

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science – Technologie – Santé

FACULTE de Médecine

UMR CNRS 6101 :

« Physiologie de la réponse immune et des lymphoproliférations »

Groupe « Mécanismes moléculaires de la lymphomagenèse »

Laboratoire d'Hématologie

Thèse N°

Thèse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

présentée et soutenue par

CHRISTOPHE LE CLORENNEC

Le 27 NOVEMBRE 2006

Etude des Cibles Transcriptionnelles du Virus d'Epstein-Barr (EBV)

et

Régulation de l'apoptose via le récepteur pro-apoptotique FAS (CD95)

dans les lymphocytes B infectés par l'EBV : Rôle de LMP1

Thèse dirigée par le Pr. Jean FEUILLARD

JURY :

Rapporteurs

M. le Dr. Olivier Micheau – Chargé de Recherche - INSERM, Dijon

M. le Pr. Alain Sergeant – Directeur de Recherche (CNRS) – INSERM, Lyon

Examineurs

M. le Dr. Jean Coll – Chargé de Recherche – CNRS, Lille

Mme la Dr. Fabienne Megetto-Pradelle – Chargée de Recherche – INSERM, Toulouse

Président

M. le Pr. Michel Cogné – UMR CNRS 6101 - Université de Limoges

Directeur de Thèse

M. le Pr. Jean Feuillard – UMR CNRS 6101 - Université de Limoges

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement mon directeur de thèse le Professeur Jean Feuillard pour m'avoir accueilli dans sa toute jeune petite équipe qui s'est construite durant ces 4 dernières années. Je le remercie pour son enthousiasme et son dynamisme et qui m'a permis de tirer le meilleur de moi-même afin d'accomplir ce travail de thèse durant ces 4 années de dure labeur. Merci de m'avoir fait confiance et encouragé durant les déboires que j'ai pu rencontrer durant ces années. La qualité de son encadrement tant sur le plan scientifique qu'humain, sa rigueur et son engouement pour la recherche m'ont conduit à me battre pour acquérir l'autonomie et la maturité d'un vrai chercheur. Son expérience et ses conseils avisés me serviront sans aucun doute pour la suite. Avec toute mon amitié.

De plus, je remercie le Professeur Michel Cogné pour avoir présidé mon jury de thèse et pour m'avoir accueilli dans son dynamique et énergique laboratoire.

Je remercie le Professeur Alain Sergeant et le Docteur Olivier Micheau de m'avoir fait l'honneur d'apporter leur jugement expert sur ce travail. Je tiens également à exprimer mes remerciements les plus chaleureux au Docteur Jean Coll, qui je le souhaite très sincèrement se remettra de ses problèmes de santé, pour avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examinateur. Courage Jean, on est avec toi. Je remercie également très chaleureusement Madame le docteur Fabienne Meggetto-Pradelle pour le travail que nous avons fait ensemble et pour avoir examiné ce travail malgré une indisponibilité conséquente. Courage Fabienne, on va y arriver à le publier cet article.

Je tiens tout particulièrement à remercier les membres de l'équipe du laboratoire UMR CNRS 6101, et plus particulièrement les membres de l'équipe du second qui m'ont aidé, soutenu, ou qui ont participé à ce travail, et qui ont contribué à la bonne ambiance du laboratoire. Merci tout particulièrement à Ibtissam qui m'a aidé et encouragé durant cette thèse et pour la complicité que nous avons partagée. Merci aussi à Abdel pour ses conseils et son soutien. Félicitations pour l'arrivée du petit Noor et plein de bonheur pour votre petite famille. Merci à Maha pour sa gentillesse, tu vas nous manquer à Limoges, mais j'espère que tu seras heureuse avec ta famille en Palestine. Je remercie Nathalie, Stéphanie, Aurélie, Chantal, Nadine pour votre gentillesse et votre bonne humeur et à Tan qui reprend le flambeau (Bon courage !).

Je remercie également tous les membres de équipe du troisième, passés et présents, pour les réunions constructives et les pots à répétition (Eric, Sophie, Cathy, Véronique, Armelle, Michel, Anne-Gaëlle, Gaël, Virginie, Karine, Laurent, Krap, Christelle, Rada, Zelhia, Amine, Ahmed, Abir, Yves, Claire, Hei-Lanne et Stéphane, Chehrasad) et plus particulièrement Christian pour sa bonne humeur et sa disponibilité pour les commandes innombrables de réactifs et les anciens post-docs Jacques et Fabrice pour leur poses « clopes ».

Je remercie également le laboratoire d'hématologie du CHRU Dupuytren, et surtout Jean-Luc et Annie qui m'ont très largement expliqué les rudiments de la cytométrie et de la culture cellulaire.

Un grand Merci à mes parents qui ont fait tant de sacrifices pour que j'arrive au bout de mes objectifs, Merci beaucoup, je vous embrasse tendrement et je vous aime.

Je remercie la femme qui a su conquérir mon cœur, Carla, qui m'a permis de me reconstruire après une épreuve difficile et qui sans nul doute partagera ma vie avec bonheur. Merci d'être près de moi, tu m'as donné sans nul doute le courage de continuer à me battre, je t'aime. Maintenant, c'est à moi de te soutenir durant la fin de ta thèse.

Merci également à mes futurs beaux-parents pour avoir été présents lors du jour de ma soutenance après un long voyage et de m'avoir accepté dans leur famille. Je remercie ma grand-mère et toute ma famille au sens large, j'ai réussi.

Enfin, je remercie également mes amis (Fredo, Didine, Seb, Cédric, Céline, Yann, Caro, Cristina et tous les autres...) pour vos encouragements et pour ces soirées relaxantes et ces innombrables et inoubliables concerts de métal et je remercie surtout Nona, mon filleul, et son papa, qui m'ont montré, par leurs conseils pertinents, la voie de la raison et de la sagesse. Je remercie aussi Nath et Nico pour l'aide le jour de ma soutenance, ainsi que Fabienne de Dijon. Merci à vous tous.

Résumé

L'EBV est le premier virus transformant identifié chez l'homme. Il est associé aux lymphomes des déficits immunitaires, aux lymphomes hodgkiniens, aux lymphomes nasal de type T cytotoxique/NK, aux carcinomes du nasopharynx et aux lymphomes de Burkitt endémiques notamment. L'immortalisation des lymphocytes B par l'EBV implique la mise en jeu et le détournement de facteurs transcriptionnels cellulaires grâce aux protéines de latence de ce virus. Une protéine de latence virale, LMP1, protéine majeure transformante de l'EBV, joue un rôle essentiel dans cette immortalisation des lymphocytes B par l'EBV. LMP1 détourne les molécules de signalisation TRAFs/TRADD des TNF-R impliquées dans la signalisation des TNF-R (CD30, CD40 et Fas/CD95), ayant pour effet l'activation des voies de signalisation NF- κ B, p38/MAPK et JNK1/AP1, et pour résultat de protéger en principe les cellules de l'apoptose et d'augmenter la prolifération cellulaire. Ainsi, la protéine LMP1 active constitutivement la voie NF- κ B via ces deux domaines cytoplasmiques CTAR1 et CTAR2 provoquant l'activation constitutive de la voie de signalisation STAT1.

Nous nous sommes intéressés en l'étude de certaines cibles transcriptionnelles activées par l'EBV. Ainsi, les travaux réalisés durant ma thèse ont porté, d'une part en l'étude des relations entre les cibles transcriptionnelles NF- κ B, STAT1, p53 de l'EBV et l'apoptose, la prolifération des lymphocytes B, et d'autre part sur l'étude de la régulation du récepteur pro-apoptotique FAS (CD95) dans les lymphocytes B infectés par l'EBV. De plus, suite à cette dernière étude, nous avons débuté une étude sur l'effet apoptotique induit par la surexpression de LMP1 dans les LCLs infectées par l'EBV.

Nous avons clairement montré dans notre modèle de lymphocyte B immortalisés par l'EBV en latence III, que le facteur de transcription NF- κ B possède un rôle central dans la signalisation de LMP1, induisant une surexpression de facteurs pro-apoptotiques comme le récepteur de mort Fas/CD95. L'activation constitutive de STAT1 et de p53 est secondaire à l'activation de NF- κ B par LMP1. En effet, l'activation constitutive de STAT1 par LMP1, dans ces lymphocytes B EBV+, est due à une boucle autocrine des IFNs, ces derniers étant induits en expression par NF- κ B. De plus, nous avons montré que les isoformes de STAT1, STAT1 α et STAT1 β , participent aux deux processus physiologiques majeurs, la prolifération et l'apoptose. En effet, nous avons montré que l'isoforme majoritaire STAT1 α est pro-apoptotique et que son inhibition par sa forme dominante négative, STAT1 β , protège les lymphocytes B infectés par l'EBV contre l'apoptose induite par des agents génotoxiques comme la Fludarabine.

En activant ces trois facteurs de transcriptions NF- κ B, STAT1 et p53, régulant l'expression de FAS à la surface cellulaire des lymphocytes B infectés par l'EBV, LMP1 permet de sensibiliser ces lymphocytes B à l'apoptose médié par les lymphocytes T cytotoxiques du système immunitaire. Du point de vue de l'équilibre virus/hôte, ce processus permettrait l'élimination des lymphocytes B infectés par l'EBV restés en latence III, par le système immunitaire. De plus, la surexpression de LMP1 provoque une apoptose spontanée dans les lymphocytes infectés par l'EBV, et nos premiers résultats montrent que cette apoptose induite par LMP1 médiée par le récepteur FAS qui, étant surexprimé, s'agrège et s'auto-active indépendamment de FasL, provoquant ainsi une apoptose caspase dépendante. Nous suggérons que le médiateur induit par LMP1 permettant l'auto-activation de Fas dans les lymphocytes B infectés par l'EBV est le niveau élevé de ROS.

Mots-clé : apoptose, EBV, virus, lymphome, lymphocyte B, LMP1, NF- κ B, STAT1, p53, FAS, système immunitaire

Abstract

Study of transcriptional targets of Epstein-Barr virus (EBV) and Apoptosis regulation by the pro-apoptotic receptor FAS (CD95) in EBV infected B cells : Role of LMP1

EBV is the first transforming virus identified in human. It is associated to the immunodeficiency-associated lymphoma, Hodgkin lymphoma, type I cytotoxic T/NK lymphoma, nasopharyngeal carcinoma and in particular the endemic Burkitt lymphoma. B cell immortalization by EBV implies the setting and the diversion of cellular transcriptional factors by latent proteins of this virus. A viral latency protein, LMP1, as major transforming protein of EBV, plays an essential role in this B cell immortalization by EBV. LMP1 diverts signalling molecules TRAFs/TRADD of TNF-R implied in the TNF-R signalling (CD30, CD40 and Fas/CD95), resulting in the activation of NF- κ B, JNK1/AP1 and p38/MAPK signalling pathways and result protecting cells from apoptosis and increasing cellular proliferation. Thus, LMP1 activates constitutively NF- κ B pathway via these two cytoplasmic domains CTAR1 and CTAR2 causing constitutive activation of STAT1 pathway.

We were interested in the study of some transcriptional targets activated by EBV. Thus, the work completed during my thesis concerned, on the one hand in the study of the relation between transcriptional targets NF- κ B, STAT1, p53 of EBV and apoptosis, B cell proliferation, and on the other hand the study of the regulation of the pro-apoptotic receptor FAS (CD95) in EBV infected B cells. Moreover, following this last study, we began a study on the apoptotic effect induced by overexpression of LMP1 in LCLs infected by EBV.

We clearly showed in our model of EBV latency III immortalized B cell, that the transcriptional factor NF- κ B has a central role in LMP1 signalling, inducing an overexpression of pro-apoptotic factors like cell death receptor Fas/CD95. Constitutive activation of STAT1 and p53 is secondary than activation of NF- κ B by LMP1. Indeed, constitutive activation of STAT1 by LMP1, in these EBV+ B cells, is due to an autocrine loop of IFNs induced in expression by NF- κ B.

Moreover, we showed that the isoform of STAT1, STAT1 β and STAT1 α take part in the two major physiological processes, proliferation and apoptosis. Indeed, we showed that the major isoform STAT1 α is pro-apoptotic and that its inhibition by its dominant negative form, STAT1 β , protects EBV infected B-cell against apoptosis induced by genotoxic agents like Fludarabine.

By activating these three transcriptional factors NF- κ B, STAT1 and p53, controlling FAS expression on the cell surface of EBV infected B cell, LMP1 sensitize these B cells to apoptosis mediated by cytotoxic T cells of the immune system. From the point of view of balance virus/host, this process would allow the elimination of EBV latency infected B cells, by the immune system. Moreover, overexpression of LMP1 causes a spontaneous apoptosis in EBV infected B cells, and our first results show that apoptosis induced by LMP1 mediated by the receptor FAS, which is overexpressed, is aggregated and auto-activated independently of FasL, thus causing a dependent caspase apoptosis. We suggest that the mediator induced by LMP1 allowing auto-activation of Fas in EBV infected B cells is the high level of ROS.

Keywords : apoptosis, EBV, virus, lymphoma, B cells, LMP1, NF- κ B, STAT1, p53, FAS, immune system

SOMMAIRE

Sommaire

Introduction générale	1
Introduction bibliographique	3
Partie 1 : L'Apoptose	3
I. Apoptose et nécrose	3
<i>I.2. Apoptose</i>	4
II. Mécanismes de l'apoptose	4
<i>II.1- Caractéristiques morphologiques</i>	4
<i>II.2- Caractéristiques biochimiques</i>	5
III. Effecteurs de l'apoptose	7
<i>III.1- Aspects moléculaires de l'apoptose</i>	7
<i>III.2- Rôles des caspases</i>	9
III.2.1- Principales caractéristiques et classification des caspases	9
III.2.2- Cibles et substrats des caspases	13
III.2.3- Mécanismes d'activation des caspases	15
III.2.4- La régulation des caspases	17
III.2.5- Les deux voies apoptotiques mènent aux caspases	19
<i>III.3- Voie mitochondriale et les protéines de la famille Bcl2</i>	19
III.3.1- Voie mitochondriale.....	19
III.3.2- Protéines de la famille Bcl-2.....	20
III.3.2.1- La sous-famille Bcl-2.....	21
III.3.2.2- La sous-famille Bax/Bak-like protein.....	22
III.3.2.3- La sous-famille BH3.....	23
III.3.2.4- Régulation de la famille Bcl-2.....	23
<i>III.4- L'apoptose par les récepteurs à domaine de mort cellulaire</i>	24
<i>III.5- Inhibiteurs de l'apoptose</i>	26
III.5.1- Les protéines c-FLIP.....	26
III.5.2 Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP).....	28
Partie 2 : Le récepteur FAS/CD95	30
I. Structure de la protéine Fas	30
<i>I.1- Partie extracellulaire</i>	31
<i>I.2- Partie intracellulaire</i>	31
II. Voies de l'apoptose induite par Fas	33
<i>II.1- Voies apoptotiques et Transduction du signal</i>	33
II.1.1- Formation du complexe de signalisation de mort induite (DISC).....	33
II.1.2- Rôle de la voie mitochondriale: cellules de type I et de type II.....	37
II.1.3- Agrégation de Fas dans les lipids rafts et Internalisation de Fas.....	40
II.1.4- FasL n'est pas indispensable dans l'apoptose médiée par Fas.....	44
<i>II.2- Voie proliférative</i>	46

II.3- Voies de signalisation régulant la transduction du signal médiée par FAS	47
II.3.1- Fas et NF-kB.....	48
II.3.2- Rôle des ROS (Radicaux oxygénés) dans l'apoptose Fas dépendante.....	49
II.4- Modulation de l'apoptose Fas dépendante par les protéines interagissant avec Fas	50
II.4.1- FADD.....	50
II.4.2- FAP-1.....	51
II.4.3- Daxx.....	52
Partie 3 : Le virus d'Epstein-Barr	54
I. La famille des Herpesviridae	54
II. Historique	55
III. Quelques données d'épidémiologie	56
IV. Structure du virion et du génome du virus d'Epstein-Barr	57
IV.1- Structure du virion	57
IV.2- Structure du génome du virus d'Epstein-Barr	58
IV.2.1- Description du génome viral.....	58
IV.2.2- La carte de restriction du génome viral.....	60
IV.2.3- Différents polymorphismes de l'EBV.....	60
V. La latence virale	61
V.1- La famille des EBNAs	63
V.1.1- Les protéines EBNA-LP et EBNA2.....	63
V.1.1.1- La protéine EBNA-LP.....	63
V.1.1.2- La protéine EBNA2.....	64
V.1.2- Les protéines de la famille des EBNA3.....	67
V.1.3- La protéine EBNA1.....	68
V.2- La famille des protéines LMPs	71
V.2.1- La protéine LMP1.....	72
V.2.2- Les protéines LMP2s.....	72
V.2.2.1- Structure de LMP2A.....	73
V.2.2.2- Fonction de LMP2A.....	74
V.2.3- Les ARNs viraux EBERs et BARTs.....	76
VI. Les différentes latences virales	77
VII. Le cycle lytique	78
Partie 4 : La physiopathologie de l'infection	81
I. Etapes cellulaires de l'infection par le virus d'Epstein-Barr	81
I.1- Infection, in vitro, des cellules lymphoïdes	81
I.2- Infection, in vivo, des cellules par le virus d'Epstein-Barr	83
I.2.1- Le cycle de l'EBV, in vivo.....	83
I.2.2- La persistance virale.....	86
I.3- Infection des cellules épithéliales par le virus d'Epstein-Barr	88
I.4- Autres types cellulaires "infectables" par le virus d'Epstein-Barr	90
II. Contrôle de l'infection virale	91

III. Pathologies associées au virus d'Epstein-Barr.....	92
Partie 5 : La protéine LMP1.....	95
I. La protéine LMP1 est codée par le gène BNLF1.....	95
<i>I.1- Transactivation de ED-L1 du gène BNLF1 via la protéine EBNA2.....</i>	97
II. Organisation structurale et fonctionnelle de la protéine LMP1.....	100
<i>II.1- Structure de LMP1.....</i>	100
II.1 .1- Structure et fonctions des domaines N-terminal et transmembranaire	102
II.1 .2- Structure du domaine C-terminal.....	103
<i>II.2- Les adaptateurs du domaine C-terminal de LMP1.....</i>	104
II.2.1- Interaction directe du domaine CTAR1 avec les protéines TRAFs.....	104
II.2.2- Les adaptateurs du domaine CTAR2 de LMP1.....	108
II.2.2.1- Interaction directe de CTAR2 avec TRADD et indirecte avec TRAFs.....	108
II.2.2.2- Interaction directe du domaine CTAR2 avec la protéine RIP.....	110
II.2.2.3- Interaction directe de CTAR2 avec la protéine BS69.....	111
II.2.3- CTAR3 : un domaine de transduction ?.....	114
III. Les voies de signalisation induites la protéine LMP1.....	116
<i>III.1- La voie de signalisation NF-κB.....</i>	116
<i>III.2- Les voies de signalisation JNK/AP1 et P38MAPKK.....</i>	121
III.2.1- La voie de signalisation JNK/AP1.....	122
III.2.2- La voie de signalisation p38MAPK.....	123
<i>III.3- La voie de signalisation STATs.....</i>	124
<i>III.4- Activation de la voie de signalisation PI3K/Akt.....</i>	127
<i>III.5- Activation de la voie de signalisation cdc42</i>	129
<i>III.6- LMP1 et ubiquitinylation ?.....</i>	130
III.6.1- Dégradation par ubiquitination de LMP1 : implication du domaine N-terminal.....	130
III.6.2- TRAFs et ubiquitinylation.....	130
III.6.3- LMP1 et la voie de l'ubiquitine de la protéine A20.....	132
IV. Les propriétés pléiotropes de LMP1.....	134
<i>IV.1- LMP1 induit des altérations phénotypiques.....</i>	134
<i>IV.2- LMP1 régule l'expression de cytokines.....</i>	134
<i>IV.3- Effet cytotatique de LMP1 et action de LMP1 sur la prolifération et la différenciation cellulaire.....</i>	135
<i>IV.4- LMP1 et apoptose.....</i>	136
<i>IV.5- LMP1 augmente les propriétés invasives des cellules.....</i>	137
Objectifs.....	138
Résultats	140
Résultats- Article 1.....	142
1- Dans des lymphocytes B infectés par l'EBV en état de latence de type III, le traitement à la fludarabine induit l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que l'apoptose avec la mise en évidence du rôle de STAT1α et de STAT1β.....	142

Présentation de l'article 1	142
Commentaires	144
Résultats- Article 2	145
2- Dans des lymphocytes B infectés par l'EBV, en état de latence de type III de l'EBV, la régulation de la signalisation STAT1 se fait par effet autocrine NF-kappa B dépendante	145
Présentation de l'article 2	145
Commentaires	148
Résultats- Article 3	150
3- Le programme de latence III de l'EBV sensibilise les lymphocytes B infectés par l'EBV à l'apoptose médiée par CD95 via la protéine LMP1 : rôle de NF-kappa B, STAT1 et p53	150
Présentation de l'article 3	150
Commentaires	152
Résultats Préliminaires	154
4- La surexpression de LMP1 conduit à l'apoptose médiée par l'autoactivation de Fas indépendamment de FasL via l'induction des ROS dans les lymphocytes B infectés par l'EBV	154
1) La surexpression de LMP1 induit l'apoptose dans les LCLs PRI.....	154
2) LMP1 provoque une surexpression du récepteur pro-apoptotique FAS, ainsi qu'une agrégation de celui-ci.....	158
3) La surexpression de LMP1 induit la phosphorylation de FADD.....	159
4) Implication du récepteur de mort cellulaire FAS dans l'apoptose induite par LMP1 avec la formation du DISC sur FAS.....	160
Discussion Générale	162
I. LMP1 et STAT1	162
II. p53, STAT1 et NF-kB	165
III. EBV et FAS	166
IV. LMP1 et régulation de l'apoptose	169
IV.1- LMP1 inhibe l'apoptose	169
IV.2- LMP1 induit l'apoptose	171
Conclusion et Perspectives	176
Références bibliographiques	181
Annexes	245

TABLES DES MATIERES

Table des matières

Liste des ABREVIATIONS

A

ADN : Acide désoxyribonucléique
aa : acide aminé
AICD: Activation-Induced Cell Death
Ala: alanine
AP-1 : Activator Protein-1
APAF-1 : Apoptosis Protein Associated Factor
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ASK : Apoptosis Signal-regulating Kinase
ATP : Adénosine triphosphate

B

Bad : Bcl-X_L/bcl-2 associated death promoter homolog
Bak : Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax : Bcl-2 associated X protein
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
Bcl-X_L : longer alternatively splice form of Bcl-2 homolog X protein from avian lymphocyte development
BCR: B cell receptor
BH : Bcl-homology
Bid : BH3 interacting death domain agonist
Bik : Bcl-2 Interacting Killer
Bim : Bcl-2 interacting mediator of cell death
BIR: Baculovirus IAP Repeat
BIV : Bovine Immunodeficiency Virus
Bmf : a BH3 only protein
BRAM: BMP receptor associated molecule
BrD: bromodomaine

C

CAD: Caspase Activated Dnase (ou DFF40)
CARD : Caspase Recruitment Domain
Caspase : cystéine aspartate protéase ou cysteinyl aspartate-specific proteinase
CD: Cluster of Differentiation
CDK : Cyclin Dependent Kinase
CED: *Caenorhabditis elegans* death genes
CMH: complexe majeur d'histocompatibilité
CNP: carcinome indifférencié du nasopharynx

CRD: cystein-rich domain
CRE: cAMP Responsive Element
CREB: cAMP response element binding protein
CRM1 : Chromosomal Region Maintenance 1
Crm A : Cytokine Response Modifier A
CTAR: C terminal activating regions
CTL: lymphocytes T CD8 CD4

D

Da: dalton
DcR: decoy receptor
DD: death domain
DED: Death Effector Domain
DEF: death effector filaments
DFF 40: DNA Fragmentation Factor 40 (ou CAD)
DIABLO: Direct Binding Protein with Low pI
DISC: Death-Inducing Signalling Complex
DNA-PK: DNA Dependent Protein Kinase
DR: Death Receptor
DR3 L: Death Receptor 3 Ligand

E

EBNA: Epstein Barr virus-encoded Nuclear Antigen
EBNA-LB: EBNA- leading protein
EBER: EBV encoded RNA
EBV : Epstein Barr Virus
EGF: epithelial growth factor
Egl: egg- laying defective
ERK: Extracellular signal Regulated protein Kinase

F

FADD: Fas Associated Death Domain protein
FAF: Fas associated factor
FAIM: Fas apoptosis inhibitory molecule
FAP: Fas Associated Phosphatase
Fas: Fibroblast associated (récepteur)
Fas L: Fas Ligand (ou CD95L)
FGF: Fibroblast Growth Factor
FIST: Fas interacting serine/threonine protein kinase
FLASH: fllice associated huge protein
FLICE: FADD-like-IL-1b-converting enzyme
FLIPs: FLICE-inhibitory proteins

G

GCV: ganciclovir
gly: glycine

gp : glycoprotéine

H

HCP: Hematopoietic Cell Phosphatase
HEK293: Human Embryonic Kidney 293
HIPK: homeodomain interacting protein kinase
HIV: Human Immunodeficiency Virus
HOS: homologue of Slimb
HTLV: Human T-lymphotropic virus

I

IAP: inhibitor of apoptosis protein
iCAD: Inhibitor of CAD (ou DFF45)
ICAM: intercellular adhesion molecule
ICE: interleukin-1 b converting enzyme
Ig: immunoglobuline
IR: Internal repeat
IFNa: interféron alpha
IL: Interleukine
ITAM: immunoreceptor tyrosine based activator motif

J

JAK: janus kinase
JNK: Jun Kinase

K

Kda : Kilo dalton
Kpb : Kilo paire de base
KO: knock out

L

LCL: lignée cellulaire lymphoblastoïde
LFG: Lifeguard
LMP1 : Latent Membrane Protein-1
LPS : lipopolysaccharides
lyLMP1 : lytic LMP1
lys : lysine

M

MAPK : Mitogen Activated protein Kinase
Mcl-1 : ML-1 human myeloid leukemia cell line
MDCK : madin- Darby canine kidney
MGA :Myc-related cellular transcription factor
MHC : Major Histocompatibility Complex

MKK : mitogen activated protein protein kinase kinase
MKP: MAPK phosphatase
MMP: matrix metalloproteinase
MNI: mononucléose infectieuse

N

NEMO : NF- κ B Essential Modulator
NF- κ B : nuclear factor B
NGFR: Nerve Growth Factor Receptor
NK: natural killer
NIK: NF- κ B Inducing Kinase
NLS : Nuclear Localization Signal
NO: nitric oxide
Noxa : a BH3-only member of the Bcl-2 family

O

ORF : « Open Reading Frame »

P

PARP : poly(ADP-ribose) polymerase
Pb: paire de base
PDK : Phosphoinositide Dependent Kinase
PHD : Plant Homodomain
PKC, PKA: Protéine Kinase C ou A
PIT : point d'initiation de la transcription
PI3K: Phosphatidylinositide 3 kinase
PTK: protein tyrosine kinase
PM : poids moléculaire
PMA : phorbol 12 myristate 13 acétate
pRb: protéine du rétinoblastome
PUMA : p53 upregulated modulator of apoptosis

R

RHD : Rel Homology Domain
RIP : receptor interacting protein
ROS : Reactive Oxygen Species

S

SAP: SLAM lymphocytic activation molecule associated protein
SAPK: Stress Activated Protein Kinase
SEK: SAPK/ERK kinase
SH2-B: Src Homology 2 Binding
sIMPs : Soluble Intermembrane mitochondrial protéines
Smac : Second Mitochondrial Activator of Caspases
SMN: survival of motor neurons

SREBP : Sterol Response Element Binding Protein
STAT : Signal Transducers Activators of Transcription

T

TAB : TAK binding protein
TAK : transforming growth factor beta activated kinase
TCR: T cell receptor
TD: transcription domain
TGF : Transcription Growth Factor
TK: thymidine kinase
TLR: Toll like receptors
TNF : Tumor Necrosis Factor
TNF-R: Tumor Necrosis Factor Receptor
TR: terminal repeat
TRADD : TNFR-Associated Death Domain
TRAF : TNF-Receptor-Associated Factor
TRAIL : TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TR-L1: TR located LMP1 promotor

U

U: unique region
U_L: long unique region
U_S: short unique region
UV : Ultra-Violet

V

VEGF : vascular endothelial growth factor
Vpg : vésicule post- golgi

X

XIAP : X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein

Liste des FIGURES

<u>Figure 1</u> : Apoptose et nécrose	3
<u>Figure 2</u> : Fragmentation internucléosomale de l'ADN lors de l'apoptose.	6
<u>Figure 3</u> : Photo de C. elegans.	7
<u>Figure 4</u> : Gènes impliqués dans l'apoptose chez C. Elegans et chez les mammifères	8
<u>Figure 5</u> : La famille des caspases.	11
<u>Figure 6</u> : Activation en cascade des caspases	12
<u>Figure 7</u> : Structure tridimensionnelle de l'hétérotétramère de la caspase 3.	13
<u>Figure 8</u> : Activation de la caspase-9 par la formation de l'apoptosome.	16
<u>Figure 9</u> : La famille Bcl-2.	21
<u>Figure 10</u> : Membres de la famille des Récepteurs à domaine de Mort	24
<u>Figure 11</u> : Voies de signalisation apoptotiques des récepteurs à domaines de mort et de leurs ligands	25
<u>Figure 12</u> : Structure des différentes isoformes de c-FLIP.	26
<u>Figure 13</u> : Les isoformes de c-FLIP modulent l'activation de la caspase-8.	27
<u>Figure 14</u> : Structure des protéines inhibitrices IAPs.	28
<u>Figure 15</u> : Domaines protéiques du récepteur Fas.	32
<u>Figure 16</u> : Structure des domaines de mort (DD).	33
<u>Figure 17</u> : Schéma du clivage de la procaspase-8 sur le DISC de FAS.	35
<u>Figure 18</u> : Les événements membranaires proximaux de la signalisation FAS.	36
<u>Figure 19</u> : Le modèle des deux voies de la signalisation FAS.	37
<u>Figure 20</u> : Modèle schématique de la cascade d'activation pro-apoptotique.	38
<u>Figure 21</u> : La signalisation des caspases et sa modulation.	39
<u>Figure 22</u> : Modèle d'agrégation du récepteur Fas/CD95	42
<u>Figure 23</u> : Modèle pour la signalisation précoce de FAS.	43

<u>Figure 24</u> : La double fonction de p22-FLIP dans la cellule.	49
<u>Figure 25</u> : Particules virales trouvées dans des lignées de lymphome de Burkitt.	55
<u>Figure 26</u> : Structure du virus d'Epstein-Barr.	58
<u>Figure 27</u> : Organisation du génome viral de l'EBV (A) sous forme linéaire ou (B) épisomale.	59
<u>Figure 28</u> : Les cadres ouverts de lecture (ORFs, ou Open Reading Frame) pour les protéines de latence de l'EBV.	60
<u>Figure 29</u> : Représentation schématique des transcrits des gènes de l'EBV exprimés durant la latence.	61
<u>Figure 30</u> : Représentation schématique des voies de signalisation empruntées par les protéines virales impliquées dans l'immortalisation/transformation cellulaire.	62
<u>Figure 31</u> : Structure de la protéine EBNA2 du variant B95.8 de l'EBV.	64
<u>Figure 32</u> : Structure des protéines Notch.	65
<u>Figure 33</u> : Clivage de la protéine Notch.	66
<u>Figure 34</u> : Fonction de EBNA2	66
<u>Figure 35</u> : Production de peptides dérivant de la protéine EBNA1.	70
<u>Figure 36</u> : Représentation schématique de la localisation des gènes codant les protéines LMP2A, LMP2B et LMP1	72
<u>Figure 37</u> : Structure et fonction de LMP2A.	75
<u>Figure 38</u> : Structures secondaires potentielles des ARNs EBER (EBER1 et EBER2).	76
<u>Figure 39</u> : Profil d'expression des gènes viraux de l'EBV en fonction des différents types de latence.	78
<u>Figure 40</u> : Assemblage et sortie du virion de l'EBV.	80
<u>Figure 41</u> : Représentation schématique de l'infection, <i>in vitro</i> , par l'EBV.	82
<u>Figure 42</u> : Modèle de l'infection <i>in vivo</i> par l'EBV.	85
<u>Figure 43</u> : Modèle d'infection par le virus d'Epstein-Barr.	87
<u>Figure 44</u> : L'infection par l'EBV mime les étapes de la maturation physiologique des lymphocytes B <i>in vivo</i>	88

<u>Figure 45</u> : Modèle d'infection des cellules épithéliales par l'EBV.	89
<u>Figure 46</u> : Structure du gène BNLF1 (A) et de la protéine LMP1 (B) de l'EBV.	95
<u>Figure 47</u> : Structure du promoteur ED-L1 du gène BNLF1 codant la protéine LMP1	97
<u>Figure 48</u> : Représentation schématique de la transactivation du promoteur ED-L1 du gène BNLF1.	99
<u>Figure 49A</u> : Séquence peptidique de la protéine LMP1.	100
<u>Figure 49B</u> : Structure de LMP1 avec ses protéines associées	101
<u>Figure 50</u> : Organisation structurale générale des protéines de la famille TRAFs.	105
<u>Figure 51</u> : Structure tridimensionnelle du domaine TRAF.	106
<u>Figure 52</u> : Schéma récapitulatif des adaptateurs et des voies de signalisation mises en jeu par le domaine CTAR1 de LMP1.	107
<u>Figure 53</u> : Modèle de recrutement de TRADD par le domaine CTAR2 de LMP1 et par le domaine de mort du TNFR1.	109
<u>Figure 54</u> : Structure de BS69 et BRAM1.	112
<u>Figure 55</u> : Schéma récapitulatif des recrutements des différents adaptateurs sur le domaine CTAR2 de LMP1 et des médiateurs du signal.	113
<u>Figure 56</u> : Structure de LMP1 et motifs putatifs de JAK3	114
<u>Figure 57</u> : Structure des domaines des protéines STATs et sites de fixation à l'ADN.	115
<u>Figure 58</u> : Structure et domaines fonctionnels de la famille Rel/NFkB.	116
<u>Figure 59</u> : Voie canonique et voie non canonique.	117
<u>Figure 60</u> : Organisation de la voie des MAP Kinases JNK et p38.	121
<u>Figure 61</u> : La cascade de MAPK responsable de l'activation des membres de la famille des p38MAPK.	123
<u>Figure 62</u> : Structures des protéines JAK3, STATs, SOCS.	125
<u>Figure 63</u> : Transduction du signal par les récepteurs aux interférons (IFNs).	126
<u>Figure 64</u> : Boucle autocrine de l'activation de STAT1 par LMP1 dépendante de NFkB	127
<u>Figure 65</u> : La famille des PI3K de Classe I.	128

<u>Figure 66</u> : Activation de la voie de la PI3K.	129
<u>Figure 67</u> : Les voies de l'ubiquitine.	131
<u>Figure 68</u> : Représentation schématique de la protéine A20.	132
<u>Figure 69</u> : Mécanisme d'inactivation de la signalisation NFκB induit par le TNFR1.	133
<u>Figure 70</u> : Obtention de la lignée cellulaire lymphoblastoïde (LCL) EREB2-5.	140
<u>Figure 71</u> : Propriétés du vecteur pRT-1.	141
<u>Figure 72</u> : L'induction de LMP1wt provoque l'apoptose dans les cellules LCLs PRI. (Sous-pic G1)	155
<u>Figure 73</u> : L'induction de LMP1wt provoque l'apoptose dans les cellules LCLs PRI. (Annexin V)	156
<u>Figure 74</u> : L'induction de LMP1wt provoque la fragmentation du noyau. (Microscopie confocale)	157
<u>Figure 75</u> : L'induction de LMP1wt provoque le clivage de PARP. (Western blot)	157
<u>Figure 76</u> : L'induction de LMP1wt provoque une surexpression du récepteur pro-apoptotique FAS, ainsi qu'un regroupement en patches de condensation	158
<u>Figure 77</u> : LMP1wt induit la phosphorylation de FADD	159
<u>Figure 78</u> : Immunoprécipitation de FAS	160
<u>Figure 79</u> : Schéma hypothétique de l'induction de l'apoptose par LMP1	175
Liste des tableaux	
<u>Tableau 1</u> : Substrats spécifiques des caspases	13
<u>Tableau 2</u> : Descriptif des huit herpès virus pathogènes connus pour l'homme	54
<u>Tableau 3</u> : Pathologies associées au virus d'EBV et latence virale correspondante	94

INTRODUCTION GENERALE

L'apoptose est un processus physiologique de mort cellulaire au cours duquel des mécanismes complexes sont activés pour aboutir à la destruction de la cellule. Ce « suicide cellulaire » est un événement clé en biologie car il permet l'équilibre entre prolifération et dégénérescence cellulaire dans les organismes pluricellulaires, c'est à dire le maintien de leur homéostasie. De plus, l'apoptose est un mécanisme « silencieux » pour l'organisme et il permet donc la régulation des populations cellulaires tout en respectant l'intégrité de l'organisme.

L'apoptose survient naturellement au cours de l'embryogenèse, du renouvellement tissulaire et lors du vieillissement. Cependant, elle peut également se produire dans diverses conditions pathologiques. De plus, un dysfonctionnement des mécanismes régulateurs de l'apoptose va donner lieu à de graves pathologies. Ainsi, un défaut d'apoptose est souvent associé à un processus de tumorigenèse, tout particulièrement au niveau du système immunitaire (lymphome, leucémie).

Parmi les molécules impliquées dans l'activation du processus apoptotique, le récepteur Fas (Apo 1 ou CD95) est l'un des plus étudiés. Fas est un récepteur appartenant à la superfamille des récepteurs au tumor necrosis factor (TNF) / nerve growth factor (NGF). La fixation de son ligand naturel (FasL), ou d'un anticorps anti-Fas agoniste permet son oligomérisation et entraîne le recrutement et l'activation de la caspase-8 grâce à la protéine adaptatrice FADD (Fas Associated Death Domain). La caspase-8 va à son tour activer la caspase-3, soit directement par clivage, soit en activant la voie apoptotique mitochondriale. La caspase-3, véritable exécutrice de l'apoptose, va permettre l'activation des molécules effectrices de l'apoptose.

Le Virus d'Epstein Bar (EBV), premier virus transformant identifié chez l'homme, associé à différentes pathologies malignes comme les lymphomes des déficits immunitaires, les lymphomes hodgkiniens, les lymphomes nasaux de type T cytotoxique/NK, les carcinomes du nasopharynx et les lymphomes de Burkitt endémiques, immortalise les lymphocytes B qu'il infecte. Cette immortalisation cellulaire implique la mise en jeu et le détournement de facteurs transcriptionnels cellulaires par ce virus grâce à ses protéines de latence, parmi elles la protéine LMP1, protéine majeure transformante de l'EBV. Cette protéine est exprimée de façon récurrente dans de nombreuses pathologies tumorales associées au virus. *In vitro*, son expression est indispensable à l'établissement des lignées lymphoblastoïdes (LCLs).

La protéine LMP1 détourne les molécules de signalisation TRAFs/TRADD des TNF-R impliquées dans la signalisation des TNF-R (CD30, CD40 et Fas/CD95), ayant pour effet l'activation des voies de signalisation NF- κ B, p38/MAPK et JNK1/AP1, et pour résultat de protéger en principe les cellules de l'apoptose et d'augmenter la prolifération cellulaire. Ainsi, la protéine LMP1 active constitutivement la voie NF- κ B via ces deux domaines cytoplasmiques CTAR1 et CTAR2 provoquant l'activation constitutive de la voie de signalisation STAT1.

Le but de mon travail de thèse a donc consisté à étudier certaines cibles transcriptionnelles activées par l'EBV. Ainsi, les travaux réalisés durant ma thèse ont porté, d'une part en l'étude des relations entre les cibles transcriptionnelles NF- κ B et STAT1 du virus et l'apoptose, la prolifération des lymphocytes B, et d'autre part sur l'étude de la régulation du récepteur pro-apoptotiques FAS (CD95) dans les lymphocytes B infectés par l'EBV. De plus, suite à cette dernière étude, nous avons débuté une étude sur l'effet apoptotique induit par la surexpression de LMP1 dans les LCLs infectées par l'EBV.

En conclusion, la protéine LMP1, protéine majeure transformante de l'EBV du programme de latence III de l'EBV, posséderait un caractère ambivalent en pouvant, soit permettre la transformation cellulaire et favoriser la prolifération, soit induire l'apoptose dans certaines conditions physiologiques, en permettant l'activation de certaines voies apoptotiques impliquant le récepteur pro-apoptotique Fas/CD95 s'auto-activant grâce à la toxicité de LMP1.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Partie 1 : L'Apoptose

I. Apoptose et Nécrose

L'apoptose est un phénomène actif génétiquement contrôlé, aboutissant à la mort des cellules sénescents ou endommagées. Le terme d'apoptose vient du grec et fait allusion à la chute des feuilles en automne. Ce phénomène est très conservé à travers les espèces et est retrouvé chez tous les organismes multicellulaires (Cikala et al., 1999; Steller, 1995). Ce terme de « mort cellulaire programmée » (Programmed Cell Death (PCD)) a été utilisé par Weber et al. en 1964 (Weber, 1964), pour décrire la régression musculaire régulée dans le temps accompagnant la métamorphose de la larve du xénope (revue (Lockshin and Zakeri, 2001)). Le processus d'apoptose a été identifié par Kerr et al. en 1972 lors d'une étude sur l'ischémie hépatique. Ces auteurs ont alors décrit deux modes distincts de mort cellulaire en se basant sur des critères morphologiques (Kerr et al., 1972).

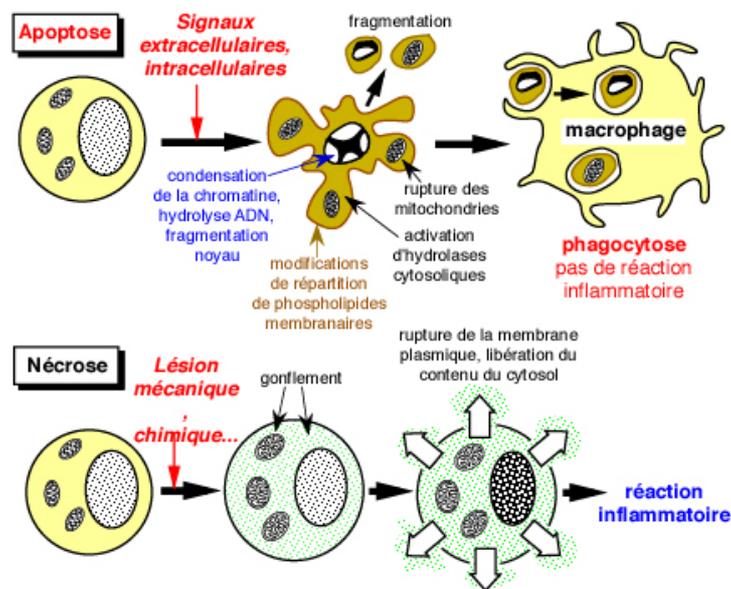


Figure 1 : Apoptose et Nécrose

Le premier type de mort cellulaire, dénommé nécrose, se caractérise par une augmentation rapide du volume cellulaire, la perte précoce de l'intégrité membranaire et mitochondriale, et le relargage du contenu lysosomal dans l'environnement intercellulaire, provoquant une lésion et une réaction inflammatoire au niveau du tissu environnant (Figure 1). Au contraire, l'apoptose est le résultat d'un programme sous-jacent de mort cellulaire et se caractérise par le maintien de l'intégrité membranaire, ainsi qu'une diminution du volume

cellulaire pendant tout ce processus jusque dans les phases les plus tardives. La structure des organelles reste préservée alors que la chromatine se condense et se fragmente. La cellule se fragmente également en corps apoptotiques mais préserve son contenu lysosomal. *In vivo*, ces corps apoptotiques sont alors phagocytés par les macrophages circulants (Figure 1), alors qu'*in vitro*, ils subissent le processus de nécrose secondaire. Enfin, contrairement à la nécrose, l'apoptose ne déclenche pas *in vivo*, de réaction inflammatoire.

I.1- Apoptose

Toutes les cellules ont la capacité de se détruire en activant un programme intrinsèque dont l'exécution conduit à une forme de mort cellulaire, l'apoptose. Par opposition à la nécrose, l'apoptose est considérée comme une mort cellulaire « ordonnée », procédant par différentes phases (Duvall et al., 1985; Kerr et al., 1972) qui permettent l'interruption planifiée des processus biologiques et la destruction des macrostructures de manière à faciliter leur élimination.

De nombreux signaux tant physiologiques que pathologiques, extracellulaires ou intracellulaires (drogues cytotoxiques, déprivation en facteurs de croissance, TNF- α , FasL, p53, ...), sont capables d'induire l'apoptose de nombreux types cellulaires. D'une manière générale, l'apoptose est considérée comme un mécanisme majeur impliqué dans des processus tant physiologiques que pathologiques. Ainsi, ce phénomène de mort cellulaire intervient dans l'élimination des cellules âgées ou endommagées et dans la dégénérescence des cellules surnuméraires, en particulier lors du développement embryonnaire. A ce titre, l'apoptose est impliquée dans les phénomènes de vieillissement cellulaire, dans le fonctionnement et l'homéostasie du système immunitaire, le renouvellement tissulaire et le développement du système nerveux. Une résistance accrue à l'apoptose entraîne l'apparition de pathologies telles que les maladies auto-immunes ou le cancer. A l'inverse, un accroissement des taux d'apoptose participe à l'émergence de maladies telles que les maladies neurodégénératives.

II. Mécanismes de l'apoptose

II.1- Caractéristiques morphologiques

Dans un premier temps, les cellules en apoptose vont s'isoler des autres cellules par une perte des contacts intercellulaires. Les mitochondries de ces cellules apoptotiques vont subir de nombreuses modifications telles que le relargage du cytochrome c dans le

cytoplasme (Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997), une diminution du potentiel membranaire ($\Delta\Psi_m$) et une modification de la perméabilité mitochondriale (Marchetti et al., 1996; Vander Heiden et al., 1997; Zamzami et al., 1996). La reconnaissance des corps apoptotiques par les phagocytes (macrophages ou monocytes) est facilitée par la translocation des phosphatidylsérines au niveau du feuillet externe de la membrane plasmique.

L'un des aspects morphologiques caractéristiques de l'apoptose est l'importante condensation du noyau ainsi que de sa chromatine. En effet dans ce processus d'apoptose, le noyau va se réduire en taille, et à la périphérie de la membrane nucléaire, une condensation de la chromatine en de petites masses bien distinctes va débiter. Par la suite, l'enveloppe nucléaire se désintègre et la chromatine se fragmente en de petits morceaux d'ADN. Après cette phase de condensation, la cellule présente à sa surface des vésicules renfermant des amas de chromatine et des fragments cytoplasmiques entourés de membrane plasmique. Ce sont les corps apoptotiques.

La membrane cytoplasmique bien que conservant son intégrité, commence à bourgeonner. Finalement, toute la cellule se fragmente en corps apoptotiques. Ceux-ci sont rapidement phagocytés par les cellules voisines évitant ainsi, toute possibilité d'inflammation locale, contrairement à ce qui s'observe dans la mort cellulaire par nécrose. Ce processus permet d'éviter toute libération du contenu cellulaire et de prévenir ainsi d'éventuelles lésions des cellules voisines.

II.2- Caractéristiques biochimiques

Les changements morphologiques survenant lors de l'apoptose sont accompagnés d'altérations biochimiques spécifiques. Parmi celles-ci, la plus remarquable est la fragmentation de l'ADN, survenant lors de la condensation de la chromatine. La chromatine est clivée en de nombreux fragments d'ADN réguliers de taille multiple de 180 paires de bases (Wyllie, 1980; Wyllie et al., 1984) (Figure 2). Cette fragmentation peut être mise en évidence en analysant par électrophorèse sur gel d'agarose, l'ADN isolé de cellules en apoptose. Les résultats d'électrophorèse obtenus montrent plusieurs bandes, de taille équivalente à des multiples de 180 paires de bases, qui forment une « échelle d'ADN » (Figure 2). Ce profil n'est pas retrouvé lors de la nécrose où la dégradation d'ADN est moins importante et induit des fragments de tailles hétérogènes. Les fragments d'ADN réguliers générés au cours de l'apoptose, résultent de l'activation d'une endonucléase, CAD/DFF40, coupant entre les nucléosomes.

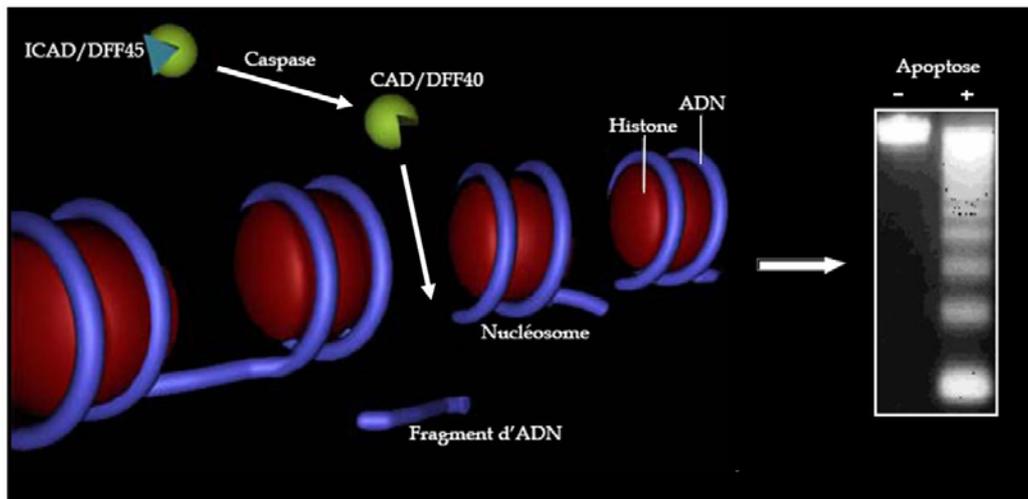


Figure 2 : Fragmentation internucléosomale de l'ADN lors de l'apoptose. L'endonucléase CAD/DFP40 clive l'ADN entre les nucléosomes (à gauche) et génère des fragments réguliers qui forment une échelle d'ADN après migration électrophorétique des fragments sur gel d'agarose (à droite).

Plusieurs études ont démontré que l'endonucléase CAD/DFP40 est responsable de ce clivage internucléosomal (Enari et al., 1998; Liu et al., 1997). En effet, cette fragmentation endogène n'est pas observée dans les cellules déficientes en CAD/DFP40. Dans les cellules normales, CAD/DFP40 forme un complexe inactif avec son inhibiteur ICAD/DFP45. Lors de l'apoptose, ICAD/DFP45 est clivé par la caspase-3 et se dissocie de CAD/DFP40 libérant l'endonucléase active, qui migre dans le noyau (Sakahira et al., 1998; Tang and Kidd, 1998) (Figure 2).

Une autre nucléase responsable de la dégradation de l'ADN lors de l'apoptose, la DNase II a été identifiée. La DNase II est une enzyme lysosomale présente dans les macrophages (Ferri and Kroemer, 2000). Elle intervient, avec d'autres enzymes du lysosome, comme les cathepsines dans une voie auxiliaire de fragmentation de l'ADN, initiée par les macrophages, au moment de la phagocytose des corps apoptotiques (McIlroy et al., 2000; Wu et al., 2000).

D'un point de vue biochimique, l'apoptose est aussi caractérisée par la perte de l'asymétrie des phospholipides de la membrane plasmique. Ainsi, les phosphatidylsérines (PS), phospholipides anioniques présents uniquement dans le feuillet interne de la membrane plasmique des cellules, vont se déplacer dans le feuillet externe et être externalisées à la surface cellulaire. Ceci permet aux cellules apoptotiques d'être reconnues comme cibles par les macrophages pour la phagocytose (Fadok et al., 2000). De plus lors de l'apoptose, certaines protéines cellulaires sont dégradées. C'est le cas, des lamines formant la membrane

nucléaire ou de certaines protéines comme la foldrine et la gelsoline dont le clivage conduit à une altération du cytosquelette, induisant par la suite la vésiculation membranaire.

III. Effecteurs de l'apoptose

III.1- Aspects moléculaires de l'apoptose

Chez les mammifères, un grand nombre de gènes est impliqué dans ce contrôle génétique de l'apoptose. Ce contrôle permet donc, soit de favoriser la croissance cellulaire lorsque ces gènes particuliers ne sont plus exprimés, soit de favoriser cette mort cellulaire lorsqu'ils sont surexprimés. Le caractère très conservé du phénomène d'apoptose a été démontré par des études génétiques en premier lieu dans des travaux réalisés chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Hengartner and Horvitz, 1994) (Figure 3).



Figure 3 :
Photographie de *C. elegans*.

Ce nématode *C. elegans* (Figure 3) a été un modèle de choix pour l'étude de l'apoptose aux niveaux cellulaire, génétique et moléculaire car il comporte certaines particularités, dont sa transparence ainsi que son développement stéréotypé. Les travaux menés sur *C. elegans* ont montré que parmi les 1090 cellules, composant ce nématode sous sa forme hermaphrodite, produites durant son développement embryonnaire, 131 de ces cellules meurent invariablement par apoptose. La forme adulte est formée des 959 cellules restantes (Sulston et al., 1983). La sélection par mutagenèse chimique de larves, présentant des défauts d'élimination de ces 131 cellules, a permis de mettre en évidence les facteurs génétiques impliqués dans la régulation de cette apoptose. Ces analyses génétiques ont révélé l'existence de 14 gènes impliqués dans ce processus. Quatre de ces gènes sont principalement impliqués dans la régulation de l'apoptose de ces 131 cellules au cours du développement de cet organisme. Parmi ces gènes, *ced-4* et *ced-3* (*Caenorhabditis elegans death*) sont requis pour l'initiation et l'exécution de l'apoptose (Ellis and Horvitz, 1986). Le gène *ced-9* codant une protéine bloquant l'apoptose, agit en amont des gènes *ced-4* et *ced-3* et inhibe leurs activités proapoptotiques. La mutation de *ced-9*, augmentant sa fonction, prévient la mort de ces 131 cellules et inversement son inactivation entraîne la mort des cellules qui auraient dû survivre. Cette inactivation est létale pour l'embryon de ce nématode (Conradt and Horvitz, 1998). Une autre mutation a permis d'identifier un gène nommé *egl-1* (*egg-laying defective-1*) codant une protéine agissant en amont de *ced-9*, *ced-4* et *ced-3*. *Egl-1* régule négativement l'activité de

ced-9 (Metzstein et al., 1998). Egl-1 est capable de s'associer à Ced-9, supprimant l'effet inhibiteur de Ced-9 sur Ced-4, alors libre d'activer Ced-3 et de déclencher l'apoptose (Figure 4).

Des analyses fonctionnelles portant sur les interactions des produits de ces gènes ont permis de définir un modèle d'activation de l'apoptose chez *C. elegans*. Dans ce modèle, la protéine Ced-3 qui est la protéine effectrice de l'apoptose, interagit avec la protéine Ced-4 permettant son auto-activation et l'initiation de l'apoptose. L'activation de Ced-3 par Ced-4 est inhibée par la protéine Ced-9. Celle-ci séquestre Ced-4 et/ou le complexe Ced-4/Ced-3 au niveau des membranes intracellulaires. Suite à un stimulus d'apoptose, la protéine Egl-1 interagit avec Ced-9, inhibant l'activité de cette dernière, permettant ainsi l'activation de la protéase Ced-3 par Ced-4 dans le cytoplasme (Metzstein et al., 1998) (Figure 4).

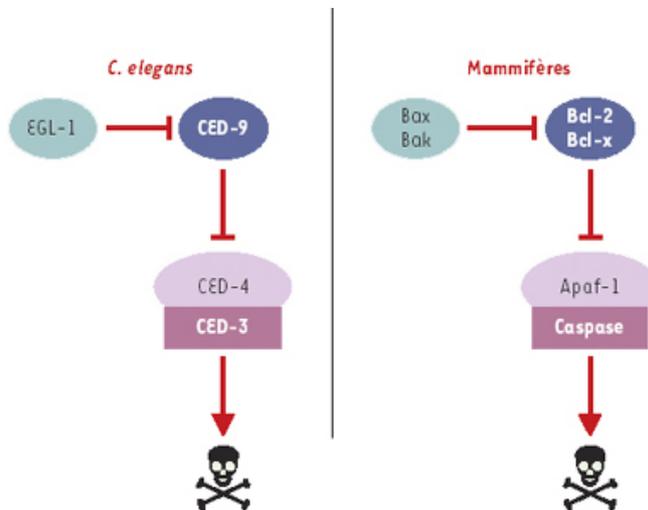


Figure 4 : Gènes impliqués dans l'apoptose chez C. Elegans et chez les mammifères (d'après (Couzinet, 2002)).

Les homologues des gènes ced-3, ced-4, ced-9 et egl-1 ont été identifiés chez les mammifères (Figure 4). Les homologues humains de ced-3 sont des gènes pro-apoptotiques codant des protéases à cystéine de type caspase (cystéinyl **aspartyl** protéases) (Nicholson and Thornberry, 1997; Yuan et al., 1993). Le gène ced-3 code une cystéine protéase homologue à l'enzyme de conversion de l'interleukine-1-β humaine ou ICE. La famille des caspases comprend actuellement 14 membres, dont 11 chez l'homme (Ferri and Kroemer, 2000). Ced-9 et Egl-1 présentent des homologies avec le proto-oncogène Bcl-2, premier membre identifié d'une grande famille de protéines régulatrices de l'apoptose (Korsmeyer, 1992; White, 1996). Egl-1 est une petite protéine contenant un module de 9 acides aminés (aa), correspondant à l'un des domaines d'homologie (BH3). Les homologues mammifères de Egl-1 sont les protéines pro-apoptotiques « BH3-only » de la famille Bcl-2 (Figure 4).

