. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.010959>
- Mocquet, V., Neusiedler, J., Rende, F., Cluet, D., Robin, J.-P., Terme, J.-M., Duc Dodon, M., Wittmann, J., Morris, C., Le Hir, H., Ciminale, V., Jalinot, P., 2012. The Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Tax Protein Inhibits Nonsense-Mediated mRNA Decay by Interacting with INT6/EIF3E and UPF1. *J. Virol.* 86, 7530–7543. <https://doi.org/10.1128/JVI.07021-11>
- Moen, P.T., Johnson, C.V., Byron, M., Shopland, L.S., de la Serna, I.L., Imbalzano, A.N., Lawrence, J.B., 2004. Repositioning of muscle-specific genes relative to the periphery of SC-35 domains during skeletal myogenesis. *Mol. Biol. Cell* 15, 197–206. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-06-0388>

- Moldón, A., Malapeira, J., Gabrielli, N., Gogol, M., Gómez-Escoda, B., Ivanova, T., Seidel, C., Ayté, J., 2008. Promoter-driven splicing regulation in fission yeast. *Nature* 455, 997–1000. <https://doi.org/10.1038/nature07325>
- Monahan, K., Horta, A., Lomvardas, S., 2019. LHX2- and LDB1-mediated trans interactions regulate olfactory receptor choice. *Nature* 565, 448–453. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0845-0>
- Mori, N., Mukaida, N., Ballard, D.W., Matsushima, K., Yamamoto, N., 1998. Human T-cell leukemia virus type I Tax transactivates human interleukin 8 gene through acting concurrently on AP-1 and nuclear factor-kappaB-like sites. *Cancer Res.* 58, 3993–4000.
- Morris, C., Wittmann, J., Jäck, H.-M., Jalinot, P., 2007. Human INT6/eIF3e is required for nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO Rep.* 8, 596–602. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400955>
- Morrison, D.K., 2012. MAP Kinase Pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a011254. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011254>
- Mortillaro, M.J., Blencowe, B.J., Wei, X., Nakayasu, H., Du, L., Warren, S.L., Sharp, P.A., Berezney, R., 1996. A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNA polymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 8253–8257. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.16.8253>
- Mozzherin, D.Ju., Shibutani, S., Tan, C.-K., Downey, K.M., Fisher, P.A., 1997. Proliferating cell nuclear antigen promotes DNA synthesis past template lesions by mammalian DNA polymerase δ . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 6126–6131.
- Mulloy, J.C., Kislyakova, T., Cereseto, A., Casareto, L., LoMonico, A., Fullen, J., Lorenzi, M.V., Cara, A., Nicot, C., Giam, C., Franchini, G., 1998. Human T-cell lymphotropic/leukemia virus type 1 Tax abrogates p53-induced cell cycle arrest and apoptosis through its CREB/ATF functional domain. *J. Virol.* 72, 8852–8860. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.11.8852-8860.1998>
- Muñoz, M.J., de la Mata, M., Kornblihtt, A.R., 2010. The carboxy terminal domain of RNA polymerase II and alternative splicing. *Trends Biochem. Sci.* 35, 497–504. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.03.010>
- Murphy, E.L., Lee, T.-H., Chafets, D., Nass, C.C., Wang, B., Loughlin, K., Smith, D., for the HTLV Outcomes Study Investigators, 2004. Higher Human T Lymphotropic Virus (HTLV) Provirus Load Is Associated with HTLV-I versus HTLV-II, with HTLV-II Subtype A versus B, and with Male Sex and a History of Blood Transfusion. *J. Infect. Dis.* 190, 504–510. <https://doi.org/10.1086/422398>
- Nadella, M.V.P., Shu, S.T., Dirksen, W.P., Thudi, N.K., Nadella, K.S., Fernandez, S.A., Lairmore, M.D., Green, P.L., Rosol, T.J., 2008. Expression of parathyroid hormone-related protein during immortalization of human peripheral blood mononuclear cells by HTLV-1: implications for transformation. *Retrovirology* 5, 46. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-46>

- Nakano, K., Ando, T., Yamagishi, M., Yokoyama, K., Ishida, T., Ohsugi, T., Tanaka, Y., Brighty, D.W., Watanabe, T., 2013. Viral interference with host mRNA surveillance, the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) pathway, through a new function of HTLV-1 Rex: implications for retroviral replication. *Microbes Infect.* 15, 491–505. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.03.006>
- Natoli, G., Chiocca, S., 2008. Nuclear ubiquitin ligases, NF-kappaB degradation, and the control of inflammation. *Sci. Signal.* 1, pe1. <https://doi.org/10.1126/stke.11pe1>
- Nogues, G., Kadener, S., Cramer, P., Bentley, D., Kornblihtt, A.R., 2002. Transcriptional activators differ in their abilities to control alternative splicing. *J. Biol. Chem.* 277, 43110–43114. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208418200>
- Nojima, T., Rebelo, K., Gomes, T., Grosso, A.R., Proudfoot, N.J., Carmo-Fonseca, M., 2018. RNA Polymerase II Phosphorylated on CTD Serine 5 Interacts with the Spliceosome during Co-transcriptional Splicing. *Mol. Cell* 72, 369-379.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.09.004>
- Nott, T.J., Petsalaki, E., Farber, P., Jarvis, D., Fussner, E., Plochowietz, A., Craggs, T.D., Bazett-Jones, D.P., Pawson, T., Forman-Kay, J.D., Baldwin, A.J., 2015. Phase transition of a disordered nuage protein generates environmentally responsive membraneless organelles. *Mol. Cell* 57, 936–947. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.013>
- Nowak, D.E., Tian, B., Jamaluddin, M., Boldogh, I., Vergara, L.A., Choudhary, S., Brasier, A.R., 2008. RelA Ser276 phosphorylation is required for activation of a subset of NF-kappaB-dependent genes by recruiting cyclin-dependent kinase 9/cyclin T1 complexes. *Mol. Cell. Biol.* 28, 3623–3638. <https://doi.org/10.1128/MCB.01152-07>
- Ooi, S.L., Priess, J.R., Henikoff, S., 2006. Histone H3.3 Variant Dynamics in the Germline of *Caenorhabditis elegans*. *PLOS Genet.* 2, e97. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020097>
- Osborne, C.S., Chakalova, L., Brown, K.E., Carter, D., Horton, A., Debrand, E., Goyenechea, B., Mitchell, J.A., Lopes, S., Reik, W., Fraser, P., 2004. Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat. Genet.* 36, 1065–1071. <https://doi.org/10.1038/ng1423>
- O’Sullivan, J.M., Tan-Wong, S.M., Morillon, A., Lee, B., Coles, J., Mellor, J., Proudfoot, N.J., 2004. Gene loops juxtapose promoters and terminators in yeast. *Nat. Genet.* 36, 1014–1018. <https://doi.org/10.1038/ng1411>
- Pahl, H.L., 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853–6866. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203239>
- Pan, W., Meshcheryakov, V.A., Li, T., Wang, Y., Ghosh, G., Wang, V.Y.-F., 2023. Structures of NF-κB p52 homodimer-DNA complexes rationalize binding mechanisms and transcription activation. *eLife* 12, e86258. <https://doi.org/10.7554/eLife.86258>

