

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
DE LILLE FLANDRES-ARTOIS

N° d'ordre 1989

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de:
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES
ET TECHNOLOGIES DE LILLE**
EN
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

PAR

Marielle CAVROIS



**EXPANSION CLONALE DES CELLULES INFECTÉES PAR HTLV-I
INCIDENCES PATHOLOGIQUES**

Soutenue le 1997 devant la Commission d'Examen:

Président:	André VERBERT
Rapporteurs:	Thérèse ASTIER-GIN Arsène BURNY Simona OZDEN
Examineurs:	Antoine GESSAIN Bernard HECQUET
Directeur de thèse	Eric WATTEL

Je souhaite exprimer mes sincères remerciements à Eric WATTEL qui a dirigé cette étude et m'a accordé sa confiance. Son enthousiasme pour la recherche et son dynamisme ont beaucoup contribué à l'accomplissement de ces travaux. Ses nombreux conseils ainsi que les discussions encourageant les initiatives ont rendu le travail motivant et agréable. Ce mémoire est l'occasion pour moi de lui témoigner ma sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier Monsieur André VERBERT qui me fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.

Je remercie vivement Madame Thérèse ASTIER-GIN, Monsieur Arsène BURNY et Madame Simona OZDEN d'avoir pris le temps de juger ce travail et d'avoir accepté d'en être les rapporteurs.

Mes remerciements s'adressent également à Antoine GESSAIN pour ses conseils et son accueil chaleureux. Sans la confiance qu'il nous a témoignée, ce travail n'aurait pu être réalisé. Je le remercie d'avoir accepté de siéger dans ce jury.

Je souhaite exprimer mes vifs remerciements à Bernard HECQUET pour les précieux conseils qu'il nous a donnés avec beaucoup de gentillesse. En acceptant d'être membre de ce jury, qu'il reçoive l'expression de ma sincère reconnaissance.

Je tiens à remercier Madame LOUCHEUX-LEFEBVRE et Monsieur J.P. KERCKAERT de m'avoir accueillie au sein de leur unité de recherches et d'avoir encouragé la réalisation de cette étude.

Je tiens également à remercier Pierre FENAUX de m'avoir accueillie dans son groupe de recherches et d'avoir soutenu cette étude.

Mes remerciements s'adressent tout particulièrement à Simon WAIN-HOBSON pour ses nombreux conseils et son précieux soutien ainsi qu'aux membres de l'unité de Rétrovirologie Moléculaire de l'Institut Pasteur qui m'ont accueillie chaleureusement.

Je souhaite exprimer mes remerciements à Michaël VANRUMBEKE qui a été un interlocuteur précieux lors de nombreuses discussions. Ses conseils ont beaucoup contribué à l'avancement de cette étude. Ce mémoire est l'occasion pour moi de lui témoigner toute mon amitié ainsi qu'à Emmanuelle PRUDHOMME, Rodolphe VEREECQUE, Ricardo GONZALEZ et Dominique HETUIN.

Je remercie également India LECLERCQ et Franck MORTREUX d'avoir choisi de poursuivre cette étude. Leurs idées et leurs travaux permettront, j'en suis sûre, de répondre aux questions posées par cette thèse.

Je remercie particulièrement Marie Claire DUVIEUXBOURG pour les travaux de photographie qu'elle a effectués avec patience et gentillesse.

Je tiens également à remercier tout le personnel de l'U124 INSERM et de l'IRCL pour la chaleur de leur accueil. Un grand merci pour les moments de détente partagés lors des pauses café.

Ce mémoire est l'occasion pour moi de témoigner toute mon affection à mes parents, mes soeurs et mes amis.

Cette étude a été effectuée à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, dans le laboratoire d'Oncohématologie Moléculaire U124 INSERM, dirigé successivement par le Dr. M.H. LOUCHEUX-LEFEBVRE et le Dr. J.P. KERCKAERT. Cette étude a été financée par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	13
GENERALITES	18
I. LE RETROVIRUS HTLV-1.	19
I.1. STRUCTURE DU PROVIRUS.	20
I.1.1. Organisation génétique de HTLV-1.	20
I.1.2. Protéines de structure et enzymes virales.	22
I.1.3. Les protéines codées par pX.	23
I.2. REGULATION DE LA REPLICATION DE HTLV-1.	29
I.3. TROPISME DE HTLV-1.	30
II. ONCOGENESE VIRALE HTLV-1.	31
II.1. LA LEUCEMIE AIGUE DE L'ADULTE.	31
II.1.1. Aspect clinique	32
II.1.2. Aspect cytologique et anomalies génétiques des cellules.	32
II.1.3. Aspect virologique.	33
II.2. EFFET DE HTLV-1 SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE.	34
II.2.1. Immortalisation / Transformation des cellules par HTLV-1.	34
II.2.2. Implication de HTLV-1 dans la régulation du cycle cellulaire.	35
II.2.3. Modèles de souris transgéniques.	37
III. LA TSP/HAM : IMPLICATION DE LA REPOSE IMMUNITAIRE CONTRE HTLV-1.	38
III.1. ASPECTS CLINIQUES TSP/HAM.	38
III.2. EPIDEMIOLOGIE DE LA TSP/HAM.	39
III.3. HTLV-1, L'AGENT DE LA TSP/HAM.	40
III.4. IMPLICATION DE LA REPOSE IMMUNITAIRE DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA TSP/HAM.	43
III.4.1. La réponse humorale.	43
III.4.2. La réponse cellulaire.	44
III.4.3. Ethiopathogénie de la TSP/HAM.	45
IV. DE LA STABILITE GENETIQUE DE HTLV-1 A L'EXPANSION CLONALE DES CELLULES INFECTEES.	47
IV.1. VARIABILITE DES VIRUS A ARN.	47
IV.2. STABILITE GENETIQUE DE HTLV-1.	48
IV.2.1. Variants géographiques et épidémiologie moléculaire.	48
IV.2.2. Variabilité intra et inter-individuelle.	49
IV.3. CHARGE VIRALE ELEVEE.	49
IV.4. REPLICATION DE HTLV-1 VIA L'EXPANSION CLONALE DE LA CELLULE HÔTE.	51

RESULTATS ET DISCUSSIONS 52

**PARTIE I: ETUDE DE L'EXPANSION CLONALE PAR AMPLIFICATION DES SITES D'INTEGRATION :
UNE TECHNIQUE SENSIBLE ET SEMI-QUANTITATIVE. 53**

I.1. INTRODUCTION. 53
I.2. RESULTATS. 55
 I.2.1. Analyse du site d'intégration d'un provirus cloné. 55
 I.2.2. Amplification des sites d'intégration de la lignée MT4. 58
 I.2.3. Analyse extensive de l'ADN extrait des PBMC d'un porteur asymptomatique. 60
I.3. DISCUSSION. 63

**PARTIE II : PROLIFERATION DES CELLULES INFECTEES CHEZ LES PORTEURS DU VIRUS
EN L'ABSENCE DE MALIGNITE. 65**

II.1. INTRODUCTION. 65
II.2. RESULTATS. 66
 II.2.1. Nombre de clones en expansion. 66
 II.2.2. Ampleur des clones. 69
 II.3.2. Stabilité des clones. 72
II.3. DISCUSSION. 77

PARTIE III: PROFIL DE REPLICATION DE HTLV-1 AU COURS DE L'ATLL. 80

III.1. INTRODUCTION. 80
III.2. RESULTATS. 81
 III.2.1. Profil de l'expansion clonale dans les différents prélèvements. 81
 III.2.2. Analyse des prélèvements issus d'une ATLL smoldering au cours du traitement. 86
III.3. DISCUSSION. 88

PARTIE IV :TRANSPORT CELLULAIRE DU VIRUS DANS LE SYSTEME NERVEUX CENTRAL 89

IV.1. INTRODUCTION. 89
IV.1. RESULTATS. 91
 IV.2.1. Charge provirale dans le LCR et le sang. 91
 IV.2.2. Expansion clonale dans le LCR. 92
 IV.2.4. Estimation de l'ampleur des clones dans le sang. 100
IV.3. DISCUSSION 102

CONCLUSIONS 106

PERSPECTIVES 110

MATERIELS ET METHODES	113
I. MATERIELS.	114
I.1. PRELEVEMENTS.	114
I.2. LIGNEES.	114
I.3. PHAGES M13mp18 ET SOUCHE BACTERIENNE XL1.	115
I.4. PLASMIDE HTLV-I.	115
II. METHODES.	116
II.1. CULTURE CELLULAIRE.	116
II.2. EXTRACTION DE L'ADN.	116
II.3. AMPLIFICATIONS.	117
II.3.1. PCR "classiques".	117
II.3.2. Amplification des sites d'intégration.	117
II.3.3. Extension d'amorce : <i>run off</i> .	121
II.4. CLONAGE ET SEQUENCAGE DES PRODUITS DE PCR.	122
II.4.1. Préparation des phages recombinants.	122
II.4.2. Transfection.	124
II.4.3. Criblage des phages recombinants.	125
II.4.4. Préparation des matrices et séquençage.	125
II.5. SEQUENCAGE DIRECT DES PRODUITS DE PCR.	126
II.6. BLOT DE SOUTHERN.	126
II.7. MARQUAGE DES SONDAS.	127
II.7.1. Marquage des sondes oligonucléotidiques.	127
II.7.2. Marquage des sondes.	128
II.8. PURIFICATION DE L'ADN.	128
II.8.1. Electrophorèse en gel d'agarose à bas point de fusion.	128
II.8.2. Purification par <i>geneclan</i> .	128
II.9. ELECTROPHORESES.	129
II.9.1. Electrophorèse en gel d'agarose.	129
II.9.2. Electrophorèse en gel d'acrylamide.	129
II.10. TESTS STATISTIQUES.	130
BIBLIOGRAPHIE	131
ANNEXES	156

INDEX DES FIGURES ET DES TABLEAUX

GENERALITES

Fig. 1G : Structure de la particule virale des rétrovirus.	19
Fig. 2G : Organisation génomique de HTLV-1.	21
Fig. 3G : Effet de Tax sur la transactivation par CREB/ATF.	24
Fig. 4G : Implication de Tax dans la voie de NFκB.	27
Fig. 5G : Implication de Tax dans le contrôle de l'entrée en phase S du cycle cellulaire.	27
Fig. 6G : Incidences de HTLV-1 sur la régulation du cycle cellulaire.	36
Tableau 1G : Principaux gènes transactivés par Tax.	25
Tableau 2G : Phénotype des souris transgéniques Tax.	38
Tableau 3G : Fidélité des virus à ARN et à ADN.	47
Tableau 4G : Variabilité intra et inter individuelle de HTLV-1.	50

RESULTATS ET DISCUSSION

Fig. 1R : Amplification des sites d'intégration de HTLV-1 par IPCR et LMPCR.	54
Fig. 2R : Amplification des sites d'intégration de HTLV-1 de la lignée MT4 et p4.39.	56
Fig. 3R : Analyse du site d'intégration de HTLV-1 de p4.39.	58
Fig. 4R : Analyse par IPCR de l'ADN extrait de dilutions de cellules MT4.	61
Fig. 5R : Analyse extensive des sites d'intégration de HTLV-1 par LMPCR de AS10.	62
Fig. 6R : Amplification des sites d'intégration de HTLV-1 chez AS et TSP/HAM.	68
Fig. 7R : Analyse de l'ampleur des clones par répétition des expériences de LMPCR chez deux porteurs asymptomatiques.	70
Fig. 8R : Stratégie expérimentale d'étude de la stabilité des clones.	72
Fig. 9R : Analyse des sites d'intégration de HTLV-1, par IPCR, au cours du temps chez deux patients atteints de TSP/HAM.	75
Fig. 10R : Recherche par PCR des clones dans les différents prélèvements.	76
Fig. 11R : Amplification par IPCR des sites d'intégration de HTLV-1 chez des patients atteints d'ATLL.	82

Fig. 12R: Comparaison du nombre et de l'abondance des clones suivant la nature des prélèvements et le sous-type des patients.	84
Fig. 13R: Analyse par IPCR de 3 prélèvements d'un patient atteint d'une forme aiguë d'ATLL.	87
Fig. 14R : Etude de l'expansion clonale dans le LCR et les PBMC de YAM.	94
Fig. 15R : Stratégie de recherche, dans le sang, les clones identifiés dans le LCR.	97
Fig. 16R : Recherche des clones identifiés dans le LCR du patient YAM.	98
Fig. 17R : Etude des clones détectés par LMPCR dans les PBMC et le LCR de JASM.	101
Fig.18R : Modèle de la génèse des lésions de la TSP/HAM.	104
Tableau 1R : Analyse par LMPCR et IPCR d'une gamme de dilution de p4.39.	57
Tableau 2R: Séquence des sites d'intégration 3' de HTLV-1 dans la lignée MT4.	59
Tableau 3R : Distribution du nombre de clones détectés chez les porteurs asymptomatiques et les patients atteints de TSP/HAM.	67
Tableau 4R : Distribution du nombre de clones détectés par LMPCR dans des PBMC diluées au 20 ^{ème} .	71
Tableau 5R: Séquence des sites d'intégration de HTLV-1 dans les prélèvements sanguins des patients BOUL et SEPH.	74
Tableau 6R : Variabilité intra-individuelle de HTLV-1 des AS en fonction de leur âge.	78
Tableau 7R : Séquences des sites d'intégration amplifiés par IPCR à partir de P25.	85
Tableau 8R : Principales voies d'infection du système nerveux central.	91
Tableau 9R : Distribution du nombre de clones dans le sang et le LCR	93
Tableau 10R : Séquences des sites d'intégration du LCR du patient YAM.	96
Tableau 11R : Recherche dans le sang des clones identifiés dans le LCR.	99

MATERIELS ET METHODES

Figure 1M : Carte de restriction du plasmide p4.39.	116
Figure 2M : Amplification des sites d'intégration par LMPCR.	118
Figure 3M : Amplification des sites d'intégration par IPCR.	119
Tableau 1M : Lignées cellulaires utilisées.	114
Tableau 2M: Séquences et positions des amorces utilisées en LMPCR, IPCR et PCR	122

LEXIQUE

virus et pathologies

- HTLV-1 : Virus de la leucémie humaine T de type 1 (*Human T-cell leukemia virus type 1*).
- HTLV-2 : Virus de la leucémie humaine T de type 2 (*Human T-cell leukemia virus type 2*).
- BLV : Virus de la leucémie bovine (*Bovine leukemia virus*).
- STLV : Virus de la leucémie T du singe (*Simian T-cell leukemia virus*).
- VIH : Virus de l'immunodéficience humaine.
- ATLL : Leucémie/lymphome T de l'adulte (*Adult T-cell leukemia/lymphoma*)
- TSP/HAM : Paraparésie spastique tropicale/Myélopathie associée à HTLV-1 (*Tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy*)

Unités

- μF : Microfarad.
- μg : Microgramme.
- Ci : Curie
- cpm : Coups par minute.
- DO : Densité optique.
- g : Accélération de la pesanteur.
- g/l : Gramme par litre.
- kb : Kilobase.
- kDa : Kilodalton.
- mA : Milliampère
- mn : Minute.
- ng : Nanogramme.
- nt : Nucléotide.

pb : Paire de bases.
V : Volt

Réactifs

BrEt : Bromure d'éthidium.
BSA : Serum albumine bovine.
DTT : Dithiothréitol.
EDTA : Acide éthylènediamine tétra acétique.
LB : Milieu Luria-Bertani.
SDS : Dodécyl sulfate de sodium.
TEMED : N,N,N',N'- tetraméthyl éthylène diamine.
TRIS : Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane.

Divers

aa : acide aminé.
ADN : Acide désoxyribonucléique.
ADNc : ADN complémentaire.
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique.
ARN : Acide ribonucléique.
ARNm : ARN messenger.
ATP : Adénosine triphosphate.
dNTP : Désoxynucléotides triphosphates.
LCR : Liquide céphalorachidien.
PCR : Réaction de polymérisation en chaîne (*Polymerase Chain Reaction*).
PBMC : Cellules mononuclées du sang périphérique (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*).
RNase : Ribonucléase.
SVF : Serum de veau foetal.
UV : Ultra violet.

COMPOSITION DES TAMPONS

LB :	Bactotryptone 10g/l; extraits de levure 10 g/l; 5g/l NaCl (pH 7,2).
LB Agar :	Bactotryptone 10g/l; extraits de levure 10 g/l; 5g/l NaCl (pH 7,2) ; Agar 15g/l.
PBS 1X :	NaCl 136 mM ; Na ₂ HPO ₄ 4,3mM ; KCl 2,7mM ; KH ₂ PO ₄ 1,5mM (pH 7,3)
Tampon de lyse :	Tris-HCl (pH 8) 10 mM ; EDTA 10 mM ; NaCl 10 mM; SDS 0,5% et protéinase K 100 µg/ml.
Tampon d'hybridation :	50 mM Phosphate de sodium (pH7,2) ; 750 mM Nacl ; 5 mM EDTA ; Denhardt's 5X, Formamide 20% à 50% ; ADN de sperme de saumon dénaturé 20 µg/ml.
TAE 10X :	Tris-acétate 8 mM (pH8) ;.EDTA 0,4 mM.
Tampon Phosphate:	0,7 M Na ₂ HPO ₄ ; 0,32 M NaH ₂ PO ₄ (pH 7,3)
TBE 10X :	Tris 0,089 M ; Acide Borique 0,089 M, EDTA 0,02 M (pH 8).
TE 1X:	Tris-HCl 10 mM (pH 7,7), EDTA 1mM.
Solution de Denhardt 100X :	FICOLL 400 10 g/l; PVP 10 g/l; BSA 10 g/l.
Solution de dénaturation :	NaOH 0,2 M ; NaCl 0,6 M
Solution dénaturante de dépôts:	Formamide 95%; 20 mM EDTA; 0,05% Bleu de Bromophénol; 0,05% Xylène Cyanol.
Solution non dénaturante de dépôts :	Bleu de Bromophénol 0,1% ; Xylène Cyanol 0,1%.
SSC 20X :	NaCl 3 M ; Citrate Trisodique 0,3 M (pH 7.2)
Solution de neutralisation :	Tris-HCl 0,5M (pH7,5); NaCl 1,5 M
Top Agar :	LB 0,8% agarose

INTRODUCTION

En 1977, Uchiyama *et al.* décrivaient la leucémie aiguë T de l'adulte (ATLL) caractérisée par une présentation clinique et un aspect cytologique particuliers. La distribution géographique des patients suggérait une participation virale dans le développement de cette affection. En 1980, une équipe américaine et un laboratoire japonais découvraient le rétrovirus HTLV-1 (*Human T-cell Leukemia Virus Type 1*) à partir de prélèvements de patients atteints de lymphomes cutanés ou d'ATLL (Poiesz *et al.*, 1980; Yoshida *et al.*, 1982). La découverte de ce premier rétrovirus oncogène humain permettait d'inclure les rétrovirus dans le groupe des agents pathogènes humains. En 1985, une étude séro-épidémiologique retenait HTLV-1 comme l'agent de la paraparésie spastique tropicale (TSP) (Gessain *et al.*, 1985). L'implication de HTLV-1 dans d'autres affections comme l'arthropathie inflammatoire chronique et certaines uvéites a été décrite plus récemment (Nishioka *et al.*, 1989; Mochizuki *et al.*, 1992).

Le nombre d'individus infectés dans le monde est estimé à 15 ou 20 millions de personnes (De Thé et Bomford, 1993). La majorité des sujets infectés ne développe aucune affection cependant ils peuvent transmettre le virus. La contamination par HTLV-1 peut s'effectuer par voie sanguine et sexuelle ou de la mère à l'enfant *via* l'allaitement (Manns *et al.*, 1991). Les principaux foyers d'endémie sont le Japon, les Caraïbes, l'Afrique Intertropicale, l'Amérique du Sud et la Mélanésie.

HTLV-1 est un rétrovirus de la famille des oncornavirus. Dans le cycle répliatif des rétrovirus, une étape de rétrotranscription du génome viral précède l'intégration de l'ADN viral dans le génome de la cellule hôte. HTLV-1 ne s'intégrant pas à un site précis du génome hôte, les mécanismes d'insertion/promotion ne peuvent être retenus dans le développement des affections (Yoshida *et al.*, 1982 et 1986). A la différence des principaux rétrovirus oncogènes, le virus HTLV-1 ne comporte pas d'oncogène d'origine cellulaire (Seiki *et al.*, 1983) mais code la protéine transactivatrice Tax qui semble jouer un rôle majeur dans la pathogénie de l'infection.

Contrairement aux lentivirus, HTLV-1 est caractérisé par une stabilité génétique importante (Gessain *et al.*, 1992) et une charge virale élevée, en l'absence de malignité (Shinzato *et al.*, 1991; Kira *et al.* 1991; Wattel *et al.*, 1992). Cette association, à priori paradoxale, est expliquée par le mode de réplication de HTLV-1 qui repose essentiellement sur une multiplication clonale, endogène, du provirus à travers la réplication de sa cellule hôte (Wattel *et al.*,1995). L'implication de ce mode de réplication dans la genèse des affections associées à HTLV-1 n'est pas connue et fait l'objet de cette étude.

Les résultats exposés dans cette thèse ont été présentés dans les publications et communications suivantes :

PUBLICATIONS.

- Cavrois M. & Wattel E. (1995). HTLV-1 et pathologie hématologique. *Hématologie*. 1, 45-51.
- Cavrois M., Wain-Hobson S. & Wattel E. (1995). Stochastic events in amplification of HTLV-I integration sites by Linker-Mediated PCR. *Virus Research*. 146, 179-184.
- Cavrois M., Wain-Hobson S. & Wattel E. (1996). Clonal expansion of HTLV-1 infected cells with accumulation of proliferating cells during the course of infection in asymptomatic carriers. *Oncogene*. 12, 2419-2423.
- Cavrois M., Wain-Hobson S., Gessain A., Plumelle Y. & Wattel E. (1996). Adult T-cell leukemia/lymphoma on a background of clonally expanding HTLV-1 positive cells. *Blood*. 88, 4646-4650.
- Wattel E., Cavrois M., Gessain A. & Wain-Hobson S. (1996). Clonal expansion of infected cells - a way of life for HTLV-I. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology & Human Retrovirology*. 13 (suppl 1), 92-99.
- Cavrois M., Gout O., Gessain A., Wain-Hobson S. & Wattel E. (1997). HTLV-1 crosses the blood brain barrier via infected cells at the proviral state. *manuscrit en préparation*.

COMMUNICATIONS ORALES et POSTERS.

- Cavrois M., Vartagnian JP, Pelletier E., Gessain A., Wain-Hobson S. & Wattel E. (1994). Assesment of HTLV-1 bearing T cell expansion in asymptomatic carriers and symptomatic carriers without malignancy. *Br. J. Haematology*, 87, suppl 1- First Meeting of the *European Haematology Association*. Communication Orale.
- Cavrois M. & Wattel E. (1994). HTLV-1 replication in vivo. Molecular Epidemiology of HTLVs workshop, HTLV European Research Network. Communication Orale.
- Cavrois M., Vanrumbeke M., Fenaux P., Wain-Hobson S. & Wattel E. (1995). *In vivo* assesment of retrovirus infected cell clonality in human through enzymatic amplification of integration sites. *J. Exp. Clin. Hematology*. 37, 60. - XIVth Congress of the French Society of Hematology. Communication Orale.
- Cavrois M., Wain Hobson S. & Wattel E. (1995). Natural history of HTLV-1 infection. *J. Exp. Clin. Hematology*. 37, 111.

- Wattel E., Cavrois M., Vartanian J-P., Gessain A. & Wain-Hobson S. (1995). Clonal expansion of infected cells is present in all HTLV-1 carriers with or without malignancy. The tenth Workshop of France-Japan Co-operative Cancer Research Program. Communication Orale.
- Cavrois M., Gessain A., Wain-Hobson S. & Wattel E. (1995). HTLV-1 Replication is different between asymptomatic carriers and TSP/HAM Patients. *J. Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, 10, 2. -*The VIIth International Conference on Human Retrovirology*.
- Cavrois M., Gessain A., Plumelle Y. Wain-Hobson S. & Wattel E. (1995). HTLV-1 replication in adult T cell Leukemia. *J. Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*, 10, 2. *The VIIth International Conference on Human Retrovirology*. Communication orale.
- Cavrois M., Gessain A., Plumelle Y. Wain-Hobson S. & Wattel E. (1995). HTLV-1 replication in adult T cell Leukemia. *Hematology and cell therapy*, 38, 1. - *XVth congress of the French Society of Hematology*.
- Cavrois M., Gessain A., Wain-Hobson S. & Wattel E. (1995). HTLV-1 Replication is different between asymptomatic carriers and TSP/HAM Patients. *Hematology and cell therapy*, 38, 1. - *XVth congress of the French Society of Hematology*. Communication Orale.
- Cavrois M., Gessain A., Plumelle Y. Wain-Hobson S. & Wattel E. (1995). HTLV-1 replication in adult T cell Leukemia. - *IIth congress of the European Hematology Association*. Communication Orale.
- Cavrois M., Lerclercq I., & Wattel E. (1996). High oligoclonal proviral load in Adult T-cell Leukemia without 3' deletion of HTLV-1 integration sites. *American Society of Hematology - XIII Annual Meeting*.
- Lerclercq I., Cavrois M., & Wattel E. (1996). HTLV-1 integration in vivo clustered in A/T rich regions a non homogeneous distribution of A/T nucleotides and dinucleotides. *American Society of Hematology - XIII Annual Meeting*.

GENERALITES

I. LE RETROVIRUS HTLV-1.

Le rétrovirus HTLV-1 appartient à la famille des oncornavirus qui inclut également le virus HTLV-2, le Virus de la Leucémie T du Singe (STLV) et le Virus de la Leucémie Bovine (BLV). La particule virale des oncornavirus est constituée de deux molécules d'ARN associées à des protéines virales, entourées d'une capsid et d'une enveloppe d'origine cellulaire (Fig. 1G). Comme tous les rétrovirus, suite à l'infection des cellules, le génome ARN de HTLV-1 est rétrotranscrit en ADN par la transcriptase inverse dans le cytoplasme avant d'être intégré dans le génome de la cellule hôte. HTLV-1 est alors sous forme provirale. En parasite des cellules, HTLV-1 utilise les enzymes de la cellule hôte pour sa réplication et ne code que les protéines nécessaires à la formation de nouvelles particules virales et à la régulation de l'expression de ses gènes.

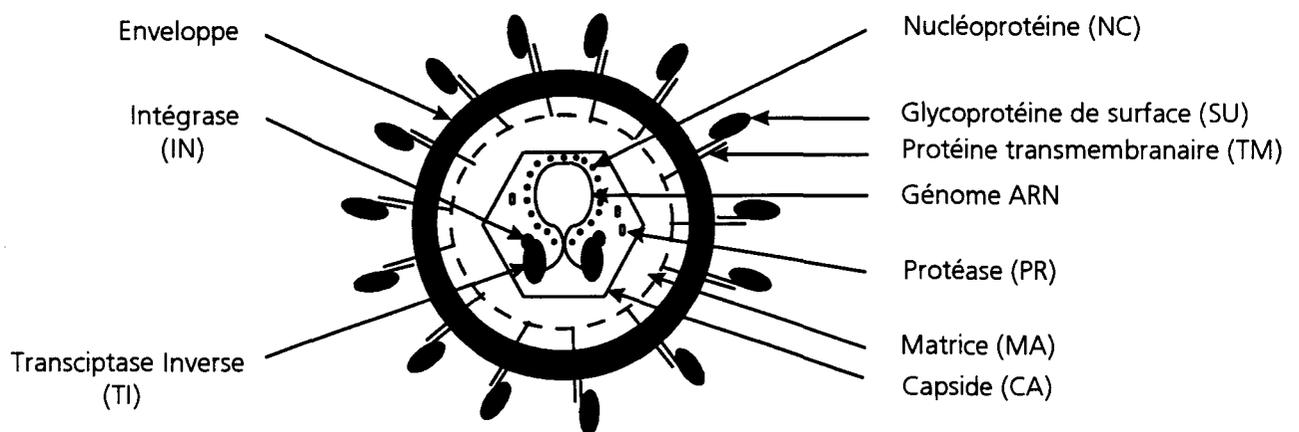


Figure 1G : Structure de la particule virale des rétrovirus. (d'après Coffin, 1996)

I.1. STRUCTURE DU PROVIRUS.

I.1.1. Organisation génétique de HTLV-1.

L'organisation génétique de HTLV-1 est complexe. L'utilisation de matrices ARN doublement, simplement ou non épissées et de différentes phases couvertes de lecture (ORF) permet l'expression de l'ensemble de ces protéines à partir d'un génome de 9 kb (Seiki *et al.*, 1983). La structure génétique HTLV-1 est représentée dans la Figure 2G. Comme tous les rétrovirus, le génome de HTLV-1 porte les gènes *gag*, *pol* et *env* mais se distingue des autres rétrovirus oncogènes par une région d'environ 2 kb dans la partie 3' du virus. Cette région, initialement appelée pX en raison de son rôle inconnu, possède 4 ORF et code au moins 6 protéines dont les mieux caractérisées sont les protéines régulatrices Tax et Rex (Seiki *et al.*, 1985; Sodroski *et al* 1985; Koralknik *et al.*, 1992).

Deux Répétitions Terminales Longues (LTR), générées lors de la rétrotranscription et constituées de 3 régions U3, R et U5, encadrent la séquence provirale (Fig. 2G). La région U3 contient les séquences régulatrices du promoteur. Elle comporte 3 répétitions d'un motif de 21 pb contenant l'élément de réponse des protéines de la famille CREB/ATF (*cAMP Responsive Element Binding / Activating Transactivation Factor*). D'autres facteurs de transcription comme Sp1, TIF-1, Ets-1 et Myb se lient sur le segment U3 et influencent l'expression des gènes viraux (Yoshida *et al.*, 1994). La transactivation du LTR 5' va permettre la synthèse d'un ARN jusqu'au site de terminaison de la transcription situé à la jonction des régions U3 et R du LTR 3'. Ce messenger génomique constitue le génome de HTLV-1 et sert de matrice à la synthèse des protéines codées par les gènes *gag* et *pol*. La traduction des messagers simplement épissés permet la synthèse des protéines d'enveloppe. Les messagers, dans lesquels 2 introns sont éliminés, codent les protéines p40^{Tax}, p27^{Rex}, p21^{Rex}, p12^I, p13^{II} et p30^{II}. Le contrôle du transport des ARN messagers subgénomiques permet la régulation de l'expression de ces différentes protéines.

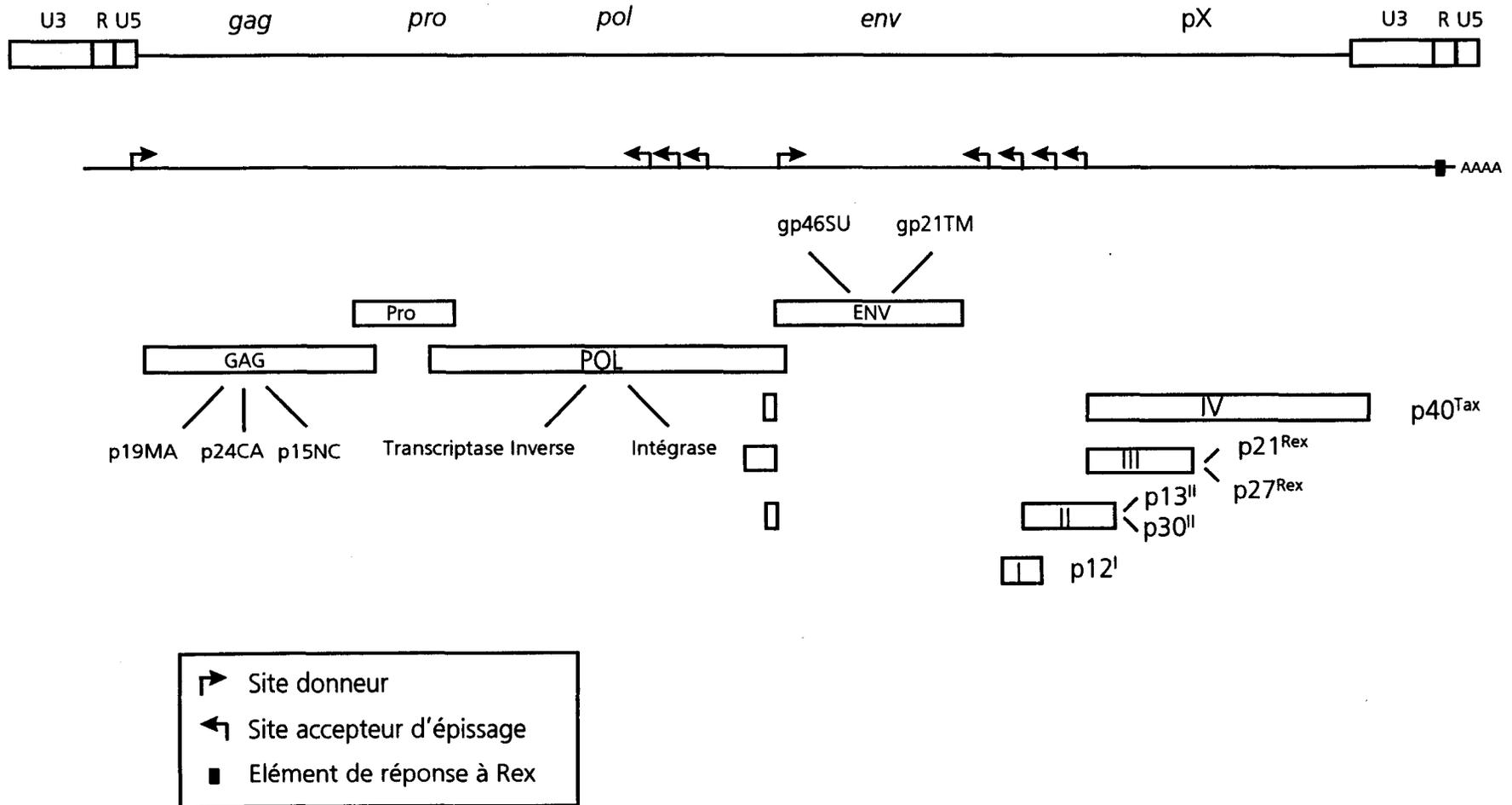


Figure 2G : Organisation génomique de HTLV-1

I.1.2. Protéines de structure et enzymes virales.

Les protéines structurales codées par les gènes *gag* et *env* et les enzymes virales comme la protéase et la transcriptase inverse sont codées par des messagers non épissés ou partiellement épissés (Fig. 2G). Leurs dispositions dans la particule virale sont schématisées dans la Figure 1G.

I.1.2.1. Protéines de structure.

Comme pour les autres rétrovirus, la région *gag* est initialement traduite sous forme d'une polyprotéine précurseur. Ce précurseur de 53 kDa (Pr53) est clivé pour former les 3 protéines de structure : la protéine de la matrice (p19 MA), la protéine de la capsid (p24 CA) et la protéine de la nucléocapsid (p15 NC). La protéine MA comporte, à l'extrémité aminoterminal, un groupement acide myristique caractéristique des protéines qui se lient sur la face interne des membranes cellulaires. La protéine hydrophobe CA constitue la structure interne du virion (core). La protéine NU est une petite protéine basique qui s'associe au génome ARN de la particule virale.

I.1.2.2. La protéase.

Codée par un cadre ouvert de lecture qui couvre la fin du gène *gag* et le début du gène *pol*, la protéase de HTLV-1 est synthétisée suite à un décalage du cadre de lecture des ribosomes. Cette enzyme est nécessaire pour obtenir des clones infectieux. Après maturation par auto-catalyse, elle permet le clivage des produits des gènes *gag* et *pol*.

I.1.2.3. Les protéines codées par la région *pol*.

La région *pol* code une protéine de 896 aa. La partie 5' de *pol* code la transcriptase inverse (RT). C'est l'enzyme clé des rétrovirus. Douée de propriétés de synthèse d'ADN à partir d'une matrice ARN ou ADN et de RNase H, elle permet la synthèse de l'ADN proviral à partir du génome ARN. L'intégrase, dérivé carboxyterminal de clivage des produits de la

région *pol*, permet l'intégration du provirus grâce à ses activités de clivage de l'ADN et de transfert de brin.

I.1.2.4. Les protéines d'enveloppe.

Le gène *env* code une glycoprotéine précurseur d'environ 63 kD. La glycoprotéine de surface (gp46 SU) et la protéine transmembranaire (gp21 TM) qui en dérivent sont associées de façon non covalente dans la particule virale. La gp46 est douée de propriétés mitogènes et peut stimuler la prolifération des cellules, infectées ou non, et favoriser ainsi l'infection de nouvelles cellules (Gazzolo *et al.*, 1987).

I.1.3. Les protéines codées par pX.

I.1.3.1. La protéine transactivatrice Tax.

La protéine p40^{Tax} (Tax) est une phosphoprotéine nucléaire qui transactive les gènes viraux et de nombreux gènes cellulaires. Tax ne se lie pas directement à l'ADN, son activité est médiée par des protéines cellulaires dont les protéines des familles CREB/ATF (*cAMP Responsive Element Binding / Activating Transactivation Factor*), NFκB (Facteur Nucléaire κB) et SRF (Facteur de Réponse au Serum).

Tax régule l'expression des gènes viraux à partir du LTR 5' principalement via 3 éléments de réponse de 21pb localisés dans le segment U3 (Sodroski *et al.*, 1984; Felber *et al.*, 1985). Les facteurs de transcription de la famille CREB/ATF sont impliqués dans cette activité (Jeang *et al.*, 1988). L'interaction de Tax avec CREB, en augmentant et/ou stabilisant leur dimérisation, favorise leur liaison à leur élément de réponse (CRE) compris dans le motif de 21pb (Zhao *et al.*, 1992; Franklin *et al.*, 1993; Wagner *et al.*, 1993). Le complexe ternaire formé par Tax, CREB et CRE suggère que HTLV-1 contourne le système normal de régulation de l'activité des CREB pour activer la transcription de ses gènes (Fig. 3G). En l'absence de Tax, CREB est activée par phosphorylation suite à un signal extracellulaire qui passe par la voie de l'AMPc et la protéine kinase A. Les CBP (*CREB Binding Protein*) se lient alors à la forme phosphorylée de CREB pour activer la transcription à partir de l'élément de

réponse à l'AMPc (Chrivia *et al.*, 1993). En interagissant avec la forme non phosphorylée de CREB, Tax pourrait mimer les fonctions des CBP et activer, en l'absence de signal extracellulaire, la transcription à partir du motif de 21pb (Suzuki *et al.*, 1993; Yoshida, 1996).

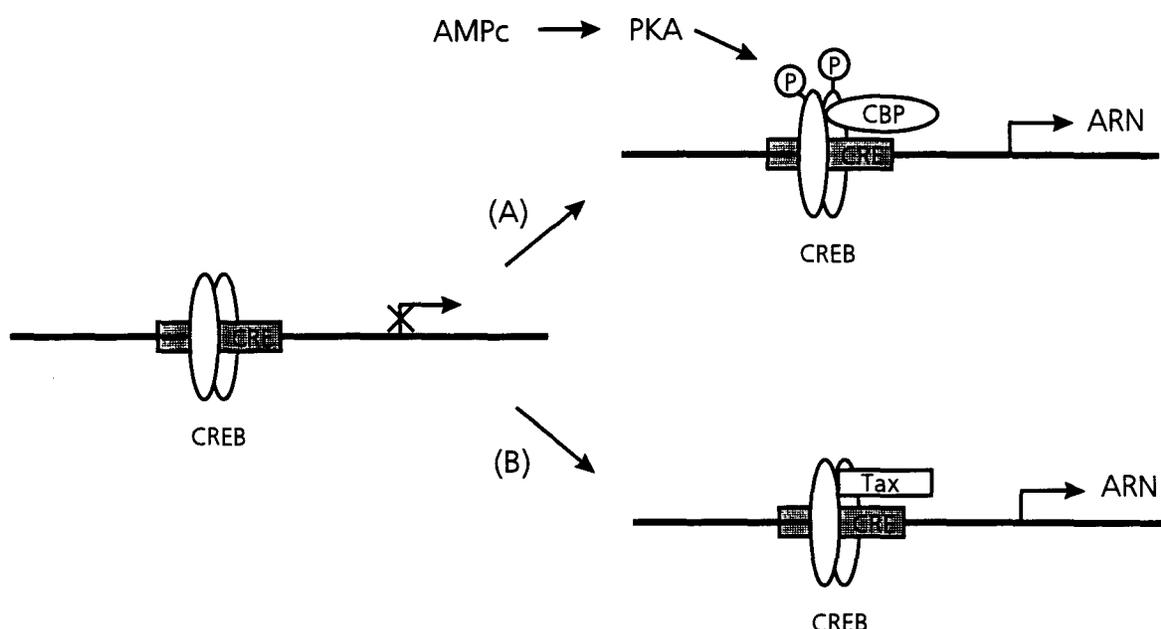


Figure 3G : Effet de Tax sur la transactivation par les facteurs de la famille CREB/ATF.

(A) en l'absence de Tax.

(B) en présence de Tax.

Parallèlement à son activité régulatrice de l'expression des gènes viraux, Tax transactive des gènes cellulaires impliqués dans la transformation ou l'immortalisation des cellules. Parmi eux, figurent des gènes codant des lymphokines, certains de leurs récepteurs et des proto-oncogènes (Tableau 1G). Le seul gène décrit dont l'expression est inhibée par Tax est celui de la β -polymérase qui est impliquée dans les phénomènes de réparation de l'ADN (Jeang *et al.*, 1990). La transactivation des gènes cellulaires par Tax semble s'effectuer par au moins 2 voies signalétiques : la voie des protéines NF κ B/Rel et celle des Facteurs de Réponse au Serum (SRF). Dans la première, Tax semble agir principalement en déstabilisant les complexes I κ B/NF κ B qui séquestrent les protéines NF κ B dans le cytoplasme (Hirai *et al.*,

cytokines

GM-CSF

IL-1 α

IL-1 β

IL-2

IL-3

IL-4

IL-5

IL-6

IL-8

IL-9

IL-15

TGF- β

TNF- α

TNF- β

IFN- γ

oncogènes

c-fos

c-sis

c-rel

c-myc

c-fra 1

divers

chaîne α récepteur à l'IL2

β -polymérase *

Tableau 1G : Principaux gènes transactivés par Tax.

(* inhibition de l'expression)

1994; Suzuki *et al.*, 1995; Yoshida, 1996) (Fig. 4G). Tax, en se liant à la sous-unité HsN3 du protéosome, pourrait favoriser la dégradation de I κ B et la libération des protéines NF κ B (Béraud *et al.*, 1996). Leur libération permet leur translocation dans le noyau où elles pourront se lier à leur élément de réponse pour transactiver des gènes comme l'IL2 ou la chaîne α du récepteur à l'IL2. L'interaction directe entre Tax et la sous-unité p50 de NF κ B indique toutefois que Tax agirait également dans le noyau directement sur les protéines NF κ B (Suzuki *et al.*, 1993; Franchini, 1995). L'autre voie signalétique par laquelle Tax peut transactiver les gènes est celle des facteurs de réponse au serum. En effet, Tax a été observée avec p67^{SRE} dans des complexes qui transactivent des gènes de réponse immédiate, comme *c-fos* ou *fra-1*, comportant un Elément de Réponse au Serum (SRE) dans leurs régions promotrices (Fuji *et al.*, 1991 et 1992; Tsuchiya *et al.*, 1993).

La protéine Tax intervient également dans la régulation du cycle cellulaire en interagissant avec la protéine p16^{INK} (Suzuki *et al.*, 1996). p16^{INK} inhibe la voie Rb qui contrôle l'entrée en phase S de la cellule. Tax, en se fixant à cet inhibiteur, libère la CDK4 (Kinase Dépendante de la Cycline 4) qui, en présence de la cycline D, phosphoryle la protéine Rb (Fig.5G). Le facteur de transcription E2F, ainsi libéré, peut transactiver les gènes requis dans la transition G1/S.

La localisation subnucléaire de Tax pourrait être déterminante pour son activité. L'étude en microscopie confocale de la localisation de Tax révèle une distribution nucléaire ponctuée dans les cellules transfectées ou transformées par Tax (Semmes *et al.*, 1996). La protéine Tax est observée dans les points d'ARN naissants et colocalise avec SC35 qui appartient au *spliceosome*. La dénaturation par la chaleur de ces structures ponctuées indique l'existence de 2 populations. Une partie des protéines Tax semble fortement associée à ces structures alors que l'autre existe hors de ces points et reste transcriptionnellement active. Dans une seconde étude, une interaction entre Tax et Int-6, dont la localisation nucléaire est ponctuée, a été décrite (Desbois *et al.*, 1996). Int-6 est codée par un locus identifié suite à l'intégration du virus MMTV. La liaison de Tax à la protéine Int-6 provoque une redistribution de la protéine Int-6 dans le cytoplasme. Ainsi, Tax semble altérer ces structures nucléaires et pourrait par ce biais moduler l'expression des gènes cellulaires.

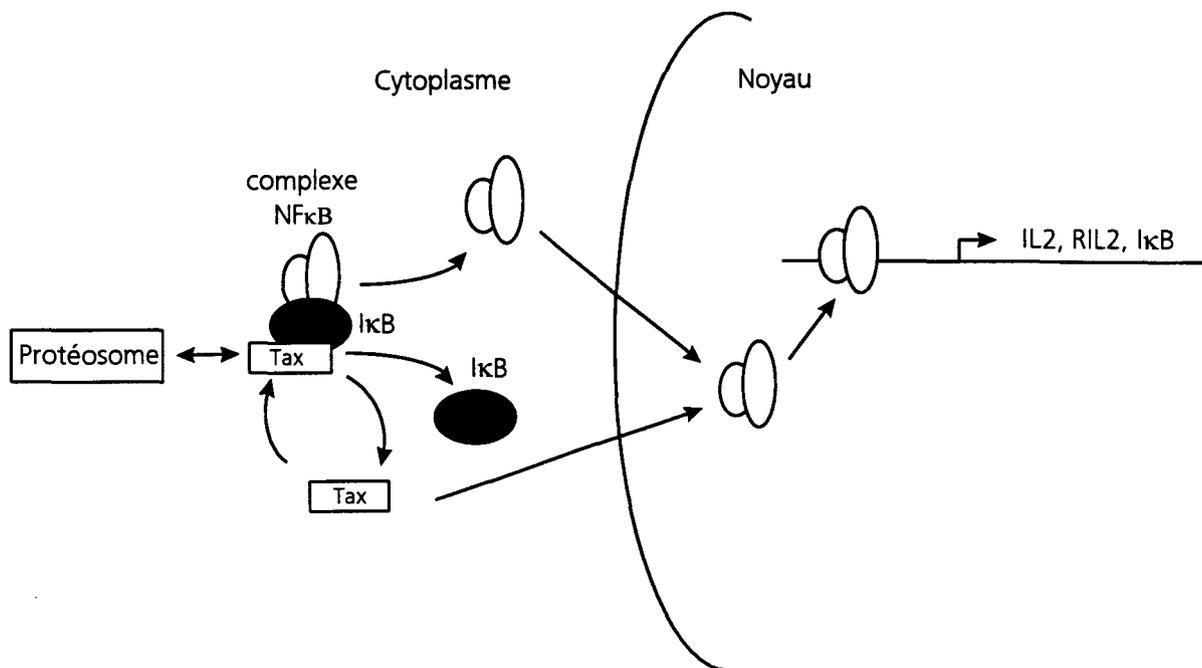


Figure 4G : Implication de Tax dans la voie de transduction du signal par NFκB.

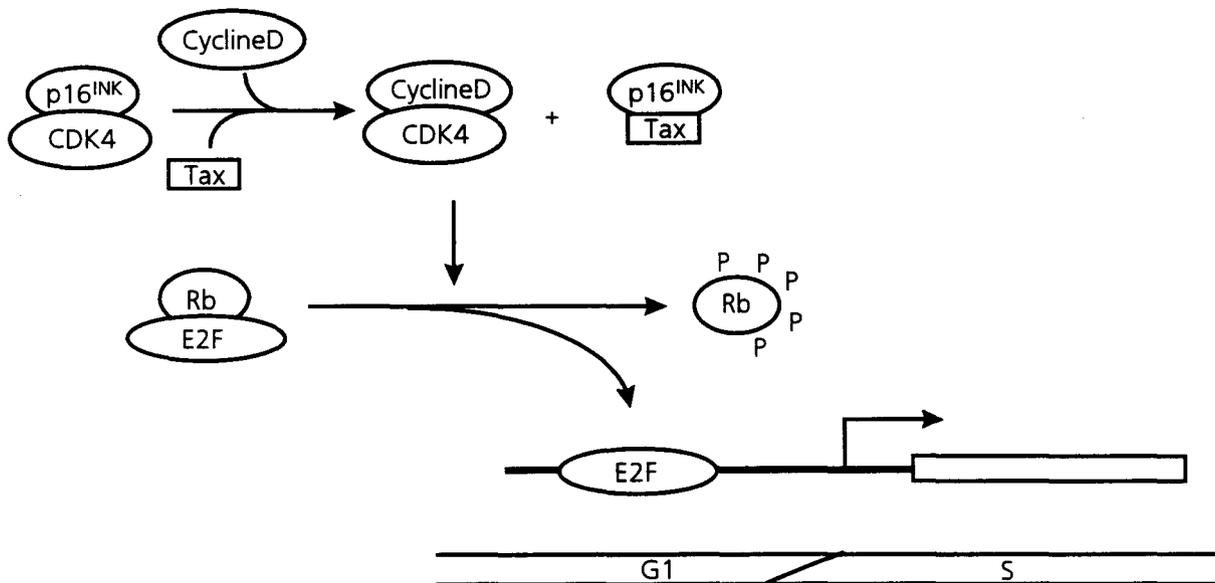


Figure 5G : Implication de Tax dans le contrôle de l'entrée en phase S.

I.1.3.2. La protéine Rex.

La phosphoprotéine p27^{Rex} (Rex) de 189 aa est une protéine régulatrice essentielle. En contrôlant la balance d'expression des ARNm subgénomiques, elle régule la réplication virale (Hidaka *et al.*, 1988; Sadai *et al.*, 1988). La protéine Rex, comme son équivalent fonctionnel Rev du VIH, agit à un niveau post-transcriptionnel. En permettant le transport dans le cytoplasme des messagers simplement ou non épissés, elle favorise la synthèse des protéines de structure et des enzymes virales (Green *et al.*, 1990). Rex se lie directement à l'ARN au niveau de l'Elément de Réponse à Rex (RRE) localisé en 3' des messagers et correspondant à une structure de l'ARN hautement organisée (Handy *et al.*, 1989; Basskerville *et al.*, 1995). L'activité de la protéine Rex est liée à la présence dans son domaine d'activation d'un Signal d'Exportation Nucléaire (NES) qui lui permet de faire la navette entre le cytoplasme et le noyau (Bogerd *et al.*, 1996; Palmeri *et al.*, 1996). Les mécanismes de transport sont encore inconnus, mais la protéine cellulaire Rab/hRIP (*Rev/Rex Activation domain binding / human Rev interaction protein*) semble médier les activités biologiques de Rex et Rev en se liant spécifiquement à ce domaine NES (Bogerd *et al.*, 1995 et 1996; Fritz *et al.*, 1995).

Outre son rôle dans l'exportation des transcrits, Rex semble agir en amont de l'épissage, probablement en stabilisant les transcrits (Inoue *et al.*, 1991). Une étude de Rex 2 codée par HTLV-2 indique que cette classe de protéine pourrait inhiber à un stade précoce la formation du *spliceosome* sur le transcrit (Bakker *et al.*, 1996).

I.1.3.3. La protéine p12^I.

La protéine p12^I, codée par les ARNm simplement ou doublement épissés, est une protéine hydrophobe localisée dans les endomembranes et les régions périnucléaires (Koralnik *et al.*, 1993). p12^I potentialise la transformation de fibroblastes par l'oncoprotéine E5 du papillomavirus bovin (Franchini *et al.*, 1993). Comme E5, elle est capable de se lier à la sous-unité de 16kd de l'ATPase H⁺ vacuolaire dont la juxtaposition de 6 unités crée des pores pour le transport des protons dans les organelles cellulaires (Franchini *et al.*, 1993). Les homologies structurales de ces deux protéines suggèrent que p12^I agit de façon analogue à E5. La protéine E5 se lie au récepteur au PDGF et l'active (Goldstein *et al.*, 1992). Récemment,

Mulloy *et al.* (1996) ont montré que p12^I se lie aux chaînes β et γ du récepteur à l'IL2 et affecte leur expression membranaire. Par cette interaction, HTLV-1 pourrait altérer les voies signalétiques médiées par le récepteur à l'IL2.

I.1.3.4. Autres protéines codées par cette région pX.

Les protéines p30^{II} (Tof) et p13^{II} sont respectivement localisées dans les nucléoles et au niveau de la matrice nucléaire. Leurs rôles demeurent inconnus. Ces protéines ne semblent pas nécessaires au maintien du phénotype néoplasique dans les cellules leucémiques. En effet, de fréquentes mutations générant des codons stop sont observées dans les séquences de p13^{II} et p30^{II} (Berneman *et al.*, 1992; Chou *et al.*, 1995).

La protéine cytosolique p21^{Rex}, identifiée dans plusieurs lignées cellulaires infectées, est traduite à partir de messagers doublement ou simplement épissés (Berneman *et al.*, 1992; Orita *et al.*, 1991; Furukawa *et al.*, 1991). Le rôle de cette protéine est inconnu. Les messagers simplement épissés la produisant sont fortement exprimés dans les PBMC de patients atteints d'ATLL (Berneman *et al.*, 1992).

I.2. REGULATION DE LA REPLICATION DE HTLV-1.

Immédiatement après l'infection et l'intégration de HTLV-1, les premiers événements transcriptionnels sont sous la dépendance de facteurs cellulaires. La transcription des gènes proviraux mène initialement à la synthèse d'ARN messagers complets. En l'absence de Rex, seuls les ARNm doublement épissés parviennent dans le cytoplasme. La position des codons d'initiation de la traduction de Tax et de Rex conduit à la traduction préférentielle de Tax. Les gènes viraux et cellulaires transactivés par Tax s'expriment et activent la boucle de croissance autocrine des cellules infectées. L'accumulation progressive de la protéine Rex va permettre le transport dans le cytoplasme de messagers simplement ou non épissés codant les enzymes viraux et les protéines de structure. Cette étape conduit à la formation de nouvelles particules viraux. L'action de Rex sur les messagers doublement épissés aboutit finalement à l'inhibition de l'expression de tous les gènes viraux établissant ainsi une latence virale.

L'activation des cellules infectées peut alors à nouveau initier la transcription des gènes viraux. L'équilibre des effets positifs et négatifs de Tax et Rex l'une sur l'autre et sur les produits des autres gènes viraux et cellulaires détermine le taux de réplication virale et de prolifération cellulaire (Green *et al.*, 1990; Koralnik *et al.*, 1994).

I.3. TROPISME DE HTLV-1.

Comparé aux autres rétrovirus, HTLV-1 est relativement peu infectieux. Bien que des particules virales libres puissent infecter les cellules (Gazzolo *et al.*, 1987), l'infection par HTLV-1 nécessite la plupart du temps des contacts cellulaires directs (Markham *et al.*, 1983).

In vivo, le virus HTLV-1 infecte et transforme principalement les cellules T de phénotype CD4. En effet, les cellules leucémiques de patients atteints d'ATLL sont principalement de phénotype CD4 et exceptionnellement CD8 (Catovsky *et al.*, 1982; Hattori *et al.*, 1981; Harper *et al.*, 1986). Le phénotype CD4 prédomine également dans les cultures cellulaires établies à partir des PBMC d'individus infectés (Gessain *et al.*, 1990) ou à partir de PBMC infectées par HTLV-1 *in vitro* (Popovic *et al.*, 1983). L'analyse des sous-populations cellulaires infectées chez 4 patients atteints de TSP/HAM et chez un porteur asymptomatique indique que 90 à 99% des cellules infectées sont de phénotypes CD4⁺ CD8⁻ CD45RO⁺ (Richardson *et al.*, 1990). Dans cette étude, HTLV-1 n'était pas détecté par PCR dans les sous-populations enrichies en lymphocytes B, en monocytes ou en cellules NK.

Cependant, les expériences d'infection *in vitro*, réalisées par coculture de cellules cibles avec des cellules productrices de virus traitées aux rayons X ou à l'actinomycine D, montrent qu'une grande partie des cellules, qu'elles soient d'origine lymphoïde ou non, sont susceptibles d'être infectées. Ces techniques permettent d'infecter des lignées de phénotype CD8, les cellules CD8 purifiées à partir de PBMC, des lignées de lymphocytes B, des monocytes et des macrophages. Les cellules endothéliales (Ho *et al.*; 1984 ; Hoxie *et al.*, 1984), microgliales (Hoffman *et al.*, 1992), gliales (Saida *et al.*, 1988), dendritiques

(Macatonia *et al.*, 1992) ou des cellules des tissus nerveux (Akagi *et al.*, 1992 ; Giraudon *et al.*, 1995) peuvent également être infectées (Sinangil *et al.*, 1985;)

Le tropisme des rétrovirus peut être déterminé à deux stades de leur cycle répliatif : au moment de l'adsorption/pénétration du virus ou lors de la transcription du provirus. Les études de fixation de HTLV-1 sur les cellules et les expériences d'interaction de pseudotypes indiquent que le récepteur du virus est présent sur une grande variété de lignées cellulaires lymphoïdes de nombreuses espèces (Nagy *et al.*, 1984; Weiss *et al.*, 1985). L'activation de PBMC semble d'ailleurs augmenter son expression dans les cellules (Yamamoto *et al.* 1984; Krichbaum-Stenger *et al.*, 1987). Le tropisme de HTLV-1 paraît donc être déterminé après la pénétration du virus. En utilisant des fractions purifiées de lymphocytes CD4 et CD8, Newbound *et al.* (1996) ont montré qu'en présence d'un taux identique d'infection, la production de particules virales est supérieure dans la fraction des lymphocytes CD4. De plus, l'étude de l'activité transcriptionnelle conduite par le LTR de HTLV-1 montre que la transactivation est plus efficace dans les cellules CD4 (Newbound *et al.*, 1996). Ces données suggèrent la présence et/ou l'activation, dans les lymphocytes CD4, de facteurs de transcription reconnaissant le LTR de HTLV-1 médiant ainsi la transcription, le tropisme et le potentiel transformant du virus.

II. ONCOGENESE VIRALE HTLV-1.

II.1. LA LEUCEMIE AIGUE DE L'ADULTE.

La leucémie aiguë de l'adulte (ATLL) est une hémopathie maligne de l'adulte qui concerne principalement les lymphocytes T matures de phénotype CD4. Cette affection se développe chez 2 à 5 % des individus infectés par HTLV-1 après une latence de 20 à 30 ans (Yamaguchi *et al.* 1993). Les études épidémiologiques indiquent que l'ATLL se développe plus souvent chez les individus infectés à la naissance et suggèrent que la durée de l'infection pourrait être déterminante dans le développement de l'ATLL (Murphy *et al.*, 1989; Blattner *et al.*, 1989).

II.1.1. Aspect clinique

Au niveau clinique, plusieurs formes sont décrites en rapport avec le mode d'installation, la présentation clinique et l'évolution (Ikeda *et al.*, 1993). Les quatre sous-types comprennent les formes chroniques, smoldering, aiguës et lymphomateuses. L'hypercalcémie et les atteintes cutanées et/ou osseuses sont caractéristiques des formes aiguës. Les formes chroniques et smoldering, moins agressives, peuvent évoluer en quelques mois en formes aiguës. L'évolution des formes aiguës est constamment péjorative avec résistance aux traitements habituellement proposés pour les lymphomes et les leucémies aiguës. La médiane de survie des patients atteints de la forme aiguë est inférieure à 6 mois. Récemment, un traitement associant la zidovudine à l'IFN- α a permis l'obtention de réponses partielles ou complètes (Gill *et al.*, 1995; Hermine *et al.* 1995).

II.1.2. Aspect cytologique et anomalies génétiques des cellules.

L'aspect cytologique des cellules néoplasiques révèle la présence de noyaux multilobés qui leur donne le nom de cellules en trèfle. Elles sont majoritairement de phénotype CD2+, CD3+, CD4+, CD8-. Ces cellules expriment fortement la chaîne α du récepteur à l'IL2 (ou antigène Tac) et le DR.

L'ATLL ne comporte pas d'anomalie cytogénétique spécifique qui permettrait de rapporter à un gène particulier l'acquisition et/ou le maintien du phénotype néoplasique. Des trisomies 3 ou 7, des réarrangements du chromosome 6 ou des pertes du chromosome X sont les anomalies les plus souvent rencontrées (Maruyama *et al.*, 1990). La fréquence de ces anomalies semble augmenter au cours de l'évolution de la maladie (Sanada *et al.*, 1987). Des mutations du gène p53 sont observées chez 30 à 50% des patients (Cesarman *et al.*, 1992; Sakashita *et al.*, 1992). Lorsqu'elle est recherchée, une perte d'hétérozygotie est presque toujours observée. Des délétions homozygotes du gène p16^{INK} sont apparemment moins fréquentes que dans les autres types de leucémies (Hatta *et al.*, 1995).

II.1.3. Aspect virologique.

Bien que le provirus HTLV-1 soit toujours présent dans les prélèvements tumoraux (Yoshida *et al.*, 1984), l'expression des gènes proviraux dans ces cellules est très faible. Les techniques conventionnelles de blot de northern et de western ne permettent pas la détection des produits des gènes de HTLV-1 (Sugamura *et al.*, 1984; Tochikura *et al.*, 1985). Dans ces cellules, les messagers tax/rex sont à peine détectables par la technique de RT-PCR (Gessain *et al.*, 1991). Dans les premières études, le faible nombre de cellules exprimant des ARNm tax/rex, estimé aux environs de 1/1000 PBMC, suggérait que les gènes viraux ne s'exprimaient pas dans la plupart des cellules hautement activées d'ATLL (Kinoshita *et al.*, 1989). Cependant, une étude plus récente, réalisée par hybridation *in situ*, indique que les cellules de 7 patients atteints d'ATLL sur 10 expriment des ARNm tax/rex (Setoya *et al.*, 1994). Dans cette étude le nombre de cellules positives était compris entre 1 et 5% chez les asymptomatiques, entre 10 et 50% chez les 2 formes chroniques étudiées et entre 50 et 100% pour 7 des 10 ATLL. Bien que cette technique ne soit pas quantitative, ces résultats suggéraient la présence de niveaux d'expression de transcrits tax/rex homogènes mais faibles dans les cellules infectées. Une étude quantitative par RT-PCR indique que l'expression des gènes viraux dans les cellules d'ATLL est environ 50 fois plus faible qu'en phase asymptomatique (Furukawa *et al.*, 1995).

Quel que soit le sous-type d'ATLL, les prélèvements tumoraux sont caractérisés par un profil clonal d'intégration de HTLV-1 (Yoshida *et al.*, 1984). L'analyse du provirus par blot de Southern révèle parfois la présence de plusieurs provirus intégrés et/ou des délétions provirales (Yoshida *et al.*, 1984; Konishi *et al.*, 1984; Hiramatsu *et al.*, 1986; Ohshima *et al.*, 1991). Les fréquences des provirus défectifs, estimées par PCR (Korber *et al.*, 1991) et par blot de Southern (Tamiya *et al.*, 1996), se situent respectivement aux environs de 30% et 60%. La plupart des délétions concerne les gènes *gag* et *env* et conserve la région pX en affectant parfois les sites donneurs et accepteurs d'épissage. Tamiya *et al.* (1996) les classent en deux types : des délétions internes conservant les LTR et des délétions conduisant à la perte du LTR 5'. Ces dernières semblent plus fréquentes dans les formes aiguë et

lymphomateuse. La signification biologique de ces délétions et des différents profils d'intégration de HTLV-1 dans les cellules demeure toutefois inconnue.