Ced-4 est l'homologue de la protéine adaptatrice Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) et Flash/Nod-1/Card-4 (Bertin et al., 1999; Imai et al., 1999; Inohara et al., 1999;

Zou et al., 1997) (Figure 4). Chez l'homme, l'activation d'une des caspases, la caspase-9 par Apaf-1 est régulée négativement ou positivement par les différents membres de la famille des Ced-9/Egl-1/Bcl (Hu et al., 1998; Li et al., 1997; Luo et al., 1998; Pan et al., 1998b). Par ailleurs, Ced-4 équivalent de Apaf-1, est capable d'interagir à la fois avec Ced-3, équivalent des caspases, et Ced-9 équivalent de Bcl-2 et Bcl-X_L (Chinnaiyan et al., 1997). De plus, il a été possible d'isoler un complexe Bcl-X_L/Ced-4/caspase. La localisation de ce complexe à la membrane mitochondriale est corrélée avec la survie cellulaire. La libération de Ced-4 dans le cytoplasme entraîne l'activation des caspases et l'apoptose (Chinnaiyan et al., 1997; Irmiler et al., 1997a; Irmiler et al., 1997b; Seshagiri and Miller, 1997). L'expression de Bcl-2 humain chez *C. elegans* permet de compenser l'inactivation de la protéine Ced-9 (Vaux et al., 1992), malgré le « fossé » évolutif séparant les mammifères des nématodes.

Ces résultats rendent en partie compte des différents niveaux de régulation entre ces protéines et leurs homologues chez les mammifères. Les mécanismes de régulation de l'apoptose sont donc remarquablement conservés chez les Métazoaires. Si le schéma général d'activation de l'apoptose est conservé entre nématodes et mammifères, la multiplicité des gènes impliqués dans l'apoptose chez les mammifères augmente le niveau de complexité des mécanismes de régulation de la mort cellulaire programmée chez les organismes supérieurs.

III.2- Rôle des caspases

En dépit de la diversité de ces signaux, qu'il s'agisse de stimuli externes (cytokines, interactions cellulaires, etc) ou internes (concentration en calcium, production de ROS ainsi que de NO), toutes les cellules engagées dans le processus apoptotique montrent des modifications morphologiques et biochimiques similaires, suggérant l'existence d'une phase effectrice commune à tous les types cellulaires. Cette signalisation aboutit alors à l'activation irréversible de molécules effectrices. Parmi les principaux effecteurs contribuant à la destruction de la cellule, on distingue d'une part les caspases et d'autre part les nucléases. L'étape capitale pour enclencher l'apoptose est donc l'activation de ces caspases, que nous allons successivement discuter d'un point de vue structural et d'un point de vue de leur voie d'activation.

III.2.1- Principales caractéristiques et classification des caspases

Les caspases sont des cystéines protéases pouvant cliver spécifiquement leur substrat après un résidu aspartate justifiant leur nom générique (cystéine **asp**artate protéase) (Alnemri et al., 1996). Elles sont impliquées directement dans l'apoptose, mais également dans la

maturation de certaines cytokines. La première caspase identifiée chez les mammifères a été ICE (Interleukin-1 β Converting Enzyme) plus tard renommée caspase-1, qui a la possibilité de convertir la proforme de l'interleukine-1 β en sa forme clivée active. Les cibles des caspases sont des protéines dont la dégradation aboutit soit à la perte de leur fonction, soit à l'acquisition de nouvelles activités enzymatiques.

Ces cystéines protéases sont présentes constitutivement dans la cellule et sont hautement conservées à travers les espèces (Boyce et al., 2004). Chez les mammifères, on en connaît actuellement 14 différentes (Figure 5). Selon la nomenclature phylogénétique usuelle, les caspases sont numérotées de la caspase-1 à -14 (Alnemri et al., 1996). Du fait de sa découverte précoce en 1992, la protéase ICE a été rebaptisée caspase-1 (Thornberry et al., 1992). A ce jour, une dizaine d'entre elles ont donc été identifiées, toutes espèces confondues, mais il faut noter que cette liste n'est pas exhaustive. En effet, un criblage *in silico* du génome humain sur la base des domaines conservés permet d'en recenser au moins 11 chez l'homme. Ce sont les caspases-1 à -10 ainsi que la caspase-14. Les caspases-11 et -12 sont des homologues des caspases-4 et -5 chez la souris, et la caspase-13 est un homologue de la caspase-4 (Koenig et al., 2001). Néanmoins, il existerait chez l'homme une « pseudo-caspase-12 » (Lamkanfi et al., 2004). Toutes ces protéases présentent des similarités au niveau de leur séquence, de leur structure et de leur spécificité de substrat (Figure 5).

Une classification de ces caspases a été suggérée selon trois critères différents. Ces trois critères sont la spécificité de reconnaissance du site de clivage sur leur substrat, la longueur de leur prodomaine et leur place dans la cascade apoptotique.

La spécificité de reconnaissance du site de clivage des caspases sur leur substrat est différente selon la nature de leurs cibles protéiques. Cette différence de spécificité peut aussi influencer sur la régulation de leurs activités, puisque les inhibiteurs des caspases lient spécifiquement les caspases selon leur site de coupure et les inactivent sélectivement. Par exemple, la protéine α -IAP se fixe sur la caspase-9 et inhibe son activité protéolytique. Les caspases elles-mêmes peuvent se présenter sous deux formes, une forme zymogène inactive et une forme active (Figure 6). La forme inactive comprend un prodomaine (partie N-terminale) et un domaine catalytique (partie C-terminale) qui est lui-même organisé en deux sous-unités de 20 kDa et 10 kDa.

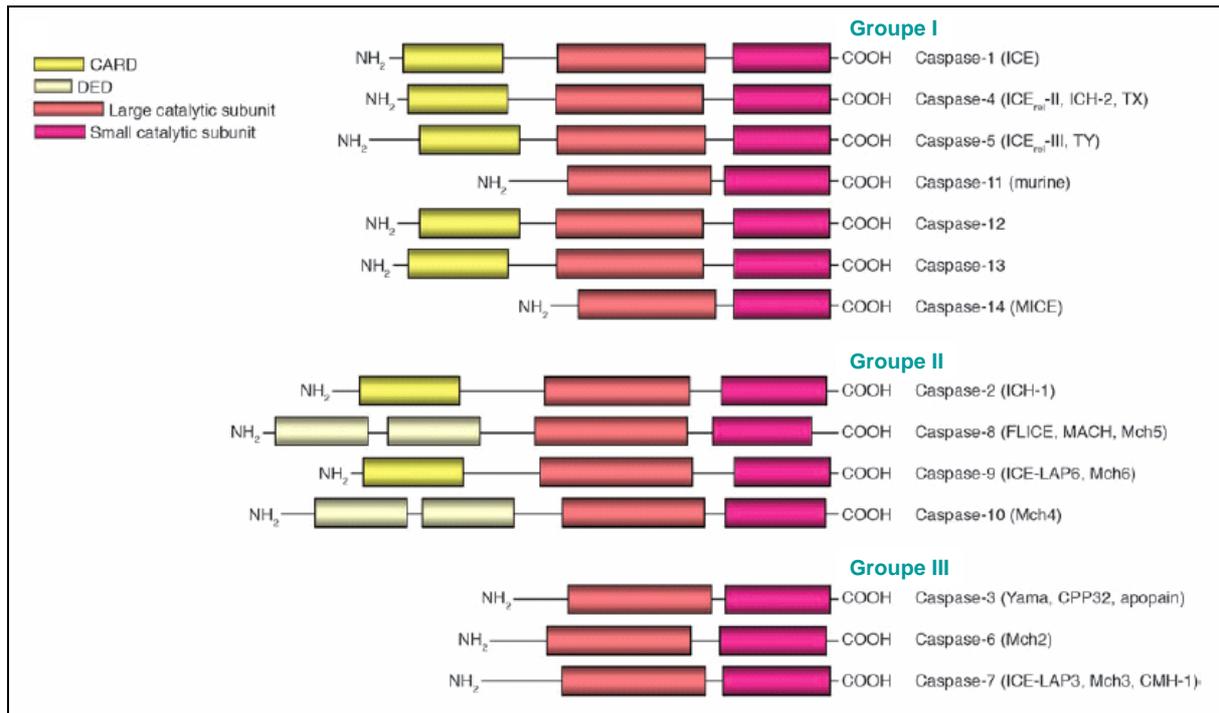


Figure 5 : La famille des caspases. Trois groupes de caspases sont présentés. Groupe I : Caspases inflammatoires. Groupe II : Caspases initiateuses de l'apoptose. Groupe III : Caspases effectrices de l'apoptose. Le domaine CARD, DED et les grandes (p20) et les petites (p10) sous-unités catalytiques sont représentées. (D'après (Lavrik et al., 2005))

Les caspases peuvent être divisées en deux catégories en fonction de leur structure et de leur position dans la cascade apoptotique. Ces deux catégories sont les caspases initiateuses et les caspases effectrices (Figure 5). Ces dernières ont généralement un prodomaine court et peuvent cliver différents substrats cellulaires. En revanche, les caspases initiateuses possèdent d'une part, un long prodomaine et d'autre part, très souvent un motif de liaison permettant l'interaction physique avec des protéines adaptatrices étant à l'origine de l'enclenchement de la cascade apoptotique (Figure 5). Ces caspases initiateuses ont comme principale fonction d'activer les caspases effectrices qui exercent leur rôle plus en aval dans le processus d'apoptose. Ces caspases à long prodomaine, dites caspases d'amont, contiennent des motifs particuliers d'interaction protéine-protéine, tels que les domaines DED (Death Effector Domain) pour les caspases-8 et -10 ou CARD (Caspase Recruitment Domain) pour les caspases-1, -2, -4 et -9. Ces domaines permettent leur recrutement par des protéines adaptatrices au niveau de complexes protéiques d'initiation de l'apoptose. Le recrutement des procaspases initiateuses au niveau de ces sites spécifiques entraîne l'oligomérisation des proenzymes et leur activation par autocatalyse (Kumar and Colussi, 1999). Les caspases-3, -6, -7 et -14 possèdent quant à elles, un prodomaine plus court (10 à 40 résidus) et sont dites caspases d'aval ou effectrices. Elles ne possèdent pas de domaine d'interaction protéine-protéine leur permettant d'être recrutées et de s'oligomériser (Figure 5). Elles sont activées le

plus souvent à la suite de leur clivage par une autre caspase (à prodomaine court ou long) ou par le granzyme B aboutissant à un fonctionnement dit en cascade. Leur activation conduit au clivage de diverses protéines substrats (Thornberry and Lazebnik, 1998) à l'origine de la plupart des événements biochimiques, structuraux ou morphologiques de l'apoptose.

Les propriétés fonctionnelles des caspases basées sur ces trois caractéristiques (spécificité de reconnaissance du substrat, structure et fonction biologique) ont donc permis de les subdiviser en trois grands groupes (Figure 5). Le premier groupe (Groupe I) comprend les caspases-1, -4, et -5 contrôlant les réponses inflammatoires et ne jouant pas de rôle important dans l'apoptose. Leur substrat est caractérisé par la séquence WEHD. La caspase-14 présente chez l'homme est aussi une caspase « non apoptotique », car elle intervient dans la différenciation terminale de l'épiderme (Mikolajczyk et al., 2004). Les deux autres groupes sont constitués des caspases impliquées dans l'apoptose, avec d'une part les caspases initiatrices (Groupe II) et d'autre part les caspases effectrices (Groupe III). Les caspases initiatrices regroupent les caspases activées suite à des signaux extra- ou intracellulaires (caspases-2, -8, -9, -10). Leur long prodomaine contient un des deux motifs caractéristiques : DED (caspases-8 et -10) ou CARD (caspases-9 et -2). Une fois activées, ces caspases initiatrices vont à leur tour activer les caspases-3, -6 et -7 effectrices, ces dernières étant caractérisées comme déjà indiqué par le prodomaine de petite taille. Ainsi les caspases initiatrices font la liaison entre les signaux déclencheurs de l'apoptose et la phase d'exécution, assurée par les caspases effectrices.

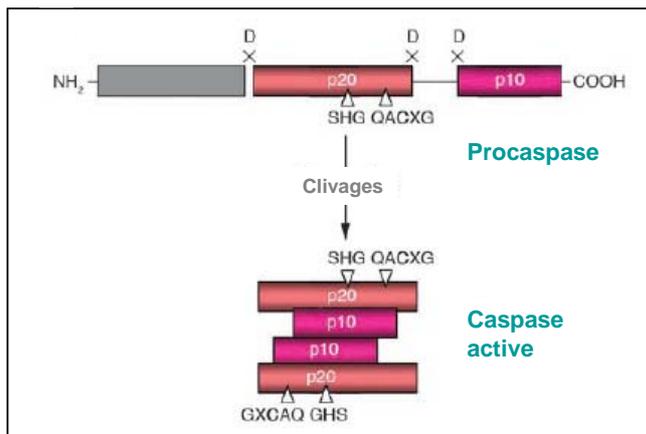


Figure 6 : Activation en cascade des caspases. Le clivage de la procaspase sur des sites de clivage spécifiques Asparagine-X (DX) conduit à la formation d'une caspase mature active, qui contient l'hétérotétramère p20-p10, et à la libération du prodomaine. Les résidus sollicités dans les centres actifs sont indiqués. (D'après (Lavrik et al., 2005)).

L'ensemble des caspases possède un site catalytique comprenant un résidu cystéine directement impliqué dans le processus catalytique localisé dans un motif QACxG (où le résidu x est R, Q ou G) (Figure 6). Ces enzymes reconnaissent, puis clivent des chaînes polypeptidiques au niveau d'un résidu aspartique de la partie C- terminale. Ces protéines sont

produites dans le cytoplasme sous forme de précurseurs inactifs (zymogènes). Dans la majorité des cas, elles sont activées par un double clivage, l'un éliminant le prodomaine N-terminal et l'autre séparant les 2 sous-unités (la grande sous-unité comprenant le site actif et la petite sous-unité se trouvant dans la partie C-terminale, Figure 6). L'étude cristallographique des caspase-1 et -3 a montré que l'assemblage des 2 sous-unités catalytiques aboutit à la formation d'un hétérotétramère enzymatiquement actif (Rotonda et al., 1996) (Figure 7). Une fois activées, les caspases propagent le signal apoptotique en activant en cascade d'autres caspases. Ce phénomène est appelé « cascade apoptotique des caspases ». Ces caspases contribuent par ailleurs aux altérations morphologiques typiques de l'apoptose en clivant différents substrats impliqués dans le maintien de l'intégrité cellulaire.

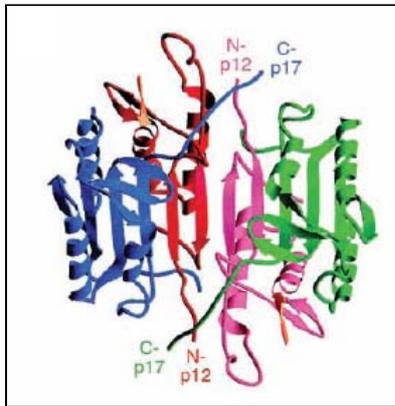


Figure 7 : Structure tridimensionnelle de l'hétérotétramère de la caspase 3.

La caspase-3 est formée de deux dimères (2 petites sous-unités p12 et 2 sous-unités p17). Chaque hétérodimère est formé par des interactions hydrophobes ayant pour résultat la plupart du temps, la formation de feuillets β parallèles, composés de 6 brins β antiparallèles. Deux hétérodimères s'adaptent ainsi pour former un feuillet β de 12 brins entourés d'hélices α . Les extrémités N et C terminales des petites et des grandes sous-unités de la protéase sont indiquées. (D'après (Lavrik et al., 2005)).

III.2.2- Cibles et substrats des caspases

	Caspase	Substrat spécifique
Groupe I	Caspase-1	WEHD
	Caspase-4	(W/L)EHD
	Caspase-5	(W/L)EHD
	Caspase-13	WEHD
Groupe II	Caspase-14	WEHD
	Caspase-2	DEHD
	Caspase-8	LETD
	Caspase-9	LEHD
Groupe III	Caspase-10	LEXD
	Caspase-3	DEVD
	Caspase-6	VEHD
	Caspase-7	DEVD

Tableau 1: Substrats spécifiques des caspases.

Certains groupes ont développé des inhibiteurs peptidiques pour les caspases (Thornberry et al., 1994). Ces inhibiteurs sont basés sur la spécificité du térapeptide du site de reconnaissance du substrat de chaque caspase (Wei et al., 2000) (Tableau 1).

L'introduction au niveau de l'extrémité C-terminale de ce térapeptide d'un groupement aldéhyde ou d'un groupement méthylcétone permet la synthèse d'un inhibiteur respectivement réversible ou irréversible (Garcia-Calvo et al., 1998). Ces inhibiteurs sont largement utilisés pour démontrer l'implication des caspases et de l'apoptose dans certains processus.

A ce jour, de nombreux substrats des caspases ont été identifiés. L'un des tous premiers substrats découvert est l'enzyme PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymérase), enzyme jouant un rôle dans la réparation de l'ADN, dont la coupure au niveau de la séquence DEVD-G est l'un des premiers signes détectables de l'apoptose, dans les phases les plus tardives.

Généralement, les clivages protéolytiques ont comme conséquence soit l'activation de protéines impliquées dans le déroulement de l'apoptose (procaspases, endonucléases, PKC- δ , facteurs de transcription SREBP-1, -2, Bcl-2, Bcl-X_L), soit l'inactivation de protéine contribuant au maintien de l'intégrité cellulaire (actine, lamines nucléaires, fodrine, facteur ICAD/DFF45) ou contribuant à la régulation de la réparation de l'ADN (PARP, DNA-PK) ou du cycle cellulaire (pRB). Ainsi, les caspases-3, -6 et -7 clivent des protéines cibles à l'origine des particularités biochimiques et morphologiques des cellules apoptotiques (Degterev et al., 2003). Dans une grande majorité de cas, le clivage de la protéine cible conduit à son inactivation. C'est très souvent le cas des protéines anti-apoptotiques comme les inhibiteurs de caspases, FLIP et IAP (Liston et al., 2003) ou les protéines Bcl-2 ou Bcl-X_L, dont le clivage résulte de la conversion de ces protéines en facteurs pro-apoptotiques (Cheng et al., 1997). Cependant, il existe quelques exemples montrant que l'activation des caspases peut activer des mécanismes non-apoptotiques. Ainsi, des travaux très récents de l'équipe de Solary et al. ont montré que dans des monocytes traités au M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor), la caspase-8 est activée et elle contribue à la voie de la différenciation macrophagique des monocytes (Rebe et al., 2006). En effet, en réponse au M-CSF, la caspase-8 interagit avec FADD, RIP1 et c-FLIP_L en absence de récepteur à domaine de mort. La caspase-8 va alors clivée la protéine RIP1, qui va empêcher l'activation de la voie NF- κ B, provoquant la différenciation cellulaire des monocytes en macrophages (Rebe et al., 2006).

Les caspases inactivent aussi des protéines de réparation (PARP ou Rad51 (Soldani and Scovassi, 2002)), des protéines de régulation du cycle cellulaire (Jin et al., 2000) et des protéines de transduction de signaux comme Akt (Widmann et al., 1998).

Les caspases peuvent également induire un gain ou une augmentation de fonction de certaines protéines pro-apoptotiques, soit directement comme les caspases elles-mêmes ou la protéine Bid qui n'est active qu'après clivage, soit indirectement par dissociation de domaines

régulateurs ou inhibiteurs comme le relargage de l'inhibiteur ICAD/DFF45 libérant l'endonucléase CAD/DFF40 active (Tang and Kidd, 1998) (Figure 2).

Enfin, les caspases sont à l'origine de la dissociation de certains constituants cellulaires par clivage de protéines de structure, comme les lamines nucléaires, protéines de structure de l'enveloppe nucléaire, dont la dégradation par la caspase-6 conduit à l'altération de la membrane nucléaire (Ruchaud et al., 2002; Takahashi et al., 1996). Ces protéases induisent également une désorganisation du cytosquelette, notamment par clivage des protéines constituant les filaments intermédiaires comme la kératine 18 (Schutte et al., 2004) ou par activation de la gelsoline. En effet, après clivage par la caspase-3, la gelsoline conduit à la dépolymérisation de l'actine (Kothakota et al., 1997). Des protéines de jonctions adhérentes, assurant les interactions entre les cellules sont aussi dégradées par les caspases (β -caténine) (Brancolini et al., 1998).

Certains substrats ne sont pas clivés dans tous les types cellulaires. Par exemple, l'actine est clivée dans la lignée myélomonocytaire U937 (Mashima et al., 1997), dans les neurones et dans les thymocytes (Villa et al., 1998), mais pas dans d'autres types cellulaires durant le processus d'apoptose (Rice et al., 1998; Song et al., 1997). De plus, certains substrats sont clivés à des sites différents selon le type cellulaire. Par exemple, la topoisomérase I a un profil de clivage différent si il s'agit de cellules de cancer du poumon A549 ou de cancer du sein MDA-MB-468 (Samejima et al., 1999). Cette hétérogénéité pourrait refléter l'activation des caspases différentes et/ou des variations dans l'accessibilité aux substrats.

L'identification et la caractérisation de ces substrats permettent donc une meilleure compréhension des modifications cellulaires intervenant dans le processus d'apoptose, mais le nombre important de ces substrats, plus d'une centaine, décrits dans la littérature (Hengartner, 2000), apporte une grande complexité au processus d'apoptose.

III.2.3- Mécanismes d'activation des caspases

Plusieurs mécanismes distincts d'activation des caspases sont utilisés par la cellule (Boatright and Salvesen, 2003; Thornberry and Lazebnik, 1998). Le plus simple appelé transactivation consiste en l'activation des caspases par d'autres caspases. Ce mécanisme utilisé pour l'activation des caspases effectrices par les caspases initiatrices, est à l'origine de la cascade de caspases (Figure 21), et a également pour but d'amplifier le signal apoptotique.

Les caspases effectrices peuvent aussi activer d'autres caspases, grâce à des systèmes de régulation rétroactifs (Van de Craen et al., 1999).

Les autres mécanismes d'activation concernent uniquement les caspases initiatrices. Ils sont provoqués par des interactions physiques avec des protéines situées en amont dans la signalisation apoptotique. Cette activation peut être due à l'induction d'un rapprochement entre plusieurs procaspases favorisant ainsi leur auto-activation (Muzio et al., 1998). Ce phénomène a été observé pour la caspase-8 lors de l'apoptose induite par les récepteurs à domaine de mort (Algeciras-Schimmich et al., 2002) (Figure 17). Ces récepteurs une fois activés, sont à l'origine d'un regroupement de procaspases-8, permettant ainsi une haute concentration locale de précurseurs et aussi la présence d'une faible activité intrinsèque de ceux-ci, leur permettant par conséquent de s'auto-activer. Les caspases-10 et -2 sont activées de façon similaire. L'activation des caspases initiatrices peut aussi résulter d'une association avec une sous-unité régulatrice comme dans le cas de la caspase-9. Le clivage protéolytique de cette caspase n'est pas suffisant pour son activation. En effet, cette dernière nécessite l'interaction avec le cofacteur Apaf-1 (Rodriguez and Lazebnik, 1999) (Figure 8).

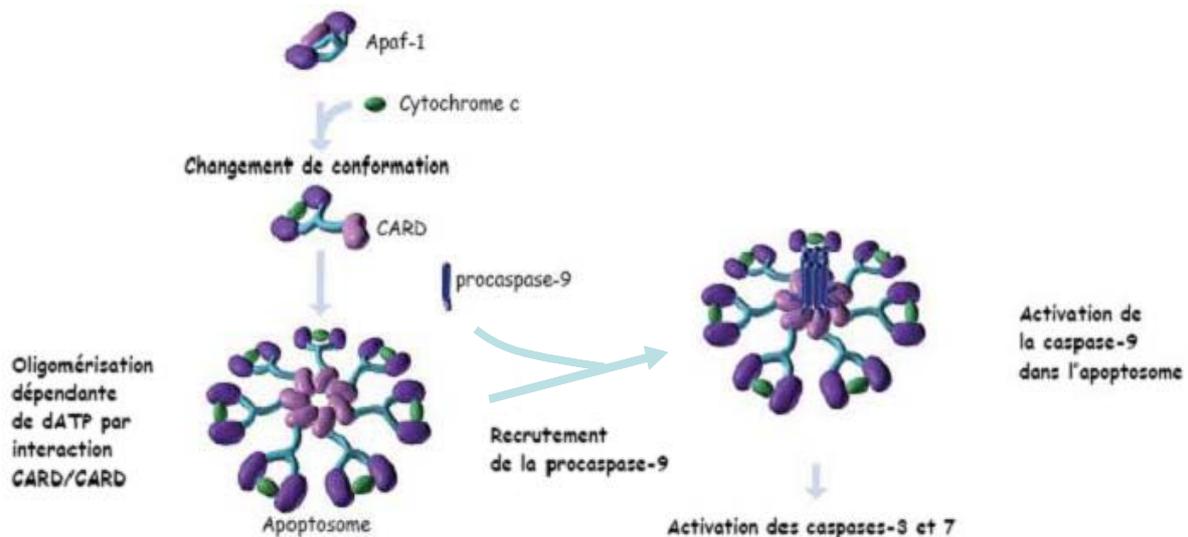


Figure 8: Activation de la caspase-9 par la formation de l'apoptosome.

Plusieurs études ont mis en évidence la présence d'un complexe multiprotéique, l'apoptosome, constitué de la caspase-9, d'Apaf-1 et du cytochrome c (Hill et al., 2003; Li et al., 1997; Zou et al., 1999) (Figure 8). La formation de ce complexe s'effectue en deux étapes et fait suite à la libération par la mitochondrie du cytochrome c dans le cytoplasme (Figure 8). On assiste d'abord, à un changement de conformation d'Apaf-1, grâce à sa liaison avec le cytochrome c et à l'hydrolyse d'ATP (Hu et al., 1999; Purring-Koch and McLendon, 2000). Puis, sept sous-unités d'Apaf-1 s'oligomérisent et recrutent par leur domaine CARD plusieurs

procaspases-9 qui vont alors être activées (Acehan et al., 2002; Saleh et al., 1999; Srinivasula et al., 1998). En effet, Apaf-1 contient à son extrémité N-terminale, un domaine CARD qui est exposé lors de son changement de conformation (Zhou et al., 1999). L'apoptosome représente la forme active de la caspase-9 (Rodriguez and Lazebnik, 1999) (Figure 8).

III.2.4- La régulation des caspases

Il existe plusieurs niveaux de régulation des caspases. Un des premiers niveaux est représenté par les mécanismes spécifiques et complexes de leur activation. Les fonctions de ces caspases sont régulées d'une part, par la disponibilité des cofacteurs, comme Apaf-1 et le cytochrome c, et d'autre part, par l'activation des protéines situées en amont dans la signalisation apoptotique, c'est-à-dire les récepteurs à domaine de mort cellulaire.

Les caspases sont également régulées par des inhibiteurs spécifiques, qui ont été découverts chez les virus. En effet, l'apoptose représente un des moyens de défense des cellules contre les virus, par destruction puis élimination des cellules infectées par les cellules phagocytaires. Certains virus ont donc développé des systèmes de résistance qui régulent les fonctions des caspases en inhibant, soit les caspases initiatrices comme la caspase-8, soit les caspases effectrices comme la caspase-3, et inhibent l'apoptose comme les protéines virales CrmA et p35. Ces deux protéines virales sont des inhibiteurs enzymatiques de types compétitifs. Un fois activées par clivage, elles se lient au caspases et évitent ainsi la protéolyse d'autres substrats (Komiyama et al., 1994; Zhou et al., 1997).

La protéine Crm A (Cytokine response modifier gene A) est un produit précoce du virus de la variole qui inhibe fortement l'inflammation et le recrutement des macrophages au site d'infection (Palumbo et al., 1989). L'inhibition de l'inflammation et de l'apoptose est probablement due à l'inhibition des caspases impliquées dans l'activation de cytokines de l'inflammation telles que l'IL-1 β . Effectivement, des études ultérieures ont montré que Crm A inhibe l'activité protéolytique des caspases-1 et -8, et moins efficacement celle de la caspase-6 (Ray et al., 1992; Zhou et al., 1997).

En revanche, la protéine p35 exprimée par le baculovirus, inhibe les caspases déjà actives : après clivage par ces caspases, p35 forme un complexe avec celles-ci, ce qui les inactive (Bump et al., 1995; Riedl et al., 2001). De plus, cette protéine inhibe une plus large palette de caspases comprenant les caspases-1, -2, -3 et -4 (Bump et al., 1995; Xue and Horvitz, 1995). Le mécanisme d'action de Crm A et p35 est celui d'un inhibiteur compétitif : ces protéines demeurent associées aux caspases après clivage et bloquent leur site catalytique.

Des équivalents de ces inhibiteurs viraux ont été découverts dans les cellules de mammifères (Crook et al., 1993) : il s'agit des protéines de la famille des IAP (Inhibitor of Apoptosis) et les protéines FLIP.

Les protéines FLIP (Irmeler et al., 1997b), identifiées chez le virus de l'herpès HHV8 (Garvey et al., 2002), possèdent deux domaines DD leur permettant d'entrer en compétition avec la procaspase-8 pour la fixation sur le domaine DED de la protéine adaptatrice FADD (Bump et al., 1995; Hu et al., 1997). Les protéines c-FLIP sont des homologues inactifs de la procaspase-8 (Figure 12). De ce fait, elles vont entrer en compétition avec celle-ci, bloquant soit directement partiellement le recrutement complet de la procaspase-8 au niveau du complexe du récepteur à domaine de mort, soit indirectement avec l'activation de la caspase-8 en inhibant partiellement son clivage (Tschopp et al., 1998) (Figure 13). Cependant, l'isoforme longue de c-FLIP, c-FLIP_L, peut activer la caspase-8 au sein d'un complexe hétérodimère c-FLIP_L/caspase-8 qui va permettre une activation limitée de la caspase-8 et le clivage de la protéine RIP (Micheau et al., 2002). Ces protéines seront développées de façon plus détaillée dans le paragraphe III.5.1.

De plus, il existe des protéines virales analogues de c-FLIP, les protéines E8, issues du virus équin de l'herpès de type II, et les protéines MC159 et MC160, toutes deux issues du virus *Molluscum contagiosum*, utilisant une stratégie similaire à celle des protéines c-FLIP afin d'inhiber la mort cellulaire. En effet, ces protéines virales se lient aux prodomaines des procaspases-8 et -10 et empêchent leur recrutement aux récepteurs à domaine de mort (Duckett et al., 1996; Uren et al., 1996).

Une autre famille de protéines inhibitrices des caspases a été décrite. Ainsi, la famille des IAPs dont tous les membres (XIAP, cIAP1, cIAP2, Survivin, Livin, Ts-IAP, NAIP) portent une ou plusieurs copies d'un motif BIR (Baculovirus IAP Repeats) nécessaires pour lier et inactiver les caspases (Liston et al., 2003) (Figure 14). Ils inhibent à la fois l'activité des caspases initiateuses et celle des caspases effectrices (Figure 21). De plus, certaines de ces protéines favorisent la fixation de l'ubiquitine ce qui induit leur dégradation ainsi que celle des caspases auxquelles elles sont liées (Suzuki et al., 2001; Yang and Li, 2000). Ces inhibiteurs sont eux-mêmes contrôlés par les protéines SMAC/DIABLO et OMI/HTRA2. Celles-ci sont libérées de la mitochondrie dans le cytoplasme lors de l'apoptose, se lient aux IAPs et les inhibent (Du et al., 2000; Liston et al., 2003) (Figure 21). La famille des IAPs sera plus largement décrite dans le paragraphe III.5.2.

III.2.5- Les deux voies apoptotiques mènent aux caspases

La mise en route du processus d'activation des caspases s'effectue par deux voies différentes : celle de la mitochondrie (voie dite **intrinsèque**) et celle des « récepteurs à domaine de mort » (voie dite **extrinsèque**). L'initiation de cette dernière est exécuté lors de la stimulation de nombreux récepteurs membranaires comme les récepteurs Fas/APO-1/CD95 ou le récepteur au TNF α (Ashkenazi and Dixit, 1998). La voie mitochondriale est induite par une large variété de stimuli physico-chimiques comme le choc thermique, la privation en facteurs de croissance, l'exposition aux UV, des drogues comme la staurosporine ou des agents anticancéreux comme l'étoposide. La voie Fas peut en outre être subdivisée en deux catégories, selon qu'elle recourt ou non à une étape d'amplification de son signal apoptotique par la voie mitochondriale (respectivement type II et type I) (Figure 21).

Dans la partie suivante, nous allons évoquer l'apoptose par les récepteurs à domaine de mort. D'autres voies apoptotiques que nous ne détaillerons pas ont été décrites (Forcet et al., 2001). L'une d'elles est induite par la libération de perforine et de granzyme B à partir de lymphocytes T cytotoxiques, qui sont internalisés par pinocytose au niveau des cellules voisines (Froelich et al., 1998). Les différentes voies convergent vers un point de non-retour, à partir duquel les phases d'exécution et de dégradation ont lieu de manière irréversible.

III.3- Voie mitochondriale et les protéines de la famille Bcl2

III.3.1- Voie mitochondriale

Depuis le début des années 1990s, il est clairement établi que la mitochondrie, organe indispensable à la production d'énergie de la cellule (ATP) joue un rôle essentiel dans la régulation des mécanismes moléculaires de la mort cellulaire. En effet, une cellule engagée dans ce processus d'apoptose (à la suite de stimuli engendrant un stress ou un dommage cellulaire, que ce soit à la suite d'un choc thermique ou osmotique, de radiations ionisantes, ou d'un sevrage en cytokines), va subir de profondes altérations de ces mitochondries. Ces dernières vont subir une perméabilisation de leurs membranes à l'origine de la libération de protéines pro-apoptotiques comme le cytochrome c de l'espace inter-membranaire vers le cytosol, provoquant par la suite une chute de leur potentiel transmembranaire ($\Delta\Psi_m$) (Figure 20). Le mécanisme précis de cette perméabilisation membranaire reste encore maintenant très controversé.

Les protéines mitochondriales ainsi libérées sont regroupées sous le nom générique de SIMP (Soluble Inter Membrane Mitochondrial Proteins) et possèdent toutes une activité pro-apoptotique.

Une première classe de SIMP agit sur la voie classique de l'apoptose dépendante des caspases. On y distingue des procaspases, le cytochrome c et un répresseur d'inhibiteur de caspases, la protéine Smac/DIABLO. Une fois libéré dans le cytosol, le cytochrome c interagit avec la protéine Apaf-1 et la procaspase-9, formant en présence d'ATP, l'apoptosome à l'origine du clivage de la procaspase-9, et donc de la formation de sa forme active (Zou et al., 1999) (Figure 8). Cette dernière activera à son tour d'autres caspases exécutrices comme les caspases-3 ou -7. Smac/DIABLO se lie aux protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) et les inactive.

Une deuxième classe de SIMP regroupe différentes protéines libérées par la mitochondrie par la voie apoptotique mitochondriale indépendante des caspases.

Le facteur inducteur de l'apoptose nommé AIF (Apoptosis Inducing Factor), est une flavoprotéine présentant des homologies avec des enzymes de type oxydoréductases de plantes ou de bactéries (Ameisen, 2002). Ce facteur est synthétisé sous la forme d'un précurseur de 67 kDa dont la partie N-terminale contient un domaine signal de localisation mitochondriale. Une fois dans l'espace intermembranaire mitochondrial, il est clivé et libère une protéine mature de 57 kDa. Cette protéine a une double fonction de NADPH oxydase et monodéhydroascorbate réductase mitochondriales, et de facteur apoptogène (Klein et al., 2002; Mate et al., 2002). Son activité oxydoréductase n'est pas essentielle à sa fonction apoptotique. Après un stimulus apoptotique, l'AIF est libéré par la mitochondrie, transloqué dans le noyau des cellules en apoptose et induit en coopération avec des endonucléases (notamment l'endonucléase G), le clivage de l'ADN en fragments de haut poids moléculaire de 50 kpb (Susin et al., 1999).

De même, l'endonucléase G qui est une endonucléase mitochondriale codée par le génome nucléaire, et qui a comme rôle principal d'être impliquée dans la réplication du génome mitochondrial, est relarguée par la mitochondrie. Puis elle est transloquée dans le noyau où elle digère l'ADN nucléaire (Li et al., 2001; van Loo et al., 2001).

III.3.2- Protéines de la famille Bcl-2

La protéine Bcl-2 a tout d'abord été identifiée comme proto-oncogène dans les lymphomes B folliculaires, où une translocation chromosomique particulière conduit à son

expression constitutive. Cet oncogène est responsable de l'inhibition de l'apoptose plutôt que de l'activation de la prolifération cellulaire (Vaux et al., 1988). L'importance de Bcl-2 comme régulateur de la mort cellulaire a été suggérée par son homologie fonctionnelle avec la protéine Ced-9 du nématode *C. elegans*. De plus, dans des souris transgéniques Bcl-2+, il a été montré que Bcl-2 conférait un avantage de survie à des populations de lymphocytes B matures et permettait l'expression du compartiment des lymphocytes B (Nunez et al., 1989). Dans des souris transgéniques déficientes en Bcl-2, il a été observé une apoptose massive des lymphocytes et des cellules rénales, ainsi qu'une perte massive de mélanocytes (Veis et al., 1993). La découverte d'autres protéines homologues à Bcl-2 a permis l'identification de toute une famille de protéines pro- ou anti-apoptotiques (Cory et al., 2003) (Figure 9).

Chez les mammifères, la famille Bcl-2 est composée d'environ une vingtaine de membres, possédant tous au moins un des quatre motifs conservés : BH1 à BH4 (Bcl-2 Homology Domain). Selon leur fonction et la présence des domaines BH, on distingue les membres anti-apoptotiques (comme Bcl-2 et Bcl-xL), constituant la sous-famille Bcl-2 et les membres pro-apoptotiques (comme Bax, Bak, Bad, Bid, Bim) subdivisés en deux groupes : la sous-famille Bax et la sous-famille BH3 (Figure 9).

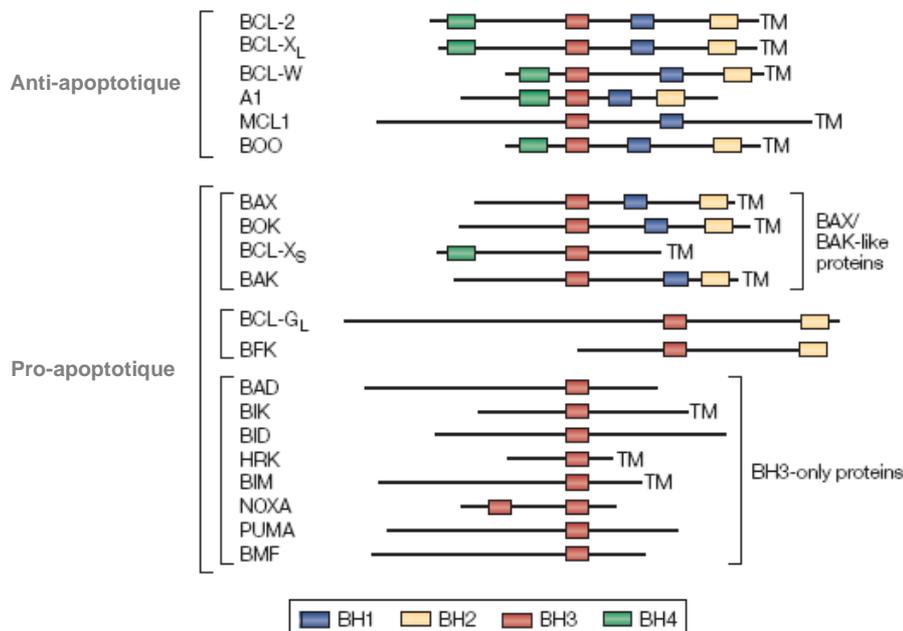


Figure 9 : La famille Bcl-2. (D'après (Strasser, 2005)).

Les membres de la famille Bcl-2 ont une importance essentielle dans la régulation des voies de signalisation de la mort cellulaire. Certaines molécules pro-apoptotiques contiennent les domaines BH1, BH2 et BH3 (Bak), tandis que d'autres ne contiennent que le domaine BH3 (Bid, Bim, Bad). Le domaine BH4 est quant à lui spécifique des protéines anti-

apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1, Diva). Ces protéines interagissent entre elles formant des homodimères ou des hétérodimères, le niveau relatif de chaque protéine dans la cellule détermine sa sensibilité à un signal de mort (Adams and Cory, 1998).

III.3.2.1- La sous-famille Bcl-2

La sous-famille Bcl-2 est formée par Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1 (connu sous le nom Bcl-2A1), Mcl-1 (Myeloïd-cell leukemia sequence 1) et BOO (Bcl-2 homologue of ovary ; connu sous le nom DIVA), qui sont des homologues fonctionnels de Ced-9 du nématode *C. elegans*. Parmi ces derniers, Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w possèdent des structures très similaires et comportent quatre domaines BH et un domaine C-terminal hydrophobe ou domaine transmembranaire (Figure 9, (Petros et al., 2004; Strasser, 2005)). Ce domaine transmembranaire permet leur ancrage dans les membranes et plus particulièrement la membrane externe de la mitochondrie, du réticulum endoplasmique ou de l'enveloppe nucléaire. Bcl-2 est toujours membranaire alors que Bcl-xL et Bcl-w s'associent à la membrane uniquement après un signal apoptotique. Ces protéines sont à l'origine d'une inhibition de l'apoptose et chacune d'entre elles semble intervenir spécifiquement dans un type cellulaire donné (Droin and Green, 2004). Quand elles sont surexprimées, chacune de ces protéines protègent les cellules en culture contre une grande variété de stimuli apoptotique. (Danial and Korsmeyer, 2004; Strasser et al., 2000; Wang, 2001). Ainsi Bcl-2 est requis pour la survie des lymphocytes, des cellules rénales et des mélanocytes (Veis et al., 1993), Bcl-w pour les cellules germinales (Rosse et al., 1998), Bcl-xL pour les cellules neuronales et érythropoïétiques (Gonzalez-Garcia et al., 1995) et A1 pour les neutrophiles (Orlofsky et al., 2002).

III.3.2.2- La sous-famille Bax/Bak-like protein

La sous-famille Bax/Bak-like protein comporte uniquement quatre membres Bax, Bak, MTD/BOK (Bcl-2 related Ovarian Killer) et Bcl-Xs qui comportent chacun une séquence et une structure similaires à Bcl-2, mais avec seulement les domaines BH1, BH2 et BH3 (Petros et al., 2004), mis à part Bcl-Xs qui ne comporte que les deux domaines BH3 et BH4 (Figure 9). Bax et Bak sont exprimés dans de nombreux types tissulaires, alors que BOK est uniquement exprimé dans les tissus de reproduction (Hsu et al., 1997). Ces protéines favorisent la survenue de l'apoptose, aboutissant au relargage du cytochrome c de l'intérieur de la mitochondrie vers le cytoplasme. La libération du cytochrome c va conduire à la formation de l'apoptosome et à l'activation de la caspase-9.

III.3.2.3- La sous-famille BH3

La sous-famille BH3 comporte huit membres chez les mammifères, dont Bad, Bid, Bim, Bik, Bmf, Noxa, Puma, HRK (Figure 9). Ces membres sont tous des homologues de la protéine Egl-1 présente chez le nématode *C. elegans* (Figure 4). Les protéines de cette sous-famille sont caractérisées par la présence dans leur séquence d'un seul motif BH, le domaine central BH3 essentiel pour leur fonction pro-apoptotique. Certaines interviennent dans l'initiation du processus apoptotique durant le développement (Bouillet and Strasser, 2002). En effet, les rôles physiologiques de Bim et de HRK ont été mis en évidence dans le développement et l'homéostasie tissulaire. Bim est essentiel pour l'élimination des lymphocytes autoréactifs (Bouillet et al., 2002). Son absence induit une augmentation du nombre de leucocytes pouvant provoquer une maladie auto-immune. Les membres de cette famille sont aussi impliqués dans le déclenchement de l'apoptose en réponse à certains stimuli cytotoxiques. Il semblerait que chaque protéine soit responsable de la transduction d'un signal de mort spécifique, dans un type cellulaire précis. Ainsi, Bid contribue à l'apoptose des hépatocytes provoquée par les récepteurs à domaine de mort (Yin et al., 1999). De même, Bad est impliqué dans l'apoptose due à un manque de glucose (Danial et al., 2003). Noxa et Puma interviennent dans l'apoptose induite par des agents génotoxiques (Oda et al., 2000; Yu et al., 2001).

III.3.2.4- Régulation de la famille Bcl-2

Pour éviter une induction de l'apoptose dans les cellules normales, les protéines de la famille BH3 exprimées constitutivement, sont maintenues dans une forme inactive par divers mécanismes. Par exemple, Bim et Bmf sont séquestrés au niveau du cytosquelette par interaction avec la dynéine et suite à un signal de mort, ces deux protéines sont libérées dans le cytoplasme (Puthalakath et al., 1999). Bad quant à lui, est phosphorylé et va interagir avec la protéine 14-3-3 inhibant sa fonction pro-apoptotique. Un troisième mécanisme de régulation est l'expression d'un précurseur inactif nécessitant pour son activation un clivage protéolytique. C'est le cas de Bid, dont le clivage libère la forme active tBid. Certaines protéines de la famille Bcl-2 sont aussi régulées au niveau de leur transcription. Ainsi, l'expression de Bax, Noxa et Puma peut être induite par p53 (Villunger et al., 2003). De même, HRK/DP5 est contrôlé au niveau transcriptionnel suite à l'absence de facteurs de croissance (Imaizumi et al., 1999).

III.4- L'apoptose par les récepteurs à domaine de mort cellulaire

Les membres de la famille du TNF-R (Tumour Necrosis Factor Receptor) sont impliqués dans le contrôle du système immunitaire, de l'homéostasie cellulaire et du développement et peuvent activer la différenciation, la survie ou la mort (Schneider and Tschopp, 2000). Le signal transmis par un récepteur donné, peut aboutir soit à l'activation cellulaire, soit à la mort cellulaire, impliquant par conséquent un mécanisme hautement régulé dépendant de l'état de la cellule. Par exemple, le TNFR1 peut transmettre aussi bien des signaux de prolifération dans des lymphocytes non activés, que des signaux de mort permettant l'élimination des lymphocytes activés (Ashkenazi and Dixit, 1998). Il a été rapporté dans la littérature que dans beaucoup de cas concernant l'apoptose, on voit qu'un même signal peut avoir des conséquences biologiques totalement opposées. Il reste à élucider, les mécanismes d'intégration du signal qui déterminent le choix entre la survie et la mort.

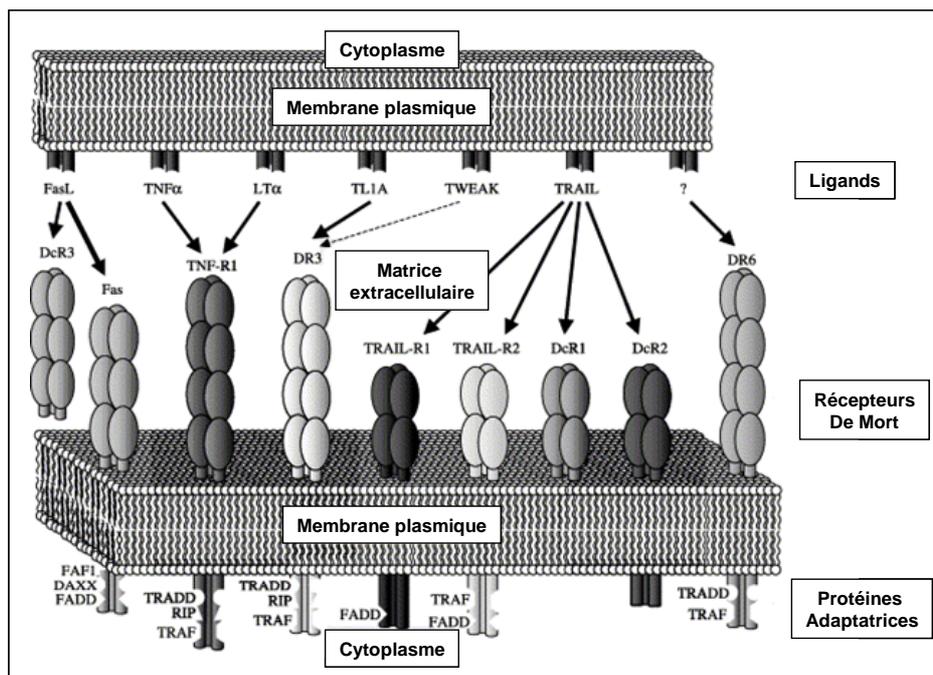


Figure 10: Membres de la famille des Récepteurs de Mort. (D'après (Curtin and Cotter, 2003))

Les récepteurs à domaine de mort cellulaire font partie des membres de la superfamille des TNF-R. Ce sont des protéines transmembranaires de type 1 possédant des homologies au niveau de leur domaine extracellulaire qui peut être composé de une à six régions répétitives riches en cystéines impliquées dans la liaison du ligand. Ils peuvent promouvoir, selon le contexte cellulaire soit la survie, soit la mort soit les deux. Ainsi, les récepteurs CD27 (Camerini et al., 1991), CD30 (Durkop et al., 1992), CD40 (Stamenkovic et al., 1989), TNF-

RII (Smith et al., 1990), Ox40 (Mallett et al., 1990), et p75 NGFR (Nerve Growth Factor Receptor) (Johnson et al., 1986) sont généralement impliqués dans la survie cellulaire. A l'inverse, FAS (CD95/APO-1) (Itoh et al., 1991; Oehm et al., 1992), TNF-RI (Loetscher et al., 1990; Schall et al., 1990), DR3 (Chinnaiyan et al., 1996), DR4 (TRAIL-R1) et DR5 (TRAIL-R2) (Chaudhary et al., 1997) et DR6 (Pan et al., 1998a) sont généralement impliqués dans la mort cellulaire (Figure 10).

Certains de ces TNF-R possèdent dans leur portion intracellulaire une région hautement conservée appelée « domaine de mort » (DD), composé d'un motif protéique d'environ 80 aa nécessaire à la transmission du signal de mort par ces récepteurs (Chaudhary et al., 1997; Nagata and Golstein, 1995; Tartaglia et al., 1993). Ce domaine DD a été conservé au cours de l'évolution et est retrouvé dans le produit du gène *reaper* présent chez la drosophile. Le produit de ce gène est impliqué dans la régulation de l'apoptose au cours de l'embryogenèse (Golstein et al., 1995). On connaît actuellement 7 de ces récepteurs: Fas (CD95/APO-1), TNFR1 (p55/CD120a), DR3, DR6, p75 NGFR, ainsi que les deux récepteurs du ligand de Apo-2 ou TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand), les molécules DR4 (TRAIL-R1) et DR5 (TRAIL-R2) (Locksley et al., 2001) (Figure 10). La capacité d'induction de mort cellulaire relayée par le récepteur Fas est parmi toutes ces voies de signalisation la plus étudiée et décrite.

De façon générale, les voies de signalisation apoptotique des récepteurs à domaine de mort de la superfamille des TNF-R conduisent à l'activation des caspases et en sont directement dépendantes (Enari et al., 1995; Longthorne and Williams, 1997). Ces récepteurs à domaine de mort sont activés par la fixation de leur ligand et vont recruter des protéines intracellulaires dites adaptatrices. Ces protéines vont alors à leur tour recruter les caspases initiatrices (principalement la caspase-8 et la caspase-10) et induire leur activation par auto-clivage. De ce fait, il semble que la voie Fas qui est décrite dans le chapitre suivant corresponde au processus généralement observé.

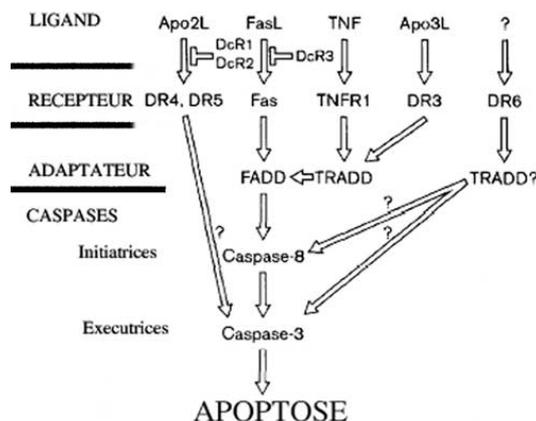


Figure 11 : Voies de signalisation apoptotique des récepteurs de mort et de leurs ligands (d'après (Ashkenazi and Dixit, 1999)).

Cependant, il existe un autre sous-groupe de récepteurs homologues au TNF-R : les decoy récepteurs (DcR). On distingue actuellement le DcR1 (Sheridan et al., 1997) et le DcR2 (Marsters et al., 1997) qui sont des récepteurs membranaires ; et le DcR3 (Pitti et al., 1998) qui est une protéine soluble sécrétée (Figure 10).

Ces récepteurs auraient un rôle d'inhibiteur des récepteurs à domaine de mort plutôt qu'un rôle de transduction d'un signal. En effet, les domaines extracellulaires de DcR1 et DcR2 sont tous les deux capables de fixer TRAIL et sont ainsi en compétition avec DR4 et DR5. Cependant, DcR1 ne possède pas de région cytoplasmique, et celle de DcR2 plus courte qu'un domaine de mort typique, ne permet pas la transmission d'un signal apoptotique. DcR3 présente 4 domaines riches en cystéine et est une protéine soluble qui peut se fixer à FasL avec la même affinité que Fas (Figure 11). De ce fait, DcR3 inhiberait par compétition de fixation avec Fas, l'apoptose induite par FasL mais son rôle physiologique n'est pas encore clairement établi (Schmitz et al., 2000).

III.5- Inhibiteurs de l'apoptose

Les virus ont développé diverses stratégies très efficaces afin d'inhiber la mort cellulaire et la libération de cytokines pro-inflammatoires par les cellules infectées dans le but d'achever son cycle de réplication et ainsi d'infecter de nouvelles cellules. À ce jour, de nombreuses molécules virales, mais aussi cellulaires animales et même végétales (Thatte et al., 2000), ont été décrites comme ayant une activité inhibitrice de l'apoptose.

III.5.1- Les protéines c-FLIP

Les récepteurs à domaine de mort décrits précédemment vont après leur activation, recruter des protéines adaptatrices qui vont à leur tour activer les caspases initiatrices. Cette étape de recrutement peut être régulée par une protéine appelée c-FLIP (cellular FLICE Inhibitory Protein) (Irmiler et al., 1997b). c-FLIP, contenant des domaines effecteur de mort cellulaire (Rodriguez et al.), agit en tant que régulateur majeur de l'apoptose, et peut commuter des signaux de vie ou de mort dans les cellules tumorales (Tucker et al., 2004).

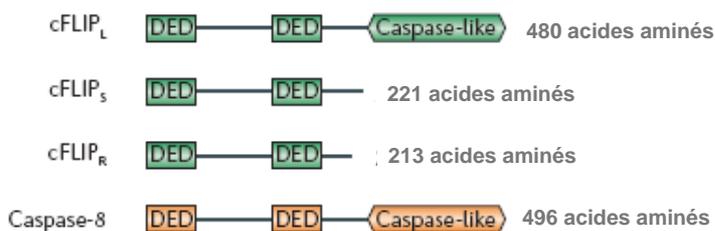


Figure 12 : Structure des différentes isoformes de c-FLIP. (D'après (Budd et al., 2006))

Bien que plus de 10 isoformes d'ARNm de c-FLIP ait été décrites (Komiyama et al., 1994), seulement deux d'entre elles ont été bien étudiées au niveau protéique. Ainsi, ces deux isoformes sont c-FLIP_L (c-FLIP long), de 55 kDa et composée de 480 aa, et c-FLIP_S (c-FLIP short ou court) de 28 kDa et composé de 221 aa (Figure 12). Les protéines c-FLIP contiennent deux domaines DED dans la partie N-terminale qui vont lui permettre de se lier aux prodomaines des caspases-8 ou -10 et ainsi empêcher leur recrutement complet aux récepteurs à domaine de mort (notamment Fas et TNF-RI) (Bump et al., 1995) (Figure 13). c-FLIP_L possède en plus des deux DEDs, un domaine C-terminal homologue au domaine catalytique de la caspase-8, mais ne possédant pas d'activité enzymatique. c-FLIP_S pour sa part, ne présente que les deux DEDs (Figure 12).

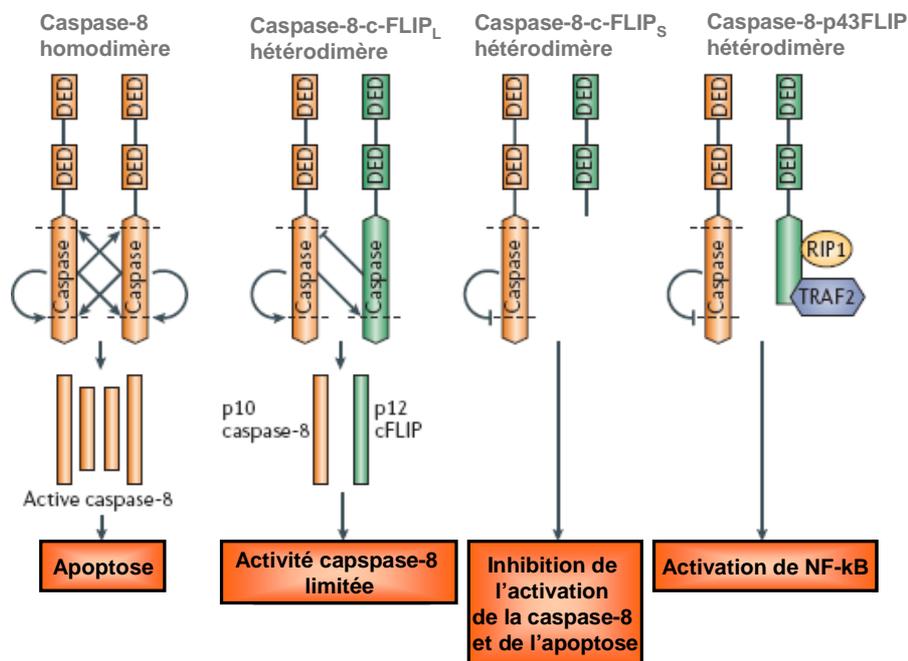


Figure 13 : Les isoformes de c-FLIP modulent l'activation de la caspase-8. (D'après (Budd et al., 2006)).