- Panfil, A.R., Martinez, M.P., Ratner, L., Green, P.L., 2016. Human T-cell Leukemia Virus-associated Malignancy. *Curr. Opin. Virol.* 20, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.08.009>
- Papantonis, A., Cook, P.R., 2013. Transcription Factories: Genome Organization and Gene Regulation. *Chem. Rev.* 113, 8683–8705. <https://doi.org/10.1021/cr300513p>
- Papantonis, A., Kohro, T., Baboo, S., Larkin, J.D., Deng, B., Short, P., Tsutsumi, S., Taylor, S., Kanki, Y., Kobayashi, M., Li, G., Poh, H.-M., Ruan, X., Aburatani, H., Ruan, Y., Kodama, T., Wada, Y., Cook, P.R., 2012. TNF α signals through specialized factories where responsive coding and miRNA genes are transcribed: Specialized transcription factories. *EMBO J.* 31, 4404–4414. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.288>
- Papantonis, A., Larkin, J.D., Wada, Y., Ohta, Y., Ihara, S., Kodama, T., Cook, P.R., 2010. Active RNA Polymerases: Mobile or Immobile Molecular Machines? *PLOS Biol.* 8, e1000419. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000419>
- Park, S.-K., Xiang, Y., Feng, X., Garrard, W.T., 2014. Pronounced cohabitation of active immunoglobulin genes from three different chromosomes in transcription factories during maximal antibody synthesis. *Genes Dev.* 28, 1159–1164. <https://doi.org/10.1101/gad.237479.114>
- Peloponese, J.-M., Iha, H., Yedavalli, V.R.K., Miyazato, A., Li, Y., Haller, K., Benkirane, M., Jeang, K.-T., 2004. Ubiquitination of human T-cell leukemia virus type 1 tax modulates its activity. *J. Virol.* 78, 11686–11695. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.21.11686-11695.2004>
- Peloponese, J.-M., Jeang, K.-T., 2006. Role for Akt/protein kinase B and activator protein-1 in cellular proliferation induced by the human T-cell leukemia virus type 1 tax oncoprotein. *J. Biol. Chem.* 281, 8927–8938. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510598200>
- Pène, S., Waast, L., Bonnet, A., Bénit, L., Pique, C., 2014. A non-SUMOylated tax protein is still functional for NF- κ B pathway activation. *J. Virol.* 88, 10655–10661. <https://doi.org/10.1128/JVI.01827-14>
- Peng, Q., Wang, L., Wang, J., Liu, C., Zheng, X., Zhang, X., Wei, L., Li, Z., Wu, Y., Wen, Y., Cao, P., Liao, Q., Yan, Q., Ma, J., 2021. Epstein–Barr virus EBNA2 phase separation regulates cancer-associated alternative RNA splicing patterns. *Clin. Transl. Med.* 11, e504. <https://doi.org/10.1002/ctm2.504>
- Pessina, F., Giavazzi, F., Yin, Y., Gioia, U., Vitelli, V., Galbiati, A., Barozzi, S., Garre, M., Oldani, A., Flaus, A., Cerbino, R., Parazzoli, D., Rothenberg, E., d’Adda di Fagagna, F., 2019. Functional transcription promoters at DNA double-strand breaks mediate RNA-driven phase separation of damage-response factors. *Nat. Cell Biol.* 21, 1286–1299. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0392-4>
- Petropoulos, L., Lin, R., Hiscott, J., 1996. Human T Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Protein Increases NF- κ B Dimer Formation and Antagonizes the Inhibitory Activity of the I κ B α Regulatory Protein. *Virology* 225, 52–64. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0574>

- Phatnani, H.P., Greenleaf, A.L., 2006. Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev.* 20, 2922–2936. <https://doi.org/10.1101/gad.1477006>
- Phillips, D.M.P., 1963. The presence of acetyl groups in histones. *Biochem. J.* 87, 258–263.
- Phillips-Cremins, J.E., Sauria, M.E.G., Sanyal, A., Gerasimova, T.I., Lajoie, B.R., Bell, J.S.K., Ong, C.-T., Hookway, T.A., Guo, C., Sun, Y., Bland, M.J., Wagstaff, W., Dalton, S., McDevitt, T.C., Sen, R., Dekker, J., Taylor, J., Corces, V.G., 2013. Architectural protein subclasses shape 3-D organization of genomes during lineage commitment. *Cell* 153, 1281–1295. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.053>
- Philpott, S.M., Buehring, G.C., 1999. Defective DNA repair in cells with human T-cell leukemia/bovine leukemia viruses: role of tax gene. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 933–942. <https://doi.org/10.1093/jnci/91.11.933>
- Pise-Masison, C.A., Dittmer, J., Clemens, K.E., Brady, J.N., 1997. Physical and functional interaction between the human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax1 protein and the CCAAT binding protein NF-Y. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1236–1243. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.3.1236>
- Pise-Masison, C.A., Mahieux, R., Jiang, H., Ashcroft, M., Radonovich, M., Duvall, J., Guillermin, C., Brady, J.N., 2000. Inactivation of p53 by human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax requires activation of the NF-kappaB pathway and is dependent on p53 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3377–3386.
- Pise-Masison, C.A., Radonovich, M., Mahieux, R., Chatterjee, P., Whiteford, C., Duvall, J., Guillermin, C., Gessain, A., Brady, J.N., 2002. Transcription Profile of Cells Infected with Human T-cell Leukemia Virus Type I Compared with Activated Lymphocytes. *Cancer Res.* 62, 3562–3571.
- Plancoulaine, S., Gessain, A., Joubert, M., Tortevoeye, P., Jeanne, I., Talarmin, A., de Thé, G., Abel, L., 2000. Detection of a Major Gene Predisposing to Human T Lymphotropic Virus Type I Infection in Children among an Endemic Population of African Origin. *J. Infect. Dis.* 182, 405–412. <https://doi.org/10.1086/315741>
- Poiesz, B.J., Ruscetti, F.W., Gazdar, A.F., Bunn, P.A., Minna, J.D., Gallo, R.C., 1980. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 7415–7419. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.12.7415>
- Portis, T., Harding, J.C., Ratner, L., 2001. The contribution of NF-κB activity to spontaneous proliferation and resistance to apoptosis in human T-cell leukemia virus type 1 Tax-induced tumors. *Blood* 98, 1200–1208. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.4.1200>
- Pradhan, B., Barth, R., Kim, E., Davidson, I.F., Bauer, B., van Laar, T., Yang, W., Ryu, J.-K., van der Torre, J., Peters, J.-M., Dekker, C., 2022. SMC complexes can traverse physical roadblocks bigger than their ring size. *Cell Rep.* 41, 111491. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111491>