La faible expression des gènes viraux, la latence prolongée observée dans l'ATLL et la faible proportion d'individus développant l'ATLL suggèrent que HTLV-1 aurait un rôle initiateur dans l'acquisition du phénotype néoplasique et qu'une succession et/ou une accumulation d'événements seraient nécessaires au développement de l'ATLL. L'augmentation de la prolifération cellulaire et/ou l'inhibition de la mort cellulaire suite à l'infection pourraient augmenter le risque de transformation maligne des cellules en favorisant l'accumulation de lésions génétiques.

II.2. EFFET DE HTLV-I SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE.

II.2.1. Immortalisation / Transformation des cellules par HTLV-1.

Les PBMC de patients atteints de TSP/HAM ou de porteurs asymptomatiques prolifèrent spontanément, *in vitro*, en l'absence de stimuli exogènes (Kramer *et al.*, 1989; Itoyama *et al.*, 1988). Les nombreux gènes transactivés par Tax suggèrent qu'elle joue un rôle essentiel dans l'initiation de la transformation des cellules. Tax immortalise en culture des lymphocytes CD4 dans un contexte de vecteurs de l'herpès virus non transformants (Grassman *et al.*, 1992). Bien que Tax transforme les fibroblastes *in vitro* (Tanaka *et al.*, 1990), la transformation des cellules est plus efficace en présence de cofacteurs comme des proto-oncogènes (Pozzatti *et al.*, 1990).

En fait, la culture des PBMC de patients conduit dans un premier temps à une immortalisation des cellules qui demeurent dépendantes de l'IL2. La transformation de ces cellules n'est observée qu'après des cultures répétées (Yamamoto *et al.*, 1982). Dans les stades tardifs de la transformation *in vitro*, la production d'IL2 ne semble pas être requise pour le maintien de la prolifération (Arya *et al.*, 1984). Au cours du temps, intervient donc une sélection des cellules dont la prolifération est indépendante de l'IL2. HTLV-1 semble intervenir à deux niveaux dans ce processus (*pour revue* : Franchini *et al.*, 1995). La protéine

Tax, en stimulant l'expression de l'IL2 et de la chaîne α du récepteur à l'IL2 active la boucle autocrine / paracrine de la prolifération cellulaire T. Cependant, le faible niveau d'expression des messagers de l'IL2 dans les cellules transformées et les cellules T leucémiques des patients (Arya *et al.*, 1984; Tendler *et al.*, 1990) suggère que HTLV-1 perturbe à un second niveau la voie de transduction du signal IL2. Une activation constitutive des JAK/STAT (*Janus Kinase / Signal Transducers Activators of Transcription*) qui jouent un rôle essentiel dans la transduction du signal au travers des récepteurs aux cytokines (Darnell *et al.*, 1994) a été observée dans les cellules transformées par HTLV-1 ou issues de prélèvements d'ATLL (Migone *et al.*, 1995). De plus, dans les cellules infectées par HTLV-1, l'indépendance à l'IL2 est corrélée à une activation constitutive de la voie des JAK/STAT (Migone *et al.*, 1995). Au niveau moléculaire, la protéine p12^l de HTLV-1 semble être impliquée dans l'activation de cette voie de transduction du signal. En effet, la p12^l se lie et affecte l'expression des chaînes β et γ c du récepteur à l'IL2 à la surface de la cellule (Mulloy *et al.*, 1996; Cereseto *et al.*, 1996).

II.2.2. Implication de HTLV-1 dans la régulation du cycle cellulaire.

Les altérations de la régulation du cycle cellulaire semblent être une caractéristique commune des cellules transformées (Hunter & Pines, 1994). La progression des cellules dans le cycle cellulaire repose sur des activations séquentielles de Kinases Dépendantes de la Cycline (CDK). L'activité de ces protéines est régulée positivement par les cyclines et négativement par les inhibiteurs des CDK, de la famille de p16^{INK4} ou de p21^{waf} (*wild type p53 activated fragment*).

De récents travaux indiquent que HTLV-1 perturbe à de nombreux niveaux le système de contrôle du cycle cellulaire (Fig. 6G.) (Suzuki *et al.*, 1996; Akagi *et al.*, 1996; Cereseto *et al.*, 1996). Outre l'action inhibitrice directe de Tax sur p16^{INK4} qui libère et active la CDK4, HTLV-1 altère l'expression des cyclines D, de p18^{INK4} et de p21^{waf} (Akagi *et al.*, 1996). Les cellules des lignées T infectées expriment préférentiellement la cycline D2 alors que la cycline D3 semble être majoritaire dans les lignées non infectées. Cette différence d'expression

semble indiquer que les modes de progression en G1 diffèrent dans les cellules infectées et non infectées (Akagi *et al.*, 1996). Bien qu'aucune anomalie génétique ne soit détectée par blot de Southern, la protéine inhibitrice p18^{INK} est très faiblement exprimée dans les cellules infectées par HTLV-1. En revanche, des niveaux élevés d'expression de p21^{waf}, protéine effectrice de p53 et contrôlée par p53, sont observés. La stabilisation de p53 dans les cellules des lignées infectées (Reid *et al.*, 1993) et/ou la transactivation par Tax du gène codant p21^{waf} (Cereseto *et al.*, 1996) pourraient être à l'origine de ce changement d'expression. p21^{waf}, initialement décrite comme une protéine inhibitrice des CDK, est fortement exprimée dans les tumeurs du cerveau et les leucémies myéloïdes (Jung *et al.*, 1995). L'incidence de cette surexpression n'est pas connue. Cependant, p21^{waf} par son interaction avec PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) pourrait perturber les mécanismes de réparation de l'ADN (Pan *et al.*, 1995; Umar *et al.*, 1996) et générer une instabilité génétique dans les cellules infectées par HTLV-1.

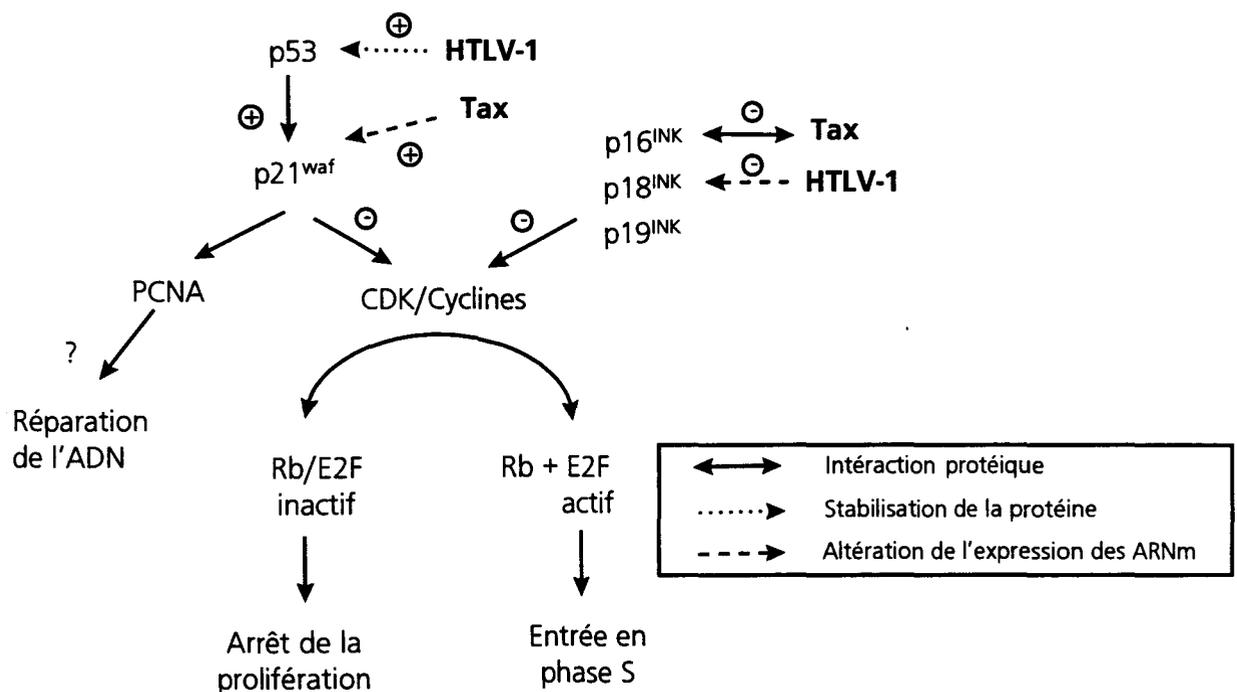


Figure 6G : Incidences de HTLV-1 sur la régulation du cycle cellulaire.

II.2.3. Modèles de souris transgéniques.

Les souris transgéniques pour Tax développent des tumeurs mésenchymateuses (Hinrichs *et al.*, 1987, Nerenberg *et al.*, 1987) et des leucémies lymphocytiques (Grossman *et al.* 1995) (Tableau 2G). L'obtention de différents phénotypes des souris transgéniques pour Tax peut être expliquée par l'utilisation de différents promoteurs et/ou par les niveaux d'expression des gènes. Les souris transgéniques pour lesquelles Tax est sous le contrôle du LTR de HTLV-1 développent des neurofibromes à une fréquence élevée (Nerenberg *et al.*, 1987; Hinrichs *et al.*, 1987) et parfois une affection ressemblant au syndrome de Sjögren (Green *et al.*, 1989 et 1992). En ciblant l'expression de Tax dans les thymocytes grâce au promoteur du gène *Thy*, le phénotype observé dans les souris transgéniques LTR(HTLV-1)-Tax, apparaît moins fréquemment et plus tardivement (Nerenberg *et al.*, 1991). En coopération avec *c-myc*, Tax sous le contrôle du promoteur des IgG induit un lymphome de type T CD4+ CD8-, chez 30% des souris transgéniques pour les deux gènes. Les autres souris développent des tumeurs cérébrales ressemblant aux neurofibromes (Benvenisty *et al.*, 1992). Cependant, la surexpression de *c-myc* dans les lymphocytes CD4+ de ces animaux transgéniques, probablement engendrée par la stimulation du LTR par Tax (Newbound *et al.*, 1996), pourrait à elle seule être responsable de ce phénotype. En utilisant le promoteur du gène de la granzyme B, protéase impliquée dans l'activité cytotoxique T, les souris transgéniques Tax développent des tumeurs lymphoïdes à grandes cellules (LGL) (Grossman *et al.*, 1995). Récemment, Green *et al.* ont créé une lignée de souris transgéniques dans laquelle Tax est sous la dépendance du promoteur d'un gène *lck* codant une kinase spécifique des lymphocytes. Ces souris transgéniques *lck*-Tax développent un lymphome de type T CD4+ qui ressemble au phénotype humain de l'ATLL (Franchini, 1995). Les mutants de Tax défectifs dans leur interaction avec les CREB/ATF endogènes perdent leur capacité à induire des tumeurs alors que les mutants défectifs dans l'interaction avec NFκB restent tumorigènes (Franchini, 1995). Les facteurs de la famille CREB/ATF semblent donc fortement impliqués dans la transformation des cellules T médiée par Tax.

Ainsi, dans les modèles transgéniques, Tax seule ou en coopération avec *c-myc* peut induire des transformations néoplasiques de cellules T. Ces systèmes pourraient permettre

l'étude des voies signalétiques influencées par Tax dans différents types cellulaires et fournir des informations sur les gènes cellulaires pouvant être ciblés afin d'éviter la tumorigenèse.

Gène	Facteurs de transcription impliqués	Type de tumeur développée	Référence
LTR (HTLV-1)-Tax	NFκB/Rel	Neurofibrome	Nerenberg <i>et al.</i> , 1987 Hinrichs <i>et al.</i> , 1987
Thy-Tax	?	Neurofibrome (peu fréquent)	Nerenberg <i>et al.</i> , 1991
IgG-Tax + LTR(HTLV-1)- <i>myc</i>	?	30% Lymphome T (CD4+, CD8-) 70% Neurofibrome	Benvenisty <i>et al.</i> , 1992
Granzyme B-Tax	?	Tumeur LGL (CD4-, CD8-)	Grossman <i>et al.</i> , 1995
lck-Tax	CREB/ATF	Lymphome T CD4+	Franchini, 1995

Tableau 2G : Phénotype des souris transgéniques Tax.

III. LA TSP/HAM : IMPLICATION DE LA REPONSE IMMUNITAIRE CONTRE HTLV-1.

III.1. ASPECTS CLINIQUES TSP/HAM.

La Paraparésie Spastique Tropicale (TSP/HAM) est une myélopathie progressive caractérisée par une spasticité des membres inférieurs pouvant aboutir à une paraplégie associée des pertes variables de la sensibilité. Une atrophie de la moëlle épinière, des signes de démyélinisation et des infiltrats inflammatoires sont observés principalement au niveau du thorax. Les études macroscopiques post-mortem indiquent que le cerveau est normal (Gessain et Gout, 1992).

Rare avant 20 ans et après 70 ans, la TSP/HAM est une affection de l'adulte qui se développe après une latence prolongée. L'installation des signes est progressive avec apparition de faiblesses au niveau des membres inférieurs, de douleurs lombaires, de

parasthésies et de troubles génitosphinctériens. L'évolution est chronique, sans phase de rémission, et aboutit en dix ans à une impotence fonctionnelle majeure. Les formes post-transfusionnelles sont caractérisées par une évolution le plus souvent subaiguë. Chez le sujet jeune, l'évolution de la maladie est plus rapide. Des affections, souvent auto-immunes, comme l'uvéite ont été décrites et sont plus fréquentes chez les patients atteints de TSP/HAM que chez les porteurs sains (Goto *et al.*, 1994).

Outre le traitement symptomatique de la spasticité et de ses complications, aucune thérapeutique spécifique n'a pu jusqu'à présent entraîner de réponse prolongée. Des réponses transitoires ont été observées par des traitements aux corticoïdes (Osame *et al.*, 1986), à l'interféron, avec des anticorps dirigés contre le récepteur à l'IL2 ou la zidovudine (Gessain *et al.*, 1992).

III.2. EPIDEMIOLOGIE DE LA TSP/HAM.

La TSP/HAM atteint environ 1% des individus infectés par HTLV-1 (Kaplan *et al.*, 1990). Elle se rencontre dans les différentes régions d'endémie HTLV-1. Les cas sporadiques, décrits dans les régions non endémiques, concernent essentiellement des émigrants, des individus en rapport avec ces territoires ou des cas secondaires à des transfusions (Gout *et al.*, 1990; Gessain et Gout, 1992). La prévalence de la TSP/HAM est variable d'une région à l'autre. Cette variabilité ne reflète pas uniquement des différences de séroprévalence. A Tumaco (Columbia), l'incidence de la TSP/HAM est 100 fois supérieure à celle du Japon en dépit d'une séroprévalence identique (Trujillo *et al.*, 1992). Cette distribution hétérogène suggère la présence de cofacteurs dans la survenue de la TSP/HAM.

Des formes familiales de TSP/HAM (Salazard-Grueso *et al.*, 1990; Miyai *et al.*, 1987) et une association entre la TSP/HAM ou l'ATLL et certains types HLA ont été décrites et suggèrent l'existence d'une prédisposition génétique dans le développement de ces affections. Certains haplotypes HLA semblent plus fréquents chez les patients atteints d'ATLL ou de TSP/HAM par rapport à la population générale japonaise (Sonoda *et al.*, 1995 et 1996). La

réponse du système immunitaire à l'infection, qui semble jouer un rôle clé dans le développement de la TSP/HAM, est influencée par le type HLA de l'individu infecté. En effet, la réponse immunologique est d'autant plus forte que l'affinité du peptide pour le complexe HLA qui le présente est importante (Kubo *et al.*, 1994; Sette *et al.*, 1994). Les cellules infectées expriment une grande variété d'épitopes reconnus dans le contexte des antigènes HLA de classe I et II (Jacobson *et al.*, 1990; Kannagi *et al.*, 1991; Parker *et al.*, 1992 et 1994; Miura *et al.*, 1991; Katahira *et al.*, 1995). La reconnaissance de ces antigènes par les cellules T autologues génèrent une réponse proliférative T. L'incubation des PBMC de porteurs asymptomatiques avec des antigènes viraux mène à deux catégories de réponse proliférative T. Certains haplotypes HLA sont liés à des statuts de hauts ou de bas répondeurs (Sonoda *et al.*, 1996). Les statuts de hauts répondeurs correspondraient à la TSP/HAM alors que les statuts de bas répondeurs seraient associés aux patients atteints d'ATLL.

Cependant, parmi les individus HLA A2, la forte réponse CTL spécifique de Tax n'est observée que chez les patients atteints de TSP/HAM et très peu chez les individus asymptomatiques ou atteints d'ATLL (Kannagi *et al.*, 1994). Ceci plaide contre une corrélation entre le type HLA et le développement de la TSP/HAM. D'autre part, un cas de TSP/HAM a été décrit chez un homme dont le jumeau également séropositif demeurerait asymptomatique (Motomura *et al.*, 1990). Le développement de la TSP/HAM ne peut donc être expliqué uniquement par des facteurs génétiques.

III.3. HTLV-1, L'AGENT DE LA TSP/HAM.

Des cellules aux noyaux multilobés caractéristiques des cellules infectées par HTLV-1 sont observées dans le sang et le LCR des patients atteints de TSP/HAM. Dans les PBMC, la charge provirale est élevée. Elle est plus importante au cours de la TSP/HAM qu'en phase asymptomatique (de 2 à 20 copies /100 cellules *versus* 0,4 à 8 copies /100 cellules) (Gessain *et al.*, 1990; Kira *et al.*, 1991; Kubota *et al.*, 1993). Les expériences de quantification sur des PBMC fractionnées montrent que les cellules infectées sont essentiellement des lymphocytes CD4 CD45 RO+. L'infection pourrait concerner jusqu'à 50 % des CD4 circulants (Richardson

et al., 1990). Cependant, l'étude de la charge virale par PCR *in situ* indique que de 1/5000 à 1/10000 des PBMC sont positives (Levin *et al.*, 1996). Cette discordance de résultats suggère l'existence de plusieurs provirus intégrés par cellule. L'analyse du profil d'intégration de HTLV-1 dans les PBMC montre une expansion clonale des cellules infectées pour 20% des patients (Furukawa *et al.*, 1992).

La charge virale est importante au cours de la TSP/HAM, cependant, le taux d'expression des gènes viraux reste faible. La recherche par RT-PCR et par hybridation *in situ* des transcrits tax/rex, montre que de 1/100 à 1/5000 cellules les exprime (Gessain *et al.*, 1991; Beilke *et al.*, 1991). Au cours de la TSP/HAM, les niveaux d'expression des messagers de tax/rex sont 100 fois plus élevés qu'en phase asymptomatique ou durant l'ATLL (Furukawa *et al.*, 1995). Cependant, normalisée par la charge virale, l'expression de ces messagers est identique dans les PBMC des porteurs sains et des patients atteints de TSP/HAM (Furukawa *et al.*, 1995).

Le virus HTLV-1 peut être isolé à partir du liquide céphalorachidien (LCR) des patients atteints de TSP/HAM (Hirose *et al.*, 1986; Kira *et al.*, 1992). Les cellules obtenues sont de phénotype CD4 et rarement CD8 (Gessain *et al.*, 1990; McKhann *et al.*, 1989). Sur des coupes de moelle épinière, Kubota *et al.* (1994) observent, par PCR quantitative, une corrélation entre la charge provirale et le nombre de lymphocytes CD4 infiltrant le SNC. Le réservoir principal du virus dans le SNC semble donc être les lymphocytes de phénotype CD4. Par PCR *in situ*, Hara *et al.* (1994) ont montré que la présence de HTLV-I était restreinte aux lymphocytes. En revanche, la recherche par hybridation *in situ* des messagers tax/rex suggère que HTLV-1 infecte les cellules non lymphocytiques du parenchyme nerveux, et notamment les astrocytes (Lehky *et al.*, 1995). Occasionnellement, le virus HTLV-1 pourrait infecter des cellules non lymphocytiques puisque de nombreuses cellules sont susceptibles d'être infectées *in vitro* (Hoxie *et al.*, 1984; Ho *et al.*, 1984; Nagy *et al.* 1983; Sinangil *et al.*, 1985, Sakai *et al.*, 1993; Koyanagi *et al.*, 1993; Macatonia *et al.*, 1992; Akagi *et al.*, 1992; Hoffman *et al.*, 1992). L'infection du parenchyme nerveux *in vivo* fait toujours l'objet de débats.

La pathogénicité et le tropisme des rétrovirus peuvent être changés par des modifications nucléotidiques mineures dans la séquence provirale. En effet, pour le virus de la leucémie murine, des mutations au niveau des LTR ou du gène *env* sont associées à des désordres hématologiques ou neurodégénératifs (Lenz *et al.*, 1984; Rassard *et al.*, 1986, Szurek *et al.*, 1988; Li *et al.*, 1987). D'éventuelles mutations conférant un neurotropisme à HTLV-1 ont donc été recherchées dans les différentes régions du génome de HTLV-1 (Mukhopadhyaya et Sadaie, 1993; Komurian *et al.*, 1991 Gessain *et al.*, 1989; Daenke *et al.*, 1990; Kinoshita *et al.*, 1991). Ces études ne montrent pas de différences notables au niveau des séquences entre les pathologies. Par ailleurs, la comparaison des séquences provirales de patients atteints de TSP/HAM et leurs conjoints asymptomatiques ne révèle pas de différences (Nishimura *et al.*, 1993). Une corrélation partielle entre des variants de HTLV-1 et la TSP/HAM a été suggérée (Renjifo *et al.*, 1995). Cependant, dans cette étude, un biais dans la sélection des échantillons étudiés est à l'origine de la différence observée dans les séquences provirales entre les patients atteints de TSP/HAM et les porteurs asymptomatiques. En effet, la mutation décrite au niveau de la séquence du gène *tax* s'avère être associée au sous-type cosmopolitain et n'est nullement corrélée avec la tendance des porteurs à développer la TSP/HAM (Mahieux *et al.*, 1995). L'existence de quasi espèces de HTLV-1 chez les individus infectés a été décrite (Niewiesk *et al.*, 1994; Saito *et al.*, 1995; Hara *et al.*, 1994; Kira *et al.*, 1994). L'analyse par séquençage du gène *tax* montre que la variabilité intra individuelle en phase asymptomatique est supérieure à celle observée au cours de la TSP/HAM (Niewiesk *et al.*, 1994). D'après ces résultats, c'est l'hétérogénéité plutôt que la présence d'une séquence particulière qui pourrait distinguer les porteurs asymptomatiques des patients atteints de TSP/HAM. Cependant, dans une autre étude, le taux de mutation dans la région pX semble modérément supérieur chez les patients atteints de TSP/HAM par rapport aux porteurs asymptomatiques et aux patients atteints d'ATLL (Saito *et al.*, 1995). D'autre part, au sein d'un individu, il ne semble pas exister de sites privilégiés de réplication pour un variant de la population virale (Saito *et al.*, 1995). En effet, les séquences provirales issues du sang ne diffèrent pas significativement de celles isolées du LCR. Ainsi, le développement de la TSP/HAM ne semble pas être associée à une séquence provirale particulière.

III.4. IMPLICATION DE LA REPONSE IMMUNITAIRE DANS LE DEVELOPPEMENT DE LA TSP/HAM.

Les nombreux paramètres immunologiques anormaux, observés au cours de la TSP/HAM, suggèrent une participation immunologique dans la genèse des lésions. Les mécanismes cellulaires et moléculaires demeurent inconnus. Différents modèles ont été proposés (Ijichi *et al.*, 1996; Hara *et al.*, 1994; Lehky *et al.*, 1995). Une meilleure compréhension de l'implication de ce type de réponse dans la pathogénèse pourrait mener à des stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement cette réponse.

III.4.1. La réponse humorale.

Des anticorps anti-HTLV-1 sont présents dans le serum et le LCR des patients atteints de TSP/HAM et constituent un critère de diagnostic de cette affection (Gessain *et al.*, 1985; Osame *et al.*, 1986). Les taux d'anticorps sériques sont plus élevés dans la TSP/HAM que chez les autres porteurs du virus (Dalgleish *et al.*, 1988). Il s'agit essentiellement d'IgG mais la présence dans le serum et le LCR d'IgA ou d'IgM a été décrite (Nagasato *et al.*, 1991). Les principaux épitopes reconnus par les IgG sont portés par les protéines codées par *gag* (p19, p24 et leur précurseur Pr 53), par *env* (gp46 et gp 21) et par l'extrémité carboxyterminale de Tax (*pour revue*: Lal *et al.*, 1996). Le taux élevé d'IgG, dans le système nerveux central, constitue une preuve indirecte de la synthèse intrathécale d'anticorps. En effet, chez la plupart des patients ces indexes d'IgG élevés sont observés alors que la barrière hématoencéphalique (BHE) est intacte (Ceroni *et al.*, 1988; Gessain *et al.*, 1988; Link *et al.*, 1989; Grimaldi *et al.*, 1988). La distribution oligoclonale d'IgG, observée dans le LCR, est souvent retrouvée dans le serum (Link *et al.*, 1989). Des complexes immuns et des autoanticorps dirigés contre les cellules endothéliales du cerveau ont été décrits chez certains patients (Tsukada *et al.*, 1989).

III.4.2. La réponse cellulaire.

De nombreuses études ont montré une haute activité cytotoxique dans les prélèvements de patients atteints de TSP/HAM (Jacobson *et al.*, 1990 et 1991; Fujihara 1991; Ijichi *et al.*, 1989; Elovaara *et al.*, 1993). Les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) sont présents au niveau des lésions inflammatoires (Moore *et al.*, 1989; Yoshioka *et al.*, 1993). Leur nombre augmente avec la progression de la maladie (Kubota *et al.*, 1994). Certes, chez les porteurs asymptomatiques, il existe des réponses CTL spécifiques de HTLV-1 (Parker *et al.*, 1992; Daenke *et al.*, 1995). Cependant, la fréquence des précurseurs de CTL durant la TSP/HAM semble être significativement supérieure (de 40 à 100 fois) à celle observée en phase asymptomatique (Jacobson *et al.*, 1996; Kannagi *et al.*, 1994; Elovaraa *et al.*, 1993). Ce sujet fait toutefois l'objet de controverses (Parker *et al.*, 1992 ; Jacobson *et al.*, 1996; Daenke *et al.*, 1995 et 1996)

Les lymphocytes T cytotoxiques peuvent être de phénotype CD4 restreint au HLA de classe II ou CD8 restreint au HLA de classe I (Jacobson *et al.*, 1996). Les stimulations antigéniques répétées, nécessaires pour l'étude des précurseurs CTL CD4, reflètent probablement leur faible fréquence dans les PBMC. En revanche, les lymphocytes CTL CD8, sont observés dans les PBMC et le LCR en l'absence de toute stimulation (Jacobson *et al.*, 1990 et 1992; Elovaara *et al.* 1993). L'analyse du réarrangement du TCR de ces lymphocytes T cytotoxiques CD8 indique l'existence d'une expansion oligoclonale de ces cellules *in vivo* chez les patients atteints de TSP/HAM (Furukawa *et al.*, 1994; Utz *et al.*, 1996).

Les CTL CD8 sont principalement dirigés contre la protéine Tax. Cependant, d'autres épitopes viraux comme les protéines de l'enveloppe peuvent être reconnus (Jacobson 1990; Koenig *et al.*, 1993; Kannagi *et al.*, 1991). La fréquence des précurseurs CTL spécifiques de Tax varie de 1/75 à 1/320 PBMC (Elovaraa *et al.*, 1993). Le peptide contenant les acides aminés de 11 à 19 est le principal épitope reconnu mais d'autres peptides dérivés de Tax peuvent aussi être la cible des CD8 (Koenig *et al.*, 1993). La forte affinité de ce peptide pour les molécules HLA A2 pourrait être à l'origine de cette immunodominance (Elovaraa *et al.*,

1993; Picqué *et al.*, 1996). En revanche, les protéines de l'enveloppe sont les principaux épitopes reconnus par ces CTL restreints au HLA de classe II (Jacobson *et al.*, 1991).

III.4.3. Ethiopathogénie de la TSP/HAM.

Les trois principaux modèles pourraient expliquer la genèse des lésions de la TSP/HAM par le système immunitaire (Ijichi *et al.*, 1993; Lehky *et al.*, 1995; Nagai *et al.*, 1996; Hara *et al.*, 1994).

La TSP/HAM : une maladie autoimmune ?

Les cellules T autoréactives font partie du répertoire immunitaire normal mais ne génèrent aucune affection tant que la BHE limite leur accès dans le Système Nerveux Central (SNC). L'activation de ces cellules leur permet cependant d'atteindre le SNC en l'absence d'altération de la BHE (Hickey *et al.*, 1991). Dans le modèle de la genèse des lésions de la TSP/HAM par réactions autoimmunes, HTLV-1 aurait un rôle initiateur. En activant les lymphocytes T autoréactifs du sang, le virus leur permettrait secondairement d'atteindre le SNC. Les cellules et/ou les composants du SNC seraient alors reconnus par les cellules autoréactives. Plusieurs arguments sont en faveur de ce modèle. D'une part, des cellules CD4 autoréactives reconnaissant à la fois HTLV-1 et des composants du SNC ont été décrits dans le LCR d'un patient atteint de TSP/HAM (Nagai *et al.*, 1996). D'autre part, l'étude des réarrangements du Récepteur des Cellules T (TCR) de certains lymphocytes infiltrant le SNC montre des motifs CDR3 analogues à ceux observés chez les patients atteints de maladies autoimmunes comme la sclérose en plaque et l'Encéphalomyélite Expérimentale Allergique (EAE) (Hara *et al.*, 1994). Enfin, des homologies entre les séquences peptidiques de p24 codée par le gène *gag* de HTLV-1 et la transaldolase TalH ont été décrites (Banki *et al.*, 1994). De plus, des réactions croisées entre les épitopes antigéniques de ces deux protéines sont observées par *western-blot*. Les phénomènes de mimicrie moléculaire décrits dans d'autres affections autoimmunes pourraient s'étendre à HTLV-1.

Infection directe des cellules du SNC?

Dans ce modèle, la destruction des tissus serait causée par l'infection persistante de cellules du SNC par HTLV-1. L'attaque des cellules du système immunitaire reconnaissant les épitopes viraux présentés par les cellules du SNC provoquerait sa destruction. HTLV-1 peut infecter *in vitro* de nombreuses cellules. Toutefois, l'infection *in vivo* de cellules nerveuses, si elle existe, ne semble pas être très fréquente et fait l'objet de controverses (Lehky *et al.*, 1995; Hara *et al.*, 1994; Kuroda *et al.*, 1994). L'infection occasionnelle de cellules du SNC pourrait toutefois avoir lieu puisque les cellules gliales et microgliales sont susceptibles d'être infectées *in vitro* (Akagi *et al.*, 1992; Hoffman *et al.*, 1992). L'existence d'éventuels variants neurotropes de HTLV-1 qui tendrait à valoriser cette hypothèse n'a pas été observée.

Genèse des lésions par un effet *bystander*?

Dans ce modèle, c'est l'interaction entre les cellules infectées et les cellules du système immunitaire qui, en produisant des cytokines, endommagerait secondairement le tissu environnant (effet *bystander*). Ce modèle requiert la présence, dans le SNC, de cellules infectées et de cellules immunitaires les reconnaissant. Ces conditions sont remplies au cours de la TSP/HAM puisque des lymphocytes T CD4 infectés et des cellules T CD8 sont observés dans le SNC (Kubota *et al.*, 1994). D'autres arguments plaident en faveur de ce modèle. En effet, chez les patients atteints de TSP/HAM, les taux d'IFN γ sont élevés dans le serum et le LCR (Kuroda *et al.*, 1993). De plus, des cellules produisant du TNF α sont détectées dans le LCR (Nakamura *et al.*, 1993). Ces cytokines neurotoxiques sont connues pour jouer des rôles importants dans les maladies démyélinisantes comme la sclérose en plaque (Seimaj *et al.*, 1991; Steinman, 1996; Sharief, 1991).

IV. DE LA STABILITE GENETIQUE DE HTLV-1 A L'EXPANSION CLONALE DES CELLULES INFECTEES.

IV.1. VARIABILITE DES VIRUS A ARN.

Le concept de quasi espèces développé à l'origine pour décrire l'évolution des molécules d'ARN s'applique à tous les virus dont le génome est une molécule d'ARN et aux virus dont la réplication fait intervenir un intermédiaire ARN (pour revue : Eigen *et al.*, 1993 et Holland *et al.*, 1992). Le polymorphisme génétique observé entre les isolats amène à raisonner en terme de populations virales ou quasi espèces.

L'absence d'activité correctrice des polymérases virales constitue l'élément central de la genèse de variants chez les virus à ARN (Domingo et Holland, 1988). Bien que la structure quaternaire de leur domaine de polymérisation ressemble à celui des autres polymérases, elles ne possèdent pas de domaine à activité 3' exonucléasique (Domingo, 1992; Holland *et al.*, 1992). Les exonucléases cellulaires n'étant pas incorporées spécifiquement dans la particule virale, toute erreur devient immortalisée. C'est pourquoi, les taux de mutation des espèces, dont le génome est un ARN, sont très élevés. Les virus à ARN sont de 10^4 à 10^6 fois moins fidèles que les virus dont le génome est un ADN (Tableau 3G). Pour une raison inconnue, le taux de mutation des rétrovirus est environ 20 fois inférieur à celui de l'ensemble des virus à ARN.

Organisme	Taux de mutations/génome
Virus lytiques à ARN (phage QB, virus de l'influenza...)	4
Rétrovirus	0,2
Phages à ADN	0,004
Levures (<i>E.coli</i> , <i>S. cerevisiae</i> ...)	0,0028

Tableau 3G : Fidélité des polymérases. (*d'après Drake et al.*, 1993)

L'hétérogénéité génétique des virus à ARN leur permet une évolution rapide. Le modèle d'équilibre de populations, proposé par Domingo et Holland (1992), repose sur une distribution probabiliste de variants pouvant émerger d'une population hétérogène soumise à différentes pressions de sélection. Au sein de la population virale composée de combinaisons génomiques, les clones les mieux adaptés sont les plus représentés (Domingo et Holland, 1988).

Le manque de fidélité des polymérases des virus à ARN génère des quasi espèces *in vitro* et *in vivo*. La signification biologique de tels variants *in vivo* reste peu connue. Outre l'échappement à la réponse immunitaire ou à une chimiothérapie virotoxique, la grande plasticité du génome des virus à ARN peut modifier leur tropisme *in vivo* (Docker *et al.*, 1996; Lenz *et al.*, 1984; Rassard 1986; Szurek 1988; Li *et al.*, 1987).

IV.2. STABILITE GENETIQUE DE HTLV-1.

La variabilité de HTLV-1 en terme de population clonale n'a pas pu être réalisée en raison des difficultés rencontrées pour obtenir un clone moléculaire infectieux. Les données disponibles sur la variabilité génétique de HTLV-1 reposent donc sur l'étude des variants géographiques et des variants inter et intra-individuels.

IV.2.1. Variants géographiques et épidémiologie moléculaire.

Le séquençage complet du provirus HTLV-1 a été effectué en 1983 (Seiki *et al.*, 1983). Depuis, l'accumulation de séquences provenant de différentes zones endémiques révèle une grande conservation de la séquence de HTLV-1. Les isolats d'Afrique (Ratner *et al.*, 1985), du Japon (Hiramatsu *et al.*, 1987), d'Amérique du Sud et des Caraïbes (Malik *et al.*, 1988) présentent plus de 97% d'homologie. Bien que les isolats viraux soient issus de tribus et de populations aborigènes ayant migré depuis des milliers d'années, la divergence des variants géographiques est inférieure à 10% au niveau de la séquence nucléique (Gessain *et al.*, 1992).

Certains fragments semblent plus variables que d'autres. En effet, la séquence des isolats de Mélanésie qui présente une homologie de 91,5% avec ATK1 diverge plus au niveau de la région pX (8% à 25%) qu'au niveau des gènes de structure (Gessain *et al.*, 1993).

IV.2.2. Variabilité intra et inter-individuelle.

L'analyse de la variabilité intra-individuelle repose sur le séquençage et la comparaison de clones moléculaires établis à partir des produits d'amplification d'une région du provirus. Le Tableau 4G résume les résultats de l'analyse de la variabilité de HTLV-1 effectuée par 6 équipes sur différents prélèvements (Gessain *et al.*, 1992; Kira *et al.*, 1994; Niewiesk *et al.*, 1994; Wattel *et al.*, 1995; Saito *et al.*, 1995). La fréquence moyenne de mutation est de 1,2 mutations par kb et par clone (de 0,08 à 4,33 mut/kb/clone). La comparaison des taux de mutation observés pour HTLV-1 est difficile à réaliser en raison de la différence de taille des séquences analysées, des techniques de PCR et de clonage utilisées et l'absence d'estimation du taux d'erreur des systèmes d'analyse. D'après Niewiesk *et al.* (1994), il semble que la variabilité intra-individuelle soit supérieure à la variabilité inter-individuelle. Un avantage répliatif et/ou un pouvoir infectieux supérieur conférés par certaines mutations pourraient expliquer ces résultats (Saito *et al.*, 1996).

IV.3. CHARGE VIRALE ELEVEE.

La TSP/HAM est caractérisée par une charge virale élevée pouvant atteindre jusque 30000 copies virales pour l'équivalent de 150 000 PBMC (soit 1/5 PBMC). Bien que plusieurs provirus pourraient être intégrés dans une même cellule, un nombre important de CD4 est infecté (Richarson *et al.*, 1990). En phase asymptomatique, la charge virale est moins importante mais peut toutefois atteindre 1/25 des PBMC (Shizato *et al.*, 1991; Wattel *et al.*, 1992). Cette charge provirale est le signe d'une intense réplication du virus. Au cours de l'infection, le VIH peut atteindre 1/100 à 1/30 des PBMC, en phase SIDA. Cependant, cette charge virale élevée s'accompagne d'une grande variabilité génétique, témoignant d'une importante réplication *via* la transcriptase inverse.

Echantillons	Région	nombre de clones	nombre de substitutions	nombre de substitutions/kb/clone	Références
Porteurs asymptomatiques					
SNC	Px (862)	10	4	0,46	Kira <i>et al.</i> , 1994
PBMC	Px (1100)	20	24	1,09	Niewiesk <i>et al.</i> , 1994
PBMC	Px (1100)	21	100	4,33	
PBMC	Px (1100)	22	28	1,16	
PBMC	Px (1100)	20	38	1,73	
PBMC	Px (960)	12	4	0,35	Saito <i>et al.</i> , 1995
PBMC	Px (960)	10	11	1,15	
PBMC	Env (265)	100	2	0,08	Wattel <i>et al.</i> , 1995
PBMC	Env (265)	100	2	0,08	
TSP/HAM					
SNC	Px (862)	8	2	0,29	Kira <i>et al.</i> ,1994
SNC	Px (862)	9	2	0,26	
SNC	Px (862)	9	10	1,29	
SNC	Px (862)	9	6	0,77	
SNC	Px (862)	15	9	0,7	
PBMC	Px (1100)	19	36	1,72	Niewiesk <i>et al.</i> , 1994
PBMC	Px (1100)	22	29	1,2	
PBMC	Px (1100)	21	16	0,69	
PBMC	Px (1100)	19	31	1,48	
SNC	Px (960)	13	11	0,88	Saito <i>et al.</i> , 1995
PBMC	Px (960)	9	6	0,69	
SNC	Px (960)	10	21	2,19	
PBMC	Px (960)	10	7	0,73	
SNC	Px (960)	10	13	1,35	
PBMC	Px (960)	9	7	0,81	
SNC	Px (960)	10	9	0,94	
SNC	Px (960)	13	19	1,52	
PBMC	Px (960)	13	16	1,28	
PBMC	Env (569)	11	3	0,48	Gessain <i>et al.</i> , 1992
PBMC	Env (569)	11	3	0,48	
PBMC	Env (569)	2	2	1,76	
PBMC	Env (569)	3	5	2,93	
PBMC	Env (569)	4	3	1,32	
ATLL					
SNC	Px (960)	10	3	0,31	Saito <i>et al.</i> , 1995
PBMC	Env (569)	8	7	1,54	
PBMC	Env (569)	2	1	0,88	Gessain <i>et al.</i> , 1992
PBMC	Env (569)	8	4	0,88	
PBMC	Env (569)	8	2	0,44	
PBMC	Env (569)	4	1	0,44	
peau	Env (569)	6	6	1,76	
PBMC	Env (569)	4	1	0,44	

Tableau 4G : Variabilité intra et inter-individuelle de HTLV-1.

IV.4. REPLICATION DE HTLV-1 VIA L'EXPANSION CLONALE DE LA CELLULE HÔTE.

L'association d'une charge virale aussi élevée à une grande stabilité génétique de HTLV-1, peut être expliquée par :

- une transcriptase inverse particulièrement fidèle,
- un génome très réfractaire au changement,
- une réplication prédominante par la mitose de la cellule hôte.

La fidélité de la transcriptase inverse de HTLV-1 n'a pas été déterminée, cependant elle ne semble pas être à l'origine de la stabilité de HTLV-1. En effet, la fidélité de la transcriptase inverse du BLV, appartenant à la famille de HTLV-1, est estimée à environ $4 \cdot 10^{-6}$ erreur par base et par cycle répliatif (Mansky *et al.*, 1994), c'est à dire 10 fois plus que celle de VIH. L'hypothèse selon laquelle HTLV-1 ne pourrait absorber les mutations semble peu probable. En effet, parmi tous les rétrovirus, les protéines codées par le gène *pol* et les protéases ne sont conservées respectivement que sur 6 et 3 résidus. De plus, la saturation par mutagenèse des protéines virales et même cellulaires montre que de nombreux résidus peuvent être changés sans altérer outre mesure leurs activités (Martinez *et al.*, 1996). Enfin, la divergence entre les virus HTLV-1 et HTLV-2 va à l'encontre de ce concept de génome réfractaire aux mutations. Ces deux rétrovirus, issus du même ancêtre, ne pourraient avoir évolué sans que les espèces intermédiaires ne soient viables. Par élimination, il semble donc que HTLV-1 se réplique sous forme provirale *via* la multiplication de la cellule hôte. L'analyse du profil d'intégration de HTLV-1, dans les PBMC, révèle l'existence de clones chez environ 20% des patients atteints de TSP/HAM et 2% des porteurs asymptomatiques (Ikeda *et al.*, 1990 et 1993; Nakada *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 1995). Par une technique plus sensible d'analyse des sites d'intégration de HTLV-1, une expansion clonale a été observée chez 4/4 patients atteints de TSP/HAM et 2/2 porteurs asymptomatiques (Wattel *et al.*, 1995). Ces résultats n'excluent cependant pas un certain niveau de réplication par transcription inverse. L'implication de ce mode de réplication dans les affections associées à HTLV-1 n'est pas connue et fait l'objet de cette étude.

RESULTATS et DISCUSSIONS

PREMIERE PARTIE :

ETUDE DE L'EXPANSION CLONALE PAR AMPLIFICATION DES SITES D'INTEGRATION : UNE TECHNIQUE SENSIBLE ET SEMI-QUANTITATIVE.

I.1. INTRODUCTION.

Le rétrovirus HTLV-1 s'intègre au hasard dans le génome cellulaire (Yoshida *et al.*, 1982). La prolifération des cellules infectées permet à HTLV-1 d'atteindre une haute charge virale en conservant une stabilité génétique importante (Wattel *et al.*, 1995). L'expansion clonale des cellules infectées peut être étudiée par analyse des séquences génomiques adjacentes au provirus. En effet, au sein d'un clone, toutes les cellules infectées partagent le même site d'intégration. La technique classique d'étude de la clonalité est le blot de Southern. Bien qu'elle révèle la présence de clones dans tous les prélèvements tumoraux, seuls 20% des prélèvements sanguins de patients atteints de TSP/HAM et une minorité des prélèvements de porteurs asymptomatiques sont positifs (Ikeda *et al.*, 1990 et 1993; Nakada *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 1995; Furukawa *et al.*, 1992). Cependant, le blot de Southern ne semble pas adapté à l'étude de l'expansion clonale des cellules dans ces échantillons où la charge virale est faible comparée à son seuil de sensibilité (Ikeda *et al.*, 1990). En effet, alors que les clones représentés à moins de 1/20 cellules ne peuvent être détectés, la charge virale en l'absence de malignité est inférieure à 1/5 PBMC (Gessain *et al.*, 1990; Kira *et al.*, 1991; Kubota *et al.*, 1993; Shinzato *et al.*, 1991; Wattel *et al.*, 1992; Matsumara *et al.*, 1993). C'est pourquoi deux techniques d'analyse des sites d'intégration, basées sur la PCR, ont été développées. La PCR avec ligation d'un oligonucléotide (LMPCR) - au cours de laquelle, un oligonucléotide est ligaturé dans le site de restriction - et la PCR inverse (IPCR) - dans laquelle les fragments d'ADN digéré sont circularisés - permettent l'amplification du site d'intégration en 3' du provirus (Fig. 1R).

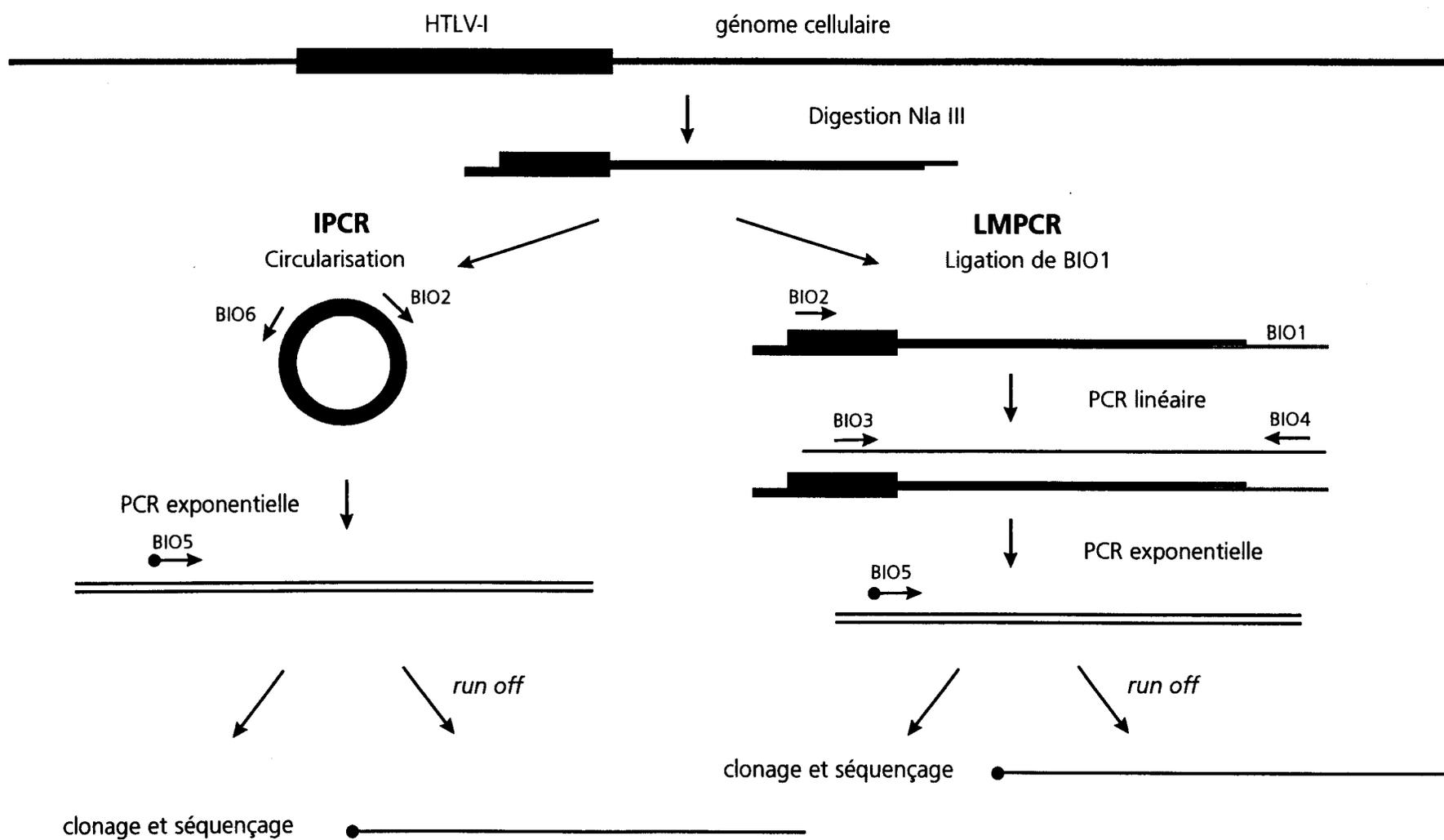


Fig. 1R : Amplification des sites d'intégration de HTLV-I par PCR Inverse (IPCR) et par PCR avec ligation d'un oligonucléotide (LMPCR)

La taille des produits d'amplification générés dépend de la position du site de restriction sur le site d'intégration. Elle est donc le reflet d'un clone cellulaire. Le polymorphisme de longueur des produits de PCR peut être analysé par électrophorèse après une PCR de quelques cycles avec une amorce radiomarquée (*Run Off*).

Les techniques de LMPCR et d'IPCR ont été optimisées à l'aide d'un provirus cloné, d'une lignée stable infectée (MT4) et de l'ADN des PBMC d'un sujet asymptomatique.

I.2. RESULTATS.

I.2.1. Analyse du site d'intégration d'un provirus cloné.

La spécificité et les seuils de sensibilité de la LMPCR et de l'IPCR ont été étudiés sur le plasmide p 4.39 (Nicot *et al.*, 1993), contenant la séquence complète de HTLV-1 encadrée des séquences génomiques, dilué dans 1 µg d'ADN de la lignée CEM équivalant à 150 000 cellules. Chaque expérience s'effectue sur 0,5 µg d'ADN. L'analyse des sites d'intégration est effectuée par *run off* avec l'amorce radiomarquée BIO5. Le polymorphisme de longueur des ampligènes est étudié par électrophorèse sur gel dénaturant. Comme le montre la Figure 2R (lignes C et D), l'analyse du site d'intégration de p4.39 révèle la présence d'une bande unique de taille 127 pb et 137 pb, respectivement par LMPCR et par IPCR. Les analyses des ADN des lignées HL60, CEM et Jurkat, utilisées comme témoins, sont toujours négatives. L'amplification des sites d'intégration par ces deux systèmes est donc spécifique. D'autre part, ces expériences montrent que ces techniques sont limitées à l'amplification de séquences relativement courtes. En effet, le LTR 5', dont la séquence est identique à celle du LTR 3', devrait générer une bande d'environ 530 pb puisque le premier CATG est situé dans le gène *gag*. Cette bande n'est cependant pas observée. Par conséquent, le LTR 5' n'entre pas en compétition dans l'amplification du site d'intégration en 3' du provirus.

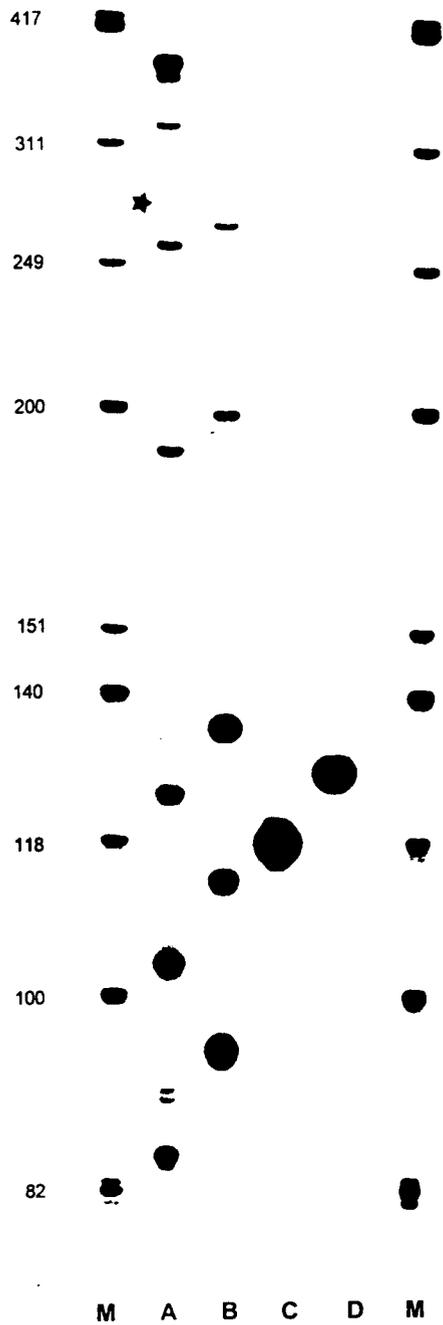


Fig. 2R: Amplification des sites d'intégration de HTLV-1 dans l'ADN de la lignée MT4 et le plasmide p4.39.

(A et B) : lignée MT4
 (C et D) : plasmide p4.39

(A et C) : LMPCR
 (B et D) : IPCR

Les seuils de sensibilité de la LMPCR et l'IPCR ont été étudiés à l'aide d'une gamme de dilution de p4.39, couvrant de 1 à 1000 copies virales par μg d'ADN. Cette gamme de dilution a été testée par séries de quatre expériences en LMPCR et en IPCR. Le Tableau 1R résume les résultats obtenus pour chaque concentration. Ces expériences, réalisées à partir d'un provirus cloné, montrent qu'un nombre supérieur à 100 et 500 copies virales par 150 000 cellules est nécessaire pour une détection fréquente de son unique site d'intégration, respectivement par LMPCR et par IPCR. Par extrapolation, la détection d'un site d'intégration par LMPCR et par IPCR nécessite respectivement la présence d'au moins 20 et 80 copies / μg d'ADN. Les seuils de sensibilité observés excluent donc la détection de sites d'intégration uniques. Par conséquent, seuls les clones cellulaires seront détectés par ces deux techniques.

Technique	Nombre de copies du plasmide p4.93 diluées dans 1 μg d'ADN non infecté						
	>1000	500	100	50	10	5	1
LMPCR	4/4*	4/4	2/4	1/4	0/4	0/4	0/4
IPCR	4/4	3/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4

Tableau 1R : Analyse par LMPCR et IPCR d'une gamme de dilution d'un plasmide HTLV-I dans de l'ADN non infecté.

* signal positif/nombre d'expériences

Dans le but de comprendre l'origine de la faible sensibilité de la LMPCR et de l'IPCR par rapport aux amplifications classiques, les sites en 3' du provirus dans le plasmide p4.39 ont été séquencés par séquençage direct. Un oligonucléotide, situé en amont du site NlaIII et complémentaire du site d'intégration, a été choisi pour des amplifications directes du plasmide avec BIO3 (Fig. 3R(A), PBSI : séquence en gras). Des expériences de LMPCR et d'IPCR ont été réalisées dans les conditions classiques à l'exception de l'étape de PCR exponentielle où PBSI était substituée à BIO4 pour la LMPCR ou BIO6 pour l'IPCR (Fig. 3R (B)). Par les deux méthodes, 5 copies virales par μg d'ADN pouvaient être détectées. Seule la

LMPCR, où une PCR linéaire de 100 cycles est réalisée, permettait la détection d'une copie virale. Par conséquent, l'étape de ligation semble être le facteur limitant nécessitant pour leur détection la présence d'un nombre de copies du site d'intégration supérieur à 20 copies/ μ g pour la LMPCR et 80 copies/ μ g pour l'IPCR.

Pour tenter d'améliorer l'efficacité de la ligation, des expériences de LMPCR et d'IPCR ont été réalisées en utilisant 10 fois plus de ligase et une concentration en BIO1 dix fois plus élevée, cependant la sensibilité n'a pas été augmentée.

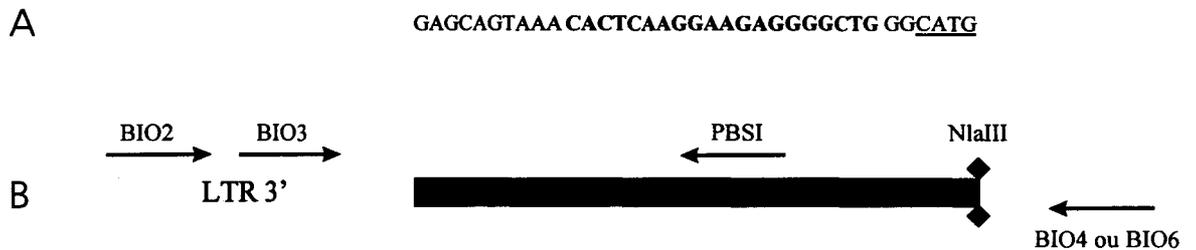


Fig. 3R : Analyse du site d'intégration de HTLV-I dans le plasmide p4.39
 A : séquence du site d'intégration.
 B : positions des amorces dans cette région.

I.2.2. Amplification des sites d'intégration de la lignée MT4.

Les résultats précédents suggèrent que seules les formes majoritaires pourraient être amplifiées par LMPCR et IPCR. Cependant, ces expériences réalisées à partir d'un provirus cloné ne concernaient qu'une séquence cible unique. Les sensibilités de l'IPCR et la LMPCR ont donc été étudiées sur l'ADN extrait des cellules de la lignée MT4 infectées par HTLV-1.

Dans cette lignée, la clonalité étudiée par blot de Southern suite à une digestion par les enzymes EcoRI ou PstI et à une hybridation avec le fragment SacI de p4.39, montre la présence de 5 provirus intégrés. En revanche, l'analyse de la clonalité par LMPCR ou IPCR révèle la présence de 7 bandes (Fig. 2R : lignes A et B(p56)). Les bandes de 83 pb et 93 pb correspondent à des clones artificiels appelés « clones TG ». En effet, ces bandes sont générées systématiquement lorsque le provirus, dont la séquence se termine par CA, s'intègre à côté d'un dinucléotide TG créant ainsi le site de restriction de NlaIII. Ces « clones TG » correspondent, en fait, à un ensemble de séquences dont le site d'intégration débute par TG. Ces 7 sites, séquencés par séquençage direct, montrent qu'ils représentent des sites d'intégration indépendants et qu'aucun ne dérive de l'autre par digestion partielle (Tableau 2R).

Taille	Séquence
2pb	LTR 3'- TG
21pb	LTR 3'- GTTAGGCTCC AAGAGGGCAT <u>G</u>
41pb	LTR 3'- ACTTTGGTCA TTGTCACCCTT TCCTATGTGT GGGTACC <u>ATG</u>
105pb	LTR 3'- GGTGGCCCC CACAGTCGGC CTGTGCATAC AGGTTTTTGT TGCAGAATCC CAGGGGTTCT AAAACTTTTA AATTTGAACC TGGCCTTCAA ATAGTTGCCA <u>ACATG</u>
184pb	LTR 3'- ATTTAGTACA CATTACCAAT GATGCCCAAC TTTTAGTGTG GTTCATCCCA TATGTTCCCA TACTCCCCT GGGACCTAAC ATTTGCAGGC GCTATTTATC ATTCTGGCTA GTGGTGTGCT CATCTGCCTA CCTCGCTAAG CAGCCTTCGT TGTTATTTTT ATAATTACTG GGAGTCTTTT <u>CATG</u>
~230pb	LTR 3'- TATAACATTT TCAGATCATC TGCTCTAGGG AATATTTTGG CAACAAATCC CTTTCCTCCA TTCTTAGCCA TTTGGAGTGA AATAATGAGA AAAATAGCTT GTTCTCAACT AAAGCAATTA CTGTTGTTTCG TCCTGTACCT TCTTAGAGAT ATTTGTTG
282pb	LTR 3'- GCATCTTAGC ATAGATGACA TTTTAAATTG CCTTTAAAA TATTAGTTTG TGGCAGAAAT ATTGGTAGTT TGCCTCAGGC AATCTATATG GTTTACTTAC TTGTTGGCTT ATCTTGTTTC ATAGCAGATG CTGAATATAG TTGAATTGGT TTACCCTGGT TTTATGTTCC TGGGCAAGGT CTTCTGATCA CAGTGAATAA CTCTTAAGGT AAATGGTTAC TTCTGTTTGC TGAGATTTTG TCAGGTTTTT GCATCTGTGT TGGGCGTCGG AGTTGGTCCA <u>TG</u>

Tableau 2R: Séquences des sites d'intégration 3' de HTLV-1 dans la lignée MT4.

Pour créer des conditions plus proches de celles observées *in vivo* chez les porteurs du virus, des expériences de LMPCR et d'IPCR ont été réalisées sur des dilutions de la lignée MT4. Ainsi, par dilution au demi de l'ADN de MT4 dans de l'ADN de CEM, les 7 sites d'intégration sont systématiquement détectés par IPCR jusqu'à une concentration en ADN de 3 ng/μg. A partir de 3 ng/μg, la détection des sites devient aléatoire. Au dessous de ce seuil, la répétition des expériences (n=10) permet la détection de l'ensemble des 7 sites d'intégration. La Figure 4R représente les résultats d'une expérience similaire réalisée à partir de dilutions de cellules MT4 dans des cellules CEM. A partir de 0,8% de cellules MT4 (correspondant environ à 4 ng d'ADN de MT4 / 0,5 μg d'ADN total), la détection par IPCR devient aléatoire.

Occasionnellement, durant l'amplification de 0,5 μg de MT4, des bandes supplémentaires sont observées suggérant la présence de clones moins abondants rendant leur détection aléatoire (Fig. 2R et 4R : astérisques). L'ADN de MT4 a donc été étudié 20 fois par l'IPCR et 23 fois par la LMPCR. Environ 20 clones de moindre fréquence sont détectés par LMPCR et seulement 4 sont observés par IPCR. Ces données confirment la meilleure sensibilité de la LMPCR pour la détection des sites d'intégration.

I.2.3. Analyse extensive de l'ADN extrait des PBMC d'un porteur asymptomatique.

L'analyse de l'ADN de la lignée MT4 montre qu'une réaction d'amplification des sites d'intégration par LMPCR et IPCR sélectionne les clones les plus représentés. A plus faible concentration, les clones sont détectés de façon aléatoire. Les expériences réalisées sur des dilutions des cellules de cette lignée montrent qu'en dessous d'une dilution à 1 %, la répétition des expériences est nécessaire pour la détection de l'ensemble des sites d'intégration.