Cette famille d'inhibiteurs de caspases a été identifiée à l'origine chez le virus de l'herpès HHV8 et le virus molluscipox (Bertin et al., 1997; Thome et al., 1997). c-FLIP a été décrit comme pouvant protéger de l'apoptose (Hu et al., 1997; Irmeler et al., 1997b; Rasper et al., 1998; Srinivasula et al., 1997) ou induire l'apoptose (Han et al., 1997; Inohara et al., 1997; Shu et al., 1997) selon la nature du transcrite et le type cellulaire considéré. Cependant, dans des conditions physiologiques, c-FLIP semble fonctionner comme un inhibiteur de la procaspase-8. Il a été montré que la sensibilité des lymphocytes T à l'apoptose induite par Fas était corrélée avec la diminution du taux d'ARNm de c-FLIP (Lens et al., 2002; Thome and Tschopp, 2001). L'expression de c-FLIP est augmentée dans quelques tumeurs humaines, et

la surexpression de c-FLIP dans les cellules tumorales a pour conséquence leur échappement à l'immunité des lymphocytes T (Dutton et al., 2006). De plus, par cDNA microarrays, il a été montré, dans des lignées de lymphomes de Burkitt (BL), transfectées par la protéine majeure transformante de l'EBV, LMP1, ou dans des lignées lymphoblastoïdes (LCLs) EBV positives, une surexpression des transcrits codant c-FLIP (Cahir-McFarland et al., 2004).

En définitive, il apparaît que le rôle de c-FLIP dans la modulation de l'apoptose semble très complexe. Son effet semble dépendre de la nature du transcrit, du type cellulaire considéré, ainsi que du niveau d'expression de chacune des isoformes mais son effet généralement reconnu est celui d'inhibiteur de la caspase-8. Dans la voie apoptotique Fas, c-FLIP agit en tant que régulateur majeur de l'apoptose, pouvant commuter des signaux de vie ou de mort dans les cellules tumorales (Tucker et al., 2004). c-FLIP_L et c-FLIP_S peuvent être recrutées dans le DISC se fixant au complexe Fas-FADD et empêchant le recrutement complet de la procaspase-8 dans celui-ci, inhibant l'apoptose induite par les récepteurs à domaine de mort (Kataoka, 2005).

III.5.2 Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP)

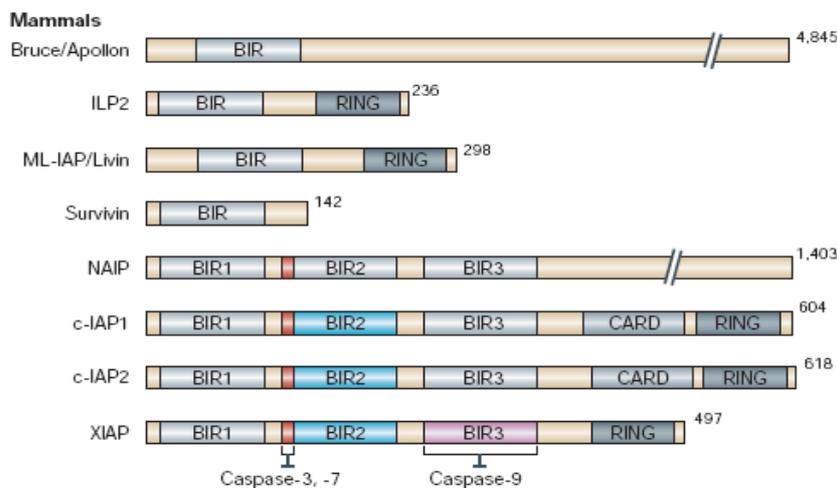


Figure 14 : Structure des protéines inhibitrices IAPs. (D'après (Riedl and Shi, 2004)).

Cette famille regroupe huit membres chez l'homme : NAIP (Neuronal IAP), c-IAP1, c-IAP2, XIAP (X-linked IAP), survivin, Bruce/Apollon (Hauser et al., 1998; Tamm et al., 1998) et KIAP (Lin et al., 2000), ML-IAP (melanoma IAP)/Livin, ILP2 (IAP-like protein 2) (Figure 14). Les protéines inhibitrices IAPs protègent de l'apoptose en bloquant l'activité des caspases, sans être clivées (Roy et al., 1997). XIAP, c-IAP1 et c-IAP2 inhibent les caspases-3, -7 et -9 (Shi, 2002), mais pas les caspases-1, -6 et -8 (Deveraux et al., 1998) (Figure 21). La sélectivité de ces molécules suggère qu'elles bloquent certaines voies apoptotiques et pas d'autres. Par exemple, XIAP se lie à la caspase-9 (activée) et inhibe son activité catalytique (Deveraux et al., 1998) (Figure 21). XIAP possède deux domaines importants (Figure 14):

- Le domaine BIR (Baculovirus IAP Repeats), permettant la liaison à la caspase-9, l'inhibant;
- Le domaine RING, qui favorise l'ubiquitination et donc la dégradation par le protéasome de XIAP et peut-être également celle de la caspase qui lui est associée.

Bien qu'il ait été montré que certaines IAPs se comportent comme des inhibiteurs compétitifs de caspases, il semble que la plupart s'associent aussi au prodomaine des caspases initiatrices pour les séquestrer et empêcher leur activation (Meier et al., 2000). La question de la fonction des IAPs restent cependant ouverte car une étude suggère que c-IAP1 serait capable de réguler le taux de protéine TRAF2 en fonction du taux d'occupation du TNF-RII (Li et al., 2002). Dans ce système, c-IAP1 serait une ubiquitine ligase qui, de manière paradoxale, exercerait une activité pro-apoptotique dans la voie du TNF-R. XIAP est elle-même inhibée par une autre protéine : Smac/DIABLO, qui étant mitochondriale, est libérée dans le cytosol en même temps que le cytochrome c au cours de la réponse apoptotique. (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000).

La protéine survivine a un profil d'expression particulière car on ne l'a retrouve que dans les tissus foetaux et dans les tumeurs (Adida et al., 1998; Ambrosini et al., 1997). Elle a été détectée dans tous les types de cancers, avec cependant des niveaux d'expression plus élevés dans les cancers du sein et du poumon (Tamm et al., 1998). Son expression va être retrouvée dans les lignées tumorales et les cancers les plus courants, ainsi que dans 50% des lymphomes de Hodgkin (Ambrosini et al., 1997). Cette protéine constitue à ce titre une cible très intéressante pour de nouvelles stratégies anticancéreuses. La survivine est importante pour la mitose et la progression du cycle cellulaire (Suzuki et al., 2000), avec une expression maximale dans la phase G2/M. Elle est physiquement associée aux microtubules mitotiques et contrôle la progression de la mitose (Li et al., 1998). La survivine peut contrecarrer l'apoptose induite par différents stimuli, et peut inhiber l'activité protéolytique *in vitro* en agissant directement sur les caspases-3 et -7 (LaCasse et al., 1998; Lu et al., 1998; Shin et al., 2001).

Certains travaux ont montré une relation entre l'EBV et l'expression forte de la survivine. Ces travaux ont mis en évidence l'implication de la protéine LMP1 de l'EBV dans le déclenchement de l'expression de la survivine dans les cellules de carcinome du nasopharynx (CNP) (Faqing et al., 2005). Ces auteurs ont démontré que LMP1 peut déclencher la translocation nucléaire de la survivine, permettant le passage des cellules en phase S du cycle cellulaire et aboutissant à la prolifération cellulaire (Faqing et al., 2005). LMP1 peut donc favoriser la prolifération cellulaire et empêcher l'apoptose par l'intermédiaire de la voie de signalisation de la survivine (Faqing et al., 2005).

Partie 2 : Le récepteur FAS/CD95

Les travaux de l'équipe de Yonehara et al (1989) ont montré qu'un anticorps monoclonal de classe IgM pouvait tuer plusieurs lignées cellulaires humaines. La protéine de surface de ces cellules, identifiée par cet anticorps, a été nommée FAS (antigène de surface associé aux cellules FS7) (Yonehara et al., 1989). En juillet de la même année, Peter H. Krammer et ses associés ont rapporté qu'un anticorps monoclonal de souris, appelé anticorps anti-APO-1, favorisait l'apoptose de cellules leucémiques humaines et activait des lymphocytes (Trauth et al., 1989). Deux ans après, Nagata et al ont réussi à cloner cette protéine membranaire identifiée par cet anticorps, induisant la mort cellulaire et reconnaissant l'antigène FAS (Itoh et al., 1991). Cet antigène FAS s'est avéré être identique à la protéine APO-1 identifiée plus tard dans le groupe de Krammer (Oehm et al., 1992). Puis, le groupe de Nagata a cloné le ligand physiologique correspondant au récepteur à domaine de mort Fas, FasL (Suda et al., 1993), qui appartient à la famille du TNF. FasL peut être présent sous forme, soit membranaire (40 kDa) ou soit soluble (26 kDa) (Nagata, 1997). Les résultats suivants ont identifié le système de Fas/FasL comme le principal régulateur de l'apoptose initiée à la membrane des cellules de mammifères par une interaction récepteur/ligand.

I. Structure de la protéine FAS

Le récepteur à domaine de mort cellulaire FAS appelé aussi (CD95/APO-1) est l'un des nombreux membres de la superfamille des récepteurs au TNF/NGF, famille caractérisée par la présence de 2 à 5 domaines riches en cystéines situés dans la partie extracellulaire du récepteur (Figure 10). Le récepteur pro-apoptotique Fas est le mieux décrit des récepteurs à domaine de mort, qui sont également caractérisés par la présence d'un domaine de mort DD (Death Domain) intracellulaire crucial dans l'induction du signal pro-apoptotique.

Fas est une protéine de 319 aa et d'un PM compris entre 45 et 52 kDa (Oehm et al., 1992) en fonction des études réalisées, probablement en raison de différences de glycosylation du récepteur (Keppler et al., 1999). Ce récepteur transmembranaire de type I sous sa forme mature de 48 kDa, comporte un simple domaine transmembranaire de 17 aa (Leu 158 à Val 174), d'un domaine N-terminal extracellulaire riche en cystéines de 156 aa, comportant 18 résidus cystéines, et d'un domaine C-terminal cytoplasmique de 145 aa contenant de façon relativement abondante des acides aminés chargés (28 aa basiques et 20 aa acides) (Figure 15).

La partie cytoplasmique de Fas contient un domaine de 85 aa appelé domaine de mort (DD), qui joue un rôle majeur dans la transmission du signal de mort provenant de la surface cellulaire et se dirigeant vers des voies de signalisation intracellulaire (Nagata, 1997) (Figure 15). De plus, il existe des formes solubles du récepteur, générées par épissage alternatif au niveau du domaine transmembranaire. Ces formes solubles contribuent à la régulation de l'apoptose induite par FasL (Cheng et al., 1994; Papoff et al., 1999).

1.1- Partie extracellulaire

La partie extracellulaire de Fas est constituée des 156 premiers aa de l'extrémité N-terminale, et est caractérisée par la présence de 3 domaines riches en cystéines (CRD pour « Cystein-Rich Domain ») comprenant les aa 28 à 65 pour CRD1, les aa 65 à 112 pour CRD2 et enfin les aa 112 à 149 pour CRD3 (Figure 15). Certains travaux, réalisés à partir de récepteur Fas tronqué dans la partie extracellulaire, ont montré que les deux domaines les plus proches de la partie transmembranaire, CRD2 et CRD3, correspondent à la zone de fixation du ligand de Fas ou LBD (Ligand Binding Domain). Le domaine CRD1 est la zone d'oligomérisation indépendante du ligand du récepteur, et est indispensable à la transduction du signal apoptotique de Fas (Papoff et al., 1999). Cette oligomérisation indépendante du ligand est liée à la présence d'un domaine d'auto-association indépendante du ligand ou « PLAD » (Pre-Ligand Association Domain) correspondant au 65 premiers aa du récepteur Fas (Siegel et al., 2000) (Figure 15).

Fas est exprimé sur la surface cellulaire sous forme d'homotrimères préassociés permettant par la suite la fixation des homotrimères de FasL. (Papoff et al., 1999; Siegel et al., 2000) (Figure 18). Une association similaire a été décrite pour les autres membres de la superfamille des TNFR comme le TNFRI, le CD40 et le TRAIL-R1 (Chan et al., 2000).

1.2- Partie intracellulaire

La partie intracellulaire de Fas ne contient aucune séquence consensus pouvant nous prédire la présence d'une activité enzymatique (Sartorius et al., 2001). Les 15 derniers aa de la partie C-terminale de Fas servent de zone d'interaction avec la protéine tyrosine phosphatase FAP1 (Fas-Associated Phosphatase 1), et leur délétion entraîne une augmentation de l'apoptose transmise par Fas (Sato et al., 1995). Tartaglia et al. ont défini en 1993, par délétion et mutagenèse dirigée, une région de 80 aa au niveau du TNF-R1 indispensable à la transmission du signal de mort cellulaire. Itoh et al. (1993) ont montré qu'une zone de 68 aa

hautement conservée entre Fas et le TNF-R1 correspond au domaine de mort de Fas, allant de l'aa 214 à 298 (Figure 15). Ce domaine comprend notamment le résidu Valine 238 dont la mutation chez les souris *lpr^{cg}* abolit le signal apoptotique. En effet, ces souris portant les mutations (*lpr*) (Ile-225 à Asn-225) dans la région cytoplasmique de l'antigène murin Fas, sont caractérisées par une déficience de l'antigène Fas entraînant des syndromes lymphoprolifératifs avec lymphoadénopathies et des maladies auto-immunes, comme par exemple le lupus érythémateux (Watanabe-Fukunaga et al., 1992). La mutation ponctuelle correspondante au remplacement de la Valine 238 en Asparagine, provoque l'inhibition de l'apoptose, par l'inhibition irréversible de l'association des domaines de mort de Fas et de l'interaction avec FADD (Huang et al., 1996), suggérant que cette mutation ponctuelle entraînerait une altération de structure des domaines de mort.

A la différence des régions intracellulaires appartenant à d'autres récepteurs transmembranaires impliqués dans la transduction du signal, le domaine de mort ne possède pas d'activité enzymatique, mais propage son signal par des interactions protéine-protéine. Le domaine de mort a la propriété de s'auto-associer et de former des agrégats de grande taille en solution (Huang et al., 1996).

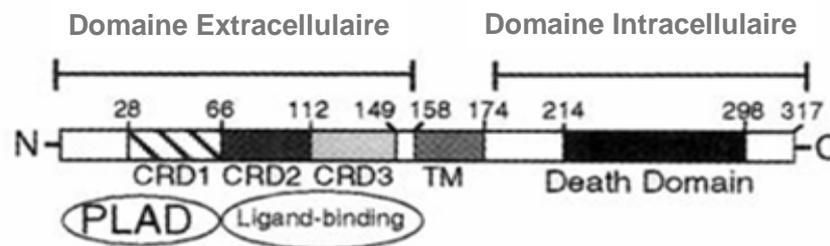


Figure 15 : Domaines protéiques du récepteur Fas.

La structure tertiaire du domaine de mort de Fas, révélée par spectroscopie NMR (Huang et al., 1996), consiste en 6 hélices α amphipatiques et antiparallèles (Figure 16). Les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont centrales et sont flanquées sur chaque face par les hélices $\alpha 3/\alpha 4$ et les hélices $\alpha 5/\alpha 6$ (Huang et al., 1996). La typologie correspondante est peu commune avec les boucles reliant les hélices $\alpha 1/\alpha 2$ et les hélices $\alpha 4/\alpha 5$ l'une au dessus de l'autre (Huang et al., 1996). La présence d'un grand nombre d'acides aminés chargés à la surface des domaines de mort est probablement responsable des interactions entre ces domaines de mort.

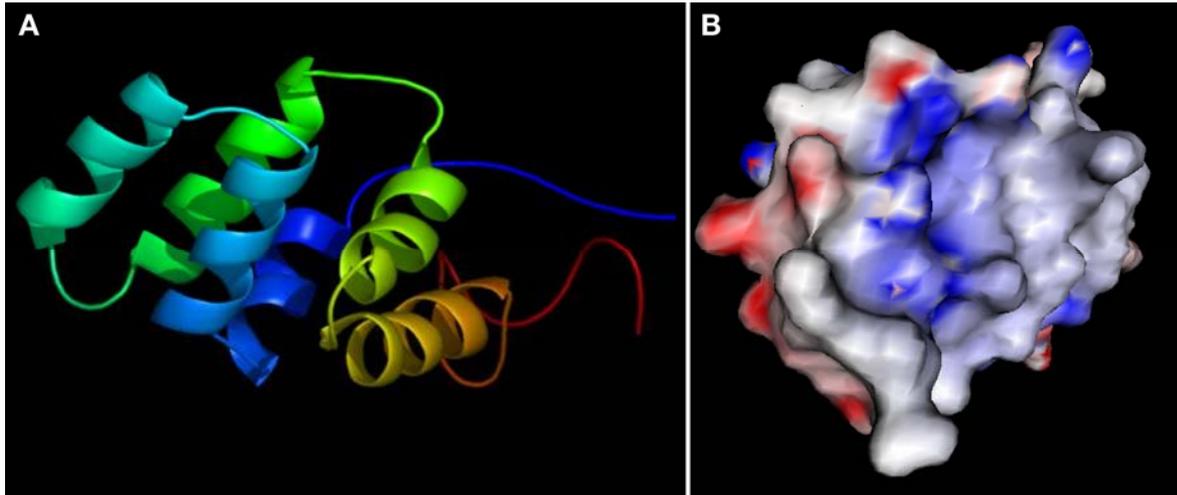


Figure 16 : Structure des domaines de mort (DD) de Fas/CD95. (A) Représentation en ruban de la structure tridimensionnelle du DD de FAS. (B) Représentation pleine des DD. Les résidus d'acides aminés acides sont colorés en rouge et les résidus basiques en bleu. (D'après (Reed et al., 2004))

II. Voies de l'apoptose induite par FAS

Initialement, il avait été supposé que FasL sous forme homotrimerique (composé de trois monomères identiques) ou un anticorps anti-Fas agoniste engageaient trois monomères de Fas, conduisant ainsi à l'assemblage d'un récepteur trimérique et à l'agrégation des domaines de mort sous la membrane (Orlinick et al., 1997).

Par la suite, des travaux ont montré que non seulement Fas possédait la capacité de s'assembler en trimères au niveau de la région PLAD (Pre-Ligand Association Domain), mais que cette trimérisation était indépendante de l'engagement de FasL (Figure 18). Ces résultats ont montré que ce pré-assemblage des monomères en trimères était un pré-requis à la liaison de FasL et donc à la transmission du signal de mort (Papoff et al., 1999; Siegel et al., 2000). Ainsi, indépendamment de la présence d'un ligand, des trimères et des monomères de Fas co-existent dans la membrane plasmique.

II.1- Voies apoptotiques et Transduction du signal

II.1.1- Formation du complexe de signalisation de mort induite (DISC)

La cascade d'activation de l'apoptose induite par Fas est la plus connue (Peter and Krammer, 1998), ce d'autant qu'elle joue un rôle important dans le système immunitaire (Krammer, 2000). Comme Fas ne contient aucune activité enzymatique propre, le signal de

mort doit être transmis par l'intermédiaire de protéines s'associant à celui-ci après sa stimulation. La transmission de ce signal apoptotique passe alors par la formation d'un complexe multiprotéique formé par l'agrégation des récepteurs Fas, la protéine FADD (Fas-Associated Death Domain) et la procaspase-8. Ce complexe est nommé « complexe de signalisation de la mort induite » ou DISC (Death Inducing Signaling Complex) (Kischkel et al., 1995) (Figure 17). La liaison des homotrimères de Fas à FasL a pour conséquence l'agrégation des trimères du récepteur (Chan et al., 2000; Papoff et al., 1999; Siegel et al., 2000), provoquant un changement de conformation de celui-ci, fixant alors au niveau de sa partie cytoplasmique, la protéine adaptatrice FADD (Chinnaiyan et al., 1995) (Figure 18). La protéine FADD a été identifiée par Kischkel et al. en 1995, et possède un domaine de mort homologue DD à celui de Fas permettant son association avec celui-ci (Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995). De plus, elle comporte à son autre extrémité N-terminale un domaine effecteur de mort ou DED (Death Effector Domain) qui est indispensable au recrutement et à l'activation de la caspase-8 (Boldin et al., 1996). De ce fait, un mutant FADD possédant son domaine DED tronqué et son domaine DD non muté ne peut induire l'activation de l'apoptose (Chinnaiyan et al., 1996).

La fixation de FADD se produisant par interaction des deux DD de Fas avec celui de FADD, il peut y avoir ensuite, recrutement au niveau du récepteur de plusieurs procaspases-8 ou -10, par l'intermédiaire de liaison des domaines homologues DED-DED de FADD avec ces différentes caspases, aboutissant alors à la formation du DISC (Figure 17).

Les travaux de Muzio et al. (1996) ont montré la présence des formes zymogènes et activées de la caspase-8 dans le DISC, reliant ainsi directement Fas à la cascade des caspases (Muzio et al., 1996). Après activation du récepteur Fas, FADD et la procaspase-8 sont recrutés et la formation d'oligomères de procaspase-8 suffit à activer son auto-protéolyse, libérant ainsi la sous-unité catalytique de la caspase-8 dans le cytoplasme (Ashkenazi and Dixit, 1998; Martin et al., 1998; Salvesen and Dixit, 1999) (Figure 17). Les caspases-8 activées initient alors la cascade des caspases responsables de l'exécution du programme de mort cellulaire, conduisant de façon inéluctable à la mort apoptotique des cellules (Slee et al., 1999). Il est à noter que la caspase-8 est essentielle à la mort cellulaire induite par Fas (Varfolomeev et al., 1998).

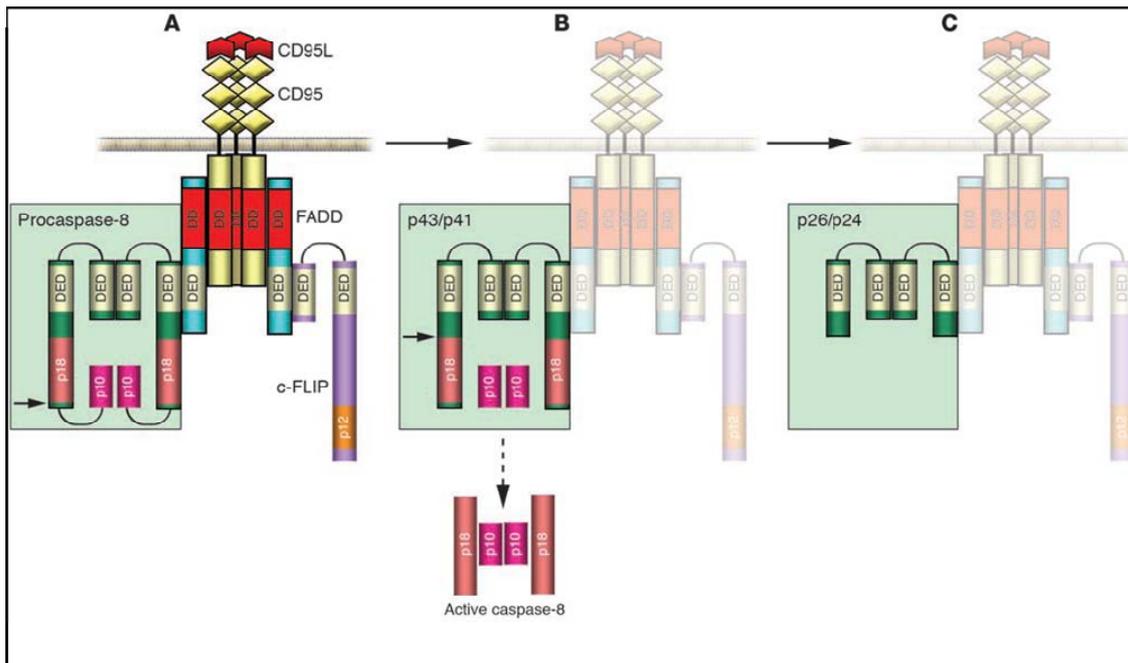


Figure 17 : Schéma du clivage de la procaspase-8 sur le DISC de FAS.

La formation du DISC est déclenchée par la fixation de FasL (en rouge) sur la partie extracellulaire de FAS, suivie de l'oligomérisation du récepteur. FADD/MORT1 est recruté dans le DISC par des interactions des domaines DD (en rouge); les procaspase-8 et -10 aussi bien que la protéine c-FLIP sont recrutées dans le DISC par des interactions de DED homophiliques (jaune). Après le recrutement dans le DISC, la procaspase-8 se dimérise (en vert). (A) La première étape du clivage de la procaspase-8 se produit entre 2 sous-unités de la protéase. Le site de clivage est indiqué par une flèche noire. Après le premier clivage, la sous-unité p10 est formée. Celle-ci n'est pas libérée dans le cytosol, mais reste liée au DISC, elle est impliquée dans les interactions avec les grandes sous-unités p20. (B) La deuxième étape du clivage a lieu entre le prodomaine et la grande sous-unité au niveau de l'Asp216. Après ce deuxième clivage, l'hétérotétramère de la caspase-8 active est formé, et est alors libéré dans le cytosol. (C) Le prodomaine p26/p24 reste fixé au DISC. (D'après (Lavrik et al., 2005)).

Les travaux de Algeciras-Schimmich et al. (2002) ont permis de mieux définir l'ordre de la signalisation initiale de la voie Fas. Ainsi, il a été montré que la fixation de FasL sur son récepteur induit la formation de microagrégats de Fas, permettant alors la formation du DISC. Cette dernière fait intervenir les filaments d'actine (Algeciras-Schimmich et al., 2002). Il se produit alors une activation de la caspase-8 mais avec trop peu d'efficacité pour induire la transduction d'un signal apoptotique (Algeciras-Schimmich et al., 2002). Cependant, cette activation permet la formation à la surface cellulaire de larges regroupements membranaires de protéines Fas, faisant intervenir la voie des sphingomyélinases (Gulbins and Grassme, 2002). Ces regroupements membranaires vont permettre d'augmenter le signal transmis et l'activation de la caspase-8, afin d'induire efficacement le signal apoptotique. Le complexe Fas/FasL serait alors internalisé, grâce à la formation de vésicules d'endocytose par un processus encore mal défini (Figure 18).

Ainsi, l'ordre des événements initiaux dans la voie physiologique médiée par Fas après la fixation de FasL inclus 4 étapes (les étapes II à V décrites dans la Figure 18) (Algeciras-Schimmich et al., 2002) :

- La fixation de FasL sur son récepteur induit la formation de microagrégats de Fas sur la surface cellulaire.
- Le recrutement de FADD pour former le complexe DISC dépendant des filaments d'actine.
- La formation de grands agrégats de Fas régulés positivement par la caspase-8 générée par le DISC.
- L'internalisation de Fas activé dépendante des filaments d'actine dans des endosomes.

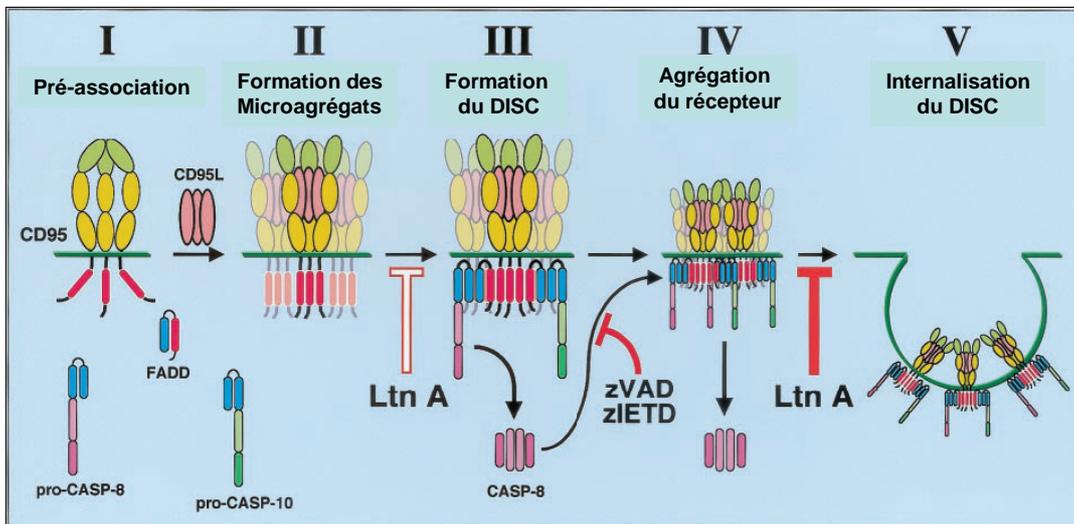


Figure 18: Les événements membranaires proximaux de la signalisation Fas. La phase de déclenchement du signal Fas peut être subdivisée en cinq étapes distinctes. (I) pré-association de Fas indépendamment de FasL. (II) Formation des microagrégats. (III) Formation du DISC, dépendante des filaments d'actine, puisqu'elle peut être bloquée par la lacruntiline A (Ltn A). Les composants du DISC sont FADD/Mort1, la procaspase-8, la procaspase-10, et c-FLIP (non montré). Regroupement ou agrégation de Fas, dépendant de la génération de la caspase 8 activée par le DISC. Cette étape peut être efficacement inhibée en pré-incubant les cellules avec le zVAD-fmk ou le zIETD-fmk. L'activation de la caspase 8 fait donc partie d'une boucle de rétroaction positive. (V) Internalisation du DISC, dépendante encore de l'actine, puisque le traitement des cellules avec la Ltn A empêche l'internalisation du récepteur agrégé. La Ltn A n'affecte pas les cellules de type II, indiquant que les étapes dépendantes de l'actine sont réduites ou absentes, expliquant pourquoi dans les cellules de type II le DISC formé est très petit. DED : Domaines bleus ; DD : Domaine rouge. Le domaine N-terminal PLAD de Fas est représenté en vert plus nuancé.

II.1.2- Rôle de la voie mitochondriale : cellules de type I et de type II

L'importance de la voie mitochondriale a été très largement démontrée dans la mort induite par Fas, au moins dans certaines cellules (Fulda et al., 1998). En fait, selon l'utilisation de l'une de ces voies apoptotiques en aval de Fas, deux types de cellules ont pu être définies (Barnhart et al., 2003; Scaffidi et al., 1998) (Figure 19).

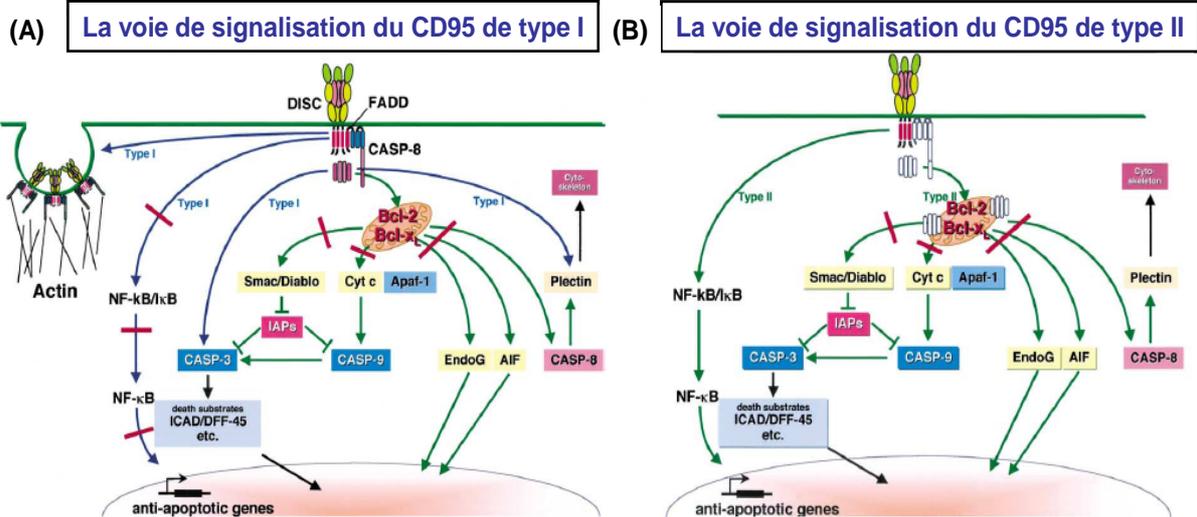


Figure 19 : Le modèle des deux voies de la signalisation Fas.

(A) La voie de signalisation de type I. Fas est sous forme homotrimérique avec FasL. De grandes quantités de caspase-8 sont activées par la formation du DISC dans les cellules de type I. Cette grande quantité de caspase-8 peut cliver directement plusieurs substrats, comme la caspase-3 et la plectine, elle peut aussi activer la fonction apoptotique des mitochondries. Le blocage de la fonction apoptotique mitochondriale par Bcl-2 ou Bcl-XL (les barres rouges indiquent l'inhibition d'une voie) ne peut empêcher l'apoptose dans ces cellules, car la caspase est activée directement, aboutissant à l'apoptose. L'activation de NF-κB par Fas est inhibée par le clivage des protéines clés de la voie NF-κB dans ces cellules. L'internalisation de Fas dépendante de l'actine et de la caspase-8 activée se produit dans ces cellules, après regroupement de Fas. (B) La voie de signalisation de type II. Dans les cellules de type II, la fixation de FasL sur Fas conduit à la production faible de caspase-8 active, et à la formation d'un très petit et indétectable DISC. Ces cellules ont besoin d'une amplification du signal apoptotique, qui va initialiser la libération et l'activation d'un certain nombre de facteurs menant à l'activation de la caspase-9, puis de la caspase-3, aboutissant à l'apoptose. L'appel de ces cellules de la fonction apoptotique mitochondriale amplifiant le signal a comme conséquence un blocage de ce signal par l'expression de Bcl-2 ou de Bcl-XL. L'activation de la fonction apoptotique mitochondriale a également comme conséquence la libération de plusieurs autres facteurs pro-apoptotique comme AIF, EndoG, et Smac/Diablo. Les deux schémas montrent les voies cellulaires où il y a surexpression de Bcl-2 ou Bcl-XL. (Barnhart et al., 2003)

Dans les cellules de type I, l'induction de la voie apoptotique Fas est indépendante des mitochondries, résultant uniquement d'une activité directe des caspases. Dans ces cellules, la stimulation de Fas conduit en une fixation efficace de FADD, dépendante de l'actine et est suivie d'un recrutement très important de procaspases-8. Les caspases-8, ainsi générées activent ensuite directement les caspases-3 dites effectrices par clivage des procaspases-3 inactives, permettant le clivage de nombreux substrats cellulaires. Plus tardivement, les

récepteurs activés forment des agrégats qui seront par la suite internalisés (Algeciras-Schimmich et al., 2002) de façon dépendante de l'actine (Algeciras-Schimmich and Peter, 2003) (Figure 19).

Les cellules de type II sont dépendantes de l'activation de la voie apoptotique mitochondriale. Dans ces cellules, la formation du DISC, ne nécessitant pas l'actine est moins importante que dans les cellules de type I. De faibles quantités de caspases-8 actives sont produites, restant insuffisantes pour activer directement la caspase-3. Les cellules de type II nécessitent alors une amplification mitochondriale. Les caspases-8 sont capables de cliver la protéine Bid, membre de la famille Bcl-2, en une forme tronquée appelée tBid (Li et al., 1998; Luo et al., 1998). tBid alors activée, interagit avec Bax, membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 présent sous forme monomérique dans le cytosol, ou Bak ((Korsmeyer et al., 2000), revue, Figure 20) induisant l'oligomérisation de tBid et son intégration dans la membrane externe mitochondriale. Cette intégration de tBid dans la membrane mitochondriale entraîne l'ouverture de mégapores mitochondriaux provoquant la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial et la libération du cytochrome c dans le cytoplasme (Eskes et al., 2000). Ce relargage du cytochrome c dans le cytoplasme provoque la formation de l'apoptosome, activant par la suite la caspase-9, qui à son tour va activer la caspase-3.

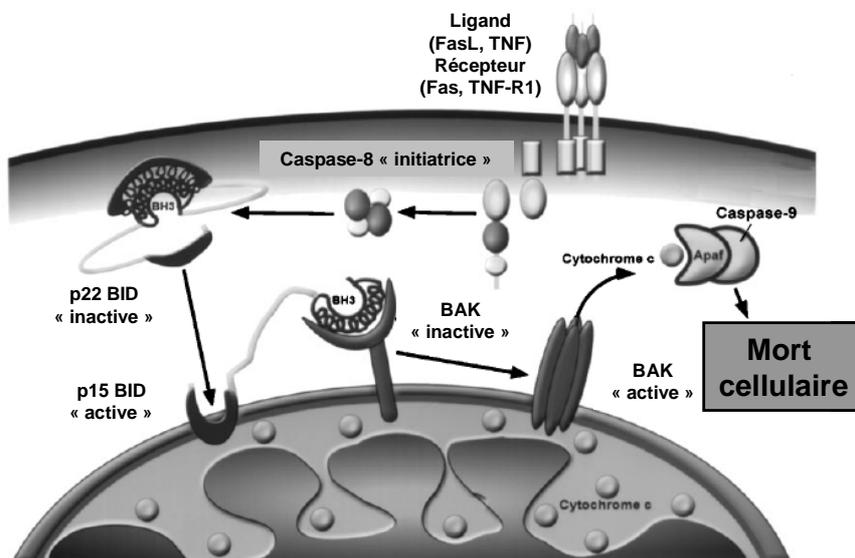


Figure 20 : Modèle schématique de la cascade d'activation pro-apoptotique.

Bid, une fois clivé en tBid active Bak intégrant la voie apoptotique des récepteurs à domaine de mort vers la mitochondrie permettant le relargage du cytochrome c (Korsmeyer et al., 2000).

Contrairement aux cellules de type I, cette voie nécessitant l'intervention de la mitochondrie, peut être inhibée par les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Une autre protéine régulatrice faisant la jonction entre les deux voies a été identifiée. Il s'agit de BAR (Bifunctional Apoptosis Regulator) (Zhang et al., 2000), possédant la capacité de s'associer à la fois aux molécules anti-apoptotiques Bcl-2/Bcl-xL (via un domaine

d'interaction protéine-protéine SAM (Sterile-Alpha Motif) et à la caspase-8 (via un domaine DED-like).

De ce fait, le rôle inhibiteur de Bcl-2 dans la mort induite par Fas dépend directement de l'identification des cellules de type I ou de type II. En effet, Bcl-2 ne joue aucun rôle dans la mort provoquée par Fas dans les cellules, au sein desquelles une activation directe des caspases est suffisante (type I). En revanche, dans des cellules pour lesquelles une amplification du signal d'activation via la voie mitochondriale (type II) est nécessaire, la mort induite par Fas serait modulée par les protéines de la famille Bcl-2.

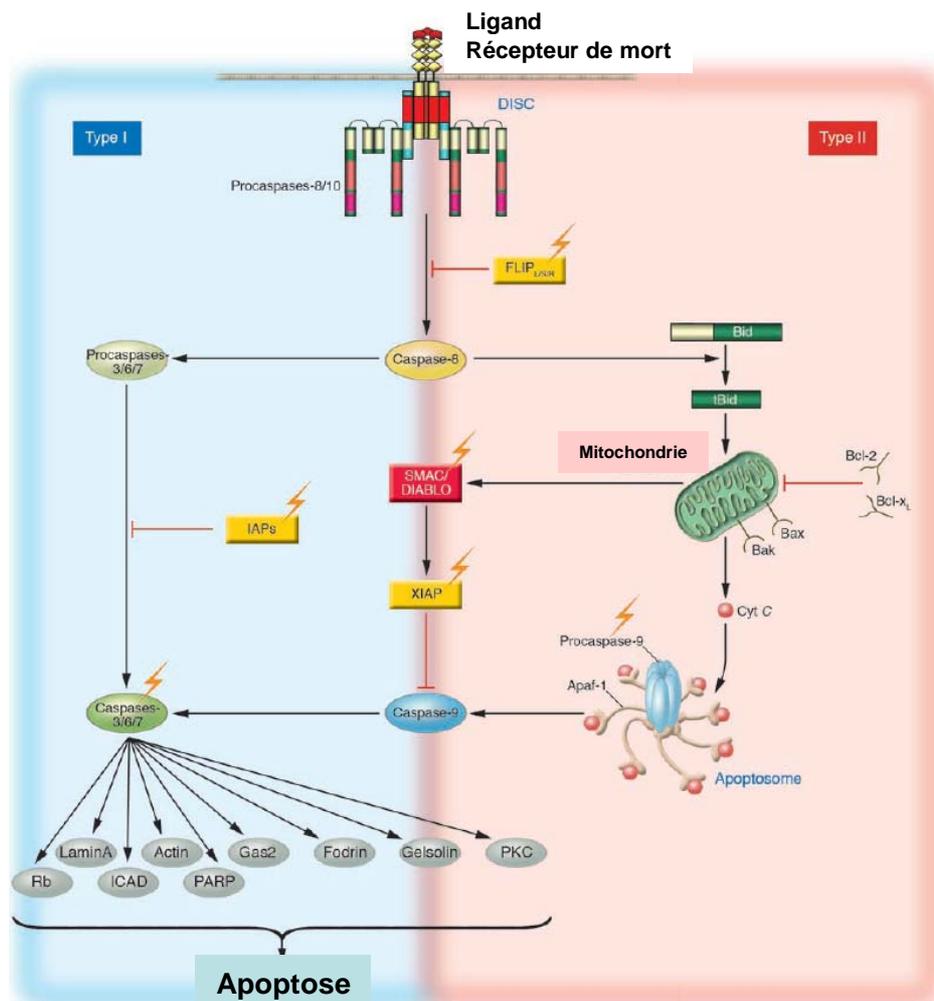


Figure 21 : La signalisation des caspases et sa modulation. Dans la voie extrinsèque, la formation du DISC mène à l'activation de la caspase-8. Deux voies de signalisation en aval du récepteur ont été établies. Dans les cellules de type I (en bleu), la caspase-8 clive directement la caspase-3, qui commence la cascade de l'apoptose. Dans les cellules de type II (en rouge), une boucle supplémentaire d'amplification est exigée, impliquant le relarguage du cytochrome c des mitochondries induit par tBid, suivi de la formation de l'apoptosome. Le déclenchement de la voie intrinsèque, a comme conséquence la formation de l'apoptosome induite par la mitochondrie, suivie de l'activation des caspases-9 et -3, aboutissant à la destruction de la cellule. L'activité des caspases peut être modulée à plusieurs niveaux. L'activation des caspases par le DISC est inhibée par c-FLIP ; l'activation des caspases effectrices est inhibée par les IAPs (voir le texte). Les caspases effectrices sont montrés en vert ; les inhibiteurs cellulaires des caspases sont présentés en jaune (Lavrik et al., 2005).

II.1.3- Agrégation de Fas dans les lipid rafts et internalisation de Fas

Le processus d'agrégation de Fas induit après stimulation par FasL est maintenant bien décrit (Algeciras-Schimnich et al., 2002; Cremesti et al., 2001; Grassme et al., 2003; Grassme et al., 2001). La stimulation de Fas par FasL soluble ou par un anticorps agoniste provoque l'agrégation du récepteur, puis son internalisation par la voie des endosomes. Ce processus a été décrit dans de nombreuses lignées cellulaires y compris dans la lignée, MCF7, qui ne peut poursuivre le processus d'apoptose en raison de l'expression importante de la protéine Bcl-X_L connue pour ces effets anti-apoptotiques (Stegh et al., 2002) et de sa déficience en caspase 3. Ces phénomènes d'agrégation et d'internalisation sont dépendants du cytosquelette d'actine, de la structure intracellulaire dynamique, qui par son assemblage/désassemblage continu est sollicité pour transférer les protéines vers la membrane plasmique, afin de transmettre différents signaux intracellulaires (Mollinedo and Gajate, 2003). En effet, le traitement des cellules avec la latrunculin A, inhibiteur de la formation et de la stabilité des filaments d'actine, bloque l'agrégation et l'internalisation de Fas (Figure 18 et 22). L'apoptose dépendante de Fas est alors totalement inhibée. Ces expériences prouvent donc l'implication directe du réseau des filaments d'actine dans l'induction de l'apoptose médié par Fas. Ces deux phénomènes sont totalement dépendants de l'activation des caspases, et principalement de la caspase-8 (Algeciras-Schimnich et al., 2002). Cette étude a été la première impliquant directement les caspases dans l'internalisation des récepteurs de surface.

Puisque l'agrégation de Fas implique directement le cytosquelette d'actine, il a été suggéré un lien direct entre la signalisation médiée par les radeaux lipidiques et l'interaction du cytosquelette d'actine (Harder and Simons, 1999). L'ezrine, protéine importante faisant partie des protéines d'ERM (Ezrin, Radixin, Moesin), liant le cytosquelette d'actine à la membrane cytoplasmique (Mangeat et al., 1999), interagit avec le récepteur Fas, provoquant sa polarisation membranaire à la surface cellulaire pendant l'apoptose médié par Fas dans les lymphocytes T humains (Fais et al., 2005; Parlato et al., 2000). De plus, les interférences avec le cytosquelette d'actine inhibent le regroupement de Fas et l'apoptose déclenchée par l'aplidine (Gajate and Mollinedo, 2005).

D'autres études ont montré la participation des céramides, libérés par la sphingomyélinase acide (SM), dans la formation des agrégats de Fas dans les radeaux lipidiques appelés « lipid rafts », provoquant par la suite l'apoptose. Ces céramides sont essentiels pour une plus efficace induction de la voie Fas. Cette signalisation est précédée du capping de Fas (Cremesti et al., 2001) (Figure 22).

En étudiant les mécanismes d'action de l'edelfosine (ET-18-OCH₃), drogue anti-tumorale, l'équipe de Gajate et al. a montré que cette drogue induisait une apoptose dépendante de Fas dans les cellules leucémiques. Cette apoptose est déclenchée par un mécanisme de translocation et d'agrégation de Fas dans ces lipid rafts, prouvant pour la première fois un recrutement de Fas dans les lipid rafts (Gajate and Mollinedo, 2001). Par microscopie confocale, ces auteurs ont montré une co-agrégation de Fas et des lipid rafts. En isolant par centrifugation à gradient de sucrose ces radeaux membranaires (Gajate and Mollinedo, 2001), ces auteurs ont constaté que Fas n'était pas constitutivement présent dans les microdomaines rafts, mais que Fas était transloqué dans ces derniers après traitement des cellules à l'edelfosine (Gajate and Mollinedo, 2001).

Les travaux de Algeciras-Schimmich et al., ont montré dans les cellules de type II que l'agrégation et l'internalisation de Fas dans les rafts n'étaient pas sollicitées pour induire l'apoptose (Algeciras-Schimmich et al., 2002). Par conséquent, il apparaît important que le type de signalisation apoptotique dépendante de Fas, type I ou type II, semble important dans le phénomène d'agrégation de Fas dans les rafts.

L'importance de ces lipid rafts dans l'apoptose médiée par Fas a été confirmée par les travaux de Miyaji et al. en 2005. En effet, ces travaux ont clairement montré que l'expression de sphingomyéline membranaire, composant majoritaire des radeaux lipidiques augmente l'apoptose Fas dépendante, avec une augmentation de la formation du DISC. Cette accroissement du DISC permet une augmentation de l'activation des caspases, ainsi qu'une plus efficace translocation de Fas dans les lipid rafts. Cette translocation permet une meilleure agrégation de Fas en de grands agrégats (Miyaji et al., 2005) (Figure 22 et 23).

Les lipid rafts sont des microdomaines membranaires constitués d'un assemblage dynamique de cholestérol et de sphingolipides (Munro, 2003; Simons and Toomre, 2000). La présence de chaînes d'hydrocarbures saturés dans ces sphingolipides permet au cholestérol de s'y intercaler étroitement. Cela aboutit à la présence de phases liquides distinctes et ordonnées de radeaux lipidiques dispersés dans la matrice liquide désordonnée plus fluide dans la bicouche lipidique. Les lipid rafts servent de foyers d'ancrage pour le recrutement et le rapprochement des molécules de signalisation à la membrane plasmique. Ils sont également impliqués dans la transduction du signal pour les récepteurs de surface (Dimanche-Boitrel et al., 2005; Simons and Toomre, 2000).

Les céramides sphingolipides ont été impliqués dans le regroupement de Fas dans les radeaux enrichis en céramides (Grassme et al., 2003) (Figure 22). Cependant, les céramides sont seulement des médiateurs du processus d'agrégation mais pas les initiateurs, amplifiant

par conséquent, les premiers événements de la signalisation. Ainsi, le céramide C16 ne peut pas déclencher seul l'agrégation de Fas en absence de stimulation, soit par un anticorps anti-Fas agoniste soit par FasL (Grassme et al., 2003).

Il est suggéré que le complexe Fas/FasL entre initialement dans de petits radeaux membranaires et induit une faible formation du DISC permettant l'activation de la caspase-8 (Grassme et al., 2003). Cette faible activation de la caspase-8 peut alors produire des céramides par la translocation des sphingomyélinases et l'activation de petits radeaux lipidiques. En raison de la proportion élevée de sphingomyéline présente dans ces radeaux (70% des sphingomyélines cellulaires) (Prinetti et al., 2001), les céramides ainsi générés, peuvent induire la coalescence des radeaux élémentaires (Grassme et al., 2003). Ce rapprochement des radeaux élémentaires permet ainsi la formation de gros patches de radeaux lipidiques contenant les complexes Fas/FasL augmentant la formation du DISC, potentialisant la signalisation de Fas (Figure 23). Ainsi, la sphingomyélinase et les céramides servent à amplifier la signalisation de Fas au niveau de la membrane après l'interaction initiale de FasL avec Fas.

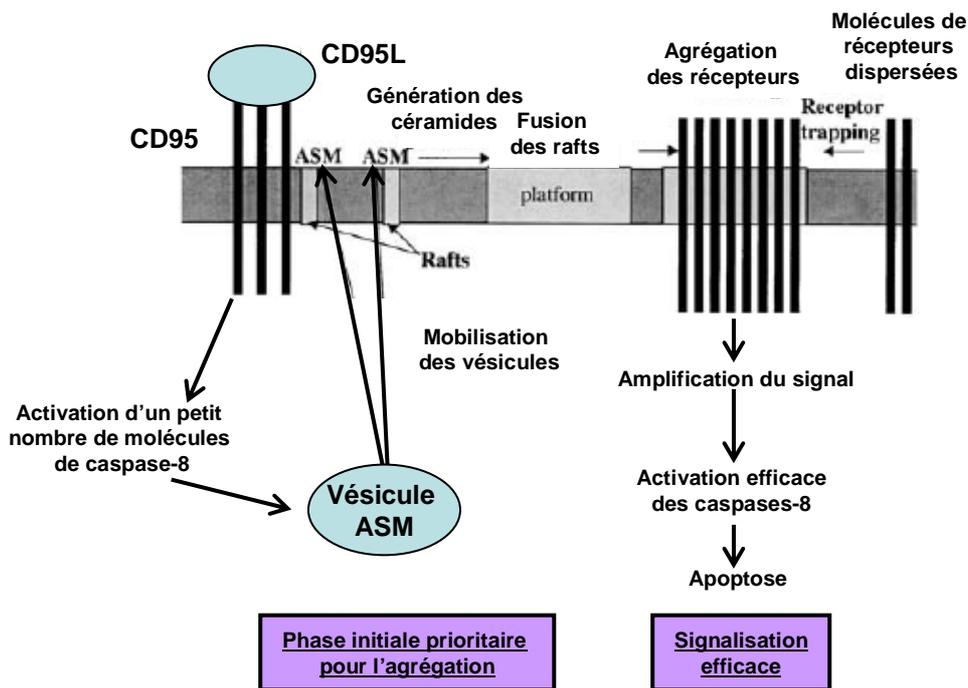


Figure 22 : Modèle d'agrégation du récepteur Fas/CD95. Le modèle mis en jeu dans l'agrégation de Fas, sert de mécanisme permettant l'amplification du premier signal faible produit par la fixation du ligand sur Fas. Bien que le signal initial soit insuffisant pour déclencher l'apoptose, il induit une translocation des ASM à la surface cellulaire, permettant une libération de céramides dans les radeaux lipidiques et la formation de plus grandes plateformes de signalisation. L'agrégation de Fas dans ces plateformes permet alors le recrutement efficace de FADD et l'activation de la caspase 8, aboutissant finalement à l'apoptose. (D'après (Grassme et al., 2003))

Les implications physiologiques de l'internalisation de Fas ne sont pas encore vraiment connues, mais il a été suggéré que ce phénomène pourrait jouer un rôle dans la protection des cellules contre l'induction du signal apoptotique, provenant des cellules voisines libérant des FasL solubles. Ce contournement de la signalisation apoptotique Fas dépendante pourrait jouer un rôle dans l'échappement de certaines cellules cancéreuses à l'apoptose Fas dépendante, et pourrait également être impliqué dans la signalisation non apoptotique en favorisant la formation du DISC.

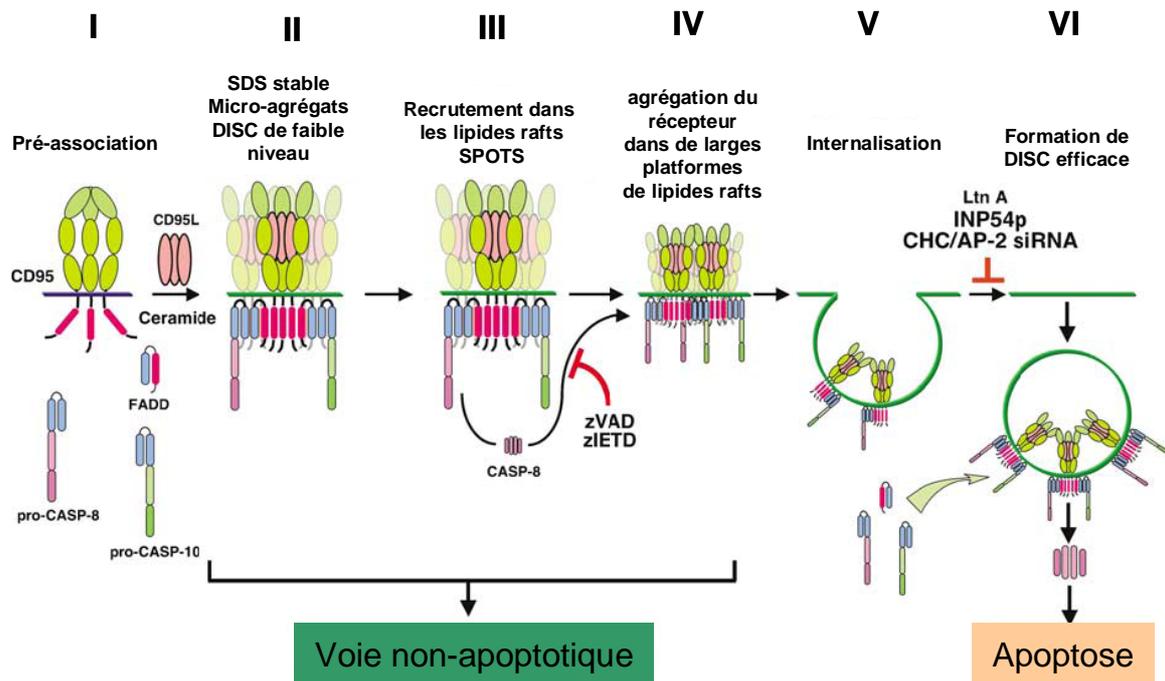


Figure 23 : Modèle pour la signalisation précoce de Fas. (I), pré-association de Fas indépendant de FasL. (II), formation des microagrégats détectés comme agrégats stables et formation du DISC de bas niveau. Il a été montré que les cellules exprimant la sphingomyéline synthase 1 formaient des agrégats stables de la forme SDS plus efficacement que les cellules SMS-négatives (Miyaji et al., 2005), suggérant que les céramides, non-essentiels à la signalisation de Fas, potentialisent l'apoptose induite par Fas. (III), recrutement de Fas dans les lipides rafts pour former des Spots. Fas une fois regroupé en agrégats va former de gros agrégats au sein de grandes plateformes de lipides rafts. Cette étape dépend de la génération d'une caspase-8 active par le DISC et peut être efficacement inhibée en pré-incubant les cellules avec le zVAD-fmk ou le zIETD-fmk. En l'absence d'internalisation, les signaux des étapes 2 à 4 ont le potentiel d'activer des voies non apoptotiques, mais sont insuffisants pour tuer les cellules de type I. (V), Internalisation de Fas activé. (VI), Migration du Fas internalisé dans un compartiment endosomal, permettant un meilleur recrutement des composants du DISC. Cette étape dépend des filaments d'actine puisqu'elle peut être inhibée par le latrunculin A (Cahir-McFarland et al.). Cette étape exige également PIP2 et les protéines de clathrines, car elle est inhibée par la surexpression de l'INP54p ou sous-expression de CHC ou d'AP-2. Dans le cas d'une apoptose induite par FasL membranaire, il a été postulé une internalisation induite par le ligand d'un complexe Fas activé qui ne contient plus le ligand. Les éléments du DISC sont FADD/Mort1, caspase-8, caspase-10 et c-FLIP (non montré). Domaines bleus, DED ; domaine rouge, DD ; l'extrémité N-terminale PLAD dans Fas est montrée en vert foncé (Lee et al., 2006).