- Qin, W., Cho, K.F., Cavanagh, P.E., Ting, A.Y., 2021. Deciphering molecular interactions by proximity labeling. *Nat. Methods* 18, 133–143. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01010-5>
- Quinodoz, S.A., Ollikainen, N., Tabak, B., Palla, A., Schmidt, J.M., Detmar, E., Lai, M.M., Shishkin, A.A., Bhat, P., Takeji, Y., Trinh, V., Aznauryan, E., Russell, P., Cheng, C., Jovanovic, M., Chow, A., Cai, L., McDonel, P., Garber, M., Guttman, M., 2018. Higher-order inter-chromosomal hubs shape 3D genome organization in the nucleus. *Cell* 174, 744–757.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.024>
- Ramanouskaya, T.V., Grinev, V.V., 2017. The determinants of alternative RNA splicing in human cells. *Mol. Genet. Genomics* 292, 1175–1195. <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1350-0>
- Rao, S.S.P., Huntley, M.H., Durand, N.C., Stamenova, E.K., Bochkov, I.D., Robinson, J.T., Sanborn, A., Machol, I., Omer, A.D., Lander, E.S., Aiden, E.L., 2014a. A three-dimensional map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell* 159, 1665–1680. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.021>
- Rao, S.S.P., Huntley, M.H., Durand, N.C., Stamenova, E.K., Bochkov, I.D., Robinson, J.T., Sanborn, A., Machol, I., Omer, A.D., Lander, E.S., Aiden, E.L., 2014b. A three-dimensional map of the human genome at kilobase resolution reveals principles of chromatin looping. *Cell* 159, 1665–1680. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.021>
- Reber, L., Vermeulen, L., Haegeman, G., Frossard, N., 2009. Ser276 phosphorylation of NF- κ B p65 by MSK1 controls SCF expression in inflammation. *PLoS One* 4, e4393. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004393>
- Reddy, T.R., Tang, H., Li, X., Wong-Staal, F., 1997. Functional interaction of the HTLV-1 transactivator Tax with activating transcription factor-4 (ATF4). *Oncogene* 14, 2785–2792. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201119>
- Rickman, D.S., Soong, T.D., Moss, B., Mosquera, J.M., Dlabal, J., Terry, S., MacDonald, T.Y., Tripodi, J., Bunting, K., Najfeld, V., Demichelis, F., Melnick, A.M., Elemento, O., Rubin, M.A., 2012. Oncogene-mediated alterations in chromatin conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 9083–9088. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112570109>
- Riedlinger, T., Liefke, R., Meier-Soelch, J., Jurida, L., Nist, A., Stiewe, T., Kracht, M., Schmitz, M.L., 2019. NF- κ B p65 dimerization and DNA-binding is important for inflammatory gene expression. *FASEB J.* 33, 4188–4202. <https://doi.org/10.1096/fj.201801638R>
- Rizkallah, G., Mahieux, R., Dutartre, H., 2015. Transmission intercellulaire de HTLV-1 - Des mécanismes loin d'être complètement élucidés. *médecine/sciences* 31, 629–637. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153106016>
- Robek, M.D., Ratner, L., 1999. Immortalization of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes by human T-cell leukemia virus type 1 Tax mutants expressed in a functional molecular clone. *J. Virol.* 73, 4856–4865. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.6.4856-4865.1999>

- Romanelli, M., Diani, E., Bergamo, E., Casoli, C., Ciminale, V., Bex, F., Bertazzoni, U., 2013. Highlights on distinctive structural and functional properties of HTLV Tax proteins. *Front. Microbiol.* 4.
- Rossow, K.L., Janknecht, R., 2003. Synergism between p68 RNA helicase and the transcriptional coactivators CBP and p300. *Oncogene* 22, 151–156. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206067>
- Rowley, M.J., Corces, V.G., 2018. Organizational principles of 3D genome architecture. *Nat. Rev. Genet.* 19, 789–800. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0060-8>
- Ruben, S., Poteat, H., Tan, T.-H., Kawakami, K., Roeder, R., Haseltine, W., Rosen, C.A., 1988. Cellular Transcription Factors and Regulation of IL-2 Receptor Gene Expression by HTLV-I tax Gene Product. *Science* 241, 89–92. <https://doi.org/10.1126/science.2838905>
- Ruiz-Velasco, M., Kumar, M., Lai, M.C., Bhat, P., Solis-Pinson, A.B., Reyes, A., Kleinsorg, S., Noh, K.-M., Gibson, T.J., Zaugg, J.B., 2017. CTCF-Mediated Chromatin Loops between Promoter and Gene Body Regulate Alternative Splicing across Individuals. *Cell Syst.* 5, 628-637.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.10.018>
- Sabari, B.R., Dall’Agnese, A., Boija, A., Klein, I.A., Coffey, E.L., Shrinivas, K., Abraham, B.J., Hannett, N.M., Zamudio, A.V., Manteiga, J.C., Li, C.H., Guo, Y.E., Day, D.S., Schuijers, J., Vasile, E., Malik, S., Hnisz, D., Lee, T.I., Cisse, I.I., Roeder, R.G., Sharp, P.A., Chakraborty, A.K., Young, R.A., 2018. Coactivator condensation at super-enhancers links phase separation and gene control. *Science* 361, eaar3958. <https://doi.org/10.1126/science.aar3958>
- Saccani, S., Marazzi, I., Beg, A.A., Natoli, G., 2004. Degradation of promoter-bound p65/RelA is essential for the prompt termination of the nuclear factor kappaB response. *J. Exp. Med.* 200, 107–113. <https://doi.org/10.1084/jem.20040196>
- Saccani, S., Pantano, S., Natoli, G., 2003. Modulation of NF- κ B Activity by Exchange of Dimers. *Mol. Cell* 11, 1563–1574. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00227-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00227-2)
- Saccani, S., Pantano, S., Natoli, G., 2002. p38-dependent marking of inflammatory genes for increased NF- κ B recruitment. *Nat. Immunol.* 3, 69–75. <https://doi.org/10.1038/ni748>
- Saha, A., Wittmeyer, J., Cairns, B.R., 2006. Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 437–447. <https://doi.org/10.1038/nrm1945>
- Saint-André, V., Batsché, E., Rachez, C., Muchardt, C., 2011. Histone H3 lysine 9 trimethylation and HP1 γ favor inclusion of alternative exons. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 337–344. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1995>
- Saldaña-Meyer, R., Rodriguez-Hernaez, J., Escobar, T., Nishana, M., Jácome-López, K., Nora, E.P., Bruneau, B.G., Tsirigos, A., Furlan-Magaril, M., Skok, J., Reinberg, D., 2019. RNA