Pour évaluer le nombre total de sites d'intégration dans un échantillon clinique, une analyse extensive a été réalisée sur les PBMC d'un porteur sain pour lequel nous disposions de suffisamment d'ADN. Cet échantillon correspond au AS10 dont la charge virale est inférieure à 1 cellule infectée/150 PBMC. (Wattel *et al.*, 1992). La LMPCR a été effectuée

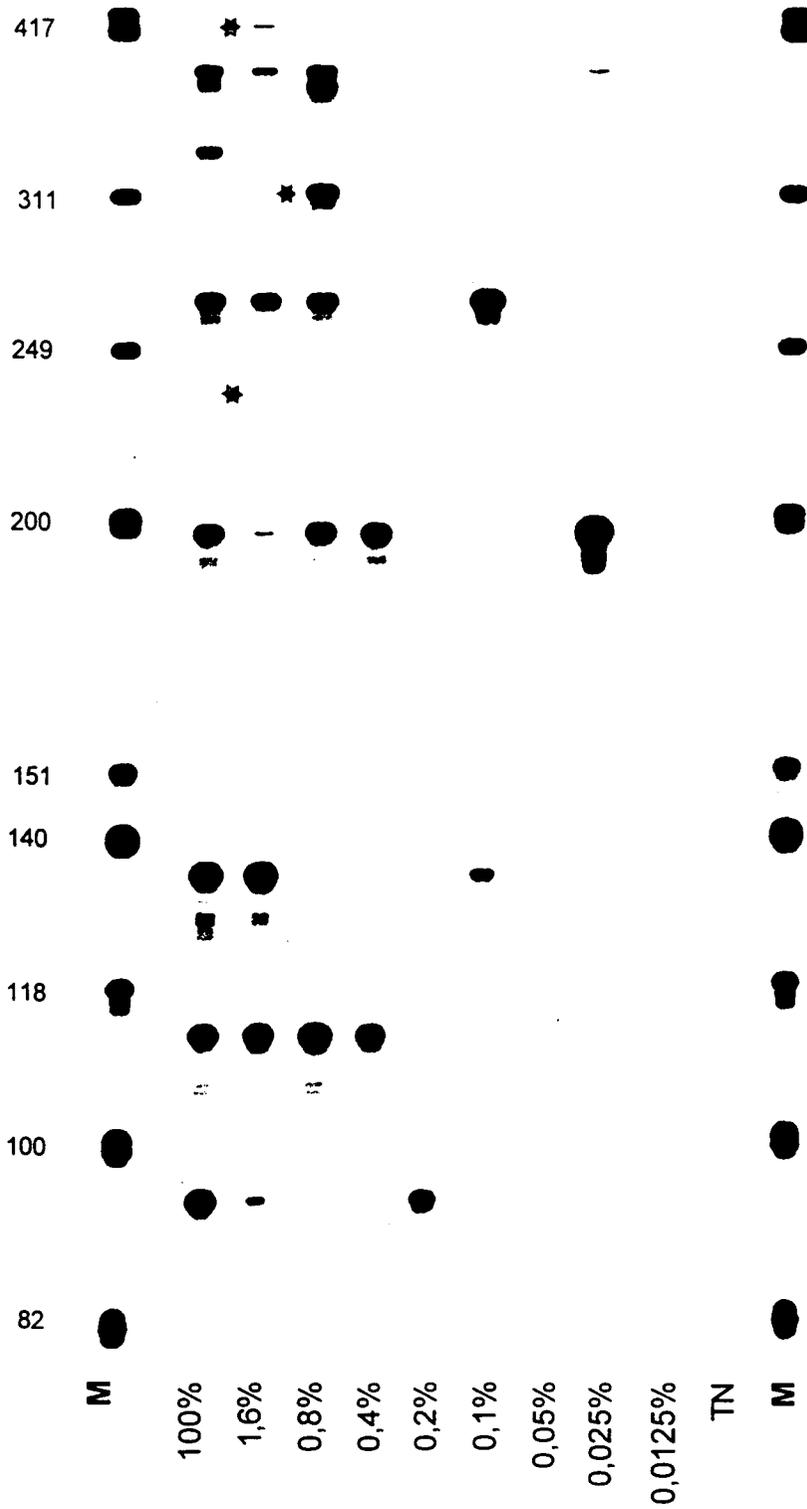


Fig. 4R : Analyse par IP-PCR de l'ADN extrait de dilution de cellules MT4 dans des cellules non infectées.

15 fois sur 0,5 μg d'ADN. Sur un total de 18 clones identifiés, 9 sont présents simultanément dans plusieurs expériences. La Figure 5R représente le nombre cumulé de clones nouveaux détectés après la $n^{\text{ième}}$ expérience. Cette courbe est asymptotique à un plateau correspondant à un nombre cumulé de 20 clones. Cette distribution est celle d'un modèle statistique théorique où parmi 20 clones, 4 clones par expérience, choisis de façon aléatoire, seraient détectés. Dans cet échantillon, étant donnée la charge virale d'environ 500 copies par μg d'ADN, chaque clone est en moyenne composé de 25 cellules ce qui rend compte du caractère aléatoire de leur détection. Les expériences de LMPCR sous-estiment donc le nombre de clones réellement en expansion dans les échantillons cliniques.

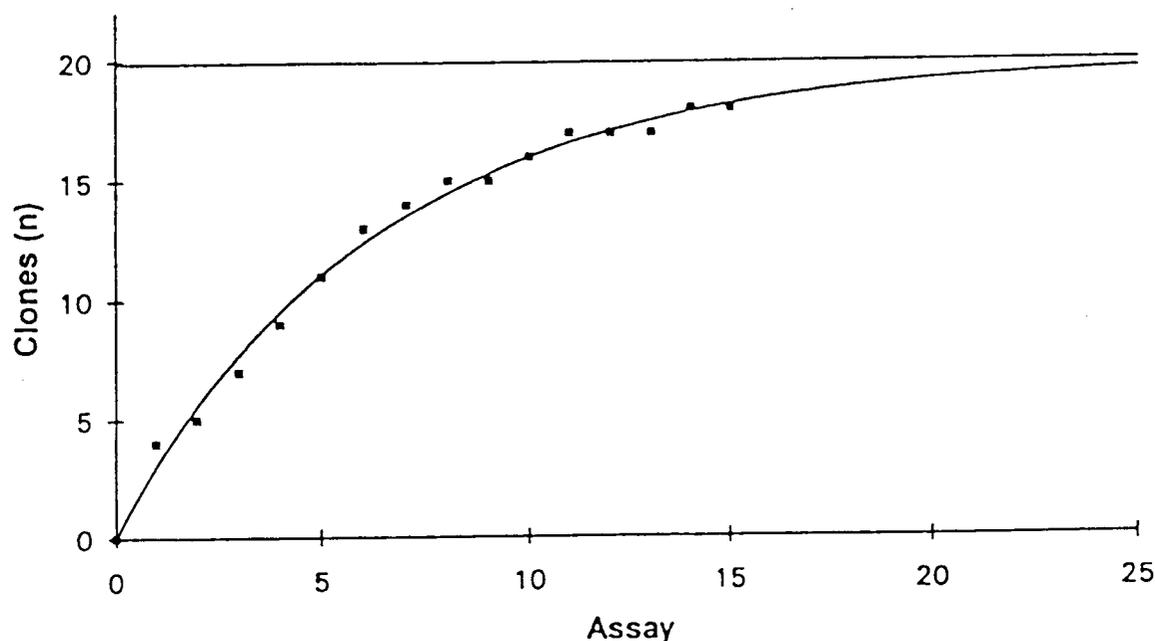


Fig. 5R : Analyse extensive des sites d'intégration de HTLV-1 par LMPCR dans l'ADN d'un porteur asymptomatique (AS10).

I.3. DISCUSSION.

Ces expériences réalisées sur le plasmide p4.39, la lignée MT4 et l'ADN de l'AS10, montrent que la technique LMPCR est plus sensible que l'IPCR. Ces deux techniques excluent la détection d'une copie. Par conséquent, chaque bande identifiée après *Run Off* correspond à un clone en expansion. Concernant la lignée MT4, 7 bandes sont détectées constamment et correspondent à des formes majoritaires représentées à plus de 1000 copies par 150 000 cellules. La technique de blot de Southern dont la sensibilité est située autour de 5% (soit 7500 provirus intégrés/150 000 PBMC) permet la détection de 5 provirus intégrés. Cette différence de résultats s'explique par la meilleure sensibilité des techniques d'amplification des sites d'intégration pour l'étude de l'expansion clonale des cellules infectées.

Néanmoins, une seule réaction d'amplification des sites d'intégration effectuée sur des échantillons à faible charge virale (<500 copies/ μ g) sous-estime le nombre de sites d'intégration différents. En effet, l'analyse des sites d'intégration de HTLV-1 dans des ADN extraits des PBMC d'un porteur asymptomatique ou des cellules MT4 diluées au centième dans des cellules non infectées montre que la répétition des expériences est nécessaire pour une estimation du nombre réel de sites d'intégration différents. Les expériences réalisées à partir du plasmide p4.39 démontrent que la faible efficacité de ligation (<1%) est à l'origine de ce phénomène d'échantillonnage. Cependant, des concentrations 10 fois plus fortes de BIO1 et l'utilisation d'une quantité dix fois plus importante de ligase n'améliorent pas significativement la réaction. Par conséquent, la détection aléatoire des sites d'intégration est très certainement engendrée par une compétition entre une ligation spécifique et une ligation non spécifique.

D'autre part, l'intensité des bandes détectées ne peut être le reflet de l'abondance des formes puisque la PCR sélectionne les petites tailles. Malgré des temps d'extension relativement longs, une différence de l'ordre de 100 pb va entraîner une amplification préférentielle des petits fragments au détriment des plus grands. En revanche, en raison du

caractère aléatoire de la détection des sites d'intégration, les clones détectés plus d'une fois dans une série d'expériences correspondent très probablement aux formes les plus représentées (>100 copies/150 000 cellules).

A faible représentation cellulaire d'un clone, il existe donc une sélection aléatoire des sites d'intégration lors de leur amplification par LMPCR ou IPCR. Cette composante stochastique, secondaire au faible rendement de la ligation tend à sous-estimer le nombre de clones présents dans l'échantillon. Par conséquent, la répétition des expériences permet une meilleure estimation du nombre de clones en expansion et les clones détectés plusieurs fois dans une série d'expériences représentent des formes plus abondantes.

DEUXIEME PARTIE :

PROLIFERATION DES CELLULES INFECTEES CHEZ LES PORTEURS DU VIRUS EN L'ABSENCE DE MALIGNITE.

II.1. INTRODUCTION.

D'après les études réalisées par blot de Southern, une expansion clonale des cellules infectées est observée chez environ 20% des patients atteints de TSP/HAM et 2% des porteurs asymptomatiques (Ikeda *et al.*, 1990 et 1993; Nakada *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 1995). Plus récemment, les techniques d'amplification des sites d'intégration ont mis en évidence une expansion clonale chez tous les porteurs du virus : 4 patients atteints de TSP/HAM ainsi que 3 porteurs asymptomatiques (Wattel *et al.*, 1995). Ces résultats suggéraient que l'expansion clonale des cellules infectées pourrait être présente, en l'absence de malignité, chez tous les individus infectés par HTLV-1. Cependant, le faible nombre d'échantillons analysés nécessitait, dans un premier temps, d'élargir ces observations sur un plus grand nombre d'individus.

D'autre part, le nombre de cellules composant les clones chez ces individus n'avait pas été étudié. Les expériences réalisées à partir du plasmide p4.39, de la lignée MT4 et de l'ADN du porteur asymptomatique AS10 montrent que les techniques d'amplification des sites d'intégration par LMPCR et IPCR permettent une estimation de l'ampleur des clones par répétition des expériences. C'est pourquoi, dans un second temps, une étude plus approfondie des prélèvements de 15 porteurs asymptomatiques et de 4 patients atteints de TSP/HAM a été réalisée.

Enfin, une étude concernant 3 patients atteints de TSP/HAM et 2 porteurs asymptomatiques montrait que les clones de cellules infectées par HTLV-1 étaient stables au cours de l'infection (Furukawa *et al.*, 1992). Dans cette étude, le profil d'intégration de HTLV-1 avait été analysé par blot de Southern sur des prélèvements effectués à des intervalles de 4

mois à 3 ans. Cependant, en raison de la faible sensibilité du blot de Southern pour l'étude de l'expansion clonale, ces résultats concernaient uniquement des clones représentés à plus de 1 cellule sur 20 PBMC. La stabilité des clones de plus faible amplitude a donc été étudiée par IPCR chez deux patients pour lesquels nous disposions de prélèvements au cours de l'infection.

II.2. RESULTATS.

II.2.1. Nombre de clones en expansion.

L'ensemble de cette étude a été réalisée sur de l'ADN extrait des PBMC et concerne l'analyse de prélèvements de 19 porteurs asymptomatiques et de 19 patients atteints de TSP/HAM. Tous les prélèvements correspondent à des PBMC. La technique de LMPCR, plus sensible, est mieux adaptée à l'analyse des échantillons à faible charge virale comme les prélèvements des porteurs sains. En revanche, l'IPCR est plus adaptée à l'étude des échantillons issus des patients atteints de TSP/HAM pour lesquels la LMPCR met en évidence un *smear* avec quelques bandes. Pour ces raisons, les prélèvements des individus asymptomatiques ont tous été étudiés par LMPCR et certains également par IPCR alors que tous les prélèvements des patients atteints de TSP/HAM ont été testés uniquement par IPCR.

Les données concernant les individus asymptomatiques et les patients atteints de TSP/HAM sont résumées dans le Tableau 3R. Le profil d'intégration de HTLV-1 est étudié sur 0,5 µg d'ADN extrait des PBMC. Après LMPCR ou IPCR, le polymorphisme de longueur des produits d'amplification a été étudié par *Run off* avec l'amorce radiomarquée BIO5. La Figure 6R montre les résultats des analyses par LMPCR de 4 prélèvements porteurs asymptomatiques et par IPCR de 5 prélèvements de patients atteints de TSP/HAM. Les résultats pour l'ensemble des prélèvements sont résumés dans le Tableau 3R. Pour tous les porteurs du virus, une expansion clonale de cellules infectées a été observée.

	âge	sexe	origine	Nombre de clones détectés après 1 expérience		Nombre de clones total/nombre de clones communs détectés après 4 expériences
				LMPCR	IPCR	
Individus asymptomatiques						
AS1	39	F	Guadeloupe	2		4/0
AS2	22	F	Guadeloupe	1		1/0
AS3	48	M	Guadeloupe	5		ND
AS4	34	M	Guadeloupe	2		ND
AS5	44	F	Guadeloupe	3		ND
AS6	60	F	Guadeloupe	16	1	59/21
AS7	31	M	Guadeloupe	4	1	15/0
AS8	46	F	Guadeloupe	13	6	41/16
AS9	57	M	Guadeloupe	11	1	37/10
AS10	55	F	Guadeloupe	4		10/2
AS11	25	M	Guadeloupe	14	1	40/9
AS12	48	M	Guadeloupe	6	2	ND
AS13	36	F	Guadeloupe	7	1	30/5
AS14	26	F	Guadeloupe	5		25/3
AS15	53	F	Guadeloupe	10		24/3
AS16	38	F	Guadeloupe	3	1	15/1
AS17	36	M	Guadeloupe	9		38/4
AS18	47	F	Guadeloupe	10		38/14
AS19	54	M	Guadeloupe	8		24/16
AS20	41	F	Guadeloupe		2	
Patients atteints de TSP/HAM						
TSP1	51	M	Guadeloupe		2	ND
TSP2	49	F	Guadeloupe		5	ND
TSP3	70	F	Gabon		8	ND
TSP4	39	F	Guadeloupe		15	ND
TSP5	51	F	Guadeloupe		7	ND
TSP6	50	F	Guadeloupe		9	ND
TSP7	52	F	Guadeloupe		22	ND
TSP8	46	F	Guadeloupe		29	ND
TSP9	34	M	Congo		35	ND
TSP10	50	F	Guadeloupe		10	ND
TSP11	62	F	Guadeloupe		46	ND
TSP12	55	F	Zaire		43	ND
TSP13	60	F	Guadeloupe		2	ND
TSP14	46	F	RCA*		20	ND
TSP15	34	F	Guyane		8	ND
TSP16	60	M	Guadeloupe		1	ND
TSP17	46	F	Guadeloupe		2	ND
TSP18	52	F	Guadeloupe		16	ND
TSP19	40	M	Haiti		19	ND

Tableau 3R : Distribution du nombre de clones détectés chez les porteurs asymptomatiques et les patients atteints de TSP/HAM après une ou 4 expériences d'amplification des sites d'intégration de HTLV-1.

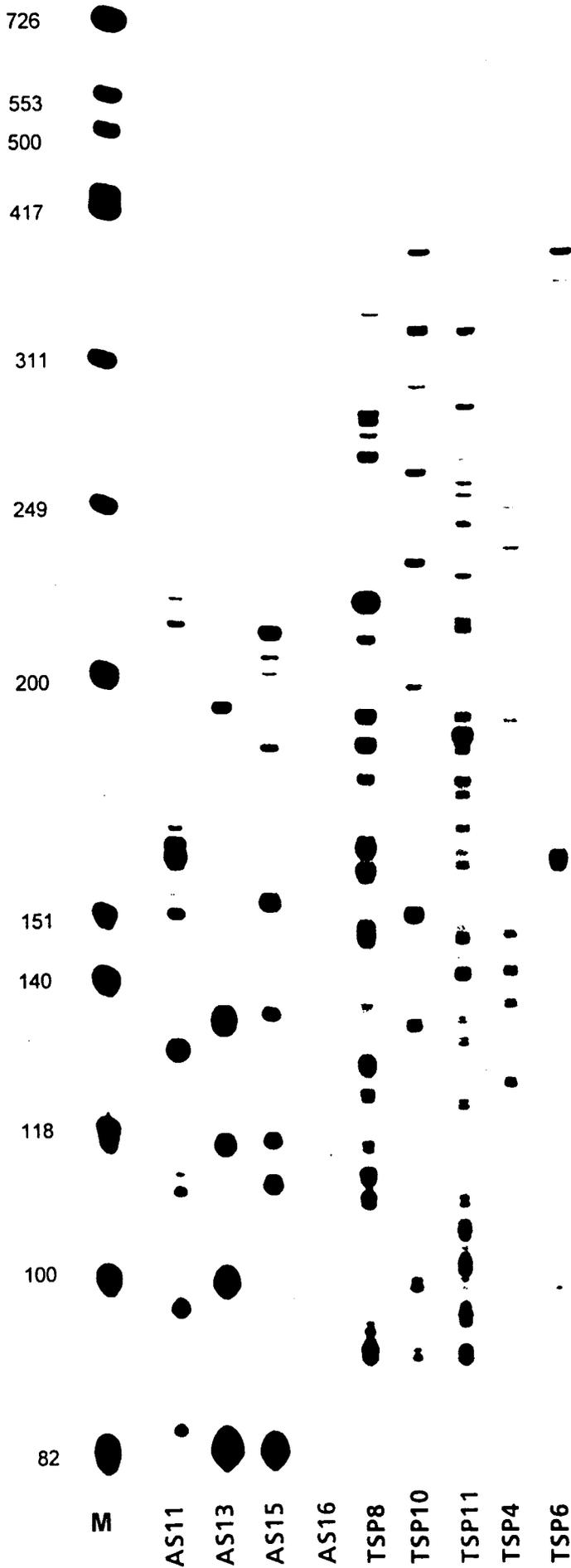


Fig. 6R:
 Amplification des sites d'intégration de
 HTLV-1 dans l'ADN de porteurs
 asymptomatiques (AS) et de patients
 atteints de TSP/HAM (TSP).

mois à 3 ans. Cependant, en raison de la faible sensibilité du blot de Southern pour l'étude de l'expansion clonale, ces résultats concernaient uniquement des clones représentés à plus de 1 cellule sur 20 PBMC. La stabilité des clones de plus faible amplitude a donc été étudiée par IPCR chez deux patients pour lesquels nous disposions de prélèvements au cours de l'infection.

II.2. RESULTATS.

II.2.1. Nombre de clones en expansion.

L'ensemble de cette étude a été réalisée sur de l'ADN extrait des PBMC et concerne l'analyse de prélèvements de 19 porteurs asymptomatiques et de 19 patients atteints de TSP/HAM. Tous les prélèvements correspondent à des PBMC. La technique de LMPCR, plus sensible, est mieux adaptée à l'analyse des échantillons à faible charge virale comme les prélèvements des porteurs sains. En revanche, l'IPCR est plus adaptée à l'étude des échantillons issus des patients atteints de TSP/HAM pour lesquels la LMPCR met en évidence un *smear* avec quelques bandes. Pour ces raisons, les prélèvements des individus asymptomatiques ont tous été étudiés par LMPCR et certains également par IPCR alors que tous les prélèvements des patients atteints de TSP/HAM ont été testés uniquement par IPCR.

Les données concernant les individus asymptomatiques et les patients atteints de TSP/HAM sont résumées dans le Tableau 3R. Le profil d'intégration de HTLV-1 est étudié sur 0,5 µg d'ADN extrait des PBMC. Après LMPCR ou IPCR, le polymorphisme de longueur des produits d'amplification a été étudié par *Run off* avec l'amorce radiomarquée BIO5. La Figure 6R montre les résultats des analyses par LMPCR de 4 prélèvements porteurs asymptomatiques et par IPCR de 5 prélèvements de patients atteints de TSP/HAM. Les résultats pour l'ensemble des prélèvements sont résumés dans le Tableau 3R. Pour tous les porteurs du virus, une expansion clonale de cellules infectées a été observée.

	âge	sexe	origine	Nombre de clones détectés après 1 expérience		Nombre de clones total/nombre de clones communs détectés après 4 expériences
				LMPCR	IPCR	
Individus asymptomatiques						
AS1	39	F	Guadeloupe	2		4/0
AS2	22	F	Guadeloupe	1		1/0
AS3	48	M	Guadeloupe	5		ND
AS4	34	M	Guadeloupe	2		ND
AS5	44	F	Guadeloupe	3		ND
AS6	60	F	Guadeloupe	16	1	59/21
AS7	31	M	Guadeloupe	4	1	15/0
AS8	46	F	Guadeloupe	13	6	41/16
AS9	57	M	Guadeloupe	11	1	37/10
AS10	55	F	Guadeloupe	4		10/2
AS11	25	M	Guadeloupe	14	1	40/9
AS12	48	M	Guadeloupe	6	2	ND
AS13	36	F	Guadeloupe	7	1	30/5
AS14	26	F	Guadeloupe	5		25/3
AS15	53	F	Guadeloupe	10		24/3
AS16	38	F	Guadeloupe	3	1	15/1
AS17	36	M	Guadeloupe	9		38/4
AS18	47	F	Guadeloupe	10		38/14
AS19	54	M	Guadeloupe	8		24/16
AS20	41	F	Guadeloupe		2	
Patients atteints de TSP/HAM						
TSP1	51	M	Guadeloupe		2	ND
TSP2	49	F	Guadeloupe		5	ND
TSP3	70	F	Gabon		8	ND
TSP4	39	F	Guadeloupe		15	ND
TSP5	51	F	Guadeloupe		7	ND
TSP6	50	F	Guadeloupe		9	ND
TSP7	52	F	Guadeloupe		22	ND
TSP8	46	F	Guadeloupe		29	ND
TSP9	34	M	Congo		35	ND
TSP10	50	F	Guadeloupe		10	ND
TSP11	62	F	Guadeloupe		46	ND
TSP12	55	F	Zaire		43	ND
TSP13	60	F	Guadeloupe		2	ND
TSP14	46	F	RCA*		20	ND
TSP15	34	F	Guyane		8	ND
TSP16	60	M	Guadeloupe		1	ND
TSP17	46	F	Guadeloupe		2	ND
TSP18	52	F	Guadeloupe		16	ND
TSP19	40	M	Haiti		19	ND

Tableau 3R : Distribution du nombre de clones détectés chez les porteurs asymptomatiques et les patients atteints de TSP/HAM après une ou 4 expériences d'amplification des sites d'intégration de HTLV-1.

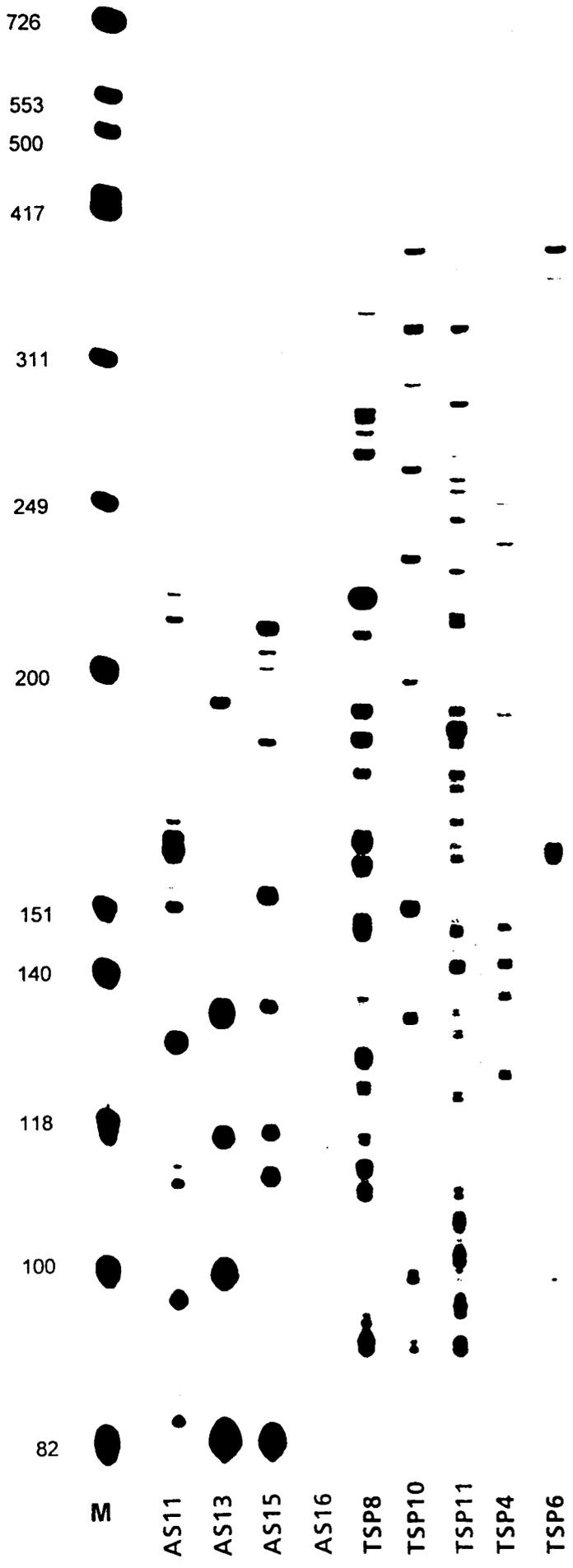


Fig. 6R:
 Amplification des sites d'intégration de
 HTLV-1 dans l'ADN de porteurs
 asymptomatiques (AS) et de patients
 atteints de TSP/HAM (TSP).

Le nombre de clones détectés par expérience d'IPCR est supérieur chez les patients atteints de TSP/HAM par rapport aux porteurs sains ($299/19=15,8$ versus $16/9 = 1,8$). Cette différence est significative ($p<0.05$, Test de U de Mann et Witney). En comparant le nombre de clones détectés par LMPCR chez les porteurs asymptomatiques et par IPCR chez les patients atteints de TSP/HAM, la différence reste significative bien que la LMPCR permette la détection de plus de clones ($299/19$ versus $133/19$; $p= 0.05$, Test de U de Mann et Witney). D'autre part, chez les porteurs asymptomatiques pour lesquels la charge virale avait été quantifiée, aucune corrélation entre le nombre de clones détectés et la charge virale n'est notée.

II.2.2. Ampleur des clones.

Comme une composante stochastique entre en jeu dans les réactions d'amplification des sites d'intégration, l'ampleur des clones peut être étudiée par répétition des expériences. Les clones les plus représentés sont plus fréquemment détectés. C'est pourquoi, chez 15 porteurs asymptomatiques, les échantillons ont été étudiés simultanément quatre fois par LMPCR. Les sites détectés plus d'une fois sur quatre expériences correspondent à des clones de fréquence supérieure à 1 cellule sur 1500 PBMC. La Figure 7R présente les résultats de l'analyse du profil d'intégration de HTLV-1 chez deux porteurs asymptomatiques guadeloupéens. L'analyse de l'ADN extrait des PBMC du porteur asymptomatique AS14, donneur de sang et âgé de 26 ans, révèle la présence dans plusieurs expériences de 3 clones sur un total de 25. Concernant le donneur AS9, âgé de 57 ans, 10 clones sur 37 sont détectés dans deux expériences. Les résultats de l'analyse des autres prélèvements de porteurs asymptomatiques sont résumés dans le Tableau 3R.

Concernant les patients atteints de TSP/HAM, le nombre élevé de clones détectés par expérience exclut la possibilité de mesurer l'ampleur de ces clones en raison de l'incertitude liée à la lecture sur gel de séquence même lorsque l'analyse du polymorphisme est étudiée à l'aide d'un séquenceur. C'est pourquoi pour 4 patients, les PBMC ont été diluées au 1/20 dans

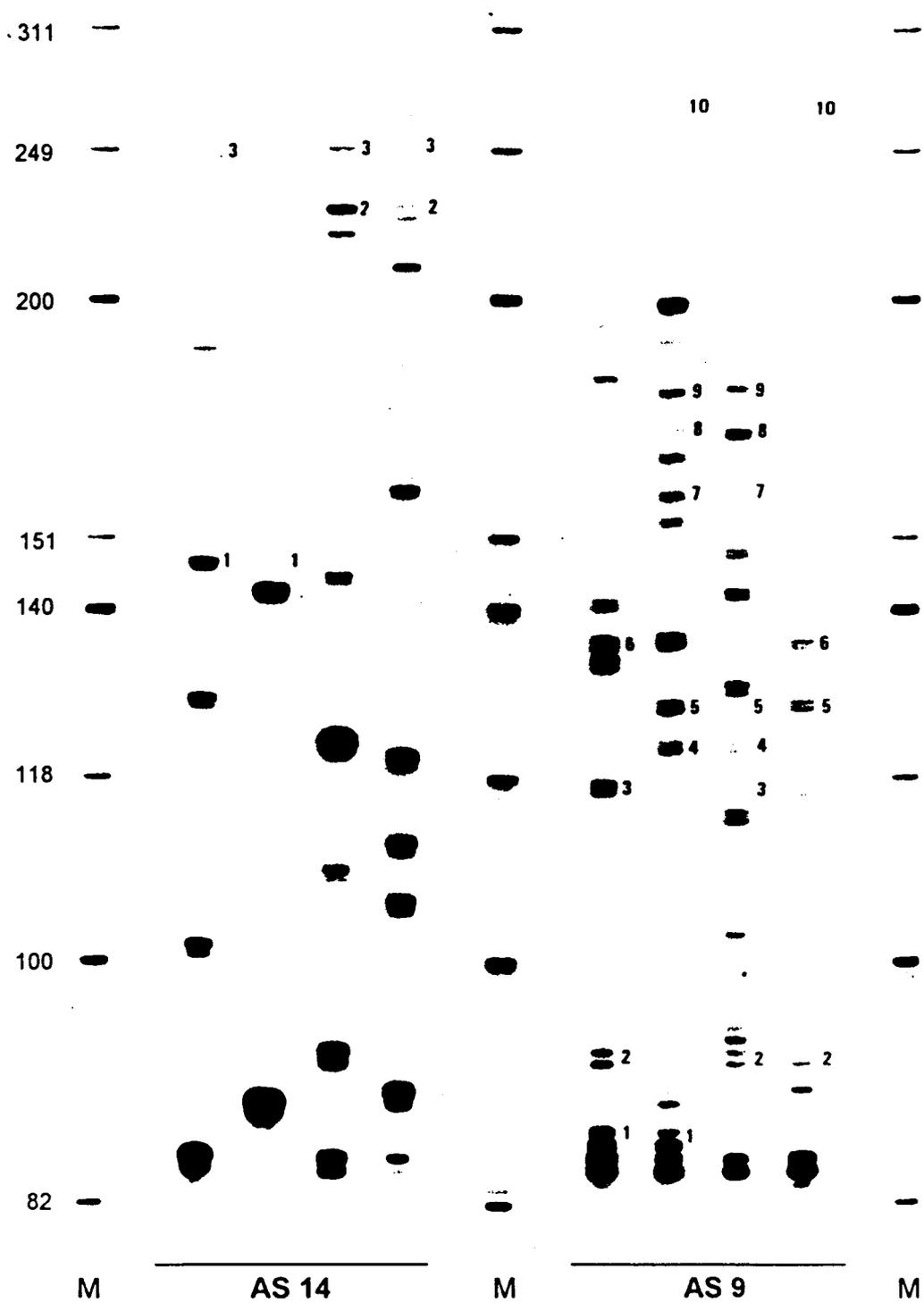


Fig. 7R : Analyse de l'ampleur des clones par répétition des expériences de LMPCR chez deux porteurs asymptomatiques.

II.3.2. Stabilité des clones.

Les résultats précédents montrent qu'en l'absence de malignité, des clones de cellules infectées par HTLV-1 sont présents dans tous les échantillons. Ces observations suggèrent qu'il existe une prolifération des cellules infectées *in vivo* en phase asymptomatique ainsi que durant la TSP/HAM. Cependant, ces données décrivant un état "instantané", ne donnaient aucune indication sur le renouvellement et/ou la stabilité des clones. C'est pourquoi la clonalité a été étudiée par amplification des sites d'intégration chez deux patients atteints de TSP/HAM prélevés à différents moments. Cette approche, par IPCR, permet l'étude de la stabilité de clones dont la fréquence est comprise entre 1 et 5 cellules sur 1500 PBMC. Les dates de prélèvements sont décrites Figure 8R. Concernant la patiente BOUL dont la TSP/HAM a été diagnostiquée en 1985, deux prélèvements ont été effectués à 11 mois d'intervalle. En 1990, une lignée BOUL a été établie par culture des PBMC en présence d'IL2. Concernant la patiente SEPH, âgée de 53 ans, atteinte d'une TSP/HAM depuis 1977, deux prélèvements ont été réalisés à 5 ans d'intervalle.

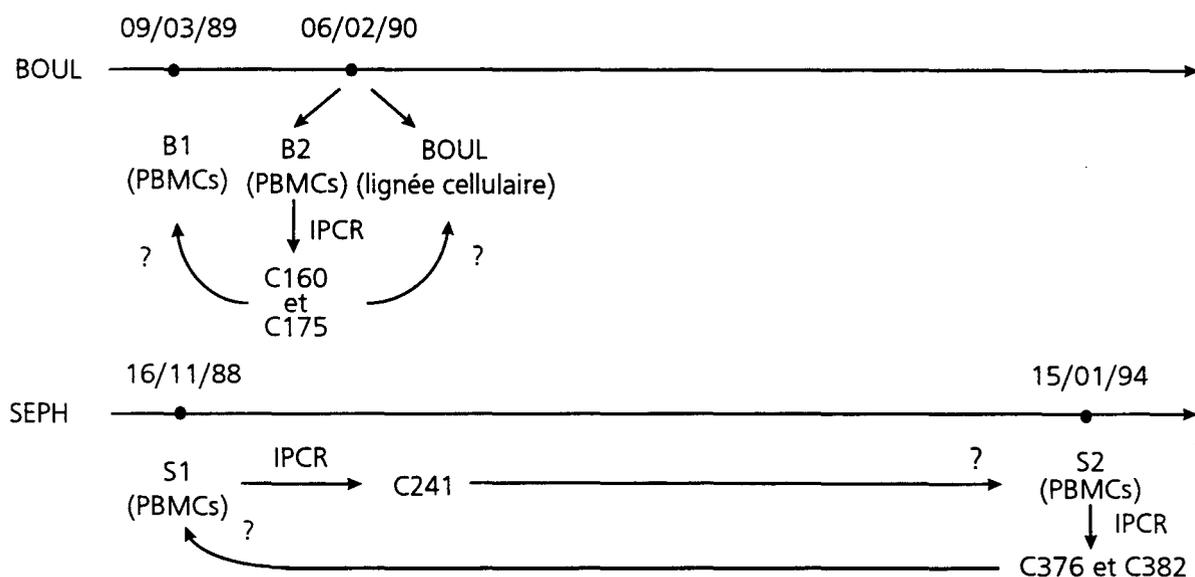


Fig. 8R : Stratégie expérimentale d'étude de la stabilité des clones (< 1/300PBMC).

Pour permettre l'étude de l'ampleur des clones, le profil d'intégration de HTLV-1 dans les prélèvements des patients BOUL (B1, B2 et la lignée BOUL) et SEPH (S1 et S2) a été étudié sur 0,5 µg d'ADN par IPCR simultanément quatre fois (Figure 9R (p75)). Le nombre de clones détectés par expérience est homogène pour un prélèvement donné. Contrairement à la lignée BOUL, l'analyse du profil d'intégration de HTLV-1 dans les autres prélèvements révèle l'absence de clones détectés 4 fois sur 4. Par conséquent, tous les clones identifiés chez ces patients sont représentés à moins de 1 cellule sur 300 PBMC.

L'amplification des sites d'intégration de HTLV-1 étant soumise à un échantillonnage, tous les clones ne sont pas systématiquement détectés en une seule réaction. D'autre part, dans certains prélèvements, le nombre de clone détectés est élevé. Par conséquent, l'étude de la stabilité des clones par analyse du polymorphisme de longueur des produits d'amplification n'est pas suffisante. La recherche des clones dans les différents prélèvements a donc été effectuée par PCR en utilisant des couples d'amorces dont l'une est située dans le LTR3' et l'autre dans le site d'intégration. Pour détecter ces sites, présents à environ 100 copies par µg d'ADN, une PCR interne est nécessaire.

Les produits de PCR exponentielle ont donc été séquencés après clonage en phage M13. La PCR et le clonage sélectionnant les petites tailles, les ampligènes ont été purifiés par électrophorèse en gel d'agarose LMP dans le but d'obtenir des séquences suffisamment longues pour choisir deux oligonucléotides dans le site d'intégration. Le Tableau 5R montre les séquences des sites d'intégration des clones issus des prélèvements B2, S1 et S2. Les amorces choisies par logiciel PCGENE pour amplifier de façon spécifique ces clones sont représentées en gras. Pour limiter les risques de contamination par des matrices M13, les amorces situées dans le LTR (LTR1 et LTR2) ont été choisies en dehors des séquences clonées. La recherche par PCR de ces clones dans les autres prélèvements est représentée Figure 10R(A) (p76). Les bandes de 230 pb et 251 pb, obtenues respectivement pour les clones C160 et C175, témoignent de la présence dans ces deux prélèvements de cellules issues du même clone (Figure 10R). Cependant, ces clones stables *in vivo* ne sont pas présents dans la lignée BOUL. Concernant le patient SEPH, les clones C376 et C382, identifiés dans le second prélèvement, sont observés également dans l'échantillon S1. En revanche, le clone

C241 du premier prélèvement n'est pas détecté 5 ans plus tard. Ainsi, chez ces deux patients, sur un total de 5 clones représentés à moins de 1 cellule sur 300 PBMC, 4 clones sont stables sur une période de 11 mois à 5 ans.

NOM	CLONE	SEQUENCES (PRIMERS)					
BOUL (B2) 09/03/89	C160 (105bp)	GAGAGTCAGC <u>CTGTTACACG</u> ACATG	ATCCTTGTAG TAAAAAGAAA	GACCCTGATT GGAAGAGTAT	ATCAGGAGAA GTATAGTACC	GGTAAGGCTG TTTGTGAACT	
BOUL(B2) 0602/90	C175 (178bp)	ACATTTGATA CCCGCCTCTA CTGTTGAGTT TTCCAGTTGC	AATTCAGTCC CATCGTGCCT AAATCTTCAA	AACATTTCCA TGGCATCTCA TAAATCCACC	CCCCTCTCAG GTAGGATTAA AAATAAGCTG	TCTTTGGGTT CCATAGACTA TTAGAGTCAT	ATG
SEPH(S1) 16/11/88	C241 (127bp)	CTTCTCCATT CAGCCCCAAA AGCAGTTGGG	TAGAAAGGAG ATTCCTCTTT	TCATTTCAGG TGCTTTCTCA	TCCCAGAAGC CAGGATGTTT	CTCCCCTGT AGTGGAAAGAA	CCTCATG
SEPH(S2) 1994	C376 (101bp)	TGTAAAGGAA CAAAC TAGAA	CAGAAATTAT CTCAGGATTC	AACAAACTGT AGAAACTCAC	CTCTCAGACC TCAAACTGC	ACAGTGCAAT TCAACTACAT	G
SEPH(S2) 1994	C382 (194bp)	CCTCTGTAAT AATTTGAATA AGGGAATGAG ATGATTGACT	GGTATTTTCA GTCCAGGAGA TGAAGAAGCA ACTAAGAGCC	GTTTAGGTAC TGGTGAGAGA GTAAATTTAC AGGCCAGGAC	ACGTGAAAAG TTAGAAGGA TGTCAGGGTA TAAGTGCTTG	AAAAC TGCTT GTGTTATAGA AAATGGAATG CATG	

Tableau 5R : Séquences des sites d'intégration de HTLV-1 dans les prélèvements sanguins des patients BOUL et SEPH.

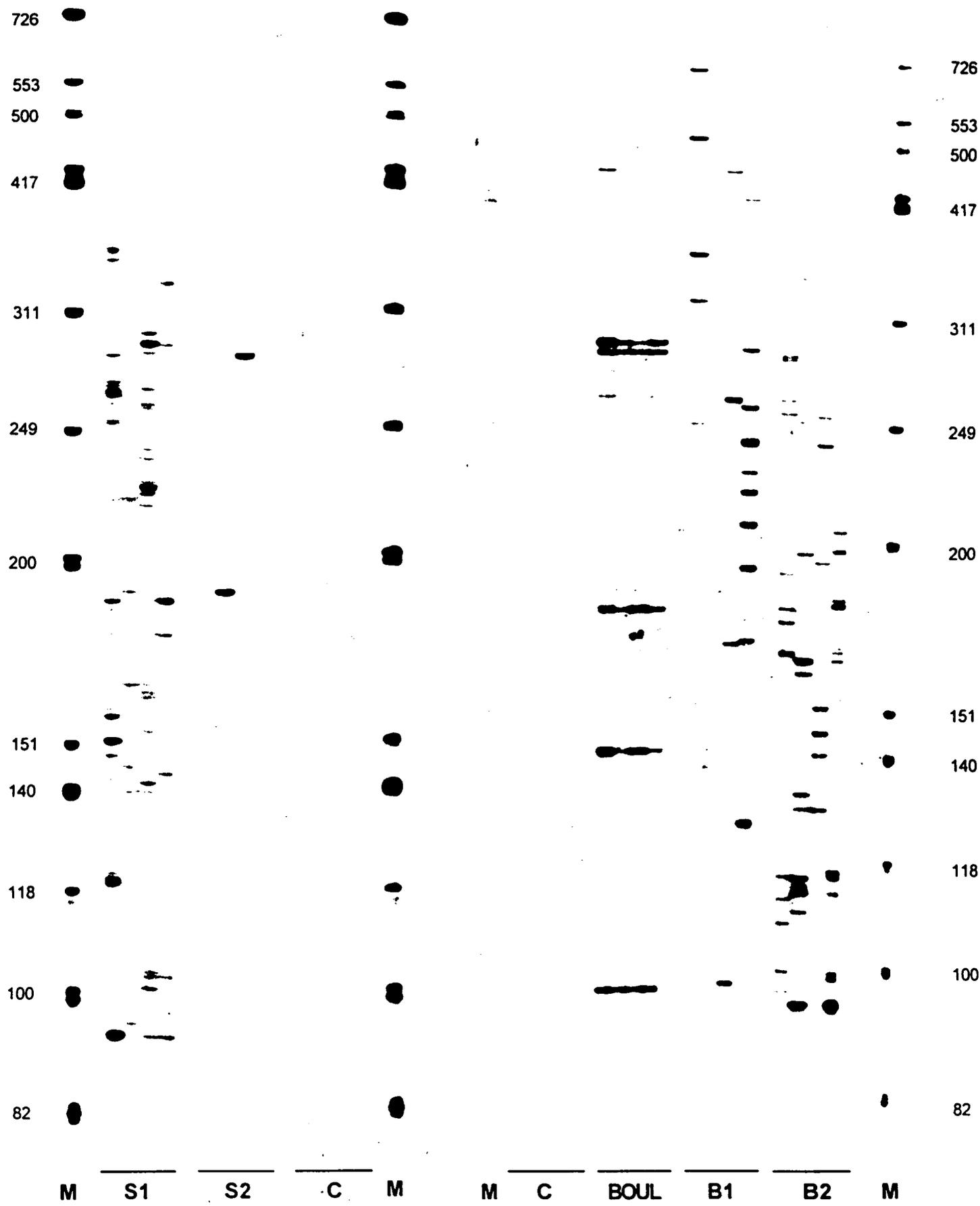


Fig. 9R : Analyse des sites d'intégration de HTLV-1, par IPCR, au cours du temps chez deux patients atteints de TSP/HAM.

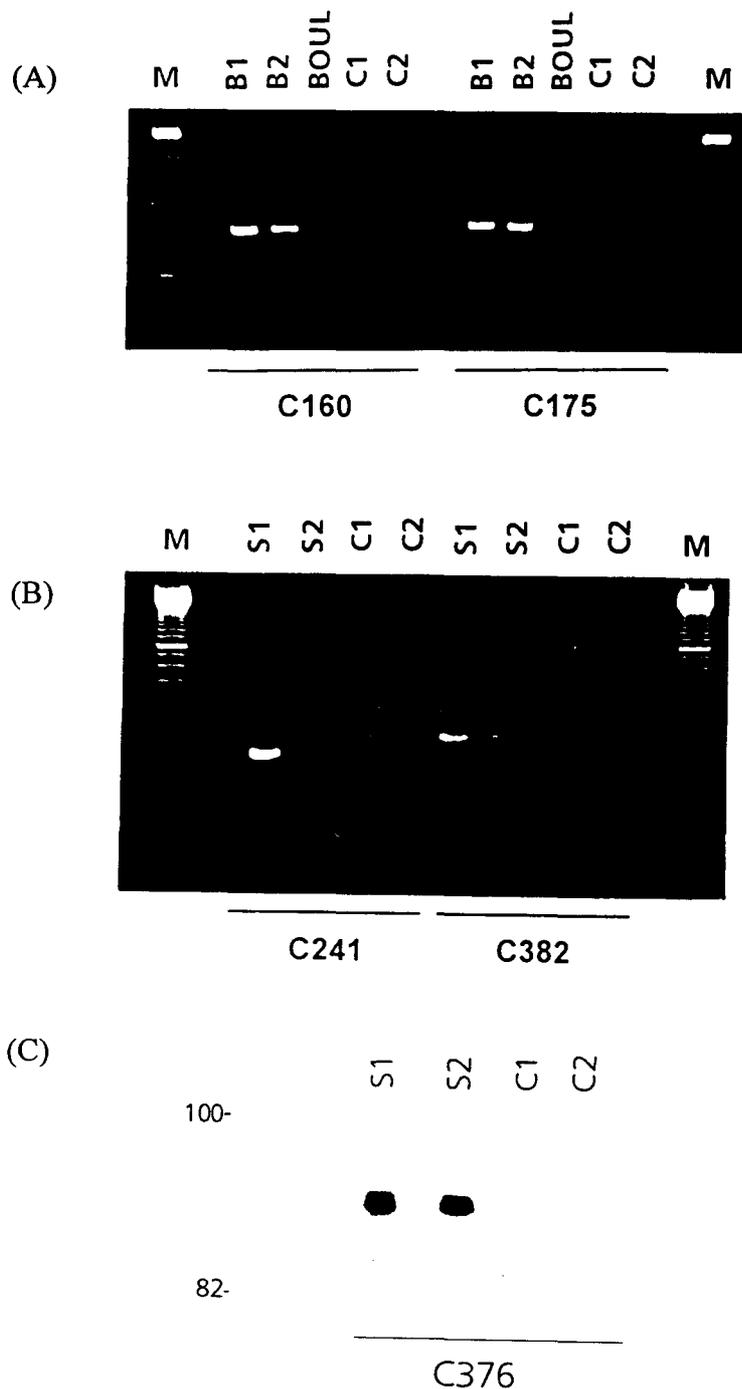


Fig. 10R : Recherche par PCR des clones dans les différents prélèvements.

patient BOUL (A) : Les clones C160 et C175, identifiés dans B2, sont également observés dans B1 respectivement à 230 pb et 251 pb.

patient SEPH (B et C) : Les clones C376 et C282, identifiés dans B2, sont également observés dans B1 respectivement à 90 et 277 pb. Un *run off* avec l'amorce radiomarquée BIO5 est nécessaire pour l'obtention de la spécificité (C).

Les témoins négatifs utilisés sont les ADN extraits de MT4 (C1) et HL60 (C2). Le marqueur de taille correspond au 100 pb (Pharmacia).

II.3. DISCUSSION.

L'amplification des sites d'intégration de HTLV-1 montre la présence de clones de cellules infectées par HTLV-1 chez tous les porteurs du virus, quel que soit leur statut clinique (asymptomatique ou atteint de TSP/HAM). Ces données permettent d'étendre considérablement les observations initiales (Wattel *et al.*, 1995). Les études par blot de Southern n'avaient pu mettre en évidence une expansion clonale que chez 20% des patients atteints de TSP/HAM et une minorité des porteurs asymptomatiques (2%). Cette différence de résultats s'explique par la meilleure sensibilité des techniques d'amplification des sites d'intégration pour l'étude de l'expansion clonale. Ces données n'excluent cependant pas l'existence *in vivo* d'un certain niveau de réplication *via* la production de particules virales. La présence dans les prélèvements de plusieurs clones et la transmission allogénique du virus HTLV-1 impliquent nécessairement une infection *de novo*. Cependant, la haute charge virale observée en l'absence de malignité est atteinte principalement par l'expansion clonale des cellules infectées. En effet, l'analyse extensive des prélèvements sanguins du porteur asymptomatique AS10 montre que la charge virale (500 copies/ μ g d'ADN) est portée par une vingtaine de clones représentés chacun à plus de 20 copies/ μ g d'ADN. Certes, chez les individus infectés, une centaine de clones peuvent exister, cependant l'essentiel de la charge virale est porté par les clones, notamment les clones les plus abondants qui sont relativement peu nombreux. Le mode de réplication endogène du provirus HTLV-1 prédomine donc *in vivo* et s'accompagne d'un faible niveau de réplication par production de particules virales qui rend compte du nombre de clones observés et de la faible variabilité de HTLV-1 *in vivo*.

L'analyse semi-quantitative, par LMPCR ou IPCR, révèle une grande variabilité du nombre et de l'ampleur des clones d'un individu à l'autre. Les clones sont plus nombreux et plus abondants au cours de la TSP/HAM qu'en phase asymptomatique. D'autre part, il existe une corrélation entre l'ampleur des clones, représentés à plus de 1/7500 PBMC, et l'âge des porteurs asymptomatiques. Comme aucun de ces individus, donneurs de sang, n'a d'antécédents transfusionnels ou de toxicomanie, leur contamination par HTLV-1 a très probablement eu lieu très tôt *via* le lait maternel, une des principales voies de contamination (Manns *et al.*, 1991). Par conséquent, l'âge des donneurs de sang étudiés peut être considéré

comme le reflet de la durée de l'infection. Il semble donc qu'au cours de l'infection, il y ait accumulation des cellules infectées par expansion clonale. Les clones sont ainsi plus gros chez les individus en âge de développer l'ATLL ou la TSP/HAM. Ces données vont dans le sens des résultats observés lors d'études sur la variabilité de HTLV-1. En effet, d'après les résultats de Saito *et al.* (1995) et Niewiesk *et al.* (1994), il semble que rétrospectivement la variabilité de HTLV-1 soit plus importante chez les individus asymptomatiques jeunes que chez les porteurs plus âgés (Tableau 6R). L'étude de la variabilité du rétrovirus HTLV-1 est effectuée par analyse d'une vingtaine de séquences réalisées après amplification d'un segment interne du provirus. Etant donné la présence, chez les porteurs asymptomatiques âgés de clones fortement représentés, les séquences prises au hasard vont plus fréquemment être celles de clones abondants. En revanche, chez les porteurs jeunes où les clones sont significativement moins importants, l'amplification va concerner un ensemble de clones. La fidélité du complexe de l'ADN polymérase de l'hôte étant très supérieure à celle des transcriptases inverses, au sein d'un clone les provirus seront moins variables qu'entre deux clones où intervient une étape de transcription inverse. Par conséquent, la différence de variabilité observée suivant l'âge des porteurs peut être expliquée par la différence de l'ampleur des clones.

âge	région	taille du fragment séquencé	nombre de clones séquencés	Nombre de Substitutions	Nombre de substitutions/kb /Clone	Référence
22	pX	1060	21	100	4,33	S. Niewiesk <i>et al.</i> , 1994
35	pX	960	10	11	1,15	M. Saito <i>et al.</i> , 1995
36	pX	1060	20	38	1,73	S. Niewiesk <i>et al.</i> , 1994
45	pX	1060	22	28	1,16	S. Niewiesk <i>et al.</i> , 1994
69	pX	1060	20	24	1,09	S. Niewiesk <i>et al.</i> , 1994
78	pX	960	12	4	0,35	M. Saito <i>et al.</i> , 1995

Tableau 6R : Variabilité intra-individuelle de HTLV-1 des porteurs asymptomatiques en fonction de leur âge.

L'étude de la stabilité des clones au cours du temps indique qu'en l'absence de malignité, la persistance de l'infection résulte de l'expansion chronique et prolongée des cellules infectées. En effet, la majorité des clones représentés à 1 ou 5 cellules par 1500 PBMC est stable sur une période de 11 mois à 5 ans sans aucun signe de sélection clonale. Le fait que de tels clones puissent proliférer face à l'importante réponse CTL qui caractérise l'infection par HTLV-1 pourrait être la conséquence de l'acquisition de mutations et/ou de délétions rendant les cellules invisibles pour le système immunitaire (Niewiesk *et al.*, 1995). La baisse de vigilance du système immunitaire chez les individus plus âgés pourrait laisser échapper certains clones (Powers *et al.*, 1993).

Comme pour les virus d'Epstein Barr et de l'hépatite B (Hausen, 1991), la phase non maligne de l'infection par HTLV-1 est accompagnée *in vivo* d'une prolifération des cellules infectées. La stimulation par le virus de la prolifération des cellules pourrait créer ainsi un terrain propice à l'acquisition de dommages génétiques menant au phénotype néoplasique. Des inactivations de p53 ont été décrites durant le passage d'une forme chronique à une forme aiguë d'ATLL (Sakashida *et al.*, 1992). Les fréquentes altérations de gènes supresseurs de tumeur (Cesaram *et al.*, 1992, Nagai *et al.*, 1991, Yamamoto *et al.*, 1993) et des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire (Hatta *et al.*, 1995), observées dans les ATLL, pourraient prendre place durant la phase asymptomatique. Bien que la TSP/HAM ne soit pas une maladie maligne, la stimulation de la prolifération des cellules par HTLV-1 pourrait également être impliquée dans le développement de la TSP/HAM. En effet, les cellules passent d'autant plus facilement la barrière hématoencéphalique qu'elles sont activées (Hickey, 1991). Ainsi, comme pour le cytomégalovirus (Wiley et Nelson, 1988) et le virus "Canine Distemper Virus" (Summer *et al.*, 1978), HTLV-1 pourrait franchir cette barrière *via* la cellule infectée. La prolifération des cellules dans le sang pourrait jouer un rôle essentiel dans la genèse de la TSP/HAM en permettant le passage de HTLV-1 dans le SNC. Le nombre de clones et de cellules constituant chaque clone pourrait ainsi être critique pour la contamination du SNC.

TROISIEME PARTIE :

PROFIL REPLICATIF DE HTLV-1 AU COURS DE L'ATLL.

III.1. INTRODUCTION.

L'ATLL est une maladie à latence prolongée induite par HTLV-1 (Blattner *et al.*, 1989). La fréquence de l'ATLL chez les individus infectés est située autour de 2% à 5% (Yamaguchi *et al.*, 1993). Les études épidémiologiques indiquent que cette affection se développe principalement chez les individus infectés à la naissance et suggèrent que la durée de l'infection pourrait être importante dans le développement de l'ATLL (Murphy *et al.*, 1989; Yamaguchi *et al.*, 1993). Les études par blot de Southern montrent que la tumeur est généralement monoclonale bien que parfois 2 ou 3 provirus puissent être détectés (Yoshida *et al.*, 1984; Konishi *et al.*, 1984; Hiramatsu *et al.*, 1986; Ohshima *et al.*, 1991).

Les résultats précédents montrent que l'expansion clonale des cellules infectées est la norme pour HTLV-1, quel que soit le statut clinique des porteurs du virus. Ces observations suggèrent fortement que l'ATLL se développe à partir d'un clone déjà présent en phase asymptomatique. Dans ce cas, l'analyse des échantillons tumoraux devrait révéler la présence d'autres clones en plus du ou des clones malins. C'est pourquoi le profil d'intégration de HTLV-1 a été étudié dans des prélèvements, tumoraux ou non, de patients atteints des différentes formes d'ATLL. Outre la détection du ou des clones malins, cette technique permet de détecter des clones plus faiblement représentés (de 1 à 10 cellules sur 1500 PBMC).

III.2. RESULTATS.

III.2.1. Profil de l'expansion clonale dans les différents prélèvements.

L'ensemble de cette étude porte sur l'analyse par IPCR du profil d'intégration de HTLV-1 dans 24 échantillons provenant de 22 ATLL présentant différents sous-types d'ATLL (aiguë, chronique, lymphome et smoldering). Le diagnostic des ATLL est basé sur des données cliniques, les marqueurs de surface et l'observation par blot de Southern d'un profil d'intégration monoclonal de HTLV-1 dans le matériel tumoral. Les patients ont été classés par sous-types en accord avec les critères du groupe d'étude des lymphomes (Shimoyama *et al.*, 1991). Les PBMC de 19 ATLL incluant 9 formes aiguës, 2 chroniques, 7 lymphomes et 2 smoldering ont été analysées. Les prélèvements tumoraux de deux lymphomes et d'une ATLL smoldering ont également été étudiés.

Pour estimer la taille des clones détectés, en terme de nombre de cellules, tous les échantillons ont été analysés, par IPCR, en répétant 4 fois les expériences pour chaque prélèvement. Conformément à l'étude de la sensibilité réalisée sur le plasmide, les clones détectés constamment (4/4) correspondent à des formes majoritaires représentés à plus de 1 cellule sur 150 PBMC. Les clones «minoritaires», détectés moins de 4/4, correspondent à des clones dont la fréquence est supérieure à 1 cellule sur 1500 PBMC. La Figure 11R montre les résultats de l'analyse par IPCR des prélèvements d'un porteur asymptomatique et de deux patients atteints d'ATLL. Le porteur asymptomatique AS6, âgé de 60 ans, est originaire de la Guadeloupe. Le profil d'intégration de HTLV-1 montre la présence de 6 clones de fréquence inférieure à 1/1500 PBMC. Le patient P12 est atteint d'une forme aiguë d'ATLL caractérisée par un nombre élevé de cellules en trèfle circulantes. Une bande majeure de 420 pb correspondant très probablement au clone malin est détectée constamment. Cependant, ce clone est accompagné de 21 autres formes dont la fréquence, estimée par la nature aléatoire de leur détection, est inférieure à 1 cellule sur 150 PBMC. Le patient P17 est atteint d'une forme lymphomateuse d'ATLL avec un profil d'intégration monoclonal observé uniquement sur les prélèvements ganglionnaires par blot de Southern. Le prélèvement analysé par IPCR

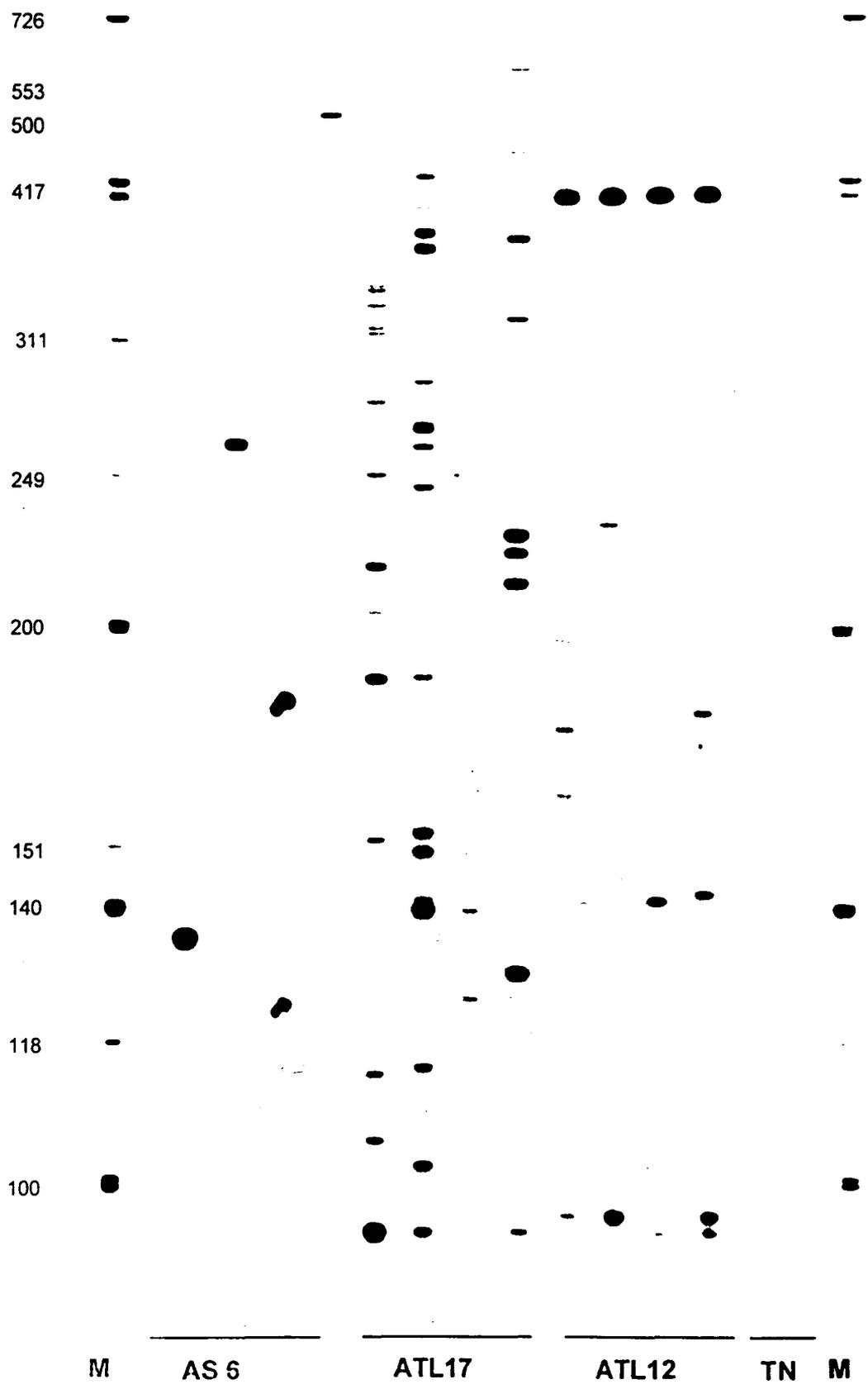


Fig.11R: Amplification par IPCR des sites d'intégration de HTLV-1 chez un porteur asymptomatique (AS6) et deux patients atteints d'ATLL de forme lymphomateuse (P17) ou aiguë (P12).

correspond aux PBMC. L'absence de détection d'un clone majeur peut être imputable à l'absence de site Nla III dans les 500 pb du site d'intégration rendant le clone indétectable par IPCR malgré le nombre important de cellules. En revanche, un grand nombre de formes minoritaires sont mises en évidence. Sur un total de 48 sites d'intégration, quatre sont détectés dans 2 expériences. Les résultats concernant l'ensemble des patients sont représentés Figure 12R.