II.1.4- FasL n'est pas indispensable dans l'apoptose médiée par Fas

Certaines études ont montré que des drogues comme la doxorubicine, la méthotrexate ou la bléomycine provoquaient une induction d'expression de FasL qui par un effet autocrine et/ou paracrine pouvaient induire l'apoptose. En effet, le FasL néosynthétisé était sécrété dans le milieu extracellulaire, et en se fixant sur le récepteur membranaire Fas induisait la mort cellulaire (Friesen et al., 1996; Fulda et al., 1997; Muller et al., 1997). Cette constatation a permis à l'équipe de Friesen et al. de postuler que les interactions Fas/FasL pourraient expliquer l'apoptose associée aux traitements de chimiothérapies (Friesen et al., 1996). Cette équipe a rapporté que certaines lignées cellulaires résistantes à l'apoptose dépendante de Fas sont insensibles à l'apoptose induite par des drogues anticancéreuses. La mort cellulaire est alors bloquée par le traitement des cellules avec des anticorps neutralisants Fas (Friesen et al., 1996).

Cependant, vers la fin des années 1990, la participation des interactions de Fas/FasL dans cette apoptose induite par les traitements de chimiothérapie est rapidement devenue très controversée. En effet, plusieurs groupes de chercheurs n'ont pu reproduire ces résultats originaux (Gajate et al., 2000a; Gamen et al., 1997; Tolomeo et al., 1998; Villunger et al., 1997).

Dans la littérature, il a été décrit que l'activation de la signalisation Fas pouvait se faire en absence de stimulation par FasL, comme dans le cas de stimulations induites par des drogues telles que la thymidine kinase/ganciclovir (TK/GCV) (Beltinger et al., 1999) ou par l'exposition aux UV (Aragane et al., 1998). La TK/GCV permet l'agrégation du récepteur Fas et le recrutement de FADD, formant un DISC actif capable de recruter par la suite, la procaspase-8 qui va s'auto-activer. L'activité de la caspase-8 peut être inhibée par l'expression d'un dominant négatif de FADD et par le z-IETD-fmk, inhibiteur spécifique de la caspase-8, de la même manière que dans l'apoptose induite par FasL (Beltinger et al., 1999). Les rayonnements UV induisent l'agrégation de Fas, et le recrutement de FADD aboutissant ainsi, à l'apoptose des cellules (Aragane et al., 1998). L'expression du dominant négatif de FADD diminue l'apoptose, suggérant que ces cellules utilisent bien la voie apoptotique Fas indépendamment de son ligand. Cependant, cette inhibition n'est pas complète, suggérant que d'autres mécanismes apoptotiques peuvent fonctionner.

Certains travaux ont montré dans des lymphocytes B du centre germinatif, qu'une apoptose médiée par Fas était possible en absence de FasL (Hennino et al., 2001). De plus, certains auteurs ont constaté que le blocage des interactions Fas/FasL n'empêchait pas

l'apoptose induite par la doxorubicine ou par d'autres drogues cytotoxiques. D'après leur constatation, l'apoptose induite par ces drogues n'exige pas une nouvelle synthèse de FasL (Gajate et al., 2000a; Gamen et al., 1997; Tolomeo et al., 1998; Villunger et al., 1997). Bien que de nombreuses drogues cytotoxiques provoquent l'apoptose indépendamment de Fas, les équipes de Gajate et al. et de Micheau et al. ont détecté une activation de Fas indépendante de FasL dans les mécanismes d'action de nombreuses drogues anti-tumorales, comme l'edelfosine, le cisplatine, l'étoposide, et la vinblastine (Gajate et al., 2000a; Micheau et al., 1999). En effet d'après ces travaux, les cellules déficientes en Fas sont résistantes à l'action pro-apoptotique de l'edelfosine. Une fois, ces cellules transfectées avec une protéine Fas fonctionnelle, elles deviennent sensibles à la drogue (Gajate et al., 2000a). La présence ou l'absence d'expression de Fas sur la surface cellulaire dans ces cellules cancéreuses est corrélée avec leur sensibilité à l'apoptose induite par l'edelfosine (Gajate et al., 2000a). Ainsi, la transfection transitoire d'un plasmide codant un anti-sens de FADD, diminuant la quantité cellulaire de celle-ci, inhibe la sensibilité des cellules tumorales à l'apoptose induite par des drogues (Micheau et al., 1999). La transfection d'un dominant négatif de FADD dans ces cellules diminue l'apoptose induite par le cisplatine et par des lipides d'ether antitumoraux (Matzke et al., 2001; Micheau et al., 1999). Les transfections transitoires des cellules avec MC159 ou E8, deux protéines virales interagissant par leurs domaines DED, respectivement avec FADD et avec le prodomaine de la procaspase-8, permettant d'empêcher le recrutement de FADD et de la procaspase-8 dans le DISC (Bertin et al., 1997), protègent les cellules contre l'effet cytotoxique induit par le cisplatine (Micheau et al., 1999). De plus, d'après une étude récente de Thureau et al., la protéine MC159 pourrait fixer les protéines TRAF3 et TRAF2 permettant la formation d'un complexe MC159/TRAF3/TRAF2 qui s'associerait au DISC de FAS et à la procaspase-8, inhibant, ainsi la voie apoptotique Fas (Thureau et al., 2006). L'incubation de cellules avec soit un anticorps antagoniste de Fas bloquant son activation par son ligand (comme les anticorps ZB4 et SM1/23), soit la protéine de fusion Fas-IgG soluble (empêchant l'interaction de Fas/FasL), ne permet pas d'inhiber l'apoptose induite par des drogues. De plus, l'augmentation d'expression de FasL médiée par des drogues n'est pas toujours bien détectée dans des cellules tumorales bien distinctes (Gajate et al., 2000a; Micheau et al., 1999). Ces données suggèrent que certaines drogues anticancéreuses induisent la mort cellulaire par une voie dépendante de Fas/FADD sans solliciter FasL.

De plus, il a été montré dans de nombreux travaux, que les drogues comme l'edelfosine, le resveratrol, le cisplatine et l'aplidine induisent toutes la translocation, la

redistribution et la forte concentration de Fas dans les radeaux lipidiques indépendamment de FasL (Delmas et al., 2003; Gajate et al., 2004; Gajate et al., 2000a; Gajate and Mollinedo, 2001; Gajate and Mollinedo, 2005; Lacour et al., 2004; Pervaiz, 2004). Ces radeaux membranaires sont donc essentiels dans le processus apoptotique Fas dépendant et dans les traitements de chimiothérapie dirigés contre les cancers.

II.2- Voie proliférative

Paradoxalement depuis 1993, il a aussi été montré un effet prolifératif du récepteur Fas. L'activation de Fas par son ligand déclenche la prolifération de lymphocytes T stimulés par leur TCR et des thymocytes humains purifiés (Alderson et al., 1993). De plus, la seule stimulation de Fas par FasL est suffisante pour induire significativement la prolifération de fibroblastes humains de peau (Aggarwal et al., 1995; Freiberg et al., 1997; Jelaska and Korn, 1998). En accord avec cette propriété proliférative, FasL peut induire l'activation de ERK1/2, activateur moléculaire de prolifération, dans des fibroblastes en état de privation de sérum (Ahn et al., 2001). Ainsi, selon les conditions utilisées, l'activation de Fas peut aussi induire l'apoptose des fibroblastes (Friesen et al., 1996; Jelaska and Korn, 1998).

Cependant, la co-stimulation de Fas et du TCR des lymphocytes T humains purifiés provoque la prolifération. Cette co-stimulation semble impliquer l'activation de caspases sans induire l'apoptose (Alam et al., 1999; Kennedy et al., 1999; Miossec et al., 1997; Wilhelm et al., 1998). L'activation de caspases dans des lymphocytes T polyclonaux activés a été fonctionnellement reliée à la prolifération induite par le TCR car celle-ci est bloquée en présence d'inhibiteurs des caspases (Alam et al., 1999; Kennedy et al., 1999). La stimulation du TCR provoquant l'augmentation de l'expression de FasL (Nagata and Golstein, 1995) et le rôle de co-stimulation de FasL dans l'activation des lymphocytes T, suggère qu'il existe une possible boucle autocrine d'activation de FasL et de Fas. Cette dernière médiée par le TCR, déclencherait une voie de signalisation non-apoptotique, caspase-dépendante et indispensable à la prolifération des lymphocytes T (Kennedy et al., 1999).

En accord avec ce scénario, l'utilisation d'un antagoniste de Fas (Fas-Fc) inhibe la prolifération des lymphocytes T stimulés avec des quantités sub-optimales d'anticorps anti-TCR. Cette inhibition n'est pas observée avec de fortes concentrations d'anticorps anti-TCR. Dans ce cas précis, la voie Fas étant bloquée, cela suggère donc l'implication d'autres récepteurs à domaine de mort tels que TRAIL-R1, TRAIL-R2, DR3 ou DR6 qui peuvent se substituer à la voie Fas, pour accomplir cette induction de la prolifération (Kennedy et al.,

1999). Ceci pourrait également expliquer le fait que ce défaut de prolifération des lymphocytes T n'affecte pas les souris *lpr* (déficientes en Fas) (Watanabe-Fukunaga et al., 1992) et *gld* (déficientes en FasL) (Ramsdell et al., 1994).

Alors que l'activation des caspases après la stimulation du TCR a été clairement établie (Alam et al., 1999; Kennedy et al., 1999), des données différentes ont été rapportées concernant les caspases impliquées et leurs substrats. Les travaux de Kennedy et al. (1999) ont clairement montré l'activation de la caspase-8, mais n'ont pas détecté le clivage de la caspase-3 ainsi que de son substrat, la PARP. Par opposition, les travaux de Alam et al. (1999) ont montré l'activation des caspases-3, -6, -7 et -8 de même que le clivage sélectif de quelques substrats de la caspase-3 tels que la PARP. Néanmoins, l'ensemble de ces travaux montre que la prolifération des lymphocytes T induite par la voie Fas est initiée par la caspase-8, qui s'autoactive après avoir été recrutée par FADD.

II.3- Voies de signalisation régulant la transduction du signal médiée par FAS

Les voies de signalisation cellulaire NF-kB, JNK (c-Jun N-terminale Kinase), et PKC (Protéine kinase C) sont impliquées dans la régulation de la transduction du signal apoptotique médié par Fas.

En effet, la voie NF-kB peut réguler négativement l'apoptose médiée par Fas en augmentant l'expression de protéines anti-apoptotiques. Nous décrirons, dans le paragraphe suivant II.3.1, plus en détail, cette implication de NF-kB dans la voie de signalisation Fas.

De plus, le cytosquelette et les radicaux oxygénés (ROS) semblent être impliqués dans l'initiation du processus apoptotique médiée par Fas. En effet, comme nous l'avons vu auparavant, l'agrégation du récepteur Fas, étape essentielle initiant l'apoptose nécessite l'implication du cytosquelette et des filaments d'actine. Le rôle des ROS dans cette agrégation de Fas sera décrit plus largement dans le paragraphe II.3.2.

La voie des JNK quant à elle, peut accroître l'apoptose Fas dépendante (Davis, 2000; Pinkoski et al., 2000; Shaulian and Karin, 2002). La voie des JNK peut également être induite par la voie de signalisation Fas, probablement par les caspases (Cardone et al., 1997; Deak et al., 1998; Widmann et al., 1998; Widmann et al., 1997). De plus, une voie alternative d'apoptose indépendante des caspases existe. Cette voie secondaire est initiée par l'association de la protéine Daxx avec Fas (Yang et al., 1997). Le rôle de Daxx dans la voie d'activation des JNK lors de l'induction de Fas sera décrit dans un prochain paragraphe II.4.3.

L'activation des PKC peut réprimer l'apoptose induite par Fas en exerçant des fonctions anti-apoptiques par l'inactivation des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, comme Bad ou Bid (Busuttill et al., 2002; Gomez-Angelats et al., 2000; Herrant et al., 2002; Rudert et al., 1997; Tan et al., 1999). Il semblerait que l'activation des PKC protégerait les cellules de type II, mais pas les cellules de type I de l'apoptose Fas dépendante (Scaffidi et al., 1999). De plus, les PKC inhibent l'oligomérisation de Fas (Ruiz-Ruiz et al., 1999), et réduisent la formation du DISC, en amont du recrutement de FADD et de la caspase-8, modulant la voie apoptotique Fas (Gomez-Angelats and Cidlowski, 2001).

II.3.1- Fas et NF-kB

La voie de signalisation NF-kB peut être activée par une grande variété de stimuli tels que les cytokines, les UV, et les produits bactériens ou viraux (Ghosh and Karin, 2002; Karin and Lin, 2002; Silverman and Maniatis, 2001). La voie NF-kB régule négativement l'apoptose induite par les récepteurs à domaine de mort en augmentant l'expression de protéines anti-apoptotiques. L'apoptose interfère également avec l'activation de NF-kB par l'intermédiaire des caspases qui clivent plusieurs composants de cette voie (Wajant et al., 2003). Par exemple, la caspase-3 clive préférentiellement les sous-unités p50 et p65 de NF-kB (Levkau et al., 1999; Ravi et al., 1998). Ainsi, l'inhibition de l'apoptose augmente fortement l'activation de NF-kB par la voie Fas (Mandal et al., 1996; Wajant et al., 2000). Dans les conditions où l'apoptose est bloquée, l'activation de NF-kB par Fas peut être aussi forte que lors du traitement au TNF α (Wajant et al., 2000).

Bien que les mécanismes exacts de l'activation de NF-kB par Fas demeurent mal connus, il semble qu'ils fassent intervenir FADD et la caspase-8 (Hu et al., 2000). Bien que cette voie soit masquée par la voie apoptotique Fas, elle peut être observée lorsque cette dernière est bloquée. Ainsi, l'activation de NF-kB augmente l'expression de la protéine c-FLIP (Kreuz et al., 2001; Micheau et al., 2001) qui, en empêchant l'activation de la caspase-8 par FADD, est un puissant inhibiteur de la voie apoptotique Fas. De plus, c-FLIP va également augmenter l'activation de NF-kB (Kataoka et al., 2000) formant ainsi une boucle d'autoactivation. Ainsi, une des isoformes de c-FLIP, c-FLIP_L quand elle est surexprimée active directement NF-kB (Chaudhary et al., 2000; Hu et al., 2000). Ainsi, il peut se former un complexe c-FLIP_L/Caspase-8 qui possède une activité protéolytique (Micheau et al., 2002). Le premier substrat de ce complexe est c-FLIP_L dont le clivage induit un changement de conformation qui pourrait être impliqué dans son ubiquitination et sa dégradation par le

protéasome (Fukazawa et al., 2001) ou son association aux molécules de la famille des TRAFs (Kataoka et al., 2000). Le second substrat est la protéine RIP (Micheau et al., 2002), qui va généré un fragment contenant un domaine de mort DD, agissant comme un inhibiteur dominant négatif de la voie NF- κ B (Martinon et al., 2000; Micheau et al., 2002). Une autre étude a montré que dans le cas de la surexpression de c-FLIP_L, cette isoforme interagit avec TRAF1, TRAF2 et RIP, qui sont des protéines intermédiaires de l'activation de NF- κ B par le TNFR1 (Kataoka et al., 2000) (Figure 13). De plus, il a été rapporté, que l'activation de NF- κ B médiée par c-FLIP_L requière le clivage de p43-FLIP interagissant seulement avec TRAF2 (Kataoka and Tschopp, 2004). Des travaux très récents du groupe de PH Krammer, montrent que dans des cellules non-apoptotiques, les formes hétérodimères composées de c-FLIP et de la procaspase-8 forment un nouveau fragment de clivage de c-FLIP en N-terminal, appelé p22-FLIP, qui pourrait être le médiateur clé de l'activation de NF- κ B par l'induction de Fas. Ainsi, p22-FLIP va se fixer directement et physiquement sur le complexe IKK, l'activant. Cette activation permet alors la phosphorylation de I κ B qui va se décrocher du complexe NF- κ B, provoquant l'activation de ce dernier. De plus, p22-FLIP peut bloquer l'apoptose médiée par le récepteur à domaine de mort, en se fixant au DISC via l'interaction de son domaine DED avec la caspase-8, inhibant l'activation de cette dernière (Golks et al., 2006) (Figure 24).

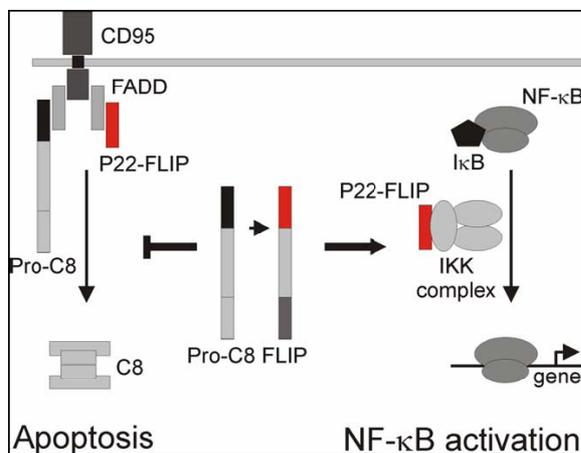


Figure 24. La double fonction de p22-FLIP dans la cellule.

p22-FLIP induit NF- κ B par son interaction avec IKK γ dans le complexe IKK (à droite). De plus, p22-FLIP peut bloquer l'apoptose induite par le récepteur de mort par sa fixation sur le DISC via des interactions des domaines DED, inhibant l'activation de la procaspase-8 (à gauche) (Golks et al., 2006).

II.3.2- Rôle des ROS (Radicaux oxygénés) dans l'apoptose FAS dépendante

Le processus d'agrégation du récepteur Fas peut impliquer les espèces réactives oxygénées (ROS). Ainsi, le traitement d'une lignée cellulaire Jurkat avec du peroxyde d'hydrogène induit une agrégation rapide de Fas sur la surface cellulaire (Huang et al., 2003). De plus, les extracteurs de radicaux libres (ROS scavengers) abrogent l'apoptose et l'agrégation de Fas induites par les radiations γ ou par le cisplatine (Huang et al., 2003). Ces

données indiquent que les ROS participent à l'agrégation de Fas provoquée par les radiations γ et le cisplatine. Cependant, les ROS scavengers n'ont aucun effet sur l'apoptose induite par l'anticorps agoniste de Fas, CH11 indiquant que l'étape ROS sensible est en amont de la voie apoptotique médiée par Fas. Les ROS ont été impliqués dans l'expression de FasL (Bauer et al., 1998), mais FasL n'est pas indispensable dans l'activation de l'apoptose induite par le cisplatine (Huang et al., 2003) ou par des stimuli additionnels qui déclenchent les ROS et l'agrégation de Fas (Gajate et al., 2000a; Gajate and Mollinedo, 2001; Gajate et al., 2000b). Le mécanisme par lequel les ROS influencent l'agrégation de Fas est actuellement inconnu. Vraisemblablement, les ROS activent des signaux qui peuvent éventuellement réorganiser le cytosquelette, permettant le regroupement de protéines membranaires (van Wetering et al., 2002; Wang et al., 2001). Dans ce contexte, la génération des ROS peut réguler la polymérisation d'actine par la glutathionylation réversible de l'actine (Wang et al., 2001).

II.4- Modulation de l'apoptose Fas dépendante par les protéines interagissant avec Fas

Un certain nombre de protéines interagissant avec Fas ont été identifiées comme capable de moduler l'activité apoptotique de Fas. Par conséquent, ces protéines peuvent jouer un rôle important dans le ciblage thérapeutique de Fas.

II.4.1- FADD

Comme nous l'avons montré précédemment, FADD est une protéine adaptatrice clé, transmettant le signal de mort cellulaire induit par les récepteurs à domaine de mort, formant ainsi avec la procaspase-8, le DISC. Les fibroblastes et les lymphocytes provenant d'embryon de souris déficientes en FADD ou en caspase-8 sont résistantes à l'apoptose induite par Fas (Juo et al., 1998; Zhang et al., 1998). Ces résultats mettent en lumière l'importance de la voie FADD-caspase-8 empruntée par le signal apoptotique engendré par l'activation de Fas.

Le gène humain codant la protéine FADD a une organisation très simple et se compose de deux exons (286 et 341 pb) séparés par un unique intron d'environ 2 Kb. La séquence peptidique de 208 aa de FADD humain contient deux domaines, qui sont particulièrement bien conservés entre les espèces, le domaine de mort (DD) dans la partie C-terminale et le domaine effecteur de mort (Rodriguez et al.) dans sa partie N-terminale (Tourneur et al., 2005). Ces deux domaines jouent un rôle essentiel dans la transduction du signal apoptotique induite par les récepteurs à domaine de mort. L'absence d'expression de FADD dans les cellules cancéreuses s'est avérée être un phénomène particulièrement fréquent

dans les cellules malignes humaines, prévenant la résistance de ces cellules à des traitements de chimiothérapie (Tourneur et al., 2004).

Les modifications post-traductionnelles de FADD par les PKC, qui sont surexprimée dans un grand nombre de tumeurs, régulent l'apoptose induite par le récepteur Fas en empêchant la formation du DISC après activation du récepteur. Cette inhibition peut être reversée par une surexpression de la protéine PAR4 (PKC inhibiting protein prostate Apoptosis Responsive 4) (de Thonel et al., 2001).

II.4.2- FAP-1

La protéine FAP-1 (Fas Associated-Phosphatase-1) est une protéine tyrosine phosphatase qui s'associe avec le domaine de régulation négatif de Fas (les 15 derniers aa de la partie C-terminale) (Sato et al., 1995). FAP-1 d'un PM d'environ de 270 kDa, est l'une des tyrosines phosphatases les plus largement connues indépendantes des récepteurs. FAP-1 contient un motif « leucine zipper » dans sa partie N-terminale, un domaine de fixation au cytosquelette « ezrin-like », et de six domaines d'homologie PSD95/Dlg/Zo-1 (PDZ) (Sato et al., 1995). Les acides aminés de la partie C-terminale (SLV) de Fas sont nécessaires et suffisants pour son interaction avec le troisième domaine PZD (PZD3) de FAP-1 (Yanagisawa et al., 1997). La transfection stable d'un ADNc FAP-1 dans des cellules Jurkat sensible à Fas (Li et al., 2000; Sato et al., 1995) ou dans d'autres lignées cancéreuses (Li et al., 2000; Ungefroren et al., 2001) protège ces cellules contre la cytotoxicité induite par Fas.

De plus, FAP-1 est fortement exprimée dans les cellules tumorales humaines qui sont en grande partie réfractaire à l'apoptose induite par Fas, comme les adénocarcinomes pancréatiques, les cellules de carcinomes du colon, et les astrocytomes (Foehr et al., 2005; Ungefroren et al., 2001; Yao et al., 2004). Le pré-traitement des cellules avec le tripeptide synthétique SLV supprime la résistance à Fas (Ungefroren et al., 2001; Yao et al., 2004). Ainsi, l'association de FAP-1 avec Fas inhibe le transport de Fas sur la surface cellulaire, réduisant du même coup, le taux de protéines sur la surface cellulaire (Ivanov et al., 2003). La co-localisation de Fas/FAP-1 augmente donc dans l'appareil de Golgi (Ungefroren et al., 2001).

La sous-expression de FAP-1 par RNAi restaure l'exportation de Fas sur la surface cellulaire (Ivanov et al., 2006), et provoque une augmentation de la sensibilité des cellules à la mort induite par Fas (Foehr et al., 2005). Il a été récemment rapporté dans des cellules d'astrocytomes, que FasL induit la phosphorylation de certaines tyrosines de Fas et que FAP-

l déphosphoryle la tyrosine 275 dans la partie C-terminale de Fas (Foehr et al., 2005). Ceci indique clairement que Fas peut être régulé par des phosphorylations réversibles.

Cette notion est soutenue par de précédentes observations qui ont montré une interaction entre Fas et la tyrosine kinase p59fyn (Atkinson et al., 1996). Ces travaux ont aussi montré que la ligation de Fas induite par les phosphorylations précoces des tyrosines par de nombreuses et multiples protéines et inhibiteurs des protéines tyrosines kinases bloque la fragmentation de l'ADN induite par Fas et prolonge la survie cellulaire (Eischen et al., 1994). Ces résultats suggèrent que l'activation des protéines kinases est un signal précoce et obligatoire à l'induction de l'apoptose par Fas (Eischen et al., 1994).

II.4.3- Daxx

La protéine Daxx (Fas Death domain-associated protein), se fixant spécifiquement au domaine DD de Fas, permet de renforcer l'apoptose induite par ce récepteur (Yang et al., 1997). Daxx contient une région de 60 aa (aa 434-493) riche en résidus glutamate et aspartate et deux régions riches en proline. La surexpression de Daxx augmente l'apoptose induite par Fas et active la voie des JNK. Bien que dépourvue de domaine DD, Daxx est capable de s'associer avec le domaine DD de Fas par sa partie C-terminale dans une région distincte de celle de FADD. *In vitro*, Daxx potentialisant l'apoptose induite par Fas, ne permet pas de compenser l'absence de FADD dans des lignées cellulaires FADD^{-/-}. Daxx et FADD définissent apparemment deux voies apoptotiques bien distinctes en aval de Fas (Yang et al., 1997).

Des expériences de transfection de mutant de Fas ont remis en question l'importance de la voie FAS-Daxx-JNK. En effet, le mutant Fas muté sur son domaine DD, active la voie des JNK mais n'induit pas l'apoptose (Chang et al., 1999). En outre, dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs), JNK1^{-/-} et JNK2^{-/-}, il n'a été constaté aucune inhibition de l'apoptose induite par Fas. Ces expériences montrent que Daxx permet l'augmentation de l'apoptose induite par la voie apoptotique Fas via l'activation des JNK. Ces résultats suggèrent que même si Daxx est capable d'activer les JNK après stimulation de Fas, l'activation des JNK n'est pas suffisante pour déclencher l'apoptose, au moins dans certains types cellulaires.

Daxx est principalement nucléaire et agit comme régulateur transcriptionnel. Cette protéine s'associe aux corps nucléaires promyélocytiques leucémiques (PML-NB : Promyelocytic Leukemia (PML) Nuclear Body) participant à une voie apoptotique nucléaire (Zhong et al., 2000). Daxx est exportée du noyau au cytoplasme par la protéine nucléaire, CRM1

(Chromosomal Region Maintenance 1). Cette exportation ne peut se faire que lorsque Daxx est phosphorylée sur sa sérine 667, permettant sa fixation à CRM1 (Song and Lee, 2004). L'activation de la voie de signalisation de la MAPK ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1) induit cette phosphorylation. Daxx phosphorylée est alors transloquée dans le cytoplasme, puis se fixe à ASK1, conduisant l'oligomérisation de ASK1 (Song and Lee, 2003). ASK1 une fois activée, provoque l'activation des JNK (Chang et al., 1998).

La surexpression d'un mutant ASK1, délété de son domaine kinase, inhibe l'apoptose induite par Fas et Daxx, et inhibe également l'activation des JNK. Daxx peut fonctionner soit comme répresseur de la transcription, ou soit comme médiateur du signal pro-apoptotique (Ko et al., 2001). ASK1 séquestre Daxx dans le cytoplasme, permettant la fixation de cette dernière à Fas activé, accélérant par la suite l'apoptose induite par Fas (Ko et al., 2001).

L'expression ectopique de Daxx dans des cellules Jurkat, incubées avec des anticorps agonistes de récepteur de mort ou avec la doxorubicine, augmente sensiblement le taux d'apoptose (Boehrer et al., 2005a). La surexpression de Daxx dans ces cellules les sensibilise légèrement aux effets apoptotiques induits par la bendamustine, la cladribine, la cytosine-arabinoside et le mitoxantrone (Boehrer et al., 2005b).

Cependant Daxx dans certaines conditions posséderait aussi un rôle anti-apoptotique. Ainsi, des expériences de siRNA contre Daxx, ont permis de montrer dans un grand nombre de lignées cellulaires que l'apoptose augmente lorsque Daxx n'est plus présente (Michaelson and Leder, 2003). De plus, l'absence de Daxx permet une meilleure sensibilisation des cellules à l'apoptose induite par Fas, par l'action des UV ou par l'effet du TNF α (Chen and Chen, 2003), suggérant donc ce rôle anti-apoptotique de Daxx. L'expression de Daxx empêche également la mort cellulaire induite par le CD43 (leukosialine, sialophorine) dans la lignée cellulaire TF-1, lignée progénitrice de cellules hématopoïétiques (Cermak et al., 2002).

En dépit d'un grand nombre d'études essayant de déterminer la véritable fonction de Daxx dans la mort cellulaire, son rôle précis est seulement partiellement compris et reste en grande partie controversée (Salomoni and Khelifi, 2006). Daxx agit comme protéine d'interaction, et s'est avérée se lier à plus d'un vingtaine de protéines différentes, et bon nombre d'entre elles sont impliquées dans la régulation de la mort cellulaire et la régulation transcriptionnelle (Salomoni and Khelifi, 2006).

Partie 3 : Le virus d'Epstein-Barr

I. La famille des Herpesviridae

La famille des Herpesviridae est divisée en trois grands sous-groupes (α , β et γ) en fonction de critères basés sur leur tropisme *in vivo*, et sur la durée de leur cycle lytique (Tableau 2). Les herpèsvirus qui possèdent une étroite spécificité d'espèce, sont très largement répandus. En effet, la majorité des espèces animales peuvent être infectées au moins par l'un de ces virus. Une des particularités de ces virus est qu'ils sont responsables d'infections dites latentes et persistent tout au long de la vie de l'individu infecté. Si les primo-infections sont souvent asymptomatiques, les herpèsvirus sont cependant associés à de graves pathologies, notamment chez les sujets immunodéprimés.

Actuellement, huit virus herpès humains (HHV) sont identifiés et associés à différentes pathologies (Tableau 2).

nom du virus	abré- viation	sous groupe	pathologies en primo- infection	autre pathologies associées
Virus de l'Herpès Simplex 1	HSV-1 (HHV1)	α	Aphtes, pharyngite	Herpès labial, encéphalite
Virus de l'Herpès Simplex 2	HSV-2 (HHV2)	α	Herpès génital et néonatal	Herpès génital et cancer du col utérin
Varicella-Zoster Virus	VZV (HHV3)	α	Varicelle	Zona
Virus d'Epstein-Barr	EBV (HHV4)	γ	mononucléose infectieuse (MNI)	Nombreux cancers
CytoMegalovirus humain	hCMV (HHV5)	β	Mononucléose CMV, hépatite	Hépatite, rétinite pneumonie
Virus Herpès Humain 6	HHV6	β	roséole infantile	?
Virus Herpès Humain 7	HHV7	β	roséole infantile	?
Virus Herpès lié au Sarcome de Kaposi	KSHV (HHV8)	γ	?	Sarcome de Kaposi, souvent associé au SIDA

Tableau 2 : Descriptif des huit herpèsvirus pathogènes connus pour l'homme.

II. Historique

En 1958, Denis Burkitt, un chirurgien anglais travaillant en Ouganda, a décrit un cancer commun affectant des enfants en Afrique équatoriale (Burkitt, 1958). La distribution géographique du lymphome de Burkitt (LB) et les conditions climatiques associées suggèrent qu'un agent infectieux pourrait en être responsable (Burkitt, 1962).

En 1964, Epstein, Achong et Barr ont identifié des particules virales par microscopie électronique dans des lignées cellulaires provenant d'une biopsie de lymphome de Burkitt. Ces particules virales, faisant partie de la famille des herpèsvirus, ont été dénommées virus d'Epstein-Barr (EBV) (Epstein et al., 1964).

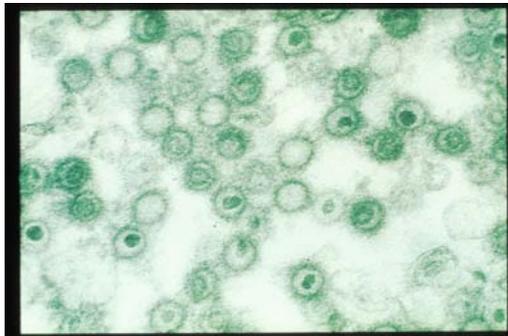


Figure 25 :
Particules virales trouvées dans des lignées de lymphome de Burkitt.

Au milieu des années 60, des études séro-épidémiologiques ont montré que les sérum des patients atteints de lymphome de Burkitt avaient des taux sériques plus élevés d'anticorps dirigés contre les antigènes de l'EBV que des sérum contrôles (Henle and Henle, 1966). Ces analyses sérologiques ont également identifié l'EBV comme agent étiologique de la mononucléose infectieuse (MNI). Ces analyses ont démontré que l'infection par l'EBV était associée à une autre maladie maligne, le carcinome indifférencié du nasopharynx (CNP) (Henle et al., 1968; zur Hausen et al., 1970), confirmant la relation de ce virus à des cancers chez l'homme (Henle and Henle, 1970). A peu près à la même époque, la capacité de transformation de l'EBV a été confortée par la potentialité du virus de transformer efficacement, *in vitro*, des lymphocytes B au repos et d'induire des tumeurs chez les primates non humains (Henle et al., 1967; Miller, 1974; Pope et al., 1968). Les études faites dans les années 80 ont prouvé que l'EBV est associé à de nombreuses variétés de tumeurs humaines comprenant des maladies des lymphocytes B telles que la maladie de Hodgkin (HD) et les maladies lymphoprolifératives surgissant après immunosuppression des patients sidéens, des lymphomes T, et des tumeurs épithéliales (NPC et cancers gastriques). Toutes ces tumeurs sont caractérisées, d'une part, par la présence de copies multiples extra-chromosomiques du

génomique virale circulaire épisomale dans les cellules tumorales, et d'autre part, par l'expression des gènes de latence codés par l'EBV, qui semblent contribuer au phénotype malin (Rickinson et Kieff, 2001).

III. Quelques données d'épidémiologie

L'EBV est un puissant inducteur *in vitro* de l'immortalisation et de la transformation des lymphocytes B. Il permet l'établissement de lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCLs). L'EBV est reconnu comme l'agent causal de la MNI (Henle et al., 1969), et comme cité ci-dessus est associé à des pathologies tumorales épithéliales comme le CNP, aux syndromes lymphoprolifératifs des déficits immunitaires ainsi qu'à certains lymphomes, dont le lymphome de Burkitt, le lymphome hodgkinien (LH) et le lymphome T de type nasal (LT) (Middeldorp et al., 2003). Malgré ce potentiel tumoral, la fréquence de l'EBV est très élevée, infectant plus de 95 % de la population adulte mondiale (Henle et al., 1969). Sa persistance est asymptomatique chez la majorité des sujets infectés.

La persistance de l'EBV, *in vivo*, est due à un équilibre hôte/virus contrôlé par deux phénomènes majeurs. Le premier est le contrôle par le système immunitaire de l'hôte, de l'émergence de cellules transformées par l'EBV. Le deuxième consiste au détournement, par le virus, via ses protéines de latence, de certaines voies de signalisation cellulaire permettant de maintenir les cellules infectées par l'EBV dans un état d'immortalisation (dit de latence) où les gènes viraux et cellulaires sont co-régulés. La rupture d'un tel équilibre aboutit aux syndromes lymphoprolifératifs des déficits immunitaires induits par l'EBV (Rickinson et Kieff, 2001). Des travaux récents sur la persistance virale montrent comment l'EBV utilise le programme de différenciation des lymphocytes B de la réponse immune pour se maintenir dans les lymphocytes B mémoire quiescents, réservoirs de l'EBV (Thorley-Lawson, 2001). Une partie de ces lymphocytes B mémoires sont soumis au cycle lytique du virus, permettant une production virale de l'EBV, puis une libération des virions dans la salive. Les sujets ainsi infectés véhiculent le virus toute leur vie par ces lymphocytes B réservoirs.

La majorité des primo-infections touche les enfants et est généralement asymptomatique. Cependant, lorsque l'infection a lieu plus tardivement chez l'adolescent ou le jeune adulte, comme souvent dans les pays développés, elle peut induire une affection bénigne, la MNI, qui est une maladie lymphoproliférative B généralisée et transitoire. Elle se traduit par une augmentation du nombre de lymphocytes B infectés par l'EBV dans le sang périphérique avec en réponse une expansion oligoclonale massive de lymphocytes T CD8⁺ dirigés contre l'EBV. Cette expansion oligoclonale induit une réaction de dépassement

responsable des signes cliniques de cette maladie. En effet, chez les sujets atteints de MNI, les symptômes peuvent correspondre à une augmentation des globules blancs dans le sang, à une inflammation douloureuse des ganglions lymphatiques occipitaux et cervicaux, à une adénopathie généralisée, à une asthénie intense, avec aussi des symptômes moins constants comme une éruption fugace ainsi qu'une conjonctivite.

La transmission de l'EBV se fait généralement par contact avec les sécrétions oropharyngées contenant le virus infectieux. La transmission chez les sujets transplantés est également possible, par les lymphocytes B infectés par l'EBV présents dans le sang du donneur d'organe. Cette infection constitue un facteur de risque pour les maladies lymphoprolifératives des sujets immunodéprimés.

IV. Structure du virion et du génome du virus d'Epstein-Barr

IV.1- Structure du virion

L'EBV possède une structure commune à tous les Herpès virus, du centre vers la périphérie :

- le nucléoïde contenant le génome viral linéarisé, molécule d'ADN bicaténaire (double brin) linéaire de 172 kpb enroulée autour de structures protéiques fibrillaires, aussi appelé « core » ou cœur.
- la nucléocapside de forme icosahédrique (20 faces, 12 sommets) mesurant 100 à 120 nm de diamètre et comportant 162 sous-unités ou capsomères (150 hexamères et 12 pentamères).
- le tégument composé de nombreuses protéines virales et cellulaires, d'aspect fibrillaire
- et enfin, l'enveloppe lipidique composée d'un double feuillet lipidique. Celui-ci correspond à une partie de membrane plasmique de la cellule hôte au niveau de laquelle le virus a exprimé ses antigènes de membrane (MAs, Membrane Antigens), qu'il a intégré et revêtu lors de sa libération (Figure 26). L'expression des glycoprotéines d'enveloppe, appartenant aux antigènes de membrane, confère au virus un aspect « spiculé ». Chaque cellule infectée par l'EBV comporte de multiples copies extrachromosomiques du virus sous sa forme épisomique ou circulaire. Ainsi, l'ADN viral est bicaténaire et linéaire dans la particule virale complète et sous forme circulaire ou épisomique dans la cellule infectée.

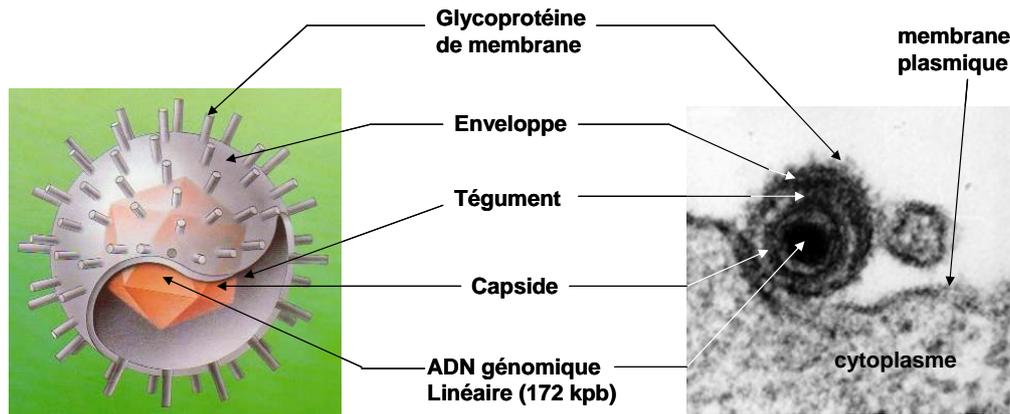


Figure 26 : Structure du virus d'Epstein-Barr.

Schéma et photographie de microscopie électronique. (Schéma adapté de <http://www.iwdl.net/Epstein%20Barr%20Virus.htm> et photographie obtenue sur www.bact.wisc.edu/.../ViralDisease.html, d'après Hutt-Fletcher LM, Epstein-Barr virus and immunomodulation in *Effects of Microbes on the Immune System*, 1999).

IV.2- Structure du génome du virus d'Epstein-Barr

IV.2.1- Description du génome viral

Le génome de l'EBV est organisé de façon semblable à celui des autres lymphocryptovirus. Il comporte une série de séquences terminales répétées (TR ou Terminal Repeat) d'environ 500 pb en tandem direct à chacune de ses deux extrémités, des séquences de répétition internes (IR ou Internal Repeat) divisant le génome en deux régions uniques, une courte et une longue (respectivement, Short Unique region ou Us, et Long Unique region ou UL) (Figure 27A).

Le nombre de séquences TR varie de 4 à 12, et ces dernières permettent la circularisation du génome viral lors de l'infection des cellules hôtes. L'ADN viral forme alors un épisode ou un CCC (Covalently Closed Circle), qui se lie étroitement à la chromatine cellulaire. Dans cette configuration, l'EBV peut maintenir stablement son génome dans les cellules infectées, sans avoir à l'intégrer au génome de la cellule hôte (Figure 27B).

Les séquences IR sont aux nombres de 4 (IR1 à IR4), séparées les unes des autres par des séquences internes uniques (U ou Unique region) au nombre de 5 (U1 à U5). La plus importante de ces séquences IR, l'IR1 (Major Internal Repeat ou Internal Repeat 1) est constituée de tandems de 7 à 12 séquences identiques mesurant chacune 3,072 kpb. L'IR1 va diviser arbitrairement le génome en deux régions uniques, une courte de 15 Kpb (Us) et une longue de 150 Kpb (UL). Les autres IRs sont situées dans la partie UL, comprenant des répétitions en tandem de séquences de 125 pb pour IR2 et de 103 pb pour IR4. Tandis que IR3 est composée d'une séquence, où trois triplets nucléotidiques (GGG, GCA et GGA) sont

répétés sur 700 pb. De plus, deux séquences identiques de 1 kpb ont été localisées sur deux endroits différents du génome viral, l'une au contact de IR2 (séquence D_L) et l'autre au contact d'IR4 (séquence D_R). Elles contiennent toutes les deux les origines de réplication lytique du virus (OryLyt). Le virus possède également une origine de réplication latente (OriP). Le génome code environ 80 protéines impliquées dans la réplication et la latence du virus.

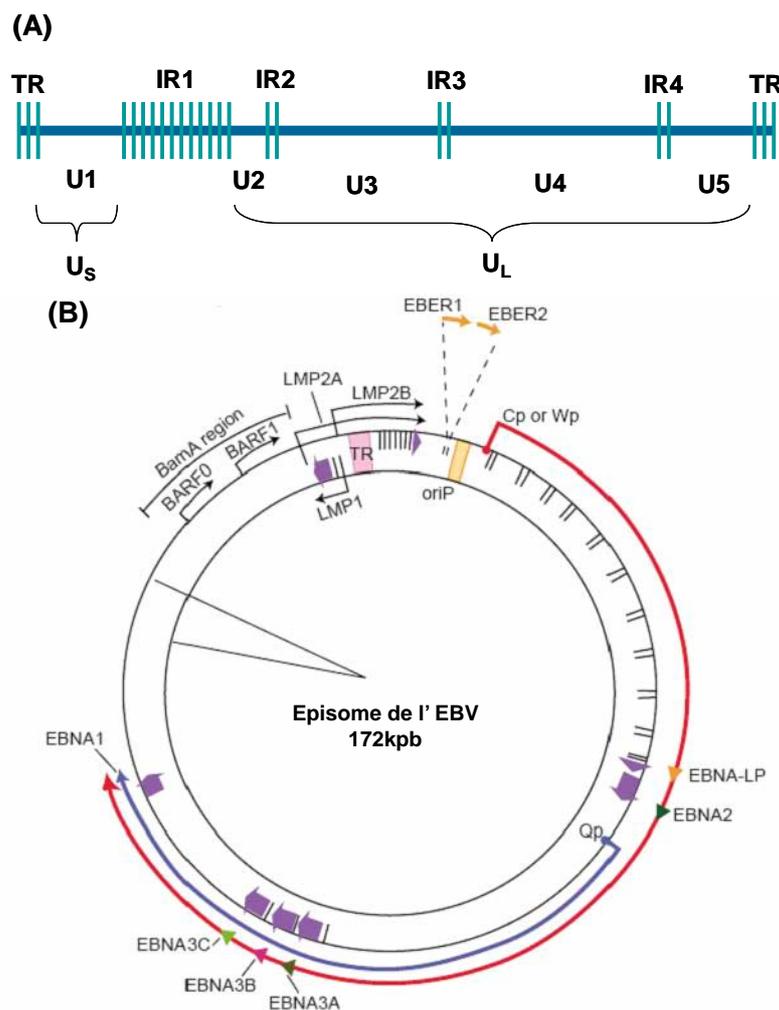


Figure 27 : Organisation du génome viral de l'EBV sous forme linéaire (A) ou épisomale (B). La forme linéaire est présente dans le virion (forme infectieuse). Dans les cellules infectées de façon latente, la fusion des séquences terminales répétées ou TRs aboutit à la circularisation du génome. IR1 à IR4 (Internal Repeat) : séquences internes répétées. U1 à U5 : séquences uniques. U_s (short Unique region), elle mesure 15 kb. U_L (long Unique region), mesure 150 kb environ. (D'après (Young and Rickinson, 2004)).

IV.2.2- La carte de restriction du génome viral

L'EBV a été le premier herpèsvirus dont le génome a été complètement cloné et séquencé (Baer et al., 1984). Ce séquençage a été fait à partir d'une banque de fragment d'ADN provenant de la digestion par l'enzyme de restriction BamHI du génome viral entier. La plupart des segments provenant de cette digestion enzymatique participe à la transcription des divers gènes viraux et ce, en fonction des cadres ouverts de lecture (ORF, ou Open Reading Frame), et du sens de lecture. Les gènes et les sites de régulation ou de transcription sont fréquemment référencés par rapport aux fragments spécifiques du génome obtenus après digestion par BamHI (Figure 28). Il a été proposé une nomenclature proposant que tous les segments génomiques obtenus après digestion de l'ADN viral par BamHI, soient repérés par une lettre sur la carte de restriction du génome viral (voir les lettres situées sur la Figure 28). Deux sens de lecture sont possibles et ont été arbitrairement choisis et fixés. Ainsi, le génome linéaire de gauche à droite, c'est-à-dire de U1 à U5, est le sens R (Rightward), et de droite à gauche, c'est-à-dire de U5 à U1, est le sens L (Leftward). Par conséquent, le gène codant la protéine LMP1 (Latent Membrane Protein 1) a été baptisé BNFL1, signifiant séquence N dans la cartographie BamHI (BN), transcrite dans le sens droite vers la gauche (L), dans le premier ORF (F1).

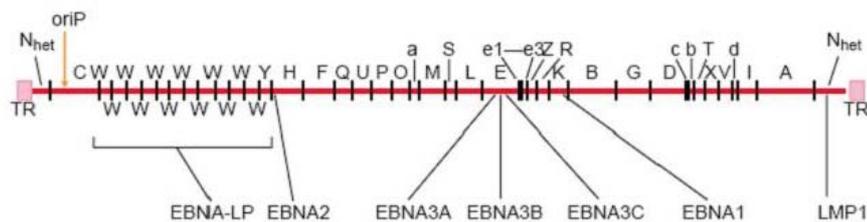


Figure 28 : Les cadres ouverts de lecture (ORFs, ou Open Reading Frame) pour les protéines de latence de l'EBV. (D'après (Young and Rickinson, 2004))

IV-2.3- Différents polymorphismes de l'EBV

L'EBV possède lui-même, un polymorphisme. En effet, il a été décrit différentes souches virales de l'EBV, qui peuvent être classées en deux types (EBV-1 et EBV-2 ou EBV-A et EBV-B). Ces deux souches virales se distinguent par des polymorphismes génomiques, au niveau des gènes de latence comme BYRF1 codant EBNA2 (EBV Nuclear Antigens 2), EBNA3A, 3B, 3C, permettant de les distinguer et de les identifier. Des études de séroprévalence ont montré que le type 1 est majoritairement prévalent en Occident, alors qu'en Afrique et en nouvelle Guinée, les types 1 et 2 présentent la même fréquence d'apparition. De plus, il existe entre les différents isolats d'EBV un polymorphisme au niveau

de certaines séquences du génome viral. En effet, il peut y avoir une variation du nombre des séquences en tandem dans les régions TRs de son génome. Enfin, pour une même souche virale de type A ou B, un autre polymorphisme s'observe également au niveau des régions IRs, ainsi qu'au niveau de plusieurs gènes dont BYRF1, BZLF1 (codant Zta) et BNLF1.

V. La latence virale

In vitro, il est possible d'immortaliser des lymphocytes B par l'EBV et d'obtenir des LCLs. Les lymphocytes B des LCLs sont très peu permissifs à la réplication virale (cycle lytique). Le virus peut s'y maintenir dans un état dit « de latence ».

Ce statut de latence virale repose sur deux phénomènes interdépendants. Le premier est la répression du cycle lytique, ainsi que le maintien du génome viral en situation intranucléaire sous forme épisomale circularisée. Le deuxième, essentiel au maintien de la latence virale, est l'expression des gènes dits de latence. Ces gènes codent pour des protéines qui ont des fonctions diverses. Certaines d'entre elles auront la propriété d'immortaliser les lymphocytes B infectés. On compte 11 gènes de latence, regroupés en 3 principales familles :

- la famille des gènes codant pour les protéines EBNA.
- la famille des gènes codant pour les protéines LMPs.
- la famille des gènes codant pour les ARNs EBERs et BARTs (Figure 29).

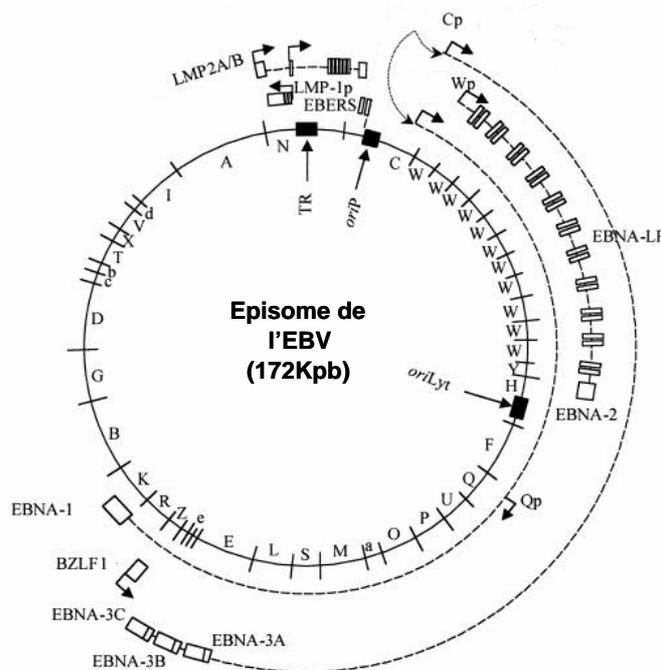


Figure 29 : Représentation schématique des transcrits des gènes de l'EBV exprimés durant la latence.

Seuls les gènes exprimés lors des différentes latences sont représentés. Les ARNm primaires sont représentés par des lignes hachées et les exons sont représentés par des boîtes blanches. IR : Internal Repeat ; U : Unique region ; oriP : Plasmidic replication origin (en phase latente) ; oriLyt : Lytic replication origin ; Cp, Wp, Qp : promoteurs respectivement situés dans les régions BamHI C, W et Q. Les lettres à l'intérieur de l'épisome indiquent le nom des fragments obtenus après digestion du génome par l'enzyme BamHI. (D'après (Sandberg et al., 2000))

L'expression des protéines de latence contribue aux propriétés d'immortalisation et/ou de transformation d'EBV en influençant la «machinerie» cellulaire afin de contrôler la croissance et/ou la survie des cellules infectées (Figure 30).

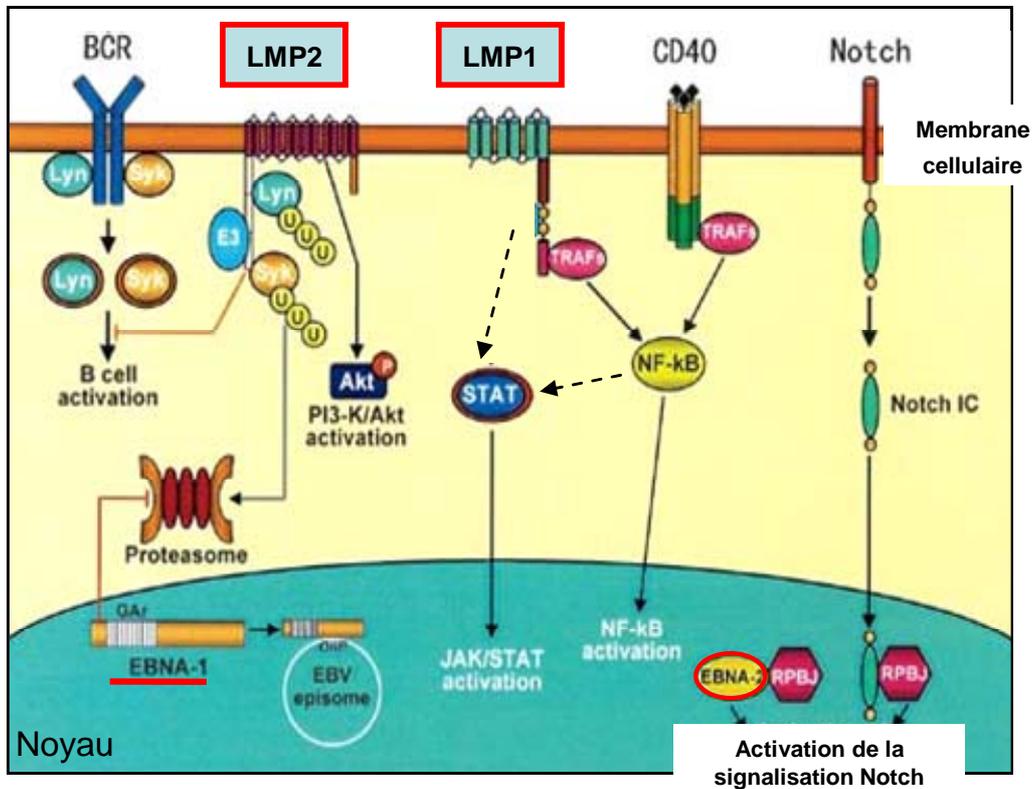


Figure 30 : Représentation schématique des voies de signalisation empruntées par les protéines virales impliquées dans l'immortalisation/transformation cellulaire (encadré en rouge). EBNA2 mime la voie de signalisation de Notch, alors que LMP1 mime le récepteur CD40. LMP2A séquestre les kinases Syk et Lyn, impliquées dans la voie de signalisation du récepteur des lymphocytes B (BCR), les conduisant à leur dégradation par le protéasome (U, ubiquitine ; E3, ligase). EBNA1, inhibe le système ubiquitine/protéasome (GAR, répétition Glycine/Alanine) (Dolcetti and Masucci, 2003).

Trois promoteurs de latence virale sont décrits : Wp, Cp et Qp. Dans un premier temps, l'expression des protéines de la famille des EBNA (EBV Nuclear Antigen) est initiée à partir du promoteur Wp (localisé dans la région BamHI W de la carte de restriction du génome viral), ensuite lorsque la transformation cellulaire est réalisée, c'est le promoteur Cp (localisé dans BamHI C) qui prend le relais (latence III), le promoteur Qp est utilisé en latence I et II (cf infra).

V.1- La famille des EBNA

V.1.1- Les protéines EBNA-LP et EBNA2

Les protéines EBNA-LP et EBNA2 produites dans les premières heures de l'infection des lymphocytes B par l'EBV, après circularisation du génome viral et entrée de celui-ci dans le noyau (Alfieri et al., 1991; Allday and Farrell, 1994), sont les premières protéines virales exprimées. Elles sont localisées dans le noyau. Ces deux protéines produites à partir du promoteur Wp par épissage alternatif, atteignent un niveau d'expression stable 24 à 32 heures après l'infection. Elles permettent aux lymphocytes B quiescents de passer de la phase G0 à G1 du cycle cellulaire, notamment grâce à l'activation de la cycline D2 (Parker et al., 2000; Sinclair et al., 1994; Zimmer-Strobl and Strobl, 2001). De plus, elles activent la transcription des autres protéines virales de latence, LMP1 et LMP2 (Johannsen et al., 1995; Laux et al., 1994), ainsi que le promoteur Cp (Jin and Speck, 1992) et les gènes cellulaires comme CD23, CD21, c-fgr et c-myc (Abbot et al., 1990; Bodescot et al., 1987; Cordier et al., 1990; Fahraeus et al., 1990; Fahraeus et al., 1993; Knutson, 1990; Wang et al., 1990a; Wang et al., 1991; Wang et al., 1990b; Zimmer-Strobl and Strobl, 2001). Bien que EBNA2 et EBNA-LP soient essentielles à l'immortalisation cellulaire, le maintien de leur expression ne semble pas indispensable à la croissance des cellules malignes, car dans la plupart des pathologies elles ne sont pas exprimées (sauf chez les sujets immunodéprimés) (cf Tableau 3 : pathologies associées à l'EBV et latence virale associée).