- Interactions Are Essential for CTCF-Mediated Genome Organization. *Mol. Cell* 76, 412–422.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.08.015>
- Sallam, T., Jones, M., Thomas, B.J., Wu, X., Gilliland, T., Qian, K., Eskin, A., Casero, D., Zhang, Z., Sandhu, J., Salisbury, D., Rajbhandari, P., Civelek, M., Hong, C., Ito, A., Liu, X., Daniel, B., Lusic, A.J., Whitelegge, J., Nagy, L., Castrillo, A., Smale, S., Tontonoz, P., 2018. Transcriptional regulation of macrophage cholesterol efflux and atherogenesis by a long noncoding RNA. *Nat. Med.* 24, 304–312. <https://doi.org/10.1038/nm.4479>
- Satou, Y., Miyazato, P., Ishihara, K., Yaguchi, H., Melamed, A., Miura, M., Fukuda, A., Nosaka, K., Watanabe, T., Rowan, A.G., Nakao, M., Bangham, C.R.M., 2016. The retrovirus HTLV-1 inserts an ectopic CTCF-binding site into the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113, 3054–3059. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423199113>
- Schoenfelder, S., Sexton, T., Chakalova, L., Cope, N.F., Horton, A., Andrews, S., Kurukuti, S., Mitchell, J.A., Umlauf, D., Dimitrova, D.S., Eskiw, C.H., Luo, Y., Wei, C.-L., Ruan, Y., Bieker, J.J., Fraser, P., 2010. Preferential associations between co-regulated genes reveal a transcriptional interactome in erythroid cells. *Nat. Genet.* 42, 53–61. <https://doi.org/10.1038/ng.496>
- Schor, I.E., Rascovan, N., Pelisch, F., Alló, M., Kornblihtt, A.R., 2009. Neuronal cell depolarization induces intragenic chromatin modifications affecting NCAM alternative splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 4325–4330. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810666106>
- Schwartz, S., Meshorer, E., Ast, G., 2009. Chromatin organization marks exon-intron structure. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 990–995. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1659>
- Segelle, A., Núñez-Álvarez, Y., Oldfield, A.J., Webb, K.M., Voigt, P., Luco, R.F., 2022. Histone marks regulate the epithelial-to-mesenchymal transition via alternative splicing. *Cell Rep.* 38, 110357. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110357>
- Semmes, O.J., Barret, J.F., Dang, C.V., Jeang, K.T., 1996. Human T-cell leukemia virus type I tax masks c-Myc function through a cAMP-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 9730–9738. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.16.9730>
- Semmes, O.J., Jeang, K.T., 1996. Localization of human T-cell leukemia virus type 1 tax to subnuclear compartments that overlap with interchromatin speckles. *J. Virol.* 70, 6347–6357. <https://doi.org/10.1128/jvi.70.9.6347-6357.1996>
- Sharma, N., Nyborg, J.K., 2008. The coactivators CBP/p300 and the histone chaperone NAP1 promote transcription-independent nucleosome eviction at the HTLV-1 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 7959–7963. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800534105>
- Shembade, N., Harhaj, N.S., Yamamoto, M., Akira, S., Harhaj, E.W., 2007. The human T-cell leukemia virus type 1 Tax oncoprotein requires the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 for NF-kappaB activation. *J. Virol.* 81, 13735–13742. <https://doi.org/10.1128/JVI.01790-07>