Pour tous les échantillons de PBMC issus de patients atteints de lymphomes, aucune cellule circulante anormale n'est observée. L'analyse par blot de Southern ne montrait aucun site majeur d'intégration indiquant que les clones sont représentés à moins de 1 cellule sur 20 PBMC. Cependant, comme l'indique la Figure 12R, l'analyse par IPCR de l'ADN extrait de prélèvements de PBMC de 7 patients atteints de forme lymphomateuse d'ATLL révèle la présence de nombreux clones. En effet, de 3 à 71 clones mineurs sont détectés après quatre expériences dans ces prélèvements non tumoraux. D'autre part, tous les prélèvements tumoraux chez lesquels un profil monoclonal d'intégration était observé par blot de Southern, (les PBMC, les deux biopsies de ganglions lymphatiques et un prélèvement de peau des patients atteints respectivement des formes aiguë, lymphomateuse ou smoldering), comportent également un nombre élevé d'autres sites représentés à moins de 1 cellule sur 150 PBMC (Fig. 11R (P12) et Fig. 13R (P25) p87).

Ces formes minoritaires pouvant résulter de réarrangements du site d'intégration du clone malin, la séquence de ces sites a été comparée à celles des clones malins après clonage en phage M13 des produits de l'IPCR. Comme le montre le Tableau 7R, les séquences des sites d'intégration de HTLV-1 des clones mineurs du prélèvement tumoral P25 ne présentent aucune homologie avec la séquence du clone majeur et par conséquent représentent des sites d'intégration indépendants. Les sites d'intégration de trois autres prélèvements analysés par séquençage montrent également que les sites ne sont pas générés par réarrangement du site majeur (I. Leclercq, 1996).

Des clones de cellules infectées ont donc été observés par IPCR dans tous les échantillons d'ATLL qu'ils soient tumoraux ou non. Il existe certaines corrélations entre la

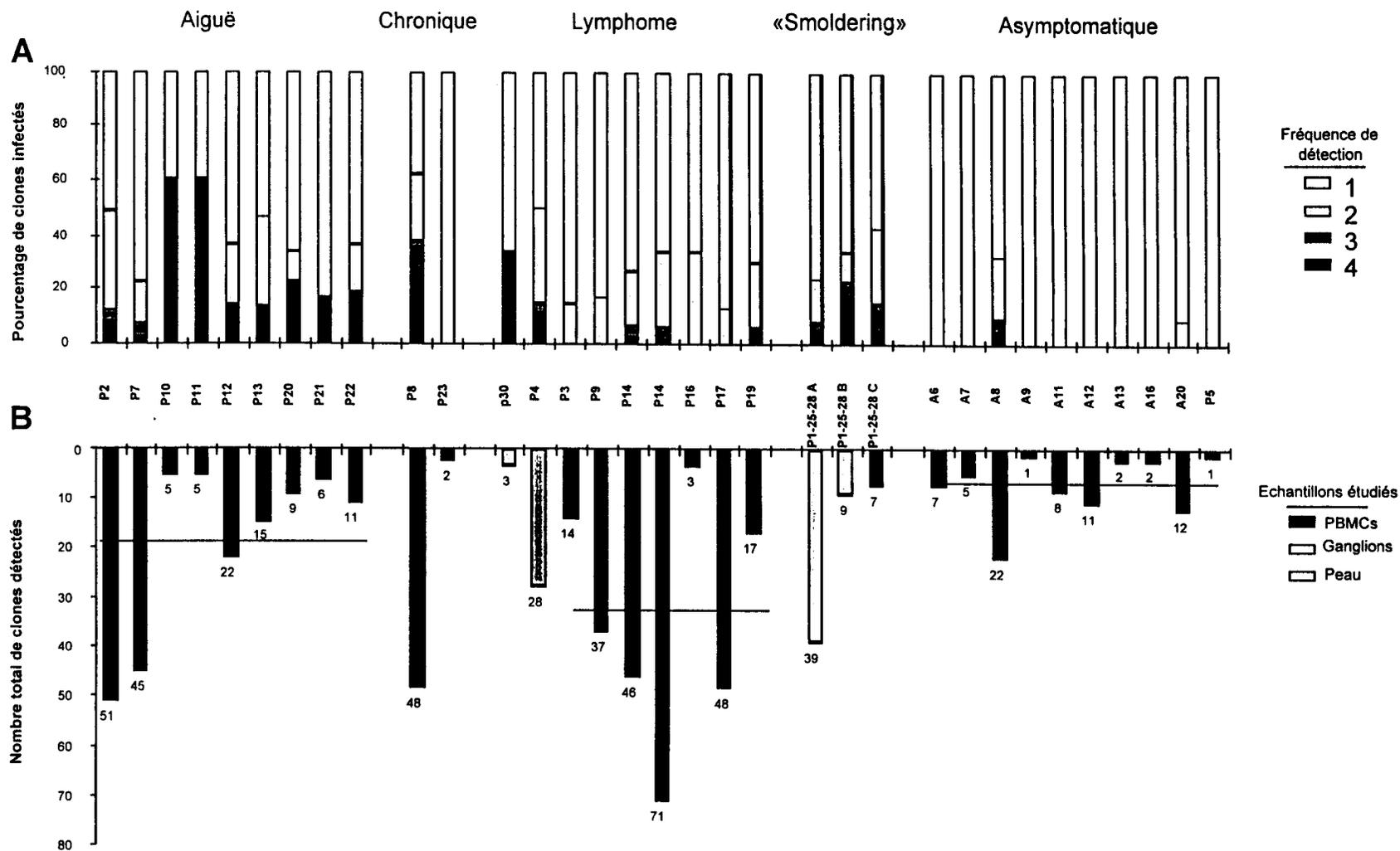


Fig. 12R : Comparaison du nombre et de l'abondance des clones suivant la nature des prélèvements et le sous type clinique des patients.

CLONE	TAILLE	SEQUENCES				
CM	301pb	AGTATATACT	ATTGCATATC	TAGTCAACCT	<u>CCCAAGCAGA</u>	<u>CTTGTGTAAC</u>
		<u>TTTGGAGTAA</u>	ATCACAAAGT	TTAGAAGACT	ACCAGAGACA	CTGCTTATTT
		CTGAGCCCCA	GTTTGAAAAT	GAAAGAAAGT	TTTCTTTTTG	AATTCTAAGA
		AAAAAAAAAA	GCTGAAAAT	GTCCATAGTA	ATTAATAGG	GAAATTTCTT
		TCCACAGTGA	CCTCTAAAT	AACTTCTTGT	ATCTTTAACC	TGTTCTGTTT
		TTGCAATAAC	TTCCATACTG	TCTCTGATTT	TCAAAAAGACC	TAGAGATCAT <u>G</u>
C46	198pb	ACATAGTAGA	TCAGGAAAGA	CTTTCTAATT	GTAGAAAATT	TTGGAAAAG
		TAGAAACCTG	AGATGGAAAG	ATTACTTAAT	AGTATAAGTG	CCAATAATAC
		TTTAAAATCT	CATTAAATAA	TGTCTTTTCA	TCCATTAGAA	ATAATAAGAG
		TCAGGACAGG	CTTGCAGTCT	GGTTAAAAGA	TAGTTATTCT	TAGT <u>CATG</u>
C69	131pb	CCACCCACCT	CAGCCTCCCA	AAGTGTTGGG	ATTACAGGCG	TGACGACCGT
		GCCCTGGCTTG	GACTAATTTA	TTTTTATTTT	CTGTAGAGAC	GATGCCTCCC
		TATTGTTGTC	CAGGCTGGTC	TCTTTCAT	<u>G</u>	
C70	49pb	TAAAGTGTCT	TAAATTTATT	AAATGTTAAG	TGACTTTAGG	CCAGGCATG
C33	28pb	CCTCTCAAGC	ATAAACAAAG	<u>CAAACATG</u>		
C38	21pb	GTTAGGCTCC	<u>AAGAGGGCAT</u>	<u>G</u>		
C64	8pb	<u>GACTCATG</u>				

Tableau 7R : Séquences des sites d'intégration amplifiés par IPCR à partir du prélèvement P25.

clonalité et le statut des patients atteints d'ATLL (Fig. 12R). Après quatre expériences d'IPCR, le nombre moyen de clones dans les PBMC des lymphomes est significativement supérieur à celui des porteurs sains (34 versus 7; $p < 0,01$; Test U de Mann et Whitney). Concernant le nombre de clones majeurs représentés à plus de 1 cellule sur 150 PBMC, il existe également une différence significative entre les porteurs asymptomatiques et les patients atteints de lymphome (2 versus 8; $p = 0,002$, test U de Mann et Whitney).

III.2.2. Analyse des prélèvements issus d'une ATLL smoldering au cours du traitement.

Le patient P25 est atteint d'une ATLL de type smoldering. Les prélèvements de matériel tumoral (P25/A) confirment l'infiltration, dans la peau, de cellules tumorales où une intégration monoclonale du virus est observée par blot de Southern. Après une chimiothérapie locale par caryolysine entraînant une rémission partielle des lésions, une seconde biopsie cutanée fut réalisée (P25/B). Enfin, après 6 cures de chimiothérapie systémique ayant entraîné une rémission complète, un dernier prélèvement sanguin est réalisé (P25/C). La Figure 14R montre l'analyse par IPCR des sites d'intégration de HTLV-1 quatre fois dans les trois prélèvements. Une bande intense de 391 pb observée dans l'échantillon tumoral et correspondant très probablement au clone majeur est observée (P25/A). Parallèlement, 38 bandes dont la détection est moins fréquente (< 1 cellule/150 PBMC) sont observées. Après chimiothérapie locale, le clone majeur reste présent dans la seconde biopsie cutanée. Cependant, il n'est plus représenté qu'à un niveau inférieur à 1 cellule sur 300. Parallèlement à la baisse d'amplitude de ce clone, le nombre de formes minoritaires baisse de façon importante. Enfin, après obtention d'une rémission complète par chimiothérapie systémique, l'analyse des PBMC révèle toujours la présence du clone malin à une fréquence supérieure à 1 cellule sur 150 PBMC. Pour confirmer l'existence dans les PBMC et dans l'infiltration cutanée de cellules issues du même clone, un oligonucléotide complémentaire du site d'intégration a été choisi pour amplifier avec LTR1 ce clone de façon spécifique (Tableau 7R : séquence en gras). L'amplification spécifique d'un fragment de 464 pb dans les prélèvements P25/A et P25/C confirme l'existence de cellules issues du même clone dans la tumeur cutanée et dans le sang.

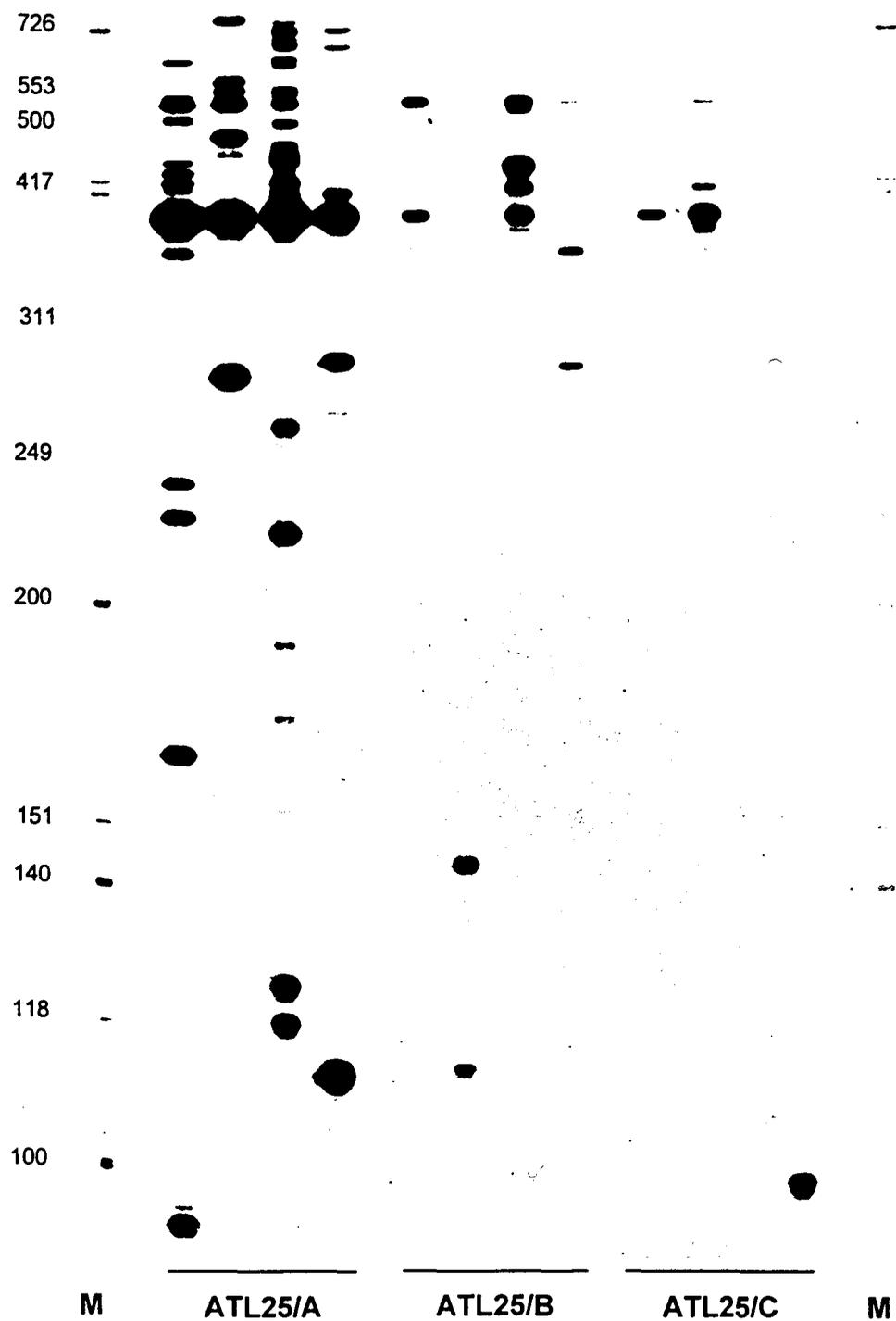


Fig. 13R: Analyse par IP-PCR de 3 prélèvements d'un patient atteint d'une forme aiguë d'ATLL. Biopsie au diagnostic (P25/A), biopsie en cours de traitement (P25/B) et prélèvement sanguin après cures de chimiothérapie (P25/C).

III.3. DISCUSSION.

Les études par IPCR des prélèvements tumoraux de différents types d'ATLL montrent que le ou les clones malins sont accompagnés de formes minoritaires. Les prélèvements non tumoraux comme les PBMC des formes lymphomateuse et smoldering révèlent eux aussi un nombre important de clones minoritaires. La présence de tels clones pourrait être le reflet :

- d'une expansion parallèle de cellules non malignes à l'intérieur du même échantillon,
- de réarrangements du site d'intégration au niveau des 500 pb encadrant le provirus,
- d'une surinfection des cellules tumorales créant ainsi des sous-clones.

Des réarrangements du site d'intégration, observés à faible fréquence chez un porteur asymptomatique (Wattel *et al.*, 1995), n'ont pas été observés après séquençage des sites d'intégration de HTLV-1 dans les échantillons provenant de patients atteints d'ATLL (Tableau 7R). Par conséquent, l'aspect polyclonal de la réplication de HTLV-1, au sein même du matériel tumoral, ne provient pas de réarrangements des sites d'intégration. Bien que la réinfection d'une cellule par un rétrovirus utilisant le même récepteur semble être difficile (Corbin et Sitbon, 1993), un tel mécanisme pourrait expliquer le nombre important de formes minoritaires détectées. Cependant, le mode répliatif de HTLV-1 reposant essentiellement sur l'expansion clonale, cette hypothèse semble peu probable. Finalement, la présence de telles cellules en expansion dans le matériel, tumoral ou non, suggère donc que l'expansion de cellules malignes s'effectue sur un bruit de fond de prolifération polyclonale.

L'analyse des sites d'intégration de HTLV-1 dans une biopsie cutanée montre qu'après chimiothérapie locale le nombre de cellules au sein du clone malin diminue. Cette baisse s'accompagne également d'une diminution du nombre de formes minoritaires. Cette sensibilité des formes polyclonales à un traitement cytotoxique suggère que la réduction de la charge virale pourrait être obtenue à tous les stades de l'infection par un traitement antimittotique.

QUATRIEME PARTIE :

TRANSPORT CELLULAIRE DU VIRUS DANS SYSTEME NERVEUX CENTRAL

IV.1. INTRODUCTION.

La TSP/HAM est une affection neurologique de l'adulte caractérisée par des lésions inflammatoires de la moelle épinière où une démyélinisation progressive et chronique mène à une spasticité des membres inférieurs et des pertes variables de la sensibilité (Höllsberg *et al.*, 1993). Bien que cette affection soit clairement associée à la présence du rétrovirus HTLV-1 (Gessain *et al.*, 1985), les mécanismes étiopathogéniques de la TSP/HAM restent obscurs. Parmi les individus infectés, environ 1% développent cette affection après une latence prolongée (Kaplan *et al.*, 1990). La diversité génétique des isolats ne semble pas être impliquée dans cette affection (Gessain *et al.*, 1989; Daenke *et al.*, 1990; Kinoshita *et al.*, 1991). En revanche, l'importante réponse immunitaire cellulaire et humorale contre HTLV-1 observée chez ces patients suggère l'implication de mécanismes immunologiques dans le développement de la TSP/HAM.

La barrière hématoencéphalique (BHE) ne semble pas altérée au cours de la TSP/HAM (Gessain *et al.*, 1988), pourtant une infiltration de lymphocytes CD4 et CD8 est observée au sein même de la moelle épinière où le virus peut toujours être détecté (Hara *et al.*, 1994; Kubota *et al.*, 1994; Kira *et al.*, 1992). Certains travaux suggèrent une infection directe du tissu nerveux (Lehky *et al.*, 1995). Cependant, d'après Kubota *et al.* (1994), les cellules CD4 présentes dans le LCR constitueraient le réservoir principal du virus dans ce compartiment. La présence de HTLV-1 au sein même des lésions histologiques médullaires de la TSP/HAM indique que la contamination du SNC par le virus semble être indispensable au développement de la TSP/HAM. Cependant, le mode de contamination du SNC par HTLV-1 demeure inconnu.

Parmi les principaux modes de pénétration des virus dans le SNC (Brightman *et al.*, 1995 ; Fazakerley *et al.*, 1993 ; Moresson *et al.*, 1991), résumés dans le Tableau 8R, certains semblent mieux correspondre à la biologie de HTLV-1. Le tropisme *in vivo* de HTLV-1 pour les cellules lymphoïdes suggère un transport du virus au travers de la BHE plutôt qu'un transport le long des cellules nerveuses comme dans le cas des virus de la poliomyélite et de l'herpès. Le franchissement de la BHE par HTLV-1 peut donc être envisagé selon deux scénari :

- l'infection des cellules endothéliales tapissant les capillaires cérébraux suivie d'une infection secondaire de cellules situées dans le SNC,
- un transport proviral de HTLV-1 *via* le passage de la cellule hôte.

Le franchissement de l'épithélium digestif semble s'effectuer par le biais de l'infection des entérocytes par des particules virales libres (Zacharopoulos *et al.*, 1992). Un tel mécanisme pourrait s'appliquer au franchissement de la BHE. Toutefois, un transport proviral de HTLV-1 dans le SNC semble plus probable. En effet, une infection des cellules endothéliales de la BHE, par des particules virales libres, suivie d'une intégration dans les cellules CD4 nécessiterait pour chaque clone du SNC un minimum de 2 évènements réplicatifs par transcription inverse. Un tel mécanisme engendrerait une variabilité significativement plus importante dans le SNC que dans le sang. Deux études ont pourtant montré que la variabilité du virus était la même dans les deux compartiments anatomiques (Kira *et al.*, 1994; Saito *et al.*, 1995). Par conséquent, seul un transport proviral de HTLV-1, suivi d'une expansion clonale des CD4 infectés dans le SNC cadrerait mieux avec ces données. De plus, l'activation des cellules étant indispensable pour traverser la BHE (Hickey *et al.*, 1991), la prolifération des cellules induite par HTLV-1 pourrait permettre au virus d'atteindre, *via* la cellule hôte, le SNC.

Le mode de transport de HTLV-1 dans le SNC a été étudié, chez des patients atteints de TSP/HAM, par comparaison des sites d'intégration du virus dans des échantillons de sang et de LCR prélevés au même moment. HTLV-1 s'intégrant au hasard dans le génome cellulaire, la présence de sites d'intégration communs aux deux compartiments anatomiques démontrerait

formellement l'existence d'un transport cellulaire de HTLV-1, sous forme provirale, dans le SNC.

Voies d'infection du SNC	Exemples
Transport axonal rétrograde	Réovirus, Herpes simplex
Infection du tractus olfactif	Influenza, virus de l'hépatite murine
Infection par le plexus choroïdien	oreillons
Transport par vésicules de pinocytose au travers de l'endothélium capillaire	virus de la forêt de Semliki
Traversée de la BHE via le passage de la cellule infectée	Cytomégalovirus, canine distemper

Tableau 8R : Principales voies d'infection du SNC (*d'après Fazakerley et al.,1993*).

IV.1. RESULTATS.

L'ensemble de cette étude concerne l'analyse des sites d'intégration de HTLV-1 dans des prélèvements de sang et de LCR chez 5 patients atteints de TSP/HAM. Le diagnostic de la TSP/HAM est réalisé selon les critères décrits par *Osame et al.* (1987). Les deux types de prélèvements ont été effectués au même moment chez des patients présentant différents stades de la maladie. Pour éviter les biais relatifs à la contamination sanguine accidentelle du LCR, les échantillons ont été sélectionnés sur la base de ponctions lombaires non traumatiques, ne ramenant au plus que 10 hématies/mm³.

IV.2.1. Recherche de HTLV-1 dans les prélèvements de LCR.

La présence de cellules infectées dans le LCR a été vérifiée dans les prélèvements de LCR de 5 patients par amplification d'une région du gène *tax*. Etant donnée la faible quantité de cellules présentes dans ce type de prélèvement (<10 000 cellules), l'extraction de l'ADN a été réalisée après addition de 0,5 million de cellules non infectées de la lignée Jurkat pour obtenir une quantité d'ADN suffisante pour l'ensemble de cette étude. L'amplification par les amorces SK43 et SK44 a révélé la présence de cellules infectées dans les prélèvements de LCR de tous les patients.

IV.2.2. Expansion clonale dans le LCR.

L'expansion clonale des cellules infectées par HTLV-1 a été étudiée dans le sang et le LCR par la technique de LMPCR chez les 5 patients atteints de TSP/HAM. Dans les PBMC, la caractérisation de l'expansion clonale, en terme de nombre de clones et de leur représentation cellulaire, a été effectuée sur des dilutions au 1/20 dans des cellules Jurkat. Les expériences de LMPCR ont été réalisées sur 0,5 µg d'ADN de ces différents couples de prélèvements dans les conditions classiques. Comme la répétition des expériences permet une meilleure estimation du nombre de clones, les expériences de LMPCR ont été réalisées quatre fois. Les témoins négatifs utilisés correspondent à l'ADN de la lignée Jurkat. La Figure 14R

montre les résultats de l'analyse du profil d'intégration de HTLV-1 dans le LCR et dans le sang. Parallèlement à l'expansion clonale observée dans les prélèvements sanguins, des clones de cellules infectées sont observés dans le LCR. Malgré les facteurs de dilution des cellules, certains sites sont détectés plusieurs fois. Dans le LCR de cette patiente, sur un ensemble de 17 clones, l'un d'entre eux correspond à une forme plus abondante. Les résultats concernant les autres patients sont résumés dans le Tableau 10R. Dans tous les prélèvements de LCR et de sang, des clones de cellules infectées sont observés. Le nombre de clones identifiés ne peut être comparé entre les différents prélèvements puisque les facteurs de dilution des cellules sont différents. Cependant, il apparaît nettement que les cellules du LCR n'appartiennent pas à un unique clone mais à un ensemble de clones.

	LCR	SANG
JAS	5/0*	nd
YAM	17/1	22/2
QUE	7/0	27/5
CEF	25/2	37/13
BOU	18/0	43/9

Tableau 9R : Distribution du nombre de clones dans le sang et le LCR des 5 patients atteints de TSP/HAM.

* nombre total de clones / nombre de clones répétés

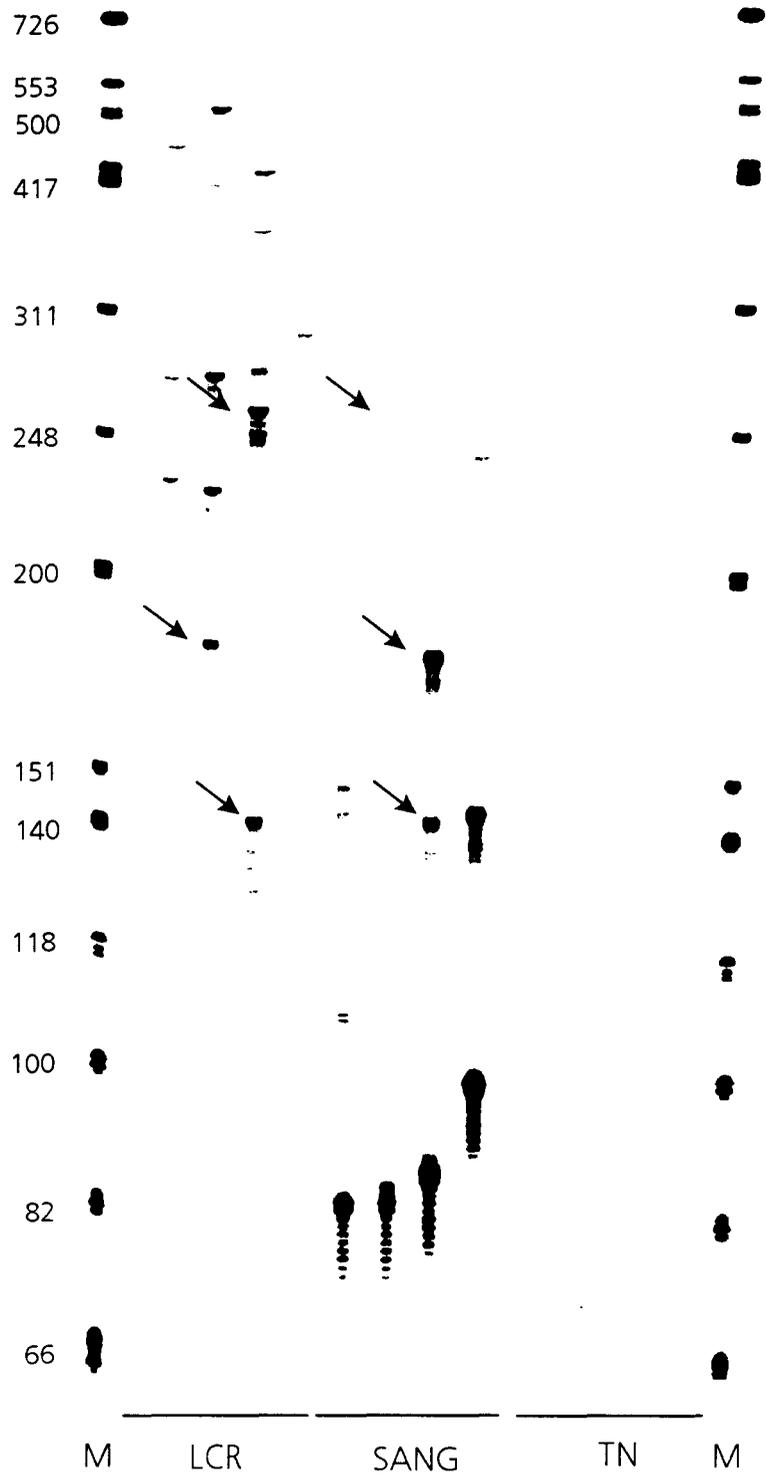


Fig. 14R : Etude de l'expansion clonale dans le LCR et les PBMC prélevés chez le patient YAM.

IV.2.3. Transport cellulaire du virus dans le SNC.

La comparaison des clones identifiés par LMPCR dans le sang et le LCR semble indiquer que des cellules issues des mêmes clones pourraient être présentes dans les deux compartiments (Fig. 14R : Flèches). Cependant, l'amplification des sites d'intégration de HTLV-1 étant soumise à un échantillonnage, tous les clones ne sont pas détectés en une seule réaction. D'autre part, des sites d'intégration présentant la même taille par polymorphisme de longueur peuvent avoir des compositions nucléotidiques différentes (Wattel *et al.*, 1995). C'est pourquoi, comme lors de l'étude de la stabilité des clones, la recherche dans le sang des clones identifiés dans le LCR a été réalisée par PCR avec des jeux d'amorces dont l'une est située dans le LTR 3' et l'autre au niveau du site d'intégration.

Pour choisir des oligonucléotides dans les sites d'intégration du LCR, les produits de PCR exponentielle de la LMPCR ont été séquencés. Le Tableau 10R montre les séquences des sites d'intégration obtenues à partir des prélèvements de LCR du patient YAM. Les oligonucléotides choisis par logiciel PCGENE pour amplifier de façon spécifique ces clones sont soulignés. La recherche des clones identifiés dans le LCR est effectuée par amplification avec les amorces BIO3 et S1e sur 10µl de produits de la PCR *hot start* linéaire avec BIO2 (Figure 15R A). Un *run off* avec l'amorce interne du site d'intégration permet d'analyser les tailles des produits amplifiés par électrophorèse en gel dénaturant. Chaque clone identifié dans le LCR est recherché dans les prélèvements de sang et de LCR. Les témoins négatifs utilisés sont les ADN extraits des cellules Jurkat. La Figure 16R montre les résultats de la recherche de 4 clones identifiés dans le LCR du patient YAM. Les bandes de 142, 149, 210 et 148 pb correspondent aux tailles attendues respectivement pour les clones C277, C285, C286 et C298. Les sites d'intégration des clones C277 et C298, observés dans le sang et le LCR, montrent la présence dans ces deux prélèvements de cellules issues des mêmes clones. Les deux autres C285 et C286 ne sont pas détectés dans le sang pourtant les jeux d'amorces permettent leur amplification dans le LCR. Par conséquent, chez ce patient, 2 clones sur 4 sont simultanément représentés dans le LCR et le sang.

CLONE	TAILLE	SEQUENCES (amorces)
C277	146 pb	<u>CTGCCAGGCT</u> <u>TACCATCTTC</u> <u>TCCCCATTT</u> <u>TTCTTTACTG</u> <u>AGATTTTATC</u> <u>TTCATCACAA</u> <u>ATTAAGTACT</u> <u>ATTCCTTCAA</u> <u>GAAACATACT</u> <u>GGCTTGCTAA</u> <u>ACTTTGCTGT</u> <u>ATCTCTCCCT</u> <u>TCTTAAACTC</u> <u>TTATATCATT</u> <u>CTCATG</u>
C285	321 pb	<u>CAGTATTCCC</u> <u>AGTTAAGAAG</u> <u>GCCAATGGAA</u> <u>CCTGGCGATT</u> <u>CATCCATGAC</u> <u>CTGCGGGCCA</u> <u>CTAACTCTCT</u> <u>AACCATAGAT</u> <u>CTCTCATCAT</u> <u>CTTCCCCCGG</u> <u>GCCCCCTGAC</u> <u>TTGTCCAGCC</u> <u>TGCCAACTAC</u> <u>ACTAGCCCAC</u> <u>TTGCAAATA</u> <u>TAGACCTTAA</u> <u>AGTACGCCTT</u> <u>TTTCCAAATC</u> <u>CCCTTACCTA</u> <u>AACAGTTCCA</u> <u>GCCCTACTTT</u> <u>GCTTCCACTG</u> <u>TCCACAGCAG</u> <u>CGTAACTACG</u> <u>GCCCCGCACT</u> <u>AGATACGCTG</u> <u>GAAGGTACTA</u> <u>CCAGGTAAA</u> <u>TAGTCCACCT</u> <u>GTGGAATGCA</u> <u>GTGGCCATAT</u> <u>CTCGAGCCAT</u> G
C286	195 pb	<u>ATTATTTTTG</u> <u>AGACAGTCTT</u> <u>GCTCTGTCGC</u> <u>TCAGGCTGGA</u> <u>GTGCAGTGGC</u> <u>ACGATGATCT</u> <u>CGGCAGACTG</u> <u>CAACCTCCAC</u> <u>CTCCTGGGTT</u> <u>CAAGCAATTA</u> <u>TCCTGCCTTA</u> <u>GCCCTCTGAG</u> <u>TAGCTGGGGT</u> <u>TATAGGCACG</u> <u>TGCCACCACA</u> <u>TCTGCCTAAT</u> <u>TTTTATATAT</u> <u>TTAGTAGAGA</u> <u>CGGGTTTCA</u> CCATG
C298	148 pb	<u>AATCACAAAT</u> <u>GCAATGAGAG</u> <u>CATCGGAGGC</u> <u>TGCTGTGTAA</u> <u>AAGTGTACAG</u> <u>CCAATACATA</u> <u>TGTAAAAAAG</u> <u>ACAAATTAAT</u> <u>CCTATTCACA</u> <u>GAGTTTATCA</u> <u>TACCAGAGTC</u> <u>AACTACCA</u> <u>TATAATTAAC</u> <u>GCTGACTTTA</u> <u>GCTACATG</u>

Tableau 10R : Séquences des sites d'intégration du LCR du patient YAM.

(les amorces sont soulignées)

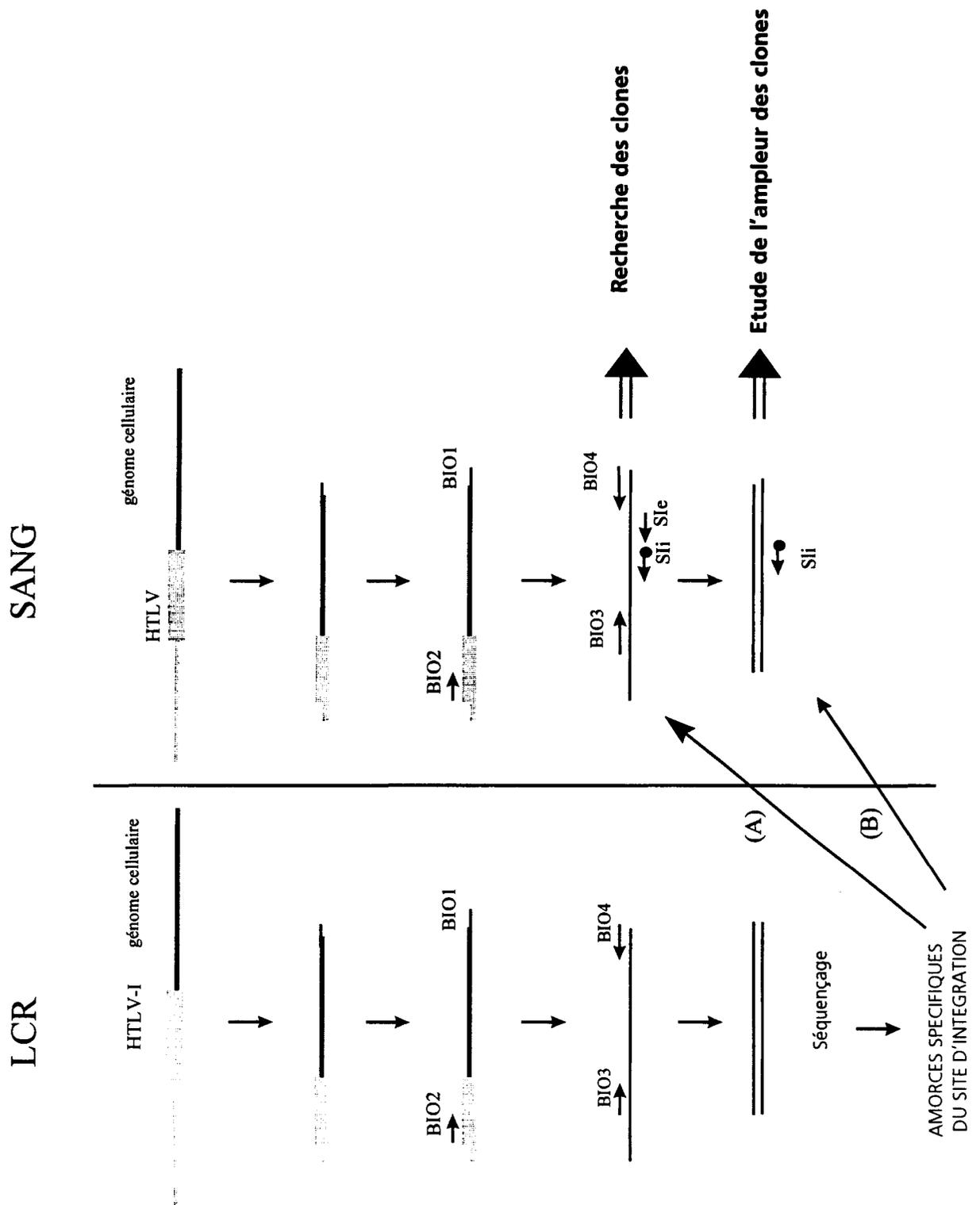


Fig. 15R : Stratégie de recherche, dans le sang, des clones identifiés dans le LCR.

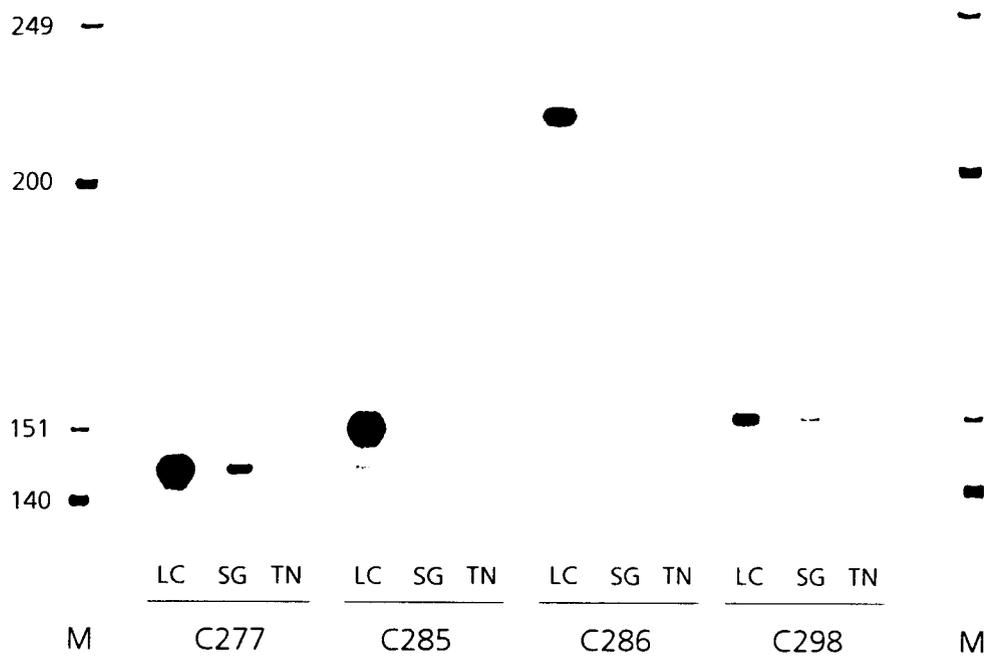


Fig. 16R : Recherche des clones identifiés dans le prélèvement de LCR du patient YAM.

LC : ADN extrait du LCR

SG : ADN extrait du sang.

TN : Témoin négatif (ADN extrait des cellules de la lignée Jurkat).

La même méthodologie a été utilisée pour rechercher des clones communs dans les 4 autres couples de prélèvements. Les résultats sont résumés dans le Tableau 11R (A). Comme le montrent ces expériences pour tous les patients atteints de TSP/HAM, des sites d'intégration identiques ont été observés dans le sang et le LCR pour au moins un clone. Par conséquent, chez tous les patients atteints de TSP/HAM étudiés, des cellules issues des mêmes clones sont observées dans le sang et le LCR. Sur un total de 15 clones, 8 sont observés dans les deux compartiments. Ces résultats démontrent que chez tous les individus étudiés, il existe une diffusion des cellules infectées au travers de la barrière hématoencéphalique pour au moins un clone.

	CLONE	Détection par PCR		Détection par LMPCR	
		LCR (A)	SANG (A)	LCR (B)	SANG (B)
JAS	C317	+	+	1/4	0/4
	C320	+	+	1/4	1/4
	C322	+	-	1/4	1/4
YAM	C277	+	+	1/4	0/4
	C285	+	-	1/4	0/4
	C286	+	-	1/4	0/4
	C298	+	+	1/4	0/4
QUE	C307	+	+	1/4	2/4
	C362	+	-	1/4	0/4
CEF	C1	+	+	nd	nd
	C3	+	-	nd	nd
	C32	+	-	nd	nd
BOU	C18	+	-	nd	nd
	C45	+	+	nd	nd
	C61	+	+	nd	nd



Tableau 11R : Recherche dans le sang des clones identifiés dans le LCR de 5 patients.

(A) : PCR linéaire sur 0,5 µg d'ADN avec BIO2 + PCR exponentielle BIO3 et SIe
+Run off avec SIi

(B) : PCR linéaire sur 0,5 µg d'ADN avec BIO2 + PCR exponentielle BIO3 et BIO4
+Run off avec SIi

IV.2.4. Estimation de l'ampleur des clones dans le sang.

Les résultats précédents démontrent qu'il existe un transport cellulaire du virus au travers de la BHE. Le passage des lymphocytes dans le SNC étant étroitement lié au degré d'activation des cellules, l'ampleur des clones pourrait être déterminante dans ce passage (Hickey *et al.*, 1991).

Etant donnée la grande variabilité de l'ampleur des clones, une estimation de la représentation cellulaire des clones neurotropes circulants a été effectuée chez trois patients. La détection par LMPCR des sites d'intégration est fonction de l'ampleur des clones. Les clones les plus fréquemment identifiés correspondent aux clones les plus représentés. Dans une première étape, l'ADN des PBMC non dilués a été analysé par LMPCR. Pour identifier les clones de façon spécifique, des *run off* ont été réalisés à l'aide d'amorces spécifiques des sites d'intégration (Figure 15R B). Chaque clone identifié dans le LCR a donc été étudié par ce protocole. L'analyse de l'ampleur, dans le compartiment sanguin, des clones identifiés dans le LCR du patient JAS est représentée dans la Figure 17R. La partie A montre l'ensemble des clones puisque les PCR de *run off* sont effectuées avec l'amorce BIO5. Dans l'ADN extrait des prélèvements sanguins non dilués, un site d'intégration d'une taille d'environ 200 pb est détecté 3 fois sur 4. Ce site n'est pourtant pas détecté dans les échantillons de LCR. La partie B montre les résultats après une PCR de *run off* spécifique du clone C320. Ce clone identifié dans le LCR 1/4 est présent dans le sang 1/4. Les résultats concernant l'ensemble des clones, donnés dans le Tableau 11R (B), indiquent que les clones détectés dans le LCR ne correspondent pas aux formes majoritaires dans le sang. Il semble donc que le transport du virus dans le SNC s'effectue indépendamment de l'ampleur des clones circulants.

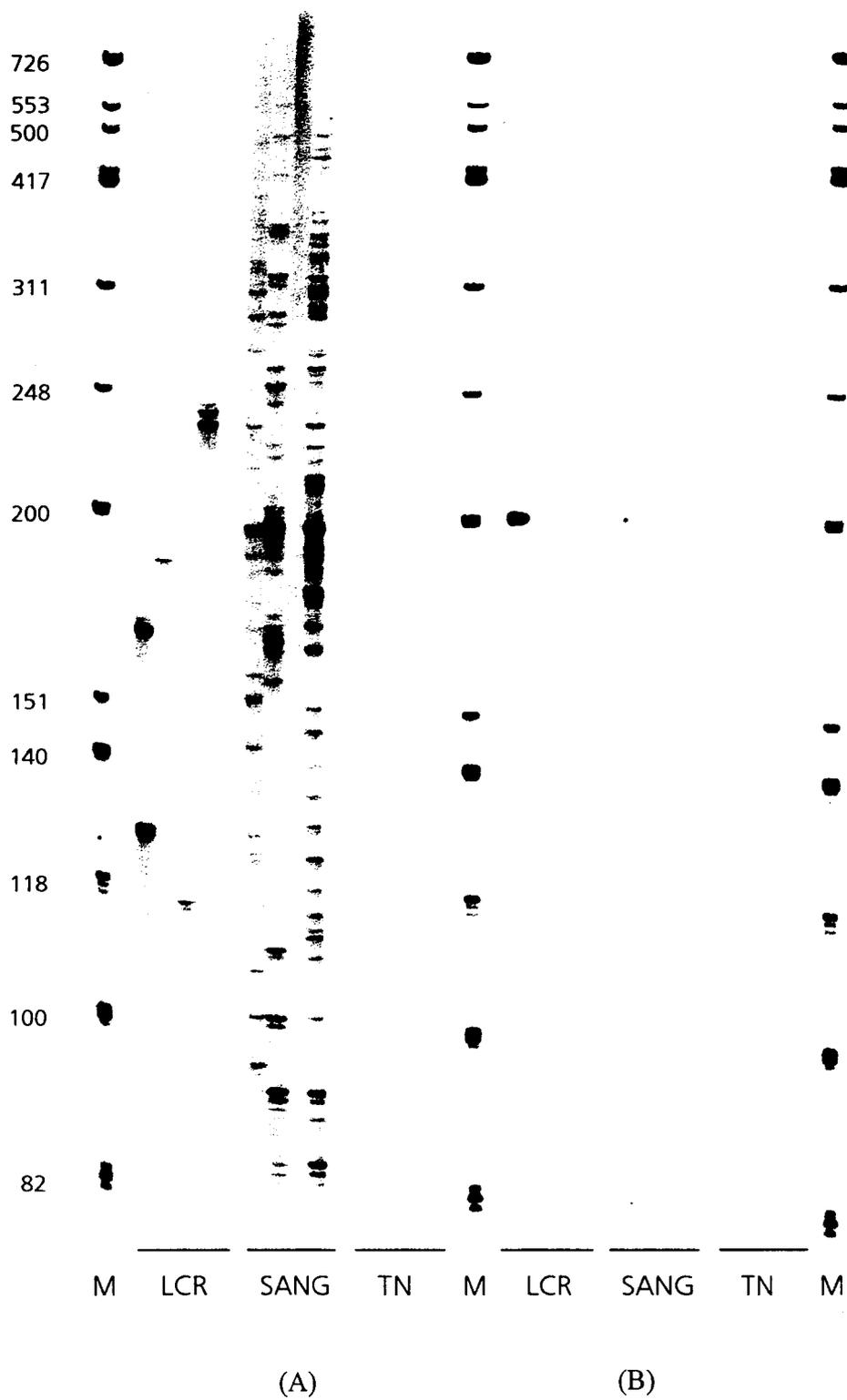


Fig. 17R : Etude des clones détectés par LMPCR dans les prélèvements de sang et de LCR du patient JASM.

(A) *Run off* BIO5.

(B) *Run off* SIi (C320).

IV.3. DISCUSSION.

Ces résultats démontrent l'existence, chez tous les patients atteints de TSP/HAM étudiés, d'un transport cellulaire de HTLV-1 dans le SNC, *via* le passage de la cellule hôte au travers de la barrière hématoencéphalique (BHE). En effet, la comparaison des sites d'intégration de HTLV-1 révèle l'existence de cellules issues des mêmes clones dans le compartiment sanguin et le SNC. HTLV-1 s'intégrant au hasard, ces résultats démontrent qu'il y a eu passage des cellules infectées au travers de la BHE. Sur un total de 15 clones identifiés dans le LCR de 5 patients, 8 clones sont présents dans les deux compartiments. L'absence de détection de certains clones dans les prélèvements sanguins pourrait être expliquée (1) par une instabilité des clones au cours de la TSP/HAM, (2) par l'infection de cellules au sein du LCR, (3) par la présence d'un nombre de cellules circulantes trop faible les détecter. Les études concernant la stabilité des clones, dont l'ampleur est comprise entre 1 et 5 cellules infectées pour 1500 PBMC, indiquent que la majorité (4/5) des clones sont stables sur une période de 11 mois à 5 ans. Bien que certains clones aient pu être éliminés du sang après avoir contaminé le LCR, la disparition de l'ensemble des 7 clones sur 15 semble peu probable. Les clones du LCR non détectés dans le compartiment sanguin pourraient résulter d'une infection de cellules au sein du LCR. Cependant, la variabilité de HTLV-1 dans le LCR, proche de celle observée dans le sang, suggère que le mode de réplication de HTLV-1 dans les deux compartiments est le même (Saito *et al.*, 1996) et repose essentiellement sur une expansion clonale des cellules. Finalement, puisque le passage des cellules au travers de la barrière BHE s'effectue indépendamment de l'ampleur des clones, les clones du LCR pourraient être trop peu représentés dans le sang pour être détectés dans l'équivalent de 75 000 PBMC (0,5µg d'ADN).

Nos résultats indiquent que des clones à faible représentation cellulaire dans le compartiment sanguin (<1/1500 PBMC) peuvent atteindre le LCR alors que des clones plus importants ne sont pas détectés. Ces observations suggèrent que certains clones pourraient présenter des caractéristiques particulières facilitant leur passage au travers de la BHE. Si l'activation de la cellule reste l'élément déterminant dans le franchissement de la BHE, de nombreux autres éléments interviennent lors des phénomènes de diapédèse, notamment l'expression de molécules d'adhésion et la production de cytokines (Hickey *et al.*, 1991). La

présence de molécules d'adhésion à la surface des cellules facilite l'interaction entre des cellules infectées et l'endothélium vasculaire. L'infection par HTLV-1, en induisant l'expression de ces molécules (Mori et al., 1994; Tanaka *et al.*, 1995 et 1996; Tatewaki *et al.*, 1995), pourrait permettre à certains clones d'entrer en contact avec les cellules endothéliales des capillaires cérébraux pour franchir plus facilement la BHE. D'autre part, des cytokines telles que l'IFN γ , le TNF α et l'IL1 α peuvent provoquer une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales activant ainsi localement et transitoirement la BHE (Hickey *et al.*, 1991). La protéine Tax de HTLV-1 est directement impliquée dans la transactivation de IL1 α , TNF α et IFN γ (Giraudon *et al.*, 1995; Tandler *et al.*, 1991; Mori et Prager, 1996). Par conséquent, les clones caractérisés par une importante expression de molécules d'adhésion et de cytokines pourraient franchir plus facilement la BHE.

Sans exclure un franchissement de la BHE *via* l'infection des cellules endothéliales, comme au cours du passage de la barrière digestive (Zacharopoulos *et al.*, 1992), nos résultats suggèrent que la contamination du SNC par transport cellulaire serait présente chez tous les patients atteints de TSP/HAM. Ce transport cellulaire de HTLV-1 existe probablement en phase asymptomatique puisqu'il existe un passage aléatoire physiologique de quelques cellules au travers de la BHE (Hickey *et al.*, 1991). Cependant, l'expression de molécules d'adhésion dans la population CD4 étant supérieure au cours de la TSP/HAM (Dhawan *et al.*, 1993; Ichinose *et al.*, 1992, Ichinose *et al.* 1994; Lal *et al.*, 1992), le passage de cellules pourrait avoir lieu plus fréquemment au cours de la TSP/HAM, multipliant ainsi les risques de réactions inflammatoires au sein du tissu nerveux. En effet, la présence de cellules infectées au sein du SNC pourrait générer les lésions par un *effet bystander* sur les tissus environnants, en provoquant une réponse autoimmune au sein du LCR, ou en infectant les cellules des tissus nerveux (Fig. 18R). L'inhibition du franchissement de la BHE par les cellules infectées pourrait donc avoir un intérêt thérapeutique.

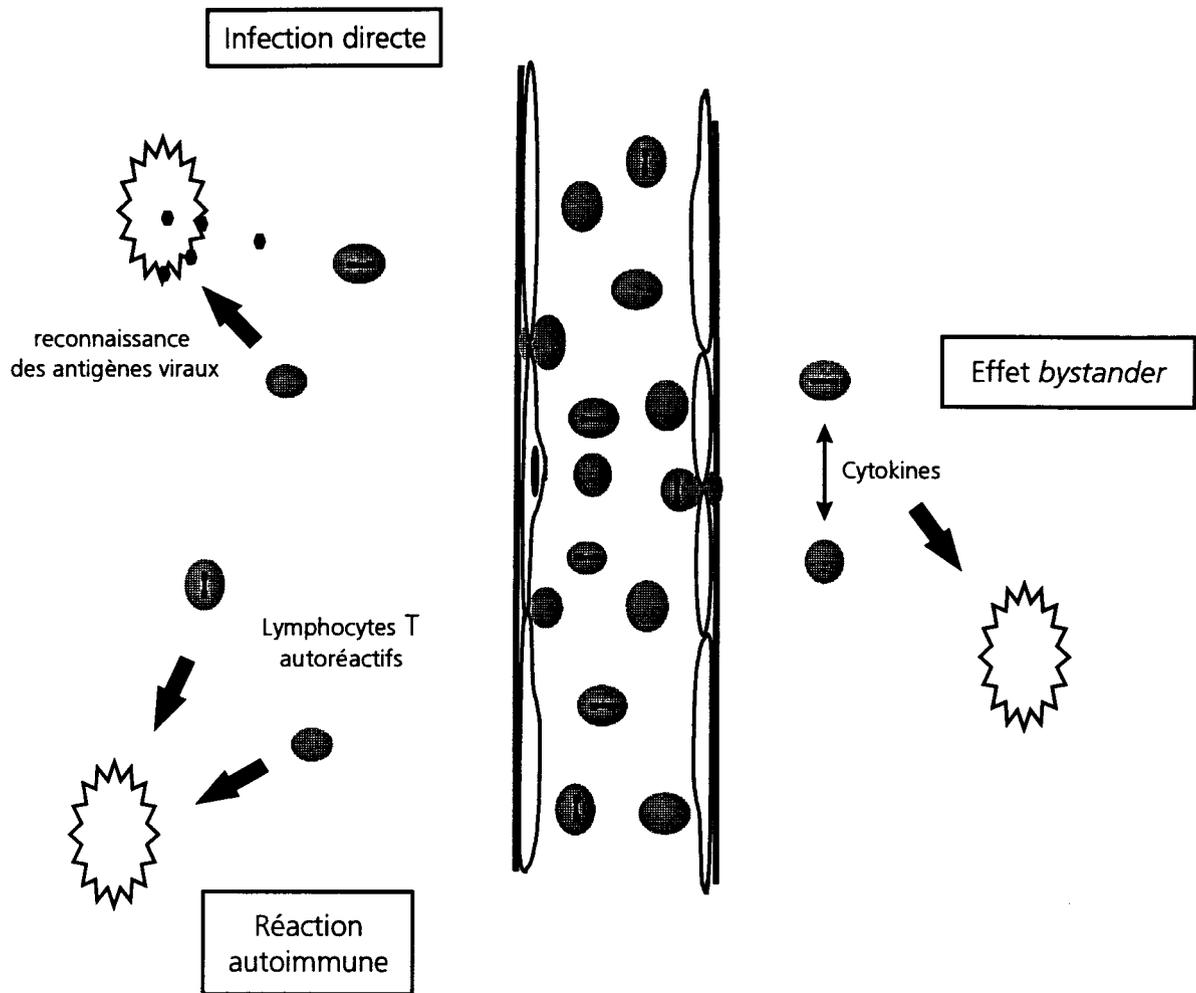


Fig. 18R : Modèles de la genèse des lésions de la TSP/HAM.

CONCLUSIONS

L'analyse des sites d'intégration de HTLV-1 montre que la réplication endogène du virus au travers de la multiplication de la cellule hôte prédomine *in vivo* chez tous les individus infectés. Ce mode de réplication rend compte de la faible variabilité de HTLV-1 observée, *in vivo*, en présence d'une charge virale élevée (Wattel *et al.*, 1995). Après un événement répliatif *via* la transcription inverse, la multiplication de la cellule hôte permet à HTLV-1 d'atteindre cette charge virale élevée avec la fidélité du complexe de l'ADN polymérase. L'expansion clonale des cellules infectées par HTLV-1 résulte de l'activité mitogène et transformante des produits des gènes viraux. Les propriétés transactivatrices de la protéine Tax (Franchini, 1996; Yoshida 1996) ainsi que son action dans les voies signalétiques contrôlant la prolifération (Suzuki *et al.*, 1996) suggèrent qu'elle joue un rôle central dans l'expansion clonale de la cellule infectée et par conséquent dans la réplication de HTLV-1. Ce mode de réplication *via* la mitose cellulaire pourrait avoir été développé suite à l'incapacité de HTLV-1 à produire une haute virémie. En effet, l'organisation génétique de HTLV-1 rend la transcription massive et la production de particules virales mutuellement incompatibles. Les effets négatifs de Rex sur l'expression de la protéine transactivatrice Tax et donc sur l'expression de l'ensemble des ARN, interdit une transcription massive de tous les messagers. A l'opposé, pour le virus HIV dont l'importante réplication s'accompagne d'une forte instabilité génétique, les effets de Rev sont plus mitigés. Une protéine Tat plus petite peut être codée par des messagers où seuls les deux premiers exons sont épissés assurant ainsi, grâce à la transcription massive du génome viral, une importante production virale. L'organisation génétique de ces rétrovirus influence donc, au travers de leur mode de réplication, leur stabilité génétique. Les similitudes entre HTLV-1 et les autres virus de la famille des oncornavirus suggèrent que la réplication au travers de la multiplication de la cellule hôte pourrait être généralisée à l'ensemble de ces rétrovirus. Récemment, Cimarelli *et al.* (1996) ont d'ailleurs montré l'existence d'une expansion clonale en phase asymptomatique chez des sujets infectés par HTLV-2 et présentant une haute charge virale.

L'étude de l'expansion clonale des cellules infectées dans les différentes conditions liées à l'infection et dans les divers prélèvements démontre que ce mode de réplication à l'état proviral est fortement impliqué dans la pathogénèse de HTLV-1. L'ATLL étant une affection clonale se développant chez une minorité d'individus, la mise en évidence d'une expansion

clonale des cellules infectées chez les porteurs asymptomatiques indique que le stade latent de l'infection peut être assimilé à un état pré-leucémique à faible taux de transformation. La croissance d'un clone malin sur un bruit de fond de prolifération polyclonale suggère que des évènements génétiques secondaires sont nécessaires au développement de l'ATLL. L'instabilité génétique des cellules générée par l'expansion chronique et prolongée des cellules infectées, aggravée par une probable baisse de l'activité correctrice d'erreur (Jeang et al., 1990), pourrait prédisposer la cellule à l'acquisition de dommages génétiques concernant les gènes cellulaires ou le provirus lui-même. Ces anomalies génétiques, comme les mutations du gène p53 déjà décrites dans les cellules néoplasiques (Cesaram *et al.*, 1992; Sakashita *et al.*, 1992), pourraient prendre place durant la phase asymptomatique. L'analyse de l'ampleur des clones montre une accumulation des cellules infectées par expansion clonale au cours de cette première étape de l'infection. La latence prolongée de l'ATLL pourrait correspondre au délai nécessaire à l'obtention d'une quantité critique de cellules. Le fait que de tels clones puissent proliférer face à l'importante réponse immunitaire qui caractérise l'infection par HTLV-1 pourrait être la conséquence de mutations et/ou de délétions rendant les cellules infectées moins vulnérables au système immunitaire (Niewiesk *et al.*, 1995). La baisse de vigilance du système immunitaire chez les individus plus âgés pourrait laisser échapper certains clones.

Si l'implication de l'expansion clonale des cellules dans une pathologie maligne s'inscrit aisément dans le schéma classique de la genèse d'un cancer, la prolifération des cellules infectées peut également avoir de fortes répercussions dans une maladie inflammatoire comme la TSP/HAM. La comparaison des sites d'intégration de HTLV-1 dans le sang et le LCR démontre qu'il existe un transport cellulaire de HTLV-1 à l'état de provirus dans le système nerveux central (SNC) chez tous les patients atteints de TSP/HAM étudiés. Comme l'activation des cellules est requise pour le passage de la barrière hématoencéphalique, la prolifération de la cellule hôte permet au virus d'atteindre le SNC, étape indispensable au développement de cette affection neurologique. La présence de cellules infectées au sein du SNC pourrait avoir un rôle initiateur dans la genèse des lésions en générant une réponse immune dans cet organe normalement isolé sur le plan immunologique (Streilien *et al.*, 1993). L'association de plusieurs facteurs comme l'activation des cellules, l'expression de molécules d'adhésion et/ou la réponse du système immunitaire pourrait expliquer que la TSP/HAM ne se

développe que chez une minorité d'individus. La prolifération des cellules infectées pourrait également être impliquée dans les autres affections associées à HTLV-1. Le passage de cellules infectées dans des sites anatomiques comme le liquide articulaire ou l'humeur vitrée pourrait déclencher une réaction inflammatoire. Une expansion clonale de cellules infectées au sein du liquide articulaire chez des patients atteints d'arthropathie inflammatoire a d'ailleurs été décrite (Yamamoto *et al.*, 1995).

Le mode de réplication de HTLV-1 reposant essentiellement sur la mitose cellulaire, un traitement cytostatique pourrait fortement réduire l'expansion des cellules infectées. L'étude de la maladie résiduelle chez un patient atteint d'une forme smoldering d'ATLL indique que ce type de traitement peut fortement réduire la prolifération des cellules malignes ou bénignes. Une charge provirale élevée étant constamment associée aux affections liées à HTLV-1, l'utilisation de drogues anti-mitotiques pourrait être envisagée dans le traitement de ces pathologies.

PERSPECTIVES

ETUDE DE L'INTENSITE DE LA PROLIFERATION DES CELLULES IN VIVO.

Nos résultats démontrent l'existence d'une expansion chronique et prolongée des cellules infectées chez les individus en l'absence de malignité. La présence de clones de plus grande amplitude dans les prélèvements de patients atteints de TSP/HAM suggère que la prolifération des cellules serait plus intense au cours de cette affection neurologique qu'au cours de la phase asymptomatique de l'infection. Cependant, les clones observés *in vivo* étant le résultat d'une balance entre la prolifération des cellules infectées et leur destruction par le système immunitaire, l'étude de la clonalité par amplification des sites d'intégration ne donne qu'une indication partielle sur l'intensité de cette prolifération. Certes, la réponse immunitaire globale et la prolifération des cellules étudiée *in vitro* semblent plus importantes au cours de la TSP/HAM. Cependant, ce sujet fait toujours l'objet de controverses (Daenke et al., 1996; Jacobson, 1996). Une étude *in vivo* de l'intensité de la prolifération des cellules chez des individus infectés asymptomatiques ou atteints de TSP/HAM pourrait révéler des différences importantes dans la magnitude de cette prolifération. Récemment, Weng *et al.* (1995) ont décrit une technique d'étude de la prolifération *in vivo* par analyse des séquences télomériques dans les prélèvements. Les télomères sont des structures chromosomiques terminales dont la longueur décroît avec le nombre de divisions cellulaires. Une étude comparative, par blot de Southern, de la taille des télomères dans les populations lymphocytaires chez des patients atteints de TSP/HAM, des porteurs asymptomatiques et des individus séronégatifs pourrait donner des indications sur l'histoire répliquative de ces cellules dans les différentes conditions liées à l'infection.