V.1.1.1- La protéine EBNA-LP

La protéine EBNA-LP est traduite par le début de chacun des ARNm des EBNA. EBNA-LP est de taille variable selon le nombre de répétitions de BamHI W contenues dans un isolat particulier de l'EBV (Kieff et Rickinson, 2001). Elle est principalement formée d'un peptide répétitif de 66 aa codé par une unité répétée de deux exons dérivée de la région IR1, le nombre de régions répétées variant selon les génomes des différents isolats d'EBV. L'activité co-activatrice de EBNA-LP est régulée par sa phosphorylation dépendante du cycle cellulaire, et par la formation de complexes multi-protéiques (Kitay and Rowe, 1996). L'analyse génétique et moléculaire indique que EBNA-LP, non indispensable pour la transformation de lymphocyte B *in vitro*, est par contre requise pour la croissance continue des LCLs (Allan et al., 1992). Par microscopie confocale, EBNA-LP et la protéine pRb co-localisent dans le noyau, dans les LCLs. *In vitro*, des études biochimiques, démontrent une interaction d'EBNA-

LP avec pRb, p53 et p14^{ARF} (bloquant la dégradation de p53) (Inman and Farrell, 1995; Jiang et al., 1991; Kashuba et al., 2003; Szekely et al., 1993). La technique de double hybride chez la levure a montré une interaction entre EBNA-LP et p14^{ARF} (Inman and Farrell, 1995; Kashuba et al., 2003). La transfection de p14^{ARF} dans les cellules provoque l'arrêt de la croissance cellulaire et induit l'apoptose. La seule présence de EBNA-LP réduit considérablement ces effets physiologiques (Kashuba et al., 2003). Par conséquent, il a été suggéré que EBNA-LP pouvait bloquer l'action de p14^{ARF}, bloquant ainsi l'activité de la protéine p53, dont l'expression est élevée en début d'infection des cellules par l'EBV. De plus, il a été montré que EBNA-LP fixait également le régulateur transcriptionnel Sp100, permettant ainsi une modification des protéines associées aux corps nucléaires PML et une induction synergique de la transcription avec la protéine EBNA2 (Ling et al., 2005). Ainsi, la fonction majeure reconnue de EBNA-LP est d'induire en collaboration avec EBNA2, la transition G0/G1 dans les lymphocytes B quiescents (Sinclair et al., 1994).

V.1.1.2- La protéine EBNA2

Le variant EBV, P3HR-1, délété du gène EBNA2 et des deux derniers exons de EBNA-LP, ne peut transformer des lymphocytes B, *in vitro*. Cela a été la première indication du rôle essentiel de EBNA2 dans le processus de transformation (Rabson et al., 1982). Ainsi, par recombinaison homologue, la restauration du gène EBNA2 dans ce variant P3HR-1 a confirmé cette importance dans la transformation de lymphocytes B. Ces expériences ont permis d'identifier les domaines fonctionnels de EBNA2 (Hammerschmidt and Sugden, 1989).

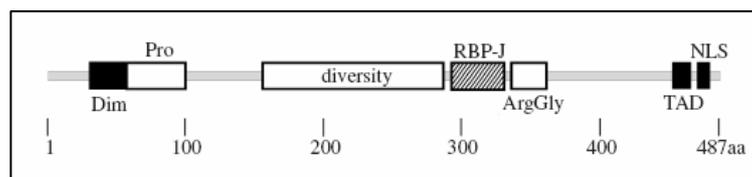


Figure 31 : Structure de la protéine EBNA2 du variant B95.8 de l'EBV. EBNA2 est composé d'une région N-terminale négativement chargée, jouant un rôle dans l'homodimérisation (Dim), un domaine riche en proline (Pro), une région de diversité (diversity), où l'homologie entre EBNA2A et EBNA2B est très faible, un domaine d'interaction avec RBP-Jk (RBP-J), un domaine riche en motif peptidique arginine-glycine (ArgGly), un domaine de transactivation (TAD) et un signal de localisation nucléaire (NLS) du côté C-terminal. (D'après (Zimmer-Strobl and Strobl, 2001))

La protéine EBNA2 est une phosphoprotéine acide, qui joue le rôle de facteur de transcription de certains gènes cellulaires et viraux. En effet, EBNA2 permet la surexpression de certains antigènes de lymphocyte B, comme le CD21 et le CD23, ainsi que les protéines de

latence virale LMP1 et LMP2 ((Wang et al., 1990b); Kieff et Rickinson, 2001). EBNA2 transactive également le promoteur Cp, induisant la transition du promoteur Wp au promoteur Cp, observé précocement dans l'infection de lymphocyte B.

Les promoteurs répondant à EBNA2 possèdent une séquence commune centrale (GTGGGAA), qui ne se lie pas directement à EBNA2 (Figure 34). Cette séquence interagit avec une protéine omniprésente possédant des sites de fixation à l'ADN, RBP-Jκ (Cp Binding protein, aussi appelée CBF-1, kBF2 ou CSL). RBP-Jκ est partiellement responsable du recrutement d'EBNA2 au niveau des promoteurs (Grossman et al., 1994; Waltzer et al., 1995; Waltzer et al., 1994) (Figure 34). Chez la drosophile, l'homologue de RBP-Jκ est impliqué dans la transduction du signal du récepteur Notch (Figure 32), qui est une voie importante pour la survie des cellules. La voie de signalisation Notch est également impliquée dans le développement des tumeurs de lymphocyte T chez l'homme (Artavanis-Tsakonas et al., 1995). Des travaux ont démontré que EBNA2 peut fonctionnellement remplacer la région intracellulaire de Notch (Notch-IC) (Sakai et al., 1998). Notch-IC est relarguée dans le noyau, après des clivages successifs de Notch qui sont activés par la fixation du ligand Delta ou Jagged (Figure 33). Notch-IC et EBNA2 se fixent, toutes les deux à RBP-Jκ. Bien qu'elles n'activent pas les mêmes gènes, leurs activations semblent complémentaires (Zimber-Strobl and Strobl, 2001).

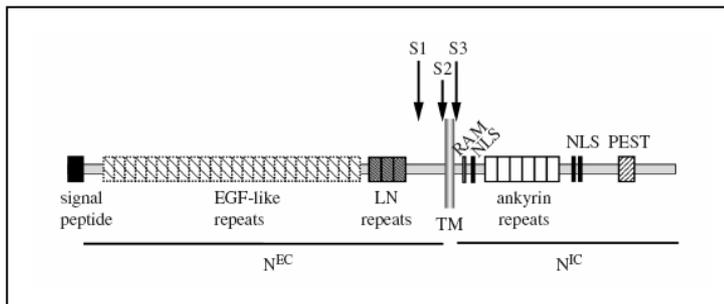


Figure 32 : Structure des protéines Notch. La partie N-terminale extracellulaire (N^{EC}) contient un peptide signal suivi d'un domaine (EGF-like Repeats), fonctionnant comme un domaine de fixation du ligand, et suivi enfin de séquences de répétitions riches en cystéines (Lin12/Notch Repeats) (LNR). La partie intracellulaire (N^{IC}) possède le domaine RAM et des séquences répétées d'ankyrine, qui interagissent avec RBP-J, suivi de 3 séquences (NLS), et du côté C-terminal une région PEST. Les flèches (S1 à S3) indiquent les emplacements des clivages protéolytiques durant la maturation de la protéine, après fixation du ligand. (D'après (Zimber-Strobl and Strobl, 2001))

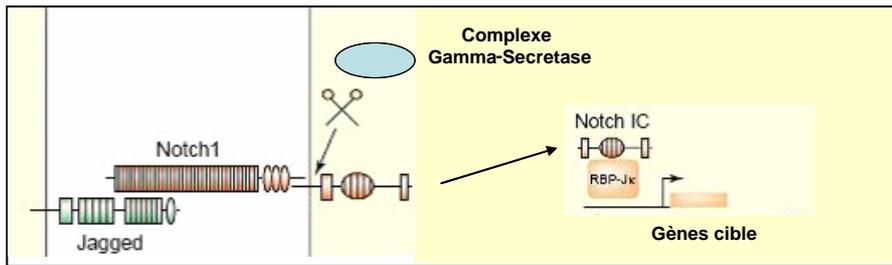


Figure 33 : Clivage de la protéine Notch. Le récepteur Notch est un hétérodimère issu d'un précurseur clivé par une endoprotéase. La fixation de ses ligands, eux aussi membranaires, entraîne une cascade de clivages dont seul le dernier est ici représenté. Ce clivage intra-membranaire par le complexe gamma-Sécrétase libère le domaine intracellulaire Notch-IC. Notch-IC va alors se fixer à RBP-Jk et transactiver ses gènes cibles. (D'après (MacDonald et al., 2001))

Pour sa fixation à l'ADN, EBNA2 nécessite d'autres protéines dont Sp-1/Spi-B, hnRNP-D/AUF1/CBF-2, ATF/CRE ou encore SMN (Survival of Motor Neurons), Spi-1/PU.1 ATF2 (Barth et al., 2003; Fuentes-Panana et al., 2000; Gordadze et al., 2001; Hofelmayr et al., 2001; Waltzer et al., 1995; Waltzer et al., 1994). De plus, EBNA2 est un puissant transactivateur permettant de recruter des Histone-AcétylTransférases (HAT) comme p300, CBP, pCAF (Barth et al., 2003; Wang et al., 2000).

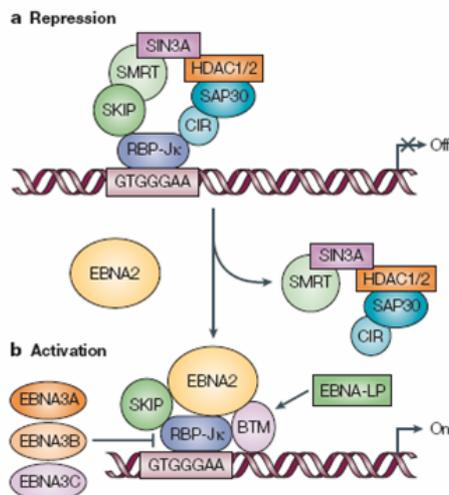


Figure 34 : Fonction de EBNA2. (a) EBNA2 fonctionne comme un activateur transcriptionnel en interagissant avec RBP-Jk et en soulevant la répression transcriptionnelle médiée par un grand complexe répresseur multi-protéique composé de (SMRT, SIN3A, de l'histone déacetylase 1 (HDAC1) et HDAC2, SKIP (SKI interacting Protein), autre protéine interagissant avec RBP-Jk et qui interagit également avec le complexe co-répresseur SMRT-HDAC. EBNA2 abolit la répression médiée par RBP-Jk par concurrence avec le complexe SMRT-HDAC en se liant à RBP-Jk et à SKIP. (b) Le domaine acide d'EBNA2 recrute alors la machinerie basale de transcription (TFIIB, TFIID et p300 ; non montré) pour activer la transcription. EBNA-LP coopère avec EBNA2 pour l'activation transcriptionnelle médiée par RBP-Jk en interagissant avec le domaine acide d'activation d'EBNA2. Les protéines EBNA3s modulent l'activation de RBP-Jk induite par EBNA2 en interagissant avec RBP-Jk, empêchant la fixation de EBNA2 à RBP-Jk. EBNA2 peut fonctionnellement remplacer la région intracellulaire de Notch. BTM, machinerie basale de transcription ; CIR, CBF1 (RBP-Jk)-Interacting corepressor ; SAP30, SIN3-associated protein 30 (D'après (Young and Rickinson, 2004)).

EBNA2 se fixe également à une autre protéine cellulaire, BS69 qui a un rôle de répresseur de la transcription (Ansieau and Leutz, 2002). En effet, cette protéine se fixe à différents facteurs transcriptionnels comme c-Myb, B-Myb, MGA, ETS2, EMSY et recrute en plus, des co-répresseurs comme HDAC1 et des méthyl-transférases (Velasco et al., 2006). Lorsque BS69, par son domaine MYND se fixe à EBNA2, elle inhibe les capacités de transactivation de EBNA2 (Ansieau and Leutz, 2002). Le facteur transcriptionnel MGA (Myc-related cellular transcription factor) peut recruter BS69 par le même domaine MYND. L'action de MGA sur les promoteurs de *myc* auxquels il est fixé, est « débloquée » par l'expression de EBNA2 fixant BS69 (Ansieau and Leutz, 2002).

L'oncogène *c-myc* semble également être une cible importante de EBNA2. La transactivation de *c-myc* par EBNA2 est importante pour la prolifération des lymphocytes B infectés par l'EBV (Kaiser et al., 1999). L'activation des proto-oncogènes *c-fgr* et *c-myc* pourrait contribuer également à l'altération de la croissance et de la différenciation cellulaire. EBNA2 augmente aussi l'expression de CCR7 (récepteur de la chimiokine MIP-3 β permettant l'attraction des lymphocytes T et B) et celle des facteurs transcriptionnels AML2 et BATF. Ce dernier membre de la famille AP1/ATF, régule négativement l'expression de la protéine Zta/EB1, et par conséquent, inhibe l'entrée des cellules dans le cycle lytique de l'EBV (Johansen et al., 2003). Parallèlement, l'expression de EBNA2 est associée à une diminution de l'expression de la chaîne lourde des immunoglobulines (IgH). De plus, l'activité transactivatrice de EBNA2 peut être très fortement inhibée par des phosphorylations dépendantes du cycle cellulaire, par le complexe Cdc2/CyclineB1 (Yue et al., 2006).

V.1.2- Les protéines de la famille des EBNA3

Cette famille est composée de trois membres EBNA3A, 3B et 3C, qui peuvent être des régulateurs transcriptionnels. Des études utilisant des recombinants de l'EBV, ont démontré que EBNA3A et EBNA3C sont essentiels pour la transformation du lymphocyte B, *in vitro*, tandis que EBNA3B n'est pas indispensable (Robertson et al., 1996; Tomkinson and Kieff, 1992; Tomkinson et al., 1993). Ces trois protéines sont nucléaires et hydrophiles. Elles contiennent des répétitions d'heptade de leucine, d'isoleucine ou de valine qui peuvent agir en tant que domaines de dimérisation. Elles sont associées à la matrice nucléaire et au nucléoplasme. De plus, elles régulent l'expression des gènes cellulaires et se fixent à certaines protéines cellulaires dont RBP-Jk. Cette interaction peut moduler la transactivation dépendante de EBNA2 des promoteurs cellulaires et viraux (Krauer et al., 1998), et perturbant la transactivation de EBNA2 depuis le promoteur Jk. De ce fait, les effets répresseurs

d'EBNA3A et 3C sont notamment dus à leur fixation à RBP-Jκ interférant avec celle de EBNA2 (Robertson et al., 1996; Waltzer et al., 1996). EBNA3C peut interagir avec l'histone deacétylase humaine 1 (HDAC1), qui contribue aussi à la répression transcriptionnelle du promoteur Cp par RBP-Jκ (Radkov et al., 1999). EBNA3C peut interagir avec pRb pour favoriser la transformation (Parker et al., 1996), et a également un effet plus direct sur le cycle cellulaire car elle supprime l'arrêt en G2/M, normalement observé après l'action d'agents génotoxiques. EBNA3C pourrait aussi contribuer à l'accumulation de dommages à l'ADN (Wade and Allday, 2000). EBNA3B peut induire l'expression de la vimentine et du CD40 (Silins and Sculley, 1994), tout en diminuant l'expression du marqueur CD77 dans des lymphocytes B EBV- (Gb3 ou BLA, marqueur B du centre germinatif) (Silins and Sculley, 1994).

V.1.3- La protéine EBNA1

Les transcrits d'ARNm codant la protéine EBNA1, sont initiés à partir de Wp lors de la circularisation du génome viral afin de former l'épisome viral. Ensuite, comme pour les autres protéines de la famille des EBNA, la transcription passe sous le contrôle du promoteur Cp. Ces transcrits primaires très longs (50 à 70 kb), contiennent les séquences codantes de EBNA1 mais également des autres protéines EBNA. EBNA1 est la seule protéine produite dans les latences de type I et II. Dans ces dernières, les promoteurs Cp et Wp sont éteints par méthylation, et le promoteur Qp (sans boîte TATA) peut prendre la suite de la transcription (Schaefer et al., 1997). Ce promoteur Qp ne permet que l'expression de EBNA1. Qp est régulé d'une part, par EBNA1 en fonction du cycle cellulaire, et d'autre part, par la voie de signalisation JAK (Janus Kinase)/STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) initiée par plusieurs cytokines ou facteurs de croissances, tels que le TGF-β, l'IL-6 ou l'EGF (Chen et al., 2001; Davenport and Pagano, 1999; Liang et al., 2000). Il existe un quatrième promoteur permettant la transcription de EBNA1, le promoteur Fp activé lors du cycle lytique.

EBNA1 est une phosphoprotéine nucléaire possédant des propriétés de fixation à l'ADN. Elle est constituée : d'un domaine N-terminal basique riche en un motif répétitif peptidique glycine-alanine (gly-ala), d'un domaine court également basique contenant un signal de localisation nucléaire (NLS), et d'un domaine C-terminal hydrophobe contenant des domaines de dimérisation et de fixation à l'ADN. Le motif peptidique gly-ala varie en taille dans différents isolats d'EBV. Cette protéine est indispensable à la réplication et au maintien à l'état épisomal du génome de l'EBV. Ce maintien est réalisé par la fixation conjointe de

EBNA1 sur l'origine de répllication virale du plasmide, OriP (Kieff et Rickinson, 2001) et sur les chromosomes de la cellule hôte lors de la mitose (Leight and Sugden, 2000; Wu et al., 2002).

Les fonctions de EBNA1 et sa localisation nucléaire sont dues à ses modifications post-traductionnelles. Au niveau de sa région centrale riche en motifs glycine-arginine, la méthylation de certaines arginines permet sa localisation dans les nucléoles. La phosphorylation des sérines régule ses propriétés de transactivateur et de maintien du génome viral (Shire et al., 2006). De plus, en fonction de la sérine ciblée dans le site NLS de EBNA1, la phosphorylation des sérines diminue ou augmente le transport du cytoplasme vers le noyau contrôlé par l'importine $\alpha 5$ (Kitamura et al., 2006).

EBNA1 peut également interagir avec deux sites situés immédiatement en aval du Qp, le promoteur utilisé pour induire l'expression de EBNA1 dans certaines tumeurs, régulant de par conséquent négativement sa propre expression (Nonkwelo et al., 1996). EBNA1 peut agir comme un transactivateur transcriptionnel de promoteurs des gènes viraux et cellulaires (Hebner et al., 2003). Cette protéine peut suractiver le promoteur Cp et le promoteur de LMP1 (Kieff et Rickinson, 2001).

Le domaine de répétition gly-ala (GAR pour « Glycine-Alanine Repeat) en N-terminal est un inhibiteur en cis de la présentation restreinte par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) et semble inhiber le processus d'apprêtement de l'antigène par l'intermédiaire de la voie de l'ubiquitine/protéosome (Levitskaya et al., 1995). En effet, cette région GAR empêche la dégradation de EBNA1 par le protéasome.

L'EBV réduit sa production de peptides via les DRiP (Defective Ribosomal Products). Les DRiP sont les produits « imparfaits » issus de la machinerie de traduction. Ils constituent à peu près un tiers des protéines nouvellement synthétisées qui sont très rapidement dégradées (dans les 30 minutes) après leur synthèse. Les différentes formes de DRiP incluent les protéines « mal formées » mais proprement traduites ainsi que les polypeptides résultant des erreurs de fidélité de la machinerie de transcription et de traduction. Beaucoup d'arguments convergent pour faire des DRiP, la principale source de peptides associés aux molécules du CMH I (Princiotta et al., 2003; Yewdell et al., 1996). Dans une étude de Yin et al., il a été montré que c'est probablement l'initiation de la traduction de la protéine EBNA1 qui est inhibée. De plus, ce serait la séquence GAR qui serait directement responsable de cette inhibition (Yin et al., 2003) (Figure 35). De cette façon, aucun peptide DRiP provenant de la protéine EBNA1 ne peut être produit, empêchant par conséquent l'apprêtement de l'antigène EBNA1.

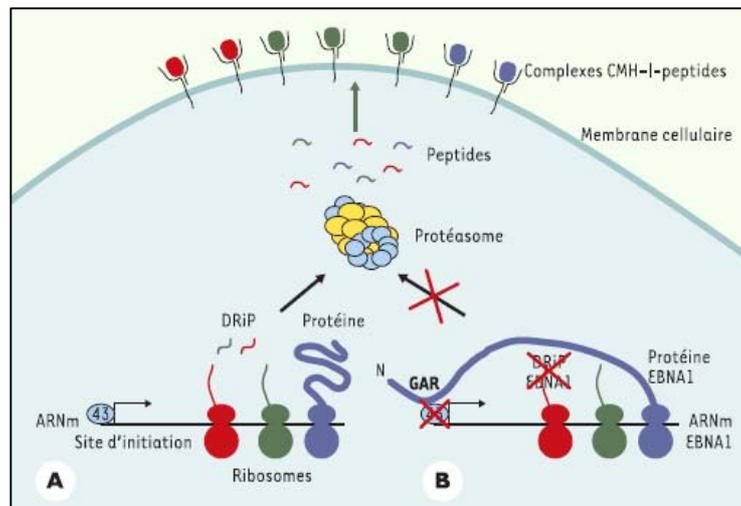


Figure 35 : Production de peptides dérivant de la protéine EBNA1. (A). Les ribosomes traduisent l'information génétique à partir d'ARNm (les trois couleurs correspondent aux différentes phases de lecture). La source majeure de peptides endogènes provient des DRiP (Defective Ribosomal Products). Les DRiP sont la conséquence des imperfections de la machinerie de traduction. Les différentes formes de DRiP incluent les protéines «mal formées» mais proprement traduites et les polypeptides résultant des erreurs de « fidélité » de la machinerie de transcription et de traduction. Les DRiP sont ensuite dégradés par le protéasome afin de produire les peptides s'associant aux molécules du CMH I. Ces complexes CMH I-peptides sont alors transportés jusqu'à la surface cellulaire où ils induisent une stimulation des lymphocytes T. (B) Dans le cas de l'EBV, la protéine EBNA1 contient une séquence appelée GAR localisée dans sa partie N-terminale inhibant sa propre synthèse protéique en bloquant l'initiation de la traduction. De cette façon, la région GAR permet qu'aucun peptide ne peut être produit par les DRiP. Il en résulte l'absence de réponse des lymphocytes T cytotoxiques contre la protéine EBNA1 (Manoury and Fahraeus, 2004).

De ce fait, aucun peptide antigénique ne pourrait être présenté, via le CMH I dépendant de TAP (Transporter Associated Proteins) aux lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (CTLs). EBNA1 serait donc protégé contre sa présentation endogène, lui donnant une longue demi-vie (Levitskaya et al., 1997). EBNA1 participe au contrôle de l'immunité anti-virale (Falk et al., 1995a; Falk et al., 1995b; Levitskaya et al., 1997). Cependant, certaines études ont démontré que EBNA1 peut être présenté par cross-présentation et être ainsi identifié par les lymphocytes T CD8 et CD4. En effet, ces études ont montré que des LCLs présentant *in vitro*, des peptides exogènes EBNA1 via le CMH-I de façon indépendante du transporteur TAP par phagocytose ou macropinocytose, sont lysés par des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ (CTLs) provenant d'individus séropositifs pour l'EBV (Lautscham et al., 2003a; Lautscham et al., 2003b). *In vivo*, la phagocytose ou la macropinocytose de corps apoptotiques ou des débris cellulaires par les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles (les cellules dendritiques ou CPAs) est sûrement à l'origine de ces lymphocytes T cytotoxiques CTLs anti-EBNA1 (Bickham et al., 2003). De plus, il a été aussi observé, *in vivo*, des lymphocytes T CD4⁺ anti-EBNA1. Ces lymphocytes sont indispensables à l'initiation, à la régulation et au maintien d'une réponse immunitaire anti-virale (Kruger et al., 2003; Precopio et al., 2003).

Dans des souris transgéniques, l'expression directe de EBNA1 dans les lymphocytes B a comme conséquence l'émergence de lymphomes B, suggérant que EBNA1 pourrait avoir un rôle direct dans l'oncogenèse (Wilson et al., 1996). De plus, dans une lignée de NPC EBV-, l'expression de EBNA1 augmente ses propriétés tumorigènes et métastatiques (Sheu et al., 1996; Wilson et al., 1996). D'après ces quelques études, EBNA1 serait important pour la transformation cellulaire. Cependant, les travaux de Kang et al. contredisent clairement ce pouvoir tumorigène, puisqu'ils n'observent aucun phénotype tumoral chez les souris transgéniques pour EBNA1 (Kang et al., 2001; Kang et al., 2005).

Des travaux antérieurs ont prouvé que l'expression stable de EBNA1 dans des cellules épithéliales exige un environnement cellulaire indifférencié (Knox et al., 1996). Cette expression peut être toxique dans certaines lignées cellulaires. Ceci pourrait expliquer pourquoi l'infection de l'EBV peut apparemment être tolérée dans certaines dysplasies épithéliales ou certaines tumeurs épithéliales malignes, mais n'est pas observé *in vivo*, dans les cellules épithéliales normales. De plus, une étude a montré par transfection de EBNA1, dans des lignées cellulaires de lymphome de Burkitt non infectées par l'EBV, que l'expression de EBNA1 peut également inhiber l'apoptose induite par p53 en absence du génome viral. Ainsi, cette équipe démontre que EBNA1 est essentiel pour la survie cellulaire de ces lymphocytes B EBV+. EBNA1 provoque donc la survie cellulaire d'autres tumeurs de lymphocytes B associées à l'EBV (Kennedy et al., 2003).

Des travaux très récents de Hong et al. ont montré par RNAi spécifique de EBNA1 que l'inhibition des fonctions de EBNA1 dans des lignées cellulaires Raji de lymphomes de Burkitt EBV positives peut inhiber la prolifération cellulaire, celle-ci exigeant les fonctions de EBNA1 pour proliférer (Hong et al., 2006). Une autre étude a confirmé ce rôle dans la croissance et la survie cellulaire dans des lignées de cellules tumorales EBV positives (Yin and Flemington, 2006). Par conséquent, EBNA1 a bien un rôle dans la prolifération cellulaire des LCLs infectées par l'EBV.

V.2- La famille des protéines LMPs

La famille des protéines latentes de membrane de l'EBV se compose d'une part, de la protéine LMP1, qui est codée par le gène BNLF1 grâce à son promoteur situé dans la région U5 du génome viral, et d'autre part, des protéines LMP2A et LMP2B qui ont des promoteurs situés dans une région de 3 Kpb à l'extrémité droite du génome viral.

V.2.1- La protéine LMP1

LMP1 (Latent Membrane Protein 1) est la protéine transformante majeure de l'EBV et se comporte comme un oncogène puissant pouvant permettre la transformation cellulaire par l'EBV des cellules épithéliales ou lymphocytaires B ou T. La protéine LMP1 est une protéine transmembranaire qui est un homologue fonctionnel du CD40. Le CD40 possède la capacité d'augmenter *in vivo* et *in vitro* la croissance et la survie des lymphocytes B, et permet d'autre part d'effectuer la commutation de classe des chaînes des immunoglobulines. LMP1 est activée de façon constitutive permettant d'induire différentes signalisations cellulaires engendrant la prolifération cellulaire. Les transcrits d'ARNm de LMP1 peuvent être initiés à partir de deux promoteurs différents : un promoteur proximal, pLMP1 (ou ED-L1), et un promoteur distal, TR-L1 situé dans les TR du génome viral.

V.2.2- Les protéines LMP2s

Le gène LMP2 est transcrit en deux ARNm différents, après circularisation du génome viral à partir de deux promoteurs bien distincts (Figure 29). En effet, la transcription des ORF LMP2A et LMP2B se fait spécifiquement au travers des TRs. Ces deux transcrits vont être ensuite traduits en deux protéines différentes, LMP2A composée de 497 aa et LMP2B de 378 aa. Ces deux transcrits sont composés de 9 exons pour LMP2A et 8 exons pour LMP2B et partagent en commun 8 exons, les exons 2 à 9 (Figure 36). L'exon 1, quant à lui, code le domaine N-terminal cytoplasmique hydrophile de LMP2A. L'exon 1 de LMP2B est non codant, la traduction ne commençant qu'à partir de l'exon 2 commun aux deux ARNm (Laux et al., 1989; Laux et al., 1988; Sample et al., 1989). Les exons restants codent les 12 domaines transmembranaires, ainsi que les 27 aa de la partie C-terminale qui est hydrophile.



Figure 36 : Représentation schématique de la localisation des gènes codant les protéines LMP2A, LMP2B et LMP1 (D'après (Brinkmann and Schulz, 2006))

Les protéines LMP2A et LMP2B sont co-localisées sous forme d'agrégats, avec LMP1 dans les radeaux lipidiques ou « rafts » (Higuchi et al., 2001; Longnecker et al., 2000). Une grande partie des études réalisées à ce jour, porte sur LMP2A qui aurait de nombreux rôles dans la persistance et le maintien de l'EBV dans certains lymphocytes B de l'organisme.

V.2.2.1- Structure de LMP2A

LMP2A est une protéine transmembranaire de 497 aa. Elle est composée d'une petite partie C-terminale de 27 aa, d'une région très longue de 12 domaines transmembranaires, et enfin d'un long domaine N-terminal cytoplasmique de 119 aa responsable des fonctions de la protéine.

Le domaine N-terminal de LMP2A possède 8 résidus tyrosine, dont certains vont être phosphorylés de manière constitutive (Longnecker et al., 1991; Longnecker and Kieff, 1990). LMP2A contient un motif Y₁₁₂EEA, homologue au motif EEXXYEEV/I du domaine SH2-B (Src-homology 2-binding) fixant le domaine SH2 des tyrosines kinases, qui appartiennent à la famille des Src kinases (PTKs) (Songyang et al., 1994a; Songyang et al., 1993; Songyang et al., 1994b). Ce motif Y₁₁₂EEA est aussi homologue au site de fixation de la protéine tyrosine kinase (PTK) Lyn (Fruehling et al., 1998). Les résidus tyrosine Y₇₄QPL et Y₈₅LGL de LMP2A forment des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activator Motif). Ces motifs ITAMs sont présents dans une grande variété d'immunorécepteurs (ou récepteurs immunologiques) cellulaires, tels que les récepteurs antigéniques des lymphocytes B (BCR, B-Cell Receptor) et lymphocytes T (TCR, T-Cell Receptor), et jouent un rôle central dans la transduction du signal de ces récepteurs (Benschop and Cambier, 1999). LMP2A est phosphorylée *in vivo* sur des résidus sérine et thréonine (Longnecker et al., 1991) et est associée *in vivo* à la MAP kinase (MAPK) Erk1. Cette MAPK peut *in vitro*, phosphoryler LMP2A sur ses résidus sérines S₁₅ et S₁₀₂ (Panousis and Rowe, 1997).

Ce domaine N-terminal possède aussi plusieurs motifs SH3-B (SH3-Binding) (Pawson and Gish, 1992) et des sites d'interaction pour les domaines WW (Sudol, 1996). Les motifs SH3-B sont des régions riches en proline identifiées par des protéines portant les domaines SH3 non-catalytiques. Les domaines WW se composent de paires de résidus tryptophane séparés par 20 à 22 aa et se lient spécifiquement au motif XPPXY, que possède LMP2A (PPPPY60 et PPPPY101). Jusqu'ici, il n'a été rapporté aucune protéine possédant ce domaine SH3 qui interagirait avec LMP2A par SH3-B. Plusieurs membres de la famille des protéines ubiquitine ligases Nedd4-like de type E3 peuvent se fixer à LMP2A sur ses motifs PPPPY (Ikeda et al., 2003; Ikeda et al., 2000; Ikeda et al., 2001; Ikeda et al., 2002; Longnecker, 2000; Portis et al., 2004; Portis and Longnecker, 2004; Winberg et al., 2000).

V.2.2.2- Fonction de LMP2A

Bien que LMP2A ne soit pas essentielle à la transformation des lymphocytes B, *in vitro*, elle induit un signal de survie permettant aux lymphocytes B d'échapper à leur propre mort. En effet, dans les centres germinatifs, en absence de sélection par le BCR, les lymphocytes B vont mourir par apoptose (Caldwell et al., 2000; Caldwell et al., 1998; Merchant et al., 2001; Tierney et al., 1994). Dans les lignées cellulaires de lymphome de Burkitt, LMP2A inhibe l'apoptose induite par le BCR, probablement par l'inhibition de l'activation des tyrosines kinases induite par l'activation du BCR (Fukuda and Longnecker, 2005). LMP2A séquestre grâce à ses motifs ITAMs, les tyrosines kinases Lyn et Syk nécessaires à la signalisation du BCR (Figure 37). LMP2A recrute également les ligases (E3) qui vont ubiquitinyler Lyn et Syk, et donc activer leur dégradation en même temps que la dégradation de LMP2A par le protéasome (Ikeda et al., 2000; Winberg et al., 2000). LMP2A peut également empêcher l'entrée du BCR dans les rafts, où le BCR initialise sa signalisation sélectionnant les lymphocytes B (Dykstra et al., 2001). Ainsi, en bloquant la voie du BCR, LMP2A inhibe le passage de la latence virale au cycle lytique, normalement induit par la signalisation du BCR (Longnecker, 2000; Miller et al., 1994a; Miller et al., 1994b). Comme LMP2A est exprimée dans la majorité des lymphocytes B infectés par l'EBV, elle permet donc à ces cellules de rester en état de latence virale.

Dans des souris transgéniques pour LMP2A, LMP2A provoque l'altération du développement normal des lymphocytes B. cette altération est caractérisée par un blocage des réarrangements des gènes codant les immunoglobines de surface ayant comme conséquence de provoquer une absence du BCR à la surface des lymphocytes B. Les lymphocytes ne comportant plus de BCR à leur surface meurent rapidement par apoptose. Cependant, les lymphocytes B provenant des souris transgéniques LMP2A⁺ se développent et survivent sans BCR. Chez les souris chimères provenant du croisement des souris LMP2A⁺ avec des souris RAG KO (dont le gène Recombinase Activating gene 1 est délété), tous les lymphocytes B BCR-négatifs se développent et survivent dans la périphérie. Ces données indiquent que LMP2A donne les signaux de survie nécessaires à la survie des lymphocytes B *in vivo* (Caldwell et al., 1998). Dans des souris transgéniques LMP2A ITAM mutée, les lymphocytes B se développent normalement, bien que l'expression du transgène soit comparable à celle précédemment décrite dans les lymphocytes B provenant de souris transgéniques LMP2A⁺. De plus, les souris chimériques provenant du croisement des souris LMP2A ITAM mutée avec des souris RAG^{-/-} ne favorisent pas le développement ou la survie des lymphocytes B.

Ces résultats démontrent que le motif ITAM de LMP2A est bien exigé, *in vivo*, pour le développement et la survie des lymphocytes B (Merchant et al., 2000).

L'inhibition de l'apoptose peut être liée aussi à l'activation de la sérine-threonine kinase Akt par LMP2A (Figure 37) (Scholle et al., 2000; Swart et al., 2000). En effet, il a été montré que l'activation constitutive de Akt, délivre un signal anti-apoptotique, par l'intermédiaire de la PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) qui participe à l'immortalisation des lymphocytes B (Brennan et al., 2002) (Figure 37).

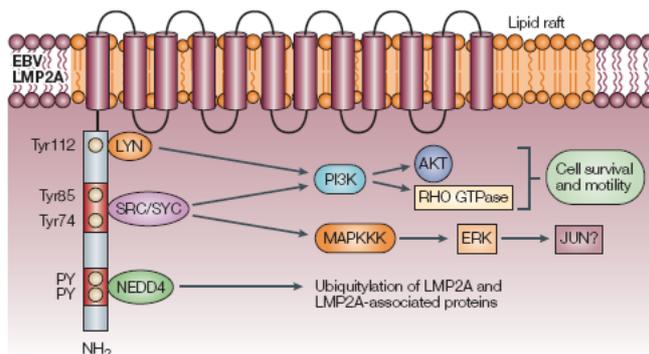


Figure 37 : Structure et fonction de LMP2A
(D'après (Young and Rickinson, 2004))

L'analyse par puces à ADN ou « cDNA microarrays » des transcriptomes, de lymphocytes B primaires provenant de souris transgéniques LMP2A positives, de lignées lymphocytaires B exprimant LMP2A et de LCLs ont indiqué que LMP2A a de multiples effets sur l'expression globale des gènes. Ainsi, LMP2A augmente l'expression des gènes associés au cycle cellulaire et à l'inhibition de l'apoptose. Cette protéine altère l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme de l'ADN et de l'ARN, et diminue aussi l'expression de facteurs spécifiques des lymphocytes B et des gènes associés à l'immunité (Portis et al., 2003; Portis et al., 2004; Portis and Longnecker, 2003; Portis and Longnecker, 2004). Ces altérations reflètent notamment, ceux décrits dans les cellules de Reed-Sternberg présentes dans les lymphomes de Hodgkin, dans lesquelles les transcrits de LMP2A ont été identifiés (Portis et al., 2003; Thorley-Lawson, 2001).

LMP2A est également capable de participer à la transformation des cellules épithéliales, notamment grâce à l'activation des voies de signalisation cellulaire PI3K/Akt et β -caténine (Morrison and Raab-Traub, 2005), mais également à leur pouvoir métastatique (Pegtel et al., 2005). En effet, l'équipe de Scholle et al. a montré que l'expression de LMP2A dans des kératinocytes aboutit à un phénotype transformé, *in vitro*, avec une prolifération des différents clones en agar mou et un arrêt de la différenciation cellulaire. Cette équipe a montré également, *in vivo*, que l'expression de LMP2A permet l'induction de tumeurs et de métastases (Scholle et al., 2000). Ceci pourrait suggérer un rôle de LMP2A, dans la formation de métastases dans les carcinomes associés à l'EBV, au moins dans les cellules épithéliales.

V.2.3- Les ARNs viraux EBERs et BARTs

Les ARNs EBERs (EBV Encoded RNAs) sont de petits ARN nucléaires non polyadénylés. Il existe 2 ARN différents, EBER1 de 166 bases et EBER2 de 172 bases, qui sont tous les deux transcrits préférentiellement par l'ARN polymérase III, et secondairement par l'ARN polymérase II. La séquence codante est localisée dans la région BamHI C du génome viral. La particularité de ces petits ARN est leur très grande quantité (10^5 à 10^7 copies par cellule). De plus, ils sont complexés à des protéines nucléaires pour former des complexes ribonucléoprotéiques très stables. Cet assemblage leur confère une structure secondaire en trèfle comparable aux ARN de transfert (Figure 38). Ces ARNs EBERs semblent être impliqués dans l'épissage des transcrits EBNAs et LMPs. De plus, ils sont impliqués dans des mécanismes anti-apoptotiques et peuvent inhiber les effets anti-viraux de l'IFN α et l'IFN γ , et induire la production d'IL-10, probablement par le biais de l'inhibition de la protéine PKR (double stranded RNA-activated Protein Kinase) (Sharp et al., 1999; Yamamoto et al., 2000).

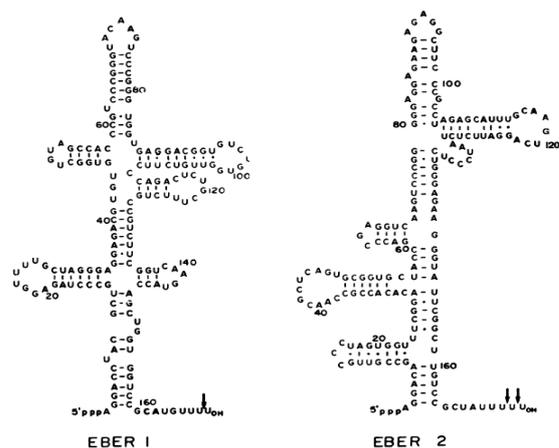


Figure 38 : Structures secondaires potentielles des ARNs EBER (EBER1 et EBER2).

(D'après (Takada and Nanbo, 2001))

Les ARNs BARTs (Rightward Transcrits of the BamHI A region) qui sont présents dans toutes les latences virales de l'EBV, comportent dans leur extrémité 3' terminale, un cadre de lecture ouvert, BARF0. *In vivo*, l'expression de la protéine BARF0 associée à ces ARNs n'a jamais été retrouvée (van Beek et al., 2003; van Beek et al., 2002). Cependant, *in vivo*, cette protéine a été détectée grâce à la présence d'anticorps anti-BARF0, ainsi que de lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ spécifiques de l'antigène BARF0 (Kienzle et al., 1999; Kienzle et al., 1998). *In vitro*, des études réalisées à partir d'une protéine BARF0 recombinante, ont montré son implication dans l'activation de LMP1, en absence de EBNA2 (Kusano and Raab-Traub, 2001). Cette activation est probablement dépendante de son interaction avec le facteur Notch (Kusano and Raab-Traub, 2001). De plus, ces études ont montré, que cette protéine possède une demi-vie très courte, pouvant expliquer l'absence de

sa détection *in vivo*. D'autres cadres de lecture ouverts possibles dans les ARNs BARTs, existent comme BARF1 (homologue soluble du récepteur au CSF-1 (Colony Stimulating Factor 1)), dont l'expression est restreinte aux tumeurs d'origines épithéliales (Strockbine et al., 1998). Cette protéine est sécrétée de façon abondante et possède des propriétés oncogéniques d'un facteur de croissance surexprimé (Busson et al., 2004).

VI. Les différentes latences virales

Le profil d'expression des gènes de latence n'est pas identique dans tous les types cellulaires infectés par l'EBV (Figure 39). On distingue ainsi 4 types de latence en fonction des différents gènes exprimés. Dans chacune d'elle, les ARNs, EBER1, EBER2 et BARTs sont présents.

➤ La latence de type I est retrouvée dans les lymphomes de Burkitt et se caractérise par la seule expression de EBNA1. Les cellules en latence I possèdent un phénotype cellulaire particulier avec l'expression à leur surface des marqueurs CD10 et CD77, et presque pas ou pas du tout d'antigènes d'activation cellulaire et de molécules d'adhésion (Cirone et al., 1995; Gregory et al., 1990). Toutefois *in vitro*, la latence I dans des lignées de lymphomes de Burkitt maintenues en culture n'est pas stable. On peut constater un changement du profil d'expression des gènes de latence dans ces cellules, ainsi que du phénotype cellulaire aboutissant à une latence de type III (Cirone et al., 1995; Gregory et al., 1990).

➤ La latence de type II est caractéristique du carcinome indifférencié du nasopharynx, de la maladie de Hodgkin et des lymphomes T. Elle se caractérise par l'expression des protéines EBNA1, LMP1, LMP2A et LMP2B.

➤ La latence de type III est rencontrée dans les LCLs transformées, *in vitro*, par l'EBV et dans les lymphoproliférations des sujets immunodéprimés. Elle s'accompagne de l'expression des 9 protéines de latences, EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, EBNA-LP, LMP1, LMP2A et LMP2B. Dans cette latence III, c'est le promoteur Wp qui va permettre la transcription de certains de ces gènes viraux. Ainsi, Wp permet l'expression des protéines EBNA2 et EBNA-LP essentielles à l'initiation de la prolifération autonome des lymphocytes B (Krauer et al., 1999; Lin et al., 2002; Wang et al., 1990b). Par la suite, c'est le promoteur viral Cp qui va prendre le relais pour transcrire les gènes viraux de la famille des EBNA. La protéine EBNA2, ainsi exprimée, va permettre la transcription des protéines LMP2A et 2B, ainsi que LMP1 et les petits ARNm EBERs et BARTs, permettant l'établissement du

programme de latence III de l'EBV. Le promoteur Qp, quant à lui, n'est plus activé durant cette latence virale.

A côté de ces trois latences caractéristiques de plusieurs pathologies malignes associées à l'EBV, on retrouve la latence de type 0 spécifique des lymphocytes B mémoires au repos, *in vivo*. Aucune protéine virale n'est exprimée dans ces cellules. Seuls les ARNs EBERs et les ARNm codant LMP2A et EBNA1 sont transcrits, et aucune protéine virale n'est détectée (Babcock et al., 2000; Hochberg et al., 2004; Laichalk et al., 2002).

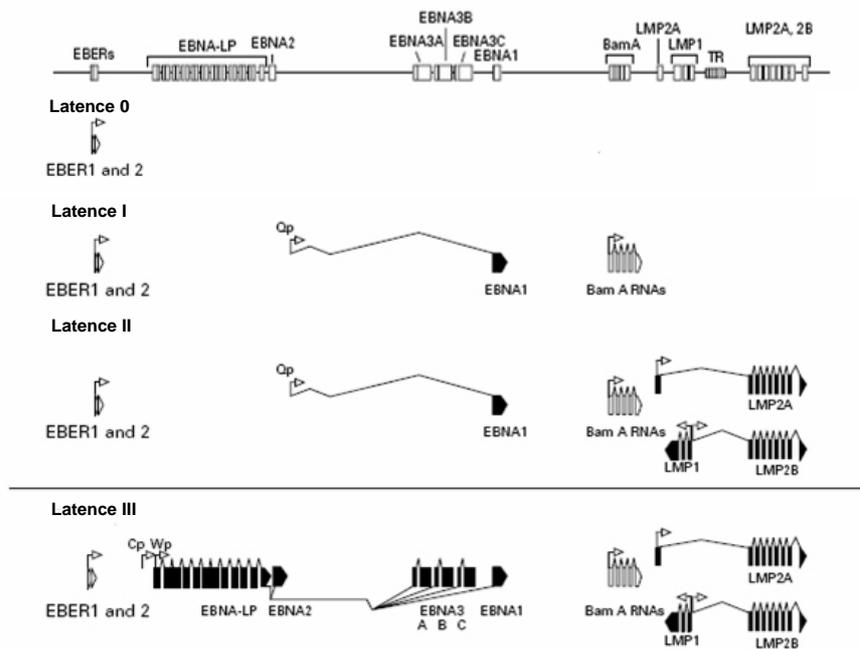


Figure 39 : Profil d'expression des gènes viraux de l'EBV en fonction des différents types de latence. Le haut de la figure montre la position des exons sur une carte linéaire du génome viral. Le reste de la figure montre la direction de la transcription de chaque promoteur (flèches) et les épissages des différents exons. Les exons codants sont en noir sur la figure et les non-codants en blanc. EBER (EBV encoded small RNA) ; EBNA (EBV encoded nuclear antigen) ; LP (Leader Protein) ; LMP (Latent Membrane Protein) ; TR (Terminal Repeat). (D'après (Hochberg et al., 2004; Young et al., 2000)).

VII. Le cycle lytique

La fréquence avec laquelle les lymphocytes B infectés de façon latente deviennent permissifs à la réplication virale, est de l'ordre de 2 à 10% des cellules présentes dans les LCLs. Cette fréquence peut être influencée par des conditions de culture spécifiques. Les meilleurs inducteurs provoquant l'entrée dans la phase lytique de ces cellules sont les esters de phorbol, le butyrate de sodium, la 5-azacytidine ou un vecteur permettant l'expression de la protéine Zta/ZEBRA/EB1 (Z Epstein-Barr Replication Activator).

La répression du cycle lytique est due à l'expression des protéines de latence virale. LMP1 active constitutivement la voie de signalisation NF- κ B. Le niveau d'activité de NF- κ B

est très élevé. Par conséquent, le niveau élevé de l'activité NF- κ B induite par LMP1 empêcherait le passage de la latence virale au cycle lytique (Brown et al., 2003), en bloquant simultanément l'expression ainsi que l'activité de la protéine Zta/EB1 (Ahsan et al., 2005). Les travaux de Ahsan et al. ont montré que LMP1, également exprimée durant le cycle lytique, serait importante dans le relarguage des virions à la fin du cycle lytique. Il semblerait que cette induction soit indépendante de la signalisation classique induite par LMP1. En effet, dans ce cas précis, la forme lytique de LMP1 (lyLMP1) ne permettant pas d'induire la signalisation classique de LMP1, permet ce relarguage des virions. lyLMP1 est une forme tronquée de LMP1 sauvage. Elle est produite lors du cycle lytique et possède les particularités d'inhiber le signal induit par LMP1, ainsi que de diminuer la demi-vie de la protéine sauvage (Pandya and Walling, 2004).

Zta/EB1 codé par le gène BZLF1, est le commutateur induisant le passage de la latence au cycle lytique. Zta/EB1 induit sa propre expression mais aussi celle des facteurs de transcription Rta, et Mta codés respectivement par les gènes BRLF1 et BMLF1. La transfection transitoire d'un vecteur d'expression codant Zta/EB1 dans des cellules infectées par l'EBV, conduit à elle seule le cycle lytique dans ces cellules, aboutissant à la production de virions (Chevallier-Greco et al., 1986). Zta/EB1 est un facteur de transcription de la famille b-zip capable de former des homodimères (Lieberman and Berk, 1990), et qui va agir sur ses séquences spécifiques présentes au niveau des gènes cibles (Rooney et al., 1989). Zta/EB1 induit alors l'expression de Rta (Sinclair et al., 1991) et celle de tous les gènes précoces de l'EBV (Manet et al., 2003).

L'expression des protéines Zta/EB1, Rta et Mta, qui sont les antigènes très précoces du cycle lytique, va permettre l'expression d'autres antigènes précoces (EA ; Early Antigen). Ces derniers vont constituer le pool de protéines nécessaires à la formation du complexe de réplication virale et à la biosynthèse des antigènes tardifs que sont les antigènes de capsid VCA (Viral Capsid Antigen) et d'enveloppe MA (Membrane Antigen).

Dans plusieurs pathologies associées à l'EBV, comme la maladie de Hodgkin, on note parfois la présence de cellules tumorales exprimant la protéine Zta/EB1 sans que Rta et Mta, ne soient détectées. Ce profil d'expression reflète probablement une activation abortive du cycle lytique.

Les cellules permissives, durant le cycle lytique, subissent un changement cytologique. Celui-ci se traduit par la formation d'une inclusion intranucléaire, d'une « margination » de la chromatine nucléaire, de l'assemblage des capsides à l'intérieur du noyau près de la membrane nucléaire, du bourgeonnement du virus au travers de la membrane

nucléaire et enfin, de la formation de vésicules cytoplasmiques. Dans des cellules en culture, *in vitro*, le cycle lytique dure 16 à 20h (Figure 40).

In vivo, l'activation du cycle lytique est peu décrite mais a probablement lieu par l'intermédiaire de mécanismes similaires à ceux de l'activation des lymphocytes B mémoires (Thorley-Lawson, 2005). En effet, l'activation de ces lymphocytes B induit une prolifération cellulaire associée à l'amplification du virus. La différenciation de ces cellules en cellules productrices d'anticorps (plasmocytes) va rendre ces cellules compétentes pour la réplication du génome viral, et ainsi permettre la production de particules virales. De plus, ces lymphocytes B activés vont migrer à travers le tissu lymphoïde jusqu'aux cellules de la muqueuse épithéliale. Dans le cas des amygdales, les nouvelles particules virales seront donc libérer dans la salive.

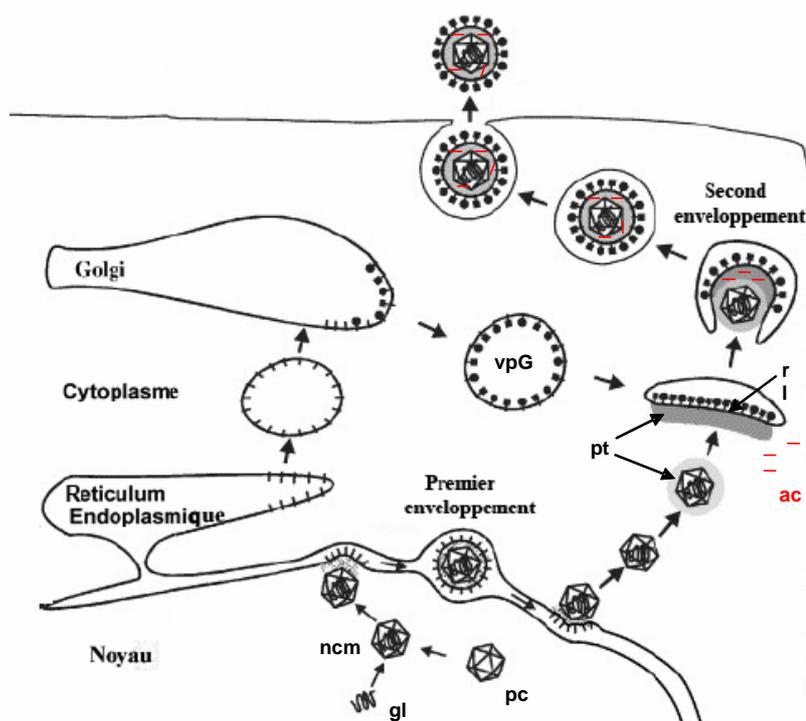


Figure 40 : Assemblage et sortie du virion de l'EBV. Les précurseurs de capsides (pc) s'assemblent dans le noyau. L'ADN viral (gl : génome viral) est alors empaqueté formant alors les nucléocapsides mûres (ncm) qui sortent du noyau par enveloppement à la membrane nucléaire interne et par désenveloppement à la membrane nucléaire externe. Les glycoprotéines virales s'accumulent dans des vésicules post-Golgi (vpG). L'enveloppement secondaire est déclenché par l'interaction de la nucléocapside et/ou des protéines du tégment (Crompton) avec les domaines intracytosoliques des glycoprotéines regroupés à un emplacement spécialisé (impliquant peut être des radeaux lipidiques – rl). Des protéines du tégment (Crompton) sont recrutées sur un échafaudage se prolongeant entre la capsidite et la membrane dans un processus pouvant impliquer les microfilaments d'actine (ac). La nucléocapside et son tégment sont finalement internalisés dans la vpG avec la membrane plasmique. (D'après (Mettenleiter, 2004)).

Partie 4 : La physiopathologie de l'infection

I. Etapes cellulaires de l'infection par le virus d'Epstein-Barr

On peut obtenir, *in vitro*, des lignées cellulaires lymphoblastoïdes B (LCLs) provenant de deux origines différentes :

- Des LCLs provenant de l'infection *in vitro* de lymphocytes B humains au repos. Cette infection aboutit à l'induction d'une activation métabolique, d'une transformation morphologique, d'une prolifération cellulaire et éventuellement, d'une immortalisation.
- Des LCLs provenant de lymphocytes B déjà infectés *in vivo*, par l'EBV à une fréquence de 1 cellule infectée sur 1 million de cellules saines, du sang périphérique d'individus séropositifs pour l'EBV (Nilsson, 1992).

Les lymphocytes B au repos, infectés *in vitro*, ont été le meilleur modèle utilisé pour étudier l'infection latente et le cycle lytique de l'EBV. La grande majorité des connaissances accumulées jusqu'à présent est basée sur ce modèle.

1.1- Infection, in vitro, des cellules lymphoïdes

Les différentes étapes de l'infection par l'EBV des lymphocytes B ont été étudiées et mises en évidence, *in vitro* (Figure 41). L'infection débute tout d'abord, par l'ancrage et la fixation de l'EBV sur le lymphocyte B contenant à sa surface le CD21 (ou CR2, récepteur du C3d du complément exprimé de façon ubiquitaire à la surface cellulaire de tous les lymphocytes B) (Fingerroth et al., 1984; Nemerow et al., 1989; Nemerow et al., 1987). Cet ancrage se fait par l'interaction du CD21 avec la gp350/220 (Fingerroth et al., 1984). Après fusion de l'enveloppe virale avec la membrane plasmique de la vésicule d'endocytose, la nucléocapside rentre dans le cytosol. Cette pénétration du virus requiert un complexe de 3 glycoprotéines virales, gH/gL/gp42 qui vont se fixer sur les cellules CD21-positives (Borza and Hutt-Fletcher, 2002; Miller and Hutt-Fletcher, 1988; Molesworth et al., 2000; Wang and Hutt-Fletcher, 1998; Wang et al., 1998).

L'internalisation des virions se fait par la coopération de la gp42 avec les molécules du CMH de classe II (allèles, DP ou DQ) co-récepteur dans l'infection des lymphocytes B par l'EBV (Haan et al., 2000; Li et al., 1997; McShane et al., 2003; Miller and Hutt-Fletcher, 1988; Molesworth et al., 2000; Wang and Hutt-Fletcher, 1998; Wang et al., 1998).

La nucléocapside migre alors dans le cytoplasme jusqu'à la membrane nucléaire, et est dégradée. Après décapsidation, le génome viral linéaire est transporté dans le noyau. Puis très rapidement, le promoteur Wp est sollicité pour la transcription de certains gènes viraux, plus de 4h après l'infection. Ce promoteur Wp permet l'expression des protéines EBNA2 et EBNA-LP, essentielles à l'initiation de la prolifération autonome des lymphocytes B (Krauer et al., 1999; Lin et al., 2002; Wang et al., 1990). Quelques heures plus tard, EBNA3A, 3B, 3C et la protéine LMP1 sont exprimés (12h après l'infection) (Figure 41).

Vingt heures après le début de l'infection, les lymphocytes B contiennent chacun quelques génomes viraux linéaires qui ne seront pas répliqués, et qui disparaîtront suite aux nombreuses divisions cellulaires, alors que le seul exemplaire de l'ADN viral circularisé présent dans chaque cellule, sera répliqué en même temps que les chromosomes cellulaires au cours de la phase S (Figure 41). Le promoteur Cp codant les gènes EBNA, et comportant des « enhancers » spécifiques d'EBNA2, va prendre alors le relais, probablement quand EBNA2 est exprimé à un niveau suffisant. On observe alors l'expression des protéines LMP2, et des petits ARN viraux, EBERS et BARTs, marquant l'établissement complet de la latence virale de type III et l'obtention d'une LCLs immortalisée capable de proliférer indéfiniment.