- Shen, H., Kan, J.L.C., Green, M.R., 2004. Arginine-Serine-Rich Domains Bound at Splicing Enhancers Contact the Branchpoint to Promote Pre-spliceosome Assembly. *Mol. Cell* 13, 367–376. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00025-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00025-5)
- Sheppard, K.A., Phelps, K.M., Williams, A.J., Thanos, D., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., Gerritsen, M.E., Collins, T., 1998. Nuclear integration of glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB signaling by CREB-binding protein and steroid receptor coactivator-1. *J. Biol. Chem.* 273, 29291–29294. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.45.29291>
- Shiama, N., 1997. The p300/CBP family: integrating signals with transcription factors and chromatin. *Trends Cell Biol.* 7, 230–236. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(97\)01048-9](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(97)01048-9)
- Shih, V.F.-S., Kearns, J.D., Basak, S., Savinova, O.V., Ghosh, G., Hoffmann, A., 2009. Kinetic control of negative feedback regulators of NF- κ B/RelA determines their pathogen- and cytokine-receptor signaling specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 9619–9624. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812367106>
- Shih, V.F.-S., Tsui, R., Caldwell, A., Hoffmann, A., 2011. A single NF κ B system for both canonical and non-canonical signaling. *Cell Res.* 21, 86–102. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.161>
- Shirinian, M., Kfoury, Y., Dassouki, Z., El-Hajj, H., Bazarbachi, A., 2013. Tax-1 and Tax-2 similarities and differences: focus on post-translational modifications and NF- κ B activation. *Front. Microbiol.* 4, 231. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00231>
- Shopland, L.S., Johnson, C.V., Byron, M., McNeil, J., Lawrence, J.B., 2003. Clustering of multiple specific genes and gene-rich R-bands around SC-35 domains: evidence for local euchromatic neighborhoods. *J. Cell Biol.* 162, 981–990. <https://doi.org/10.1083/jcb.200303131>
- Showpnil, I.A., Selich-Anderson, J., Taslim, C., Boone, M.A., Crow, J.C., Theisen, E.R., Lessnick, S.L., 2022. EWS/FLI mediated reprogramming of 3D chromatin promotes an altered transcriptional state in Ewing sarcoma. *Nucleic Acids Res.* 50, 9814–9837. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac747>
- Shukla, S., Kavak, E., Gregory, M., Imashimizu, M., Shutinoski, B., Kashlev, M., Oberdoerffer, P., Sandberg, R., Oberdoerffer, S., 2011. CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature* 479, 74–79. <https://doi.org/10.1038/nature10442>
- Sibon, D., Gabet, A.-S., Zandecki, M., Pinatel, C., Thête, J., Delfau-Larue, M.-H., Rabaaoui, S., Gessain, A., Gout, O., Jacobson, S., Mortreux, F., Wattel, E., 2006. HTLV-1 propels untransformed CD4⁺ lymphocytes into the cell cycle while protecting CD8⁺ cells from death. *J. Clin. Invest.* 116, 974–983. <https://doi.org/10.1172/JCI27198>
- Silbermann, K., Schneider, G., Grassmann, R., 2008. Stimulation of interleukin-13 expression by human T-cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax via a dually active promoter element responsive to NF- κ B and NFAT. *J. Gen. Virol.* 89, 2788–2798. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/003699-0>

- Sims, R.J., Millhouse, S., Chen, C.-F., Lewis, B.A., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Manley, J.L., Reinberg, D., 2007. Recognition of Trimethylated Histone H3 Lysine 4 Facilitates the Recruitment of Transcription Postinitiation Factors and Pre-mRNA Splicing. *Mol. Cell* 28, 665–676. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.010>
- Singh, M., Popowicz, G.M., Krajewski, M., Holak, T.A., 2007. Structural Ramification for Acetyl-Lysine Recognition by the Bromodomain of Human BRG1 Protein, a Central ATPase of the SWI/SNF Remodeling Complex. *ChemBioChem* 8, 1308–1316. <https://doi.org/10.1002/cbic.200600562>
- Smith, K.P., Moen, P.T., Wydner, K.L., Coleman, J.R., Lawrence, J.B., 1999. Processing of endogenous pre-mRNAs in association with SC-35 domains is gene specific. *J. Cell Biol.* 144, 617–629. <https://doi.org/10.1083/jcb.144.4.617>
- Sofiadis, K., Papantonis, A., 2018. Transcription Factories as Spatial and Functional Organization Nodes, in: *Nuclear Architecture and Dynamics*. Elsevier, pp. 283–296. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803480-4.00012-0>
- Somasundaram, K., Gupta, B., Jain, N., Jana, S., 2022. LncRNAs divide and rule: The master regulators of phase separation. *Front. Genet.* 13, 930792. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.930792>
- Spector, D. I., Fu, X. d., Maniatis, T., 1991. Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO J.* 10, 3467–3481. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04911.x>
- Spector, D.L., Lamond, A.I., 2011. Nuclear Speckles. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a000646. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000646>
- Spector, D.L., Schrier, W.H., Busch, H., 1983. Immunoelectron microscopic localization of snRNPs. *Biol. Cell* 49, 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1768-322x.1984.tb00215.x>
- Spielmann, M., Lupiáñez, D.G., Mundlos, S., 2018. Structural variation in the 3D genome. *Nat. Rev. Genet.* 19, 453–467. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0007-0>
- Spies, N., Nielsen, C.B., Padgett, R.A., Burge, C.B., 2009. Biased Chromatin Signatures Around Polyadenylation Sites and Exons. *Mol. Cell* 36, 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.10.008>
- Strahl, B.D., Allis, C.D., 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41–45. <https://doi.org/10.1038/47412>
- Strom, A.R., Emelyanov, A.V., Mir, M., Fyodorov, D.V., Darzacq, X., Karpen, G.H., 2017. Phase separation drives heterochromatin domain formation. *Nature* 547, 241–245. <https://doi.org/10.1038/nature22989>
- Sullivan, D.E., Ferris, M., Nguyen, H., Abboud, E., Brody, A.R., 2009. TNF-alpha induces TGF-beta1 expression in lung fibroblasts at the transcriptional level via AP-1 activation. *J. Cell. Mol. Med.* 13, 1866–1876. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00647.x>