FIDELITE DE LA TRANSCRIPTASE INVERSE DE HTLV-1 IN VIVO.

Le taux d'erreur induit par la transcriptase inverse de HTLV-1 n'a pu être caractérisé en raison des difficultés rencontrées pour obtenir un clone moléculaire infectieux ou une quantité suffisante de protéine par génie génétique. La fidélité de la transcriptase inverse du BLV, proche cousin de HTLV-1, semble néanmoins indiquer que le taux d'erreur des polymérases des oncornavirus serait assez proche de celui des autres rétrovirus. L'étude de la variabilité génétique de HTLV-1 *in vivo* indique pourtant un taux de mutation très inférieur à celui des

autres rétrovirus. Cette différence est expliquée par le mode de réplication particulier de HTLV-1 qui repose en priorité sur l'expansion clonale endogène de HTLV-1 à l'état proviral. Après un évènement réplcatif via l'infection, la rétrotranscription et l'intégration dans le génome de la cellule hôte, la mitose cellulaire permet à HTLV-1 d'accroître sa charge virale avec le taux de fidélité du complexe de l'ADN polymérase cellulaire. Les travaux réalisés jusqu'à présent ne tenant pas compte de cette caractéristique sous-estiment très certainement le nombre d'erreurs générées lors de la rétrotranscription. L'étude de la variabilité génétique entre les clones permettrait de mieux approcher le taux de fidélité, *in vivo*, de la transcriptase inverse de HTLV-1. L'amplification spécifique de la région *tax* pour chaque clone pourrait être réalisée en utilisant des couples d'amorces dont l'une serait située en 5' de *tax* et l'autre au niveau du site d'intégration en 3' du provirus.

ETUDE DES SEQUENCES DES SITES D'INTEGRATION DE HTLV-1 *IN VIVO*.

Bien que le rétrovirus HTLV-1 semble s'intégrer au hasard dans le génome cellulaire, plusieurs travaux suggèrent que certaines zones du génome seraient des cibles privilégiées, notamment les zones transcriptionnellement actives ou celles dont la composition nucléotidique se rapprochent le plus de celle du virus (Bernardi *et al.*, 1985; Zoubak *et al.*, 1994). L'analyse préliminaire de 200 séquences semble indiquer que HTLV-1 s'intègre préférentiellement dans des zones riches en A/T. Cependant, les techniques d'étude des sites d'intégration, basées sur la PCR et nécessitant la présence d'un site CATG, pourraient introduire des biais dans la composition de ces séquences. Par conséquent, le traitement de ces données implique la construction d'un témoin artificiel permettant l'étude de la composition du génome humain dans des conditions expérimentales identiques. Ce témoin peut être construit par ligation de fragments d'ADN résultant d'une hydrolyse aléatoire d'ADN génomique à un fragment de LTR 3'. Par cette stratégie expérimentale, la composition des sites d'intégration de HTLV-1 pourrait être comparée globalement ou en fonction des positions à celle du témoin. Par ailleurs, l'alignement de l'ensemble de ces séquences sur des banques d'expression pourrait révéler s'il existe une intégration préférentielle de HTLV-1, *in vivo*, dans des zones transcriptionnellement actives.

DETECTION ET QUANTIFICATION DE LA MALADIE RESIDUELLE.

Une rémission complète est obtenue chez environ 50% des patients atteints d'ATLL. Ces rémissions sont souvent de courte durée et les éléments permettant de prévoir la survenue d'une rechute sont peu nombreux. Un suivi de la maladie résiduelle des patients pourrait permettre une meilleure compréhension de l'action des traitements et prévoir d'éventuelles rechutes. L'étude préliminaire réalisée sur différents prélèvements du patient P25 indique que l'analyse des sites d'intégration de HTLV-1 par IPCR peut être utilisée comme un indicateur de l'ampleur des clones. Une meilleure estimation du nombre de cellules malignes résiduelles pourrait cependant être obtenue par amplification classique dont la sensibilité est meilleure. Après séquençage des sites d'intégration de HTLV-1 dans les cellules malignes, un oligonucléotide spécifique pourrait être choisi pour amplifier et quantifier spécifiquement avec une amorce située dans le LTR 3' les clones malins.

MATERIELS et METHODES

I. MATERIELS.

I.1. PRELEVEMENTS.

Les échantillons sanguins des individus asymptomatiques proviennent de donneurs de sang :

- du Centre de transfusion Sanguine de Pointe-à-Pitre
- du Centre de Transfusion Sanguine de l'hôpital Saint Antoine de Paris

Les données concernant ces porteurs sains sont résumées dans le Tableau 3R (p58).

Les prélèvements de patients atteints d'ATLL et de TSP/HAM proviennent du Laboratoire d'Epidémiologie des Rétrovirus Oncogènes de l'Institut Pasteur (Paris) et du laboratoire de Biologie du CHRU de Fort de France.

I.2. LIGNEES.

Les lignées cellulaires utilisées dans cette étude sont représentées dans le Tableau 1M. Les lignées BOUL, CORD et BILL ont été établies par Antoine Gessain à partir de patients atteints de TSP/HAM ou d'ATLL. Les lignées non infectées par HTLV-I: CEM, HL60 et Jurkat, sont utilisées comme témoins négatifs.

LIGNEES CELLULAIRES	PATHOLOGIE D'ORIGINE
cellules infectées par HTLV-I	
BILL	ATLL
BOUL	TSP/HAM
CORD	TSP/HAM
MT4	
cellules non infectées	
CEM	Leucémie Aiguë Lymphoblastique
HL60	Leucémie Promyélocytaire
Jurkat	Leucémie Aiguë

Tableau 1M : Lignées cellulaires utilisées.

I.3. PHAGES M13mp18 ET SOUCHE BACTERIENNE XL1.

La souche bactérienne XL1 (Stratagene), de phénotype : *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZdeltaM15 Tn10 (Tet r) Amy Cam r]* est utilisée pour les transfection et la culture du phage M13mp18.

Le cycle répliatif de M13mp18 passe par un intermédiaire ADN double brin dans la bactérie, alors qu'il est produit sous forme de particules phagiques avec un génome d'ADN simple brin circulaire. Cet ADN simple brin, aisément isolable du surnageant de cultures bactériennes, rend plus facile le séquençage des inserts.

L'insertion de l'ADN s'effectue dans le site multiple de clonage, au niveau du gène codant le peptide α de la β -galactosidase de l'opéron lactose contrôlé par un promoteur inducible par l'IPTG (Isopropyl - β -D- thio-galactopyranoside). Les bactéries XL1 délétées de ce fragment ne peuvent exprimer une activité β -galactosidase que par α complémentation. Seules les bactéries infectées par un phage M13 non recombinant expriment le peptide α et donc une activité β galactosidase. Après croissance dans un milieu contenant l'IPTG et un substrat de la β galactosidase, le X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) les plages de lyse pourront être sélectionnées par leur couleur. En effet, le dérivé métabolisé du X-gal étant de couleur bleue, les plages de lyse formées par les phages sauvages seront bleues. En revanche, les phages recombinants donneront naissance à des plages de lyse non colorées.

I.4. PLASMIDE HTLV-I.

La séquence provirale entière, encadrée des sites d'intégration d'origine cellulaire, a été clonée dans le plasmide pBR327 à partir de la lignée 2060. La carte de restriction de ce plasmide est représentée dans la Figure 1M (Nicot *et al.*, 1993).

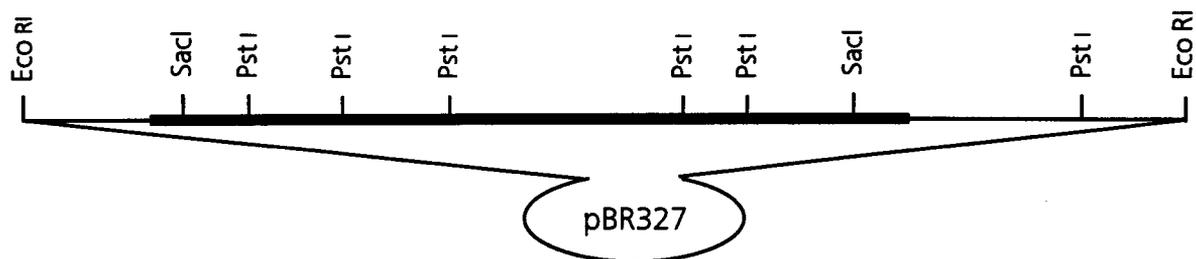


Figure 1M : Carte de restriction du plasmide p4.39.

II. METHODES.

II.1. CULTURE CELLULAIRE.

Les lignées hématopoïétiques comme la CEM, HL60, Jurkat et MT4, sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 (Gibco BRL) enrichi à 10% de serum de veau foetal (Boehringer), à 37°C dans une atmosphère humide à teneur en CO₂ de 5 %. Les lignées BOUL, CORD et BILL, dépendantes de l'IL2, sont cultivées dans les mêmes conditions avec concentration finale en IL2 de 20 U/ml (Boehringer).

II.2. EXTRACTION DE L'ADN.

L'extraction de l'ADN des lignées cellulaires est effectuée après lavage des cellules dans un tampon PBS 1X. Concernant les prélèvements sanguins et médullaires, une centrifugation sur coussin de ficoll va permettre la purification des PBMC. Les culots cellulaires sont ensuite soumis à une digestion par la protéinase K (100 µg/ml) dans un tampon de lyse pendant une nuit à 42°C. Après purification de l'ADN par extraction volume à volume au phénol (2 fois), au phénol/chloroforme (1/1) et au chloroforme, l'ADN est précipité par deux volumes d'éthanol absolu et 1/10 de volume d'acétate de sodium 3 M. Après une centrifugation à 4°C, de 30 min à 12000 g, le culot est lavé à l'éthanol 70°, séché

sous vide et repris dans une solution de TE 1X. L'ADN est dosé par spectrophotométrie à 260 nm.

II.3. AMPLIFICATIONS.

II.3.1. PCR "classiques".

Les amplifications classiques sont réalisées sur une quantité d'ADN comprise entre 0,5 et 1 µg dans un volume réactionnel de 100 µl recouvert par 30 µl d'huile minérale (Sigma). 20 à 50 pmol d'amorces sont utilisées pour chaque réaction. Les concentrations finales de chaque dNTP (Pharmacia) sont de 200 µM. Les DNA polymérases thermostables utilisées sont la Taq Cetus (Perkin Elmer) ou la Taq Appligène avec leur tampon respectif. Les conditions d'amplification sont optimisées en utilisant des gammes de concentrations finales en MgCl₂ de 1mM à 5mM et en dNTP de 50µM à 500µM. Le nombre de cycles réalisés varie de 30 à 40 avec une température d'hybridation (T_m) préconisée par le fabricant d'oligonucléotides (Bioprobe). Généralement, les paramètres utilisés sont : 95°C 10 min, 30 à 40 fois (95°C 1 min, 55°C à 65°C 1 min, 72°C 1 min), 72°C 10 min.

Les PCR internes sont réalisées dans les mêmes conditions en amplifiant 10 µl de la première réaction de PCR.

II.3.2. Amplification des sites d'intégration.

Le problème posé par l'amplification des sites d'intégration de HTLV-I réside dans le fait que seule une extrémité de la région à amplifier, le LTR, est connue. C'est pourquoi, la stratégie expérimentale utilisée fait intervenir la ligation de séquences connues au niveau d'un site de restriction fréquent situé dans le site d'intégration de HTLV-I. Deux techniques, la PCR avec ligation d'un oligonucléotide (LMPCR) - au cours de laquelle, un oligonucléotide est ligaturé dans le site de restriction - et la PCR inverse (IPCR) - dans laquelle les fragments d'ADN digéré sont circularisés - ont été développées (Fig. 2M et 3M).

L'enzyme de restriction NlaIII a été choisie en raison des quatre avantages que présente son utilisation :

- Reconnaissant une séquence de 4 pb, NlaIII hydrolyse fréquemment l'ADN et permet de générer des fragments de tailles faciles à amplifier.

- L'hydrolyse de l'ADN par NlaIII génère une extrémité 3' protrusive de 4 bases facilitant la circularisation des fragments ou la ligation d'un oligonucléotide.

- Le LTR 5' du provirus, identique en séquence au LTR 3' pourrait générer une bande de 530 pb correspondant à la séquence de gag. Cependant, la PCR sélectionnant les petits fragments au détriment des plus grands, le LTR 5' ne devrait pas modifier sensiblement le rendement de l'amplification.

- La séquence du provirus HTLV-I se terminant par CA, une bande est générée systématiquement lorsque HTLV-I s'intègre à côté d'un TG. Ces clones artificiels nommés "clones TG" correspondent en fait à un ensemble de sites d'intégration commençant par TG et peuvent servir de témoins internes d'amplification.

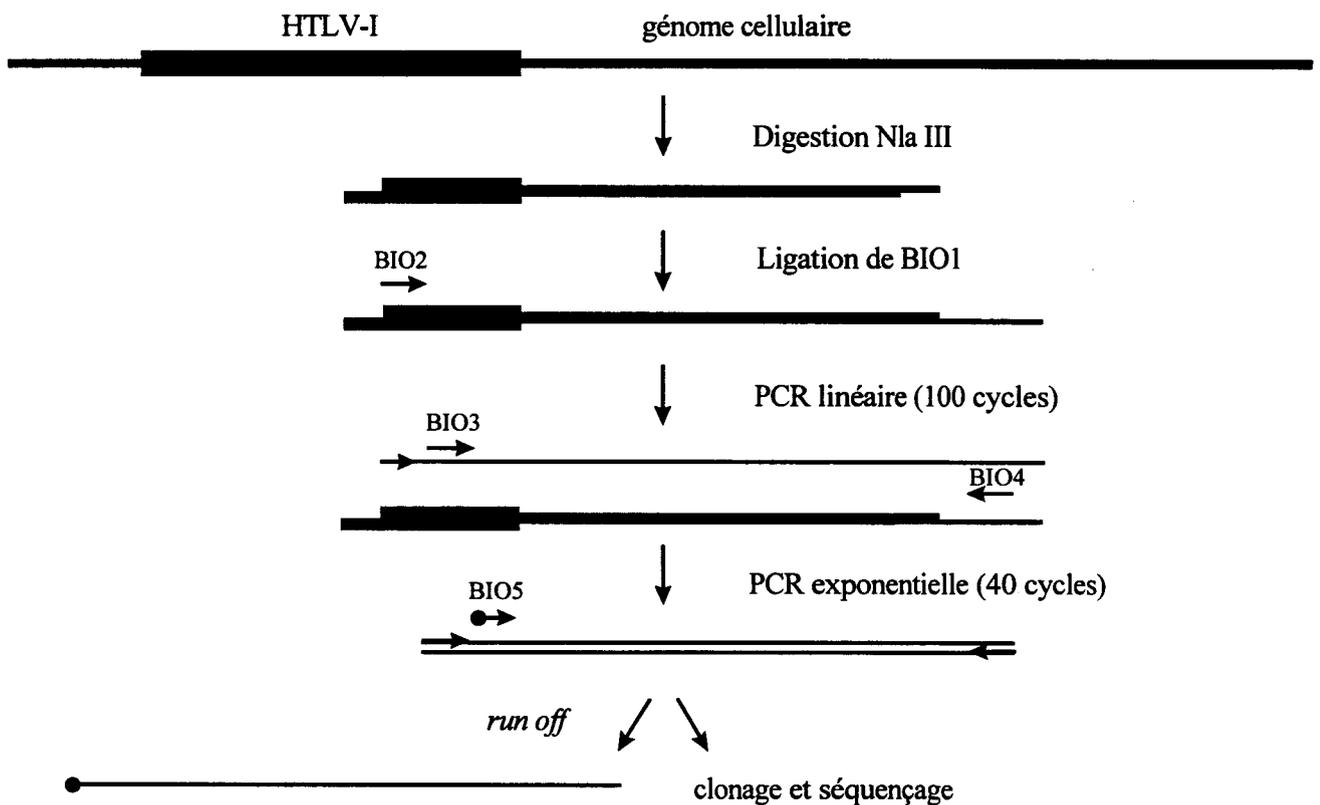


Fig. 2M : Amplification des sites d'intégration par LMPCR

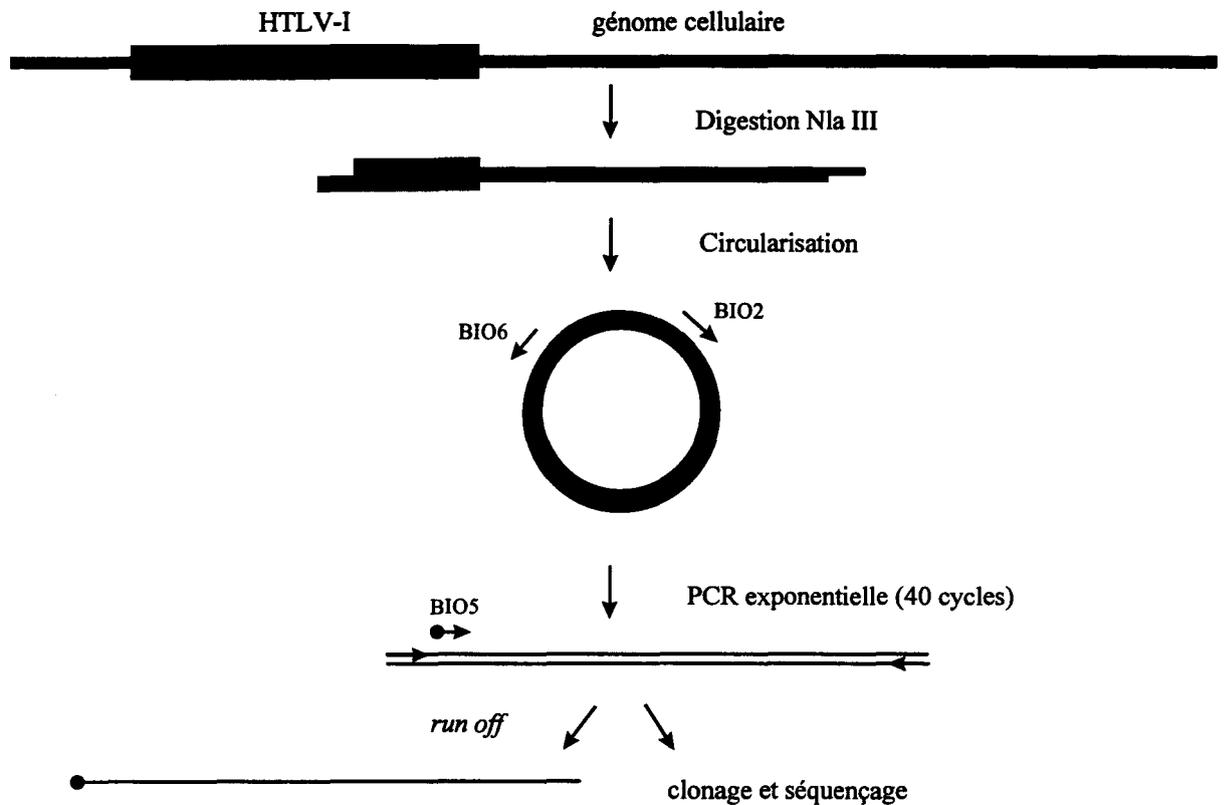


Fig. 3M : Amplification des sites d'intégration par IPCR.

II.3.2.1. PCR avec ligation d'un oligonucléotide (LMPCR).

La LMPCR, dont les étapes sont décrites Fig. 2M, consiste en une digestion de l'ADN génomique par l'enzyme de restriction NlaIII, reconnaissant la séquence : CATG. Par la suite, la ligation de l'oligonucléotide BIO1 au niveau du site de restriction va permettre l'amplification du site d'intégration.

Sur le plan pratique, 2 µg d'ADN génomique sont digérés par 10 U de NlaIII (Biolabs) dans un volume réactionnel de 50 µl (50 mM Acétate de Potassium; 20 mM Acétate de Tris; 10 mM Acétate de Magnésium et 1 mM DTT (pH 7,9)) pendant 3 heures à 37°C. La digestion est vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose 1%. Une purification de l'ADN par deux extractions au phénol/chloroforme (1/1) et une extraction au chloroforme précède la précipitation des produits de digestion par 2,5 volumes d'éthanol absolu et 1/10 d'acétate

d'ammonium 3 M. Après une centrifugation à 12 000 g à 4°C pendant 30 minutes, le culot est lavé par de l'éthanol 70°, séché et repris dans de l'eau.

15 pmol de l'oligonucléotide BIO1, dont l'extrémité 3' est complémentaire des 4 bases protrusives du site de restriction, sont liguées à 1 µg des produits de digestion de l'ADN génomique 16h à 14°C par l'action de 20 U de ligase (Pharmacia) dans un volume réactionnel de 40µl (50 mM Tris-HCl (pH7,8); 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM ATP; BSA 50 µg/ml). Les produits de ligation sont purifiés, précipités et repris dans de l'eau.

Une PCR *hot start* de 100 cycles est réalisée sur l'équivalent de 0,5 µg de produits de ligation à l'aide de 10 pmol de l'amorce BIO2, située dans U5 (Tableau 1M) et du fragment Stoffel de la Taq polymérase (Perkin Elmer). Les conditions d'amplification ont été optimisées en utilisant des gammes de dNTP et de MgCl₂. Dans un premier temps, 25 µl du mélange réactionnel (1,5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 10 mM Tris-HCl (pH8,3)) contenant 10 pmol de BIO2 et chaque dNTP à une concentration de 500 µM sont placés dans un tube eppendorf de 750 µl sous une bille de paraffine (Ampliwax, Perkin Elmer). Une incubation de 8 min à 79°C puis 13 min à 15°C permet l'isolement de la phase inférieure. Sur cette phase, sont déposés 60 µl d'une solution (1,5 mM MgCl₂; 10 mM KCl; 10 mM Tris-HCl (pH8,3)) contenant 0,5 µg de produits de ligation et 10 U du fragment stoffel de Taq polymérase. Les paramètres d'amplification sont : 95°C 10 min, 100 fois (95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 2 min), 72°C 10 min.

10 µl de cette réaction sont utilisés pour une amplification exponentielle de 40 cycles utilisant BIO3, une amorce située en 3' de BIO2 et BIO4, colinéaire à BIO1. Cette amplification est effectuée sur un volume final de 100 µl de tampon (10 mM Tris-HCl (pH9); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,1% Triton X 100; BSA 0,2 mg/ml) avec 50 pmol de chaque amorce, une concentration finale de chaque dNTP de 200 µM et 2 U de Taq polymérase (Appligène). Les conditions d'amplification sont : 95°C 10 min, 40 fois (95°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 1 min), 72°C 10 min.

II.3.2.2. PCR Inverse : *Inverse PCR (IPCR)*.

L'IPCR débute également par une digestion enzymatique de l'ADN génomique par NlaIII. Cependant, les fragments de digestion sont circularisés pour permettre l'amplification du site d'intégration (Fig. 3M).

Concrètement, la circularisation de 1 µg de fragments de digestion s'effectue par leur incubation 16h à 14°C dans un volume réactionnel de 600 µl (50 mM Tris-HCl (pH7,8); 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM ATP; BSA 50 µg/ml) contenant 20 U de ligase (Pharmacia). Après purification et précipitation, les produits de circularisation sont amplifiés à l'aide d'un couple d'amorces BIO2 et BIO6, situées dans le LTR. L'amplification s'effectue sur l'équivalent de 0,5 µg de fragments d'ADN circularisés avec 50 pmol de chaque amorce, une concentration finale de 200 µM de chaque dNTP et 2 U de Taq polymérase dans 100 µl de tampon (10 mM Tris-HCl (pH9); 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,1 % Triton X 100; BSA 0,2 mg/ml). Les conditions d'amplification sont : 95°C 10 min, 40 fois (95°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 1 min), 72°C 10 min.

II.3.3. Extension d'amorce : *run off*.

Le polymorphisme de longueur des ampligènes est analysé par *run off* qui consiste en une PCR linéaire de 4 à 10 cycles avec une amorce interne radiomarquée (Fig. 1M et 2M) et une électrophorèse des produits d'amplification sur gel d'acrylamide dénaturant.

Sur le plan pratique, 2 µl de produits de PCR sont soumis à une amplification de 4 à 10 cycles dans un volume réactionnel de 20 µl (2,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl; 10 mM Tris-HCl (pH8.3)) contenant de 0,1 à 0,05 pmol de l'amorce préalablement radiomarquée (cf. II.7.2 p129), une concentration de chaque dNTP de 200 µM et 1 U du fragment Stoffel de la Taq polymérase. Les conditions d'amplification sont : 95°C 10 min, 4 à 10 fois (95°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 1 min), 72°C 10 min. Après dénaturation par dilution au demi dans une solution dénaturante de dépôt et par chauffage 5 min à 95°C, l'équivalent de 1,5 µl de

produits de *run off* est soumis à une électrophorèse en gel d'acrylamide en conditions dénaturantes. Après séchage du gel, une autoradiographie sur film X-OMAT (Kodak) avec écrans intensificateurs est réalisée à -80°C.

NOM	SEQUENCE (5'- 3')	ORIENTATION	REGION	POSITION SUR ATK1	REFERENCES
BIO1	TCATGATCAATGGGACGATCACATG	anti-sens			Wattel <i>et al.</i> , 1995
BIO2	CTGTTCTGCGCCGTTACAGATCGA	sens	LTR	8898-8921	Wattel <i>et al.</i> , 1995
BIO3	CCTTTCATTACGACTGACTGCCG	sens	LTR	8938-8961	Wattel <i>et al.</i> , 1995
BIO4	TCATGATCAATGGGACGATCA	anti-sens			Wattel <i>et al.</i> , 1995
BIO5	TGGCTCGGAGCCAGCGACAGCCCAT	sens	LTR	8995-9019	Wattel <i>et al.</i> , 1995
BIO6	CTCCTGCTAGTTTATTGAGCCATA	anti-sens	LTR	8622-8598	Wattel <i>et al.</i> , 1995
LTR1	TCGCATCTCTCCTTCACGCG	sens	LTR	8656-8676	
LTR2	CTGACCCTGCTTGCTCAACTCTACG	sens	LTR	8858-8883	
SK43	CGGATACCCAGTCTACGTGT	sens	TAX	7358-7377	Ehrlich <i>et al.</i> , 1990
SK44	GAGCCGATAACGCGTCCATCG	anti-sens	TAX	7516-7496	Ehrlich <i>et al.</i> , 1990
SK45	ACGCCCTACTGGCCACCTGTCCAGAGCA TCAGATCACCTG	sens	TAX	7447-7468	Ehrlich <i>et al.</i> , 1990

Tableau 2M: Séquences et positions des amorces utilisées en LMPCR, IPCR et en PCR quantitative.

II.4. CLONAGE ET SEQUENCAGE DES PRODUITS DE PCR.

II.4.1. Préparation des phages recombinants.

Le clonage des produits de PCR est réalisé dans le site *Sma*I du phage M13mp18. Dans le but de favoriser l'insertion des produits d'amplification dans le vecteur aux dépens d'une recircularisation du vecteur, les ampligènes sont phosphorylés et la forme répliquative du phage M13mp18 est déphosphorylée.

II.4.1.1. Préparation des ampligènes à cloner.

50 µl de produits d'amplification sont incubés 15 min à 37°C en présence de 4U du fragment Klenow de l'ADN polymérase I (Boehringer). Après extraction au phénol/chloroforme (1/1), l'ADN est précipité et repris dans de l'eau.

Pour limiter le clonage des dimères d'amorces et/ou des "clones TG", les produits d'amplification sont purifiés par électrophorèse en gel d'agarose à bas point de fusion 1,5% (Low Melting Point, Tebu) (cf. II.8.1 p131). Après précipitation, les ampligènes sont phosphorylés par 10 U de Polynucléotide Kinase dans un volume réactionnel de 10 µl (10 mM Tris-acétate ; 10 mM Acétate de Magnésium ; 50 mM Acétate de Potassium ; 2 mM ATP). La polynucléotide kinase est inactivée par un chauffage de 15 min à 65°C et par addition de 2 µl d'EDTA 100 mM. L'EDTA est ensuite neutralisé par l'addition de 3 µl de MgCl₂ 100 mM. Sur les 15 µl de réaction, 5 µl seront ligués dans le phage M13mp18.

II.4.1.2. Préparation du vecteur.

Concernant le vecteur, 4 µg de la forme répliquative, double brin, sont digérés par 20 U de SmaI (Boehringer) pendant 2 heures à 37°C dans un volume réactionnel de 30 µl. Le vecteur est ensuite déphosphorylé par 20 U de Phosphatase alcaline (Boehringer) lors d'une incubation à 37°C de 30 min. Pour permettre une meilleure accessibilité des groupements phosphate, une incubation à 55°C durant 10 min est réalisée. L'efficacité de cette réaction est améliorée par deux nouvelles incubations à 37°C et à 55°C avec 20 U supplémentaires d'enzyme. L'ADN est purifié par extraction au phénol/chloroforme et précipité. Le culot est repris et dosé par électrophorèse en comparant les intensités à celles d'une gamme de concentration d'un plasmide.

II.4.1.3. Ligation.

5 µl d'ampligènes phosphorylés sont ligués à 100 ng de vecteur dans un volume réactionnel de 20 µl (50 mM Tris-HCl (pH7,8); 10 mM MgCl₂ ; 10 mM DTT ; 1 mM ATP ; BSA 50 µg/ml) en présence de 40 U de ligase (Biolabs). Une incubation d'une heure à température ambiante en précède une autre d'une nuit à 16°C. Pour augmenter les rendements de ligation, 10 U de ligase, 2 µl de DTT 0,1 M et 1 µl ATP 10 mM sont ajoutés pour une nouvelle incubation de 6 heures à 16°C.

La ligase est dénaturée par un chauffage de 10 min à 65°C. Les produits de ligation sont purifiés par deux extractions au phénol/chloroforme (1/1). La phase aqueuse est précipitée et reprise par 10 µl d'eau stérile. La transfection des bactéries s'effectuant par électroporation, une dialyse d'une demi-heure contre de l'eau sur les membranes de dialyse à 0,025 µm (Millipore) est nécessaire pour l'élimination des sels.

II.4.2. Transfection.

Les bactéries à transférer par les phages M13 recombinants sont préalablement rendues compétentes pour l'électroporation par des lavages successifs à l'eau. Concrètement, une préculture de XL1 estensemencée au 1/50^{ième} dans du milieu LB. Lorsque la densité optique de la culture à 600nm atteint 0,8 unité, les bactéries sont sédimentées par une centrifugation de 15 min à 3 000 g et reprises dans un volume identique d'eau à 4°C. Une nouvelle centrifugation précède un second lavage dans les mêmes conditions. Un troisième lavage dans 35 ml d'eau est effectué avant de reprendre le culot bactérien volume à volume dans une solution de glycérol à 10% puis dans une solution de glycérol à 20%. Les bactéries peuvent, alors, être conservées à - 80°C aliquotées par 50 µl sous congélation instantanée dans un mélange carboglace/éthanol.

Pour l'électroporation, 50 µl de bactéries compétentes et 5 µl de produits de ligation sont placés dans une cuve à électroporation (Biorad). Après 5 min d'incubation dans la glace,

l'électroporation est réalisée avec les paramètres suivants : 2500 V;17,5 ms; 700 Ohms et 25 μ F. Les bactéries sont alors reprises dans 900 μ l de SOC-LB pour être incubées 1 heure à 37°C. Suivant les rendements de clonage, de 0,1 à 100 μ l de bactéries sont étalées en double couche dans 3ml de Top-agar contenant 0,033 % de X-Gal et 8,3 ng/ml d'IPTG. L'incubation se fait sur la nuit à 37°C.

II.4.3. Criblage des phages recombinants.

Les plages de lyse sont criblées grâce à l'hybridation d'une sonde oligonucléotidique radiomarquée (cf. II.7.1, p130) sur des membranes de nitrocellulose. Après transfert des plages de lyse sur les membranes, celles-ci sont préhybridées à 42°C pendant une heure dans un tampon d'hybridation. De 1 à 10 pmol d'oligonucléotide radiomarqué sont alors ajoutées pour une hybridation à 42°C de 4 heures. Les membranes sont lavées deux fois à température ambiante dans un tampon SSC 2X /SDS 1%. L'exposition autoradiographique des membranes va permettre de repérer sur la boîte les plages de lyse possédant les inserts souhaités.

II.4.4. Préparation des matrices et séquençage.

Les matrices d'ADN à séquencer sont extraites des particules phagiques produites lors d'une incubation à 37°C pendant 5 à 6 heures de 2,5 ml d'une préculture de XL1 diluée au 1/100 et infectée par repiquage des phages. Après sédimentation des bactéries par deux centrifugations, les phages contenus dans 1,2 ml de surnageant sont précipités par l'addition de 250 μ l d'une solution de précipitation (PEG 6000 20%; 2,5 M NaCl). Suite à une centrifugation de 15 min à 12 000 g, le culot est repris par 200 μ l de TE1X. Une extraction au phénol à 50°C va permettre la purification du génome simple brin du phage. Après précipitation, les matrices sont reprises dans 20 μ l de TE 1X et 7 μ l vont être séquencés par la technique de Sanger en utilisant le kit Sequenase version 2.0 (USB). L'électrophorèse en gel de polyacrylamide dénaturant à 6% permet la séparation des produits de séquence (cf. II.9.2, p132). Après séchage du gel, une autoradiographie avec film X-OMAT (Kodak) est effectuée pendant 12h. Les séquences sont stockées et analysées avec le logiciel PCGENE.

II.5. SEQUENCAGE DIRECT DES PRODUITS DE PCR.

Le séquençage direct des ampligènes est réalisé sur des matrices simple brin obtenues par digestion à l'exonucléase III (Pharmacia) d'un brin d'ADN préalablement phosphorylé.

Sur le plan pratique, la bande à séquencer est découpée du gel d'acrylamide et éluée dans de l'eau par chauffage à 85°C pendant 10 min. Après dialyse d'une demi heure contre de l'eau, une PCR est réalisée avec un couple d'amorces dont l'une est préalablement phosphorylée par 10 U de Polynucléotide Kinase dans un Tampon (10 mM Tris-acétate ; 10 mM Acétate de Magnésium ; 50 mM Acétate de Potassium ; 2 mM ATP). Les produits d'amplification sont ensuite purifiés par électrophorèse en gel d'agarose à bas point de fusion 1,5% (Low Melting Point, Tebu) (cf. II.8.1, p131). Après précipitation, les matrices sont reprises dans 20 µl de tampon (25 mM MgCl₂, 0,67M glycine KOH (pH9,3)) pour une digestion d'une heure à 37°C du brin phosphorylé par 10 U d'Exonucléase III (Pharmacia). L'exonucléase est ensuite dénaturée par un chauffage de 2 min à 92°C. Les matrices simple brin sont à nouveau purifiées par ultrafiltration sur tubes Centricon (Amicon) et précipitées à l'éthanol. Après lavage du culot à l'éthanol 70°, le culot est repris dans de l'eau. Le séquençage s'effectue selon la technique de Sanger au α ³⁵S dATP en utilisant les conditions du Kit Sequenase version 2.0 (United States Biochemical).

II.6. BLOT DE SOUTHERN.

L'étude par blot de Southern de la clonalité a été réalisée avec les enzymes de restriction EcoRI, absente de la séquence provirale HTLV-I ou PstI, coupant à trois endroits et en utilisant, comme sonde, le fragment Sac I du plasmide P4.39 (Fig.1M, p117).

10 µg d'ADN sont digérés pendant 12 heures par 150 U d'enzymes de restriction. Les fragments d'ADN sont ensuite précipités pour être repris par 20 µl de TE 1X. Une électrophorèse, à 4°C, en gel d'agarose 0,8% est effectuée à 25V dans un tampon phosphate pendant 14 à 18 heures. La dénaturation de l'ADN, par deux incubations successives du gel

dans une solution alcaline (0,5 M NaOH) est suivie d'une neutralisation par un tampon (0,5 M Tris-HCl (pH6,5); 3 M NaCl). L'ADN est transféré, par capillarité, sur une membrane de nitronylon (Hybond C extra, Amersham) par un flux de tampon SSC 6X. Le transfert est réalisé sur la nuit. L'ADN est ensuite fixé sur la membrane par un chauffage de deux heures à 80°C. La membrane est préhybridée pendant 1 heure dans un tampon d'hybridation. L'hybridation du fragment SacI de 8.3 kb, marqué au α ^{32}P dCTP par la technique de multiamorçage au hasard (cf. II.7.2.) est réalisée à 42°C pendant 12 heures. L'hybridation non spécifique est éliminée par deux lavages successifs à température ambiante avec une solution (SSC 0,1X; SDS 0,1%) et un dernier lavage à 50°C . Enfin, une autoradiographie est réalisée.

II.7. MARQUAGE DES SONDÉS.

II.7.1. Marquage des sondes oligonucléotidiques.

Le marquage des sondes oligonucléotidiques s'effectue par addition d'un groupement phosphate en 5' de l'oligonucléotide grâce la Polynucléotide Kinase. La réaction s'effectue sur 10 pmol de l'oligonucléotide par incubation d'une heure à 37°C en présence de 30 μCi de γ ^{32}P ATP (Amersham) et de 10 U de Polynucléotide Kinase dans un volume réactionnel de 20 μl (10 mM Tris-acétate ; 10 mM Acétate de Magnésium ; 50 mM Acétate de Potassium). La Polynucléotide Kinase est inactivée par une incubation de 2 min à 92°C en présence d'EDTA à une concentration finale de 10 mM.

L'efficacité de cette réaction est contrôlée par chromatographie sur gel de silice. La migration s'effectue pendant 15 min dans un tampon (0,5 M NaH_2PO_4 (pH 6,5)). Le γ ^{32}P ATP, soluble dans le tampon est entraîné par le flux de solution alors que l'oligonucléotide reste au niveau du dépôt. Une autoradiographie sur phosphorimager permet d'estimer les rendements de marquage.

II.7.2. Marquage des sondes.

Le marquage de la sonde d'ADN double brin est effectué par la technique de multiamorçage au hasard en utilisant le kit *rediprime DNA labelling system* (Amersham). Le principe de cette technique consiste en l'hybridation d'hexanucléotides aléatoires à différents endroits sur la matrice d'ADN dénaturée. Une réaction d'extension d'amorces est ensuite réalisée par la Klenow. En substituant le dCTP par le α ³²P dCTP dans le mélange réactionnel de dNTP, l'ADN néosynthétisé sera radiomarqué. Le protocole utilisé correspond à celui décrit dans le kit. La sonde sera utilisée après purification par gel filtration sur colonnes Sephadex G50 et dénaturation par la soude.

II.8. PURIFICATION DE L'ADN.

II.8.1. Electrophorèse en gel d'agarose à bas point de fusion.

Les produits d'amplification sont purifiés par électrophorèse en gel d'agarose à bas point de fusion 1,5% (Low Melting Point (LMP), Tebu) dans un tampon TBE 0,5X. La bande d'intérêt est découpée et dissoute 10 min à 65°C avec 200 μ l de TE 1X et 100 μ l d'acétate d'Ammonium 3M. L'extraction de l'ADN est réalisée par l'addition de 500 μ l de Phénol à 65°C, agitation au vortex et incubation de 10 min à 65°C. Après centrifugation, la phase aqueuse est soumise à une nouvelle extraction au phénol puis au chloroforme. L'ADN est ensuite précipité par 500 μ l d'éthanol absolu.

II.8.2. Purification par *geneclean*.

Les fragments d'ADN de taille supérieure à 500 pb, sont purifiés en utilisant le kit "Gene Clean" de BIO 101 Inc. Après électrophorèse, ce kit permet la purification de l'ADN par dissolution du gel dans une solution de NaI et capture de l'ADN par des billes de silice affines pour l'ADN simple ou double brin. Le protocole utilisé est celui décrit dans le kit.

Cependant, pour augmenter les rendements de purification, l'électrophorèse des fragments d'ADN est réalisée en gel d'agarose LMP dans un tampon TAE 1X.

II.9. ELECTROPHORESES.

II.9.1. Electrophorèse en gel d'agarose.

Les échantillons à analyser, dilués au demi dans une solution de Bleu de bromophénol (saccharose 40% ; 20 mM EDTA ; bleu de bromophénol 0,05%), sont déposés sur un gel d'agarose (0,8% à 2% agarose; 0,5X TBE, BET 0,5 µg/ml). La migration s'effectue, en général, pendant 30 min à 100V. L'analyse se fait sous lampe UV (254 nm). Suivant la taille des bandes attendues, les marqueurs de taille utilisés sont le 100 bp (Pharmacia) ou le 1 kb (Pharmacia).

II.9.2. Electrophorèse en gel d'acrylamide.

Suivant la nature des produits à séparer, les électrophorèses sont réalisées dans un gel dénaturant (6% Acrylamide/bis acrylamide (19/1); TBE1X; Urée 8M) ou non dénaturant (8% Acrylamide/bis acrylamide (19/1); TBE1X). Le gel est polymérisé par addition de TEMED 1% et persulfate d'ammonium 1% en concentrations finales. Les tampons de dépôts sont dénaturant ou non dénaturant. Les électrophorèses s'effectuent à 85W dans un tampon TBE 1X. Après séchage des gels, les autoradiographies sont effectuées sur des films X-OMAT Kodak.

Le marqueur de taille souvent utilisé est le plasmide ψ X 174 digéré par Hinf I. Il est déposé sur les gels après marquage à la Polynucléotide Kinase (cf.II.7.1, p130).

II.10. TESTS STATISTIQUES.

Les tests statistiques utilisés pour comparer les profils répliatifs de HTLV-I dans les différents statuts liés à l'infection sont des tests non paramétriques. Ce type de test présente l'avantage de ne faire aucune hypothèse sur la distribution des variables. La distribution des variables qui caractérise l'expansion clonale des cellules n'étant pas connue et les effectifs étant relativement faibles, le test U de Mann et Whitney ainsi que le coefficient de corrélation de Spearman sont les plus appropriés.

Test U de Mann et Whitney :

Ce test permet d'étudier la liaison entre un caractère quantitatif et un caractère qualitatif à 2 classes. Le principe de ce test est de classer par rang la variable quantitative et de comparer, par le biais de cette nouvelle variable les deux populations.

Coefficient de corrélation de Spearman

Ce test permet d'étudier la corrélation entre 2 variables quantitatives. Dans ce test, chacune des 2 variables quantitatives est classée par rang. Le coefficient de corrélation est alors calculé sur ces couples de nouvelles variables. Le degré de signification de la corrélation est ensuite estimé par les méthodes classiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Akagi T., Hoshida Y., Yoshino T., Teramoto N., Kondo E., Hayashi K. et Takahashi K. Infectivity of human T-lymphotropic virus type I to human nervous tissue cells in vitro. *Acta Neuropathol Berl*, 1992, 84 (2): 147.
- Akagi T., Ono H. et Shimotohno K. Expression of cell-cycle regulatory genes in HTLV-I infected T-cell lines: possible involvement of Tax1 in the altered expression of cyclin D2, p18Ink4 and p21Waf1/Cip1/Sdi1. *Oncogene*, 1996, 12 (8): 1645.
- Arya S. K., Gallo R. C., Hahn B. H., Shaw G. M., Popovic M., Salahuddin S. Z. et Wong-Staal F. Homology of genome of AIDS-associated virus with genomes of human T-cell leukemia viruses. *Science*, 1984, 225 (4665): 927.
- Bakker A; Li X. Ruland C. Stephens D., Black A. & Rosenblatt J. Human Tcell Leukemia Virus type II Rex inhibits pre-mRNA splicing in vitro at an early stage of spliceosome formation. *J. Virol.* 1996, 70, 5511.
- Banki K., Colombo E., Sia F., Halladay D., Mattson D. H., Tatum A. H., Massa P. T., Phillips P. E. et Perl A. Oligodendrocyte-specific expression and autoantigenicity of transaldolase in multiple sclerosis. *J. Exp. Med.*, 1994, 180 (5): 1649.
- Baskerville S., Zapp M. & Ellington A. High-Resolution mapping of the human T-cell Leukemia Virus type I Rex binding Element by in vitro selection. *J. Virol.* 1995, 69, 7559.
- Beilke M. A., In D. R., Gravell M., Hamilton R. S., Mora C. A., Leon-Monzon M., Rodgers-Johnson P. E., Gajdusek D. C., Gibbs C. Jr. et Zaninovic V. In situ hybridization detection of HTLV-I RNA in peripheral blood mononuclear cells of TSP/HAM patients and their spouses. *J. Med. Virol.*, 1991, 33 (1): 64.
- Benvenisty N., Ornitz D. M., Bennett G. L., Sahagan B. G., Kuo A., Cardiff R. D. et Leder P. Brain tumours and lymphomas in transgenic mice that carry HTLV-I LTR/c-myc and Ig/tax genes. *Oncogene*, 1992, 7 (12): 2399.
- Béraud C. et Greene W. Interaction of HTLV-1 Tax with the human proteasome : Implications for NFκB induction. *J. AIDS.* 1996, 13: S76.
- Bernardi G. Olofsson B., Filipski J., Serial M., Salinas J., Cuny G., Meunier-Rotival M. et Rodier F. The mosaic genome of warm blood vertebrates. *Science*, 1985, 228:953.
- Berneman Z. N., Gartenhaus R. B., Reitz M. Jr., Blattner W. A., Manns A., Hanchard B., Ikehara O., Gallo R. C. et Klotman M. E. Expression of alternatively spliced human T-lymphotropic virus type I pX mRNA in infected cell lines and in primary uncultured cells from patients with adult T-cell leukemia/lymphoma and healthy carriers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89 (7): 3005.

- Blattner W. Human T-Lymphotropic viruses and diseases of long latency. *Ann. Intern. Med.*, 1989, 111 (1): 4.
- Bogerd H., Frideli R., Benson R., Hua J. & Cullen B. Protein sequence requirements for fonction of the Human T-cell Leukemia Virus Type I Rex Nuclear Export Signal delineated by a novel in vitro randomization-selection assay. *MCB*. 1996, 16, 4207.
- Bogerd H., Frideli R., Madore S. & Cullen B. Identification of cellular cofactor for the Rev/Rex class of retroviral regulatory proteins. *Cell*. 1995, 82, 485.
- Catovsky D., Greaves M., Rose M., Galton D., Goolden A., Mac Cluskey D., White J., Lampert I., Bourikas G., Ireland R., Brownell A., Bridges J., Blattner A. & Gallo R. Adult T-Cell Lymphoma-leukaemia in Blacks from the west Indies. *Lancet*. 1982, 639.
- Cereseto A., Diella F., Mulloy J., Cara A., Michieli P., Grassman R., Franchini G. et Klotman M. p53 fonctional impairment and high p21waf/cip1 expression in human T-cell lymphotropic/leukemia virus type I-transformed T cells. *Blood*, 1996, 88 (5): 1551.
- Cereseto A., Mulloy J. et Franchini G. Insights on the pathogenicity of Human T-Lymphotropic/Leukemia Virus Types I and II. *J. AIDS*, 1996, 13 : S69.
- Ceroni M., Piccardo P., Rodgers-Johnson P., Mora C., Asher D. M., Gajdusek D. C. et Gibbs C. Jr. Intrathecal synthesis of IgG antibodies to HTLV-I supports an etiological role for HTLV-I in tropical spastic paraparesis. *Ann Neurol*, 1988, 23 (91): S188.
- Cesarman E., Chadburn A., Inghirami G., Gaidano G. et Knowles D. M. Structural and functional analysis of oncogenes and tumor suppressor genes in adult T-cell leukemia/lymphoma shows frequent p53 mutations. *Blood*, 1992, 80 (12): 3205.
- Chen J., Zekeng L., Yamashita M., Takehisa J., Miura T., Ido E., Mboudjeka I., Tsague J. M., Hayami M. et Kaptue L. HTLV type I isolated from a Pygmy in Cameroon is related to but distinct from the known central African type. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1995, 11 (12): 1529.
- Chou K. S., Okayama A., Tachibana N., Lee T. H. et Essex M. Nucleotide sequence analysis of a full-length human T-cell leukemia virus type I from adult T-cell leukemia cells: a prematurely terminated PX open reading frame II. *Int. J. Cancer.*, 1995, 60 (5): 701.
- Chrivia JC., Kwok RPS., Lambs N. et al. Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Mol. Cell. Biol*. 1993, 13:855.
- Cimarelli A., Duclos CA., Gessain A., Casoli C. et Bertazzoni U. Clonal expansion of T-cell leukemia virus type II in patients with high proviral laod. *Virology*, 1996, 223:362.

- Coffin J. Retroviridae: The viruses and their Replication. *Fields Virology*, 1996, 58, 1767.
- Corbin A. et Sitbon M. Protection against retroviral diseases after vaccination is conferred by interference to superinfection with attenuated murine leukemia viruses. *J. Virol.*, 1993, 67(9):5146.
- Daenke S., Kermode A. G., Hall S. E., Taylor G., Weber J., Nightingale S. et Bangham C. R. High activated and memory cytotoxic T-cell responses to HTLV-1 in healthy carriers and patients with tropical spastic paraparesis. *Virology*, 1996, 217 (1): 139.
- Daenke S., Nightingale S., Cruickshank J. K. et Bangham C. R. Sequence variants of human T-cell lymphotropic virus type I from patients with tropical spastic paraparesis and adult T-cell leukemia do not distinguish neurological from leukemic isolates. *J. Virol.*, 1990, 64 (3): 1278.
- Dalglish A., Richardson J., Matutes E., Cruickshank K., Newell A., Sinclair A., Thorpe R., Brasher M., Weber J., Catovsky D. et al. HTLV-1 infection in tropical spastic paraparesis: lymphocyte culture and serologic response. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1988, 4 (6): 475.
- Darnell JE., Kerr IM. et Strak GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 1994, 264 : 1415.
- Desbois C., Rousset R., Bantignies F. et Jalinet P. Exclusion of Int-6 from PML Nuclear Bodies by Binding to the HTLV-1 Tax Oncoprotein. *Science*, 1996, 273:951.
- de-The G. et Bomford R. An HTLV-I vaccine: why, how, for whom? *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1993, 9 (5): 381.
- Dhawan S., Weeks B., Abbasi F. Gralnick H., Notkins A., Klotman M., Yamada K. et Klotman P. Increased expression of $\alpha 4\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$ integrins on HTLV-1 infected lymphocytes. *Virology*, 1993, 197:778.
- Docker J., Evans C. Tishon A. et Oldstone M. Competitive selection in vivo by a cell for one variant over another : Implications for RNA virus quasispecies in vivo. *J. Virol.*, 1996, 70:1799.
- Domingo E., Holland JJ. et Ahlquist P. High error rates, population equilibrium and evolution of RNA replication systems. *RNA Genetics*. CRC Press Inc., Baton Rouge, USA, 1988 3-36.
- Drake JW. Rates of spontaneous mutations among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90 : 4171.

- Domingo E; et Holland JJ. Complications of RNA heterogeneity for engineering of virus vaccines and antiviral agents. Genetic engineering, principles and methods. New York, 1992, 13.
- Eigen M. Viral quasispecies. *Sci Am.*, 1993, 269 : 42.
- Elovaara I, Koenig S, Brewah AY, Woods RM, Lehky T, Jacobson S. High human T cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1)-specific precursor cytotoxic T lymphocyte frequencies in patients with HTLV-1-associated neurological disease. *J Exp Med* 1993 ; 177: 1567.
- Erlich GD., Greenberg S. et Abott M. Detection of the Human T-cell Lymphoma / Leukemia viruses. *PCR Protocols*, Academic press, 1990, 39:325.
- Fzakerley J. et Buchmeier M. Pathogenesis of virus-induced demyelination. In advances in virus research. Maramorosh K., Murohy F. et Shatkin A. (Eds). Academic Press, 1993,249-323.
- Felber B. K., Paskalis H., Kleinman-Ewing C., Wong-Staal F. et Pavlakis G. N. The pX protein of HTLV-I is a transcriptional activator of its long terminal repeats. *Science*, 1985, 229 (4714): 675.
- Franchini G., Mulloy J. C., Koralnik I. J., Lo-Monico A., Sparkowski J. J., Andresson T., Goldstein D. J. et Schlegel R. The human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I p12I protein cooperates with the E5 oncoprotein of bovine papillomavirus in cell transformation and binds the 16-kilodalton subunit of the vacuolar H⁺ ATPase. *J. Virol.*, 1993, 67 (12): 7701.
- Franchini G. Molecular mechanisms of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I infection. *Blood*, 1995, 86 (10): 3619.
- Franklin A. A., Kubik M. F., Uittenbogaard M. N., Brauweiler A., Utaincharoen P., Matthews M. A., Dynan W. S., Hoeffler J. P. et Nyborg J. K. Transactivation by the human T-cell leukemia virus Tax protein is mediated through enhanced binding of activating transcription factor-2 (ATF-2) ATF-2 response and cAMP element-binding protein (CREB). *J. Biol. Chem.*, 1993, 268 (28): 21225.
- Fritz C., Zapp M. & Green M. A human nucleoporin-like protein that specifically interacts with HIV Rev. *Nature*. 1995, 376. 530.
- Fujihara K., Itoyama Y., Yu F., Kubo C. et Goto I. Cellular immune surveillance against HTLV-I infected T lymphocytes in HTLV-I associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP). *J Neurol Sci*, 1991, 105 (1): 99.

- Fujii M, Niki T, Mori T, Matsuda T, Matsui M, Nomura N, Seiki M. HTLV-1 Tax induces expression of various immediate early serum responsive genes. *Oncogene* 1991 ; 6: 1023.
- Fujii M., Tsuchiya H., Chuhjo T., Akizawa T. et Seiki M. Interaction of HTLV-1 Tax1 with p67SRF causes the aberrant induction of cellular immediate early genes through CARG boxes. *Genes Dev.*, 1992, 6 (11): 2066.
- Furukawa K., Furukawa K. et Shiku H. Alternatively spliced mRNA of the pX region of human T lymphotropic virus type I proviral genome. *Febs Lett*, 1991, 295 (1-3): 141.
- Furukawa K., Mori M., Ohta N., Ikeda H., Shida H., Furukawa K. et Shiku H. Clonal expansion of CD8+ cytotoxic T lymphocytes against human T cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) genome products in HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients. *J Clin Invest*, 1994, 94 (5): 1830.
- Furukawa Y., Fujisawa J., Osame M., Toita M., Sonoda S., Kubota R., Ijichi S. et Yoshida M. Frequent clonal proliferation of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-infected T cells in HTLV-1-associated myelopathy (HAM-TSP). *Blood*, 1992, 80 (4): 1012.
- Furukawa Y., Osame M., Kubota R., Tara M. et Yoshida M. Human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1) Tax is expressed at the same level in infected cells of HTLV-1-associated myelopathy or tropical spastic paraparesis patients as in asymptomatic carriers but at a lower level in adult T-cell leukemia cells. *Blood*, 1995, 85 (7): 1865.
- Gazzolo L. et Duc Dodon M. Direct activation of resting T lymphocytes by HTLV-1. *Nature*, 1987, 326 (6114) : 714.
- Gessain A., Barin F., Vernant J. C., Gout O., Maurs L., Calender A. et de-The G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type-I in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet*, 1985, 2 (8452): 407.
- Gessain A., Caudie C., Gout O., Vernant J. C., Maurs L., Giordano C., Malone G., Tournier-Lasserre E., Essex M. et de-The G. Intrathecal synthesis of antibodies to human T lymphotropic virus type I and the presence of IgG oligoclonal bands in the cerebrospinal fluid of patients with endemic tropical spastic paraparesis. *J. Infect. Dis.*, 1988, 157 (6): 1226.
- Gessain A., Saal F., Morozov V., Lasneret J., Vilette D., Gout O., Emanoil-Ravier R., Sigaux F., de-The G. et Peries J. Characterization of HTLV-I isolates and T lymphoid cell lines derived from French West Indian patients with tropical spastic paraparesis. *Int. J. Cancer.*, 1989, 43 (2): 327.
- Gessain A., Saal F., Giron M. L., Lasneret J., Lagaye S., Gout O., De-The G., Sigaux F. et Peries J. Cell surface phenotype and human T lymphotropic virus type 1 antigen expression

in 12 T cell lines derived from peripheral blood and cerebrospinal fluid of West Indian, Guyanese and African patients with tropical spastic paraparesis. *J. Gen. Virol.*, 1990, 71 (Pt 2): 333.

Gessain A., Saal F., Gout O., Daniel MT. Flandrin G., de Thé G. Peries J. et Sigaux F. High human T-cell lymphotropic virus type I proviral DNA load with polyclonal integration in peripheral blood mononuclear cells of French West Indians, Guianese and African with TSP/HAM. *Blood*, 1990, 75 (2): 428.

Gessain A., Louie A., Gout O., Gallo R. C. et Franchini G. Human T-cell leukemia-lymphoma virus type I (HTLV-I) expression in fresh peripheral blood mononuclear cells from patients with tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy. *J. Virol.*, 1991, 65 (3): 1628.

Gessain A. et Gout O. Chronic myelopathy associated with human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I). *Ann. Intern. Med.*, 1992, 117 (11): 933.

Gessain A., Gallo R. C. et Franchini G. Low degree of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I genetic drift in vivo as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations. *J. Virol.*, 1992, 66 (4): 2288.

Gessain A., Boeri E., Yanagihara R., Gallo R. C. et Franchini G. Complete nucleotide sequence of a highly divergent human T-cell leukemia (lymphotropic) virus type I (HTLV-I) variant from melanesia: genetic and phylogenetic relationship to HTLV-I strains from other geographical regions. *J. Virol.*, 1993, 67 (2): 1015.

Gill P. S., Harrington W., Kaplan M., Ribeiro R., Benett J., Liebman H., Bernstein-Singer M., Espina B., Cabral L., Allen S. et al. Treatment of Adult T-cell leukemia-lymphoma with a combination of interferon alfa and zidovudine. *N. Engl. J. Med.*, 1995, 332 (26): 1744.

Giraudon P., Bernard A., Malcus C., Dufay N., Desgranges C. et Belin M. F. Retroviral infection (HTLV-I) induces cytokine-regulated immunomodulation and cytotoxicity of medulloblastoma cells. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1995, 54 (2): 165.

Goldstein DJ., Andresson T., Sparkowski JJ. et Schlegel R. The BPV-1 E5 protein, the 16kDa membrane pore-forming protein and the PDGF receptor exist in a complex that is dependent on hydrophobic transmembrane interactions. *EMBO*, 1992, 11:4851.

Goto K., Saeki K., Kurita M., Iijima Y., Miyake A. et Ohno S. HTLV-I seroprevalence in patients with undefined uveitis in central Japan. *Jpn J Ophthalmol*, 1994, 38 (2): 175.

Gout O., Baulac M., Gessain A., Semah F., Saal F., Peries J., Cabrol C., Foucault-Fretz C., Laplane D., Sigaux F. et al. Rapid development of myelopathy after HTLV-I infection

- acquired by transfusion during cardiac transplantation. *N. Engl. J. Med.*, 1990, 322 (6): 383.
- Grassmann R., Berchtold S., Radant I., Alt M., Fleckenstein B., Sodroski J. G., Haseltine W. A. et Ramstedt U. Role of human T-cell leukemia virus type 1 X region proteins in immortalization of primary human lymphocytes in culture. *J. Virol.*, 1992, 66 (7): 4570.
- Green J. E., Baird A. M., Hinrichs S. H., Klintworth G. K. et Jay G. Adrenal medullary tumors and iris proliferation in a transgenic mouse model of neurofibromatosis. *Am. J. Pathol.*, 1992, 140 (6): 1401.
- Green J. E., Hinrichs S. H., Vogel J. et Jay G. Exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in HTLV-1 tax transgenic mice. *Nature (London)*, 1989, 341 (6237): 72.
- Green P. L. et Chen I. S. Regulation of human T cell leukemia virus expression. *Faseb J.*, 1990, 4 (2): 169.
- Grimaldi L. M., Roos R. P., Devare S. G., Casey J. M., Maruo Y., Hamada T. et Tashiro K. HTLV-I-associated myelopathy: oligoclonal immunoglobulin G bands contain anti-HTLV-I p24 antibody. *Ann Neurol*, 1988, 24 (6): 727.
- Grossman W. J., Kimata J. T., Wong F. H., Zutter M., Ley T. J. et Ratner L. 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*, 1995, 92 (4): 1057.
- Hanly SM., Rimsky LT., Malim MH., Kim JH., Hauber J., Duc Dodon M., Le SY. Maizel JV., Cullen BR. et Greene WC. Comparative analysis of the HTLV-1 Rex and HIV-1 Rev Trans regulatory proteins and their RNA response elements. *Gene Dev.*, 1989, 3:1534.
- Hara H., Morita M., Iwaki T., Hatae T., Itoyama Y., Kitamoto T., Akizuki S., Goto I. et Watanabe T. Detection of human T lymphotropic virus type I (HTLV-I) proviral DNA and analysis of T cell receptor V beta CDR3 sequences in spinal cord lesions of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J. Exp. Med.*, 1994, 180 (3): 831.
- Harper M., Kaplan M., Marselle L. et al. Concomitant Infection with HTLV-I and HTLV-III in a Patient with T8 Lymphoproliferative Disease. *N. Engl. J. Med.*, 1986, 315. 1073.
- Hatta Y., Hiramata T., Miller C. W., Yamada Y., Tomonaga M. et Koeffler H. P. Homozygous deletions of the p15 (MTS2) and p16 (CDKN2/MTS1) genes in adult T-cell leukemia. *Blood*, 1995, 85 (10): 2699.
- Hattori T., Uchiyama T., Toibana T., Takatsuki K. & Uchino H. (1981). Surface Phenotype of Japanese Adult T-Cell Leukaemia Cells Characterised by Monoclonal Antibodies. *Blood*. 1981, 58. 645.

Hausen H. Viruses in human cancer. *Science*, 1991, 254:1167.

Hermine O., Bouscary D., Gessain A., Turlure P., Leblond V., Franck N., Buzyn-Veil A., Rio B., Macintyre E., Dreyfus F. et al. Brief report: treatment of adult T-cell leukemia-lymphoma with zidovudine and interferon alfa [see comments]. *N. Engl. J. Med.*, 1995, 332 (26): 1749.

Hickey WF., Hsu BL et Kimura H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J. Neurosci. Res.*, 1991, 28:254.

Hidaka M., Inoue J., Yoshida M. et Seiki M. Post-transcriptional regulator (rex) of HTLV-1 initiates expression of viral structural proteins but suppresses expression of regulatory proteins. *EMBO J.*, 1988, 7 (2): 519.

Hinrichs S. H., Nerenberg M., Reynolds R. K., Khoury G. et Jay G. A transgenic mouse model for human neurofibromatosis. *Science*, 1987, 237 (4820): 1340.

Hirai H., Suzuki T., Fujisawa J., Inoue J. et Yoshida M. Tax protein of human T-cell leukemia virus type I binds to the ankyrin motifs of inhibitory factor kappa B and induces nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B proteins for transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91 (9): 3584.

Hiramatsu K. et Yoshikura H. Frequent partial deletion of human adult T-cell leukemia virus type I proviruses in experimental transmission: pattern and possible implication. *J. Virol.*, 1986, 58 (2): 508.