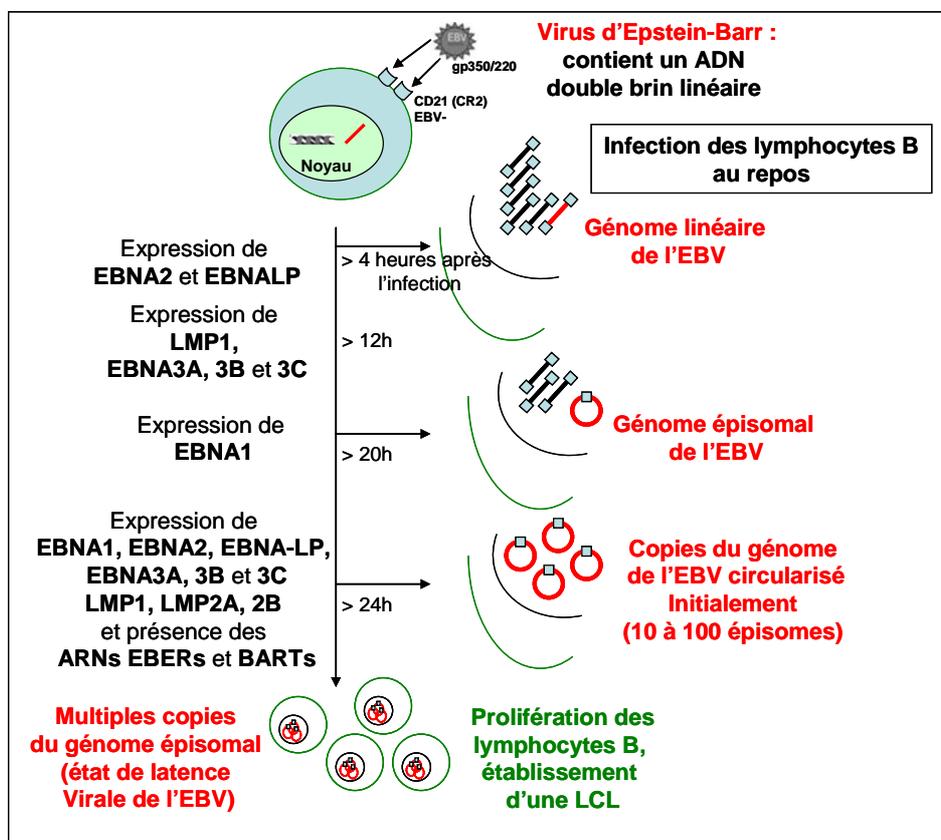


Figure 41 : Représentation schématique de l'infection, *in vitro*, par l'EBV.

Le nombre d'épisomes viraux est en moyenne de 10 à 100 copies par cellule infectée et reste stable. Chaque épisode viral est répliqué lors de la réplication cellulaire, et transmis dans chaque cellule fille suite à la division cellulaire. Dans des cas très rares, le génome viral de l'EBV peut s'intégrer au génome cellulaire. En effet, des formes intégrées et épisomiques semblent pouvoir coexister dans une même cellule (Delecluse et al., 1993; Hurley et al., 1991).

1.2- Infection, in vivo, des cellules par le virus d'Epstein-Barr

In vitro, l'EBV possède un tropisme prononcé pour les lymphocytes B auxquels il confère l'immortalité (Nilsson, 1992). *In vivo*, l'EBV peut se comporter de deux façons opposées. Après avoir infecté les lymphocytes B, l'EBV rentre en cycle lytique, après une phase de prolifération des lymphocytes B infectés, permettant ensuite, la libération des virions produits dans l'organisme. De façon opposée, l'EBV rentre directement dans un état de latence virale. Ces deux états, peuvent être corrélés avec la localisation particulière de sa cellule hôte. En effet, dans le système lymphoïde nasopharyngé (anneau de Waldeyer), comprenant les amygdales, les végétations adénoïdes, les ganglions régionaux, l'EBV est plus répliquatif, tandis que dans la circulation périphérique, il reste complètement latent.

Par conséquent, dans les amygdales, on peut distinguer deux types d'infection virale : l'infection aiguë et l'infection persistante (Figure 42 et 43).

1.2.1- Le cycle de l'EBV, in vivo

Pendant l'infection aiguë, l'EBV provenant de la salive échangée lors d'un baiser avec un individu contaminé, peut entrer à l'intérieur des cryptes des amygdales et s'infiltrer, suivant un mécanisme encore inconnu, au travers de la fine couche de l'épithélium recouvrant les lymphocytes. Pour expliquer ce passage au travers de l'épithélium, deux hypothèses ont été avancées :

- Le virus infecte en premier lieu, les cellules épithéliales présentes dans l'épithélium oropharyngé (premiers hôtes du virus), entraînant la formation d'un foyer de réplication lytique. Ce foyer permet une libération plus importante de virions, qui à leur tour, infectent les lymphocytes B circulants près de la muqueuse (deuxième hôte mais cette fois définitif du virus). Cependant, les cellules épithéliales infectées par l'EBV n'ont jamais été détectées dans les amygdales de sujets ayant contracté une MNI, alors que des lymphocytes B infectés sont régulièrement observés (Anagnostopoulos et al., 1995).

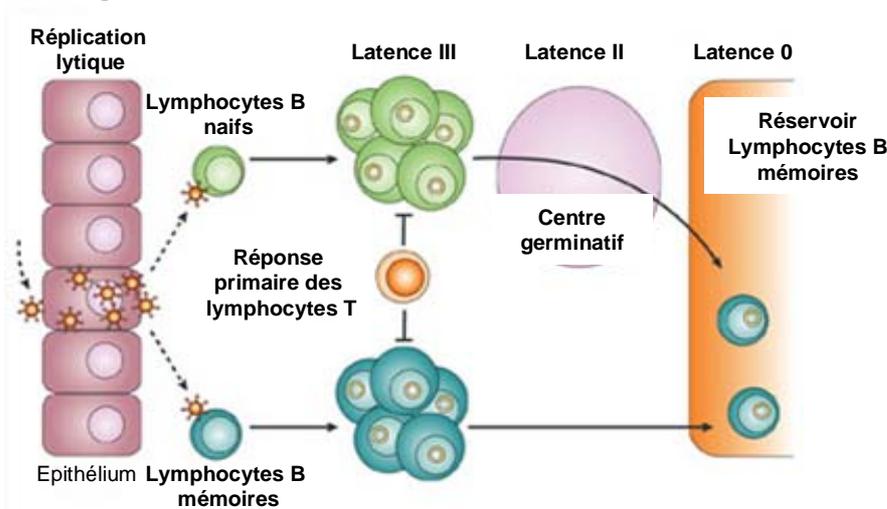
- L'EBV infecte directement les lymphocytes B de l'oropharynx, affleurant les muqueuses. Cette hypothèse peut être soutenue par la présence de cryptes dans l'épithélium de l'anneau de Waldeyer (Cesarman, 2002; Faulkner et al., 2000; Schuster and Muschen, 2003). Les lymphocytes B naïfs infectés par l'EBV se localisent directement sous l'épithélium des amygdales (Babcock et al., 2000; Babcock and Thorley-Lawson, 2000; Joseph et al., 2000a; Joseph et al., 2000b).

Suite à cette infection, les lymphocytes B expriment toutes les protéines de latence (EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, LP, LMP1, LMP2A et 2B (Ling et al., 1994)), constituant le programme de latence de type III. Celui-ci est associé à la prolifération autonome des lymphocytes B, comme dans des LCLs.

Ces lymphocytes B infectés par l'EBV en latence III provoquent une réponse immunitaire primaire des lymphocytes T spécifiques des antigènes de la latence III. Cette réponse immune primaire détruit une très grande majorité de lymphocytes B infectés par l'EBV. Les cellules survivantes échappent à cette destruction par la diminution d'expression de leurs protéines de latence.

In situ, les lymphocytes B EBV+ sont retrouvés également dans les centres germinatifs des amygdales. Les travaux d'Uchida et al. sur les souris transgéniques LMP1 suggèrent que les lymphocytes B LMP1+ ne peuvent former des centres germinatifs (Uchida et al., 1999). Cependant, il est possible que les lymphocytes B nouvellement infectés par l'EBV dans les zones inter-folliculaires et ayant échappés à la cytotoxicité T CD8+ et NK puissent migrer dans des centres germinatifs déjà formés, puisqu'ils ont pu être détectés avec un état de latence II LMP1+. En ce sens, les lymphocytes B EBV+ et les lymphocytes B EBV+ d'un autre centre germinatif ne sont pas clonalement reliés.

A Infection aiguë



B Infection persistante

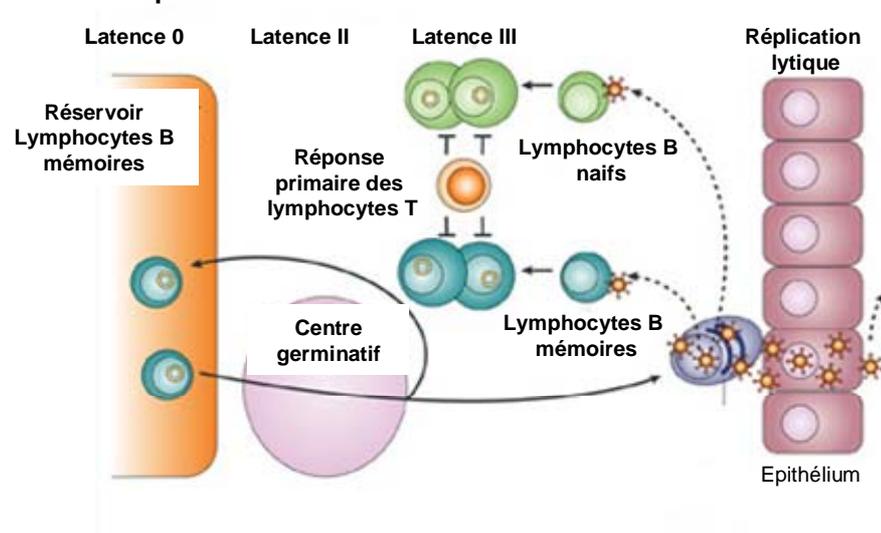


Figure 42 : Modèle de l'infection *in vivo* par l'EBV. (A) Infection aiguë. (B) Infection persistante (voir texte pour détails) (D'après (Young and Rickinson, 2004)).

Par la suite, dans les centres germinatifs, ces lymphocytes B EBV+ changent de programme d'expression des gènes viraux. Ainsi, EBNA2 bloquant en principe la différenciation des lymphocytes B, ne va plus s'exprimer. Le programme de latence II, où seuls EBNA1, LMP1, LMP2A et LMP2B sont exprimés (Babcock et al., 2000; Babcock and Thorley-Lawson, 2000) se met en place. Dans ces centres germinatifs, les lymphocytes B non infectés subissent généralement une sélection conduisant les cellules non affines pour l'antigène à leur propre mort par apoptose. Quant aux lymphocytes B sélectionnés, ils poursuivent leur maturation et leur différenciation pour atteindre le stade de lymphocyte B mémoire. Ces lymphocytes B sélectionnés échappent à l'apoptose grâce à deux événements essentiels. D'une part, l'activation du BCR par un antigène de forte affinité, et d'autre part, l'activation du CD40 par le CD40L de cellules dendritiques et/ou de lymphocytes T Th2. Les

lymphocytes B infectés par l'EBV présentant une latence II échappent à l'apoptose grâce à l'expression de LMP1 et LMP2A, qui miment respectivement, le récepteur CD40 et l'activation du BCR (Gires et al., 1997; Kilger et al., 1998; Longnecker, 2000; Miller et al., 1995; Miller et al., 1994a; Miller et al., 1994b; Uchida et al., 1999; Zimmer-Strobl et al., 1996).

Dans le sang périphérique, l'EBV est détecté à une fréquence de 0,5 à 50 lymphocytes B sur un million, leur phénotype est alors CD19⁺, CD23⁻, s(surface)Ig⁺ mais sIgD⁻ (Babcock et al., 1998). Aucune protéine virale n'est exprimée dans ces cellules. Seuls les messagers des protéines EBNA1 et LMP-2a sont parfois détectés. Ce profil est caractéristique du programme latence de type 0 (Miyashita et al., 1997; Qu and Rowe, 1992).

I.2.2- La persistance virale

Quand les lymphocytes B mémoires infectés par l'EBV présents dans le sang périphérique, retournent dans l'amygdale, probablement sous l'effet de chemokines, le programme de latence de type II se met en place sous l'induction d'un signal restant encore inconnu (Babcock et al., 2000; Babcock and Thorley-Lawson, 2000; Joseph et al., 2000a). LMP1 et LMP2A s'expriment (Figure 42 et 43). Occasionnellement, l'EBV présent dans ces cellules rentre dans le cycle lytique, conduisant à la libération de virions dans la salive. Ces virions infectent de nouveaux lymphocytes B (Anagnostopoulos et al., 1995; Niedobitek et al., 1992; Rickinson and Lane, 2000), assurant ainsi, la persistance de l'EBV dans l'organisme. *In vivo*, le cycle lytique est réactivé par des signaux qui sont encore mal connus. Les travaux de Kurth et al. ont montré que des lymphocytes B infectés par l'EBV, n'exprimant pas EBNA2 et exprimant LMP1, sont localisés principalement au niveau des zones inter-folliculaires et de manière occasionnelle dans les centres germinatifs (Kurth et al., 2003; Kurth et al., 2000). L'analyse des mutations présentes dans les gènes des immunoglobulines de ces lymphocytes B infectés par l'EBV, a montré que ces cellules pouvaient migrer d'un compartiment à l'autre, c'est-à-dire des zones interfolliculaires vers les centres germinatifs. Malgré leur état prolifératif, ces lymphocytes B ne possèdent pas de diversité intra-clonale dans leurs gènes des Ig, suggérant que le système d'hypermutation somatique n'est pas fonctionnel dans ces cellules.

Deux hypothèses ont donc été suggérées suite aux résultats avancés par le groupe de Kurth. En effet, les lymphocytes B infectés par l'EBV observés dans les ganglions de sujets atteints de MNI correspondraient :

- aux lymphocytes B mémoires précédemment infectés par l'EBV retournant dans l'amygdale et induisant la latence virale de type II avec l'expression de EBNA1, LMP1 et LMP2A.

- aux lymphocytes B du centre germinatif, infectés de nouveau par l'EBV, qui aurait lieu après l'acquisition des mutations somatiques. Ces lymphocytes B (EBV⁺) peuvent alors migrer dans les zones inter-folliculaires et/ou dans un autre centre germinatif et proliférer.

Une troisième hypothèse serait que l'EBV infecte directement des lymphocytes B mémoires qui prolifèrent alors dans les zones inter-folliculaires ou migrent dans un centre germinatif déjà formé. Chez les sujets atteints de MNI, les lymphocytes B mémoires pourraient donc être établis par l'infection directe de lymphocytes B mémoires et/ou de lymphocytes B du centre germinatif. Ceci pourrait expliquer que chez les sujets ayant un système immunitaire défaillant, la quantité de lymphocytes B mémoires (EBV⁺) augmente considérablement jusqu'à 30 fois plus (Babcock et al., 1999; Prang et al., 1997).

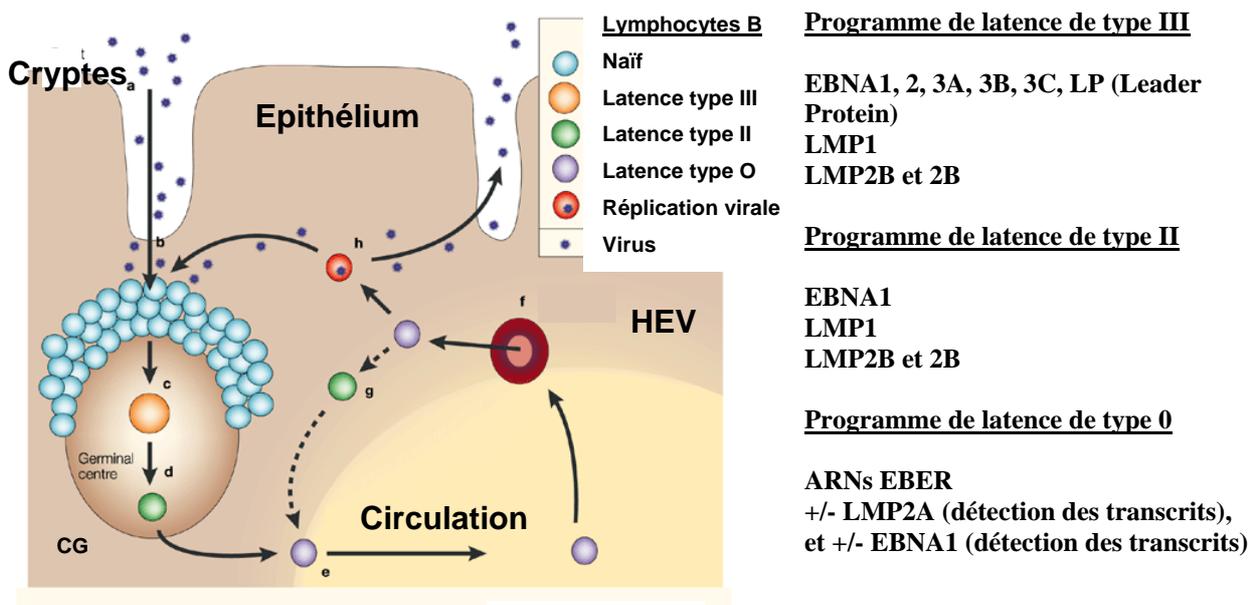


Figure 43 : Modèle d'infection par le virus d'Epstein-Barr. (a) le virus, provenant de la salive, (b) pénètre à l'intérieur des cryptes du lympho-épithélium des amygdales. (c) il infecte directement les lymphocytes B naïfs, qui sont alors des lymphoblastes dans lesquels l'EBV induit le programme de latence III par l'intermédiaire des 9 protéines de latence (EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, LP (Leader Protein) ; LMP1 ; LMP2A et 2B) sous la direction de EBNA2. (d) Les lymphoblastes infectés par l'EBV changent de programme d'expression des gènes viraux, et induisent la latence II où seulement 3 protéines virales sont exprimées (EBNA1, LMP1, LMP2A et -2B). Ces protéines maintiennent les signaux de survie nécessaires. (e) Les lymphocytes B mémoires/EBV⁺ (latence 0) quittent les follicules et entrent dans la circulation périphérique par les lymphatiques efférents. (f) Les lymphocytes B mémoires/EBV⁺ retournent dans l'amygdale par les veinules post-capillaires de l'endothélium épais (HEV, pour « High Endothelial Venules »), (g) leur survie nécessite l'induction du programme de latence II, puis quittent l'amygdale et retournent dans la circulation sanguine en latence 0. (h) Occasionnellement, les lymphocytes B mémoires/EBV⁺ peuvent induire le cycle lytique, et libérer du virus dans la salive. CG : Centre Germinatif (Thorley-Lawson, 2001).

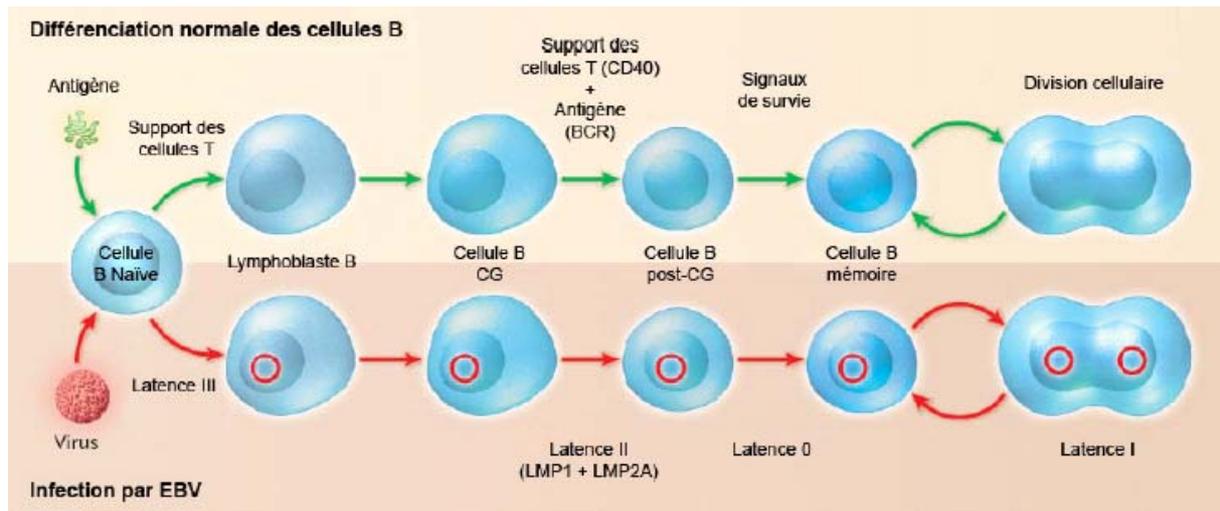


Figure 44 : L'infection par l'EBV mime les étapes de la maturation physiologique des lymphocytes B *in vivo*. Quand l'EBV infecte les lymphocytes B naïfs qui sont à l'état quiescent dans les tissus lymphoïdes de la cavité oropharyngée, il exprime un programme de latence III qui active ces cellules. Elles deviennent alors des lymphoblastes en prolifération. Ce processus correspond à ce qui est observé dans le cas de l'activation des lymphocytes B naïfs exposés à un antigène. Au cours d'une réponse immune normale, ces lymphoblastes cessent ensuite de proliférer, sont sélectionnés au sein des centres germinatifs (lymphocytes CG) grâce aux signaux délivrés par l'antigène lui-même (via sa fixation au BCR) et par les lymphocytes T helper correspondants (notamment via l'interaction CD40/CD40L). Ce processus peut également être mimé par l'EBV lorsqu'il passe de la latence III à la latence II (LMP1 et LMP2A miment en partie les signaux activés respectivement par CD40 et le BCR). Ensuite les cellules sélectionnées sortent des CG (lymphocytes B post-CG) et peuvent survivre à long terme dans l'organisme en se transformant en lymphocytes B mémoires circulants. Ce passage dans la circulation périphérique se traduit par une extinction de l'expression de toutes les protéines de latence : le virus passe à une latence 0. De façon occasionnelle, les lymphocytes B mémoires sont amenés à se diviser pour maintenir un nombre stable de cellules dans le réservoir. Quand la cellule est infectée, l'EBV réexprime alors uniquement EBNA1 afin de maintenir son génome dans les cellules filles après division cellulaire. Ce programme correspond à la latence I. CG : centre germinatif ; CD40L : CD40 ligand ; BCR : B-Cell Receptor. (D'après (Thorley-Lawson and Gross, 2004)).

1.3- Infection des cellules épithéliales par le virus d'Epstein-Barr

La découverte de nombreux cas de carcinomes du nasopharynx (CNP) associés à la présence du virus montrent que les cellules épithéliales peuvent être directement infectées par l'EBV.

In vivo, la pénétration de l'EBV dans les cellules épithéliales de l'oropharynx et/ou des amygdales se fait précocement lors de l'infection par le virus. Néanmoins, dans la littérature, le fait que l'infection se fasse en premier ou secondairement par rapport à celle des lymphocytes B est encore très largement débattue (Chang et al., 1999; Pegtel et al., 2004; Shannon-Lowe et al., 2006). Une fois, ces cellules épithéliales infectées, l'EBV y accomplit principalement un cycle réplcatif complet, conduisant à la destruction des cellules. Cette infection est moins bien comprise que l'infection des lymphocytes B. En effet, les cellules

épithéliales n'expriment pas le CD21 (Pegtel et al., 2004; Speck and Longnecker, 2000; Tugizov et al., 2003). Cependant, si l'on co-cultive, *in vitro*, une lignée de cellules épithéliales avec des lymphocytes B infectés par l'EBV produisant des virions, il peut se produire une infection de ces cellules (Pegtel et al., 2004; Speck and Longnecker, 2000; Tugizov et al., 2003).

Certains travaux ont montré que la fixation du virus sur les cellules épithéliales fait intervenir la glycoprotéine virale gH. Ainsi, l'entrée du virus dans ces cellules implique la formation d'un complexe comportant uniquement les deux glycoprotéines gH/gL (Molesworth et al., 2000), contrairement aux lymphocytes B qui ont besoin de la gp42 additionnée à ce complexe. La majorité des virions produits par les lymphocytes B perdent la protéine gp42 à leur surface. En effet, la gp42 est séquestrée par le CMH de classe II présent à la surface des lymphocytes B, augmentant donc le tropisme du virus pour les cellules épithéliales. Au contraire, l'absence du CMH de classe II à la surface des cellules épithéliales va influencer le tropisme du virus vers les lymphocytes B (Borza and Hutt-Fletcher, 2002) (Figure 45).

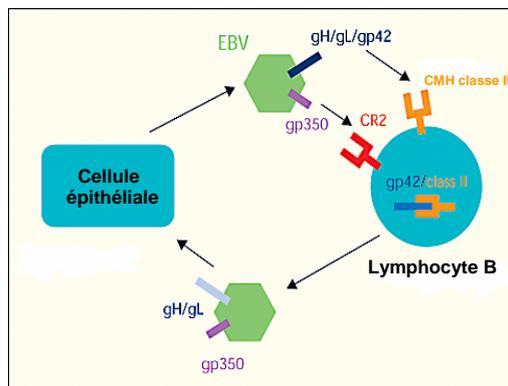


Figure 45 : Modèle d'infection des cellules épithéliales par l'EBV.

L'EBV infecte les lymphocytes B grâce aux interactions gp350-CR2 (CD21), et gH/gL/gp42-CMH de classe II. Les virions libérés par les lymphocytes B (ceux présents dans la salive) sont gp42- (séquestrée par le CMH de classe II dans les lymphocytes B) infectent donc préférentiellement les cellules épithéliales dont l'infection ne nécessite pas gp42. (D'après (Farrell, 2002))

De plus, une autre glycoprotéine virale, BRMF2 portant un motif RGD essentiel à l'interaction avec l'intégrine $\beta 1$, est exprimée du côté basolatéral des cellules épithéliales, et a été décrite comme importante pour l'infection de ces cellules épithéliales. En effet, cette interaction est indispensable à l'infection des cellules par le virus libre (Tugizov et al., 2003). De plus, l'EBV peut se disséminer au sein d'un épithélium de façon indépendante des lymphocytes B. L'EBV est capable d'infecter des cellules épithéliales adjacentes en passant au travers des membranes latérales à proximité des desmosomes et des jonctions serrées (Tugizov et al., 2003).

Très récemment, il a été montré que l'infection par l'EBV, provenant de lymphocytes B déjà infectés, de cellules épithéliales impliquait la formation d'une synapse intercellulaire. Cette synapse comporte des complexes gp350/CD21, ainsi que la gp85 et la gp110, mais pas la gp42 (essentielle à l'infection des cellules B via le CMH de classe II). Ces protéines virales peuvent jouer un rôle important dans cette infection (Shannon-Lowe et al., 2006).

De plus, il a été montré que le transfert horizontal d'ADN par capture de corps apoptotiques était aussi une possibilité d'infection de cellules épithéliales par l'EBV. En effet, une étude *in vitro*, a montré que si l'on co-cultive des fibroblastes, des monocytes ou des cellules endothéliales avec une lignée lymphoblastoïde produisant des corps apoptotiques, après traitement chimique, les cellules non infectées endocytent ces derniers. L'ADN viral est alors détectable dans les cellules, lesquelles peuvent exprimer des marqueurs spécifiques de l'EBV (Holmgren et al., 1999).

1.4- Autres types cellulaires “infectables” par le virus d'Epstein-Barr

La multiplicité des tumeurs cancéreuses associées à l'EBV, suggère que le tropisme de l'EBV pour les lymphocytes B est prédominant, mais pas exclusif. D'après les données de la littérature, d'autres cellules peuvent être infectées par l'EBV. Ainsi, *in vitro*, mis à part les lymphocytes B, l'EBV peut infecter et immortaliser des lymphocytes T et des monocytes (Groux et al., 1997; Masy et al., 2002; Savard et al., 2000). Au contraire, l'infection *in vitro*, par l'EBV des neutrophiles, des cellules folliculaires dendritiques, des astrocytes et des macrophages n'aboutit pas à l'établissement de lignées immortalisées (Larochelle et al., 1998; Lindhout et al., 1994; Menet et al., 1999; Shimakage et al., 1999).

In vivo, l'EBV peut infecter des thymocytes corticaux immatures, des lymphocytes T matures, aussi bien que des cellules NK (Natural Killer) (Paterson et al., 1995; Trempat et al., 2002; Watry et al., 1991). La majorité d'entre eux n'expriment pas le CD21 (Kasahara and Yachie, 2002; Tsoukas and Lambris, 1993). Les travaux de Tabiasco et al. ont récemment mis en évidence que l'attaque des lymphocytes B infectés par l'EBV par des lymphocytes NK permet l'établissement d'une synapse immunologique avec une fusion des membranes de chacune des cellules composant cette synapse, au cours de laquelle le CD21 est transféré de la membrane plasmique des lymphocytes B vers celle des cellules NK (Onfelt et al., 2004; Tabiasco et al., 2003). Ces cellules deviennent alors des cibles potentielles pour une infection par l'EBV. Ce mécanisme pourrait permettre d'expliquer l'infection des cellules NK par l'EBV. Les lymphocytes T établissent aussi des synapses immunologiques avec leurs cellules

cibles (Bromley et al., 2001). Par conséquent, ce mécanisme décrit pour les cellules NK, pourrait également être utilisé pour l'infection par l'EBV des lymphocytes T.

Un grand nombre d'hémopathies d'origine lymphoïde T ont été associées à la présence de l'EBV dans les cellules tumorales avec la mise en place du programme d'expression des gènes viraux de latence de type II. Par l'utilisation de virus recombinants et sélectionnables, une équipe a réussi à infecter une lignée lymphocytaire T humaine CMT2 (préalablement établie) avec l'EBV. Ainsi, des clones CMT2 stablement infectés ont été isolés. Ces cellules présentaient en effet, un programme de latence II (Fujiwara and Ono, 1995).

L'équipe de Coll et al a démontré qu'il était possible d'infecter et de transformer *in vitro* des lymphocytes T périphériques par l'EBV. Ainsi, il a été possible d'obtenir des lignées transformées par l'EBV possédant toutes, un phénotype de lymphocyte T naïf. En fait, dans ces cellules, le génome viral est présent sous forme épisomale et exprime un programme de latence viral de type II. Une de ces lignées appelée NC5, a la particularité de posséder plusieurs réarrangements chromosomiques et elle a été démontrée comme tumorigène chez les souris nude (Groux et al., 1997).

L'infection par l'EBV des monocytes a été très peu étudiée. Toutefois, quelques études rapportent la présence de l'EBV dans des monocytes/macrophages issus de patients (Revoltella et al., 1989; Shimakage et al., 1999). Un travail démontre également que l'on peut infecter *in vitro* des monocytes primaires par l'EBV (Savard et al., 2000). Dans tous les cas, les cellules infectées engendrées lors de ces études ne sont pas immortalisées. Néanmoins, l'interaction entre l'EBV et les monocytes engendre toute une série de modulations d'expression de cytokines (IL-1, IL-6 et TNF α) et de prostaglandines E₂ par ces cellules (Gosselin and Borgeat, 1997; Gosselin et al., 1992).

II. Contrôle de l'infection virale

L'EBV infecte les lymphocytes B naïfs provoquant leur prolifération par l'induction du programme de latence III. Ensuite, le programme de latence II se met en place, permettant la différenciation de ces lymphocytes B naïfs en lymphocytes B mémoires (EBV+). Ces derniers rejoignent alors la circulation sanguine en latence 0. Le système immunitaire de l'hôte contrôle chacune de ces étapes (Khan et al., 1996; Yao et al., 1985).

Durant l'infection aiguë, une réponse cytotoxique non spécifique, faisant intervenir des cellules NK ou des anticorps neutralisants se met en place. Puis secondairement, une

réponse spécifique est initiée. Cette réponse spécifique est caractérisée d'une part, par une réponse cytotoxique dépendante des anticorps, et d'autre part, par une réponse cytotoxique restreinte au CMH de classe I dirigée majoritairement contre les protéines du cycle lytique. La proportion des lymphocytes T CD8+ spécifiques peut atteindre alors 44 % des lymphocytes T CD8+ totaux circulant dans le sang (Callan et al., 1998). Il y a en plus, une réponse immunitaire humorale avec :

- Apparition précoce d'anticorps anti-VCA persistant durant toute la vie à un niveau bas
- Apparition plus tardive d'anticorps anti-EBNAs, nécessitant une réponse immunitaire cytotoxique efficace pour apparaître. Ils persistent également toute la vie à un niveau bas.
- Enfin, apparition d'anticorps anti-EA qui sont produits transitoirement, détectables seulement au cours de la primo-infection.

Durant l'infection persistante, ce sont essentiellement les lymphocytes T CD8+ anti-EA, EBNA3A/B/C, EBNA-LP et LMP2A/B qui limitent l'infection (Khanna et al., 1992; Murray et al., 1992; Rickinson and Moss, 1997). Chez les individus séropositifs pour l'EBV, qui n'ont pas eu de MNI auparavant, la fréquence des lymphocytes T CD8+ dirigés contre les épitopes des protéines de la phase lytique est de 0.5 à 5.5 % selon les individus (Hislop et al., 2002), et la fréquence des lymphocytes T CD8+ dirigés contre les épitopes des protéines de latence est de 3.8 % (Tan et al., 1999).

III. Pathologies associées au virus d'Epstein-Barr

Il existe plusieurs pathologies humaines d'origines lymphoïdes ou épithéliales associées à ce virus telles que :

- la mononucléose infectieuse (MNI) qui est une affection bénigne des lymphocytes B qui parfois peut évoluer vers des infections actives chroniques (CAEBV Chronic active EBV infection) dues à un déficit fonctionnel des cellules NK ou T cytotoxiques.
- le lymphome de Burkitt, qui est une lymphoprolifération B se caractérisant par la présence de la translocation (8; 14) et impliquant le locus c-myc sur le chromosome 8 et le locus de la chaîne lourde des immunoglobulines sur le chromosome 14 ;
- les lymphomes B immunoblastiques de sujets atteints d'immunosuppression :
 - soit congénitale telles que les lymphoproliférations B liées au chromosome X. Ces lymphoproliférations apparaissent après une infection par l'EBV chez des patients

atteints du syndrome lié au chromosome X. Ce dernier se singularise par la mutation de la protéine SAP (SLAM (Signaling Lymphocytic Activation Molecule) Associated Protein) normalement impliquée dans le contrôle de l'activation des lymphocytes T. Il a été suggéré, que la mutation de la protéine SAP, altère la fonction des lymphocytes T et conduit à une immunodéficience. Dans ce contexte, suite à une infection par l'EBV, les patients peuvent développer une forme fulminante de MNI évoluant vers une lymphoprolifération souvent fatale.

- Soit acquise après une transplantation d'organe ou après l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) ;

- les lymphomes T périphériques ;
- les lymphomes T/NK nasal ;
- la maladie de Hodgkin ;
- le carcinome indifférencié du nasopharynx,
- des cancers gastriques.
- le cancer du sein.

A propos des cancers du sein, l'association entre l'EBV et ce cancer a été suggérée par plusieurs équipes (Bonnet et al., 1999; Grinstein et al., 2002; Labrecque et al., 1995; Preciado et al., 2005; Xue et al., 2003). Les travaux de Bonnet et al. ont permis de mettre en évidence la présence du génome viral de l'EBV dans 51% des cas étudiés. De plus, l'EBV n'a été retrouvé spécifiquement que dans les cellules tumorales et sa présence a été corrélée à l'existence de facteurs de mauvais pronostic. Plus récemment, la même équipe a montré que l'EBV augmentait la résistance des cellules à l'agent chimiothérapeutique paclitaxel (Arbach et al., 2006). L'association entre l'EBV et le cancer du sein reste néanmoins l'objet de beaucoup de discussions (Chu et al., 2001; Murray et al., 2003; Perrigoue et al., 2005).

Il faut également signaler que l'EBV est de plus en plus souvent mis en cause dans le développement de certaines pathologies auto-immunes, telles que le syndrome de Sjörger, le lupus érythémateux, la polyarthrite rhumatoïde ou encore la sclérose en plaques (Christensen, 2005; Pender, 2003).

Le tableau suivant présente un résumé des informations essentielles concernant ces tumeurs. C'est-à-dire les différents sous-types de ces tumeurs, le pourcentage d'association avec l'EBV et le type de latence dans les cellules tumorales (Dolcetti and Masucci, 2003).

Tableau 3 : Pathologies associées au virus d'EBV et latence virale correspondante.

Maladies	% de cas EBV positifs	Latence virale
<ul style="list-style-type: none"> • La Mononucléose infectieuse 	> 99	EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, LP ; LMP1 ; LMP2A, 2B
<ul style="list-style-type: none"> • Lymphome B immunoblastique, associé au SIDA • Désordre Lymphoprolifératif post greffe • Lymphome de Burkitt (Afrique) • Lymphome de Burkitt (Amérique du Nord et associé au SIDA) • Lymphome T périphérique 	~ 95 ~ 95 > 95 ~ 20-30 ~ 40	EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, LP ; LMP1 ; LMP2A, 2B EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, LP ; LMP1 ; LMP2A, 2B EBNA1 EBNA1 EBNA1 ; LMP1 ; LMP2A, 2B
<ul style="list-style-type: none"> • Lymphome T/NK nasal 	> 95	EBNA1 ; LMP1 ; LMP2A, 2B
<ul style="list-style-type: none"> • La maladie de Hodgkin <ul style="list-style-type: none"> ○ Cellularité mixte ○ Scléro nodulaire 	50 à 70 30 à 50	EBNA1 ; LMP1 ; LMP2A, 2B
<ul style="list-style-type: none"> • La maladie de Hodgkin classique associé au SIDA 	> 95	EBNA1 ; LMP1 ; LMP2A, 2B
<ul style="list-style-type: none"> • Carcinome du nasopharynx • Lymphoépithéliome de l'estomac ou du thymus • Adénocarcinome gastrique 	> 95 ~80 ~10	EBNA1 ; LMP1 ; LMP2A, 2B EBNA1 ; LMP1 ; LMP2A, 2B EBNA1 ; LMP2A

Latence de type I, Latence de type II, Latence de type III.

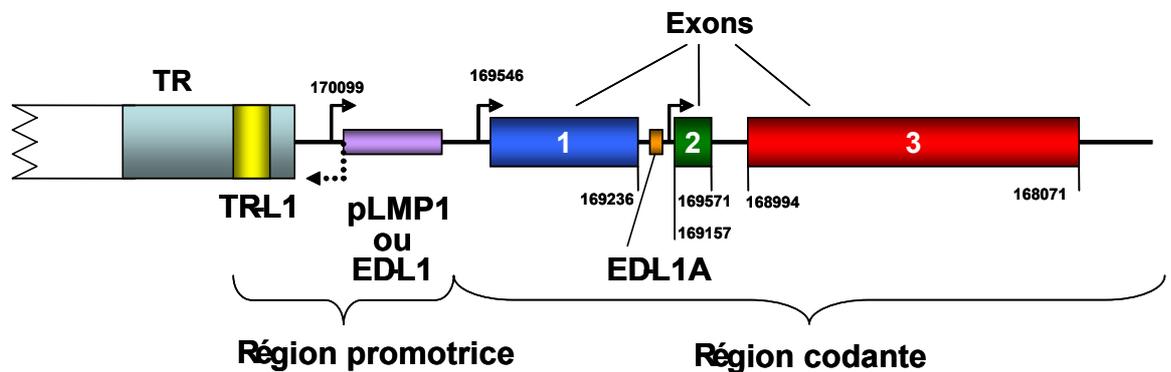
SIDA : Syndrome de l'Immunodéficience Acquise.

Partie 5 : La protéine LMP1

Plusieurs travaux ont mis en évidence le rôle clé de cette protéine dans la transformation cellulaire induite par l'EBV. En effet, la transfection du gène BNLF1 codant LMP1 dans des fibroblastes de rongeurs immortalisés, conduit à un phénotype transformé caractérisé par des changements morphologiques, une croissance sans inhibition de contact et la formation de tumeur chez la souris Nude (Wang, Liebowitz et al. 1985; Baichwal and Sugden 1988). De plus, l'obtention de souris transgéniques pour le gène BNLF1 montre que l'expression de LMP1 dans les lymphocytes B, en absence d'autres gènes de l'EBV, est oncogénique *in vivo*, et qu'elle représente le principal facteur pour le développement de lymphomes associés à l'EBV (Kulwichit, Edwards et al. 1998).

I. La protéine LMP1 est codée par le gène BNLF1

(A) Le gène BNLF1 codant LMP1



(B) La protéine LMP1

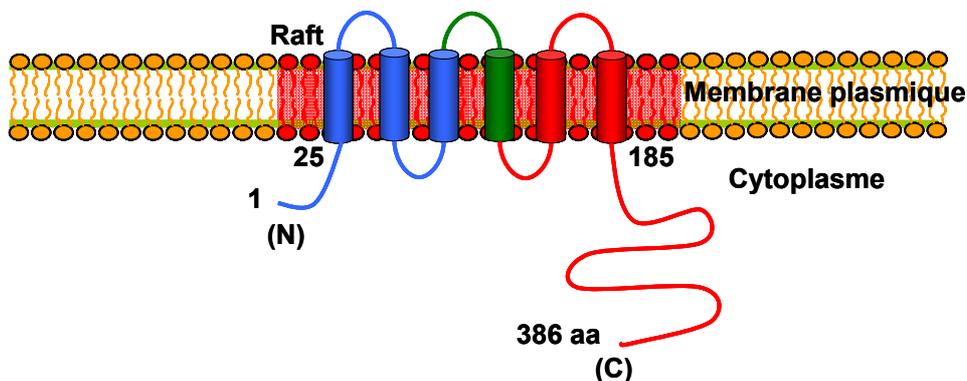


Figure 46 : Structure du gène BNLF1 (A) et de la protéine LMP1 (B) de l'EBV.

Le gène BNFL1 codant LMP1 est localisé dans la séquence interne unique U5 du génome viral de l'EBV. Ce gène comportant une séquence codante de 1318 pb, se compose de 3 exons séparés par deux petits introns de 78 et 76 pb. Le premier exon de 310 pb code la partie N-terminale, ainsi que les 3 premiers domaines transmembranaires. Le second exon de 86 pb code pour le quatrième domaine transmembranaire. Et enfin, le troisième exon de 923 pb code pour les deux derniers domaines transmembranaires et la partie fonctionnelle C-terminale comportant les domaines fonctionnels CTAR1 et CTAR2 (Figure 46).

Durant la phase de latence de l'EBV, deux promoteurs du gène BNLF1 ont été caractérisés et sont fonctionnels. Le mieux caractérisé d'entre eux est le promoteur ED-L1 (BamHI EcoRI D fragment located LMP1 promoter) nommé également pLMP1 (promoteur de LMP1). Le second est le promoteur TR-L1 (TR-located LMP1 promoter) localisé à l'intérieur des TRs, environ 500 pb en amont de ED-L1 (Tsang, Wang et al. 1991; Sadler and Raab-Traub 1995; Sjoblom, Yang et al. 1998; Sjoblom-Hallen, Yang et al. 1999; Tsai, Lee et al. 1999; Zhao and Sample 2000; Lin, Johannsen et al. 2002). Ces deux promoteurs initient chacun un transcrit d'ARNm différent. Ainsi, à partir de ED-L1, il est généré un ARNm de 2,8 kb, et à partir de TR-L1 (ou ED-L1E), un transcrit de 3,5 kb.

Le promoteur distal TR-L1 est activé principalement dans les cellules épithéliales en latence II de l'EBV (Sadler and Raab-Traub 1995). De plus, dans certains lymphomes de Hodgkin, l'activité de TR-L1 est aussi détectée (Chen, Lee et al. 2001). TR-L1 est positivement régulé par les protéines STATs (Chen, Lee et al. 2001; Chen, Hutt-Fletcher et al. 2003). TR-L1 contient différents points d'initiation de la transcription (PIT), tous localisés au environ de 650 pb avant l'ATG, afin de générer l'ARNm de 3,5 kb.

Le promoteur proximal pLMP1 ou ED-L1 dirige l'expression de LMP1 lors de la latence III dans les lymphocytes B. Le PIT de l'ARNm de 2,8 kb se situe 41 nucléotides avant l'ATG (Hudson, Farrell et al. 1985). Le transactivateur majeur de ED-L1 est EBNA2, indispensable à l'expression de LMP1 dans les LCLs (Abbot, Rowe et al. 1990; Wang, Tsang et al. 1990) - voir le paragraphe V.1.1.2 de la partie 3). ED-L1 étant bidirectionnel, il permet l'initiation de la transcription de LMP2B dans le sens opposé à celui de LMP1 (Laux, Dugrillon et al. 1994).

Lors de l'induction du cycle lytique, un autre promoteur situé dans le premier intron du gène BNLF1 appelé ED-L1A (Figure 46), est activé et est responsable de l'expression de lyLMP1 (D1LMP1 ou trLMP1).

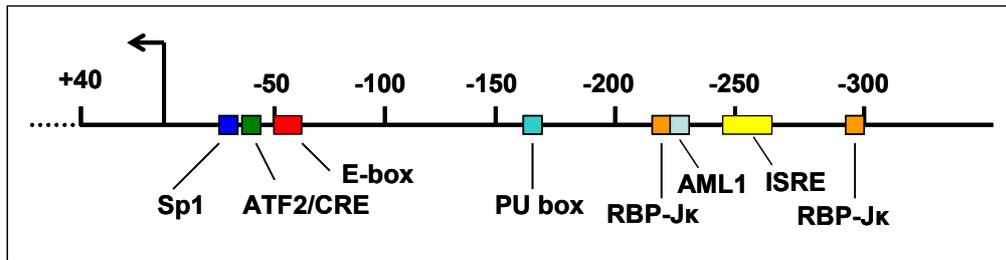


Figure 47 : Structure du promoteur ED-L1 du gène BNFL1 codant la protéine LMP1.

L'échelle est basée sur le point d'initiation de la transcription (PIT) du promoteur. Les sites connus de fixation de certains facteurs transcriptionnels sont représentés par des rectangles de couleurs différentes. Voir le texte pour plus de détail. (D'après (Sjoblom, Yang et al. 1998)).

I.1- Transactivation de ED-L1 du gène BNFL1 via la protéine EBNA2

La protéine EBNA2, produite précocement lors de l'infection virale de l'EBV a été reconnue comme facteur essentiel pour la transactivation de ED-L1 initiant la transcription du gène BNFL1. ED-L1 comporte des éléments de réponse à EBNA2 (Tsang, Wang et al. 1991; Laux, Adam et al. 1994; Laux, Dugrillon et al. 1994; Waltzer, Logeat et al. 1994). Comme nous l'avons vu précédemment (dans le paragraphe V.1.1.2 de la partie 3), EBNA2 ne se fixe pas directement à l'ADN, mais via des protéines cellulaires se fixant spécifiquement sur des séquences présentes dans les éléments de réponse à EBNA2. La mieux caractérisée de ces protéines est RBP-Jκ (Grossman, Johannsen et al. 1994; Laux, Adam et al. 1994; Laux, Dugrillon et al. 1994; Johannsen, Koh et al. 1995).

RBP-Jκ est très conservée au cours de l'évolution et a comme homologue chez la drosophile, la protéine Su(H) (Suppressor of Hairless) impliquée en aval du récepteur Notch, dans la régulation de l'expression d'un groupe de gènes spécifiques du système nerveux essentiel durant le développement (Tun, Hamaguchi et al. 1994). Chez la souris, RBP-Jκ est aussi l'homologue de la protéine KBF2, facteur cellulaire se fixant aux enhanceurs des gènes codant des protéines du CMH de classe I (Israel, Yano et al. 1989). En se fixant sur son motif spécifique GTGGGAA, RBP-Jκ réprime la transcription au niveau des promoteurs en recrutant un complexe co-répresseur disposant d'une fonction histone déacétylase (Tun, Hamaguchi et al. 1994; Wang, Grossman et al. 2000). Les protéines intermédiaires ou co-répresseurs telles que les protéines CIR (CBF1 Interacting Corepresseur), SMRT (Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid), SAP30 (Sin3-Associated Polypeptide 30), Sin3A et SKIP (SKi-Interacting Protein) font partie de ce complexe (Grozinger and Schreiber 2002). Ces co-répresseurs sont impliqués dans le recrutement de complexes multiprotéiques contenant des histones déacétylases, telles que HDAC1 (Histone DeAcetylase 1) et HDAC2 (Histone DeAcetylase 2). HDAC1 et HDAC2 recrutées sur le promoteur, désacétylent localement les

histones, permettant ainsi de rendre la chromatine plus compacte et moins accessible pour la machinerie transcriptionnelle, bloquant ainsi la transcription (Wade and Allday 2000; Grozinger and Schreiber 2002).

EBNA2 transactive l'expression de plusieurs gènes, en particulier le gène BNLF1, en interagissant avec le domaine de répression de RBP-J κ et de la protéine SKIP (Zhou, Fujimuro et al. 2000). Après sa fixation, EBNA2 via son domaine d'activation, recrute d'une part, des coactivateurs transcriptionnels, possédant une fonction histone acétyltransférase et d'autre part, des facteurs du complexe d'initiation de la transcription (CIT). Ces coactivateurs sont p300, CBP (CREB Binding Protein), pCAF (Wu, Kalpana et al. 1996; Wang, Grossman et al. 2000; Bandobashi, Maeda et al. 2001). De plus, EBNA2 peut recruter par son domaine d'activation, plusieurs protéines du CIT qui sont TBP (TATA Binding Protein), TFIIB (Transcription Factor IIB), TAF40 (Trans Activator Factor 40), les sous-unités p80 et p62 de TFIIF et le coactivateur cellulaire p100, lequel interagit avec TFIIE, c-Myb, et Pim-1 (kinase permettant l'activation de c-Myb) (Tong, Drapkin et al. 1995; Tong, Drapkin et al. 1995; Han, Xue et al. 2002; Barth, Liss et al. 2003). EBNA2 en interagissant avec les protéines SKIP et RBP-J κ , lève l'inhibition et permet la transcription du gène BNLF1 par le promoteur ED-L1.

D'autres protéines cellulaires interagissent avec EBNA2 et sont impliquées dans la transactivation de ED-L1. Certaines d'entre elles sont directement liées à l'ADN par leur séquence nucléotidique spécifique et recrutent également EBNA2, ce sont les protéines PU-1/Spi-1/Spi-B, l'hétérodimère ATF2-c-Jun, et sp1, ainsi que des facteurs à domaines POU, des facteurs LBF (LMP-1 Binding Factor : LBF2 uniquement dans les cellules épithéliales ; LBF3, LBF5, LBF6 et LBF7) (Laux, Adam et al. 1994; Waltzer, Logeat et al. 1994; Johannsen, Koh et al. 1995; Waltzer, Bourillot et al. 1995; Barth, Liss et al. 2003; Gordadze, Onunwor et al. 2004). De plus, certaines protéines, indirectement liées à l'ADN, sont impliquées dans les fonctions de transactivation de EBNA2 sur ED-L1 comme SMN (Survival of Motor Neurons), libérée des complexes du spliceosome grâce à une interaction entre DP103 (Dead box Protein 103) et EBNA2. SMN peut ainsi coactiver le complexe transcriptionnel comportant la polymérase II présent sur ED-L1 ((Voss, Hille et al. 2001)- cf. Figure 48)

D'autres protéines virales peuvent réguler la fonction de transactivation de EBNA2. Ainsi, lors de l'infection par l'EBV, EBNA2 et EBNA-LP vont co-activer l'expression des autres protéines virales dont LMP1. EBNA-LP augmente considérablement les propriétés transactivatrices de EBNA2, et joue donc le rôle de coactivateur transcriptionnel de ED-L1 du gène BNLF1 (Harada and Kieff 1997; Nitsche, Bell et al. 1997; Peng, Tan et al. 2000; Peng,

Moses et al. 2005). La protéine cellulaire HA95 impliquée dans la disparition de la membrane cellulaire et dans la condensation de la chromatine lors de la mitose, est étroitement associée à EBNA-LP. Cette association est retrouvée dans les LCLs et dans les lymphomes B présentant une latence III (Han, Harada et al. 2001). HA95 régule la fonction co-activatrice d'EBNA-LP de manière positive en recrutant la protéine RHA (RNA Hélicase A), qui fait partie d'un complexe multi-enzymatique (p300, CBP, Polymérase II) indispensable au recrutement du complexe d'initiation de la transcription (CIT). De plus, HA95 régule négativement la fonction transactivatrice de EBNA-LP en recrutant la sous-unité catalytique α de la PKA (Protein Kinase A) dans des cellules exprimant fortement cette sous-unité ((Han, Xue et al. 2002) - cf. Figure 48). Ce recrutement va permettre l'activation du facteur de transcription ATF1-CREB1, qui par la fixation sur les séquences CRE de ED-L1, va transactiver le gène BNLF1 (Sjoblom, Yang et al. 1998; Han, Xue et al. 2002).

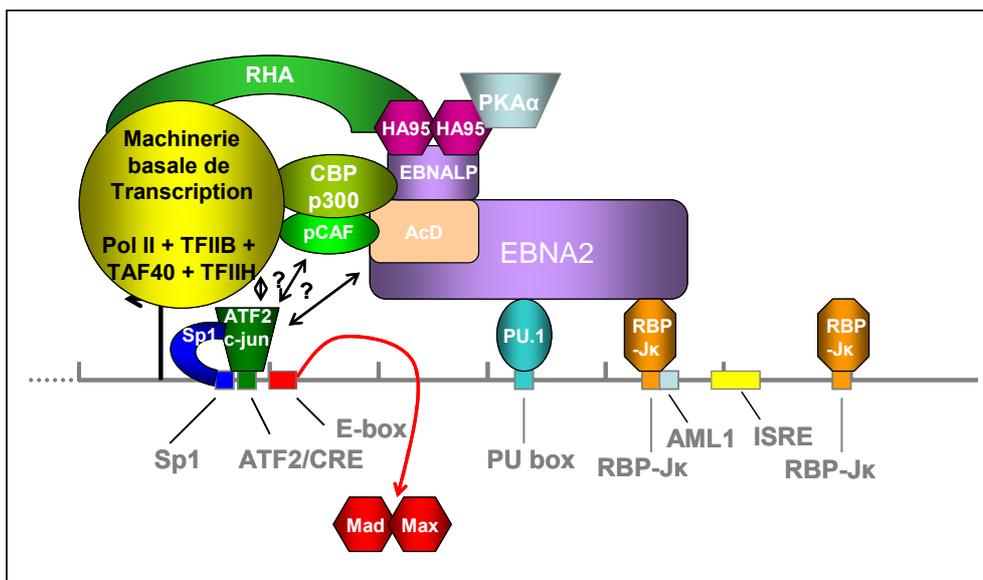


Figure 48 : Représentation schématique de la transactivation du promoteur ED-L1 du gène BNLF1 codant la protéine LMP1.

Comme nous l'avons dit dans le paragraphe III.1.2 de la partie 3, EBNA3A, 3B et 3C peuvent réguler les propriétés transactivatrices de EBNA2. Ainsi, EBNA3C peut augmenter fortement la transactivation de ED-L1 de BNLF1 par EBNA2 (Marshall and Sample 1995; Zhao and Sample 2000; Lin, Johannsen et al. 2002), tandis qu'elle peut inhiber cette même transactivation sur le promoteur viral Cp (Waltzer, Perricaudet et al. 1996; Lin, Johannsen et al. 2002; Rosendorff, Illanes et al. 2004). EBNA3A et EBNA3B modulent seulement la transactivation EBNA2 dépendante. De plus, EBNA1 en se fixant sur l'origine de réplication plasmidique (OriP) de l'épisome viral, semble également transactiver le promoteur du gène

BNLF1 (Leight and Sugden 2000; Hebner, Lasanen et al. 2003). Actuellement, les mécanismes impliqués dans cette activation transcriptionnelle ne sont pas encore connus.

II. Organisation structurale et fonctionnelle de la protéine LMP1

LMP1 ne comportant pas d'homologue cellulaire structural du point de vue de sa séquence, est une protéine transmembranaire possédant une homologie fonctionnelle avec les récepteurs appartenant à la superfamille des TNFR, ainsi qu'avec les récepteurs de IL-1 et des « Toll-Like Receptors » (TLR). En effet, ces différents récepteurs cellulaires utilisent des protéines adaptatrices (TRAFs, TRADD, RIP...), ainsi que des molécules médiatrices (IRAK1, TAK1...) et enfin des voies de signalisation cellulaire (NF-kB, JNK, IRFs, p38/MAPK, ...) communes, afin d'accomplir leurs fonctions cellulaires.

La signalisation induite par LMP1 consiste en l'activation des facteurs de transcription NF-kB, AP1, lesquels sont impliqués dans des mécanismes anti-apoptotiques et de transformation cellulaire. Les voies STAT1/3 sont beaucoup plus discutées.