- Sun, S.C., Ballard, D.W., 1999. Persistent activation of NF-kappaB by the tax transforming protein of HTLV-1: hijacking cellular I kappa B kinases. *Oncogene* 18, 6948–6958. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203220>
- Suzuki, S., Singhirunnusorn, P., Mori, A., Yamaoka, S., Kitajima, I., Saiki, I., Sakurai, H., 2007. Constitutive Activation of TAK1 by HTLV-1 Tax-dependent Overexpression of TAB2 Induces Activation of JNK-ATF2 but Not IKK-NF-kB*. *J. Biol. Chem.* 282, 25177–25181. <https://doi.org/10.1074/jbc.C700065200>
- Suzuki, T., Hirai, H., Murakami, T., Yoshida, M., 1995. Tax protein of HTLV-1 destabilizes the complexes of NF-kappa B and I kappa B-alpha and induces nuclear translocation of NF-kappa B for transcriptional activation. *Oncogene* 10, 1199–1207.
- Suzuki, T., Hirai, H., Yoshida, M., 1994. Tax protein of HTLV-1 interacts with the Rel homology domain of NF-kappa B p65 and c-Rel proteins bound to the NF-kappa B binding site and activates transcription. *Oncogene* 9, 3099–3105.
- Takeda, S., Maeda, M., Morikawa, S., Taniguchi, Y., Yasunaga, J.-I., Nosaka, K., Tanaka, Y., Matsuoka, M., 2004. Genetic and epigenetic inactivation of tax gene in adult T-cell leukemia cells. *Int. J. Cancer* 109, 559–567. <https://doi.org/10.1002/ijc.20007>
- Takenouchi, N., Yamano, Y., Usuku, K., Osame, M., Izumo, S., 2003. Usefulness of proviral load measurement for monitoring of disease activity in individual patients with human T-lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J. Neurovirol.* 9, 29–35. <https://doi.org/10.1080/13550280390173418>
- Tammer, L., Hameiri, O., Keydar, I., Roy, V.R., Ashkenazy-Titelman, A., Custódio, N., Sason, I., Shayevitch, R., Rodríguez-Vaello, V., Rino, J., Lev Maor, G., Leader, Y., Khair, D., Aiden, E.L., Elkon, R., Irimia, M., Sharan, R., Shav-Tal, Y., Carmo-Fonseca, M., Ast, G., 2022. Gene architecture directs splicing outcome in separate nuclear spatial regions. *Mol. Cell* 82, 1021-1034.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.02.001>
- Tan-Wong, S.M., Zaugg, J.B., Camblong, J., Xu, Z., Zhang, D.W., Mischo, H.E., Ansari, A.Z., Luscombe, N.M., Steinmetz, L.M., Proudfoot, N.J., 2012. Gene loops enhance transcriptional directionality. *Science* 338, 671–675. <https://doi.org/10.1126/science.1224350>
- Tattermusch, S., Skinner, J.A., Chaussabel, D., Banchereau, J., Berry, M.P., McNab, F.W., O'Garra, A., Taylor, G.P., Bangham, C.R.M., 2012. Systems biology approaches reveal a specific interferon-inducible signature in HTLV-1 associated myelopathy. *PLoS Pathog.* 8, e1002480. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002480>
- Terrone, S., Valat, J., Fontrodona, N., Giraud, G., Claude, J.-B., Combe, E., Lapendry, A., Polvèche, H., Ameur, L.B., Duvermy, A., Modolo, L., Bernard, P., Mortreux, F., Auboeuf, D., Bourgeois, C.F., 2022. RNA helicase-dependent gene looping impacts messenger RNA processing. *Nucleic Acids Res.* 50, 9226–9246. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac717>

- Tezuka, K., Fuchi, N., Okuma, K., Tsukiyama, T., Miura, S., Hasegawa, Y., Nagata, A., Komatsu, N., Hasegawa, H., Sasaki, D., Sasaki, E., Mizukami, T., Kuramitsu, M., Matsuoka, S., Yanagihara, K., Miura, K., Hamaguchi, I., 2020. HTLV-1 targets human placental trophoblasts in seropositive pregnant women. *J. Clin. Invest.* 130, 6171–6186. <https://doi.org/10.1172/JCI135525>
- Thénoz, M., Vernin, C., Mortada, H., Karam, M., Pinatel, C., Gessain, A., Webb, T.R., Auboeuf, D., Wattel, E., Mortreux, F., 2014. HTLV-1-infected CD4+ T-cells display alternative exon usages that culminate in adult T-cell leukemia. *Retrovirology* 11, 119. <https://doi.org/10.1186/s12977-014-0119-3>
- Tilgner, H., Nikolaou, C., Althammer, S., Sammeth, M., Beato, M., Valcárcel, J., Guigó, R., 2009. Nucleosome positioning as a determinant of exon recognition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 996–1001. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1658>
- Ting, A.Y., Endy, D., 2002. Decoding NF- κ B Signaling. *Science* 298, 1189–1190. <https://doi.org/10.1126/science.1079331>
- Tong, A.-J., Liu, X., Thomas, B.J., Lissner, M.M., Baker, M.R., Senagolage, M.D., Allred, A.L., Barish, G.D., Smale, S.T., 2016. A Stringent Systems Approach Uncovers Gene-Specific Mechanisms Regulating Inflammation. *Cell* 165, 165–179. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.020>
- Tsukada, J., Misago, M., Serino, Y., Ogawa, R., Murakami, S., Nakanishi, M., Tonai, S., Kominato, Y., Morimoto, I., Auron, P.E., Eto, S., 1997. Human T-cell leukemia virus type I Tax transactivates the promoter of human prointerleukin-1 β gene through association with two transcription factors, nuclear factor-interleukin-6 and Spi-1. *Blood* 90, 3142–3153.
- Tzavlaki, K., Moustakas, A., 2020. TGF- β Signaling. *Biomolecules* 10, 487. <https://doi.org/10.3390/biom10030487>
- Uchiyama, T., Yodoi, J., Sagawa, K., Takatsuki, K., Uchino, H., 1977. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 16 cases. *Blood* 50, 481–492.
- Ueki, K., Fruman, D.A., Brachmann, S.M., Tseng, Y.-H., Cantley, L.C., Kahn, C.R., 2002. Molecular balance between the regulatory and catalytic subunits of phosphoinositide 3-kinase regulates cell signaling and survival. *Mol. Cell. Biol.* 22, 965–977. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.3.965-977.2002>
- Van Prooyen, N., Gold, H., Andresen, V., Schwartz, O., Jones, K., Ruscetti, F., Lockett, S., Gudla, P., Venzon, D., Franchini, G., 2010. Human T-cell leukemia virus type 1 p8 protein increases cellular conduits and virus transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 20738–20743. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009635107>
- Vandermeulen, C., O'Grady, T., Wayet, J., Galvan, B., Maseko, S., Cherkaoui, M., Desbuleux, A., Coppin, G., Olivet, J., Ben Ameer, L., Kataoka, K., Ogawa, S., Hermine, O., Marçais, A., Thiry, M., Mortreux, F., Calderwood, M.A., Van Weyenbergh, J., Peloponese, J.-M., Charlotiaux, B., Van den Broeke, A., Hill, D.E., Vidal, M., Dequiedt, F., Twizere, J.-C.,