Hiramatsu K., Nishida J., Naito A. et Yoshikura H. Molecular cloning of the closed circular provirus of human T cell leukaemia virus type I: a new open reading frame in the gag-pol region. *J. Gen. Virol.*, 1987, 68 (Pt 1): 213.

Hirose S., Uemura Y., Fujishita M., Kitagawa T., Yamashita M., Imamura J., Ohtsuki Y., Taguchi H. et Miyoshi I. Isolation of HTLV-I from cerebrospinal fluid of a patient with myelopathy [letter]. *Lancet*, 1986, 2 (8503): 397.

Ho D. D., Rota T. R. et Hirsch M. S. Infection of human endothelial cells by human T-lymphotropic virus type I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984, 81 (23): 7588.

Hoffman P. M., Dhib-Jalbut S., Mikovits J. A., Robbins D. S., Wolf A. L., Bergey G. K., Lohrey N. C., Weislow O. S. et Ruscetti F. W. Human T-cell leukemia virus type I infection of monocytes and microglial cells in primary human cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89 (24): 11784.

- Holland JJ., de le Torre JC., Steinhauer DA. RNA virus populations as quasispecies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1992, 176:1.
- Hollberg P. et Hafler D. A. What is the pathogenesis of human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis? [editorial; comment]. *Ann Neurol*, 1995, 37 (2): 143.
- Hoxie J. A., Matthews D. M. et Cines D. B. Infection of human endothelial cells by human T-cell leukemia virus type I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984, 81 (23): 7591.
- Hunter T. et Pines J. Cyclins and cancer: Cell cycle control and cancer. *Cell*, 1994, 79:573.
- Ichinose K., Nakamura T., Kawakami A., Eguchi K., Nagasato K., Shibayama K., Tsujihata M et Nagataki S. Increased adherence of T cells to the human endothelial cells in patients with T-cell lymphotropic virus type 1-associated myelopathy. *Aech. Neurol.*, 1992, 49:74.
- Ichinose K., Nakamura T., Nishihiro Y., Nagasato K., Ohishi K., Watanabe H., Fujita A., Kurouji K., Tsujihata M. et Nagataki S. Characterization of adherent T cells to human endothelial cells in patients with HTLV-1-associated myelopathy. *Journal of the Neurological Sciences*, 1994, 122:204.
- Ijichi S., Eiraku N., Osame M., Izumo S., Kubota R., Maruyama I., Matsumoto M., Niimura T. et Sonoda S. Activated T lymphocytes in cerebrospinal fluid of patients with HTLV-I-associated myelopathy (HAM/TSP). *J Neuroimmunol*, 1989, 25 (2-3): 251.
- Ijichi S., Izumo S., Eiraku N., Machigashira K., Kubota R., Nagai M. Ikegami N., Kashio N., Umehara F., Maryama I. et Osame M. AN autoaggressive process against bystander tissues in HTLV-1-infected individuals : A possible pathomechanism of TSP/HAM. *Medical Hypotheses*, 1993, 41:542.
- Ijichi S. et Osame M. Human T lymphotropic virus type I (HTLV-I)-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis (HAM/TSP): recent perspectives. *Intern Med*, 1995, 34 (8): 713.
- Ikeda K., Inaba N. et Takamizawa H. [Vertical transmission human T-cell lymphotropic virus type-I (HTLV-I)--genetic diagnosis and assessment of the probable routes of HTLV-I infection]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 1993, 45 (11): 1283.
- Ikeda S., Momita S., Amagasaki T., Tsukasaki K., Yamada Y., Kusumoto Y., Ito M., Kanda N., Tomonaga M., Soda H. et al. Detection of preleukemic state of adult T-cell leukemia (pre-ATL) in HTLV-1 carriers. *Cancer Detect Prev*, 1990, 14 (4): 431.
- Ikeda S., Momita S., Kinoshita K., Kamihira S., Moriuchi Y., Tsukasaki K., Ito M., Kanda T., Moriuchi R., Nakamura T. et al. Clinical course of human T-lymphotropic virus type I

carriers with molecularly detectable monoclonal proliferation of T lymphocytes: defining a low- and high-risk population. *Blood*, 1993, 82 (7): 2017.

Inoue J, Seiki M, Taniguchi T, Tsuru S, Yoshida M. Induction of interleukin 2 receptor gene expression by p40x encoded by human T-cell leukemia virus type 1. *Embo J* 1986 ; 5: 2883-8.

Inoue J., Itoh M., Akizawa T., Toyoshima H. et Yoshida M. HTLV-1 Rex protein accumulates unspliced RNA in the nucleus as well as in cytoplasm. *Oncogene*, 1991, 6 (10): 1753.

Itoyama Y., Minato S., Kira J., Goto I., Sato H., Okochi K. et Yamamoto N. Spontaneous proliferation of peripheral blood lymphocytes increased in patients with HTLV-I-associated myelopathy. *Neurology*, 1988, 38 (8): 1302.

Jacobson S, Shida H, McFarlin DE, Fauci AS, Koenig S. Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. *Nature* 1990 ; 348: 245-8.

Jacobson S., Gupta A., Mattson D., Mingioli E. et McFarlin D. E. Immunological studies in tropical spastic paraparesis. *Ann Neurol*, 1990, 27 (2): 149.

Jacobson S., Shida H., McFarlin D. E., Fauci A. S. et Koenig S. Circulating CD8+ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. *Nature (London)*, 1990, 348 (6298): 245.

Jacobson S., Reuben J. S., Streilein R. D. et Palker T. J. Induction of CD4+, human T lymphotropic virus type-1-specific cytotoxic T lymphocytes from patients with HAM/TSP. Recognition of an immunogenic region of the gp46 envelope glycoprotein of human T lymphotropic virus type-1. *J. Immunol.*, 1991, 146 (4): 1155.

Jacobson S., McFarlin D. E., Robinson S., Voskuhl R., Martin R., Brewah A., Newell A. J. et Koenig S. HTLV-I-specific cytotoxic T lymphocytes in the cerebrospinal fluid of patients with HTLV-I-associated neurological disease. *Ann Neurol*, 1992, 32 (5): 65.

Jacobson S. Cellular immune responses to HTLV-1: Immunopathogenic role in HTLV-1 Associated neurologic Disease. *J. AIDS.*, 1996, 13: S100.

Jeang K. T., Boros I., Brady J., Radonovich M. et Khoury G. Characterization of cellular factors that interact with the human T-cell leukemia virus type I p40x-responsive 21-base-pair sequence. *J. Virol.*, 1988, 62 (12): 4499.

Jeang K. T., Widen S. G., Semmes O. 4. et Wilson S. H. HTLV-I trans-activator protein, tax, is a trans-repressor of the human beta-polymerase gene. *Science*, 1990, 247 (4946): 1082.

- Jung JM., Bruner JM., Ruan S., Langford LA., Kyritsis AP., Kobayashi T., Levin VA., Zhang W. *Oncogene*, 1995, 11:2021.
- Kannagi M., Harada S., Maruyama I., Inoko H., Igarashi H., Kuwashima G., Sato S., Morita M., Kidokoro M., Sugimoto M. et al. Predominant recognition of human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) pX gene products by human CD8⁺ cytotoxic T cells directed against HTLV-I-infected cells. *Int Immunol*, 1991, 3 (3): 761.
- Kannagi M., Matsushita S., Shida H. et Harada S. Cytotoxic T cell response and expression of the target antigen in HTLV-I infection. *Leukemia*, 1994, 8 (1): S54.
- Kaplan J. E., Osame M., Kubota H., Igata A., Nishitani H., Maeda Y., Khabbaz R. F. et Janssen R. S. The risk of development of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis among persons infected with HTLV-I. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1990, 3 (11): 1096.
- Katahira Y., Yashiki S., Fujiyoshi T., Nomura K., Tara M., Mori M., Setoyama M., Kanzaki T., Shida H. et Sonoda S. In vitro induction of cytotoxic T lymphocytes against HTLV-I-infected T-cells from adult T-cell leukemia patients, asymptomatic HTLV-I carriers and seronegative healthy donors. *Jpn J Cancer Res*, 1995, 86 (1): 21.
- Kinoshita T., Shimoyama M., Tobinai K., Ito M., Ito S., Ikeda S., Tajima K., Shimotohno K. et Sugimura T. Detection of mRNA for the tax1/rex1 gene of human T-cell leukemia virus type I in fresh peripheral blood mononuclear cells of adult T-cell leukemia patients and viral carriers by using the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86 (14): 5620.
- Kinoshita T., Tsujimoto A. et Shimotohno K. Sequence variations in LTR and env regions of HTLV-I do not discriminate between the virus from patients with HTLV-I-associated myelopathy and adult T-cell leukemia. *Int. J. Cancer.*, 1991, 47 (4): 491.
- Kira J., Koyanagi Y., Yamada T., Itoyama Y., Goto I., Yamamoto N., Sasaki H. et Sakasi Y. Increased HTLV-1 proviral DNA in HTLV-1 associated myelopathy : a quantitative polymerase chain reaction study. *Ann. Neurol.*, 1991, 29:194.
- Kira J., Itoyama Y., Koyanagi Y., Tateishi J., Kishikawa M., Akizuki S., Kobayashi I., Toki N., Sueishi K., Sato H. et al. Presence of HTLV-I proviral DNA in central nervous system of patients with HTLV-I-associated myelopathy. *Ann Neurol*, 1992, 31 (1): 39.
- Kira J., Koyanagi Y., Yamada T., Itoyama Y., Tateishi J., Akizuki S., Kishikawa M., Baba E., Nakamura M., Suzuki J. et al. Sequence heterogeneity of HTLV-I proviral DNA in the central nervous system of patients with HTLV-I-associated myelopathy [see comments]. *Ann Neurol*, 1994, 36 (2): 149.

- Koenig S., Woods R. M., Brewah Y. A., Newell A. J., Jones G. M., Boone E., Adelsberger J. W., Baseler M. W., Robinson S. M. et Jacobson S. Characterization of MHC class I restricted cytotoxic T cell responses to tax in HTLV-1 infected patients with neurologic disease. *J. Immunol.*, 1993, 151 (7): 3874.
- Komurian F., Pelloquin F. et de-The G. In vivo genomic variability of human T-cell leukemia virus type I depends more upon geography than upon pathologies. *J. Virol.*, 1991, 65 (7): 3770.
- Konishi H., Kobayashi N. et Hatanaka M. Defective human T-cell leukemia virus in adult T-cell leukemia patients. *Mol Biol Med*, 1984, 2 (4): 273.
- Koralnik I., Gessain A. Virus HTLV-I: structure et fonction des protéines de la région pX. *Médecine/Sciences*. 1994, 10, 296.
- Koralnik I. J., Gessain A., Klotman M. E., Lo-Monico A., Berneman Z. N. et Franchini G. Protein isoforms encoded by the pX region of human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89 (18): 8813.
- Koralnik I. J., Fullen J. et Franchini G. The p12I, p13II and p30II proteins encoded by the human T-cell leukemia/lymphotropic virus type I open reading frame I and II are localized in three different cellular compartments. *J. Virol.*, 1993, 67 : 2360.
- Korber B., Oayama A., Donnelly R., Tachibana N. et Essex M. Polymerase chain reaction analysis of defective human T-cell leukemia virus type 1 proviral genomes in leukemic cells of patients with ATLL. *J. Virol.*, 1991, 65(10):5471.
- Koyanagi Y., Itoyama Y., Nakamura N., Takamatsu K., Kira J., Iwamasa T., Goto I. et Yamamoto N. In vivo infection of human T-cell leukemia virus type I in non-T cells. *Virology*, 1993, 196 (1): 25.
- Kramer A., Jacobson S., Reuben J. F., Murphy E. L., Wiktor S. Z., Cranston B., Figueroa J. P., Hanchard B., McFarlin D. et Blattner W. A. Spontaneous lymphocyte proliferation in symptom-free HTLV-I positive Jamaicans [letter]. *Lancet*, 1989, 2 (8668): 923
- Krichbaum-Stenger K., Poiesz B. J., Keller P., Ehrlich G., Gavalchin J., Davis B. H. et Moore J. L. Specific adsorption of HTLV-I to various target human and animal cells. *Blood*, 1987, 70 (5): 1303.
- Kubo RT;, Sette A., Grey HM., Appella E., Sakaguchi N., Zhu N., Arnott D., Sherman N., Shabanowitz J., Michel H., Bodnar WR., Davis TA. et Hunt DF. Definition of specific peptide motifs for the fourth major HLA-A alleles. *J. Immunol.*, 1994, 152:3913.

- Kubota R., Fujiyoshi T., Izumo S., Yashiki S., Maruyama I., Osame M. et Sonoda S. Fluctuation of HTLV-I proviral DNA in peripheral blood mononuclear cells of HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol*, 1993, 42 (2): 147.
- Kubota R., Umehara F., Izumo S., Ijichi S., Matsumuro K., Yashiki S., Fujiyoshi T., Sonoda S. et Osame M. HTLV-I proviral DNA amount correlates with infiltrating CD4+ lymphocytes in the spinal cord from patients with HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol*, 1994, 53 (1): 23.
- Kuroda Y. et Matsui M. Cerebrospinal fluid interferon-gamma is increased in HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol*, 1993, 42 (2): 223.
- Kuroda Y., Matsui M., Kikuchi M., Kurohara K., Endo C., Yukitake M., Matsuda Y., Tokunaga O., Komine-Sakaki A. et Kawaguchi R. In situ demonstration of the HTLV-I genome in the spinal cord of a patient with HTLV-I-associated myelopathy. *Neurology*, 1994, 44 (12): 2295.
- Lal RB., Mainolei E. et Rothlein R. Elevated levels of cICAM-1 in patients with HTLV-1-associated myelopathy and adult T-cell leukemia. *Blood*, 1992, 80:2434.
- Lal RB. Delineation of immunodominant epitopes of the HTLV-1 and 2 and their usefulness in developing serologic assays for detection of antibodies to HTLV-1 and 2. *J. AIDS.*, 1996, S170.
- Leclercq I. Composition nucléotidique des sites d'intégration de HTLV-1 in vivo. DEA, Lille 1996.
- Lehky T. J., Fox C. H., Koenig S., Levin M. C., Flerlage N., Izumo S., Sato E., Raine C. S., Osame M. et Jacobson S. Detection of human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) tax RNA in the central nervous system of HTLV-I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis patients by in situ hybridization [see comments]. *Ann Neurol*, 1995, 37 (2): 167.
- Lenz J., Celander D., Crowther RL., Patarca R., Perkins DW. et Haselsine WA. Determination of the leukemogenicity of a murine retrovirus by sequences within the long terminal repeat. *Nature*, 1984, 308:467.
- Levin M. C., Fox R. J., Lehky T., Walter M., Fox C. H., Flerlage N., Bamford R. et Jacobson S. PCR-in situ hybridization detection of human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) tax proviral DNA in peripheral blood lymphocytes of patients with HTLV-1-associated neurologic disease. *J. Virol.*, 1996, 70 (2): 924.

- Li Y., Golemis E., Hartley JW. et Hopkins N. Disease specificity of non defective Friend and Moloney murine leukemia viruses is controlled by a small number of nucleotides. *J. Virol.*, 1987, 61:693.
- Link H., Cruz M., Gessain A., Gout O., de-The G. et Kam-Hansen S. Chronic progressive myelopathy associated with HTLV-I: oligoclonal IgG and anti-HTLV-I IgG antibodies in cerebrospinal fluid and serum. *Neurology*, 1989, 39 (12): 1566.
- Macatonia S. E., Cruickshank J. K., Rudge P. et Knight S. C. Dendritic cells from patients with tropical spastic paraparesis are infected with HTLV-1 and stimulate autologous lymphocyte proliferation. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1992, 8 (9): 1699.
- MacKhann G. 2., Gibbs C. Jr., Mora C. A., Rodgers-Johnson P. E., Liberski P. P., Gdula W. J. et Zaninovic V. Isolation and characterization of HTLV-I from symptomatic family members with tropical spastic paraparesis (HTLV-I encephalomyeloneuropathy). *J. Infect. Dis.*, 1989, 160 (3): 371.
- Mahieux R., de The G. et Gessain A. The tax mutation at nucleotide 7959 of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) is not associated with tropical spastic paraparesis/HTLV-1-associated myelopathy but is linked to the cosmopolitan molecular genotype [letter]. *J. Virol.*, 1995, 69 (9): 5925.
- Malik K. T., Even J. et Karpas A. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of an adult T cell leukaemia virus/human T cell leukaemia virus type I (ATLV/HTLV-I) isolate of Caribbean origin: relationship to other members of the ATL/HTLV-I subgroup. *J. Gen. Virol.*, 1988, 69 (Pt 7): 1695.
- Manns A. et Blattner W. A. The epidemiology of the human T-cell lymphotropic virus type I and type II: etiologic role in human disease. *Transfusion*, 1991, 31 (1): 67.
- Mansky L. M. et Temin H. M. Lower mutation rate of bovine leukemia virus relative to that of spleen necrosis virus. *J. Virol*, 1994, 68:494-499 : 494.
- Markham PD., Salahuddin SZ., Kalyanaraman VS., Popovic M., Sarin P. et Gallo RC. Infection and transformation of fresh human umbilical cord blood cells by multiple sources of HTLV-1. *Int. J. Cancer.*, 1983, 31:413.
- Maruyama K., Fukushima T., Kawamura K. et Mochizuki S. Chromosome and gene rearrangements in immortalized human lymphocytes infected with human T-lymphotropic virus type I. *Cancer Res*, 1990, 50 (17 Suppl): 5697.
- Matsumura M., Kushida S., Ami Y., Suga T., Uchida K., Kameyama T., Terano A., Inoue Y., Shiraki H., Okochi K. et al. Quantitation of HTLV-I provirus among seropositive blood donors: relation with antibody profile using synthetic peptides. *Int. J. Cancer.*, 1993, 55 (2): 220.

- Martinez M., Pezo V., Marlière P. et Wain-Hobson S. Exploring the robustness of an enzyme by in vitro evolution. *EMBO*, 1996, 15:1203.
- Migone T. S., Lin J. X., Cereseto A., Mulloy J. C., O'Shea J. J., Franchini G. et Leonard W. J. Constitutively activated Jak-STAT pathway in T cells transformed with HTLV-I. *Science*, 1995, 269 (5220): 79.
- Miyai I., Saida T., Fujita M., Kitahara Y. et Hirono N. Familial cases of HTLV-I-associated myelopathy. *Ann Neurol*, 1987, 22 (5): 601.
- Mochizuki M., Watanabe T., Yamaguchi K., Takatsuki K., Yoshimura K., Shirao M., Nakashima S., Mori S., Araki S. et Miyata N. HTLV-I uveitis: a distinct clinical entity caused by HTLV-I. *Jpn J Cancer Res*, 1992, 83 (3): 236.
- Moore G. R., Traugott U., Scheinberg L. C. et Raine C. S. Tropical spastic paraparesis: a model of virus-induced, cytotoxic T-cell-mediated demyelination? *Ann Neurol*, 1989, 26 (4): 523.
- Mori N., Murakami S., Oda S. et Eto S. Human T-cell leukemia virus type 1 Tax induces intracellular adhesion molecule-1 expression in T cells. *Blood*, 1994, 84(1):350.
- Mori N. et Prager D. Transactivation of the interleukin-1 alpha promoter by human T-cell leukemia virus type 1 and type 2 Tax proteins. *Blood*, 1996, 87:3410.
- Motomura M., Nakamura T., Nagasato K., Shibayama K., Kubo S., Nakasono I., Tsujihata M., Sonoda S. et Yashiki S. HTLV-I associated myelopathy in an identical twin [letter]. *Lancet*, 1990, 336 (8706): 55.
- Mukhopadhyaya R. et Sadaie M. R. Nucleotide sequence analysis of HTLV-I isolated from cerebrospinal fluid of a patient with TSP/HAM: comparison to other HTLV-I isolates. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1993, 9 (2): 109.
- Mulloy J. C., Crownley R. W., Fullen J., Leonard W. J. et Franchini G. The human T-cell leukemia/lymphotropic virus type 1 p12I proteins bind the interleukin-2 receptor beta and gamma c chains and affects their expression on the cell surface. *J. Virol.*, 1996, 70 (6): 3599.
- Murphy E. L., Hanchard B., Figueroa J. P., Gibbs W. N., Lofters W. S., Campbell M., Goedert J. J. et Blattner W. A. Modelling the risk of adult T-cell leukemia/lymphoma in persons infected with human T-lymphotropic virus type I. *Int. J. Cancer.*, 1989, 43 (2): 250.

- Nagai H., Kinoshita T., Imamura J., Murakami Y., Hayashi K., Mukai K., Ikeda S., Tobinai K., Saito H., Shimoyama M. et al. Genetic alteration of p53 in some patients with adult T-cell leukemia. *Jpn J Cancer Res*, 1991, 82 (12): 1421.
- Nagai M., Yashiki S., Fujiyoshi T., Fujiyama C., Kitze B., Izumo S., Osame M. et Sonoda S. Characterization of a unic T-cell clone established from a patient with HAM/TSP which recognised HTLV-I infected T-cell antigens as well as spinal cord tissue antigens. *Journal of Neuroimmunology*, 1996, 65, 97.
- Nagasato K., Nakamura T., Ohishi K., Shibayama K., Motomura M., Ichinose K., Tsujihata M. et Nagataki S. Active production of anti-human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) IgM antibody in HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol*, 1991, 32 (2): 105.
- Nagy K., Clapham P., Cheingsong-Popov R. et Weiss R. A. Human T-cell leukemia virus type I: induction of syncytia and inhibition by patients' sera. *Int. J. Cancer.*, 1983, 32 (3): 321.
- Nakada K., Yamaguchi K., Furugen S., Nakasone T., Nakasone K., Oshiro Y., Kohakura M., Hinuma Y., Seiki M., Yoshida M. et al. Monoclonal integration of HTLV-I proviral DNA in patients with strongyloidiasis. *Int. J. Cancer.*, 1987, 40 (2): 145.
- Nakamura S., Nagano I., Yoshioka M., Shimazaki S., Onodera J. et Kogure K. Detection of tumor necrosis factor-alpha-positive cells in cerebrospinal fluid of patients with HTLV-I-associated myelopathy. *J Neuroimmunol*, 1993, 42 (2): 127.
- Nerenberg M., Hinrichs S. H., Reynolds R. K., Khoury G. et Jay G. The tat gene of human T-lymphotropic virus type 1 induces mesenchymal tumors in transgenic mice. *Science*, 1987, 237 (4820): 1324.
- Newbound G. C., Andrews J. M., O'Rourke J. P., Brady J. N. et Lairmore M. D. Human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax mediates enhanced transcription in CD4+ T lymphocytes. *J. Virol.*, 1996, 70 (4): 2101.
- Nicot C., Astier-Gin T., Edouard E., Legrand E., Moynet D., Vital A., Londos-Gagliardi D., Moreau J. P. et Guillemain B. Establishment of HTLV-I-infected cell lines from French, Guianese and West Indian patients and isolation of a proviral clone producing viral particles. *Virus Res.*, 1993, 30 (3): 317.
- Niewiesk S., Daenke S., Parker C. E., Taylor G., Weber J., Nightingale S. et Bangham C. R. The transactivator gene of human T-cell leukemia virus type I is more variable within and between healthy carriers than patients with tropical spastic paraparesis. *J. Virol.*, 1994, 68 (10): 6778.

- Niewiesk S., Daenke S., Parker C. E., Taylor G., Weber J., Nightingale S. et Bangham-CRM. Naturally occurring variants of human T-cell leukemia virus type I tax protein impair its recognition by cytotoxic T lymphocytes and the transactivation function of tax. *J Virol. Journal of Virology*, 1995, 69 (4): 2649.
- Nishimura M., McFarlin D. E. et Jacobson S. Sequence comparisons of HTLV-I from HAM/TSP patients and their asymptomatic spouses. *Neurology*, 1993, 43 (12): 2621.
- Nishioka K., Maruyama I., Sato K., Kitajima I., Nakajima Y. et Osame M. Chronic inflammatory arthropathy associated with HTLV-I [letter]. *Lancet*, 1989, 1 (8635): 4410.
- Ohshima K., Kikuchi M., Masuda Y., Kobari S., Sumiyoshi Y., Eguchi F., Mohtai H., Yoshida T., Takeshita M. et Kimura N. Defective provirus form of human T-cell leukemia virus type I in adult T-cell leukemia/lymphoma: clinicopathological features. *Cancer Res*, 1991, 51 (17): 4639.
- Orita S., Saiga A., Takagi S., Tanaka T., Okumura K., Aono Y., Hinuma Y. et Igarashi H. A novel alternatively spliced viral mRNA transcribed in cells infected with human T cell leukemia virus type 1 is mainly responsible for expressing p21X protein [published erratum appears in *FEBS Lett* 1992 Mar 24;299(1):117]. *FEBS Lett*, 1991, 295 (1-3): 127.
- Osame M., Usuku K., Izumo S., Ijichi N., Amitani H., Igata A., Matsumoto M. et Tara M. HTLV-I associated myelopathy, a new clinical entity [letter]. *Lancet*, 1986, 1 (8488): 1031.
- Palmeri D. & Malim M. The Human T-cell Leukemia Virus type I post-transcriptional trans-activator Rex contains a nuclear Export Signal. *J. Virol.*, 1996, 70: 6442.
- Pann ZQ., Reardon JT., LI L., Flores-Rozas H., Legerski R., Sancar A. et Hurwitz J. Inhibition of nucleotide excision repair by the cyclin-dependant kinase inhibitor p21. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270:22008.
- Parker C. E., Daenke S., Nightingale S. et Bangham C. R. Activated, HTLV-1-specific cytotoxic T-lymphocytes are found in healthy seropositives as well as in patients with tropical spastic paraparesis. *Virology*, 1992, 188 (2): 628.
- Parker C. E., Nightingale S., Taylor G. P., Weber J. et Bangham C. R. Circulating anti-Tax cytotoxic T lymphocytes from human T-cell leukemia virus type I-infected people, with and without tropical spastic paraparesis, recognize multiple epitopes simultaneously. *J. Virol.*, 1994, 68 (5): 2860.
- Picqué C., Connan F., Levilain JP., Choppin J. et Dokhélard MC. Among all HTLV-1 proteins, Tax, polymerase and envelope proteins are predicted as preferential targets for the LHA-A2 restricted cytotoxic T-cell response. *J. Virol.*, 1996, 70 (8):4919.

- Poiesz B. J., Ruscetti F. W., Gasdar A. F., Bunn F. A., Minna J. D. et Gallo R. C. Detection and isolation of type C retrovirus particules from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 77 : 7415.
- Popovic M., Sarin P., Robert-Guroff M., Kalyanaraman V. Mann. D., Minowada J. & Gallo R. Isolation and Transmission of Human Retrovirus (Human T-Cell Leukaemia Virus). *Science*, 1983, 219. 856.
- Rassard E., Nelbach L. et Jolicoeur P. Cas-Br-E murine leukemia virus: sequencing the palalitogenic region of its genome and derivation of specific probes to study its origine and the structure of its recombinant genomes in leukemic isolates. *J. Virol.*, 1986, 60:910.
- Ratner L., Josephs S. F., Starcich B., Hahn B., Shaw G. M., Gallo R. C. et Wong-Staal F. Nucleotide sequence analysis of a variant human T-cell leukemia virus (HTLV-Ib) provirus with a deletion in pX-I. *J. Virol.*, 1985, 54 (3): 781.
- Powers DC. et Belshe RB. Effect of age on cytotoxic lymphocyte memory as well as serum and local antibody responses elicited by inactivated influenza virus vaccine. *J. Inf. Dis.*, 1993, 167:584.
- Reid R. L., Lindholm P. F., Mireskandari A., Dittmer J. et Brady J. N. Stabilization of wild-type p53 in human T-lymphocytes transformed by HTLV-I. *Oncogene*, 1993, 8 (11): 3029.
- Renjifo B., Borrero I. et Essex M. Tax mutation associated with tropical spastic paraparesis/human T-cell leukemia virus type I-associated myelopathy. *J. Virol.*, 1995, 69 (4): 2611.
- Richardson J. H., Edwards A. J., Cruickshank J. K., Rudge P. et Dalglish A. G. In vivo cellular tropism of human T-cell leukemia virus type 1. *J. Virol.*, 1990, 64 (11): 5682.
- Saida T., Saida K., Funauchi M., Nishiguchi E., Nakajima M., Matsuda S., Ohta M., Ohta K., Nishitani H. et Hatanaka M. HTLV-I myelitis: isolation of virus, genomic analysis, and infection in neural cell cultures. *Ann N Y Acad Sci*, 1988, 540 : 636.
- Saito M., Furukawa Y., Kubota R., Usuku K., Sonoda S., Izumo S., Osame M. et Yoshida M. Frequent mutation in pX region of HTLV-1 is observed in HAM/TSP patients, but is not specifically associated with the central nervous system lesions. *J Neurovirol*, 1995, 1 : 286.
- Sakai M., Eguchi K., Terada K., Nakashima M., Yamashita I., Ida H., Kawabe Y., Aoyagi T., Takino H., Nakamura T. et al. Infection of human synovial cells by human T cell

- lymphotropic virus type I. Proliferation and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor production by synovial cells. *J Clin Invest*, 1993, 92 (4): 1957.
- Sakashita A., Hattori T., Miller C. W., Suzushima H., Asou N., Takatsuki K. et Koeffler H. P. Mutations of the p53 gene in adult T-cell leukemia. *Blood*, 1992, 79 (2): 477.
- Salazard-Gruesco EF., Holzer TJ., Gutierrez RA., Casey JM., Desai SM., Devare SG. et al., Familiale spastic paraparesis syndrome associated with HTLV-1 infection. *N. Engl. J. Med.*, 1990, 32:732.
- Sanada I., Ishii T., Matsuoka M., Kumagai E., Nishimura H., Yamaguchi K. et Takatsuki K. Chromosomal abnormalities in non-Hodgkin lymphoma with peripheral T-cell type: effect of HTLV-I infection. *Hematol Oncol*, 1987, 5 (3): 157.
- Seiki M., Hattori S., Hirayama Y. et Yoshida M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983, 80 (12): 3618.
- Seiki M., Inoue J., Takeda T., Hikikoshi A., Sato M. et Yoshida M. The p40x of human T-cell leukemia virus type I is a trans-acting activator of viral gene transcription. *Jpn J Cancer Res*, 1985, 76 (12): 1127.
- Seimaj K., Raine CS. et Cross A. Anti-TNF therapy abrogates autoimmune demyelination. *Ann. Neurol.*, 1991, 30:694.
- Semmes O. et Jeang KT. Localization of the HTLV-1 Tax to subnuclear compartments that overlap with interchromatin speckles. *J. Virol.*, 1996, 70 (9):6347.
- Setoyama M., Fujiyoshi T., Mizoguchi S., Katahira Y., Yashiki S., Tara M., Kanzaki T. et Sonoda S. HTLV-I messenger RNA is expressed in vivo in adult T-cell leukemia/lymphoma patients: an in situ hybridization study. *Int. J. Cancer.*, 1994, 57 (5): 760.
- Sette A. Vitiello A., Rehman B., Fowler P., Nayarsina R., Kast WM., Melief CJM., Oseroff C. Yan L., Sidney M., del Guercio M., Southwood S., Kubo T., Chesnut RW., Grey HM. et Chisari FV. The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J. Immunol.*, 1994, 153:5586.
- Sharief MK. et Hentges R. Association between TNFalpha and disease progression in patients with MS. *N. Engl. J. Med.*, 1991, 325:467.
- Shimoyama M. Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br J Haematol*, 1991, 79 (3): 428.

- Shinzato O., Ikeda S., Momita S., Nagata Y., Kamihira S., Nakayama E. et Shiku H. Semiquantitative analysis of integrated genomes of human T-lymphotropic virus type I in asymptomatic virus carriers. *Blood*, 1991, 78 (8): 2082.
- Sinangil F., Harada S., Purtilo D. T. et Volsky D. J. Host cell range of adult T-cell leukemia virus. I. Viral infectivity and binding to various cells as detected by flow cytometry. *Int. J. Cancer.*, 1985, 36 (2): 191.
- Sodroski J., Rosen W. & Haseltine W. (1984). Transacting transcriptional activation of the long terminal human T lymphotropic viruses in infected cells. *Science*, 225, 381.
- Sodroski J. G., Goh W. C., Rosen C. A., Salahuddin S. Z., Aldovini A., Franchini G., Wong-Staal F., Gallo R. C., Sugamura K., Hinuma Y. et al. trans-Activation of the human T-cell leukemia virus long terminal repeat correlates with expression of the x-lor protein. *J. Virol.*, 1985, 55 (3): 831.
- Sonoda S. Fujiyoshi T. et Yashiki S. Immunogenetics of HTLV-I/II and associated diseases. *J. AIDS.*, 1996, 13:S119.
- Steinman L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell*, 1996, 85:299.
- Sugamura K., Fujii M., Kannagi M., Sakitani M., Takeuchi M. et Hinuma Y. Cell surface phenotypes and expression of viral antigens of various human cell lines carrying human T-cell leukemia virus. *Int. J. Cancer.*, 1984, 34 (2): 221.
- Summers BA., Griesen HA. et Appel MJG. Possible initiation of viral encephalomyelitis in dogs by migrating lymphocytes infected with Distemper virus. *Lancet*, 1978, 1:187.
- Suzuki T., Fujisawa J. I., Toita M. et Yoshida M. The trans-activator tax of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) interacts with cAMP-responsive element (CRE) binding and CRE modulator proteins that bind to the 21-base-pair enhancer of HTLV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90 (2): 610.
- Suzuki T., Hirai H., Fujisawa J., Fujita T. et Yoshida M. 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*, 1993, 8 (9): 2391.
- Suzuki T., Hirai H., Murakami T. et Yoshida M. 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*, 1995, 10 (6): 1199.

- Suzuki T., Kitao S., Matsushime H. et Yoshida M. HTLV-1 Tax protein interacts with cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4A and counteracts its inhibitory activity towards CDK4. *EMBO J.*, 1996, 15 (7): 1607.
- Szurek PF., Yuen PH., Jersy R. et Wrong PKH. Identification of point mutations in the envelope gene of Moloney murine leukemia virus TB temperature sensitive paralytogenic mutants *tsl*: molecular determinant of neurovirulence. *Virology*, 1988, 62:357.
- Tachibana N, Okayama A, Ishizaki J, Yokota T, Shishime E, Murai K, Shioiri S, Tsuda K, Essex M, Mueller N. Suppression of tuberculin skin reaction in healthy HTLV-I carriers from Japan. *Int J Cancer* 1988 ; 42: 829.
- Tamyia S., Matsuoka M., Etoh K., Watanabe T., Kamihira S., Yamaguchi K. et Takatsuki K. Two types of defective human T-lymphotropic virus type 1 provirus in Adult T-cell leukemia. *Blood*, 1996, 88:3065.
- Tanaka A., Takahashi C., Yamaoka S., Nosaka T., Maki M. et Hatanaka M. Oncogenic transformation by the tax gene of human T-cell leukemia virus type I in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87 (3): 1071.
- Tanaka Y., Fukudome K., Hayashi M., Takagi S. et Yoshie O. Induction of ICAM-1 and LFA-3 by Tax 1 of the human T-cell leukemia virus type 1 and mechanism of down regulation of ICAM-1 or LFA-1 in adult-T-cell-leukemia cell lines. *Int. J. Cancer*, 1995, 60:554.
- Tanaka Y., Hayashi M., Takagi S. et Yoshie O. Differential transactivation of the intercellular adhesion molecule 1 gene promoter by Tax1 and Tax2 of the human T-cell leukemia viruses. *J. Virol.*, 1996, 70:8508.
- Tatewaki M., Yamaguchi K., Matsuoka M., Ishii T., Miyasaka M., Mori S., Takatsuki K. et Watanabe T. Constitutive overexpression of the L-selectin gene in fresh leukemic cells of adult T-cell leukemia that can be transactivated by human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax. *Blood*, 1996, 86:3109.
- Tendler C. L., Greenberg S. J., Blattner W. A., Manns A., Murphy E., Fleisher T., Hanchard B., Morgan O., Burton J. D., Nelson D. L. et al. Transactivation of interleukin 2 and its receptor induces immune activation in human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy: pathogenic implications and a rationale for immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990, 87 (13): 5218.
- Tochikura T., Iwahashi M., Matsumoto T., Koyanagi Y., Hinuma Y. et Yamamoto N. Effect of human serum anti-HTLV antibodies on viral antigen induction in vitro cultured peripheral lymphocytes from adult T-cell leukemia patients and healthy virus carriers. *Int. J. Cancer.*, 1985, 36 (1): 1.

- Trujillo J. M., Concha M., Munoz A., Bergonzoli G., Mora C., Borrero I., Gibbs C. Jr. et Arango C. Seroprevalence and cofactors of HTLV-I infection in Tumaco, Colombia. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 1992, 8 (5): 651.
- Tsuchiya H., Fujii M., Niki T., Tokuhara M. Mutsui M. & Seiki M. Human T cell leukemia virus type I activates transcription of the human fra-1 gene through multiple cis elements responsive to transmembrane signals. *J. Virol.* 1993, 67, 7001.
- Tsukada N., Tanaka Y. et Yanagisawa N. Autoantibodies to brain endothelial cells in the sera of patients with human T-lymphotropic virus type I associated myelopathy and other demyelinating disorders. *J Neurol Sci*, 1989, 90 (1): 33.
- Uchiyama T., Yodoi J., Sagawa K., Takatsuki K. et Uchino H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 15 cases. *Blood*, 1977, 50 : 481.
- Umar A., Buermeier A., Simon J., Thomas D., Clark A. Liskay M. et Kunkel T. Requirement for PCNA in DNA Mismatch repair at a step preceding DNA reymthesis. *Cell*, 1996, 87:65.
- Utz U., Banks D., Jacobson S. et Biddison W. E. Analysis of the T-cell receptor repertoire of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) Tax-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes from patients with HTLV-1-associated disease: evidence for oligoclonal expansion. *J. Virol.*, 1996, 70 (2): 843.
- Wagner S. et Green M. R. HTLV-I Tax protein stimulation of DNA binding of bZIP proteins by enhancing dimerization. *Science*, 1993, 262 (5132): 395.
- Wattel E., Mariotti M., Agis F., Gordien E., Le-Coeur F. F., Prin L., Rouger P., Chen I. S., Wain-Hobson S. et Lefrere J. J. Quantification of HTLV-1 proviral copy number in peripheral blood of symptomless carriers from the French West Indies. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 1992, 5 (9): 943.
- Wattel E., Vartanian J. P., Pannetier C. et Wain-Hobson S. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *J. Virol.*, 1995, 69 (5): 2863.
- Weiss R., Clapham P., Nagy K. & Hoshino H. (1985). Envelope properties of Human T-Cell Leukaemia Viruses. *Current. Top. Microbiol. Immunol.* 1985, 115, 235.
- Weng NP, Levine BL, June CH, Hodes RJ. Human naive and memory T lymphocytes differ in telomeric length and replicative potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 11091.
- Wiley CA. et Nelson JA. *Ann J. Pathol.*, 1988, 133:355.**

- Yamaguchi K. et Takatsuki K. Adult T cell leukaemia-lymphoma. *Baillieres Clin Haematol*, 1993, 6 (4): 899.
- Yamamoto K., Oka T. Iwahara Y., Sugito S., Tsuchida N. et Miyoshi I. *Jpn J. Cancer Res.*, 1993, 84:4.
- Yamamoto K., Aono H., Nakajima T., Hasunuma T. et Nishioka K. Oligoclonal proliferation of human T-cell leukemia virus type I infected lymphocytes in lesions of virus-induced arthropathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 208 (3): 1040.
- Yamamoto N., Schneider J., Hinuma Y. et Hunsmann G. Adult T-cell leukemia-associated antigen (ATLA): detection of a glycoprotein in cell- and virus-free supernatant. *Z Naturforsch C*, 1982, 37 (7-8): 731.
- Yamamoto N., Chosa T., Koyanagi Y., Tochikura T., Schneider J. et Hinuma Y. Binding of adult T-cell leukemia virus to various hematopoietic cells. *Cancer Lett*, 1984, 21 (3): 261.
- Yoshida M., Miyoshi I. et Hinuma Y. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982, 79 (6): 2031.
- Yoshida M., Seiki M., Yamaguchi K. et Takatsuki K. Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia virus in the disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984, 81 (8): 2534.
- Yoshida M. Mechanism of transcriptional activation of viral and cellular genes by oncogenic protein of HTLV-1. *Leukemia*, 1994, 8 (1): S51.
- Yoshida M. Molecular biology of HTLV-1: recent progress. *J. AIDS.*, 1996, 13:S63
- Yoshioka A., Hirose G., Ueda Y., Nishimura Y. et Sakai K. Neuropathological studies of the spinal cord in early stage HTLV-I-associated myelopathy (HAM). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 1993, 56 (9): 1004.
- Zacharopoulos VR., Perotti ME. et Phillips DM. Lymphocyte-facilitated infection of epithelia by human T-cell lymphotropic virus type 1. *J. Virol.*, 1992, 66(7):4601.
- Zhao L. J. et Giam C. Z. Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) transcriptional activator, Tax, enhances CREB binding to HTLV-I 21-base-pair repeats by protein-protein interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89 (15): 7070.

Zoubak S., Richardson JH., Rynditch A., Hollsberg P., Hafler D., Lever A. et Bernanardi G.
Regional specificity of HTLV-1 proviral integration in human genome. *Gene*, 1994,
143:155.

ANNEXES

HTLV-1 et pathologie hématologique

Marielle Cavrois*,
Eric Wattel*,**

Seule une faible proportion d'individus infectés par HTLV-1 développe une leucémie T de l'adulte (ATL). Cliniquement peu spécifique, l'ATL est caractérisée par une latence prolongée laissant supposer l'intervention de plusieurs facteurs. Le mode réplcatif particulier de HTLV-1 par expansion clonale des cellules infectées réalise, au stade asymptomatique, une prolifération lymphoïde chronique *a minima*. Les protéines régulatrices codées par la région pX du virus jouent un rôle central dans la régulation de la réplication du virus. Réplication et transformation semblent être intriquées dans l'histoire naturelle de l'infection. En entretenant la prolifération chronique des cellules infectées, les protéines de la région pX participent à l'initiation de la transformation. D'autres facteurs semblent intervenir dans la promotion tumorale : délétions provirales en 5', cofacteurs infectieux... Au stade ultime d'ATL, des anomalies génétiques non spécifiques, comme l'inhibition du gène suppresseur de tumeurs p53, sont retrouvées. L'association zidovudine-interféron a récemment permis d'obtenir un taux élevé de rémissions complètes au cours de l'ATL. La synergie d'action antitumorale de ces deux molécules semble plus en cause dans son efficacité que l'activité inhibitrice de la zidovudine sur la transcriptase inverse. En effet, à tous les stades de l'infection, HTLV-1 demeure un virus qui se multiplie beaucoup en se répliquant peu par transcription inverse.

Mots-clés : HTLV-1, leucémie T de l'adulte.

Key-words : HTLV-1, adult T cell leukemia.

ADRESSES

* Institut de recherche sur le cancer de Lille, place de Verdun, 59000 Lille.

** Service des maladies du sang, CHU, 1, place de Verdun, 59037 Lille France.

En 1977, Uchiyama décrivait la leucémie T de l'adulte (*adult T-cell leukemia* ou ATL), caractérisée par son aspect cytologique, une fréquence élevée d'atteinte cutanée et d'hypercalcémie et par l'origine géographique des patients qui fit supposer une origine virale à l'ATL [1]. En 1980, le premier rétrovirus humain pathogène était découvert [2, 3]. L'équipe américaine isolait HTLV-1 (*Human T-Leukemia Virus type 1*) à partir d'une culture de cellules de

mycosis fongoïde [2] alors que le groupe japonais le purifiait à partir de cellules d'ATL [3].

HTLV-1 est un rétrovirus de la famille des oncornavirus s'intégrant au hasard (Fig. 1). Sa structure génétique, dépourvue d'oncogène, est caractérisée par sa stabilité et sa complexité. On estime à 15/20 millions le nombre de sujets infectés dans le monde. Les grands foyers d'endémie sont le Japon, la région des Caraïbes, l'Afrique intertropicale, l'Amérique du Sud

RÉFÉRENCES

1. Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K, Uchino H. Adult T-cell leukemia: clinical and hematologic features of 15 cases. *Blood* 1977; 50: 481-92.
2. Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gasdar AF, Bunn FA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Nat Acad Sci USA* 1980; 77: 7415-21.
3. Yoshida M, Mioshi I, Hinuma Y. Isolation and characterization of a retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Nat Acad Sci USA* 1982; 79: 2031-40.
4. Gessain A, Barin F, Vernant J, Maurs L, Gout O, Calander A, De Thé G. Antibodies to human T-lymphotropic virus type 1 in patients with Tropical Spastic Paraparesis. *Lancet* 1985; ii: 407-10.
5. Blattner W. Human T-lymphotropic viruses and diseases of long latency. *Ann Intern Med* 1989; 111 (1): 4-5.
6. Ikeda S, Momita S, Kinoshita K, Kamihira S, Y. M, Tsukasaki K, Ito M, Kanda T, Nakamura T, Tomonaga M. Clinical course of Human T-lymphotropic virus type 1 carriers with molecularly detectable monoclonal proliferation of T lymphocytes; defining a low and high-risk population. *Blood* 1993; 82 (7): 2017-24.
7. Yoshida M, Seiki M, Yamaguchi K, Takatsuki K. Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia virus in the disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 2534-7.
8. Maruyama K, Fukushima T, Kawamura K, Mochizuki S. Chromosome and gene rearrangements in immortalized human lymphocytes infected with Human T-lymphotropic Virus type 1. *Cancer Res* 1990; 50 (17).
9. Ejima E, Rosenblatt D, Massari M, Quan E, Stephens D, Rosen CA, Prager D. Cell-type-specific transactivation of the parathyroid hormone related protein gene promoter by the Human T-lymphotropic Virus type 1 (HTLV-I) Tax and HTLV-II Tax proteins. *Blood* 1993; 81 (4): 1017-24.
10. Gill PS, Masood R, Cai J, Louie S, Harrington W, Kaplan M, Aggarwal V, Ling G, Law R, Levine AM. Novel (antiviral) therapy for Adult T-Cell leukemia secondary to HTLV-1 infection. *Blood* 1992; [suppl.] 1: 287.
11. Cesarman E, Chadburn A, Inghirami G, Gaidano G, Knowles DM. Structural and functional analysis of oncogenes and tumor suppressor genes in adult T-cell leukemia/lymphoma shows frequent p53 mutations. *Blood* 1992; 80 (12): 3205-16.

et la Mélanésie. La contamination s'effectue par les mêmes voies que celle du VIH avec une contagiosité plus faible: l'infection par voie sexuelle se déroule beaucoup plus dans le sens homme-femme que dans le sens femme-homme; chez l'enfant, l'infection provient quasi exclusivement de l'allaitement maternel. Outre l'ATL, HTLV-1 est responsable de la paraparésie spastique tropicale (*tropical spastic paraparesis/HTLV associated myelopathy* ou TSP/HAM) [4]; sa participation à d'autres affections inflammatoires, auto-immunes ou néoplasiques, fait actuellement l'objet de débats.

Unique affection humaine néoplasique liée directement à l'infection par un rétrovirus, l'ATL se caractérise par une pathogénie originale différente de celles rencontrées au cours de l'infection par les autres rétrovirus oncogènes connus. Les mécanismes d'oncogenèse sont incomplètement élucidés. Comme pour toute affection néoplasique, le développement de l'ATL repose sur l'intrication de plusieurs facteurs où le virus interviendrait dans l'initiation du processus leucémique. Les données concernant la leucémogénèse au cours de l'infection par HTLV-1 reposent actuellement sur la meilleure connaissance que nous avons de l'organisation génétique du provirus et de l'activité des protéines régulatrices codées par la région pX du provirus. D'autre part, des événements tardifs de la transformation telle l'inactivation d'anti-oncogènes ont été mis en évidence. Enfin, les cofacteurs infectieux et la mise en évidence d'une expansion clonale des lymphocytes infectés à tous les stades de l'infection permettent d'approcher les événements précoces de l'oncogenèse liée à l'infection par HTLV-1.

Aspects cliniques de l'ATL

L'ATL est une hémopathie lymphoïde caractérisée par une latence prolongée, supérieure à 20 ans. Il s'agit donc d'une affection de l'adulte le plus souvent infecté par l'allaitement maternel [5]. La latence prolongée de l'affection laisse supposer l'intervention de nombreux facteurs dans la genèse de l'ATL.

Plusieurs formes représentées dans le *tableau 1* sont décrites en rapport avec le mode d'installation [6], la présentation clinique et l'évolution. Toutes sont caractérisées par l'intégration monoclonale du provirus détectée par blot de Southern [7].

La prolifération maligne est constituée de cellules très particulières dont le noyau multilobé peut prendre la forme d'un trèfle à 3 ou 4 feuilles. Il s'agit d'une prolifération mature de phénotype helper (CD2⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁻) exprimant le DR et le CD25, récepteur β de l'interleukine 2. L'aspect histologique ganglionnaire n'est pas spécifique.

Les anomalies cytogénétiques sont fréquentes multiples et non spécifiques: trisomie 3 ou 7, perte de l'X, anomalie des chromosomes 6 et 14 [8].

Cette prolifération lymphoïde est responsable d'un tableau clinique très polymorphe, associant syndrome tumoral et fréquemment des lésions osseuses, des localisations cutanées, une hypercalcémie en rapport avec la transactivation par p40^{tax} du promoteur de la parathormone [9]. Chez un patient séropositif pour HTLV-1, l'association de ces différents signes à une infection par *Strongyloides stercoralis* et la présence de cellules en trèfles sont très évocateurs du diagnostic d'ATL. C'est la démonstration, par blot de Southern, d'une intégration monoclonale du provirus dans l'ADN tumoral qui confirmera le diagnostic.

L'évolution des formes aiguës et lymphomateuses est constamment péjorative avec résistance aux différents traitements habituellement proposés dans les lymphomes et leucémies aiguës. Même l'allogreffe de moelle, grevée d'une lourde toxicité chez des patients profondément immunodéprimés par l'infection HTLV, ne permet pas d'améliorer le pronostic. Récemment, l'association Zidovudine- α interféron a permis l'obtention de réponses partielles ou complètes. Ces résultats préliminaires prometteurs constituent la première approche thérapeutique efficace [10].

Les événements tardifs de la leucémogénèse

L'ATL ne comporte pas d'anomalie cytogénétique spécifique permettant de rapporter à un gène particulier l'acquisition et/ou le maintien du phénotype malin. Il est probable que l'inhibition par le virus du système réparateur de l'ADN favorise la survenue d'anomalies cytogénétiques multiples et complexes. La recherche d'anomalies de c-myc, RB et des gènes de la famille Ras n'a pas montré d'anomalie chez 10 patients étudiés [11].

Tableau I
Principales formes cliniques d'ATL

Formes cliniques	Clinique	Lymphocytose	Intégration monoclonale du provirus blot de Southern
Pré-ATL	• Latence	• Normale ou modérément élevée	• Constante
Progressive (smouldering)	• Atteinte cutanée isolée	• Normale	• Constante
Chronique	• Atteinte des organes hématopoïétiques	• Élevée	• Constante
Crise (crisis)	• Évolution d'une forme progressive ou chronique vers une forme aiguë		• Constante
Aiguë	• Atteinte des organes hématopoïétiques • Localisations cutanées • LDH élevées • Hypercalcémie (50 %) • Ostéolyse • Immunosuppression	• Élevée	• Constante
Lymphomateuse	• Idem aiguë	• Normale	• Constante

Devant une prolifération T CD4⁺, le diagnostic de leucémie T de l'adulte liée à l'infection par HTLV-1 repose sur la mise en évidence par blot de Southern d'une intégration monoclonale du provirus HTLV-1. Le terme leucémie T de l'adulte ne s'applique qu'aux proliférations comportant au moins 5% de cellules anormales. Six formes cliniques sont décrites.

Les mutations de p53 sont retrouvées dans 30 à 50 % des ATL [11, 12]. Lorsqu'elle a été recherchée, une perte d'hétérozygotie a constamment été retrouvée. Chez un patient, une mutation homozygote du codon 273 de p53 a été retrouvée au cours du passage vers une forme aiguë d'une forme chronique d'ATL où la p53 était normale. La fréquence élevée des anomalies p53 laisse supposer un rôle important de cet anti-oncogène au cours de l'ATL. Comme au cours des autres tumeurs où p53 intervient, il semble que cette anomalie génétique soit un événement tardif de la leucémogénèse.

Indépendamment des mutations ou délétions, une stabilisation de la p53 sauvage a été démontrée dans les lignées C81,

MT4 et HUT 102 où l'analyse de l'ensemble de l'ADN complémentaire de p53 s'est avérée normale [13]. Cette stabilisation de la protéine p53, de mécanisme actuellement inconnu, peut être considérée comme une inhibition fonctionnelle et entraîner ainsi le même effet qu'une inactivation par délétion ou mutation.

Organisation génétique du provirus

Comme tout rétrovirus, HTLV-1 est un virus à ARN qui, après reverse-transcription, s'intègre dans le génome humain sous forme d'ADN proviral. L'analyse par blot de

Southern du provirus intégré a révélé que les sites d'intégration de HTLV-1 variaient d'un patient à l'autre, de telle sorte qu'un mécanisme d'insertion-promotion ne peut être retenu dans la pathogénie de l'ATL comme au cours de l'infection par d'autres rétrovirus lents.

La séquence provirale [14], schématisée (figure 2), comporte les deux régions terminales répétées (LTR) ainsi que les gènes de structure communs aux différents rétrovirus : Gag codant pour les antigènes de groupe, Pol pour la transcriptase inverse et l'intégrase, env pour les glycoprotéines d'enveloppe. Les LTR de HTLV-1 sont caractérisés par leur longue taille, ils constituent un élément régulateur essentiel de la réplication du virus. Les LTR sont des promoteurs inductibles de tous les gènes proviraux. La région U3 des LTR comporte trois répétitions incomplètes de 21pb qui correspondent à des récepteurs pour de nombreuses protéines cellulaires ainsi que pour certaines protéines virales, telle la protéine régulatrice p40^{tax}.

La glycoprotéine d'enveloppe Gp46 de HTLV-1 est caractérisée par son pouvoir mitogène [15]. Son expression permet donc l'activation et la prolifération des lymphocytes T favorisant la réinfection de nouvelles cellules et l'expansion clonale des lymphocytes infectés ou non.

La séquence provirale de HTLV-1 est dépourvue d'oncogène [14], écartant ainsi un mécanisme de transduction dans l'ATL

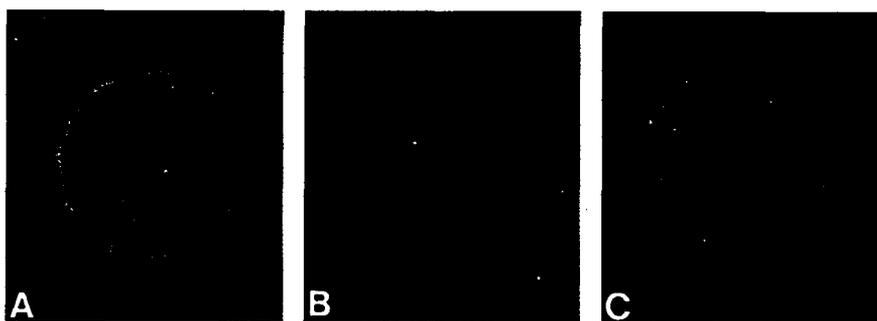


Figure 1. **Génomes HTLV-1 intégrés dans l'ADN humain.** Détection par hybridation fluorescente in situ sur noyaux interphasiques de cellules de la lignée MT4. Les signaux jaunes correspondent à l'hybridation d'une sonde provirale dans l'ADN cellulaire hôte. Les 3 cellules représentées (A, B, C) correspondent à 1, 2 et 3 provirus intégrés.

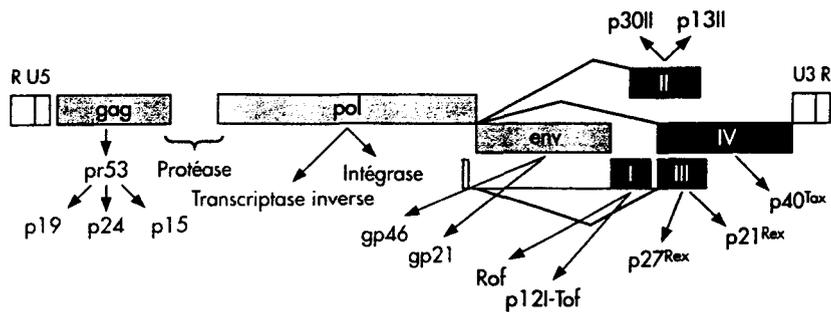


Figure 2. **Organisation du génome proviral.** Les gènes de structure sont représentés en vert. La région pX, comprenant 4 cadres ouverts de lectures (ORF open reading frame) est colorée en rouge. Elle code pour l'ensemble du système régulateur de la réplication.

RÉFÉRENCES

- Sakashita A, Hattori T, Miller C, Suzushima H, Asou N, Takatsuki K. Mutations of the p53 gene in adult T-cell leukemia. *Blood* 1992; 79 (2) : 477-80.
- Reid RL, Lindholm PF, Mireskandari A, Dittmer J, Brady JN. Stabilization of wild-type p53 in human T-lymphocytes transformed by HTLV-1. *Oncogene* 1993; 8 : 3029-36.
- Seiki M, Hattori S, Hirayama Y, Yoshida M. Human adult T-cell leukemia virus : Complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80 : 3618-22.
- Gazzolo L, Duc-Dodon M. Direct activation of resting T lymphocytes by human T-lymphotropic virus type I. *Nature* 1987; 326 (6114) : 714-7.
- Koralnik JJ, Gessain A. Virus HTLV-1 : Structure et fonction des protéines de la région Px. *Médecine/Sciences* 1994; 10 (3) : 296-305.
- Gessain A, Gallo RC, Franchini G. Low degree of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I genetic drift *in vivo* as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations. *J Virol* 1992; 66 (4) : 2288-95.
- Meyerhans A, Cheyner R, Albert J, Seth M, Kwok S, Sninsky J, Morfeldt-Manson L, Asjö B, Wain-Hobson S. Temporal fluctuation in HIV quasispecies *in vivo* are not reflected by sequential HIV isolations. *Cell* 1989; 58 : 901-10.
- Dougherty JP, Temin HM. High mutation rate of a spleen necrosis virus based retrovirus vector. *Mol Cell Biol* 1986; 6 : 4387-95.
- Wattel E, Mariotti M, Agis F, Gordien E, LeCoeur FF, Prin L, Rouger P, Chen IS, Wain-Hobson S, Iferre J. Quantification of HTLV-1 proviral copy number in peripheral blood of symptomless carriers from the French West Indies. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992; 5 (9) : 943-6.
- Grassmann R, Fleckenstein B, Desrosiers RC. Viral transformation of human T lymphocytes. *Advances in cancer research* 1994; 63 : 211-43.
- Green PC-I. Regulation of human T-cell leukemia virus expression. *Faseb J* 1990; 4 (2) : 169-75.
- Greene WC, Leonard WJ, Wano Y, Svetlik PB, Pfeffer NJ, Sodrowski JG, Rosen CA, Goh WC, Haseltine WA. Transactivator gene of HTLV-I induces IL-2 receptor and IL-2 cellular gene expression. *Science* 1986; 232 : 877-80.

comme au cours des tumeurs induites par les oncornavirus animaux.

Outre les séquences communes aux différents rétrovirus, HTLV-1 comporte une région d'environ 2 kb située en amont du LTR3' et initialement appelée pX en raison de sa nature inconnue. Cette région comporte au moins quatre cadres ouverts de lecture qui permettent, par simple ou double épissage, la synthèse de messagers codant pour au moins six protéines (revue générale dans [16]). Les protéines p40^{Tax} et p27^{Rex} furent les premières isolées; leur rôle dans la régulation de la réplication les rapproche des protéines Tat et Rev des virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1 et -2). D'autre part, l'activité transactivatrice de p40^{Tax} constitue un des premiers facteurs viraux de la leucémogénèse.

La stabilité génétique du provirus constitue l'un des aspects fondamentaux des oncornavirus [17]. Ainsi, les différents isolats de HTLV-1 sont génétiquement très proches. Cette propriété oppose HTLV-1 aux VIH, caractérisés par leur grande variabilité génétique [18]. La variabilité génétique des rétrovirus repose sur le taux élevé d'erreurs commises par les transcriptases inverses générant un taux de mutations d'environ 1 base par génome par cycle répliatif [19]. La circulation chez les porteurs asymptomatiques d'une charge virale 10 à 100 fois plus élevée que ne l'est celle du VIH-1 au stade SIDA [20] s'accompagne d'une stabilité génétique proche de celle des génomes eucaryotes, soit 1 million de fois plus importante que celle des rétrovirus. L'association paradoxale d'une charge provirale élevée avec une étonnante stabilité génétique est l'une des caractéristiques fondamentales de HTLV-1. Elle implique nécessairement une réplication originale sans mutation.

Protéines régulatrices de la réplication

Ces protéines sont codées par la région pX. p40^{Tax} est une protéine transactivatrice agissant sur les LTR proviraux et sur de nombreux gènes cellulaires. Son action sur les LTR s'effectue au niveau des séquences répétées de 21 pb. L'action de p40^{Tax} sur l'ADN viral ou cellulaire est indirecte et s'effectue par l'intermédiaire de protéines cellulaires tel le *cAMP response element* et les facteurs activateurs de la transcription. p27^{Rex} agit sur l'ARN viral au niveau d'un récepteur situé dans le LTR 3'. Comme Rev, p27^{Rex} favorise le passage cytoplasmique des ARN non ou simplement épissés, inhibant l'expression des ARN doublement épissés et favorisant ainsi la synthèse de protéines de structure.

À l'échelon cellulaire, l'activité transactivatrice de p40^{Tax} est responsable de l'activation de nombreux promoteurs de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'activation, la division et la prolifération des cellules hôtes: interleukine 2 (IL2), chaîne α du récepteur à l'IL2 (RIL2), vimentine, GM-CSF, c-fos, fra-1, c-jun, egr-1, egr-2, TNF β , TGF β . D'autre part, p40^{Tax} inhibe l'expression de la β polymérase, enzyme intervenant dans la réparation de l'ADN (revue générale dans [21]). Les fonctions des autres protéines régulatrices de HTLV-1 ne sont que partiellement connues [16]. p¹² est localisée au niveau des endomembranes et se lie spécifiquement à la chaîne β du RIL2; elle possède une analogie fonctionnelle avec l'oncoprotéine E5 du *Papilloma Virus* bovin. Rof ne semble pas être synthétisée *in vivo*; p¹³ se trouve dans la matrice nucléaire et p³⁰ au niveau nucléolaire, leurs fonctions sont ac-

tuellement inconnues comme celles de p21^{Rex}.

Au cours de l'infection, la protéine p40^{Tax} est la première exprimée et active tous les gènes viraux par son action sur les LTR. Progressivement, l'expression et l'accumulation de Rex permet la production de protéines de structure et la formation de particules virales. L'action inhibitrice de Rex sur l'expression des messagers doublement épissés aboutit finalement à l'inhibition de l'expression de tous les gènes viraux établissant une latence virale. Toute stimulation de la cellule hôte active les LTR par le biais des protéines cellulaires activatrices de la transcription, « réveillant » ainsi la transcription virale en activant à nouveau l'expression de p40^{Tax} [22].