II.1- Structure de LMP1

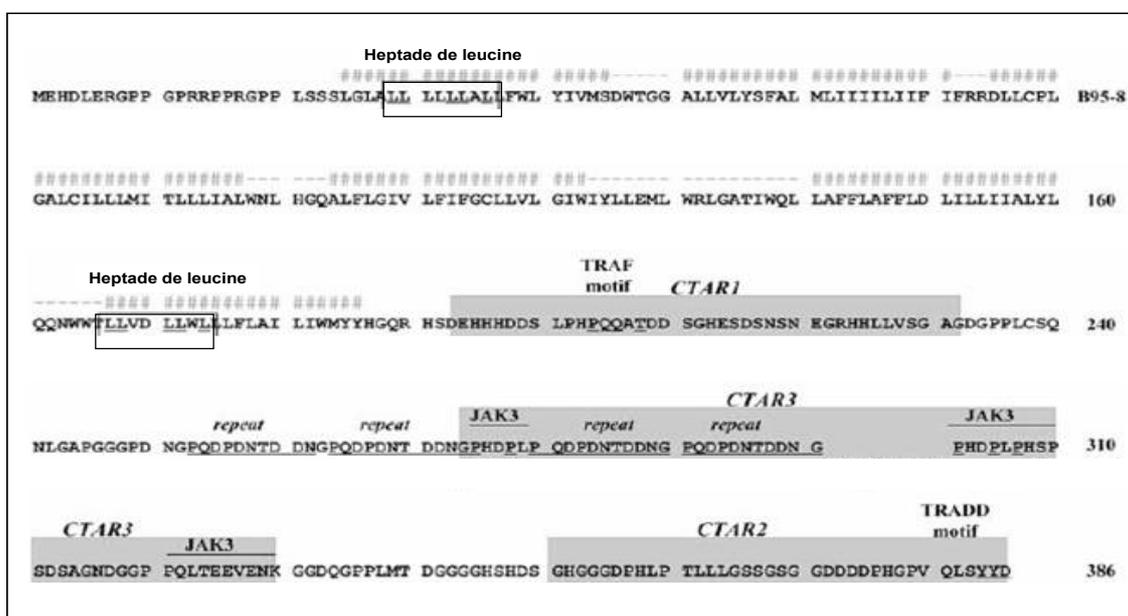


Figure 49A : Séquence peptidique de la protéine LMP1. La séquence complète d'acides aminés de LMP1 représentée provient de la souche virale B95-8. Les acides aminés situés dans les domaines transmembranaires sont indiqués avec des « # ». Les boîtes grises ombragées indiquent les régions CTAR1, CTAR2, et CTAR3. Les boîtes blanches représentent les motifs d'heptade de leucine. D'autres motifs importants tels que les séquences spécifiques de fixation des TRAFs et de TRADD et des JAK3 putatifs sont soulignés et marqués. (D'après (Brinkmann and Schulz 2006)).

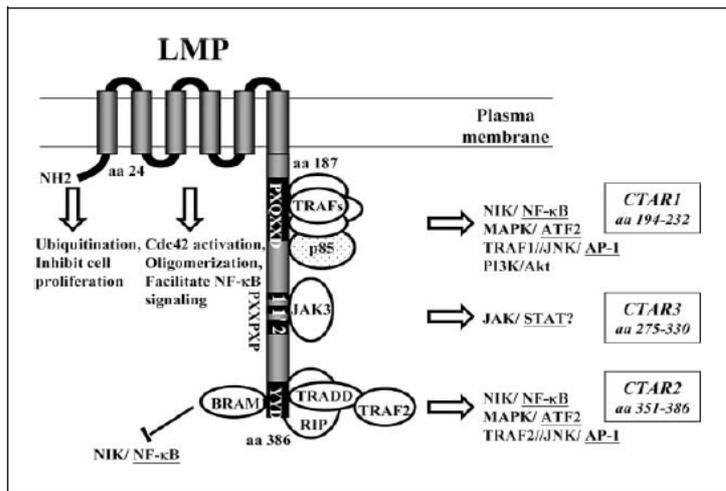


Figure 49B : Structure de LMP1 avec ses protéines associées. LMP1 se compose d'un domaine N-terminal cytosolique court, de six domaines transmembranaires (aa 25-186), et d'un long domaine C-terminal cytosolique (aa 187-386) contenant trois domaines d'activation essentiels, CTAR1, CTAR2, et « CTAR3 ». Chaque CTAR possède des séquences consensus composant des motifs peptidiques spécifiques servant de site de fixation pour les adaptateurs cellulaires déclenchant les voies de transduction de signal (indiquées en tant que flèches ouvertes). (d'après (Li and Chang 2003)).

LMP1 est une protéine transmembranaire de 63 kDa comportant 386 aa, et comprenant 3 domaines (Figure 49A et 49B):

- Un court domaine N-terminal (NT) cytosolique, composé de 24 aa, riche en arginine et en proline hydrophile, et responsable de l'orientation de LMP1 dans la membrane cellulaire (Izumi, Kaye et al. 1994; Coffin, Erickson et al. 2001).

- un domaine transmembranaire (TM), de 162 aa, composé de 6 hélices α traversant chacune la membrane cytoplasmique. Ce domaine peut induire l'oligomérisation des molécules LMP1 (Gires, Zimmer-Strobl et al. 1997) et activer la petite GTPase Cdc42 déclenchant la réorganisation du cytosquelette (Puls, Eliopoulos et al. 1999).

- un long domaine cytosolique C-terminal de 200 aa, qui peut être subdivisé en trois régions essentielles CTARs (C Terminal Activating Regions), CTAR1, CTAR2 et CTAR3 (Huen, Henderson et al. 1995; Gires, Kohlhuber et al. 1999). Les deux régions CTAR1 et CTAR2 ont été englobées respectivement dans deux domaines fonctionnels TES1 et TES2 (Transformation Effector Sites 1 et 2) (Kaye, Izumi et al. 1993; Kaye, Izumi et al. 1995; Izumi, Kaye et al. 1997; Izumi and Kieff 1997; Izumi, Cahir McFarland et al. 1999; Kaye, Izumi et al. 1999) (Figure 49A et 49B).

Ces domaines CTARs servent de régions de recrutement et de fixation des protéines adaptatrices TRAFs et TRADD, ayant pour rôle d'activer des protéines cellulaires spécifiques. CTAR1 et CTAR2, mais pas CTAR3, sont essentielles pour la transformation des lymphocyte B (Kaye, Izumi et al. 1995; Izumi and Kieff 1997; Izumi, Cahir McFarland et al. 1999) (Figure 49A et 49B).

II.1.1- Structure et fonctions des domaines N-terminal et transmembranaire

Le domaine N-terminal de LMP1 positivement chargé grâce à de nombreux acides aminés chargés, en dépit de sa longueur courte est essentiel à l'agrégation de LMP1, et de ce fait à la transformation cellulaire, au turn-over rapide de LMP1, et à l'activation de NF- κ B (Izumi, Kaye et al. 1994; Aviel, Winberg et al. 2000; Coffin, Erickson et al. 2001).

Ce domaine contribue aux fonctions effectrices de LMP1 en permettant son ancrage et son orientation dans la membrane plasmique (Izumi, Kaye et al. 1994; Aviel, Winberg et al. 2000; Coffin, Erickson et al. 2001; Dirmeier, Neuhierl et al. 2003). De plus, la fixation de molécule d'ubiquitine sur ce domaine aboutit à la dégradation de LMP1 par le protéasome (Aviel, Winberg et al. 2000), expliquant la demi-vie très courte de LMP1, comprise entre 1h30 et 7h en fonction du type cellulaire (Baichwal and Sugden 1987). Cependant, le site exact de fixation de l'ubiquitine sur LMP1 n'est pas encore très clairement établi. La suppression de 12 aa dans ce domaine, contenant probablement le site d'ancrage des molécules d'ubiquitine stabilise la molécule LMP1 (Aviel, Winberg et al. 2000).

L'activation de la signalisation par LMP1 nécessite sa localisation dans les radeaux lipidiques riches en glycosphingolipides (« rafts ») et son oligomérisation. La séquence F₃₈WLY₄₁ située dans le premier domaine transmembranaire semble clé pour ces deux propriétés (Yasui, Luftig et al. 2004). C'est notamment dans ces rafts que LMP1 recrute un de ces principaux adaptateurs TRAF3 (Ardila-Osorio, Clause et al. 1999).

La protéine LMP1 possède la particularité de s'agréger en trimères. Le mutant LMP1 délété de ses 44 premiers aa (incluant le domaine N-terminal et le premier domaine transmembranaire) s'accumule dans la membrane plasmique, mais ne s'agrège pas, ne permettant pas la transformation de lymphocytes B primaires (Kaye, Izumi et al. 1993). Cela suggère que l'orientation appropriée et l'ancrage de LMP1 dans la membrane plasmique sont exigés pour permettre son agrégation correcte, nécessaire à sa propre fonctionnalité. Il existe des motifs particuliers LLXXLLX, appelés leucine-heptad-like motifs présents dans le premier et le sixième domaine transmembranaire de LMP1, potentiellement capables de provoquer leur auto-association par des interactions protéine-protéine (Kaykas, Worringer et al. 2002). Quand les leucines de ces motifs sont substitués par des alanines dans le premier domaine transmembranaire, le mutant LMP1 s'agrège comme LMP1 sauvage, mais ne permet pas une activation suffisante de la signalisation NF- κ B (Kaykas, Worringer et al. 2002). Ce mutant serait également complété par un mutant LMP1 délété des domaines CTARs, suggérant que les domaines transmembranaires de LMP1 sont impliqués dans son

orientation à la surface des cellules, permettant de faciliter la transduction du signal LMP1 vers la voie NF-kB.

II.1.2- Structure du domaine C-terminal

Le domaine C-terminal est mis en jeu dans les voies de signalisation cellulaire induites par LMP1. Les deux régions CTAR1/TES1 et CTAR2/TES2 sont essentielles à l'immortalisation de lymphocytes B primaires en LCLs. CTAR1 et CTAR2 sont composées respectivement, des aa 194 à 232 et des aa 351 à 386 (Figure 48) (Hammarskjold and Simurda 1992; Laherty, Hu et al. 1992; Huen, Henderson et al. 1995; Mitchell and Sugden 1995; Floettmann and Rowe 1997)). Les domaines fonctionnels TES1 et TES2 sont respectivement composés des aa 187 à 231 et des aa 352 à 386 (Kaye, Izumi et al. 1993; Kaye, Izumi et al. 1995; Izumi, Kaye et al. 1997; Izumi and Kieff 1997; Izumi, Cahir McFarland et al. 1999; Kaye, Izumi et al. 1999).

De plus, une autre pseudo-région a été mise en évidence sur la partie C-terminale de LMP1, c'est le pseudo-domaine « CTAR3 » qui activerait la signalisation JAK/STAT par la fixation de JAK3 dans cette région, mais cela reste très controversé. Cette région comprise entre CTAR1 et CTAR2, est composée des aa 233 à 350 (Figure 49A et 49B).

Le recrutement et la fixation des différentes protéines associées à LMP1, les TRAFs et TRADD, déclenchent les cascades de transduction du signal modifiant la croissance des cellules et la survie cellulaire (Eliopoulos and Young 2001).

D'après les données de la littérature, il est admis que LMP1 active au moins sept voies de signalisation. Cinq de ces activations se produisent par ses domaines C-terminaux :

- la voie non canonique de NF-kB induite par la kinase (NIK) (Huen, Henderson et al. 1995; Mitchell and Sugden 1995) et la voie canonique de NF-kB.
- la voie p38/MAPK induisant le facteur de transcription ATF2 (Kieser, Kilger et al. 1997).
- la voie JAK3/STATs (Gires, Kohlhuber et al. 1999) qui est très controversée.
- la voie des JNK induisant c-Jun (Eliopoulos and Young 1998).
- la voie PI3K/Akt (Dawson, Tramontanis et al. 2003).

Les voies de l'ubiquitination (Aviel, Winberg et al. 2000) et d'activation de Cdc42 (Puls, Eliopoulos et al. 1999), sont induites par l'intermédiaire respectivement, des domaines N-terminal et transmembranaire (cf. infra).

II.2- Les adaptateurs du domaine C-terminal de LMP1

L'utilisation de mutants de délétion a permis de montrer le rôle essentiel du domaine cytoplasmique C-terminal de LMP1, codé par l'exon 3 du gène BNL1, dans les changements phénotypiques et l'immortalisation des lymphocytes B primaires (Kaye, Izumi et al. 1995). Alors que la délétion de CTAR1 empêche les transformations phénotypiques et l'immortalisation des lymphocytes B par l'EBV, l'absence de CTAR2 compromet seulement leur croissance à long terme (Kaye, Izumi et al. 1995; Izumi, Kaye et al. 1997; Izumi and Kieff 1997; Kaye, Izumi et al. 1999). CTAR1 est donc essentielle à l'établissement initial de la transformation phénotypique, et CTAR2 joue un rôle primordial dans l'immortalisation des lymphocytes B, *in vitro*. A l'opposé, CTAR3 ne semble pas essentielle à la transformation phénotypique et à l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro* (Izumi, Cahir McFarland et al. 1999; Dirmeier, Neuhierl et al. 2003; Li and Chang 2003). LMP1 induit le recrutement de protéines adaptatrices ou adaptateurs cellulaires qui sont en grande majorité, les mêmes que ceux utilisés par les membres de la famille des TNFR.

II.2.1- Interaction directe du domaine CTAR1 avec les protéines TRAFs

Ce domaine CTAR1 est impliqué dans l'activation des voies de signalisation NF- κ B, JNK/AP1, p38MAPK/ATF2 et PI3K/Akt par l'intermédiaire des protéines TRAFs. Par criblage des doubles hybrides de levure, deux membres de la famille des TRAFs, TRAF1 et TRAF2 humains, ont été les deux premiers adaptateurs identifiés interagissant avec LMP1 par sa région C-terminale (aa 187-386) (Mosialos, Birkenbach et al. 1995). Cette étude a montré également que c'est le domaine CTAR1 (aa 187-231) qui est responsable de cette interaction avec les TRAFs. Il existe actuellement 7 représentants des protéines TRAFs (TRAF1 à TRAF7). A l'exception de TRAF1, dont l'expression est restreinte à certains types tissulaires comme par exemple les lymphocytes B qui l'expriment très fortement (Eliopoulos, Waites et al. 2003), les TRAFs sont ubiquitaires.

Les TRAFs sont une famille de protéines cytoplasmiques adaptatrices d'une taille comprise entre 400 à 550 aa. Elles ont été identifiées comme s'associant avec des membres de la superfamille des TNFR et avec d'autres récepteurs de la surface cellulaire. Elles sont donc impliquées dans la régulation de l'apoptose, de la survie cellulaire et des effets pro-inflammatoires (Arch, Gedrich et al. 1998).

Les TRAFs possèdent dans leur extrémité C-terminale (CT) une région homologe très conservée entre les différents membres de cette famille dénommée TRAF, responsable de la liaison aux récepteurs. Cette région est subdivisée en 2 parties, l'une très conservée située en C-Terminal (TRAF-C), l'autre moins conservée en N-terminal (TRAF-N) (Bishop 2004). TRAF7, découvert récemment ne comporte que le domaine TRAF-N du domaine TRAF. A la place du domaine TRAF-C se trouve un domaine « WD40 repeats » ((Bouwmeester, Bauch et al. 2004; Morita, Kanei-Ishii et al. 2005) (cf. Figure 50).

Les domaines TRAF-N sont responsables de l'homo- et de l'hétéro-trimérisation des TRAFs entre-eux, tandis que les domaines TRAF-C sont responsables de l'interaction des TRAFs avec les récepteurs cellulaires les recrutant. La partie effectrice des TRAFs est située dans la région N-terminale de la protéine, et n'est pas requise pour l'association directe avec les récepteurs cellulaires. Cette région effectrice contient plusieurs séquences peptidiques particulières appelées « doigts de Zinc » ou « Zinc Fingers » et un motif peptidique adoptant une conformation en anneau appelée « Ring Finger » (Bishop 2004). TRAF1 ne possède pas de région effectrice (Figure 50).

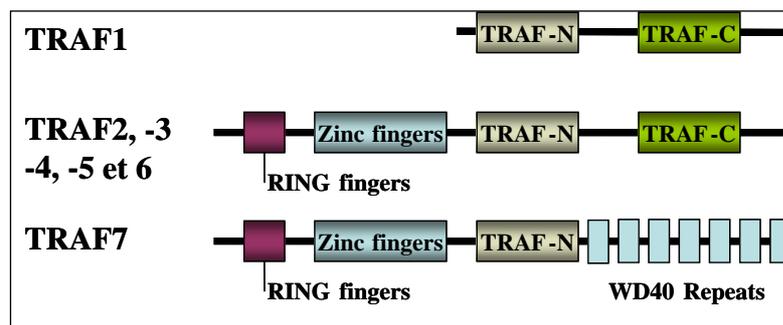


Figure 50 : Organisation structurale générale des protéines de la famille TRAFs. (D'après (Bishop 2004))

Par des études cristallographiques de l'interaction du domaine TRAF de TRAF2 avec le CD40, il a été possible de montrer que les domaines TRAF forment des trimères adoptant un repliement en forme de champignon (Figure 51). Cette conformation implique simultanément les domaines TRAF-N sous forme d'hélices « Coiled-Coil » (pied de champignon), et les domaines TRAF-C sous forme de « sandwichs » de feuillets β (chapeau de champignons). La région de CD40 interagissant avec TRAF2 vient s'insérer, en adoptant une conformation linéaire, perpendiculairement au « chapeau », dans un « sillon » situé sur la face extérieure de chaque monomère (McWhirter, Pullen et al. 1999).

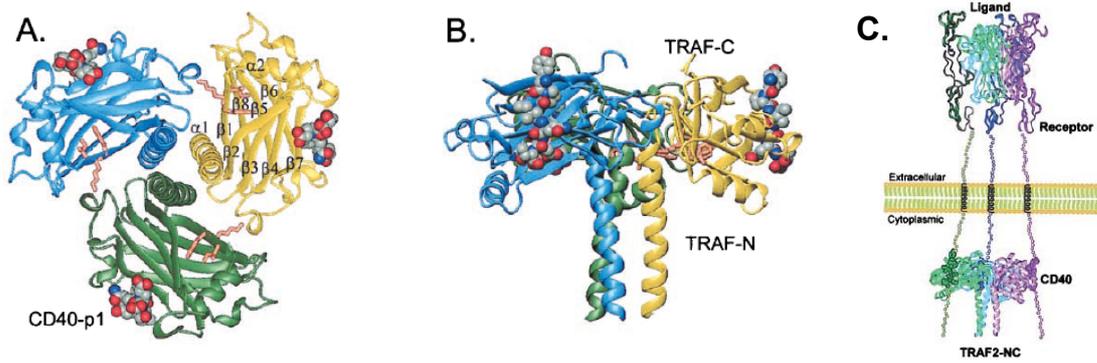


Figure 51 : Structure tridimensionnelle du domaine TRAF. (A) Le domaine TRAF est représenté en « ruban » avec l'hélice formée par le domaine TRAF-N pointant perpendiculairement au plan de la feuille et les peptides (représentation en « atome ») correspondant au site de fixation de CD40 s'encastrant dans les « sillons » de chaque domaine TRAF-C. (B) Même situation mais l'ensemble est représenté avec l'axe de l'hélice dans le plan de la feuille. (C) Ce même trimère mis dans la situation d'interaction avec le CD40 activé par la fixation de son ligand (d'après (McWhirter, Pullen et al. 1999))

Le domaine CTAR1 de LMP1 interagit spécifiquement avec les protéines adaptatrices TRAF1, TRAF2, TRAF3 et TRAF5 (Mosialos, Birkenbach et al. 1995; Devergne, Hatzivassiliou et al. 1996; Kaye, Devergne et al. 1996; Brodeur, Cheng et al. 1997; Sandberg, Hammerschmidt et al. 1997; Devergne, Cahir McFarland et al. 1998; Shirakata, Imadome et al. 2001; Rothenberger, Burns et al. 2003). Dans la signalisation de LMP1, TRAF3 est la seule à être spécifiquement recrutée au niveau des rafts lipidiques (Ardila-Osorio, Clause et al. 1999). TRAF6 est recruté dans le complexe actif de la signalisation LMP1 par un mécanisme indirect impliquant le motif P₂₀₄QQAT de CTAR1 et la tyrosine Y₃₈₄ de CTAR2 (Schultheiss, Puschner et al. 2001). TRAF6 peut s'associer à ces domaines de façon indirecte (Schultheiss, Puschner et al. 2001), via TRAF2 (Cao, Xiong et al. 1996).

Par la suppression et la substitution d'acides aminés dans CTAR1 de LMP1, il a été montré que le motif de fixation des TRAFs dans ce domaine est P₂₀₄XQXT₂₀₈ (ou X est un acide aminé quelconque). Cette séquence consensus est commune aux membres de la superfamille des TNFR (Mosialos, Birkenbach et al. 1995; Devergne, Hatzivassiliou et al. 1996; Kaye, Devergne et al. 1996; Brodeur, Cheng et al. 1997; Devergne, Cahir McFarland et al. 1998). L'étude cristallographique de l'interaction de TRAF2 avec le CD40, CD30, Ox40, 4-1BB et LMP1 montre bien que la séquence impliquée dans le cas de LMP1 serait un nouveau motif, P₂₀₄XQ₂₀₆XXD₂₀₉, dans CTAR1, dont la présence garantit avec une faible affinité, la fixation de TRAF2 (Ye, Park et al. 1999; Ye and Wu 2000).

Dans les lymphocytes B immortalisés par l'EBV, des quantités significatives de TRAF1, TRAF2, TRAF3, et TRAF5 sont complexées directement à LMP1. En revanche, dans les

cellules épithéliales possédant des niveaux relativement bas de complexe TRAF1, LMP1 fixe seulement TRAF2, TRAF3, et TRAF5 (Devergne, Cahir McFarland et al. 1998).

Des expériences récentes, dans des lymphocytes B murins dépourvus en TRAF3, ont suggéré que TRAF3 est essentiel à l'activation par LMP1 des voies JNK et NF- κ B (Xie and Bishop 2004; Xie, Hostager et al. 2004). Dans ces cellules, TRAF3 est capable de propager le signal de LMP1, en interagissant directement avec CTAR1, et indirectement avec CTAR2 (Xie and Bishop 2004; Xie, Hostager et al. 2004). De plus, TRAF3 serait plus spécifiquement impliqué dans l'induction de la voie non canonique de NF- κ B pour certains membres de la famille des TNFR (Xia and Chen 2005). D'après certaines études récentes, aucune des autres protéines TRAFs ne seraient essentielles à la signalisation de LMP1 via CTAR1, mis à part TRAF3 (Luftig, Prinarakis et al. 2003; Wan, Sun et al. 2004; Xie and Bishop 2004; Xie, Hostager et al. 2006). Cependant, une étude très récente de Soni et al. a montré dans des cellules MEFs KO pour les protéines impliquées dans l'activation de NF- κ B, que le domaine CTAR1 requière principalement TRAF2 pour induire la voie non canonique de NF- κ B (Soni et al., EBV symposium 2006).

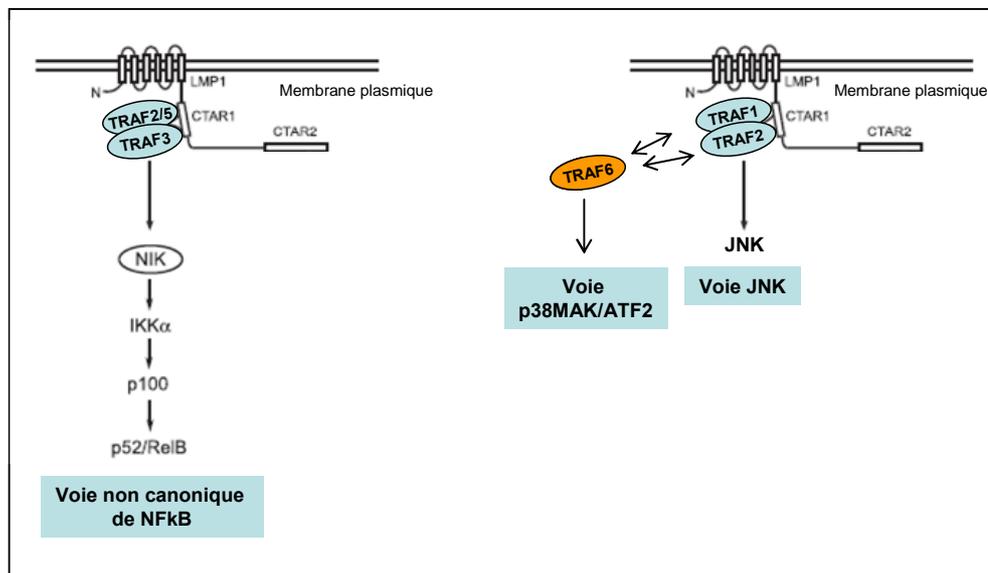


Figure 52 : Schéma récapitulatif des adaptateurs et des voies de signalisation mises en jeu par le domaine CTAR1 de LMP1.

Ainsi selon les études, CTAR1 peut donc recruter directement soit TRAF2 ou TRAF3 (Wu, Kapoor et al. 2002), pour induire la voie non canonique de NF- κ B (Figure 52). TRAF1, quand elle est exprimée comme dans les lymphocytes B, permet d'induire avec TRAF2 la voie JNK et la voie NF- κ B (Eliopoulos, Waites et al. 2003) (Figure 52). La voie

p38MAPK/ATF2 est induite par le domaine CTAR1 par l'intermédiaire de TRAF6 interagissant physiquement avec TRAF2, préalablement fixé sur CTAR1, ou qui va être activé, de manière non encore connue par l'intermédiaire de TRAF3 recruté par CTAR1 (Eliopoulos, Gallagher et al. 1999; Schultheiss, Puschner et al. 2001) (Figure 52).

II.2.2- Les adaptateurs du domaine CTAR2 de LMP1

Les adaptateurs de CTAR2 se fixant directement sur LMP1 sont les protéines TRADD et RIP, qui vont pouvoir recruter les protéines TRAFs activant la voie de signalisation NF- κ B. De plus, dans l'activation de la voie JNK par LMP1, BS69 semble se fixer directement au domaine CTAR2.

II.2.2.1- Interaction directe de CTAR2 avec TRADD et indirecte avec TRAFs

Par l'utilisation de virus recombinants pour lesquels LMP1 comporte soit une délétion des aa 231-386 ou une substitution des trois derniers aa F₃₈₄DD₃₈₆ du domaine CTAR2, il a été montré que l'EBV était incapable, soit d'induire à long terme des LCLs, soit de transformer des lymphocytes B (Izumi, Kaye et al. 1997; Izumi and Kieff 1997), sans CTAR2. Par conséquent, la région d'acides aminés 231-386 de LMP1, définie comme TES2 ou CTAR2, a été définie comme la deuxième région nécessaire à la transformation de lymphocytes B par LMP1. En outre, les virus recombinants possédant LMP1 mutée sur son domaine CTAR2 (Y₃₈₄YD₃₈₆ en I₃₈₄D₃₈₅), sont incapables d'induire l'immortalisation de fibroblastes embryonnaires de souris (Xin, He et al. 2001). Cela, indique donc que le domaine CTAR2 de LMP1, interagissant avec TRADD, est nécessaire pour induire l'immortalisation des lymphocytes B et des fibroblastes de rongeur (Xin, He et al. 2001).

TRADD est une protéine de 34 kDa composée de 312 aa. C'est une des autres protéines adaptatrices majeures interagissant avec LMP1, identifiée par criblage de double hybride de levure. Le domaine N-terminal de TRADD (aa 1-194) interagit spécifiquement avec CTAR2 de LMP1 (aa 355-386), mais n'interagit pas avec le mutant LMP1, muté sur ces trois derniers aa (Y₃₈₄YD₃₈₆ en I₃₈₄D₃₈₅) (Izumi and Kieff 1997). TRADD a été identifié la première fois comme interagissant avec le TNFR1 via un domaine d'interaction protéine-protéine de 80 aa appelé domaine de mort (DD) (Death Domain), situé d'une part sur le domaine C-terminal de TNFR1 et d'autre part dans la partie C-terminale de TRADD, et requis pour induire l'apoptose. Comme LMP1 ne contient pas de DD, la région de LMP1 interagissant avec TRADD n'est pas la même que dans le cas du TNFR1. En effet, TRADD

est recruté par CTAR2 dans une orientation inverse, via son extrémité N-terminale par rapport au TNFR1 ((Kieser, Kaiser et al. 1999) - cf. Figure 53). Par conséquent, le DD de TRADD, situé en C-terminal, n'est pas responsable de son interaction avec le domaine CTAR2 de LMP1.

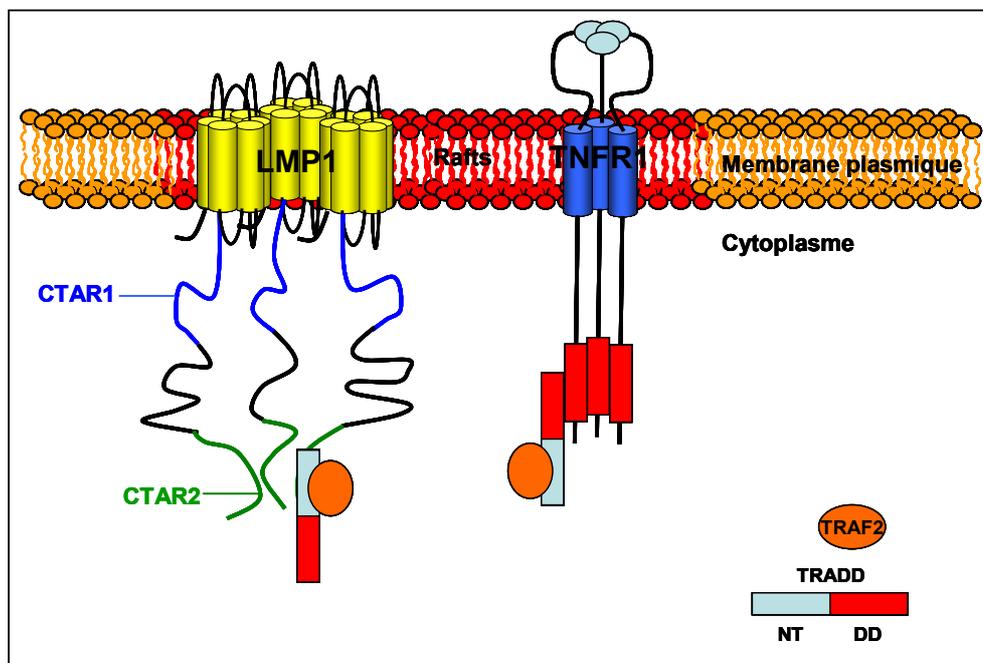


Figure 53 : Modèle de recrutement de TRADD par le domaine CTAR2 de LMP1 et par le domaine de mort du TNFR1. DD : Death domain.

Comme nous l'avons vu auparavant, les trois derniers acides aminés ($Y_{384}YD_{386}$) (dans CTAR2) fixent TRADD. Ensuite TRADD, en synergie avec RIP, permet le recrutement de TRAF2, permettant ainsi l'induction de NF- κ B. En conséquence, le domaine CTAR2 de LMP1 peut également interagir indirectement avec TRAF2 (Izumi and Kieff 1997; Eliopoulos, Blake et al. 1999; Izumi, Cahir McFarland et al. 1999; Kieser, Kaiser et al. 1999).

Une étude très récente montre, en inhibant l'expression de TRADD par ARN interférence (RNAi) dans des cellules épithéliales HEK293, que LMP1 ne nécessite pas TRADD pour induire la voie NF- κ B à partir de CTAR2 (Wu, Nakano et al. 2006). Confortant l'implication de TRADD dans la signalisation NF- κ B, une équipe a très récemment confirmé que TRADD est bien nécessaire et requis pour induire la voie NF- κ B via CTAR2. Une lignée cellulaire de lymphocyte B DG75 TRADD KO a été générée en supprimant séquentiellement les deux allèles de TRADD (Neugebauer et al., EBV Symposium 2006). Ces cellules B TRADD^{-/-} ont permis de montrer que l'activation d'IKK β induite par le domaine CTAR2 de

LMP1 est bien dépendante de TRADD. TRADD est donc bien exigé pour le recrutement d'IKK β à LMP1 et est donc requis pour l'induction de la voie canonique de NF-kB, au moins dans les lymphocytes B.

TRADD est capable d'activer NF-kB dans la voie de signalisation du TNFR1 par une interaction physique avec l'effecteur secondaire, TRAF2 (Hsu, Shu et al. 1996). Le domaine CTAR2 de LMP1 peut activer la voie NF-kB par un mode semblable. En fait, l'engagement constitutif entre LMP1 et TRADD active les signalisations NF-kB et p38/MAPK, activation partiellement inhibée par un mutant dominant négatif de TRAF2 (Izumi and Kieff 1997; Eliopoulos, Gallagher et al. 1999). Ainsi, TRAF2 est un composant important de ces deux voies de signalisation.

Par des expériences de gènes rapporteurs de NF-kB, la protéine de fusion LMP1-CTAR2 contenant les domaines N-terminal, transmembranaires et CTAR2 de LMP1, induit une activation de NF-kB plus faible (environ 25% plus faible) que la protéine LMP1 entière (Huen, Henderson et al. 1995; Mitchell and Sugden 1995). La voie JNK-AP1 est également activée par l'interaction entre LMP1 et TRADD dans les cellules embryonnaires humaines de rein, les HEK293 (Kieser, Kilger et al. 1997; Eliopoulos and Young 1998; Hatzivassiliou, Miller et al. 1998; Eliopoulos, Blake et al. 1999).

Ainsi, parmi les TRAFs, seul TRAF2 (avec la coopération de TRAF5) peut venir se fixer au domaine CTAR2 de LMP1. Mais cette interaction se fait de façon indirecte par l'intermédiaire de TRADD. En fonction des études, son recrutement ne semble pas être essentiel à la signalisation générale de LMP1, puisque dans les cellules TRAF2-, LMP1 continue d'induire normalement ses voies de signalisation (Luftig, Prinarakis et al. 2003; Wan, Sun et al. 2004). De plus, il semble que TRAF3 permette la coopération physique des deux domaines CTAR de LMP1 (Xie and Bishop 2004).

II.2.2.2- Interaction directe de CTAR2 avec la protéine RIP

RIP (Receptor Interacting Protein) est une protéine de 74 kDa associée au TNFR1 qui induit la survie des cellules. Semblable à TRADD, RIP contient un domaine DD dans sa partie C-terminale qui provoque des interactions protéine-protéine avec le TNFR1 et TRADD (Hsu, Shu et al. 1996). Elle est activée par ubiquitination en Lys63, lui permettant de recruter les protéines TAB2 (TAK1 Binding protein 2) et TAK1 (Transforming growth factor-beta-Activated Kinase 1). L'interaction entre RIP et LMP1 a été confirmée par des expériences de double hybride de levure et par des co-immunoprécipitations (Izumi, Cahir McFarland et al. 1999), faisant de RIP, une des protéines partenaires identifiées de LMP1. Comme TRADD,

RIP interagit avec le domaine CTAR2 de LMP1. En utilisant un mutant de LMP1, muté sur ces trois derniers aa (Y₃₈₄YD₃₈₆ en I₃₈₄D₃₈₅), l'interaction de RIP avec LMP1 devient moins affine. Bien que la région fixant RIP sur LMP1 chevauche la région fixant TRADD (aa 355-386), RIP requiert une plus large zone d'interaction (Izumi, Cahir McFarland et al. 1999). Le domaine N-terminal de RIP contient un domaine kinase semblable à celui des sérine-thréonine kinases, suggérant que RIP peut phosphoryler d'autres protéines. Cependant, ses substrats potentiels sont toujours inconnus (Baker and Reddy 1998). La surexpression de RIP active NF-κB (Hsu, Shu et al. 1996). La transfection de RIP a un effet additif sur l'activation de NF-κB induite par LMP1 (Izumi, Cahir McFarland et al. 1999). Comme une kinase, RIP peut phosphoryler NIK aboutissant à l'activation de NF-κB. Cependant, on ne sait pas encore si l'interaction de RIP est nécessaire pour induire l'activation des JNK par LMP1 et induire la transformation cellulaire.

II.2.2.3- Interaction directe de CTAR2 avec la protéine BS69

Une étude très récente a montré qu'en plus de TRADD et de RIP, un autre adaptateur nouvellement identifié peut se fixer directement au domaine CTAR2 de LMP1. En effet, l'équipe de Wan et al. a montré que la protéine BS69 pouvait interagir directement avec LMP1, afin d'activer la voie de signalisation JNK (Wan, Zhang et al. 2006). BS69, comme nous l'avons vu auparavant dans le paragraphe V.1.1.2 de la partie 3, fixe EBNA2 et joue le rôle de répresseur de la transcription (Ansieau and Leutz 2002). De plus, BS69 peut être recrutée par le facteur transcriptionnel MGA (Myc-related cellular transcription factor). L'expression de EBNA2 permet par sa fixation à BS69 de libérer MGA, lui permettant d'agir sur les promoteurs de myc (Ansieau and Leutz 2002).

Depuis plusieurs années, une isoforme de BS69 nommée BRAM1 (BMP receptor Associated Molecule 1) a été décrite et étudiée. BRAM1 semblerait être générée par un épissage alternatif de l'ARNm BS69 et correspondrait au tiers de la partie C-terminale de BS69. BRAM1 est cytosolique et participe aux voies de signalisation initiées à partir des récepteurs TGFβ et BMP (Bone Morphogenetic Protein) (Kurozumi, Nishita et al. 1998) (Figure 54).

BS69, identifiée à l'origine comme cible de la protéine E1A de l'adénovirus est une protéine nucléaire de 74 kDa ubiquitaire contenant plusieurs domaines fonctionnels, bien identifiées. BS69 comporte un bromodomaine (BrD), des domaines PHD (Plant HomeoDomain), un domaine contenant le térapeptide PWWP, une séquence NLS (Nuclear

Localisation Signal), un domaine de fixation pour la protéine E1A de l'adénovirus et un domaine MYND (Figure 54).

Le bromodomaine est une structure de 110 aa répartis en 4 hélices α séparées par des boucles formant une surface d'interaction hydrophobe, reconnaissant de façon spécifique des résidus lysine acétylés (Jeanmougin, Wurtz et al. 1997; Zeng and Zhou 2002). Le domaine PHD adopte une structure en double doigt-de-zinc et serait également impliqué dans des interactions protéine-protéine (Aasland, Gibson et al. 1995). Le domaine PWWP tire son nom des résidus proline et tryptophane le constituant.

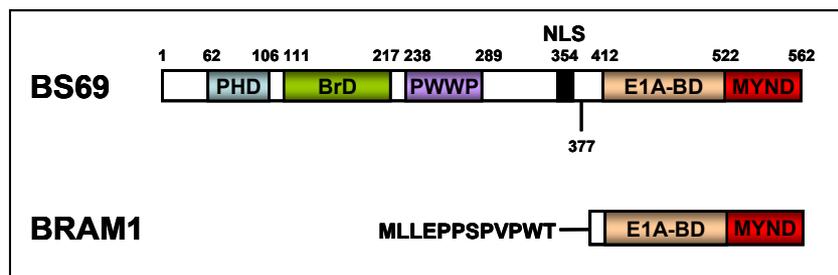


Figure 54 : Structure de BS69 et BRAM1 (d'après (Wan, Zhang et al. 2006))

Cependant, d'après l'étude très récente de Velasco, il est suggéré que cette molécule BRAM1 n'existerait pas et que sa découverte proviendrait de l'étude d'un gène chimérique (un fragment du gène BS69 fusionné en aval d'un fragment du gène anks1, correspondant au peptide spécifique en N-terminal de BRAM1 – cf. Figure 54) très certainement obtenu lors d'un clonage de banque d'ADNc (Velasco, Grkovic et al. 2006).

La découverte très récente de BS69 comme adaptateur de LMP1 (Wan, Zhang et al. 2006) pose beaucoup d'interrogations sur le rôle de BS69 dans les activations des différentes voies induites par LMP1. Pourtant d'après les travaux récents de Wan et al, BS69 est l'adaptateur clé de CTAR2 pour l'induction de JNK par LMP1. Son inhibition par RNAi entraînerait une perte de l'induction de cette voie. Par conséquent, son oligomérisation au niveau des rafts, par les domaines transmembranaire de LMP1, suffirait à activer la kinase. BS69 pourrait permettre de faire la connexion physique entre LMP1 et TRAF6, respectivement grâce à son domaine MYND et un site situé entre le domaine PWWP et le NLS.

Même si BS69 est surtout nucléaire, Wan et al. ont rapporté une localisation constitutive de BS69 dans les rafts (Wan, Zhang et al. 2006), augmentée par LMP1. Cependant, ces observations ont été faites dans des conditions bien particulières de surexpression de BS69. En effet, BS69 endogène est strictement nucléaire et associée à la

chromatine (Velasco, Grkovic et al. 2006). L'interaction entre LMP1 et BS69 nécessiterait donc une exportation de BS69 du noyau vers le cytoplasme. Il est à noter que BS69 interagit avec le facteur de transcription ETS2, lui-même exporté vers le cytoplasme de façon dépendante de CRM1 suite à un signal induit par LMP1 (Ohtani, Brennan et al. 2003; Wei, Schaffner et al. 2003). Cette protéine nouvellement impliquée dans la signalisation LMP1 pourrait être importante, mais il faut approfondir son implication dans cette signalisation, par d'autres études.

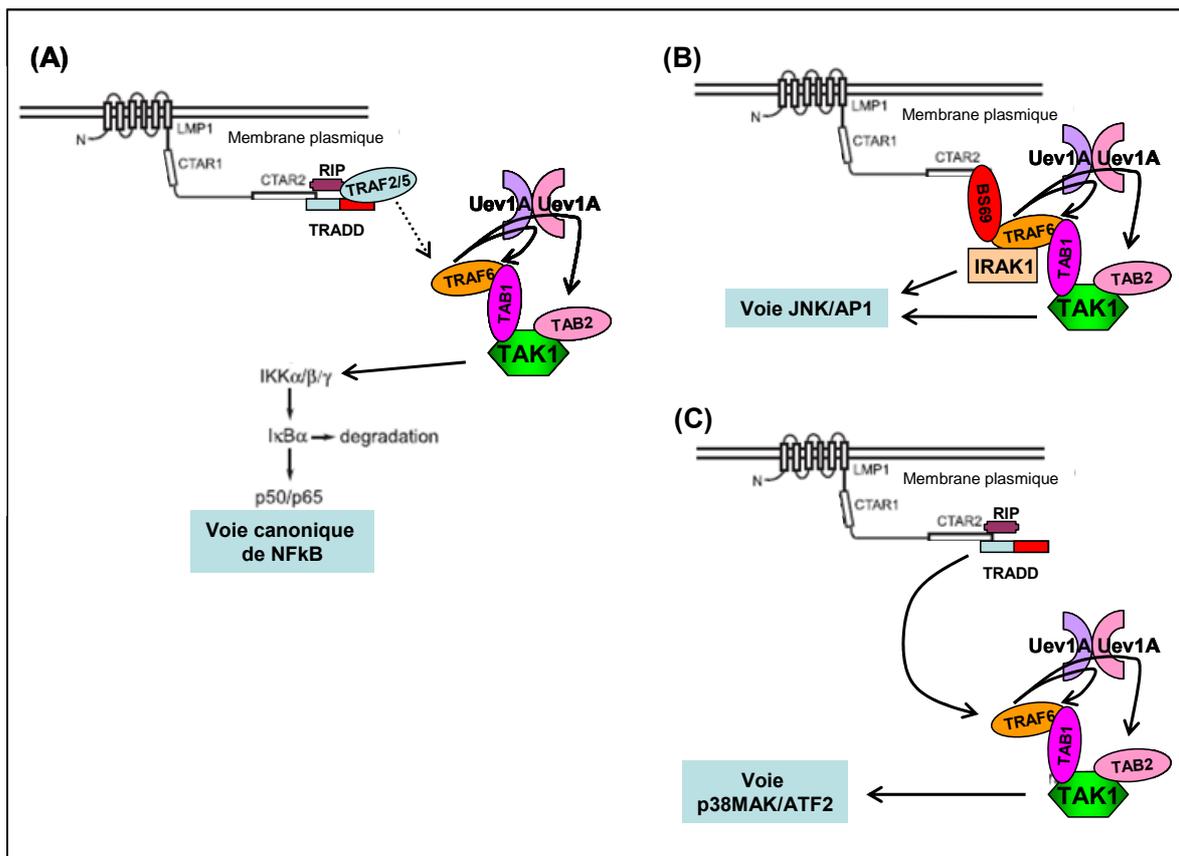


Figure 55 : Schéma récapitulatif des recrutements des différents adaptateurs sur le domaine CTAR2 de LMP1 et des médiateurs du signal.

En résumé, ce domaine CTAR2 est donc impliqué dans l'activation des voies de signalisation NF-κB, JNK/AP1, p38MAPK. L'induction par le domaine CTAR2 de LMP1 de la voie NF-κB se fait par le recrutement direct de TRADD et de RIP. Ces deux protéines vont à leur tour, recruter TRAF2/TRAF5. Ces adaptateurs provoquent l'activation de la voie canonique de NF-κB. La voie de signalisation JNK va être induite par le domaine CTAR2 via la protéine BS69, préalablement transloquée du noyau au cytoplasme. BS69 recrute TRAF6 aboutissant à l'activation de la voie JNK. Le domaine CTAR2 de LMP1 va induire la voie

p38/MAPK par l'intermédiaire du recrutement de TRADD et RIP, qui ensuite vont activer TRAF6 de manière inconnue. L'activation de TRAF6 va aboutir à l'induction de la p38MAPK.

II.2.3- CTAR3 : Un domaine de transduction ?

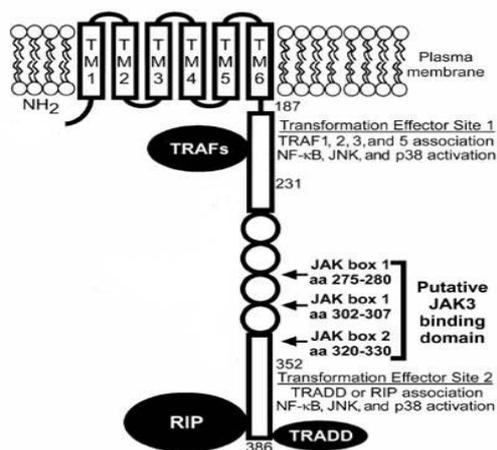


Figure 56 : Structure de LMP1 et motifs putatifs de JAK3. (Higuchi, Kieff et al. 2002).

Le rôle de cette région appelée dans la littérature « CTAR3 », dans la signalisation JAK/STAT est très controversé. Cette région comprise entre CTAR1 et CTAR2, est composée des aa 233 à 350. Elle inclut quatre répétitions imparfaites directes, d'une séquence conservée PQDPDNTDDNG. Elle comprend également une séquence PPQLT des aa 320 à 324, ressemblant à un motif de fixation pour les TRAFs, PXQXT/S, mais qui ne fonctionne pas comme lui. Cette région possède un site de clivage par des protéases (entre les aa 241 et 242), ainsi que 19 sites potentiels de phosphorylation de sérine ou de thréonine. De plus, cette région contient des séquences qui sont variables en fonction des isolats humains, rapportées comme affectant la capacité de LMP1 à transformer des fibroblastes de rongeur (Fennewald, van Santen et al. 1984; Hu, Zabarovsky et al. 1991; Li, Chang et al. 1996; Mehl, Fischer et al. 1998).

En outre, LMP1 possède des sites consensus caractéristiques pour l'interaction avec des membres de la famille des JAKs. Ces sites consensus définissent deux motifs particuliers. Le premier motif nommé « motif box 1 » est une séquence riche en proline (PXXPXP) censé servir à la fixation des JAKs (aa P₂₇₅HDPLP₂₈₀ et aa P₃₀₂HDPLP₃₀₇). Le deuxième motif nommé « motif box 2 » joue un rôle dans l'activation de kinases (aa P₃₂₀PQLTEEVENK₃₃₀) (Gires, Kohlhuber et al. 1999). Cette région « CTAR3 » n'est pas essentielle pour la transformation des lymphocytes B par l'EBV (Izumi, Cahir McFarland et al. 1999).

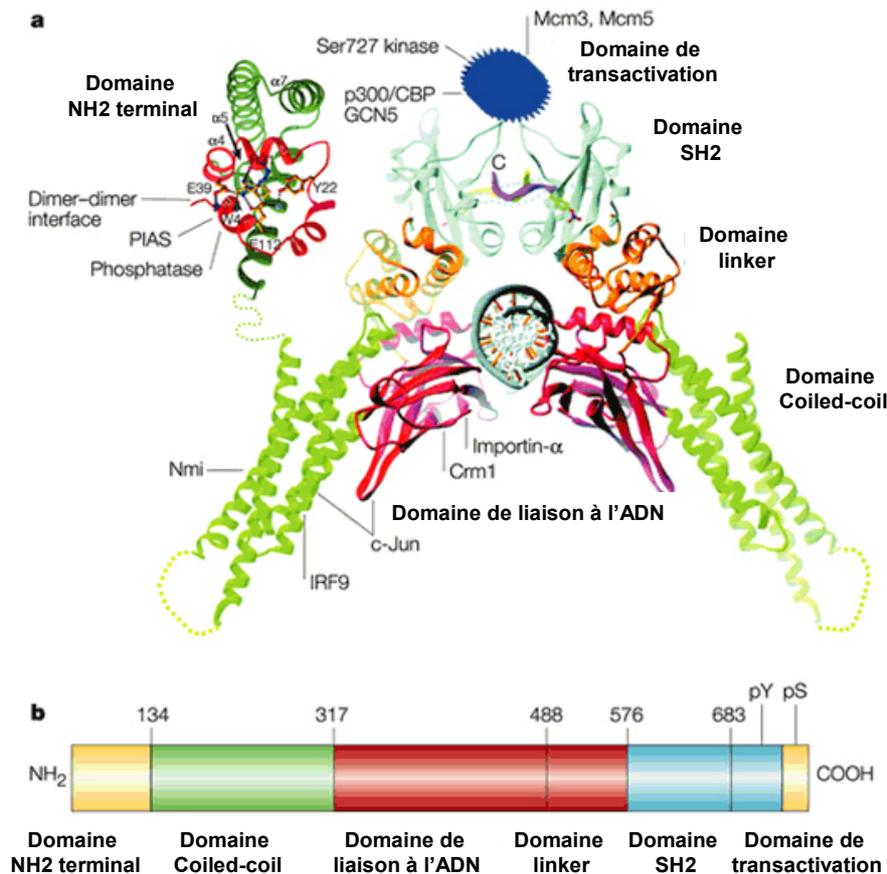


Figure 57 : Structure des domaines des protéines STATs et sites de fixation à l'ADN. (a) Structure tridimensionnelle du dimère de STAT1 fixé à l'ADN. La structure du noyau (acides aminés 130-712) montre la liaison d'un dimère de STAT1 à l'ADN et les sites de fixation de diverses protéines dans divers domaines. CBP : CREB Binding Protein ; IRF, Interferon Regulatory Factor ; Mcm : Minichromosome maintenance ; Nmi : N-Myc interactor ; PIAS, Protein Inhibitor of activated STATs. (b) Structure de STAT1. STAT : Signal Transducer of Activator of Transcription ; SH2, Src-homology-2 domain. (D'après (Levy and Darnell 2002)).

Les protéines STATs (Signal Transducers Activators of Transcription) peuvent être activées par des récepteurs constitutivement actifs. Ces protéines STATs sont des facteurs de transcription retrouvés constitutivement activés dans certaines pathologies malignes associées à l'EBV (Weber-Nordt, Egen et al. 1996; Chen, Lee et al. 1999; Chen, Lee et al. 2001; Kube, Holtick et al. 2001) comme la maladie de Hodgkin ou comme dans les carcinomes du nasopharynx. Dans les cellules épithéliales, l'expression de LMP1 a été associée à une augmentation de l'expression de STAT3 et STAT5 constitutivement activés (Chen and Chen 2003). Une interaction directe a été rapportée entre LMP1 et JAK3 par l'intermédiaire des acides aminés 233 à 350. L'activation de JAK3 et de STAT3 dans des lymphocytes B infectés par l'EBV, demeure cependant très controversée (Gires, Kohlhüner et al. 1999; Higuchi, Kieff et al. 2002). Ainsi, une protéine déletée de CTAR1 et CTAR2 possédant seulement CTAR3 est incapable d'induire l'activation des STATs (Brennan, Floettmann et al. 2001). De plus

dans une étude, Higuchi et al, ont montré que dans les LCLs, les quantités de protéines JAK3, STAT3 et STAT5 activées restent les mêmes que l'on soit en présence de LMP1 sauvage ou de LMP1 délétée de CTAR3 (Higuchi, Kieff et al. 2002). Les domaines CTAR1 et CTAR2 participent donc de façon indirecte à l'induction de la voie de signalisation des JAKs/STATs par LMP1.

III- Les voies de signalisation induites par la protéine LMP1

III.1- La voie de signalisation NF- κ B

Le facteur de transcription NF- κ B joue un rôle prépondérant dans la plupart des expressions de gènes induites par LMP1 (Devergne, Cahir McFarland et al. 1998; He, Xin et al. 2000; Mehl, Floettmann et al. 2001; Zhang, Wu et al. 2001). L'activation de cette voie de signalisation est associée à l'immortalisation induite par LMP1 des lymphocytes B primaires humains (Devergne, Hatzivassiliou et al. 1996; Izumi and Kieff 1997; Cahir McFarland, Izumi et al. 1999) et à la transformation de quelques lignées de cellules de rongeurs (He, Xin et al. 2000; Xin, He et al. 2001; Pomerantz and Baltimore 2002). Les voies NF- κ B dites canoniques (Ghosh and Karin 2002) et non-canoniques peuvent être activées par LMP1.

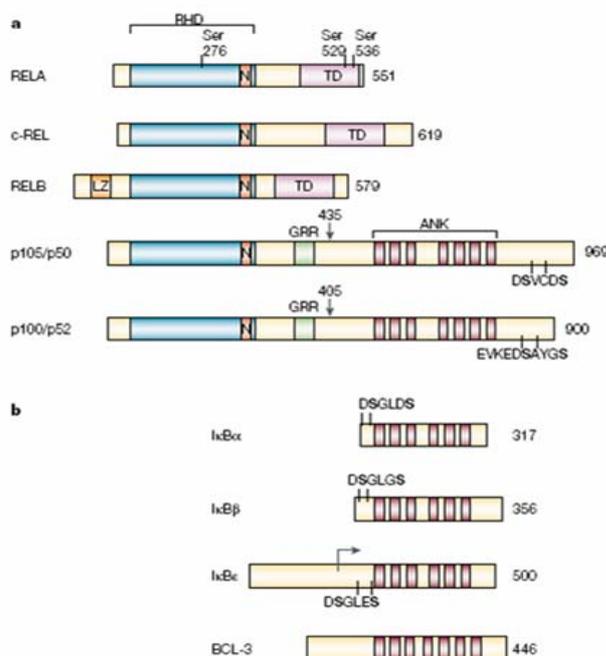


Figure 58 : Structure et domaines fonctionnels de la famille Rel/NF- κ B.

Les séquences peptidiques notées sur p105, p100, I κ B α , β , ϵ correspondent à leur site de phosphorylation.

RHD :Rel Homology Domain ;
 N :Nuclear localisation signal ;
 TD : Transactivation domain ;
 LZ : Leucine Zipper ;
 GRR : Glycine Rich region ;
 ↓ : site de clivage ;
 ANK : ANKyrin repeats.
 (D'après (Li and Verma 2002)).

Les protéines NF- κ B forment la famille des facteurs de transcription Rel/NF- κ B incluant 5 membres RelA/p65, RelB, NF- κ B/p50, NF- κ B2/p52, et c-Rel, qui vont former des homo- ou des hétérodimères comme p50-p50, p52-p65, et p65-p50 (Herrero, Mathew et al. 1995; Paine, Scheinman et al. 1995; Eliopoulos, Dawson et al. 1996). Tous ces membres possèdent un domaine très conservé d'environ 300 aa, appelé « Rel Homology Domain »

(RHD), permettant simultanément la fixation à l'ADN, la dimérisation des sous-unités, la localisation nucléaire (motif N) et la liaison à la protéine inhibitrice IκB (Inhibitor of NF-κB) ((Moynagh 2005) - cf. Figure 58). Les protéines inhibitrices IκB incluant 3 isoformes : IκBα, IκBβ et IκBε, se fixent aux complexes NF-κB par des motifs « Ankyrin Repeats » empêchant ainsi, leur translocation nucléaire et par conséquent leur activité transcriptionnelle (Figure 58). Les protéines Rel/NF-κB sont classées en deux sous-classes en fonction de leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles. Les protéines de la première classe, p105 (ou NF-κB1) et p100 (ou NF-κB2), sont synthétisées sous forme de précurseurs possédant du côté C-terminal, un long domaine inhibiteur contenant plusieurs répétitions de motifs ankyrines « Ankyrin Repeats ». Les deux précurseurs p105 et p100 sont clivés respectivement en p50 et p52 après clivage protéolytique par le protéasome qui dégrade spécifiquement la partie C-terminale. Les domaines Rel de p50 et p52 sont alors capables de se fixer à l'ADN mais ils n'ont cependant que des activités transcriptionnelles très faibles, car ils possèdent leurs sous-domaines transactivateurs propres. Au contraire, les trois protéines de la deuxième classe, c-Rel, RelB et p65/RelA sont directement synthétisées sous leur forme fonctionnelle et contiennent toutes, un domaine d'activation de la transcription (TD) en C-terminal (Figure 58).

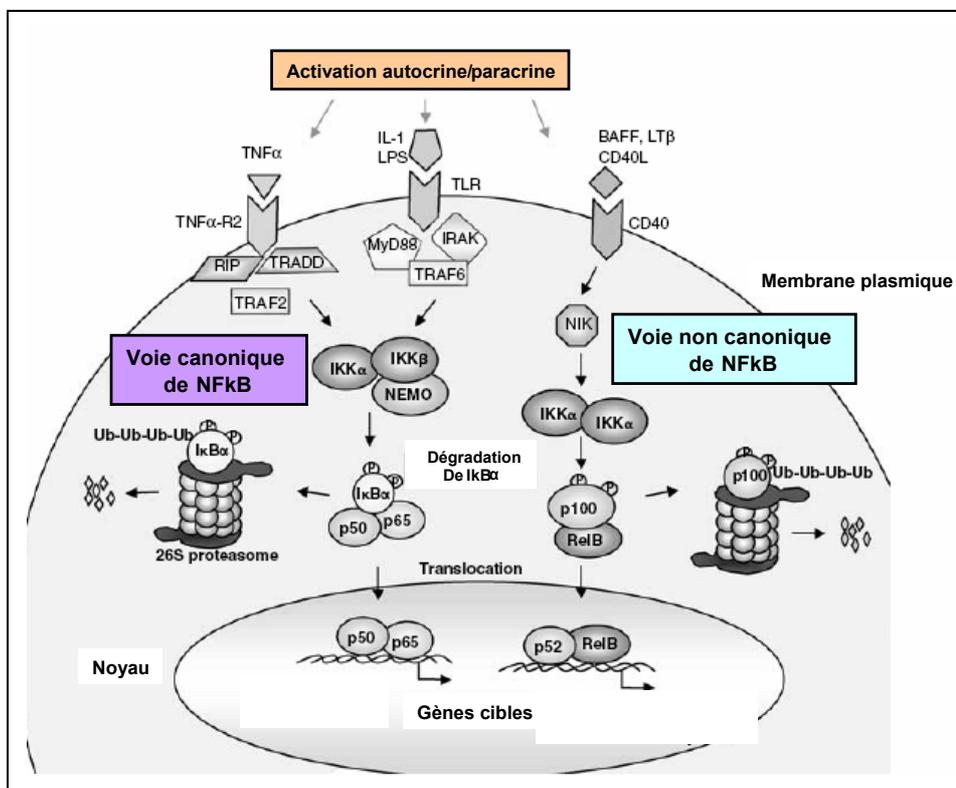


Figure 59 : Voie canonique et voie non canonique de NF-κB.
(D'après (Braun, Carvalho et al. 2006)).