2021. The HTLV-1 viral oncoproteins Tax and HBZ reprogram the cellular mRNA splicing landscape. *PLoS Pathog.* 17, e1009919. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009919>
- Vargas, D.Y., Shah, K., Batish, M., Levandoski, M., Sinha, S., Marras, S.A.E., Schedl, P., Tyagi, S., 2011. Single-molecule imaging of transcriptionally coupled and uncoupled splicing. *Cell* 147, 1054–1065. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.024>
- Vendel, A.C., McBryant, S.J., Lumb, K.J., 2003. KIX-mediated assembly of the CBP-CREB-HTLV-1 tax coactivator-activator complex. *Biochemistry* 42, 12481–12487. <https://doi.org/10.1021/bi0353023>
- Verdonck, K., González, E., Van Dooren, S., Vandamme, A.-M., Vanham, G., Gotuzzo, E., 2007. Human T-lymphotropic virus 1: recent knowledge about an ancient infection. *Lancet Infect. Dis.* 7, 266–281. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70081-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70081-6)
- Vlahopoulos, S., Boldogh, I., Casola, A., Brasier, A.R., 1999. Nuclear factor-kappaB-dependent induction of interleukin-8 gene expression by tumor necrosis factor alpha: evidence for an antioxidant sensitive activating pathway distinct from nuclear translocation. *Blood* 94, 1878–1889.
- Wäldele, K., Schneider, G., Ruckes, T., Grassmann, R., 2004. Interleukin-13 Overexpression by Tax Transactivation: a Potential Autocrine Stimulus in Human T-Cell Leukemia Virus-Infected Lymphocytes. *J. Virol.* 78, 6081–6090. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.12.6081-6090.2004>
- Wang, V.Y.-F., Huang, W., Asagiri, M., Spann, N., Hoffmann, A., Glass, C., Ghosh, G., 2012. The Transcriptional Specificity of NF- κ B Dimers Is Coded within the κ B DNA Response Elements. *Cell Rep.* 2, 824–839. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.08.042>
- Wansink, D., Schul, W., van der Kraan, I., van Steensel, B., van Driel, R., de Jong, L., 1993. Fluorescent labeling of nascent RNA reveals transcription by RNA polymerase II in domains scattered throughout the nucleus. *J. Cell Biol.* 122, 283–293. <https://doi.org/10.1083/jcb.122.2.283>
- Warf, M.B., Berglund, J.A., 2010. The role of RNA structure in regulating pre-mRNA splicing. *Trends Biochem. Sci.* 35, 169–178. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.10.004>
- Watanabe, T., 2011. Current status of HTLV-1 infection. *Int. J. Hematol.* 94, 430–434. <https://doi.org/10.1007/s12185-011-0934-4>
- Wattel, E., Cavrois, M., Gessain, A., Wain-Hobson, S., 1996. Clonal expansion of infected cells: a way of life for HTLV-I. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirology Off. Publ. Int. Retrovirology Assoc.* 13 Suppl 1, S92-99. <https://doi.org/10.1097/00042560-199600001-00016>
- Winter, H.Y., Marriott, S.J., 2007. Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Enhances Serum Response Factor DNA Binding and Alters Site Selection. *J. Virol.* 81, 6089–6098. <https://doi.org/10.1128/JVI.02179-06>

- Wongtrakoongate, P., Riddick, G., Fucharoen, S., Felsenfeld, G., 2015. Association of the Long Non-coding RNA Steroid Receptor RNA Activator (SRA) with TrxG and PRC2 Complexes. *PLoS Genet.* 11, e1005615. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005615>
- Wu, K., Bottazzi, M.E., de la Fuente, C., Deng, L., Gitlin, S.D., Maddukuri, A., Dadgar, S., Li, H., Vertes, A., Pumfery, A., Kashanchi, F., 2004. Protein profile of tax-associated complexes. *J. Biol. Chem.* 279, 495–508. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310069200>
- Wu, X., Sun, S.-C., 2007. Retroviral oncoprotein Tax deregulates NF-kappaB by activating Tak1 and mediating the physical association of Tak1-IKK. *EMBO Rep.* 8, 510–515. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400931>
- Xiao, G., Cvijic, M.E., Fong, A., Harhaj, E.W., Uhlik, M.T., Waterfield, M., Sun, S.C., 2001. Retroviral oncoprotein Tax induces processing of NF-kappaB2/p100 in T cells: evidence for the involvement of IKKalpha. *EMBO J.* 20, 6805–6815. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.23.6805>
- Xing, Y., Johnson, C.V., Moen, P.T., McNeil, J.A., Lawrence, J., 1995. Nonrandom gene organization: structural arrangements of specific pre-mRNA transcription and splicing with SC-35 domains. *J. Cell Biol.* 131, 1635–1647. <https://doi.org/10.1083/jcb.131.6.1635>
- Xu, S., Lai, S.-K., Sim, D.Y., Ang, W.S.L., Li, H.Y., Roca, X., 2022. SRRM2 organizes splicing condensates to regulate alternative splicing. *Nucleic Acids Res.* 50, 8599–8614. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac669>
- Xu, S.-J., Lombroso, S.I., Fischer, D.K., Carpenter, M.D., Marchione, D.M., Hamilton, P.J., Lim, C.J., Neve, R.L., Garcia, B.A., Wimmer, M.E., Pierce, R.C., Heller, E.A., 2021. Chromatin-mediated alternative splicing regulates cocaine-reward behavior. *Neuron* 109, 2943–2966.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.08.008>
- Xu, X., Heidenreich, O., Kitajima, I., McGuire, K., Li, Q., Su, B., Nerenberg, M., 1996. Constitutively activated JNK is associated with HTLV-1 mediated tumorigenesis. *Oncogene* 13, 135–142.
- Yamaguchi, K., Watanabe, T., 2002. Human T lymphotropic virus type-I and adult T-cell leukemia in Japan. *Int. J. Hematol.* 76, 240–245. <https://doi.org/10.1007/BF03165123>
- Yamaoka, S., Inoue, H., Sakurai, M., Sugiyama, T., Hazama, M., Yamada, T., Hatanaka, M., 1996. Constitutive activation of NF-kappa B is essential for transformation of rat fibroblasts by the human T-cell leukemia virus type I Tax protein. *EMBO J.* 15, 873–887. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00422.x>
- Yang, J., Mitra, A., Dojer, N., Fu, S., Rowicka, M., Brasier, A.R., 2013. A probabilistic approach to learn chromatin architecture and accurate inference of the NF-kB/RelA regulatory network using ChIP-Seq. *Nucleic Acids Res.* 41, 7240–7259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt493>