Rôle des protéines régulatrices dans la leucémogénèse

La transactivation par p40^{Tax} de nombreux gènes cellulaires engagés dans la différenciation, l'activation et la prolifération cellulaire laisse supposer un rôle central de cette protéine dans le développement de l'ATL. Ainsi, un modèle autocrine de croissance des lymphocytes infectés par HTLV-1 fut proposé. Il repose sur la transactivation de l'IL2 et du RIL2 α [23]. Ces deux molécules sont exprimées par les cellules hôtes du virus et leur transactivation par p40^{Tax} est supposée aboutir à une prolifération des cellules hôtes. Ce modèle peut être complété par l'activation monomacrophagique (par transactivation du promoteur du GM-CSF) responsable d'une production d'IL2 stimulant les cellules hôtes. La liaison de p12 au RIL2 β pourrait intervenir dans la prolifération autocrine des lymphocytes infectés.

Les protéines régulatrices de HTLV-1 et particulièrement p40^{Tax} possèdent donc toutes les propriétés biochimiques susceptibles d'entraîner une prolifération des cellules hôtes du virus. Ces propriétés transformantes ont ainsi été démontrées par transgénèse : la souris transgénique p40^{Tax} développe des tumeurs mésenchymateuses. Cependant, il est peu probable que les protéines régulatrices puissent intervenir dans le maintien du phénotype malin. En effet, l'expression *in vivo* de p40^{Tax} est très faible, uniquement détectable par amplification enzymatique de l'ADN complé-

mentaire (RT-PCR) de son messager. Ainsi, le rôle de p40^{Tax} et des autres produits de la région pX semble actuellement restreint à l'initiation, à la promotion de l'ATL.

Délétions en 5' du provirus et leucémogénèse

L'amplification enzymatique des différentes régions de HTLV-1 sur des échantillons provenant de patients atteints d'ATL retrouve une délétion plus ou moins importante de la partie 5' du LTR dans plus d'un tiers des cas [24]. Ces délétions respectent toujours la région pX mais modifient par délétion du ou des sites donneurs en 5' le système d'épissage des ARN viraux.

Cette anomalie fréquente, probablement sous-estimée pour des raisons techniques, pose le problème des délétions 5' dans la genèse de l'ATL. Deux scénarios où interviendrait ce mécanisme peuvent être proposés :

– La survenue d'une telle délétion inhibe la formation de particules virales et donc l'expression des principaux antigènes viraux cibles de la réponse T cytolytique. Les cellules porteuses de tels virus défectifs échappent donc à l'importante réponse T cytolytique (CTL) observée au cours de l'infection par HTLV-1. Par conséquent, ces délétions pourraient entraîner une immuno-sélection de cellules porteuses de virus délétés au sein desquelles d'autres facteurs permettraient la transformation maligne. Ce type de mécanisme correspond à celui décrit au cours de l'hépatocarcinome induit par le virus de l'hépatite B. Après une phase d'hépatite liée à la réponse immunitaire dirigée contre les cellules infectées, une prolifération hépatocytaire maligne se développe, caractérisée par la présence de virus délétés au sein des cellules tumorales.

– En modifiant l'épissage de la région pX, les délétions 5' pourraient favoriser l'expression d'un messager p40^{Tax} anormal, non détectable par les techniques de RT-PCR utilisées jusqu'ici, basées sur l'emploi d'amorces situées de part et d'autre d'un site d'épissage. Une surexpression et/ou l'expression d'un messager anormal codant pour une protéine transactivatrice amplifierait la boucle de croissance autocrine précédemment décrite.

Réplication par expansion clonale des cellules infectées

Les lymphocytes des porteurs asymptomatiques sont caractérisés, tout comme ceux des patients atteints de TSP/HAM, par leur capacité à proliférer spontanément *in vitro* [25]. Cette prolifération concerne les lymphocytes porteurs ou non du virus. L'action transactivatrice de p40^{Tax} [21], l'effet mitogénique de la GP46 d'enveloppe [15], certaines molécules d'adhésion, tel le complexe CD2/LFA3 [26], semblent jouer un rôle important dans cette prolifération. L'action mitogène nécessite un contact intercellulaire et la présence d'IL2.

In vivo, la réplication de HTLV-1 semble reposer essentiellement sur une multiplication des cellules infectées aux dépens d'une expansion par transcription inverse. Par blot de Southern, 1 à 2 clones HTLV-1 sont retrouvés dans ~20 % des TSP, 2 % à 16 % des sujets asymptomatiques [27]. L'étude au cours du temps révèle une stabilité de ces clones équivalant à une prolifération chronique, indépendamment de toute anomalie hématologique. Par amplification enzymatique des sites d'intégration, des clones sont retrouvés chez tous les individus testés, quel que soit le statut clinique [28]. Ce mode répliatif permet ainsi d'expliquer l'association d'une charge virale élevée à une stabilité génétique voisine de celle du génome eucaryote. L'expansion clonale des lymphocytes infectés est ainsi présente chez 100 % des porteurs asymptomatiques étudiés, de même qu'au cours de la TSP/HAM. Comme au cours de l'infection par le virus d'Epstein Barr, la première phase de l'ATL correspond donc à une prolifération des cellules infectées. L'ensemble des données concernant l'activité mitogène et transformante des constituants viraux peut ainsi être appliqué à la phase asymptomatique de l'infection. À cette première étape promotrice de la transformation succède l'intervention d'autres facteurs probablement indépendants du génome proviral, mais favorisés par la prolifération chronique des cellules infectées.

Les cofacteurs de la transformation

La présence d'une réponse CTL importante [29] au cours de l'infection HTLV-1 permet

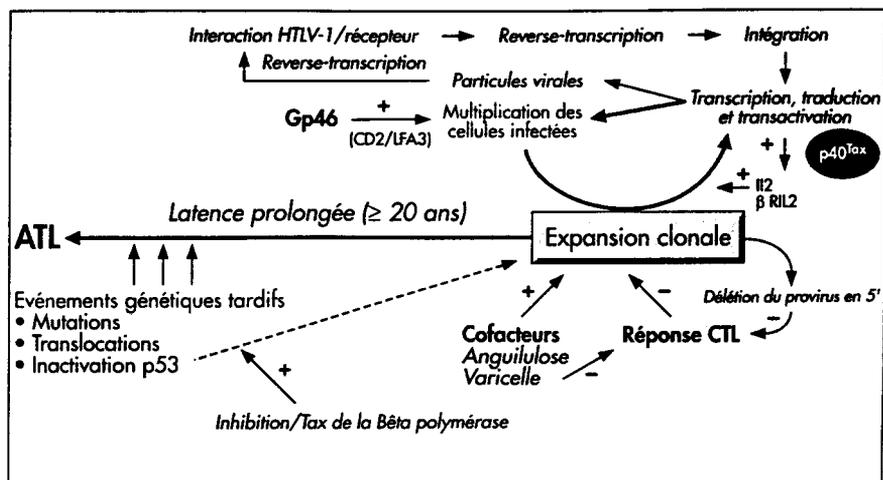


Figure 3. **Régulation de la réplication de HTLV-1 et leucémogénèse.** Ce schéma représente l'intrication entre la réplication du virus et la genèse de l'ATL. L'expansion clonale des cellules infectées constitue, au stade asymptomatique, le mode répliatif principal du virus. Cette expansion permet l'accumulation d'une charge provirale importante génétiquement stable. L'action mitogène de la Gp46 d'enveloppe et surtout l'activité transactivatrice de p40^{tax} entretiennent cette prolifération T chronique à minima. L'action de p40^{tax} mais aussi l'intervention de cofacteurs et d'événements génétiques tardifs permettent la transformation, après une période de latence prolongée, de l'un des clones en expansion, aboutissant à l'ATL.

RÉFÉRENCES

24. Korber B, Okayama A, Donnelly R, Tachibana N, Essex M. Polymerase chain reaction analysis of defective Human T-cell leukemia virus type 1 proviral genomes in leukemic cells of patients with adult T-cell leukemia. *J Virol* 1991 ; 65 : 5471-6.
25. Kramer A, Jacobson S, Reuben JF, Murphy EL, Wiktor SZ, Cranston B, Figueroa JP, Hanchard B, McFarlin D, Blattner WA. Spontaneous lymphocyte proliferation in symptom-free HTLV-1 positive Jamaicans. *Lancet* 1989 ; 2 (8668) : 923-4.
26. Kimata JT, Palker TJ, Ratner L. The mitogenic activity of Human T-cell leukemia virus type 1 is T-cell associated and required CD2/LFA3 activation pathway. *J Virol* 1993 ; 67 (6) : 3134-41.
27. Furukawa Y, Fujisawa J, Osame M, Toita M, Sonoda S, Kubota R, Ijichi S, Yoshida M. Frequent clonal proliferation of human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-infected T-cells in HTLV-1-associated myelopathy (HAM-TSP). *Blood* 1992 ; 80 (4) : 1012-6.
28. Wattel E, Vartanian J, Whain-Hobson S. Clonal expansion of HTLV-1 infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *Blood* 1993 ; 82 (10) (suppl. 1) : 1793.
29. Jacobson S, Shida H, McFarlin DE, Fauci AS, Koenig S. Circulating CD8(+) cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-1 pX in patients with HTLV-1 associated neurological disease. *Nature* 1990 ; 348 (6298) : 245-8.
30. Plumelle Y, Pascaline N, Nguyen D, Paneratti G, Jouannelle A, Jouault H, Imbert M. Adult T-cell leukemia-lymphoma : A clinico-pathologic study of twenty-six patients from Martinique. *Hematol Pathol* 1993 ; 7 (4) : 251-62.
31. Nakada K YK, Furugen S. Monoclonal integration of HTLV-1 proviral DNA in patients with strongyloidosis. *Int J Cancer* 1987 ; 40 : 146-8.
32. D'Incan M, Combemale P, Verrier B, Garin D, Audoly G. Transient adult T-cell leukemia/lymphoma picture during varicella infection in an HTLV-1 carrier. *Leukemia* 1994 ; 8 (4) : 682-87.

de supposer qu'une altération de cette réponse pourrait favoriser, comme au cours de l'infection par EBV, la survenue de l'ATL chez les sujets infectés. Aucun lien direct n'a pu être établi entre un marqueur génétique polymorphe et le risque de développer une ATL chez les porteurs asymptomatiques du virus.

L'infection par *Strongyloides stercoralis* est plus fréquente chez les sujets infectés par HTLV-1 que dans la population générale, probablement en rapport avec le degré d'immuno-suppression conféré par l'infection virale [30]. D'autre part, cette fréquence est significativement accrue au cours de l'ATL [30]. Enfin, Nakada *et al.* ont par ailleurs montré une fréquence élevée d'intégration monoclonale du provirus détectable par blot de Southern chez les porteurs asymptomatiques coinfectés par *Strongyloides stercoralis* [31]. D'autres agents infectieux comme l'infection zostérienne [32] ont été rapportés comme facteurs prédisposants au déclenchement de l'ATL.

Histoire naturelle de l'infection par HTLV-1 et leucémogénèse

L'existence d'une expansion clonale chronique des cellules infectées chez les por-

teurs asymptomatiques du virus et la faible incidence de l'ATL parmi ces sujets font de l'infection par HTLV-1 une prolifération lymphoïde chronique polyclonale à minima associée à un faible taux de transformation maligne. La latence prolongée de l'ATL évoque l'intervention de plusieurs facteurs dans la leucémogénèse. Les données parcellaires dont nous disposons sur la réplication du virus et les événements transformants tardifs soulignent l'intrication entre réplication et transformation au cours de l'infection.

Ainsi, l'expansion clonale chronique et prolongée des lymphocytes infectés permet au virus de se multiplier en restant stable. Toute stimulation-activation d'une cellule hôte déclenche par l'action des facteurs transcriptionnels cellulaires l'activation des LTR, promoteurs de tous les gènes proviraux. L'expression de p40^{tax} aboutira à l'expansion des cellules infectées et à la propagation clonale du provirus. L'activité CTL intense permet un contrôle continu de la prolifération clonale. Au sein de cette prolifération chronique, la probabilité de survenue d'événements immortalisants est nécessairement proportionnelle au nombre de cellules infectées en prolifération. Ainsi, tout facteur favorisant l'expansion clonale augmentera le risque de transformation. Le premier facteur est le temps : l'étude par blot de Southern révèle une stabilité des clones en

Tableau II
Principaux facteurs de la leucémogénèse

	Mécanismes	Conséquences
Facteurs liés au virus		
• Région pX	Transactivation de gènes cellulaires impliquée dans l'activation et la multiplication des cellules hôtes	Expansion clonale
• Gp46	Action mitogène	Expansion clonale
• Délétion 5' du provirus	<i>Immuno-sélection</i> <i>Modification de l'épissage de pX</i>	Expansion clonale
Événements secondaires ou tardifs		
• Cofacteurs infectieux (<i>strongyloïdes stercoralis...</i>)	<i>Activation des cellules infectées</i>	Expansion clonale
• Anomalies cytogénétiques	<i>Dérégulation de gènes impliqués dans la promotion tumorale</i>	Promotion, progression tumorale
• Inactivation P53	Progression tumorale	<i>Expansion clonale</i> Progression tumorale

Les inscriptions en italique correspondent à des mécanismes non démontrés. Dans ce modèle, les facteurs viraux interviennent au stade asymptomatique en maintenant l'expansion clonale des cellules infectées. L'accumulation au cours du temps d'une masse critique de cellules infectées, favorisée par l'action de cofacteurs aboutit à l'intervention d'événements génétiques tardifs non spécifiques.

expansion chez les sujets asymptomatiques informatifs. Ainsi, les clones en expansion sont stables au cours du temps, probablement tout au long de la vie du sujet infecté. La latence prolongée de l'ATL pourrait ainsi correspondre au délai nécessaire à l'obtention d'une quantité critique de cellules infectées en expansion. Au cours de l'infection, d'autres facteurs, représentés dans le *tableau II*, peuvent intervenir pour activer l'expansion clonale : dépression de la réponse CTL, immuno-sélection par délétion 5', stimulation infectieuse de la cellule hôte. Enfin, des événements génétiques tardifs communs à de nombreux cancers, telle l'inactivation de p53, permettent la promotion et la progression tumorale.

L'efficacité récemment décrite de l'association zidovudine-interféron dans le traitement de l'ATL peut sembler en contradiction avec ce modèle où l'expansion clonale des cellules infectées tient le rôle central, aux dépens de la réplication classique du virus par transcription inverse. Toutefois, l'efficacité de cette association peut correspondre à une activité antitumorale plus qu'à un blocage de la reverse transcriptase. En effet, la zidovudine agit en bloquant l'élongation de l'ADN au cours de sa synthèse et son action antitumorale a été prouvée *in vivo* et *in vitro*. Enfin, l'association zidovudine-interféron possède une action antitumorale synergique *in vivo* et *in vitro*. L'efficacité de ce traitement au cours de l'ATL repose donc vraisemblablement sur une activité antitumorale, l'acti-

té reverse transcriptase étant extrêmement faible au cours de cette affection.

Conclusion et perspectives

15 à 20 millions d'individus sont infectés par HTLV-1 dans le monde. La prévention de l'infection constitue ainsi, dans l'attente d'un vaccin, un moyen sûr de réduire l'incidence de l'ATL. Aux chimiothérapies des lymphomes utilisés jusqu'ici dans le traitement de l'ATL, l'association zidovudine-interféron semble offrir une nouvelle alternative prometteuse. L'association réplication-transformation propre à la leucémogénèse induite par HTLV-1 souligne l'importance des découvertes récentes concernant les nouvelles protéines régulatrices codées par la région pX. La possibilité, par amplification des sites d'intégration, d'isoler spécifiquement *in vivo* un clone infecté qui se transformera 20 à 50 ans plus tard, fait de l'ATL un modèle privilégié d'étude des mécanismes précoces de la leucémogénèse ■

TIRÉS À PART

E. Wattel.

Summary

Only a small proportion of patients infected by HTLV-1 will develop Adult T-cell leukemia (ATL). ATL is not specific clinically and is characterized by a prolonged latency which leads us to suppose that several factors are involved. The particular mode of replication of HTLV-1 through clonal expansion of the infected cells provokes, at the asymptomatic stage, a chronic lymphoid proliferation at minimum. The regulating proteins coded by the pX region of the provirus play an essential part in the regulation of viral replication. Replication and transformation seem to be intricate in the natural history of the infection. By maintaining the chronic proliferation of the infected cells, the proteins of the pX region are involved in the process of triggering the transformation. Others factors seem to be involved in the growth of tumors, i.e. deletions of the 5' part of the provirus, infectious cofactors... At the last stage of ATL, some non-specific genetic events like p53 inactivation are found. The combined use of zidovudine and interferon would seem to be a new efficient treatment of ATL. The synergy of anti-tumoral action of both these molecules seems to be more involved in the efficiency of that treatment than the inhibiting effect of zidovudine on the reverse transcriptase of HTLV-1.

Stochastic events in the amplification of HTLV-I integration sites by linker-mediated PCR

M. Cavrois ⁽¹⁾, S. Wain-Hobson ⁽²⁾ and E. Wattel ^{(1)(3)(*)}

⁽¹⁾ *Institut de Recherche sur le Cancer de Lille, place de Verdun, 59000 Lille,* ⁽²⁾ *Unité de Rétrovirologie Moléculaire, Institut Pasteur, 28, rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, and*

⁽³⁾ *Service des Maladies du Sang, CHU, 1, place de Verdun, 59037 Lille (France)*

SUMMARY

Human T-cell leukaemia virus type I (HTLV-I) proviral integration sites from an asymptomatic carrier and from the MT4 cell line were analysed by linker-mediated PCR (LMPCR) and inverse PCR (IPCR). LMPCR was more sensitive, allowing detection of a greater number of integrated proviruses. Reconstruction experiments using a cloned integrated HTLV-1 provirus indicated that > 100 copies were necessary to be detected frequently by LMPCR. To circumvent this problem, the LMPCR analysis was performed ~ 20 times per sample. Thus, for the MT4 cell line, the seven major integration sites were accompanied by ~20 clones of lesser frequency. For an asymptomatic HTLV-I carrier, nine integration sites were identified in a single amplification, while a further 9 followed from 14 additional reactions. These findings show that there is a stochastic element to sampling HTLV-I integration sites by LMPCR, which tends to underestimate the actual number of HTLV-I bearing clones. Accordingly, those detected in at least two reactions represent the most abundant clones.

Key-words: HTLV-I, PCR, Integration site; Stochastic events, Linker-mediated PCR.

INTRODUCTION

Two hallmarks of HTLV-I, the causative agent of adult T-cell leukaemia (ATL, Uchiyama *et al.*, 1977) and tropical spastic paraparesis/HTLV-I associated myelopathy (TSP/HAM; Gessain *et al.*, 1985) are its genetic stability and the high proviral load in asymptomatic and symptomatic carriers. Unlike all other retroviruses, the rate of fixation of mutations in the HTLV-I genome is of the order of a few per century (Gessain *et al.*, 1992). Despite this, the proportion of cells infected among periph-

eral blood mononuclear cells (PBMC), measured by PCR as the proviral load, may attain values as high as 1/10 in the absence of malignancy (Wattel *et al.*, 1992). If such high proviral loads were attained via reverse transcription, then much greater sequence diversity would have been anticipated, unless the fidelity of the HTLV-I reverse transcriptase (polymerase) was particularly elevated, which is not the case, as judged by the mutation rate for the related retrovirus, bovine leukaemia virus (Mansky and Temin, 1994). These two conflicting observations, genetic stability and high proviral

Submitted February 8, 1995, accepted March 15, 1995.

(*) Correspondence to Eric Wattel, Service des Maladies du Sang, CHU, 1, place de Verdun, 59037 Lille France.

load, were reconciled in a recent PCR study of HTLV-I proviral integration sites which showed that, for asymptomatic individuals, as well as those suffering from TSP/HAM, there was extensive evidence of clonally expanded cells harbouring the HTLV-I provirus (Wattel *et al.*, 1995). By dividing with the host cell, the provirus is replicated with the fidelity of the host cell, which is approximately 10^6 -fold greater than reverse transcription.

The initial study of HTLV-I integration sites was qualitative in nature and proved the existence of clonally expanded HTLV-I bearing cells in the absence of malignancy (Wattel *et al.*, 1995). However, the quantitative nature of the technique was not examined. It is shown here that LMPCR is superior to IPCR, while reconstruction experiments show that the detection threshold was ~20 copies per 150,000 cells.

MATERIALS AND METHODS

Samples

The HTLV-I plasmid p4.39, cloned from HTLV-I cell line 2060 (Nicot *et al.*, 1993), was kindly provided by Dr Astier-Gin. DNA from the MT4 cell line and from PBMCs of an asymptomatic HTLV-I carrier, G12 (Wattel *et al.*, 1992), was also studied. DNA from 3 HTLV-I seronegative subjects was used in negative amplification controls. The oligonucleotides used have been described (Wattel *et al.*, 1995).

Southern blot analysis of HTLV-I integration

Approximately 10 µg of high molecular weight MT4 DNA were digested with *EcoRI* electrophoresed through a 0.8% agarose gel. After Southern blotting to a nylon membrane, the filter was hybridized with a randomly-primed ^{32}P -labelled 8.3 kb *SacI* fragment of p4.39 HTLV-I DNA.

Amplification of cellular flanking sequences

All LMPCR amplifications were undertaken as described (Wattel *et al.*, 1995). For calibration, 1 µg

of p4.39 was digested with 10 U of *NlaIII* in $1 \times$ *NlaIII* buffer for 3 h at 37°C. Digestion was controlled by gel electrophoresis. DNA was phenol/chloroform-extracted and ethanol-precipitated and ligated with 15 pmol of BIO1 primer using 20 U of T4 DNA ligase in 40 µl for 16 h at 14°C. DNA was diluted and LMPCR performed as described (Wattel *et al.*, 1995). In the case of IPCR, DNA and plasmid were first digested by *NlaIII* as in LMPCR. One µg of digested DNA was circularized with 20 U of T4 DNA ligase in 600 µl for 16 h at 14°C. This was followed by phenol/chloroform extraction and precipitation carried out twice. One half of the circularized DNA was amplified for 40 cycles using the BIO3 and BIO6 primer pair. Amplification conditions have been described (Wattel *et al.*, 1995).

Run-off analysis of amplified products

Two µl of amplified product were submitted to 4 cycles of linear PCR in 20 µl with 0.05 pmols of a 5'- ^{32}P -radiolabelled primer, BIO5, 1 U of Taq polymerase (Perkin Elmer Cetus). Thermal cycling parameters were: 95°C, 5 min; $4 \times$ (95°C 30 s, 58°C 45 s, 72°C 5 min) followed by a final elongation step of 10 min at 72°C. After boiling in deionized formamide, 1.25 µl of run-off product were analysed on a 6% sequencing gel.

Sequencing

The flanking regions of p4.39 and MT4 were sequenced. IPCR products were cut from the sequencing gel. After re-amplification and purification on a 1.5% low melting point agarose gel, the DNA was sequenced using the exonuclease III method. LMPCR products from MT4 amplification were cloned into *SmaI* cleaved M13mp18 DNA and 50 clones were sequenced.

RESULTS

Reconstruction experiments

Plasmid p4.39 DNA was diluted in 1 µg (~150,000 cell equivalents) of uninfected PBMC high molecular DNA and analysed by

ATL = adult T leukaemia.
bp = base pair.
HTLV-I = human T-cell lymphotropic virus.
IPCR = inverse PCR.
LMPCR = linker-mediated PCR.

PBMC = peripheral blood mononuclear cell.
PCR = polymerase chain reaction.
TSP/
HAM = tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy.

Table I. LMPCR and IPCR analysis of serial dilutions of HTLV-I plasmid p4.39 DNA.

Methods	HTLV-I plasmid copy numbers diluted in 1 µg of non-infected DNA						
	> 1000	500	100	50	10	5	1
LMPCR	4/4 ^(*)	4/4	2/4	1/4	0/4	0/4	0/4
IPCR	4/4	3/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4

(*) Positive signal/number of experiments.

both LMPCR and IPCR in quadruplicate. The amplified integration sites were identified by a run-off with a ³²P-labelled primer, BIO5 for both LMPCR and IPCR. Five-hundred copies were uniformly detected by LMPCR, whereas 100 copies were detected only twice and 50 copies only once (table I). This gives a 50% detection level of 50 copies and, by extrapolation, an absolute threshold of ≥ 17 copies per sample. The detection threshold was higher for IPCR (50% detection level of ~ 200 copies and an absolute threshold of ≥ 80 copies per sample).

In order to eliminate any trivial variable which might explain the greater sensitivity of LMPCR over IPCR, the 3' flanking sequence of the p4.39 clone amplified by LMPCR was determined (GAGCAGTAAACACTCAAGGAA-GAGGGGCTGGGCATG, *Nla*III site underlined). An oligonucleotide, PBSI (complementary sequences are in bold face), mapping within the immediate cellular flanking sequences was synthesized and used in conjunction with BIO3 to amplify *Nla*III digested p4.39 DNA. By both LMPCR and IPCR techniques, 5 copies diluted in 1 µg of carrier DNA could be detected. Below 5 copies, the efficiency of detection by both methods was variable and $< 100\%$. As the PBSI oligo was internal to the *Nla*III site, amplification was not influenced by the difference between the two strategies. Thus, it may be concluded that LMPCR was intrinsically the more sensitive of the two methods, requiring > 50 copies per sample. The sensitivity of the method was not enhanced by the addition of a 10-fold molar excess of ligation primer nor the addition of more ligase (data not shown).

Amplification of HTLV-I integration sites in the MT4 cell line and patient DNA

The above results suggest the LMPCR is capable of identifying only reasonably abundant HTLV clones. However, the reconstruction experiments above used a single target sequence. The sensitivity of LMPCR was therefore tested using DNA from the chronically HTLV-I infected cell line, MT4. Digestion of MT4 DNA by *Eco*RI, which does not cleave the HTLV-I provirus, showed that there were 5 major bands (data not shown) indicating four distinct integrated proviruses. Amplification of MT4 DNA by both LMPCR and IPCR revealed 7 distinct integration sites (fig. 1). Dilution of MT4 DNA to 3 ng (~ 450 cell equivalents) yielded the same 7 bands, below which fewer and fewer bands were identified, indicating that the frequency of each was $\geq 1/450$. However, if amplification of < 3 ng DNA was performed ten times, most of the 7 bands could be detected. The MT4 integration sites were sequenced to confirm that they represented distinct integration sites (fig. 2). Each sequence was different, also confirming that there were seven independent integration sites and that one was not derived from another by postintegration recombination.

Occasionally, during amplification of 1 µg of MT4 DNA, additional bands were seen, suggesting the presence of low abundance forms present at a few tens of copies per sample, rendering their detection aleatory (fig. 1, land D). MT4 DNA was therefore analysed 23 times (1 µg) by LMPCR, which yielded 20 low-abundance integration sites. For comparison, IPCR was performed 22 times, which yielded only four addi-

MT4 21bp	3'LTR end-	GTTAGGCTCC AAGAGGGCA TG
MT4 42bp	3'LTR end-	ACTTTGGTC ATTGTCACCC TTTCCTATGT GTGGGTACTC ATG
MT4 105bp	3'LTR end-	GGTGGCCCC CACAGTCGGC CTGTGCATAC AGGTTTTTGT TGCAGAATCC CAGGGGTTC T AAAACTTTTA AATTTGAACC TGGCCTTCAA ATAGTTGCGA ACATG
MT4 184bp	3'LTR end-	ATTTAGTACA CATTACCAAT GATGCCCAAC TTTTAGTGTG GTTCATCCCA TATGTTCCCA TACTCCCACT GGGACCTAAC ATTTGCAGGC GCTATTTATC ATTCTGGCTA GTGGTGTGCT CATCTGCCTA CCTCGCTAAG CAGCCTTCGT TGTATTTTTT ATAATTACTG GGAGTCTTTT CATG
MT4 ~230bp	3'LTR end-	TATAACATTT TCAGATCATC TGCTCTAGGG AATATTTTGG CAACAAATCC CTTTCCTCCA TTCTTAGCCA TTTGGAGTGA AATAATGAGA AAAATAGCTT GTTCTCACT AAAGCAATTA CTGTTGTTCG TCCTGTACCT TCTTAGAGAT ATTTGTTG
MT4 191bp	3'LTR end-	GCATCTTAGC ATAGATGACA TTTTAAATG CCTTAAAAA TATTAGTTTG TGGCAGAAAT ATTGGTAGTT TGCCCTCAGGC AATCTATATG GTTTACTTAC TTGTTGGCTT ATCTTGTTC ATAGCAGATG CTGAATATAG ATTTTAAAAA TTGAATTTGT TTACCCTGGT TTTATGTTCC TGGGCAAGGT CTCTGATCA CAGTGAATAA CTCTAAGGT AAATGGTTAC TTCTGTTTGC TGAGATTTTG TCAGGTTTTT GCATCTGTGT TGGGCGTCGG AGTTGGTCCA TG
MT4 2bp	3'LTR end-	TG

Fig. 1. Sequences of the seven major MT4 integration sites.

All 7 sequences correspond to an integration site between 3'LTR (long terminal repeat) end and the first *Nla*III restriction site except MT4 320, in which only the first 158 bp of genomic segments were sequenced. The size of the flanking sequences are given in base pairs. There was no sequence homology between any of these sequences and those in the data bases.

tional clones, again confirming the greater sensitivity of LMPCR over IPCR.

One of the problems with clinical samples is that the size of the sample is frequently a problem; many tests may have to be made, and the samples are frequently shared between research groups. In order to evaluate the underestimation of the number of unique integration sites within a clinical sample, an extensive analysis of HTLV-I integration sites was made on a sample for which there was extensive material. The sample was from an asymptomatic HTLV-I individual (patient G12) with a total copy number of < 1/150 PBMCs (Wattel *et al.*, 1992). LMPCR was performed 15 times on 0.5 µg of high molecular weight DNA. As can be seen from figure 3, the number of distinct HTLV-I clones identified was 18. One clone was detected 4 times, 3 clones thrice, 6 clones twice and 9 clones only once. Extrapolating from this data, a total of 20 were

predicted. As a single LMPCR yielded between 2-3 clones, it would appear that a single reaction may underestimate the total number of proviral integration sites by a factor of 5-7. In fact, a 0.5 µg sample of G12 DNA harbours ~ 500 copies of HTLV-I DNA. Assuming that the clones are of comparable abundance, the frequency of each would be ~ 25 which, from the reconstruction experiments using p4.39 DNA, would suggest that their detection is frequently aleatory.

DISCUSSION

LMPCR proved to be more sensitive than IPCR in the detection of HTLV-I integration sites, as judged by reconstruction experiments with cloned plasmid DNA, MT4 cell line and patient DNA. Nonetheless, a single reaction with a low copy number per sample (< 500, G19 DNA)

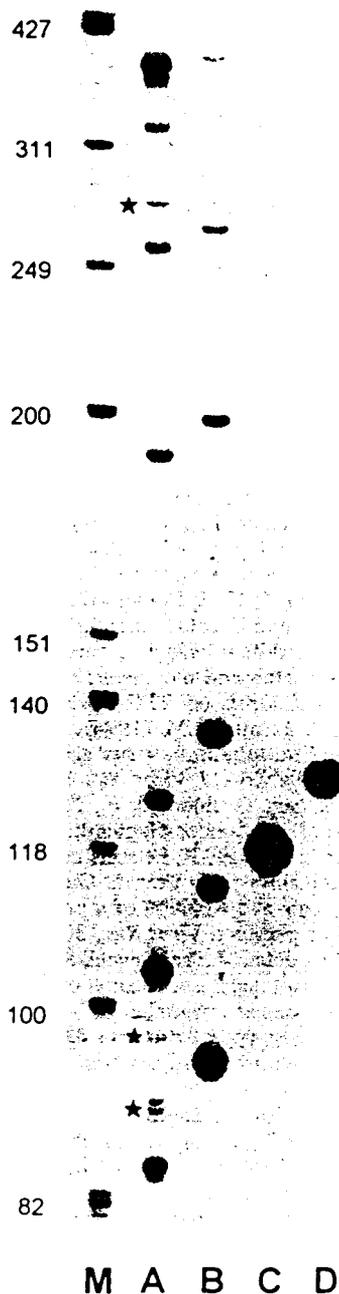


Fig. 2. IPCR and LMPCR analysis of MT4 DNA (lanes A and B respectively) and HTLV-I plasmid p4.39 DNA (lanes C and D respectively).

As expected, p4.39 plasmid analysis allow for the detection of a unique band. IPCR analysis of the MT4 cell line allowed for the detection of 7 bands. The same 7 sites were also detected through LMPCR, migrating at slightly lower molecular weight. The band marked with an asterisk detected in an aleatory manner.

underestimated the number of discrete integration by a factor of 5. For the HTLV-I MT4 cell line,

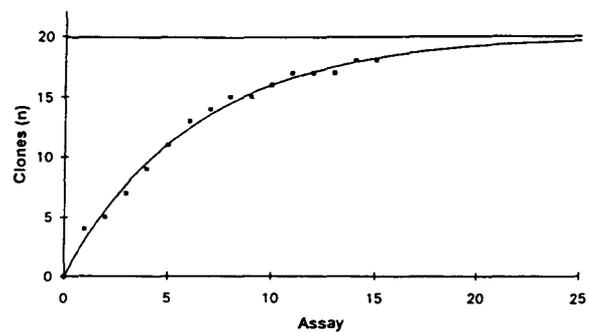


Fig. 3. Repeated LMPCR analysis of HTLV-I integration sites from an asymptomatic carrier, G12.

After ~ 15 experiments, LMPCR detected 18 integration sites. Extrapolation using the adjustment to symptotic function predicted a total of 20 detectable sites.

repeated detection of 7 bands per 1 µg DNA suggested that the 7 bands represented major forms (> 450 copies/150,000 cells). However, Southern blotting revealed only 5 integrated proviruses. The discrepancy is certainly due to the fact that the sensitivity of Southern blotting is no better than 0.1 cellular gene per cell, or the equivalent of 7,500 HTLV proviruses/150,000 cells. Thus, the 3 additional clones frequently detected in the MT4 DNA probably have frequencies between 450-7500 copies per 150,000 cells. That LMPCR was unable to reliably detect < 80 copies of the p4.39 HTLV-I provirus was probably due to the competition between the *Nla*III cleaved extremities for the BIO1 primer and cellular DNA fragments. The addition of excess BIO1 primer or more ligase did not significantly ameliorate detection.

It is probably unreliable to estimate the frequency of a given HTLV-I clone from the intensity of the LMPCR products, even for abundant forms. This is because of the different sizes of the PCR products. Despite using long elongation times we have found that as long as two fragments differ by greater than 100 bps there is a preferential amplification of the smaller fragment to the detriment of the larger one (V. Pezo, S. Wain-Hobson *et al.*, unpublished data).

At low frequencies of a given HTLV-I-positive expanded clone (< 80 per sample), there is a sto-

chastic contribution to proviral detection which tends to underestimate the number of HTLV-I-bearing clones. Conversely, any common integration site detected in duplicate or serial samples must represent clones with a frequency of $> 100/150,000$. This suggests that LMPCR should be performed at least twice on 1 μ g DNA samples.

Despite the stochastic amplification of low abundance integration sites, this method should prove useful in following patients with ATL (Takemoto *et al.*, 1994) before and after chemotherapy or following individuals with a high proviral and numerous clones who could be at risk of developing ATL or TSP/HAM.

Acknowledgements

This work was supported in part by a grant from the "Fondation pour la Recherche Médicale" and grants from the "Direction de la Recherche et des Etudes Doctorales", and from the "Association pour la Recherche sur le Cancer". M.C. was supported by bursaries from the "Ministère de la Recherche et Technologie".

Evénements stochastiques dans l'amplification des sites d'intégration de HTLV-I par LMPCR (PCR médiée par ligature)

Le travail a porté sur l'amplification des sites d'intégration de HTLV-I (human T cell leukemia virus type I) par PCR inverse (IPCR) et PCR avec ligature d'oligonucléotides (LMPCR). Des échantillons d'ADN de la lignée MT4 et d'un porteur asymptomatique du virus ont été étudiés. La sensibilité de la LMPCR est trouvée supérieure à celle de l'IPCR. L'étape de ligature constitue un facteur limitant dans la LMPCR et l'IPCR. Au-delà de 100 copies provirales, les sites d'intégration d'un plasmide HTLV-I sont retrouvés fréquemment après répétition des expériences. Après 20 expériences, l'analyse de l'ADN de la lignée de MT4 permet de retrouver 7 principaux sites d'intégration et 20 sites moins fréquemment représentés. Chez le porteur

asymptomatique, neuf sites d'intégration ont été détectés après une manipulation, et un total de 18 sites a été détecté après 14 expériences. Ces résultats montrent que la LMPCR et l'IPCR effectuent une sélection stochastique des sites d'intégration de HTLV-I. Cette sélection entraîne une sous-estimation du nombre de clones détectés. Ainsi, les sites retrouvés plus d'une fois après plusieurs expériences correspondent à des clones abondants.

Mots-clés: HTLV-I, PCR, Site d'intégration; PCR médiée par ligature, Evénements stochastiques.

References

- Gessain, A., Barin, F., Vernant, J.C., Maurs, L., Gout, O., Calender, A. & de Thé, G. (1985), Antibodies to human T-cell lymphotropic virus type-1 in patients with tropical spastic paraparesis. *Lancet* ii, 407-410.
- Gessain, A., Gallo, R.C. & Franchini, G. (1992), Low degree of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I genetic drift *in vivo* as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations. *J. Virol.*, 66, 2288-2295.
- Mansky, L.M. & Temin, H.M. (1994), Lower mutation rate of bovine leukemia virus relative to that of spleen necrosis virus. *J. Virol.*, 68, 494-499.
- Nicot, C., Astier-Gin, T., Edouard, E., Legrand, E., Moynet, D., Vital, A., Londos-Gagliardi, D., Moreau, J.P. & Guillemain, B. (1993), Establishment of HTLV-1-infected cell lines from French, Guianese and West Indian patients and isolation of a proviral clone producing virus particles. *Virus Res.*, 30, 317-334.
- Takemoto, S., Matsuoka, M., Yamaguchi, K. & Takatsuki, T. (1994), A novel diagnostic method of adult T-cell leukemia: monoclonal integration of human T-cell lymphotropic virus type I provirus DNA detected by inverse polymerase chain reaction. *Blood* 84, 3080-3085.
- Uchiyama, T., Yodoi, J., Sagawa, K., Takatsuki, K. & Uchino, H. (1977), Adult T-cell leukemia: clinical and haematologic features in 16 cases. *Blood*, 50, 481-492.
- Wattel, E., Mariotti, M., Agis, E., Gordien, E., Ferrer Le Cœur, F., Prin, L., Rouger, P., Chen, I.S.Y., Wain-Hobson, S. & Lefrere, J.J. (1992), Quantification of HTLV-I proviral copy number in peripheral blood of symptomless carriers from French West Indies. *J. AIDS*, 5, 943-946.
- Wattel, E., Vartanian, J.P. & Wain-Hobson, S. (1995), Clonal expansion of HTLV-I infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *J. Virol.* (in press).



Proliferation of HTLV-1 infected circulating cells *in vivo* in all asymptomatic carriers and patients with TSP/HAM

Marielle Cavrois¹, Antoine Gessain², Simon Wain-Hobson³ and Eric Wattel^{1,4}

¹U₁₂₄ INSERM Institut de Recherche sur le Cancer de Lille; ²Unité d'Epidémiologie des Virus Oncogènes, Institut Pasteur, Paris; ³Unité de Rétrovirologie Moléculaire, Institut Pasteur, Paris; ⁴Service des Maladies du Sang, CHU Lille, France

Assuming that the clonal expansion of T cells harbouring the human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) provirus is a central feature of HTLV-1 infection, the identification of such cells was sought among a series of 19 asymptomatic carriers and 19 cases of tropical spastic paraparesis/HTLV-1 associated myelopathy (TSP/HAM) devoid of malignancy. Two PCR based protocols designed to amplify the host cell-HTLV-1 proviral integration sites were used. In all cases large numbers of proliferating clones could be identified. The proportion of some clones was >1/1500 peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) with the suggestion that their number increased as a function of age among asymptomatic carriers.

Keywords: HTLV-1; adult T-cell leukemia; leukemogenesis

Introduction

HTLV-1 infection is intimately related to the development of adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL) (Uchiyama *et al.*, 1977) and TSP/HAM (Gessain *et al.*, 1985). Both diseases generally appear following a long and variable incubation period (Blattner, 1989) by mechanisms incompletely understood. ATLL results from malignant clonal expansion of an HTLV-1 bearing T cell probably following the accumulation of a number of lesions inducing chromosomal abnormalities (Whang-Peng *et al.*, 1985) and tumour suppressor gene inactivation (Nagai *et al.*, 1991; Cesarman *et al.*, 1992; Sakashita *et al.*, 1992; Yamato *et al.*, 1993; Hatta *et al.*, 1995).

The HTLV-1 proviral load is particularly elevated in patients with TSP/HAM with up to 1/5 PBMC harbouring HTLV-1 (Gessain *et al.*, 1990; Kira *et al.*, 1991; Kubota *et al.*, 1993). The load in asymptomatic carriers is generally less but can be as high as 1/20 PBMC (Shinzato *et al.*, 1991; Wattel *et al.*, 1992; Matsumura *et al.*, 1993). There is a problem in that considerable viral replication is needed in order to attain such high proviral loads. Such a situation should lead to extensive sequence diversity. Of all the retroviruses, those of the HTLV/BLV group are the most stable genetically (Gessain *et al.*, 1992). This conundrum was resolved by the finding of HTLV-1 bearing clonal expansion of T cells PBMCs from four TSP/HAM patients and three asymptomatic carriers (Wattel *et al.*, 1995). These findings resulted from PCR

amplification of the HTLV-1 integration sites which proved far more sensitive than Southern blotting and suggested clonal expansion in a minority of TSP/HAM patients or asymptomatic carriers (Ikeda *et al.*, 1990, 1993; Nakada *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 1995).

Here the PCR based protocol has been applied to a series of samples from 19 TSP/HAM patients and 19 asymptomatic carriers. Clonal expansion of HTLV-1 bearing cells was found in every case indicating that this is indeed a *modus vivendi* for HTLV-1 in the absence of malignancy.

Results

The pertinent clinical data accompanying to the DNA samples is given in Table 1. There were 19 samples from asymptomatic carriers and 19 from patients with TSP/HAM. Ligation mediated PCR (LMPCR) analysis of HTLV-1 samples with >10⁴ proviral copies per µg DNA invariably resulted in a smear (data not shown). Both LMPCR and inverse PCR (IPCR) have detection thresholds below which it is not possible to detect a unique integrated HTLV-1 proviral DNA (Cavrois *et al.*, 1995). As the IPCR threshold (100 copies/sample) is greater than that for LMPCR (50 copies/sample), IPCR was used to analyse samples with high proviral load. Indeed IPCR was able to identify discrete integration sites where LMPCR produced a smear. As high proviral loads are invariably associated with TSP/HAM (Gessain *et al.*, 1990; Kira *et al.*, 1991; Wattel *et al.*, 1992), the latter samples were analysed by IPCR while PBMC samples from asymptomatic carriers were analysed by LMPCR.

Typical data for HTLV-1 integration sites derived from four asymptomatic carriers and five TSP/HAM patients are shown in Figure 1. Evidence for the expansion of HTLV-1 harbouring clones was found in every case along with a wide variation in their number between different samples. Despite the lower sensitivity of IPCR with respect to LMPCR (Cavrois *et al.*, 1995), the mean number of clones was greater among the TSP/HAM samples (299/19 = 15.8) than for asymptomatic carriers (133/19 = 7) consistent with a much increased average copy number in former with respect to the latter samples (Gessain *et al.*, 1990; Kira *et al.*, 1991; Wattel *et al.*, 1992).

Typical quadruplicate LMPCR analyses for samples from two asymptomatic carriers are shown in Figure 2 while the results for 15 asymptomatic carriers are given in Table 1. Clones with a mean frequency of >1/1500 PBMCs in asymptomatic carriers over 40 years old (*n* = 7) and under 40 (*n* = 8) was 12 and 3 respectively. This difference was significant (*P* < 0.017, Mann-Whitney test) as was the correlation between the

Table 1 Distribution of the number of detected clone in TSP/HAM patients and symptomless subjects after one and four LMPCR experiments. (1): Central African Republic

Subjects	Age	Sex	Geographic Origin	Number of HTLV-1 infected clones detected in 1 experiment	Number of clones/common clones detected after 4 experiments
<i>TSP/HAM patients (IPCR)</i>					
TS1	51	M	FWI	2	ND
TS2	49	F	FWI	5	ND
TS3	70	F	Gabon	8	ND
TS4	39	F	FWI	15	ND
TS5	51	F	FWI	7	ND
TS6	50	F	FWI	9	ND
TS7	52	F	FWI	22	ND
TS8	46	F	FWI	29	ND
TS9	34	M	Congo	35	ND
TS10	50	F	FWI	10	ND
TS11	62	F	FWI	46	ND
TS12	55	F	Zaire	43	ND
TS13	60	F	FWI	2	ND
TS14	46	F	CAR ¹	20	ND
TS15	34	F	French Guiana	8	ND
TS16	60	M	FWI	1	ND
TS17	46	F	FWI	2	ND
TS18	52	F	FWI	16	ND
TS19	40	M	Haiti	19	ND
<i>Symptomless subjects (LMPCR)</i>					
AS1	39	F	FWI	2	4/0
AS2	22	F	FWI	1	1/0
AS3	48	M	FWI	5	ND
AS4	34	M	FWI	2	ND
AS5	44	F	FWI	3	ND
AS6	60	F	FWI	16	59/21
AS7	31	M	FWI	4	15/0
AS8	46	F	FWI	13	41/16
AS9	57	M	FWI	11	37/10
AS10	55	F	FWI	4	10/2
AS11	25	M	FWI	14	40/9
AS12	48	M	FWI	6	ND
AS13	36	F	FWI	7	30/5
AS14	26	F	FWI	5	25/3
AS15	53	F	FWI	10	24/3
AS16	38	F	FWI	3	15/1
AS17	36	M	FWI	9	38/4
AS18	47	F	FWI	10	38/14
AS19	54	M	FWI	8	24/16

The number of clones was calculated after one and four LMPCR. Despite a lower sensitivity of IPCR, the mean number of clones is higher in TSP/HAM (16 ± 14) than in asymptomatic carriers (7 ± 4). Quadruplicate LMPCR analysis of integration sites was performed in 15 asymptomatic carriers and the number of common clones (frequency > 1/1500 PBMCs) was found to be significantly higher in the seven asymptomatic subjects older than 40 than in the remaining eight asymptomatic subjects

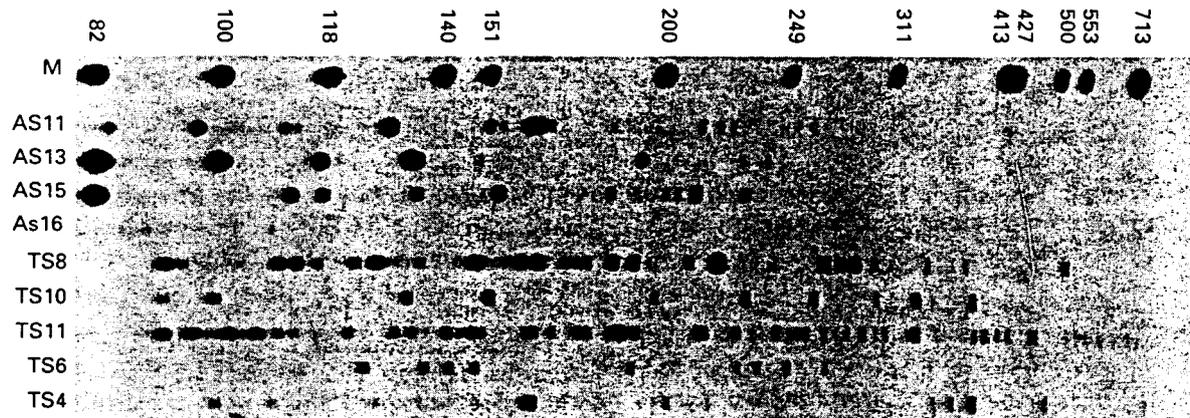


Figure 1 LMPCR analysis of HTLV-1 integration sites in four symptomless individuals and six TSP/HAM patients. For each sample, 0.5 µg of DNA were amplified. Samples from symptomless individuals (lanes AS11, AS13, AS15, AS16) were analysed by LMPCR and samples from TSP/HAM patients (lanes TS8, TS10, TS11, TS6, TS4) by IPCR. The signal found at 82 bp in 3/4 asymptomatic carriers and at 90 bp in 3/5 TSP/HAM corresponds to clonal expansion superimposed upon the background of random integration of HTLV-1 5' to any TG dinucleotide (Wattel *et al.*, 1995)

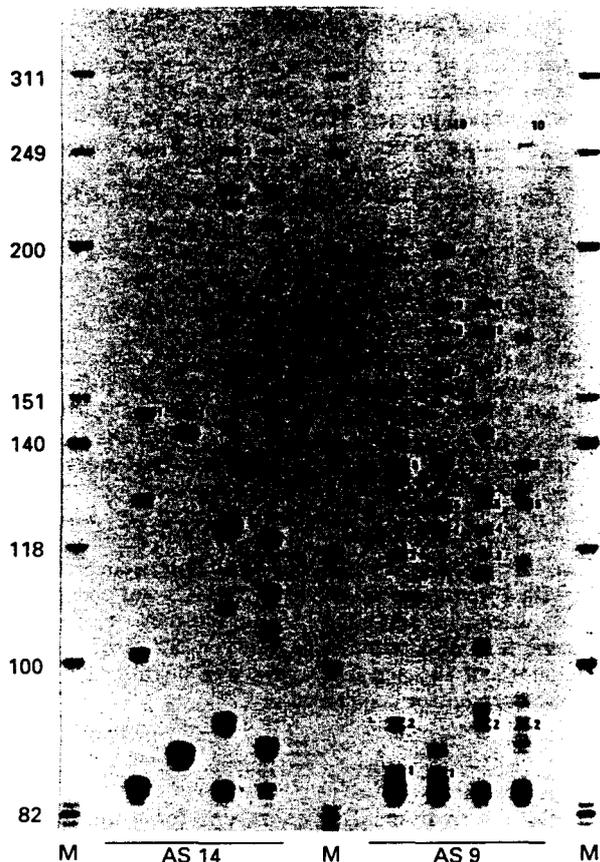


Figure 2 For each sample, 2 μ g of DNA were studied through four experiments. After digestion by *Nla*III, linear and exponential amplification, four cycles of linear PCR were performed with a 5'-³²P-radiolabeled HTLV-1 (+) strand specific primer. Final products were loaded on a 4% sequencing gel. TG 'clone', which represents independent integration events, was found three and four times in AS14 and AS9 DNA, respectively. Identical bands are indicated by a corresponding number. After quadruplicate LMPCR, 25 clones were detected in AS14 DNA with three common bands. AS9 DNA analysis allowed for the detection of 37 clones. Ten of these clones (number 1 to 10) common. Some clones may appear as doublets, differing by a single nucleotide. This is due to nontemplated addition of a single adenosine at the 3' end of the strands (Clark, 1988)

number of such clones and the age of the asymptomatic carriers ($P < 0.02$, $R \sim 0.6$, Spearman rank correlation).

Discussion

PCR amplification of HTLV-1 integration sites showed that clonal expansion of HTLV-1 bearing cells was the norm for all samples whether they were derived from asymptomatic carriers or patients with TSP/HAM. As such the data extends considerably initial observations based on three samples from each category (Wattel *et al.*, 1995).

Detection of HTLV-1 infected clones by Southern-blot had been previously reported in about 20% of TSP/HAM patients (Furukawa *et al.*, 1992) and in a minority of asymptomatic carriers (Ikeda *et al.*, 1990, 1993; Nakada *et al.*, 1987; Chen *et al.*, 1995). In the work of Furukawa *et al.* (1992), one clone was detected by Southern-blot after *Pst*I digestion in 19% of samples studied and only 3/19 TSP/HAM patients with positive signal harboured two infected clones.

These differences may be attributed to the greater sensitivity of the PCR based techniques. The suggestion that among asymptomatic carriers the number of clones with a frequency of $> 1/1500$ increases with age is intriguing. None of the carriers had antecedents of transfusion or drug addiction, so breast feeding or sexual transmission are the presumed infection routes (Manns and Blattner, 1991). Hence life span may be considered as a reflection of the duration of infection in this population.

Just why such clones expand in the face of intense HTLV-1 specific cellular immune response in seropositive individuals in general (Jacobson *et al.*, 1992; Parker *et al.*, 1992) is unclear. It could reflect the accumulation of inactivating mutations and deletions (Korber *et al.*, 1991) within the HTLV-1 provirus permitting the cell to escape immune surveillance. Furthermore a decrease in the CTL response to viral antigen in elderly individuals might help some clones to proliferate (Powers, 1993).

In view of the fact that T cell activation facilitates transport across the blood-brain barrier, the above findings suggest a means by which HTLV-1 may be so introduced. The parallel with cytomegalovirus (Wiley and Nelson, 1988) and canine distemper virus (Summers *et al.*, 1978), which both cross the blood-brain barrier via infected mononuclear cells is striking. Accordingly, the number of clones and the number of cells constituting a clone may be critical for the contamination of the CNS. Thus, the assessment of HTLV-1 replication in the CNS of TSP/HAM as the prospective evaluation of the clonality pattern of infected PBMCs in asymptomatic carriers will be of interest to highlight the pathogenesis of TSP/HAM.

Acquired p53 inactivation has been demonstrated during the evolution from chronic to acute ATLL (Sakashita *et al.*, 1992). It may be that such tumour suppressor gene inactivation, commonplace in ATLL (Nagai *et al.*, 1991; Cesarman *et al.*, 1992; Yamato *et al.*, 1993), or mutations in other genes involved in cell cycling (Hatta *et al.*, 1995) may occur during the long asymptomatic phase. As for Epstein-Barr virus and hepatitis B virus infections (Hausen, 1991) the non-malignant phase of HTLV-1 infection is clearly accompanied by the proliferation of infected cells providing a propitious backdrop to the subsequent mutation of cellular genes.

Material and methods

Samples studied

DNA (0.5 μ g) from 19 TSP/HAM patients and 19 HTLV-1-seropositive asymptomatic carriers was studied. TSP/HAM patients were native from French West Indies (FWI) (13), Africa (4), Haiti (1) or French Guiana (1), four were males. Their age ranged from 34 to 70 (mean 50). All asymptomatic subjects were natives of FWI. Their ages ranged from 22 to 60 years (mean 41 ± 12); eight were males. DNA from three HTLV-1 seronegative individuals was used as negative control.

Ligation mediated PCR amplification of cellular flanking sequences

DNA was digested with *Nla*III in $1 \times$ *Nla*III buffer for 3 h at 37°C. Digestion was controlled by gel electrophoresis.

DNA was phenol/chloroform extracted and ethanol precipitated. Digested DNA was ligated with BIO1 primer (Wattel *et al.*, 1995) using T4 DNA ligase. This was followed by two phenol/chloroform extractions and precipitation. Ligated DNA was amplified for 100 cycles using the BIO2 primer alone (Wattel *et al.*, 1995). Conditions were 1× Stoffel DNA polymerase buffer, 1.5 mM MgCl₂, 50 pmol BIO2, 150 μM of each dNTP and 10 U of Stoffel fragment of Taq DNA polymerase (Perkin Elmer Cetus) in a final volume of 85 μl. Twenty-five μl of a 1× PCR buffer containing dNTPs and primers were first loaded in a 750 μl tube and an ampliwaq PCR gem 100 (Cetus) was added to each tube. After wax layer formation by incubation at 75°C 10 min and cooling at room temperature for 15 min, 60 μl of the remaining reagent and ligated products were loaded. Thermal cycling parameters were: 94°C, 10 min; 100×(95°C 45 s, 60°C 45 s, 72°C 2 min), followed by a final elongation step of 10 min at 72°C. Ten microliters of this linear PCR reaction was used in a classical PCR amplification using the BIO3 and BIO4 primer pair (Wattel *et al.*, 1995). Amplification conditions were as before with 40 pmol of each primer, 2.5 U Taq polymerase all in a final volume of 100 μl. Thermal cycling parameters were: 94°C 10 min, 35×(95°C 45 s, 58°C 45 s, 72°C 1 min) followed by a final elongation step of 10 min at 72°C.

Amplification of integration sites by inverse PCR

DNA was first digested by *Nla*III as in LMPCR. Digested DNA was circularized with T4 DNA ligase in 600 μl for 16 h at 14°C. This was followed by two phenol/chloroform extractions and precipitation. Circularised DNA was amplified for 40 cycles using the BIO3 and BIO6 primer pair (Cavrois *et al.*, 1995). Amplification conditions and thermal cycling parameter were: 95°C 10 min, 40×(95°C 45 s, 58°C 45 s, 72°C 1 min) followed by a final elongation step of 10 min at 72°C.

References

- Blattner W. (1989). *Ann. Intern. Med.*, **111**, 4–5.
Cavrois M, Wain-Hobson S and Wattel E. (1995). *Res. Virol.*, **146**, 179–184.
Cesarman E, Chadburn A, Inghirami G, Gaidano G and Knowles DM. (1992). *Blood*, **80**, 3205–3216.
Chen YX, Ikeda S, Mori H, Hata T, Tsukasaki K, Momita S, Yamada Y, Kamihira S, Mine M and Tomonaga M. (1995). *Int. J. Cancer*, **60**, 798–801.
Clark JM. (1988). *Nuc. Acid. Res.*, **16**, 9677–9686.
D'Incan M, Combemale P, Verrier B, Garin D, Audoly G, Brunot J, Desgranges C and Flechaire A. (1994). *Leukemia*, **8**, 682–687.
Furukawa Y, Fujisawa J, Osame M, Toita M, Sonoda S, Kubota R, Ijichi S and Yoshida M. (1992). *Blood*, **80**, 1012–1016.
Gessain A, Barin F, Vernant JC, Maurs L, Gout O, Calender A and De Thé G. (1985). *Lancet*, **2**, 407–410.
Gessain A, Saal F, Gout O, Daniel MT, Flandrin G, de Thé G, Peries J and Sigaux F. (1990). *Blood*, **75**, 428–433.
Gessain A and Gout O. (1992). *Ann. Intern. Med.*, **117**, 933–946.
Hatta Y, Hiramata T, Miller CW, Yamada Y, Tomonaga M and Koeffler HP. (1995). *Blood*, **85**, 2699–2704.
Hausen H. (1991). *Science*, **254**, 1167–1173.
Ikeda S, Momita S, Amagasaki T, Tsukasaki K, Yamada Y, Kusumoto Y, Ito M, Kanda N, Tomonaga M, Soda H, Atogami S, Kamihira S, Hino S, Ito S, Kinoshita K and Ichmaru M. (1990). *Cancer Detect. Prev.*, **14**, 431–435.

Run-off analysis of amplified products

Two microliters of amplified product were submitted to two cycles of linear PCR in 20 μl with 0.05 pmols of a 5'-³²P-radiolabeled primer, BIO5 (Cavrois *et al.*, 1995), 1 U of Taq polymerase (Perkin Elmer Cetus). Thermal cycling parameter were: 95°C 5 min; 4×(95°C 30 s, 58°C 45 s, 72°C 5 min) followed by a final elongation step of 10 min at 72°C. After boiling in deionized formamide, 1.25 μl of run-off product were analysed on a 6% sequencing gel.

Quadruplicate experiments

As there is a stochastic component to the detection of HTLV-1 integration sites within the range of 100–1000 copies per clone for IPCR and 50–100 for LMPCR, samples from 15 asymptomatic carriers were analysed in quadruplicate. Thus an integration site detected more than once in four reactions corresponds to a clone with a frequency of $\geq 1/1500$ PBMCs if detected by LMPCR (Cavrois *et al.*, 1995). The 15 asymptomatic carriers were categorized according to age and sex. The occurrence of clones with a frequency of $\geq 1/1500$ PBMCs was compared between categories by the Mann-Whitney test (non parametric test) and correlation between the frequency of these clones and the age of carriers was quantified by the Spearman correlation coefficient.

Acknowledgements

We would like to thank Dr Franz Agis for a number of samples from asymptomatic carriers, Dr Olivier Gout for some TSP/HAM samples and Michaël Vanrumbeke, Bernard Hecquet and Michel Tavet for assistance. This work was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Direction de la Recherche et des Etudes Doctorales and the Fondation pour la Recherche Médicale. MC was supported by bursaries from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

- Ikeda S, Momita S, Kinoshita K, Kamihira S, Moriuchi Y, Tsukasaki K, Ito M, Kanda T, Moriuchi R, Nakamura T and Tomonaga M. (1993). *Blood*, **82**, 2017–2024.
Jacobson S, McFarlin DE, Robinson S, Voskuhl R, Martin R, Brewah A, Newell AJ and Koenig S. (1992). *Ann. Neurol.*, **32**, 651–657.
Kira J, Koyanagi Y, Yamada T, Itoyama Y, Goto I, Yamamoto N, Sasaki H and Sakaki Y. (1991). *Ann. Neurol.*, **29**, 194–201.
Korber B, Okayama A, Donnelly R, Tachibana N, Essex M. (1991). *J. Virol.*, **65**, 5471–5476.
Kubota R, Fujiyoshi T, Izumo S, Yashiki S, Maruyama I, Osame M and Sonoda S. (1993). *J. Neuroimmunol.*, **42**, 147–154.
Manns A and Blattner WA. (1991). *Transfusion*, **31**, 67–75.
Matsumura M, Kushida S, Ami Y, Suga T, Uchida K, Kameyama T, Terano A, Inoue Y, Shiraki H, Okochi K, Sato H and Miwa M. (1993). *Int. J. Cancer*, **55**, 220–222.
Nagai H, Kinoshita T, Imamura J, Murakami Y, Hayashi K, Mukai K, Ikeda S, Tobinai K, Saito H, Shimoyama M and Shimotohno K. (1991). *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 1421–7.
Nakada K, Yamaguchi K, Furugen S, Nakasone T, Nakasone K, Oshiro Y, Kohakura M, Hinuma Y, Seiki M, Yoshida M, Matutes E, Catovsky D, Ishii T and Takatsuky K. (1987). *Int. J. Cancer*, **40**, 145–148.
Parker CE, Daenke S, Nightingale S and Bangham CR. (1992). *Virology*, **188**, 628–636.



- Powers DC. (1993). *J. Infect. Dis.*, **167**, 584–592.
- Sakashita A, Hattori T, Miller CW, Suzushima H, Asou N, Takatsuki K and Koeffler HP. (1992). *Blood*, **79**, 477–480.
- Shinzato O, Ikeda S, Momita S, Nagata Y, Kamihira S, Nakayama E and Shiku H. (1991). *Blood*, **78**, 2082–2088.
- Summers BA, Griesen HA and Appel MJG. (1978). *Lancet*, **1**, 187–189.
- Uchiyama T, Yodoi J, Sagawa K, Takatsuki K and Uchino H. (1977). *Blood*, **50**, 481–492.
- Wattel E, Mariotti M, Agis F, Gordien E, Prou O, Courouce AM, Rouger P, Wain-Hobson S, Chen IS and Lefrere JJ. (1992). *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, **5**, 943–946.
- Wattel E, Vartanian JP, Pannetier C and Wain-Hobson S. (1995). *J. Virol.*, **69**, 2863–2868.
- Whang-Peng J, Bunn PA, Knutsen T, Kao-Shan CS, Broder S, Jaffe ES, Gelmann E, Blattner W, Lofters W, Young RC and Gallo RC. (1985). *J. Natl. Cancer Inst.*, **74**, 357–369.
- Wiley CA and Nelson JA. (1988). *Am. J. Pathol.*, **133**, 355–366.
- Yamato K, Oka T, Hiroi M, Iwahara Y, Sugito S, Tsuchida N and Miyoshi I. (1993). *Jpn. J. Cancer Res.*, **84**, 4–8.

Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma on a Background of Clonally Expanding Human T-Cell Leukemia Virus Type-1-Positive Cells

By Marielle Cavrois, Simon Wain-Hobson, Antoine Gessain, Yves Plumelle, and Eric Wattel

Tumorous and nontumorous samples from patients with various forms of adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) were analyzed using the sensitive inverse polymerase chain reaction (PCR) technique. In all samples, oligoclonal expansion of human T-cell leukemia virus (HTLV)-1 bearing T cells were detected, even for the tumorous samples that were mainly monoclonal by Southern blotting. For one case of

smouldering ATLL, chemotherapy apparently reduced the number of detectable clones. Taken together with similar data on asymptomatic and symptomatic HTLV-1 carriers without malignancy, it would appear that ATLL appears on a prior background of HTLV-1-initiated oligoclonal expansion. © 1996 by The American Society of Hematology.

ADULT T-CELL leukemia/lymphoma (ATLL) is a disease of long latency caused by human T-cell leukemia virus type-1 (HTLV-1).^{1,2} Southern blotting showed that the tumors were usually monoclonal for HTLV-1 integration, although some may harbor two to three proviruses.^{3,4} The viral protein tax transactivates a number of cellular genes such as interleukin-2 (IL-2) and IL-2R resulting in cell immortalization.⁵⁻¹² Two recent polymerase chain reaction (PCR)-based analyses of asymptomatic patients, as well as those with tropical spastic paraparesis HTLV-1-associated myelopathy (TSP/HAM), demonstrated that the clonal expansion of cells harboring the HTLV-1 provirus was the norm.^{13,14} This mode of replication reconciles the finding of elevated proviral loads^{15,16} with the extraordinary genetic stability of HTLV-1,^{17,18} which are otherwise antithetical for RNA viruses and retroviruses devoid of a polymerase-associated 3' exonuclease activity.¹⁹

The finding that clonal expansion of HTLV-1-bearing cells may precede ATLL suggests that the tumorous cell in ATLL may have arisen from a clonally expanding nonmalignant cell, presumably by the acquisition of subsequent mutations in genes such as p53 or p16.²⁰⁻²³ Therefore, in addition to the tumorous cell(s), clinically confirmed ATLL cases should exhibit a multitude of different HTLV-1 positive clonally expanding T cells. This should be particularly noticeable in the nontumorous material, in the case of lymphomas, and perhaps to a lesser extent, in the tumorous material. Inverse PCR (IPCR) was recently used in a demonstration of clonality of HTLV-1 proviral DNA in samples from nine patients with ATLL.²⁴ IPCR could detect about 1% of ATLL cells among uninfected cells and one to two integration sites

in seven frank cases. For two cases of smouldering ATLL a few faint bands were identified.

To assess the pattern of HTLV-1 replication in patients with ATLL, particularly the nontumorous tissue, a series of samples from patients with various forms of ATLL has been studied by IPCR amplification of HTLV-1 integration sites, which has a detection threshold of approximately one HTLV-1 integration site per 1,500 cells.

MATERIALS AND METHODS

Samples. DNA from 21 patients with ATLL were studied. Thirteen patients were women and the median age was 61 years (range, 19 to 83). Eleven patients were from the French West Indies, 5 from French Guiana, 3 from Iran, and 2 from the Ivory Coast. The diagnosis of ATLL was based on clinical features, cell surface marker analysis, serum HTLV-1 antibodies, and clonal integration of HTLV-1 provirus in tumor samples. Patients were classified according to lymphoma study group criteria.²⁵ Nine, 9, 2, and 1 patients fulfilled diagnostic criteria of acute, lymphoma, chronic, and smouldering ATLL, respectively. Skin infiltrates from a 60-year-old woman (patient P1-25-28) with smouldering ATLL were studied before, shortly after, and 6 months following treatment. DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), lymph nodes, and histologically proven skin infiltrates for 19, 2, and 2 samples, respectively. DNA from 10 asymptomatic carriers was also studied by IPCR. These 10 samples were selected on the basis of high proviral load (>1,000 copies/150,000 PBMCs) as evidenced by semiquantitative PCR (data not shown).

PCR amplification of cellular flanking sequences. HTLV-1 integration sites were amplified by IPCR as previously described^{14,26} with the following small modifications. Each sample was studied four times ($4 \times 1 \mu\text{g}$). Two microliters of amplified product were submitted to four cycles of linear PCR in 20 μL with 0.05 pmol of a 5'-³²P-radiolabeled primer, BIO5¹³ with 1 U of Stoffel fragment of the *Taq* polymerase (Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, CT). Thermal cycling parameters were 95°C for 10 minutes; $4 \times$ (95°C for 1 minute, 58°C for 1 minute, and 72°C for 5 minutes) followed by a final elongation step of 10 minutes at 72°C. After boiling in deionized formamide, 1.25 μL of run-off product was analyzed on a 4% sequencing gel. MT4 cell line and serial dilutions of an HTLV-1 plasmid were used as positive control. Sensitivity and specificity were identical to those of previous studies.^{14,26}

RESULTS

There is a stochastic element to the amplification of low frequency HTLV-1 integration sites.²⁶ Quadruplicate IPCR analysis of *Nla* III-digested p4.39 DNA, bearing an integrated HTLV-1 provirus, showed that above 1,000 copies, detection was 4/4. However at 500, 100, and ≤ 50 copies, detection was 3/4, 1/4, and 0/4, respectively.²⁶ As a consequence of this, DNA samples were analyzed four times ($4 \times 1 \mu\text{g}$, $\sim 4 \times 150,000$ cell equivalents). A signal present

From Unité 124 INSERM, Institut de Recherche sur le Cancer de Lille, Lille; Unité de Rétrovirologie Moléculaire and Unité d'Epidémiologie des Virus Oncogènes, Institut Pasteur, Paris, France; the Service d'Hématologie Biologique CHRU de Fort de France, Fort de France, Martinique, France; and the Service des Maladies du Sang, CHRU, Lille, France.

Submitted April 2, 1996; accepted July 25, 1996.

Supported by a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer. M.C. was supported by a bursary from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Address reprint requests to Eric Wattel, MD, PhD, Service des Maladies du Sang, CHU, 1 place de Verdun, 59037 Lille, France.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734 solely to indicate this fact.

© 1996 by The American Society of Hematology.
0006-4971/96/8812-0003\$3.00/0

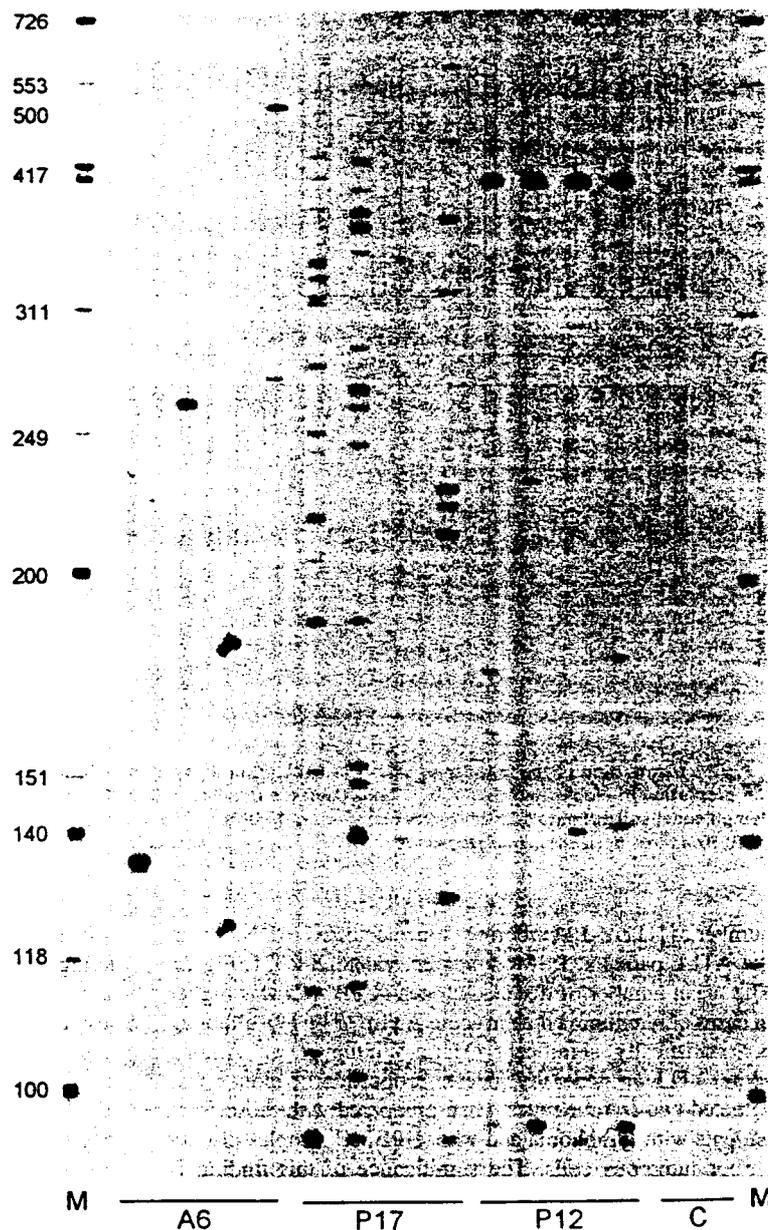


Fig 1. Run-off analysis of IPCR products of samples from patients A6, P17, and P12. For each sample, 0.5 μ g of digested and circularized DNA was submitted to four PCR analyses. Patient P12 had an acute ATLL with approximately 100% flower cells. The pattern of clonally expanding T cells showed one major clone with 21 clones repeated less than four times. Patient P17 had a lymphoma subtype of ATLL. IPCR analysis of PBMCs showed an overall number of 48 detectable clones. Four of these clones were found twice. A6 was an asymptomatic carrier with seven clones detected in a single IPCR reaction. No signal was detected after IPCR analysis of noninfected DNA (C).

in all four samples, therefore, corresponds to a clonal frequency of $\geq 1/150$ cells, whereas a single positive amplification would correspond to a frequency of $\leq 1/1,500$.

Typical IPCR analyses are shown in Fig 1. Patient P12 had an acute ATLL with an abundance of flower cells. A dominant band at approximately 417 bp was obvious and probably corresponds to the HTLV-1 integration site in the malignant cell. However, it was accompanied by 21 other clones whose frequency, judging by the stochastic nature of their detection, was $< 1/150$. Patient P17 had a lymphoma with a monoclonal integration site in the tumorous lymph node DNA. That a common intense band was not detected in PBMCs could simply be explained by the absence of an *Nla* III restriction site within 500 bp of the 3' HTLV-1 long terminal repeat (LTR), there being preferential amplification of small fragments.¹³ Despite this, the plethora of minor

clones is striking. A total of 48 distinct integration sites were noted, four being detected twice.

For PBMC samples from patients with lymphoma no abnormal lymphocytes or flower cells were detectable. Furthermore, the samples were negative by Southern blotting, indicating that there was less than 5% of harbored HTLV-1 proviral DNA. However, as can be seen in Fig 2, there were a large number of clones, between 3 and 71, in this apparently nontumorous material. The two samples of tumorous material derived by lymph node biopsy, were monoclonal by Southern blotting. Despite this, additional bands could be detected by IPCR. In fact, clonally expanding HTLV-1-infected clones were found by IPCR in all PBMC samples analyzed from patients with different degrees of ATLL with little correlation between disease stage and the number of clones (Fig 2 and Table 1). After four experiments, the mean

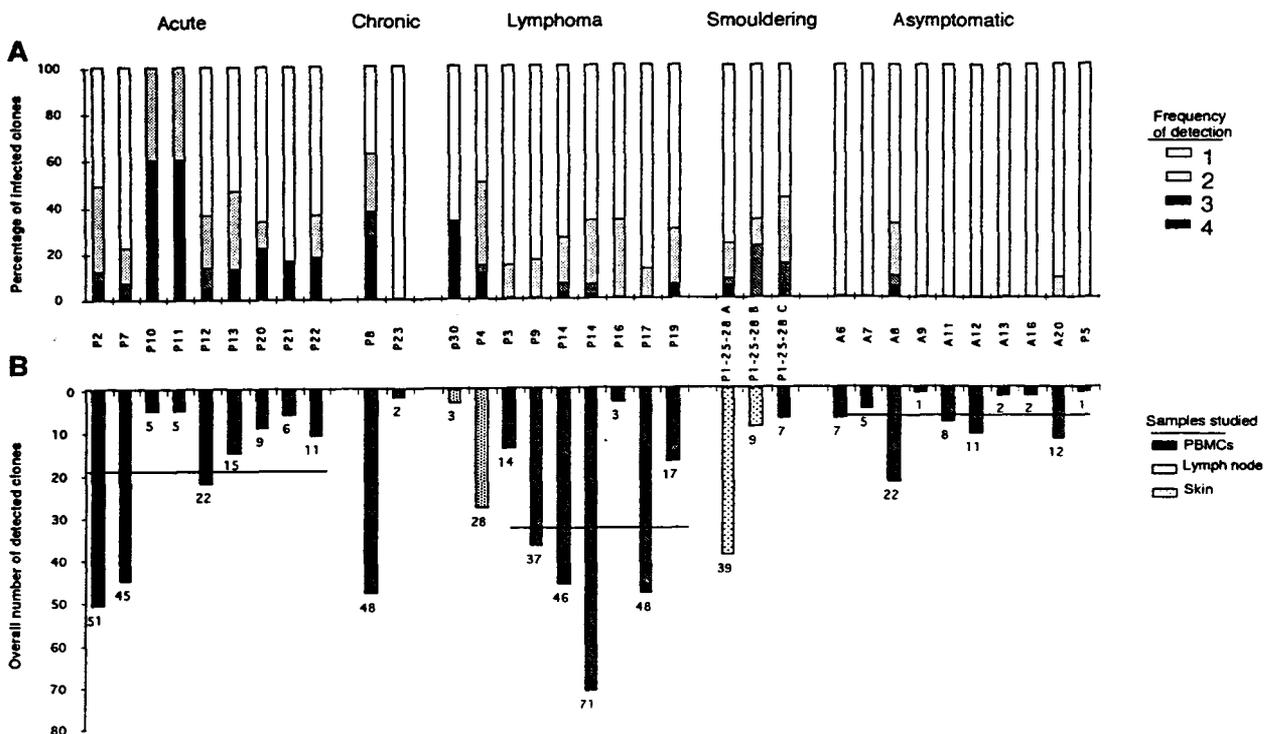


Fig 2. Distribution of the number of clones in ATLL (P) and asymptomatic carriers (A). Each sample was studied four times by IPCR and the proportion of clones detected 1, 2, 3, and 4 times is detailed in (A). DNA was extracted from PBMCs in all cases, except for patients P4 (lymph node) and patient P1-25-28 (2 skin biopsies and 1 PBMCs). The overall number of clones identified after four IPCR experiments is shown in (B). The three horizontal lines represent the mean number of circulating clones in acute ATLL, lymphoma ATLL, and asymptomatic carriers.

number of HTLV-1-harboring clones detected in DNA from the ATLL patients' PBMCs was 25 (range, 3 to 71, Fig 2). The mean number of detected clones in PBMCs was higher in cases of lymphoma than in acute ATLL (34 v 19), although not statistically significant (Mann-Whitney test). Among acute ATLL, a generally greater proportion of clones was detected two to four times when compared with those from patients with lymphoma and whose PBMC samples did not harbor tumorous cells. The significance of this finding is unclear, especially as the distribution of detection frequencies for the lymphomatous lymph node samples was comparable to those of acute ATLL samples (Fig 2).

Table 1. Distribution of the Number of Unique and Repeated Circulating Clones in Asymptomatic Carriers and Patients With HTLV-1-Associated Lymphoma

	Asymptomatic (9)	Lymphoma (7)	P (Mann-Whitney test)
Mean no. of clones	7	34	.0083
Mean no. of frequent clones (%)	1 (4)	8 (24)	.002

The overall number of HTLV-1 positive clones and the proportion of clones with frequencies $>1/1,500$ was significantly higher in the PBMCs of lymphoma in which no signal was detected by Southern blot. The difference was mostly due to the number of small clones detected one or two times after 4 experiments.

Patient P1-25-28 was a 60-year-old woman with smouldering ATLL confirmed by skin biopsy. Southern blotting showed infiltration of a tumorous cell bearing a single HTLV provirus. Following local chemotherapy, there was a near complete remission of skin lesions. A second skin biopsy of remaining lesions was performed. Figure 3 shows the IPCR HTLV-1 integration patterns for the two samples. A single intense band at approximately 365 bp dominated the tumorous sample (Fig 3A). Nonetheless, there were an additional 38 bands of lower frequency, some of which only came up in a single sampling. The number of detectable bands in the posttherapy sample was much less (Fig 3B), nine, although the approximately 365-bp band, presumably corresponding to the tumorous cell, was found in three of four samplings, suggesting a frequency of approximately 1/300 among the cells recovered. Six courses of systemic chemotherapy resulted in a complete clinical remission. At this latter time, a PBMC sample was analyzed, showing clonally expanding HTLV-1 T cells (Fig 3C). The approximately 365-bp band was also present at a frequency of four of four samplings or $\geq 1/150$ PBMC.

DISCUSSION

Southern blotting has long shown that ATLL is usually monoclonal with respect to an integrated HTLV-1 provirus, although tumors with two to three integration sites may also be detected.^{3,4} The inherent sensitivity associated with PCR techniques has allowed the detection of clonally expanded

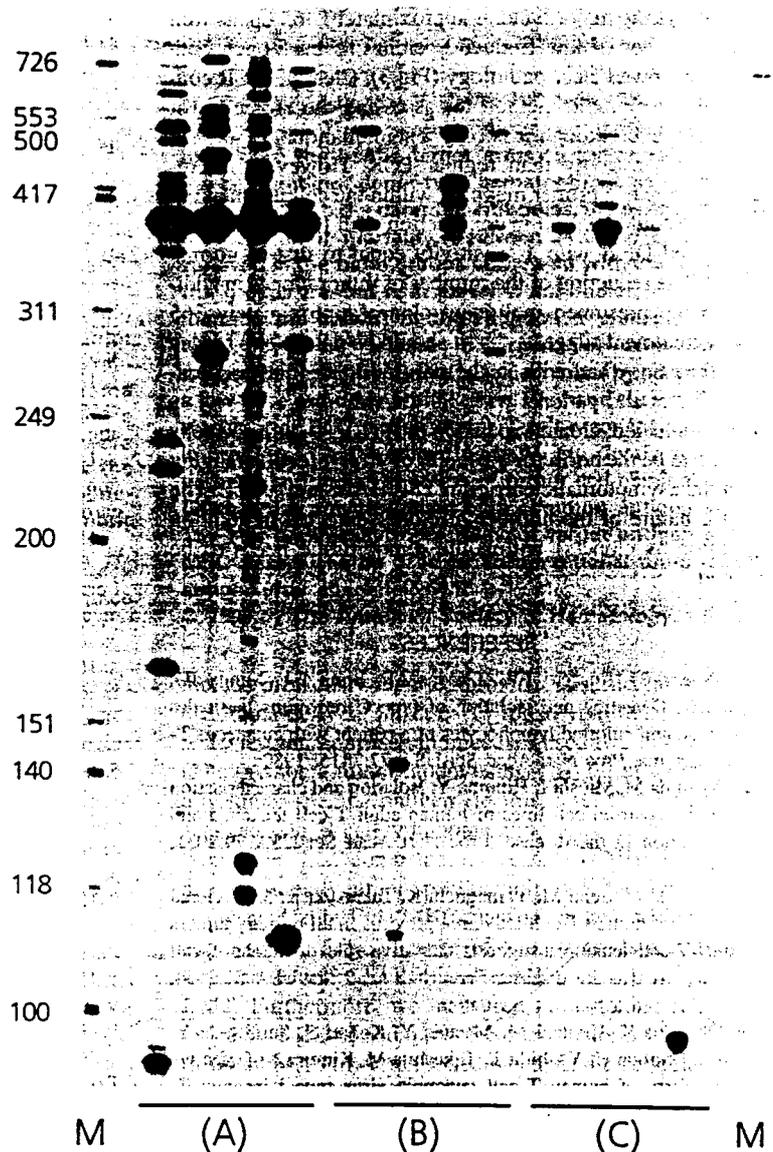


Fig 3. Run-off analysis of IPCR products of DNA from tumor cells present in skin biopsies of patient P1-25-28 before (A) and after local chemotherapy (B). Lane C, analysis of IPCR products derived from the PBMC sample taken 6 months after the second skin biopsy. After local chemotherapy, the number of clones detected diminished from 39 to nine. The major integration site detected 4/4 times in the first sample was still detected 3/4 and 4/4 replicas in the second biopsy and third samples, respectively.

HTLV-1-harboring cells in asymptomatic carriers and TSP/HAM patients.^{13,14} When applied to ATLL samples, inverse PCR showed a large number of minor clones.

With the PBMC samples from patients with acute leukemia, as well as the lymphomatous lymph node samples (P4, P30), at least 2 to 51 additional minor clones per sample were detected (150,000 cells). Given that all the tumors were monoclonal for HTLV-1 by Southern blotting, the presence of such additional clones could reflect (1) clonal expansion of nonmalignant HTLV-1-bearing clones within the same sample, (2) rearrangement of cellular DNA flanking the provirus in monoclonal tumor cells, or (3) HTLV-1 superinfection of monoclonal tumor cells. The first possibility is distinctly possible given that clonal expansion is the dominant mode of HTLV-1 replication. Rearrangement of 3' flanking cellular sequences has indeed been detected, although at low frequency.¹³ Infrequent superinfection of the tumor cell cannot be formally excluded. However, as clonal expansion

appears to be the dominant form of HTLV-1 replication,^{13,14,18} this third possibility would appear unlikely.

The finding of clonally expanding HTLV-1-bearing T cells in the nontumorous PBMC samples of patients with lymphoma, along with comparable findings for asymptomatic carriers and TSP/HAM patients, would suggest that this mode of viral replication is the norm, with the malignant cell superimposed on such a background. Given the augmented proliferation initiated by HTLV integration, the accumulation of subsequent genetic lesions, for example p53 mutation, might contribute to the development of a neoplastic cell.²⁰⁻²² In this respect, ATLL would appear analogous to many other cancers requiring a succession of genetic lesions. However, HTLV integration, followed by tax driven clonal expansion of the cell, may be seen as the initiating event.

The IPCR analysis of HTLV-1 proviral DNA in the skin biopsy and PBMC samples before and after local chemotherapy and chemotherapy showed considerable reduction in the

intensity of the major band at approximately 365 bp, as well as the number of low frequency clones, even though both samples showed clear pathology (Fig 3). Clearly, IPCR constitutes a very rapid method for assessing the efficiency of treatment, even though it is only a semiquantitative method with less sensitivity than regular PCR. However, as previously shown, a primer mapping within the cellular flanking sequence could be used in conjunction with BIO3 to amplify undigested DNA with a sensitivity equal to that of normal PCR.²⁶ The reduction of the number of minor clones in addition to the presumed malignant clone (approximately 365 bp) by treatment suggests that it should be possible to reduce their frequency and with it, the proviral load, in asymptomatic carriers and patients with TSP/HAM.

In conclusion, clonal expansion of HTLV-1-infected cells appears to be the norm for all stages of viral infection ranging from the asymptomatic carrier to TSP/HAM and ATLL. The precise nature of the number of clones detected in addition to tumorous clone(s) within the tumor tissue needs to be defined.

REFERENCES

- Poiesz BJ, Ruscetti FW, Gasdar AF, Bunn FA, Minna JD, Gallo RC: Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:7415, 1980
- Yoshida M, Mioshi I, Hinuma Y: Isolation and characterisation of a retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:2031, 1982
- Yoshida M, Seiki M, Yamaguchi K, Takatsuki K: Monoclonal integration of human T-cell leukemia provirus in all primary tumors of adult T-cell leukemia suggests causative role of human T-cell leukemia virus in the disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:2534, 1984
- Ohshima K, Kikuchi M, Masuda Y, Kobari S, Sumiyoshi Y, Eguchi F, Mohtai H, Yoshida T, Takeshita M, Kimura N: Defective provirus form of human T-cell leukemia virus type I in adult T-cell leukemia/lymphoma: Clinicopathological features. *Cancer Res* 51:4639, 1991
- Alexandre C, Charnay P, Verrier B: Transactivation of Krox-20 and Krox-24 promoters by the HTLV-1 Tax protein through common regulatory elements. *Oncogene* 6:1851, 1991
- Kim SJ, Kehrl JH, Burton J, Tendler CL, Jeang KT, Danielpour D, Thevenin C, Kim KY, Sporn MB, Roberts AB: 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, 1990
- Mori N, Shirakawa F, Saito K, Murakami S, Oda S, Eto S: Transactivation of the interleukin-1 alpha gene promoter by human T-cell leukemia virus type I tax in T cells. *Blood* 84:1688, 1994
- Tendler CL, Greenberg SJ, Blattner WA, Manns A, Murphy E, Fleisher T, Hanchard B, Morgan O, Burton JD, Nelson DL, Waldman DA: Transactivation of interleukin 2 and its receptor induces immune activation in human T-cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy: Pathogenic implications and a rationale for immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:5218, 1990
- Yamashita I, Katamine S, Moriuchi R, Nakamura Y, Miyamoto T, Eguchi K, Nagataki S: Transactivation of the human interleukin-6 gene by human T-lymphotropic virus type I Tax protein. *Blood* 84:1573, 1994
- Himes SR, Coles LS, Katsikeros R, Lang RK, Shannon MF: HTLV-1 tax activation of the GM-CSF and G-CSF promoters requires the interaction of NF-kB with other transcription factor families. *Oncogene* 8:3189, 1993
- Kelly K, Davis P, Mitsuya H, Irving S, Wright J, Grassmann R, Fleckenstein B, Wano Y, Greene W, Siebenlist U: A high proportion of early response genes are constitutively activated in T cells by HTLV-I. *Oncogene* 7:1463, 1992
- Cross SL, Feinberg MB, Wolf JB, Holbrook NJ, Wong-Staal F, Leonard WJ: Regulation of the human interleukin-2 receptor alpha chain promoter: Activation of a nonfunctional promoter by the transactivator gene of HTLV-I. *Cell* 49:47, 1987
- Wattel E, Vartanian JP, Pannetier C, Wain-Hobson S: Clonal expansion of HTLV-1 infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *J Virol* 69:2863, 1995
- Cavrois M, Gessain A, Wain-Hobson S, Wattel E: Proliferation of HTLV-1 infected circulating cells in vivo in all asymptomatic carriers and patients with TSP/HAM. *Oncogene* 12:2419, 1996
- Gessain A, Saal F, Gout O, Daniel MT, Flandrin G, de-The G, Peries J, Sigaux F: High human T-cell lymphotropic virus type I proviral DNA load with polyclonal integration in peripheral blood mononuclear cells of French West Indian, Guianese, and African patients with tropical spastic paraparesis. *Blood* 75:428, 1990
- Wattel E, Mariotti M, Agis F, Gordien E, Le-Coeur FF, Prin L, Rouger P, Chen IS, Wain-Hobson S, Lefrere JJ: Quantification of HTLV-1 proviral copy number in peripheral blood of symptomless carriers from the French West Indies. *J Acquir Immune Defic Syndr* 5:943, 1992
- Gessain A, Gallo RC, Franchini G: Low degree of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I genetic drift in vivo as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations. *J Virol* 66:2288, 1992
- Wattel E, Cavrois M, Gessain A, Wain-Hobson S: Clonal expansion of infected cells - a way of life for HTLV-1. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 13:591, 1996
- Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, Vande Pol S: Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 215:1577, 1982
- Sakashita A, Hattori T, Miller CW, Suzushima H, Asou N, Takatsuki K, Koeffler HP: Mutations of the p53 gene in adult T-cell leukemia. *Blood* 79:477, 1992
- Nagai H, Kinoshita T, Imamura J, Murakami Y, Hayashi K, Mukai K, Ikeda S, Tobinai K, Saito H, Shimoyama M, Shimotohno K: Genetic alteration of p53 in some patients with adult T-cell leukemia. *Jpn J Cancer Res* 82:1421, 1991
- Cesarman E, Chadburn A, Inghirami G, Gaidano G, Knowles DM: Structural and functional analysis of oncogenes and tumor suppressor genes in adult T-cell leukemia/lymphoma shows frequent p53 mutations. *Blood* 80:3205, 1992
- Hatta Y, Hiramata T, Miller CW, Yamada Y, Tomonaga M, Koeffler HP: Homozygous deletions of the p15 (MTS2) and p16 (CDKN2/MTS1) genes in adult T-cell leukemia. *Blood* 85:2699, 1995
- Takemoto S, Matsuoka M, Yamaguchi K, Takatsuki K: A novel diagnostic method of adult T-cell leukemia: Monoclonal integration of human T-cell lymphotropic virus type I provirus DNA detected by inverse polymerase chain reaction. *Blood* 84:3080, 1994
- Shimoyama M: Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *Br J Haematol* 79:428, 1991
- Cavrois M, Wain-Hobson S, Wattel E: Stochastic events in the amplification of HTLV-1 integration sites by linker mediated PCR. *Res Virol* 146:179, 1995

Clonal Expansion of Infected Cells: A Way of Life for HTLV-I

*†Eric Wattel, †Marielle Cavrois, ‡Antoine Gessain, and §Simon Wain-Hobson

**Service des Maladies du Sang, CHU, Lille; †INSERM U124, Institut de Recherche sur le Cancer, Lille; ‡Unité d'Epidémiologie des Virus Oncogènes, Paris; and §Unité de Retrovirologie Moléculaire, Institut Pasteur, Paris, France*

Summary: Human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) is characterized by a remarkable genetic stability and high proviral loads in the absence of malignant disease. This results from the effect of tax on cell cycling. The virus replicates essentially in concert with the cell, that is, via mitosis, which can be shown by polymerase chain reaction amplification of the HTLV-I integration sites. This is true of all stages of HTLV-I infection and accompanies adult T-cell leukemia/lymphoma. The very low viremia results from its genetic organization. **Key Words:** HTLV-I—Adult T-cell leukemia—Tropical spastic paraparesis—Clonal expansion—Genetic variation.

Nucleic acids are vulnerable to chemical modification and degradation while their replication is an error-prone process. DNA-based microbes have invested heavily in DNA repair and proofreading mechanisms to an extent that is compatible with efficient reproduction, yet generating sufficient variation so as to enable survival in the face of changing environments and extraordinarily hostile immune systems. Inter alia proofreading involves 3' exonucleolytic activity associated with either the DNA polymerase or the replication complex. Such is life in the DNA world. RNA viruses are unique in that their polymerases, although clearly marked by the same basic quaternary structure of the polymerization domain common to all nucleic acid polymerases, lack a domain encoding a 3' exonuclease (1,2). Furthermore, host exonucleases are not incorporated specifically into virions. Consequently, any polymerization error becomes immortalized. Not surprisingly, the highest mutation rates observable for any microbes are to be found among the

RNA viruses (1,2). Higher mutation rates are theoretically and practically possible—referred to as hypermutations. However, there comes a threshold beyond which the mutation rate is deleterious to the survival of the virus (3). The retroviruses are somewhat schizophrenic: on the one hand, they undertake DNA polymerization while, on the other, their reverse transcriptase is devoid of 3' exonucleolytic activity. Thus, genetic variability typical of the RNA viruses becomes part of their way of life. For some reason not yet evident, the average mutation rate for retroviruses is ~20-fold lower than that for an ensemble of familiar RNA viruses (Table 1). (4).

HTLV-I IS GENETICALLY STABLE

The first complete human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I) sequence emerged in 1983 (5). Since then, a remorseless accumulation of sequence data has shown that HTLV-I is genetically extraordinarily stable. While some segments are slightly more variable than others, geographically widely dispersed viruses are <10% divergent at the nucleic acid level. This includes isolates from tribes and

Address correspondence and reprint requests Dr. Eric Wattel at Department of Hematology, University Hospital of Lille, CHU, 1 place Verdun, 59037 Lille, France.

TABLE 1. Mutation rates for a large number of organisms

Organism	Mean mutation rate per genome
Lytic RNA viruses	4
Retroviruses	0.2
DNA phages	0.004
<i>E. coli</i> , <i>N. crassa</i> , and <i>S. cerevisiae</i>	0.0028

Adapted and updated from Drake (4). Lytic RNA viruses include phage Q β , vesicular stomatitis virus, poliovirus, and influenza A; the retroviruses cover Moloney murine leukemia virus, Rous sarcoma virus, bovine leukemia virus, HIV, and spleen necrosis virus; the DNA phages were M13, λ , T2, and T4.

aboriginal populations isolated from the mainstream of human movement for over thousands of years (6). Inpatient variation is invariably <0.5% (Table 2). By comparison, the genetic variation of the other human CD4 T-lymphotropic virus, HIV-1, is embarrassingly evident (7). The inpatient variation within the HIV-1 envelope protein 5 years after infection is greater than that among all HTLV-I envelope proteins to date (8). Even antigenically stable RNA viruses such as measles and hepatitis-A virus have, in this polymerase chain reaction (PCR) era, shown themselves to be more variable than was hitherto thought. Thus, HTLV-I and its close and distant cousins, HTLV-II and bovine leukemia virus (BLV), respectively, constitute remarkable exceptions, unique among the genetically promiscuous RNA viruses.

ELEVATED PROVIRAL LOADS

The nonmalignant neurologic disorder tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy (TSP/HAM) is accompanied by very high proviral loads, sometimes approaching 1/5 peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) (6,9,10). Consequently, substantial proportions of the CD4 T cells in the periphery may be infected. Proviral loads during the long asymptomatic phase of infection are less than in TSP/HAM, although they can be as high as 1/25 PBMCs (11,12). Here is evidence of extensive replication, yet HTLV-I is genetically more stable than any other RNA virus. Another glance at HIV-1 is instructive: HIV proviral loads in late-stage disease, AIDS, may get up to 1/100 to 1/30 in the periphery. In other words, HIV-1, too, shows signs of extensive viral replication, although the maximum HIV-1 proviral load is less than that observed for HTLV-I. Yet HIV-1 varies considerably as one would expect (7,8). HTLV-I is clearly the odd man out. How is this possible?

Three possibilities come to mind: (a) the HTLV-I mutation rate is unusually low, (b) the genome is particularly refractory to change, or (c) HTLV-I predominantly replicates via cellular mitosis. While there is no precise value for HTLV-I, that of the related BLV is known. It turns out to be on the lower side [4×10^{-6} /base/cycle (13)] while that for HIV-1 is on the upper end [3.5×10^{-5} /base/cycle (14)]. Only 1 log differentiates them. Coffin has cogently argued that, of all the components underlying viral variation, the mutation rate is among the least important while the number of successive cycles of replication is probably the most important (15). The second possibility is that HTLV-I cannot absorb mutation and is refractory to genetic change (16). While HTLV-I is certainly unique in some aspects, it shares pol polyproteins common to all retroviruses. Among all retroviral aspartic protease and reverse transcriptases encoded by pol, only six and three residues, respectively, are perfectly conserved among retroviruses. Furthermore, saturation mutagenesis of a number of viral proteins, as well as slowly evolving cellular proteins, show that a very large number of residues may be changed with little change in protein function. Finally, the extraordinary sequence distances separating HTLV-I and BLV argue against the concept that HTLV-I is refractory to change. Paraphrasing Maynard Smith's elegant demonstration of 25 years ago, given a mutation rate of <1/genome/cycle, you can't get from HTLV-I to HTLV-II (or vice versa) without a series of functional single residue replacements (17). Thus, HTLV-I cannot be refractory to mutation.

HTLV-I REPLICATES PREDOMINANTLY VIA MITOSIS

Having eliminated the first two possibilities, Sherlock Holmes would deduce that only HTLV-I replication via mitosis remains, however improbable. In fact, this is not entirely without precedent, as HTLV-I proviral DNA haunts the tumor cell. Originally, it was thought that HTLV-I integration was polyclonal in nonmalignant disease. This was to some extent a problem of sampling, particularly when the mean proviral load is low (<1/5 cells) compared with the sensitivity of Southern blotting (>1/20 cells). Subsequently, a certain fraction of TSP/HAM samples (<30%) was found to have detectable integrated HTLV-I proviruses, indicative of clonal expansion of the infected cells, in a man-

TABLE 2. Inpatient HTLV-I sequence variation

Samples	Region (bp)	No. clones	No. substitutions	Subs/kb/clone	References
Asymptomatic carriers					
CNS	Px (862)	10	4	0.46	Kira et al., 1991 (9)
PBMCs	Px (1100)	20	24	1.09	Niewiesk et al., 1995 (26)
PBMCs	Px (1100)	21	100	4.33	
PBMCs	Px (1100)	22	28	1.16	
PBMCs	Px (1100)	20	38	1.73	
PBMCs	Px (960)	12	4	0.35	Saito et al., 1995 (25)
PBMCs	Px (960)	10	11	1.15	
PBMCs	Env (265)	100	2	0.08	Wattel et al., 1995 (18)
PBMCs	Env (265)	100	2	0.08	
TSP/HAM					
CNS ¹	Px (862)	8	2	0.29	Kira et al., 1991 (9)
CNS ¹	Px (862)	9	2	0.26	
CNS ²	Px (862)	9	10	1.29	
CNS ²	Px (862)	9	6	0.77	
CNS	Px (862)	15	9	0.70	
PBMCs	Px (1100)	19	36	1.72	Niewiesk et al., 1995 (26)
PBMCs	Px (1100)	22	29	1.20	
PBMCs	Px (1100)	21	16	0.69	
PBMCs	Px (1100)	19	31	1.48	
CNS	Px (960)	13	11	0.88	Saito et al., 1995 (25)
PBMCs	Px (960)	9	6	0.69	
CNS	Px (960)	10	21	2.19	
PBMCs	Px (960)	10	7	0.73	
CNS	Px (960)	10	13	1.35	
PBMCs	Px (960)	9	7	0.81	
CNS	Px (960)	10	9	0.94	
CNS	Px (960)	13	19	1.52	
PBMCs	Px (960)	13	16	1.28	
PBMCs	Env (569)	11	3	0.48	Gessain et al., 1992 (6)
PBMCs	Env (569)	11	3	0.48	
PBMCs	Env (569)	2	2	1.76	
PBMCs	Env (569)	3	5	2.93	
PBMCs	Env (569)	4	3	1.32	
ATLL					
CNS	Px (960)	10	3	0.31	Saito et al., 1995 (25)
PBMCs	Env (569)	8	7	1.54	Gessain et al., 1992 (6)
PBMCs	Env (569)	2	1	0.88	
PBMCs	Env (569)	8	4	0.88	
PBMCs	Env (569)	8	2	0.44	
PBMCs	Env (569)	4	1	0.44	
Skin	Env (569)	6	6	1.76	
PBMCs	Env (569)	4	1	0.44	

The average number of nonsynonymous changes per clone per kilobase is derived from published data. Only differences with respect to the dominant sequence were noted. The mean substitution frequency was 1.2/kb/clone (range, 0.08–4.33/kb/clone). The median was 0.91/kb/clone. The polymerase chain reaction error rate is often not reported and varies between laboratories. It is expected to be ≤ 0.5 /kb/clone. Occasionally it could be greater. ATLL, adult T-cell leukemia/lymphoma; CNS, central nervous system; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; and TSP/HAM, tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy.

ner reminiscent of HTLV-I in adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL). Only PCR, however, has the sensitivity to explore the problem further. The amplification of the HTLV-I proviral integration sites required the use of linker-mediated PCR (18) and/or inverse PCR (19,20). The former proved to be the most sensitive.

In all patient samples analyzed to date, whether they be from asymptomatic carriers or TSP/HAM patients, oligoclonal expansion of HTLV-I-infected

cells proved to be the norm (18). The number of clones detected varied considerably but was between 5 and 60 per sample (Fig. 1). Despite being far more sensitive than Southern blotting, linker-mediated PCR and inverse PCR are nonetheless less sensitive than normal PCR, their relative sensitivity being >50 and 100 copies, respectively. In addition, samples are typically 1–2 μ g of DNA, which will restrict the identification of rare clones. It is to be presumed that the absolute number of

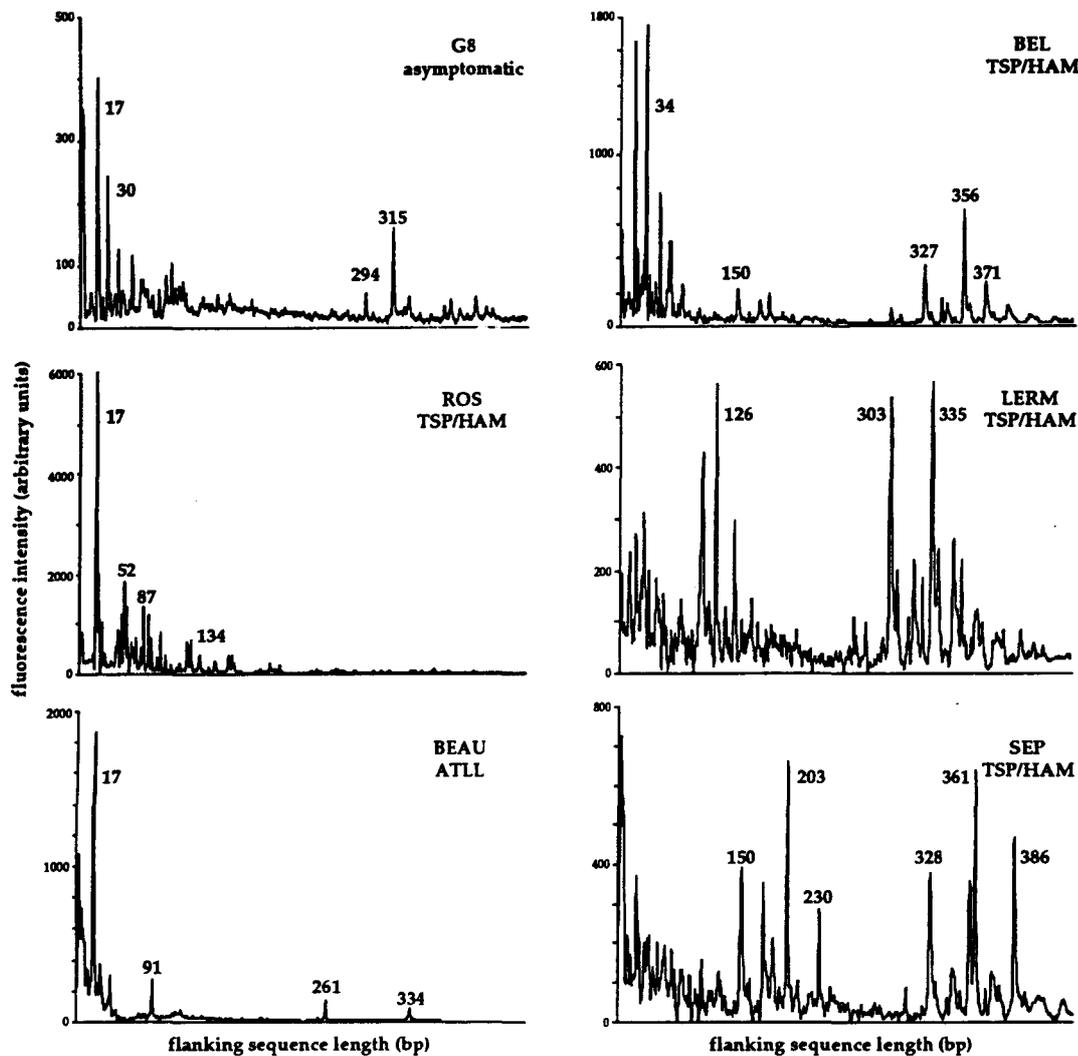


FIG. 1. Fluorescent primer runoff of polymerase chain reaction/amplified HTLV-I integration sites in six HTLV-I-positive samples. Oligoclonal expansion, evidenced by 10–20 peaks, is evident. The integration site profile was simpler for the adult T-cell leukemia/lymphoma (ATLL) sample, although minor peaks could be discerned. All patients were from Martinique or Guadeloupe in the Caribbean. TSP/HAM, tropical spastic paraparesis/HTLV-I-associated myelopathy. From Wattel et al. (18).

clones within a patient is considerably greater, probably of the order of many hundreds. However, the PCR techniques pick up the most abundant expanding clones.

That there may be a hundred or more clones within an individual clearly indicates that HTLV-I does replicate via a little reverse transcription *in vivo*. However, the bulk of the proviral load is made up of the most abundant clones, which are relatively few (<10–15) per sample. Consequently, it can be concluded that HTLV-I replicates *in vivo* predominantly via mitosis rather than via reverse transcription. As cell-free virus is quasi nil, transmission must involve infected allogeneic cells. Reverse transcription must soon follow, as the allo-

genic cells are ephemeral. Once a few rounds of reverse transcription have been established, however, clonal expansion of the infected T cells predominates. With a mutation rate of 4×10^{-6} /base per genome (13), even 100 rounds of successive replication via reverse transcription would give rise to ~2 substitutions among 20 clones of 300-bp length, comparable to PCR error. PCR error varies with dNTP concentrations and between laboratories. Even if the observed inpatient variation was wholly attributed to reverse transcription, 100 rounds of replication over many tens of years is trivially small, given that a retrovirus may replicate in <24 h.

There is ample literature describing the influence

of the HTLV-I tax protein on the upregulation of transcription factors and lymphokines and their receptors (21). Recently, it has been shown that tax intervenes directly in the pathway controlling proliferation. Inhibiting the tax pushes the cell from G₁ into S phase (28). Thus, the molecular basis for clonal expansion is starting to become clear.

A HIGHLY DYNAMIC RELATIONSHIP WITH THE IMMUNE SYSTEM

Microbial infections are always dynamic playoffs between the microbe trying to replicate and the host's immune system trying to prevent it from doing so. A little number crunching reveals the wrath of the immune system. The HTLV-I proviral load in TSP/HAM patients may approach 10% of PBMCs or on the order of 3×10^9 copies (the proviral burden in secondary lymphoid organs is unknown). Let us assume a minimum of 10 HTLV-I-driven proliferating clones and that proliferation is not unduly abnormal, that is, the clones have the potential to divide approximately every 24 h. It would be possible to attain such a proviral load in ~28 divisions. Even if the proviral burden was 10-fold greater, the number of divisions needed would only be 31. As only a small proportion of HTLV-I carriers develop nonmalignant disease after 20–40 years of infection, clonal expansion must clearly be actively restrained or else CD4 lymphocytosis would be in evidence from within weeks after infection.

As clonal expansion must be held in check, the question becomes, by what? Anti-HTLV-I cellular immunity is the obvious explanation. Anti-HTLV-I cellular immunity is present in asymptomatic carriers (22) and is particularly intense among TSP/HAM patients (23), where the proviral load is much greater than in the former group. Indeed, among the latter group, anti-tax activity is especially intense, being detectable in direct cytotoxic T-lymphocyte (CTL) assays. Although tax expression pushes the cell into proliferation directly as well as upregulating a number of cytokines and transcription factors, it is antigenically nonself, which is detrimental to clonal survival.

One of the few HTLV-I transcripts detectable among PBMCs from TSP/HAM patients is tax mRNA (24). And the CTL response is particularly focused on tax. This suggests that any somatic mutation occurring during mitosis that affects in some way a tax CTL epitope, either via processing, HLA

presentation, or recognition, has the potential to render the virus-driven clone less vulnerable to the immune system. Indeed, depending upon the HLA profile of the individual, it may be able totally to escape CTL recognition. Some authors have presented data indicating that the frequency of inpatient mutations in tax is higher than elsewhere in the genome (25), whereas others have reported variants not recognized by bulk anti-tax CTL (26).

This argument makes a few assumptions about tax function and the immune system that need to be mentioned. If tax expression is necessary for clonal proliferation, the somatic mutations should not impair tax activity (27). Those that do would result in the loss of the cell lineage. Yet if somatic mutations in tax may occur during clonal expansion, similar mutations in cellular genes, perhaps p53 and others, yet not resulting in a malignant phenotype, might have also occurred. If they affected cell growth, then over time these clones may outgrow others by competitive exclusion. Indeed, there might be a point where such clones could become tax independent. Based on such a background, escape from tax-specific CTLs via somatic mutation would be of advantage to the clone, whereas loss of tax function would be irrelevant. Both scenarios are distinctly viable. In one of the asymptomatic carriers studied in great detail, a small deletion was found in cellular flanking DNA of one clone, demonstrating that additional mutational events do indeed accompany clonal expansion (18).

These arguments are reminiscent of discussions of the mechanisms underlying cancer. This brings us to ATLL, which occurs late in life following many decades of an asymptomatic carrier status and carries a lifetime risk of ~5%. ATLL was the first disease associated with HTLV-I, the tumor being characterized by a single, and occasionally 2–3, HTLV-I provirus or parts thereof. Using the sensitive PCR techniques, it has been possible, obviously, to pick up the malignant cell. More importantly, considerable numbers of other HTLV-I clones have also been identified (M. Cavrois et al., unpublished data). In cases of lymphoma, the peripheral blood presented a series of HTLV-I-driven clonally expanding cells indistinguishable from those of an asymptomatic carrier or TSP/HAM patient. Thus, in all cases of HTLV-I infection, whether it be the long asymptomatic carrier phase, TSP/HAM, or ATLL, clonal expansion of HTLV-I-bearing cells is the norm. Indeed, ATLL could even be seen as a clone that has picked up one or

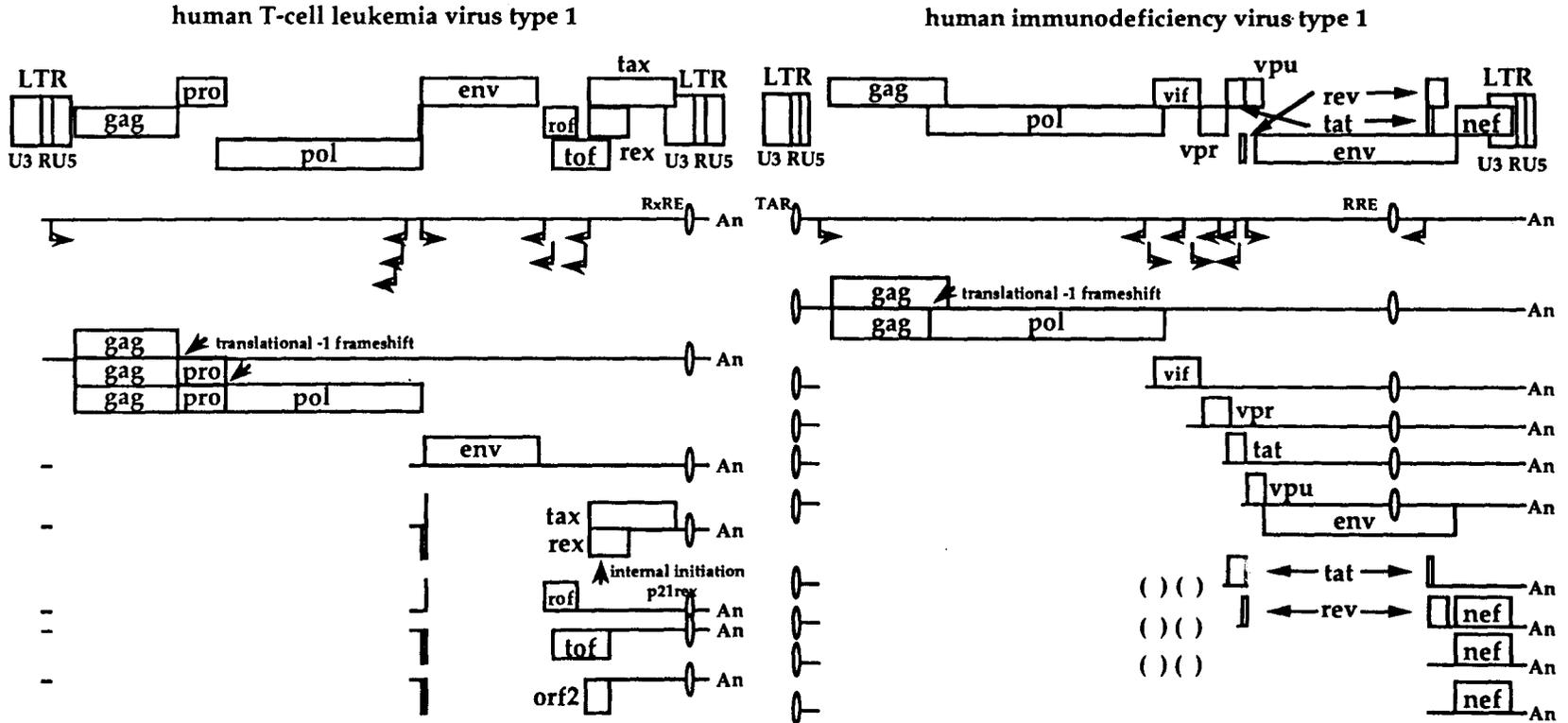


FIG. 2. Transcription maps of HTLV-I and HIV-1. Below the genome configuration is the transcription map, each line designating a unique mRNA. When broken, the mRNA is made up of ≥ 2 exons. Those exons in brackets are noncoding exons present only in some mRNA species. Splice and donor sites are given as left and right pointing arrows, respectively. The HTLV-I transactivator—Tax—acts on a DNA element in long terminal repeat (LTR) U3 region and cellular genes. That of HIV—Tat—recognizes the RNA TAR element in the R region of the LTR. The analogous HTLV-I and HIV-1 regulators of splicing—rex and rev—act on specific intragenomic RNA structures, RxRE and RRE, respectively. Note that Tax and Rex are derived from the same mRNA. The HIV-1 Tat protein comes in two functionally equivalent forms of 72 and 86 residues. The 86-residue form (exons 2 + 3) comes from a small Rev-independent mRNA while the 76-residue form (exon 2) comes from a large Rev-dependent mRNA.

two somatic mutations too many, which has resulted in a malignant phenotype. In such terms, ATLL may be seen as the result of a process involving the accumulation of numerous somatic mutations following HTLV-I infection years beforehand. The stochastic nature of mutation and the probability of accumulating an ensemble of somatic changes might underlie the fact that HTLV-I infection does not always result in ATLL. These findings would suggest that cytostatic drugs might be of some use in the treatment of TSP/HAM.

THE CONTRAST BETWEEN HTLV-I AND HIV-1

It would seem therefore that HTLV-I establishes high proviral loads via a small amount of reverse transcription and subsequent clonal expansion, probably via the trans effect of p40tax on cellular genes (21,28). Consequently, little genetic variation is generated. For HIV-1, high proviral loads are ultimately achieved by remorseless rounds of reverse transcription, with extensive genetic variation as an inevitable consequence.

Two further issues need addressing that are partly linked. Given clonal expansion and large proviral loads, why is so little virus produced? And how do HIV and HTLV-I achieve such different results? The two questions are intertwined. An answer is to be had by examining the relative genetic organization of the analogous viral tax (HTLV-I)/tat (HIV-1) and rex (HTLV-I)/rev (HIV-1) genes (Fig. 2). Tax and Tat are the transactivating transcriptional enhancer proteins. Tax has targets in the DNA of the HTLV-I long terminal repeat (LTR) and cellular promoters and therefore its effect is somewhat diluted. Tat is highly focused on a small RNA structure encoded by the HIV LTR. The Rex and Rev proteins regulate the transport of partly spliced mRNAs to the cytoplasm via interaction with RNA structures termed RexRE and RRE, respectively. In the case of HTLV-I, the positive effect of rex on transport of gag-pol and env mRNAs to the cytoplasm rex has a negative effect on the quantity of small mRNAs that encode Tax and Rex. Thus, massive transcription and virion assembly at the plasma membrane are mutually incompatible.

Like Rex, the Rev protein of HIV has a negative effect on its own expression as well as that of the 86-amino-acid form of Tat encoded by the second and third exons of the small 1.8-kb mRNA. However, among the large RRE+ mRNA transcripts is

a 4.5-kb mRNA encoding a 72-residue form of Tat. Hence, the negative effect of Rev on Tat expression is mitigated, ensuring constant and massive transcription of the genome, abundant precursor RNA for the multiple mRNAs, and consequently virus production.

The two human retroviruses are simply not organized in the same way, which helps explain their very different genetic stability. Could transactivation of cellular genes by HTLV-I tax with consequent replication by mitosis have arisen as a consequence of the inability of HTLV to produce high viremia? It is an interesting thought.

CONCLUSION

Clonal expansion of HTLV-I-infected cells is the norm whether the carrier be asymptomatic or not. As T-cell activation facilitates transport across the blood-brain barrier, passage to the central nervous system is obvious. The outgrowth of a malignant cell leading to ATLL on a background of clonal expansion indicates that subsequent mutations are necessary. The impact of cytostatic drugs on the treatment of HTLV-I-related diseases is in principle fecund. One would predict that drugs specifically targeted to the virus should have little to no effect. The particular penchant of HTLV-I for replication via mitosis with only a little reverse transcription has a direct repercussion on the genetic stability of HTLV-I. The biology of the virus controls its variation. Given the obvious similarities between HTLV-I and its cousins, simian T-cell lymphotropic virus, HTLV-II, and BLV, it is to be expected that replication by mitosis will be identified for all of these viruses.

Acknowledgment: We thank Drs. Franz Agis, Olivier Gout, and Yves Plumelle for samples and Michaël Vanrumbeke, Bernard Hecquet, and Michel Tavet for assistance. M.C. was supported by a bursary from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. This work was supported by grants from the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Direction de la Recherche et des Etudes Doctorales, the Fondation pour la Recherche Médicale, Institut Pasteur, and the ANRS.

REFERENCES

1. Domingo E, Holland JJ. Complications of RNA heterogeneity for the engineering of virus vaccines and antiviral agents. In: Setlow JK, ed. *Genetic engineering, principles and methods*. New York: Plenum, 1992:13-31.
2. Holland JJ, de la Torre JC, Steinhauer DA. RNA virus pop-

- ulations as quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992; 176:1-20.
3. Eigen M. Viral quasispecies. *Sci Am* 1993;269:42-9.
 4. Drake JW. Rates of spontaneous mutations among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:4171-5.
 5. Seiki M, Hattori S, Hirayama Y, Yoshida M. Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:3618-22.
 6. Gessain A, Gallo RC, Franchini G. Low degree of human T-cell leukemia/lymphoma virus type I genetic drift in vivo as a means of monitoring viral transmission and movement of ancient human populations. *J Virol* 1992;66:2288-95.
 7. Myers G, Lorber B, Wain-Hobson S, Smith RF, Pavlakis GN. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, 1993.
 8. Pedroza Martins L, Chenciner N, Wain-Hobson S. Complex intrapatient sequence variation in the V1 and V2 hypervariable regions of the HIV-1 gp 120 envelope sequence. *Virology* 1992;191:837-45.
 9. Kira J, Koyanagi Y, Yamada T, et al. Increased HTLV-I proviral DNA in HTLV-I associated myelopathy: a quantitative polymerase chain reaction study. *Ann Neurol* 1991; 29:194-201.
 10. Richardson JH, Edwards AJ, Cruickshank JK, Rudge P, Dalglish AG. In vivo cellular tropism of human T cell leukemia virus type I. *J Virol* 1990;64:5682-7.
 11. Shinzato O, Ikeda S, Momita S, Nagata Y, Kamihira S, Nakayama E, Shiku H. Semiquantitative analysis of integrated genomes of human T-lymphotropic virus type I in asymptomatic virus carriers. *Blood* 1991;78:2082-8.
 12. Wattel E, Mariotti M, Agis F, et al. Human T lymphotropic virus (HTLV) type I and II DNA amplification in HTLV-I/II-seropositive blood donors of the French West Indies. *J Infect Dis* 1992;165:369-72.
 13. Mansky LL, Temin HM. Lower mutation rate of bovine leukemia virus relative to that of spleen necrosis virus. *J Virol* 1994;68:494-9.
 14. Mansky LM, Temin HM. Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type I than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol* 1995;69:5087-94.
 15. Coffin J. Genetic diversity and evolution of retroviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992;176:143-64.
 16. Pique C, Tursz T, Dokhelar MC. Mutations introduced along the HTLV-I envelope gene result in a non-functional protein: a basis for envelope conservation? *EMBO J* 1990;9: 4243-8.
 17. Maynard Smith J. Natural selection and the concept of a protein space. *Nature* 1970;225:563-4.
 18. Wattel E, Vartanian JP, Pannetier C, Wain-Hobson S. Clonal expansion of human T-cell leukemia virus type I-infected cells in asymptomatic and symptomatic carriers without malignancy. *J Virol* 1995;69:2863-8.
 19. Cavois M, Wain-Hobson S, Wattel E. Stochastic events in the amplification of HTLV-I integration sites by linker mediated PCR. *Res Virol* 1995;146:179-84.
 20. Takemoto S, Matsuoka M, Yamagushi K, Takatsuki K. A novel diagnostic method of adult T cell leukemia: monoclonal integration of human T-cell leukemia virus type I provirus DNA detection by inverse polymerase chain reaction. *Blood* 1994;84:3080-5.
 21. Yoshida M. HTLV-I Tax: regulation of gene expression and disease. *Trends Microbiol* 1993;1:131-135.
 22. Parker CE, Daenke S, Nightingale S, Bangham CRM. Activated HTLV-I specific cytolytic T lymphocytes are found in healthy seropositives as well as in patients with tropical spastic paraparesis. *Virology* 1992;188:628-36.
 23. Jacobson S, Shida H, McFarlin DE, Fauci AS, Koenig S. Circulating CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes specific for HTLV-I pX in patients with HTLV-I associated neurological disease. *Nature* 1990;349:245-8.
 24. Kinoshita T, Shimoyama M, Tobinai K, et al. Detection of mRNA for the tax1/rex1 gene of human T-cell leukemia virus type I in fresh peripheral blood mononuclear cells of adult T-cell leukemia patients and viral carriers by using the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:5620-4.
 25. Saito M, Furukawa Y, Kubota R, et al. Frequent mutation in pX region of HTLV-I is observed in HAM/TSP patients but is not specifically associated with the central nervous system lesions. *J Neurovirol* 1995;1:286-94.
 26. Niewiesk S, Daenke S, Parker CE, et al. Naturally occurring variants of human T-cell leukemia virus type I tax protein impair its recognition by cytotoxic T lymphocytes and the transactivation function of tax. *J Virol* 1995;69:2649-53.
 27. Yamaoka S, Tobe T, Hatanaka M. Tax protein of human T-cell leukemia virus type I is required for maintenance of the transformed phenotype. *Oncogene* 1992;7:433-7.
 28. Suzuki T, Kitao S, Matsushime H, Yoshida M. HTLV-I Tax protein interacts with cyclin-dependent kinase inhibitor p16^{INK4A} and counteracts its inhibitory activity towards CDK4. *EMBO* 1996;15:1607-14.