- Yao, H., Brick, K., Evrard, Y., Xiao, T., Camerini-Otero, R.D., Felsenfeld, G., 2010. Mediation of CTCF transcriptional insulation by DEAD-box RNA-binding protein p68 and steroid receptor RNA activator SRA. *Genes Dev.* 24, 2543–2555. <https://doi.org/10.1101/gad.1967810>
- Yashiki, S., Fujiyoshi, T., Arima, N., Osame, M., Yoshinaga, M., Nagata, Y., Tara, M., Nomura, K., Utsunomiya, A., Hanada, S., Tajima, K., Sonoda, S., 2001. HLA-A*26, HLA-B*4002, HLA-B*4006, and HLA-B*4801 alleles predispose to adult T cell leukemia: the limited recognition of HTLV type 1 tax peptide anchor motifs and epitopes to generate anti-HTLV type 1 tax CD8(+) cytotoxic T lymphocytes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 17, 1047–1061. <https://doi.org/10.1089/088922201300343735>
- Yin, M.J., Christerson, L.B., Yamamoto, Y., Kwak, Y.T., Xu, S., Mercurio, F., Barbosa, M., Cobb, M.H., Gaynor, R.B., 1998. HTLV-I Tax protein binds to MEKK1 to stimulate I κ B kinase activity and NF- κ B activation. *Cell* 93, 875–884. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81447-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81447-6)
- Ying, Y., Wang, X.-J., Vuong, C.K., Lin, C.-H., Damianov, A., Black, D.L., 2017. Splicing activation by Rbfox requires self-aggregation through its tyrosine-rich domain. *Cell* 170, 312–323.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.022>
- Zentner, G.E., Henikoff, S., 2013. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 259–266. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2470>
- Zhang, L., Liu, M., Merling, R., Giam, C.-Z., 2006. Versatile reporter systems show that transactivation by human T-cell leukemia virus type 1 Tax occurs independently of chromatin remodeling factor BRG1. *J. Virol.* 80, 7459–7468. <https://doi.org/10.1128/JVI.00130-06>
- Zhang, Y., Qian, J., Gu, C., Yang, Y., 2021. Alternative splicing and cancer: a systematic review. *Signal Transduct. Target. Ther.* 6, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00486-7>
- Zhao, B., Barrera, L.A., Ersing, I., Willox, B., Schmidt, S.C.S., Greenfeld, H., Zhou, H., Mollo, S.B., Shi, T.T., Takasaki, K., Jiang, S., Cahir-McFarland, E., Kellis, M., Bulyk, M.L., Kieff, E., Gewurz, B.E., 2014. The NF- κ B Genomic Landscape in Lymphoblastoid B-cells. *Cell Rep.* 8, 1595–1606. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.037>
- Zhao, M., Joy, J., Zhou, W., De, S., Iii, W.H.W., Becker, K.G., Ji, H., Sen, R., 2018. Transcriptional outcomes and kinetic patterning of gene expression in response to NF- κ B activation. *PLOS Biol.* 16, e2006347. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006347>
- Zhao, T., 2016. The Role of HBZ in HTLV-1-Induced Oncogenesis. *Viruses* 8, 34. <https://doi.org/10.3390/v8020034>
- Zhao, W., Wang, L., Zhang, M., Wang, P., Zhang, L., Yuan, C., Qi, J., Qiao, Y., Kuo, P.C., Gao, C., 2011. NF- κ B- and AP-1-Mediated DNA Looping Regulates Osteopontin Transcription in Endotoxin-Stimulated Murine Macrophages. *J. Immunol.* 186, 3173–3179. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003626>

- Zhao, Y.-Q., Jordan, I.K., Lunyak, V.V., 2013. Epigenetics Components of Aging in the Central Nervous System. *Neurotherapeutics* 10, 647–663. <https://doi.org/10.1007/s13311-013-0229-y>
- Zhong, H., May, M.J., Jimi, E., Ghosh, S., 2002. The Phosphorylation Status of Nuclear NF- κ B Determines Its Association with CBP/p300 or HDAC-1. *Mol. Cell* 9, 625–636. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00477-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00477-X)
- Zhong, H., Voll, R.E., Ghosh, S., 1998. Phosphorylation of NF- κ B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol. Cell* 1, 661–671. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80066-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80066-0)
- Zhou, M., Lu, H., Park, H., Wilson-Chiru, J., Linton, R., Brady, J.N., 2006. Tax interacts with P-TEFb in a novel manner to stimulate human T-lymphotropic virus type 1 transcription. *J. Virol.* 80, 4781–4791. <https://doi.org/10.1128/JVI.80.10.4781-4791.2006>

Résumé

L'activation de la voie NF- κ B contrôle la transcription de nombreux gènes engagés dans des processus physiologiques majeurs tels que l'inflammation et la réponse immunitaire. Néanmoins, son activation chronique est fréquemment associée dans des maladies telles que les cancers. L'organisation tridimensionnelle de la chromatine joue un rôle dans la coordination des régulations transcriptionnelles mises en place lors de l'activation de la voie NF- κ B. Mes travaux montrent dans un contexte d'activation de la voie NF- κ B par l'oncogène Tax du rétrovirus HTLV-1 que de nombreuses dérégulations d'épissage alternatif sont médiées par le recrutement intragénique du facteur NF- κ B p65/RelA à proximité des exons régulés via sa capacité d'interaction avec des facteurs d'épissage, dont l'hélicase à ARN DDX17. Par des approches de Hi-C, 4C et 3C, mes données montrent que les régulations transcriptionnelles et co-transcriptionnelles engendrées par Tax, notamment via l'activation de la voie NF- κ B, s'accompagnent d'une réorganisation de l'architecture tridimensionnelle du génome, induisant la formation de complexes multigéniques composés de gènes régulés par Tax dans leur niveau transcriptionnel ou leur épissage alternatif. Les analyses de l'enrichissement à la chromatine de p65/RelA, ainsi que des approches moléculaires permettant de moduler expérimentalement le recrutement de p65/RelA à la chromatine, ont permis d'identifier que la fixation intragénique de p65/RelA participe à la formation de contacts entre gènes et à leurs régulations au niveau de la transcription et de l'épissage alternatif. Ces données apportent de nouvelles connaissances dans les mécanismes de régulation lors de l'infection par HTLV-1 mais également dans les pathologies associées à l'activation de la voie NF- κ B.