Toutes les protéines Rel peuvent former des homo- ou des hétérodimères, sauf RelB qui ne forme que des hétérodimères. Cette diversité de combinaisons contribue à la régulation différentielle de nombreux gènes. NF- κ B se fixe de façon spécifique sur des séquences d'ADN, de dix paires de bases nommées « site κ B » dont la séquence consensus est 5'-GGGRNYYYCC-3' (avec R : purine ; Y : pyrimidine ; N : n'importe quel nucléotide). NF- κ B est un facteur de transcription utilisant un motif hélice-boucle-hélice pour lier les éléments de séquences spécifiques dans les régions promotrices des gènes qu'il régule. Le complexe NF- κ B le plus abondant et le mieux étudié est l'hétérodimère p50/p65 et active la transcription de nombreux gènes. Un certain nombre de protéines kinases (IKK β , PKA, ...) peuvent phosphoryler p65 et augmenter ainsi l'activité du complexe NF- κ B. La phosphorylation du domaine d'activation de la transcription (TD) et/ou du RHD de p65 est un événement très important pour le recrutement et/ou l'interaction avec des cofacteurs et des sous-unités de la machinerie transcriptionnelle comme p300 et TFIIB (Moynagh 2005).

La voie NF- κ B peut être activée par différents stimuli tels que des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1), des toxines bactériennes (LPS, exotoxine B), des produits de gènes viraux (LMP1, Tax de HTLV1), ou par différents stress (Radicaux libres, UV, radiations γ). Dans la cellule, NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme par la protéine inhibitrice I κ B, possédant la partie « Ankyrin Repeats » d'un précurseur non mûré, qui se fixe au RHD, masquant et inhibant ainsi la séquence de liaison à l'ADN et la séquence de localisation nucléaire (NLS) de NF- κ B ((Moynagh 2005) - Figure 58).

Deux voies d'activation de NF- κ B distinctes, la voie canonique et la voie non canonique sont décrites. Cette distinction dépend de la dégradation de I κ B α ou de la maturation de p100. En effet, des stimuli comme le TNF α ou l'IL-1 induisent la voie NF- κ B dite canonique ou classique, se caractérisant par une activation du complexe IKK α /IKK β /IKK γ qui va cibler les complexes NF- κ B séquestrés par I κ B. Les sous-unités IKK α et IKK β des IKK phosphorylent deux résidus sérines dans la partie N-terminale d'I κ B α (IKK γ /NEMO, membre structurant le complexe IKK et ne portant pas d'activité enzymatique). Cette phosphorylation va entraîner une polyubiquitination d'I κ B α en Lys48 aboutissant à sa dégradation par le protéasome et donc à la libération du dimère (p50/p65) composant NF- κ B (Figure 59).

L'autre voie dite non canonique ou voie alterne se fait par d'autres récepteurs faisant partie de la superfamille des TNFR, tels que BAFF-R, le récepteur à la lymphotoxin- β , et le CD40. Cette voie non canonique ne nécessite que la kinase IKK α ciblant les complexes NF- κ B possédant NF- κ B2/p100. La kinase NIK (NF- κ B Inducing Kinase) va permettre l'activation de la kinase IKK α , qui phosphoryle deux sérines présentes dans la partie « Ankyrin Repeats » de l'extrémité C-terminale de p100. Par la suite, cette phosphorylation entraîne également une polyubiquitination en Lys48 provoquant une dégradation partielle de p100, puisque seule la partie « Ankyrin Repeats » est dégradée, la transformant ainsi en p52 (Figure 59).

L'hétérodimère ou l'homodimère NF- κ B est transloqué du cytoplasme dans le noyau et se fixe aux sites κ B présents dans les promoteurs des gènes cibles de NF- κ B, permettant la transcription spécifique de ces gènes cibles. La fixation de NF- κ B sur ces motifs κ B situés sur l'ADN fait intervenir d'autres facteurs qui vont s'associer à l'ADN et interagir avec NF- κ B comme ceux appartenant à la machinerie transcriptionnelle (TBP, TFIIB ou CBP/p300) ou des corépresseurs (Campbell, Rocha et al. 2004; Moynagh 2005). NF- κ B peut agir en synergie avec d'autres facteurs de transcription tels que c-Jun ou sp-1, suggérant que la régulation différentielle de l'expression des gènes cibles de NF- κ B proviendrait d'une combinaison de sites de fixation différents avec des facteurs de transcription différents (Figure 59).

Parmi tous les facteurs de transcription activés par LMP1, NF- κ B est essentiel à l'expression de la majorité des gènes induits par LMP1. L'inhibition de NF- κ B dans les LCLs, aboutit à la mort de ces cellules par apoptose (Asso-Bonnet, Feuillard et al. 1998; Cahir McFarland, Izumi et al. 1999; Feuillard, Memet et al. 2000). Le domaine CTAR1 de LMP1, est responsable de 20 à 30 % de l'activation de NF- κ B, alors que CTAR2 y contribue pour 70 à 80 % (Huen, Henderson et al. 1995; Mitchell and Sugden 1995; Eliopoulos and Young 1998; Eliopoulos, Blake et al. 1999). L'activation de la voie NF- κ B non-canonique dans des lignées cellulaires de fibroblastes (Saito, Courtois et al. 2003), dans des lignées de cellules épithéliales et de lymphocyte B (Atkinson, Coope et al. 2003; Luftig, Yasui et al. 2004) est médiée par la région CTAR1 de LMP1. La voie NF- κ B canonique est médiée par l'intermédiaire de la région CTAR2, ayant pour résultat la production de p100 (Atkinson, Coope et al. 2003; Saito, Courtois et al. 2003; Luftig, Yasui et al. 2004).

Suite à l'oligomérisation de LMP1 dans les rafts, le domaine CTAR1 va recruter TRAF3 ou TRAF2 directement selon les études. Ces dernières recrutent à leur tour la kinase NIK. Celle-ci va ensuite activer IKK α en la phosphorylant. Le domaine CTAR1 de LMP1 induit la voie non canonique de NF- κ B. Cette voie non canonique sera donc spécifique de CTAR1 (Figure 52).

De façon parallèle, le recrutement de TRADD et de RIP sur le domaine CTAR2 de LMP1, va induire le recrutement de TRAF6 conduisant à l'induction de deux signaux d'activation de NF- κ B par la voie canonique. D'une part, TRAF6 va recruter et activer, par l'intermédiaire de Ubc 13 et Uev 1A, le complexe TAB1/TAB2/TAK1 qui va alors activer le complexe IKK α /IKK β /IKK γ de la voie canonique (Figure 55). D'autre part, il y a l'activation de IRAK1 qui induit la phosphorylation de p65/RelA soit directement soit indirectement.

Au final, IKK permet la phosphorylation et la dégradation consécutive des protéines inhibitrices de NF- κ B, comme I κ B α ou p105. L'hétérodimère NF- κ B (p50/p65) est alors libéré et peut se transloquer dans le noyau où il peut exercer ses fonctions trans-activatrices.

Dans cette voie de signalisation, TRAF2 permet la formation d'un complexe catalytique de haut poids moléculaire facilitant l'initiation et l'amplification du signal d'activation de NF- κ B. Ce complexe contient les protéines NIK, IKK, les inhibiteurs I κ Bs et la sérine/thréonine kinase Tpl-2/Cot (Eliopoulos, Davies et al. 2002; Eliopoulos, Dumitru et al. 2002). La présence de Tpl-2/Cot dans ce complexe multiprotéique est nécessaire à l'activation de NF- κ B par LMP1. Dans ce contexte, cette kinase contrôle la phosphorylation des protéines inhibitrices I κ Bs et p105 (Eliopoulos, Davies et al. 2002; Eliopoulos, Dumitru et al. 2002). Par ailleurs, Tpl-2/Cot est également connue pour augmenter l'activation des protéines IKK et NIK (Lin, Cunningham et al. 1999). Dans la maladie de Hodgkin, la surexpression de Tpl-2/Cot est corrélée avec l'expression de LMP1 (Murono, Inoue et al. 2001; Eliopoulos, Davies et al. 2002).

III.2- Les voies de signalisation JNK/AP1 et P38MAPKK

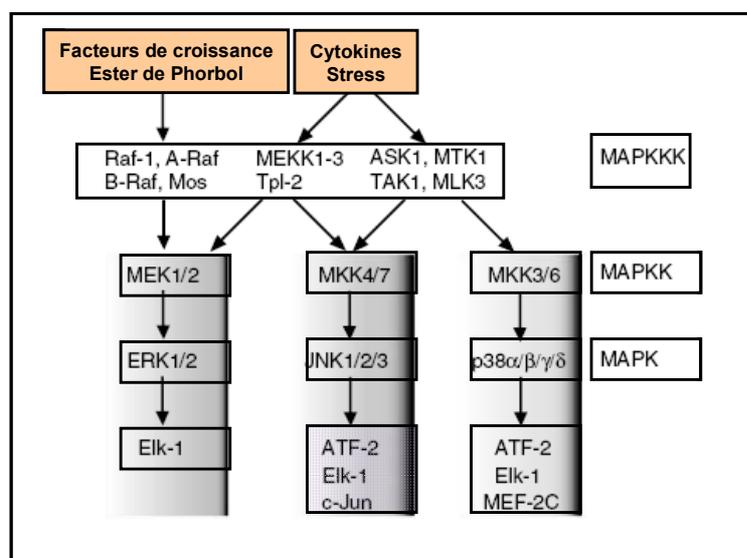


Figure 60 : Organisation de la voie des MAP Kinases JNK et p38.
(D'après (Nakano, Nakajima et al. 2006))

La famille des MAP kinases (Mitogen Activated Protein) joue un rôle important dans la régulation cellulaire en réponse à divers stimuli environnementaux, comme par exemple, les facteurs de croissance, les cytokines et les signaux de stress. Ces voies de signalisation impliquent une cascade d'évènement caractéristiques, consistant en l'activation par des molécules effectrices, intra- ou extracellulaires, d'une MAPK Kinase Kinase (MAPKKK ou MAP3K), laquelle active une MAPK Kinase (MAPKK ou MAP2K, ou encore MKK) qui activera à son tour une MAP Kinase (ou MAPK). Toutes ces activations successives en cascade s'effectuent par des phosphorylations généralement en sérine/thréonine des kinases. Parfois, une MAP4K est nécessaire pour initier la cascade. Ces cascades d'activation sont souvent organisées en modules grâce à des protéines d'échafaudages (Scaffold Protein) facilitant les processus de phosphorylations entre les différentes MAPK par un rapprochement et un positionnement des différents partenaires impliqués dans la cascade d'évènements.

Plusieurs MAPKKKs sont connues et sont le reflet du type cellulaire et du type de stimuli reçus par les cellules. Ainsi par exemple, la kinase Raf est activée en réponse aux facteurs de croissance et aux cytokines, tandis que les kinases MEKK1-4, MLKs (Mixed Lineage kinase), ASK1 et TAK1 sont activées en réponse au stress, au TGF- β et aux céramides (Zhang and Liu 2002). La super famille des MAPKKs comprend les kinases SEKs/MKKs (Signal Extracellular Kinase/MAPK Kinase). Les MAPKs incluent les kinases ERK1/2, p38MAPK et JNK/SAPK.

La liste de leurs substrats est très diverse et inclue notamment :

- c-jun/AP1, ATF2, Elk1, DPC4, p53 et NFAT4 pour JNK/SAPK
- Elk1, 90RSK, MNK1/2, Ets, myc, STAT1/3 et ER pour ERK1/2
- Hsp27, PLA2, MNK1/2, APKAP2, myc, MSK1, Elk1, ATF2 et STAT1 pour p38MAPK.

III.2.1- La voie de signalisation JNK/AP1

L'activation de la kinase JNK (Jun N-terminal Kinase), aussi appelée SAPK (Stress Activated Protein Kinase) est impliquée dans l'activation de l'apoptose en réponse à des signaux de stress (UV). Néanmoins, elle induit également des signaux de survie et de prolifération, par l'intermédiaire de LMP1 et de plusieurs autres récepteurs, comme le CD40, le TNFRI et l'EGFR (Berberich, Shu et al. 1996; Kieser, Kilger et al. 1997). Il existe trois JNK/SAPK différentes codées par trois gènes distincts, qui peuvent générer par épissage alternatif, 10 isoformes différentes dont le poids moléculaire apparent est soit 46 kDa, soit 54 kDa.

Les kinases JNK sont activées par phosphorylation de deux résidus, tyrosine et thréonine. Ces deux résidus sont séparés par un résidu proline formant ainsi un motif Thréonine-Proline-Tyrosine (TPY) à l'intérieur de la boucle d'activation. Les JNK sont activées par des cytokines, des agents perturbant la synthèse d'ADN, des protéines, le stress, des facteurs de croissance ainsi que des agents transformants. Deux membres de la famille des MAPKK, MKK4 (appelée aussi SEK1, ou JNKK1) et MKK7 (appelée aussi JNKK2), sont impliqués dans les voies JNK (Davis 2000). SEK1/MKK4/JNKK1 phosphoryle préférentiellement le résidu tyrosine, tandis que MKK7/JNKK2 phosphoryle des résidus thréonines. Ces deux kinases peuvent donc coopérer pour activer JNK, en conservant l'intégralité du signal (Davis 2000).

LMP1 peut activer le facteur de transcription AP1 par l'intermédiaire des MAPK JNK1 et p38 dans les lymphocytes B et dans les cellules épithéliales (Kieser, Kilger et al. 1997; Eliopoulos and Young 1998; Hatzivassiliou, Miller et al. 1998; Eliopoulos, Blake et al. 1999; Eliopoulos, Gallagher et al. 1999; Blake, Eliopoulos et al. 2001; Eliopoulos, Waites et al. 2003). L'activation de la voie JNK1/AP1, par les domaines CTAR1 et CTAR2 de LMP1, nécessite la fixation directe de TRAF1 avec TRAF2 sur CTAR1 (Figure 52) (Eliopoulos, Waites et al. 2003) et une fixation directe de BS69 sur CTAR2 (Wan, Zhang et al. 2006) (Figure 55). Le recrutement de TRAF1, et BS69 par LMP1 permet le recrutement de TRAF6.

TRAF6 va ensuite recruter le complexe TAB1/TAB2/TAK1 activé de façon Ubc13 et Uev1A dépendante (Figure 55). TAK1 va activer par phosphorylation les kinases activatrices de JNK, SEK1/MKK4/JNKK1 et MKK7/JNKK2. Une fois activée par la kinase SEK1/MKK4/JNKK1, la protéine JNK1 est transloquée dans le noyau où elle se fixe au domaine N-terminal de la protéine c-jun et la phosphoryle sur ses sérines 63 et 73. L'activation de c-jun permet la formation des homodimères c-Jun-c-Jun ou des hétérodimères c-Jun-c-Fos. Ces homo- ou hétérodimères vont ensuite transactiver l'expression de gènes possédant des promoteurs contenant des sites AP1. Parmi les gènes régulés positivement par c-Jun, on trouve les gènes c-Jun et c-Fos. La transactivation de ces gènes vont permettre l'amplification du signal d'activation d'AP1 (Kieser, Kilger et al. 1997).

III.2.2- La voie de signalisation p38MAPK

Les protéines de la famille p38MAPK composée de quatre isoformes (p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ) sont activées en réponse au stress cellulaire, aux cytokines pro-inflammatoires et à certains mitogènes. Elles peuvent jouer un rôle important dans l'apoptose, la différenciation, la survie, la prolifération, le développement, l'inflammation et dans les réponses au stress cellulaire. (Davis 2000; Schieven 2005). L'ensemble de ces p38MAPK est phosphorylé par la MAPKK, MKK6/SKK3 (Figure 61), tandis que MKK3 n'active que les isoformes α , γ et δ . MKK4, activant la voie JNK, peut activer l'isoforme p38 α . Les MAPKKK et leurs activateurs sont très nombreux. L'activation de p38MAPK provoque l'activation de différents facteurs de transcription comme ATF2, GADD153 et Elk1 (Davis 2000; Schieven 2005).

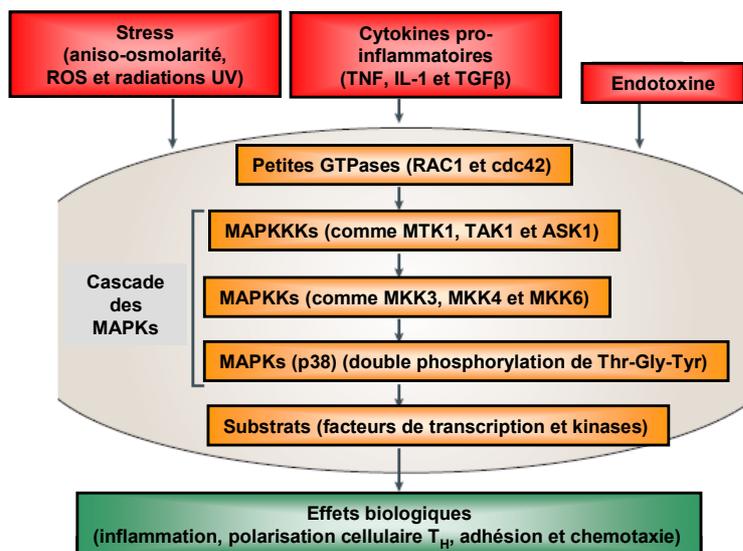


Figure 61 : La cascade de MAPK responsable de l'activation des membres de la famille des p38MAPK. (D'après (Ashwell 2006) revue)

LMP1 active la p38MAPK par CTAR1 et CTAR2 par l'intermédiaire de TRAF6 (Eliopoulos, Gallagher et al. 1999; Schultheiss, Puschner et al. 2001), de façon indirecte. LMP1 engage la voie p38MAPK via la protéine adaptatrice TRAF2 ou TRAF3 qui va fixer TRAF6 (Eliopoulos, Gallagher et al. 1999; Schultheiss, Puschner et al. 2001; Vockerodt, Pinkert et al. 2005). Dans un premier temps, TRAF2 ou TRAF3 se fixe au domaine CTAR1 ou à TRADD liée au domaine CTAR2, puis TRAF6 vient interagir avec TRAF2 ou TRAF3 (Eliopoulos, Gallagher et al. 1999; Schultheiss, Puschner et al. 2001; Vockerodt, Pinkert et al. 2005). TRAF6 ainsi activé, va activer simultanément IRAK1 et le complexe TAB1/TAB2/TAK1. TAK1 va alors activer la kinase MKK6, qui phosphoryle et active directement la p38MAPK (Schultheiss, Puschner et al. 2001) (Figure 52 et 55). IRAK1 va induire la p38MAPK par un mécanisme encore mal connu.

La p38 MAPK permet, d'une part, l'induction de cytokine par LMP1 (Eliopoulos, Gallagher et al. 1999; Vockerodt, Haier et al. 2001) et, d'autre part, la stabilisation des transcrits de la chemokine IP-10 (Vockerodt, Pinkert et al. 2005). L'une des cibles de ATF2 est le promoteur du gène c-Fos. Ainsi, dans les cellules exprimant LMP1, la voie p38MAPK pourrait augmenter, d'une part, la quantité de dimères c-Jun-c-Fos (AP1) et d'autre part, l'expression de LMP1 puisque le promoteur ED-L1 du gène BNLF1 codant LMP1 contient des sites de fixation pour ATF2.

III.3- La voie de signalisation STATs

La voie JAK/STAT sollicite trois familles de protéines : les JAKs, ou famille des Janus kinases, les facteurs de transcription de la famille STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription) et les protéines de la famille de CIS/SOCS, servant de régulateur de l'activité de la voie JAK/STAT. Cette voie implique la transmission du signal du récepteur de cytokine au noyau. Les JAKs sont stimulées par activation d'un récepteur de cytokine, ayant comme conséquence l'activation des STATs.

Les JAKs sont une grande famille de tyrosines kinases, de 120 à 140kDa, composées de 1130 à 1142 aa. Quatre JAKs (JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk2) ont été identifiées chez les mammifères. Ces JAKs se composent de sept différents domaines conservés (JH1 à JH7). JH1 constitue un domaine kinase, alors que JH2 est un domaine pseudo-kinase. Il a été proposé beaucoup de rôles possibles pour les différents domaines des JAKs. Ainsi, JH2 inhiberait JH1,

et favoriserait la fixation des STATs. JH2 serait exigé pour l'activité kinase de JH1. De plus, JH6 et JH7 seraient nécessaires pour l'association des JAKs avec les récepteurs de cytokines.

La famille des facteurs de transcription STATs se compose de sept protéines (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6) d'un PM de 75 à 95 kDa composée de 748 à 851 aa. La structure de ces protéines se compose d'un domaine d'oligomérisation en N-terminal, d'un domaine de fixation à l'ADN dans sa partie centrale, d'un domaine d'homologie 2 de Src (SH2) et d'un domaine de transactivation près de l'extrémité C-terminale (Figure 62). Le domaine de transactivation est le plus divergent en taille et en séquence. Le domaine d'oligomérisation contient une tyrosine rapidement phosphorylée par les JAKs, permettant une interaction entre deux domaines SH2 de deux protéines STATs. Cette interaction permet la dimérisation des STATs formant un complexe se fixant sur l'ADN. La formation des dimères favorise le passage du complexe dans le noyau, ainsi que la fixation à l'ADN permettant l'activation de la transcription des gènes cibles des STATs. La dimérisation des STATs augmente leur stabilité. La phosphorylation de la thréonine peut jouer un autre rôle dans la régulation de l'activité transcriptionnelle des STATs.

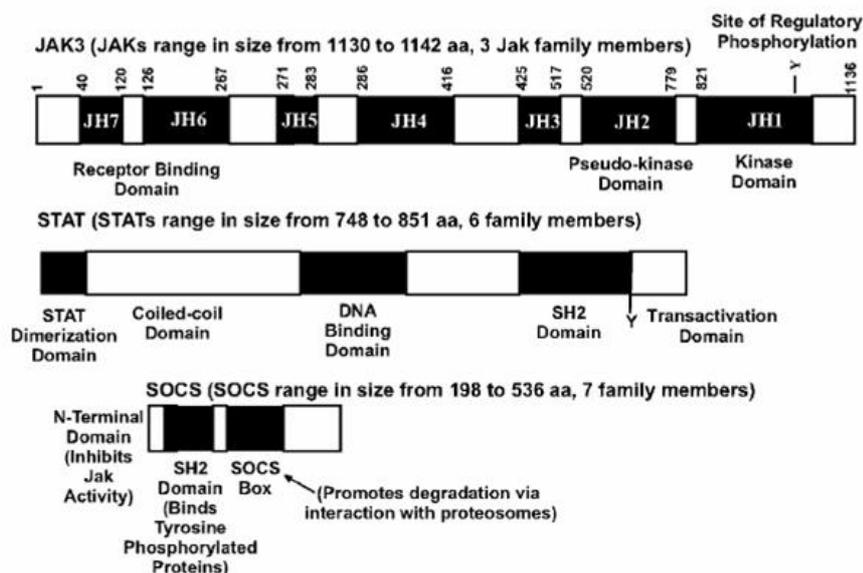


Figure 62 : Structures des protéines JAK3, STATs, SOCS. (D'après (Steelman, Pohnert et al. 2004)).

Les protéines STATs sont normalement cytoplasmiques et leur translocation nucléaire est activée de façon transitoire, grâce à leur phosphorylation sur leurs tyrosines par les kinases JAKs. Ces dernières sont activées par autophosphorylation après fixation sur des récepteurs cellulaires (O'Shea, Gadina et al. 2002) (Figure 63). L'activation des STATs peut être due à la

stimulation permanente de cytokines, de facteurs de croissance ou encore de virus tels que l'EBV.

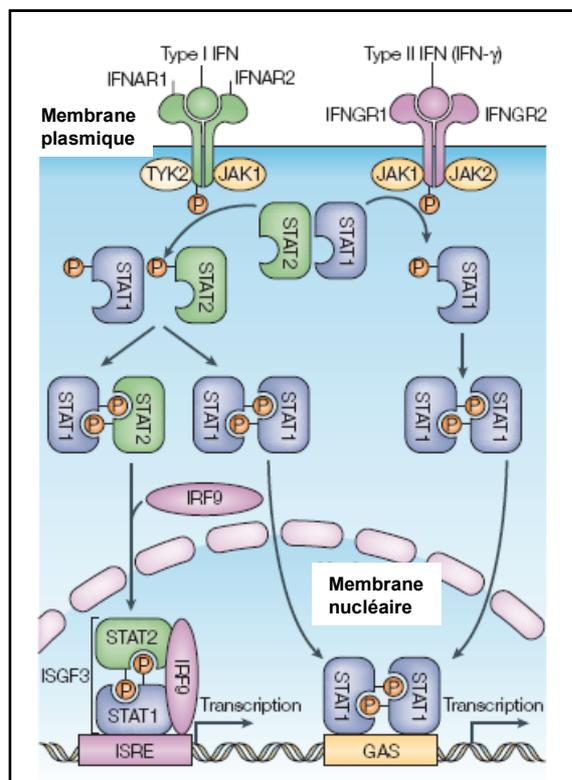


Figure 63 : Transduction du signal par les récepteurs aux interférons (IFNs). La fixation des IFNs de type I et II sur leurs récepteurs respectifs (IFN α R et IFN γ R) active les JAKs liées en permanence à ces récepteurs, JAK1 et TYK2 pour IFN α R, JAK1 et JAK2 pour IFN γ R. Les JAKs activées phosphorylent les résidus tyrosines du récepteur. Cette phosphorylation provoque la formation de sites de fixation pour les protéines STAT1 (IFN γ R) ou d'un complexe STAT1-STAT2 (IFN α R). Les STATs sont alors phosphorylés sur des résidus tyrosines par les JAKs. Après stimulation des IFN α R, les protéines STAT1 phosphorylées, forment des homodimères, tandis que la stimulation des IFN γ R provoque la formation des hétérodimères STAT1-STAT2 où STAT1 et STAT2 sont phosphorylés. Les dimères de STATs migrent alors dans le noyau. Les homodimères STAT1 se fixent sur les séquences d'ADN GAS des promoteurs de gènes cibles et les hétérodimères STAT1-STAT2 s'associent à la protéine IRF9, afin de former le complexe protéique ISGF3 se fixant sur les séquences spécifiques ISRE des promoteurs des gènes cibles, afin de transcrire les gènes cibles des IFNs. (D'après (Decker, Muller et al. 2005)).

Comme nous l'avons vu précédemment, LMP1 par son pseudo-domaine « CTAR3 » pourrait fixer la protéine kinase JAK3, mais de façon dépendante des deux autres domaines CTAR1 et CTAR2. Une interaction directe a en effet été rapportée entre LMP1 et JAK3 par l'intermédiaire des aa 233 à 350. Cette interaction permettrait l'activation de JAK3 et de STAT3 dans des lymphocytes B infectés par l'EBV. Mais cela demeure très controversée (Gires, Kohlhuber et al. 1999; Higuchi, Kieff et al. 2002). L'activation de JAK3 permettrait par la suite l'activation de STAT1, STAT3 et probablement STAT5 (Kilger, Kieser et al. 1998; Gires, Kohlhuber et al. 1999; Chen, Lee et al. 2001; Higuchi, Kieff et al. 2002; Chen, Hutt-Fletcher et al. 2003).

Il est important de noter que dans le cas de STAT1, sa phosphorylation et son activation induite par LMP1 dans les LCLs est presque exclusivement due à la sécrétion dépendante de NF- κ B des IFN α et IFN γ , qui par une boucle autocrine vont activer les récepteurs des interférons permettant ainsi l'activation de la voie STAT1. L'activation de de

cette voie est donc dépendante de l'activation de NF- κ B induite par les deux domaines CTAR1 et CTAR2 de LMP1 ((Najjar, Baran-Marszak et al. 2005)- Figure 64).

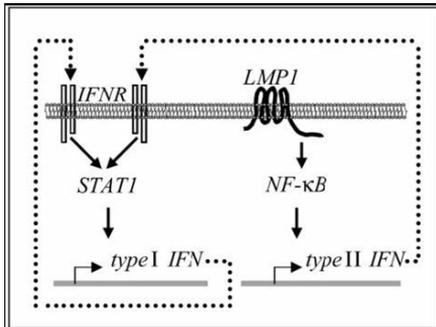


Figure 64 : Boucle autocrine de l'activation de STAT1 par LMP1 dépendante de NF- κ B.
(D'après (Najjar, Baran-Marszak et al. 2005))

III.4- Activation de la voie de signalisation PI3K/Akt

La PI3K (Phosphatidylinositol 3 Kinase) appartient à la famille des sérine-thréonine kinases activées par les stimuli extracellulaires ou par sa fixation aux récepteurs des membres de la famille des TNFR. La PI3K activée produit des phospholipides qui activent à leur tour, la kinase PKB/Akt (Protéine Kinase B/Akt), augmentant la phosphorylation de Bad, membre de la famille Bcl-2, supprimant ainsi le phénomène d'apoptose et favorisant par conséquent la survie des cellules (Datta, Dudek et al. 1997).

La famille des protéines PI3K comprend trois classes d'enzymes activées par de nombreux stimuli de croissance et mitogéniques, incluant les ligands de la famille des TNFR, tels que CD40L et le TNF α . La voie de la PI3K comprend 3 enzymes fonctionnant de manière successive. Ainsi la PI3K une fois activée, active la kinase PKB/Akt qui va activer la PDK1 (Phosphoinositide Dependent Kinase 1).

Les PI3K sont des lipides kinases phosphorylant spécifiquement les phosphoinositides en position D3 de l'inositol (D3 phosphoinositides). Les produits en résultant sont appelés les D3 phosphoinositides (Figure 65). Les PI3K de classe IA, sont constituées d'une sous-unité catalytique (p110 α , β ou δ) et d'une sous-unité adaptatrice ou régulatrice (p85 α/β , p55 α/γ ou p50 α) (Carpenter and Cantley 1996; Okkenhaug and Vanhaesebroeck 2001) (Figure 65). L'isoforme la plus communément activée par les tyrosines kinases est l'hétérodimère p85/p110. La PI3K de classe IA est une enzyme à double spécificité possédant, en plus de son activité lipide kinase, une activité sérine/thréonine kinase intrinsèque. En effet, la p110 peut s'autophosphoryler mais aussi phosphoryler la p85 sur un résidu sérine.

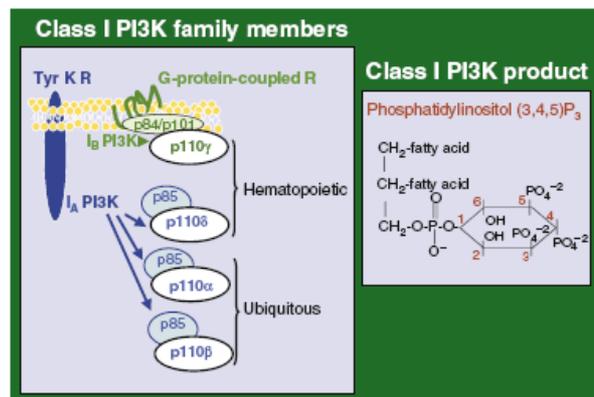


Figure 65 : La famille des PI3K de Classe I. (D'après (Garcia, Kumar et al. 2006))

Les D3 phosphoinositides par leur association avec de nombreuses protéines, vont activer de nombreuses et diverses voies de signalisation. Par exemple, ceux-ci participent à la survie cellulaire en activant la protéine kinase Akt et PDK1 (Bader, Kang et al. 2005) (Figure 66). De plus, ces D3 phosphoinositides participent également à la régulation du métabolisme du glucose en aval de l'activation d'Akt, ainsi qu'à la prolifération cellulaire notamment par l'activation de la phospholipase C γ (PLC γ) et de la Protéine kinase C ϵ (PKC ϵ). Enfin, ces D3 phosphoinositides peuvent participer à la migration cellulaire en agissant sur le cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de l'activation de vav, facteur d'échange de certaines petites protéines G de la famille Rho telle que Cdc42, ou à la maturation et à l'activation des lymphocytes B via l'activation de la kinase BTK (Bruton tyrosine kinase) (Toker and Cantley 1997; Leever, Vanhaesebroeck et al. 1999; Payrastra, Missy et al. 2001). La PI3K peut activer la famille des GTPases Rho, qui régule l'organisation du cytosquelette d'actine (Kjoller and Hall 1999; Bar-Sagi and Hall 2000).

La sous-unité p85 peut se fixer aux récepteurs (TRANSE)-R (TNF-Related Activation-induced Cytokine Receptor), un des membres de la famille des TNF-R (Wong, Besser et al. 1999; Arron, Vologodskia et al. 2001).

Récemment, il a été montré que LMP1, par son domaine CTAR1, peut induire la voie de la PI3K/Akt (Dawson, Tramountanis et al. 2003; Mainou, Everly et al. 2005), permettant ainsi, la polymérisation de l'actine, des transformations morphologiques, ainsi que la prolifération et la survie cellulaire (Dawson, Tramountanis et al. 2003). En effet, LMP1 et la p85 de la PI3K co-immunoprécipitent, s'accompagnant alors d'une augmentation de l'activité basale des lipides kinases dans des cellules épithéliales Rat-1 et HEK 293. La nature exacte de cette l'interaction est encore mal connue.

Cette interaction protéine-protéine entre LMP1 et p85 permet de relier directement la signalisation LMP1 aux cibles de la PI3K. LMP1 favorise la survie cellulaire et module le

cytosquelette. Ces réponses biologiques semblables font suite à l'activation de la PI3K. Par conséquent, il est donc possible que certaines réponses induites par LMP1 soient provoquées par la PI3K. Par des expériences de micro-injection des molécules LMP1, il a été montré une formation des fibres d'actine (Puls, Eliopoulos et al. 1999; Dawson, Tramountanis et al. 2003). Celle-ci a pu être complètement bloquée par la co-microinjection de mutants dominant négatifs de p85 ou de Rho, et par l'addition d'un inhibiteur de la PI3K (LY294002) (Dawson, Tramountanis et al. 2003). Par conséquent, la PI3K et ses effecteurs sont impliqués dans la formation des fibres d'actine ou dans le changement morphologique de la cellule induite par LMP1. LMP1 provoque la formation du cytosquelette d'actine par deux voies légèrement différentes : soit médiée par la GTPase Cdc42 via les domaines transmembranaires de LMP1 (Puls, Eliopoulos et al. 1999), soit médiée par la PI3K/Akt (GTPase Rho-induite) via les domaines de fixation des protéines TRAFs (CTAR1 ou CTAR2) de LMP1 (Dawson, Tramountanis et al. 2003).

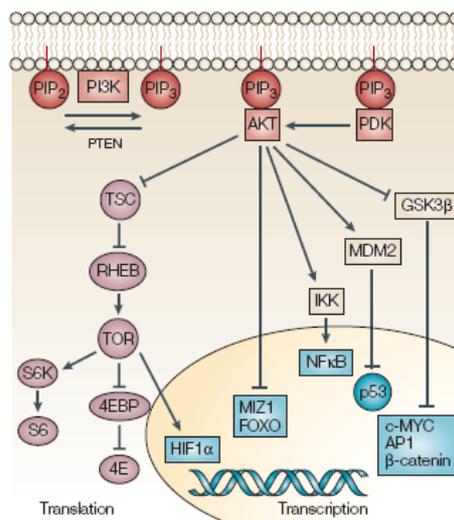


Figure 66 : Activation de la voie de la PI3K. Voir texte pour détails (D'après (Bader, Kang et al. 2005))

III.5- Activation de la voie de signalisation *cdc42*

L'activation de Cdc42, une GTPase de la famille Rho, ou la kinase Rac-1-activated kinase aboutit à l'induction de la polymérisation d'actine (Puls, Eliopoulos et al. 1999). Un mutant dominant négatif de Cdc42 bloque le changement du cytosquelette induit par LMP1. Divers mutants de LMP1 délétés des différents domaines transmembranaires ont permis de déterminer lesquels de ces domaines étaient capables d'induire l'activation de Cdc42, bien que le mécanisme d'activation de Cdc42 par LMP1 ne soit pas entièrement compris. Bien que les conséquences de cette réorganisation du cytosquelette induit par LMP1 soient encore très floues, elle peut être associée à la progression du cycle cellulaire ou à la migration des

cellules, impliquant un changement morphologique actif, une réorganisation du cytosquelette, et une métastase des cellules tumorales.

Des études ont suggéré par certaines expériences que les six domaines transmembranaires de LMP1 provoquent la réorganisation du cytosquelette et permet le changement morphologique des cellules. L'introduction de LMP1 dans des fibroblastes ou des lymphocytes B provoque un hérissément des membranes, ainsi que des « saillies de membrane » et une réorganisation des filaments d'actine (Wang, Liebowitz et al. 1988; Puls, Eliopoulos et al. 1999), responsable du changement de la morphologie des cellules.

Il est très tentant d'associer la formation d'actine induite par LMP1 ainsi que le changement morphologique aux phénotypes plus envahissants et métastatiques des tumeurs exprimant LMP1, particulièrement dans les NPC. La question importante que l'on peut poser est de savoir si la p85 est requise pour la transformation cellulaire induite par LMP1.

III.6- LMP1 et Ubiquitination ?

III.6.1- Dégradation de LMP1 par ubiquitination : implication du domaine N-terminal

LMP1 possède une demi-vie très courte, de 1h30 à 7h en fonction du type cellulaire (Baichwal and Sugden 1987; Mann and Thorley-Lawson 1987). Cette propriété semblerait être importante pour le turn-over rapide de LMP1, ainsi que de sa fonctionnalité (Martin and Sugden 1991). LMP1 est soumis à la voie de l'ubiquitination engendrant la dégradation de la protéine (Aviel, Winberg et al. 2000). Cependant, le site exact de fixation de l'ubiquitine sur LMP1 n'est pas encore très clairement établi. La suppression de 12 aa dans le domaine N-terminal, contenant probablement le site d'ancrage des ubiquitines, stabilise la molécule LMP1 (Aviel, Winberg et al. 2000). L'addition d'inhibiteurs du protéasome peut empêcher la dégradation de LMP1 et provoque la formation d'une échelle de poly-ubiquitines sur LMP1, celle-ci étant la marque des protéines subissant l'ubiquitination et la dégradation protéique par le protéasome. Par conséquent, ce domaine N-terminal est probablement responsable de l'ubiquitination et de la dégradation de LMP1 par le protéasome (Aviel, Winberg et al. 2000).

III.6.2- TRAFs et Ubiquitination

Parallèlement, le domaine CTAR1 de LMP1 permettrait par la fixation des TRAFs, l'ubiquitination de LMP1, ainsi que de ces protéines TRAFs associées (Rothenberger, Burns et al. 2003). Il existe une homologie structurale retrouvée entre TRAF2 et l'ubiquitine ligase

Shia (Polekhina, House et al. 2002). Bien que l'ubiquitination de LMP1 soit nécessaire à sa dégradation, des travaux récents indiquent que l'ubiquitine peut également être importante dans la signalisation de LMP1 (Aviel, Winberg et al. 2000; Deng, Wang et al. 2000; Wang, Deng et al. 2001).

Très récemment, il a été démontré que les TRAFs étaient des membres de la famille des « Ubiquitines-ligases » (Deng, Wang et al. 2000; Brown, Hostager et al. 2002; Shi and Kehrl 2003). En fonction du branchement de l'ubiquitine sur les lysines concernées utilisées pour la polymérisation de la chaîne de polyubiquitine (Lys48 ou Lys63), l'ubiquitination peut aboutir à deux types d'effets sur la protéine ciblée, soit la dégrader (Lys48) soit l'activer (Lys63) ((Chen 2005; Xia and Chen 2005)-cf. Fig.70). Les réactions d'ubiquitination se font par l'action successive de 3 enzymes E1, E2 et E3 (Figure 67). Ce phénomène d'ubiquitination de LMP1 peut se faire dans sa partie N-terminale et plus particulièrement dans la région de ses 12 premiers acides aminés. En effet, la suppression de ces 12 aa stabilise LMP1 (Aviel, Winberg et al. 2000). Une lysine serait donc impliquée dans ce processus.

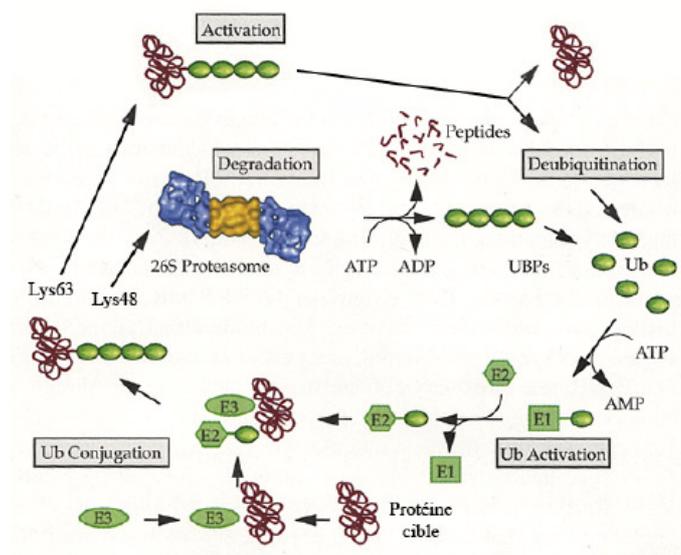


Figure 67 : Les voies de l'ubiquitine. L'ubiquitination des protéines fait intervenir trois types d'enzyme. E1 (ubiquitin-activating enzyme) active l'ubiquitine et la transfère sur des enzymes E2 (ubiquitin-conjugating enzymes). Avec l'aide de E3 (ubiquitine ligases), elles transfèrent et polymérisent l'ubiquitine sur les substrats. Dans la majorité des cas, les ligases E3 forment un pont moléculaire entre E2 et le substrat. D'autres ligases transfèrent eux-mêmes l'ubiquitine sur les protéines cibles. Ce sont les E3 qui assurent l'essentiel de la spécificité. Les ubiquitines sont spécifiquement polymérisées soit en Lys48 (conduisant à la dégradation de la protéine cible par le protéasome), soit en Lys63 (aboutissant à un signal d'activation de la protéine cible). Il existe aussi des enzymes impliquées dans la déubiquitinylation. Ces enzymes permettent le recyclage des molécules d'ubiquitine mais également, l'arrêt du signal en cas de chaîne d'ubiquitine en Lys63. (D'après <http://www.hgu.mrc.ac.uk/Research/Gordon/>).

Parmi les TRAFs, TRAF2, TRAF6 et TRAF7 comportent une activité de type E3 ubiquitine ligase (Deng, Wang et al. 2000; Brown, Hostager et al. 2002; Shi and Kehrl 2003; Morita, Kanei-Ishii et al. 2005). Comme la fonction des ubiquitine-ligases fait appel au domaine « RING finger », TRAF1 ne possédant pas ce domaine n'a pas cette fonction. TRAF3 et plus particulièrement TRAF5 (de vue de leur forte homologie structurelle avec TRAF2), possèdent probablement eux aussi cette activité E3 ubiquitine-ligase, mais cela reste à prouver.

III.6.3- LMP1 et la voie de l'ubiquitine de la protéine A20

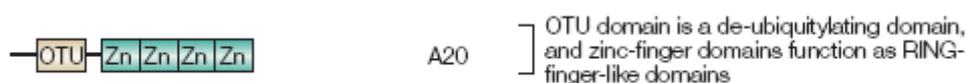


Figure 68 : Représentation schématique de la protéine A20.

La protéine A20 fonctionne comme une E3-Ubiquitine ligase par son domaine à « doigt de zinc » (Zing finger) (Zn), qui recrute les complexes ubiquitine-E2 et transfère la molécule d'ubiquitine au substrat. Par son domaine OTU (Ovarian Tumor domain), qui fonctionne comme l'enzyme dé-ubiquitinante DUB (De-Ubiquitylating enzyme) déubiquitine des substrats. (d'après (Liu, Penninger et al. 2005))

Le gène codant la protéine A20, a été décrit comme étant un gène cible de LMP1, permettant à A20 d'être impliqué dans l'inhibition de l'apoptose (Laherty, Hu et al. 1992; Fries, Miller et al. 1996). Comme les TRAFs, A20 est une protéine à doigts de Zinc, pouvant d'ailleurs se fixer à certains TRAFs, ainsi qu'à RIP pour les inhiber. Cette inhibition se fait à trois niveaux, en modulant tout d'abord, leur recrutement au niveau des récepteurs par sa fixation compétitive au site de fixation des TRAFS et RIP (Fries, Miller et al. 1999; He and Ting 2002), ou bien en inhibant leur activation, ou enfin en stimulant leur dégradation (Heyninck and Beyaert 2005). Ces deux dernières fonctions sont exclusivement dues à la double activité enzymatique d'A20. En effet, A20 est à la fois une « déubiquitinase » par son domaine OTU et une « ubiquitine ligase » par ces domaines à doigt de Zinc (Figure 68). En effet, A20 peut dépolymériser les ubiquitines déjà branchées entre elles par leur Lys63 (désactivant la cible) et ensuite catalyser la polyubiquitination en Lys48 (dirigeant la cible vers la dégradation par le protéasome) (Figure 69).

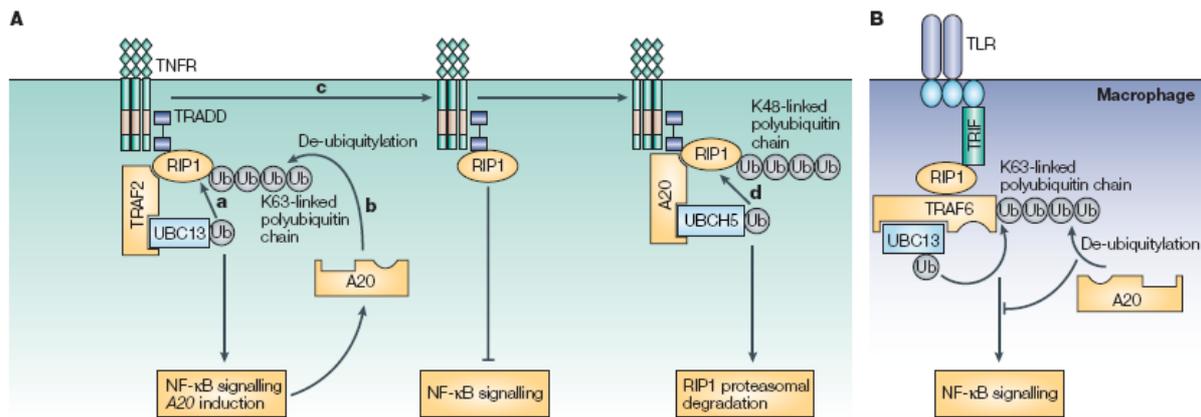


Figure 69 : Mécanisme d'inactivation de la signalisation NF-κB induit par le TNFRI.

(A) La stimulation du TNFRI par son ligand (TNF α) provoque la polyubiquitination TRAF2 dépendante sur la Lys63 (K63) de RIP1 qui interagit avec le TNFRI (a), qui a comme conséquence l'activation de NF κ B. A20 fonctionne alors d'abord comme une enzyme Dé-ubiquitinante en enlevant les chaînes de polyubiquitine liées à la Lys63 de RIP1 (b), A20 déplace donc TRAF2 du TNFR et se fixe à la place de TRAF2, ce qui termine la signalisation dépendante du TNF (c). À ce stade, A20 fonctionne alors comme une E3-ubiquitine ligase par le recrutement d'ubiquitine provenant de l'enzyme ubiquitine-E2 (UBCH5), facilitant le transfert de l'ubiquitine à partir d'UBCH5 à RIP1 et favorisant la polyubiquitination de RIP1 sur la Lys48 (d) et ensuite la dégradation de RIP1 par le protéasome. (B) A20 fonctionne également comme une enzyme Déubiquitinase en enlevant des chaînes de polyubiquitine fixés sur la Lys63 de TRAF6, médiateur de la signalisation des Toll-like Receptor (TLR). TRADD associé au TNFR par l'intermédiaire du domaine de la mort ; TRIF, la protéine adaptatrice contenant le domaine Toll/interleukin-1 récepteur (TIR) induisant l'interféron- β . (D'après (Liu, Penninger et al. 2005))

Eliopoulos et al. ont montré que A20, comme pour le CD40 et d'autres TNFR, peut inhiber les voies de signalisation NF- κ B et JNK induites par LMP1 par l'intermédiaire de CTAR1 ou de CTAR2 (Eliopoulos, Stack et al. 1997; Eliopoulos, Blake et al. 1999). Cette inhibition se fait, au moins en partie par une interaction directe de A20 avec LMP1, entraînant une déstabilisation de l'interaction de TRAF1, au niveau de CTAR1, et de TRADD, au niveau de CTAR2 (Fries, Miller et al. 1999).

L'implication directe des activités déubiquitinase et ubiquitine ligase de A20 dans l'inhibition de la signalisation de LMP1 n'a pas été vraiment démontrée. Cependant, on peut supposer d'après les constatations faites dans le cas des TNFR que A20 peut agir de façon directe pour inhiber la signalisation induite par LMP1. De plus, très récemment il a été montré que deux autres déubiquitinases (le suppresseur de tumeur « Cyldromatosis », CYLD, et « l'Ubiquitin specific Protease homologue 31 », USP31) peuvent inhiber l'induction de la voie NF- κ B par LMP1 (Trompouki, Hatzivassiliou et al. 2003; Tzimas, Michailidou et al. 2006).

IV. Les propriétés pléiotropes de LMP1

Les propriétés oncogéniques de LMP1 ont des effets majeurs sur la survie, la prolifération, la différenciation et la formation de métastases. Les différentes voies de signalisation activées par LMP1, de façon constitutive, participent pour la plupart à ces effets.

IV.1- LMP1 induit des altérations phénotypiques

Dans les cellules infectées par l'EBV, LMP1 induit la surexpression de nombreux marqueurs cellulaires impliqués indirectement dans le processus de transformation cellulaire. LMP1 transactive l'expression :

- de marqueurs d'activation comme le CD21, le CD23 (récepteur de basse affinité des IgE), le CD80 et le CD83 (molécules de co-stimulation des lymphocytes B), le CD30 et le CD40, l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), et c-Met (Horikawa, Sheen et al. 2001)
- de molécules d'adhérence telles que LFA1, LFA3, ICAM1, CD44. LFA1 et ICAM1 interagissent entre elles et sont en grande partie responsable de l'adhérence homotypique des LCLs donnant ainsi aux cellules des signaux de survie. Cela favorise les interactions entre intégrines (Cahir-McFarland, Carter et al. 2004) et les échanges de cytokines et facteurs de croissance (Park and Faller 2002). LMP1 inhibe également certaines molécules d'adhérence comme la E-cadhérine dans les cellules épithéliales (Tsai, Tsai et al. 2002).

IV.2- LMP1 régule l'expression de cytokines

La régulation de la production de nombreuses cytokines (IL-6, IL-8, IL-10, TNF), chimiokines (IP-10, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22) et facteurs de croissance (FGF2, VEGF) par les cellules hôtes a deux conséquences principales : une perturbation du système immunitaire de l'hôte (favorisant ainsi la survie des cellules infectées), et plus directement un ensemble de signaux de survie et de prolifération de façon auto- ou paracrine (Mosialos 2001; Wakisaka, Murono et al. 2002; Nakayama, Hieshima et al. 2004; Stevenson, Charalambous et al. 2005; Uchihara, Krensky et al. 2005; Vockerodt, Pinkert et al. 2005; Okudaira, Yamamoto et al. 2006).

IV.3- Effet cytotatique de LMP1 et action de LMP1 sur la prolifération et la différenciation cellulaire

Outre l'activation de Cdc42, les domaines transmembranaires de LMP1 ainsi que le domaine N-terminal contribuent non seulement, à l'inhibition de l'expression cellulaire des gènes (Sandberg, Kaykas et al. 2000), à l'inhibition de l'apoptose induite par le TNF α , mais aussi à l'inhibition de la prolifération cellulaire (Kaykas and Sugden 2000). Ces résultats paradoxaux sont très étonnants car la plupart des oncogènes agissent comme des facteurs facilitant la croissance cellulaire plutôt que l'inhibant. Plusieurs études se sont donc intéressées aux moyens mis en œuvre par LMP1 pour soit favoriser soit inhiber la prolifération des lymphocytes B. Ainsi, le niveau d'expression de LMP1 est particulièrement important pour maintenir un équilibre sensible entre ces deux processus. En fait, il a été montré dans des lymphocytes B que LMP1 est exprimée dans une gamme de 2.10^5 à 4.10^5 molécules/cellule. Le niveau d'expression de LMP1 compris dans cette gamme a comme conséquence l'inhibition de la prolifération des cellules (Sandberg, Kaykas et al. 2000). Aux concentrations inférieures, les effets de LMP1 sont prolifératifs pour les cellules (Kaykas and Sugden 2000). Ces résultats indiquent que le domaine transmembranaire de LMP1 sert non seulement d'ancrage de LMP1 à la membrane cellulaire afin de maintenir les protéines à la membrane des cellules, mais aussi, sert à faciliter également la signalisation NF- κ B induite par LMP1, modulant ainsi la morphologie des cellules, et la régulation cytotatique de LMP1.

L'expression de LMP1 altère la différenciation et la croissance de plusieurs types cellulaires. Ainsi, LMP1 par CTAR1 et CTAR2, induit la voie PI3K/Akt, et permet l'entrée des cellules infectées par l'EBV dans le cycle cellulaire (de G0 vers G1), mimant ainsi l'activation antigénique et les cytokines (Brennan, Mehl et al. 2002; Dawson, Tramountanis et al. 2003; Mainou, Everly et al. 2005). En effet, dans les LCLs, en bloquant la voie PI3K, les cellules s'accumulent en phase G1. Il est observé parallèlement une perte de l'activité transcriptionnelle des facteurs E2F nécessaires à l'entrée dans le cycle cellulaire, à la diminution d'expression des cyclines D2 et D3 et à une augmentation de la protéine p27^{kip1}, inhibiteur de CDK (Cyclin Dependent Kinases) (Arvanitakis, Yaseen et al. 1995; Brennan, Mehl et al. 2002; Mainou, Everly et al. 2005).

Dans les cellules épithéliales, *in vitro* et *in vivo* (souris transgéniques), LMP1 empêche la différenciation (Dawson, Rickinson et al. 1990; Wilson, Weinberg et al. 1990). Cette propriété de LMP1 pourrait expliquer le phénotype indifférencié fréquemment observé dans le CNP. LMP1 permet aussi aux LCLs et aux cellules épithéliales infectées d'être réfractaires

aux effets cytostatiques et apoptotiques du TGF- β (Transforming Growth Factor β). En effet, le TGF- β bloque les cellules en phase G1 du cycle cellulaire, probablement à cause de l'induction, via la voie Smad, de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21^{waf1}. LMP1 empêcherait l'expression de p21^{waf1} en activant les voies Erk et NF- κ B (Arvanitakis, Yaseen et al. 1995; Fukuda, Kurosaki et al. 2002; Mori, Morishita et al. 2003).

LMP1 peut aussi induire par l'activation constitutive de NF- κ B, les protéines Id1 (Inhibitor of differentiation) et Id3 (Everly, Mainou et al. 2004). Ces protéines peuvent inhiber l'expression de certains inhibiteurs du cycle cellulaire, comme la p16^{INK4a}. Les travaux de Everly et al. ont d'ailleurs décrit une baisse de p27^{kip1} et une augmentation de cdk2 et de pRb phosphorylée de façon concomitante.

Enfin, par un mécanisme original d'export nucléaire des facteurs de transcription ETS2, E2F4 et 5, LMP1 inhibe l'expression de p16^{INK4a}, normalement induite par ces facteurs de transcription (Ohtani, Brennan et al. 2003).

IV.4- LMP1 et Apoptose

Une des fonctions de LMP1, contribuant à son oncogénicité, est la suppression de l'apoptose. L'activation de la voie NF- κ B par LMP1 semble être essentielle pour l'inhibition de l'apoptose. Ainsi, en utilisant le mutant dominant négatif I κ B α et/ou l'inhibiteur chimique de NF- κ B, BAY 11-7082, l'apoptose est induite dans les LCLs immortalisées par l'EBV et dans les cellules transfectées par LMP1 (Asso-Bonnet, Feuillard et al. 1998; Cahir-McFarland, Davidson et al. 2000; Cahir-McFarland, Carter et al. 2004). LMP1 utilise la voie NF- κ B pour réguler positivement l'expression de plusieurs protéines anti-apoptotiques, telles que A20, TRAF1, l'inhibiteur de caspase c-IAP et les membres de la famille Bcl-2, comme Bcl-2, Bcl-XL, Bfl1 ou Mcl1 (Gregory, Dive et al. 1991; Henderson, Rowe et al. 1991; Laherty, Hu et al. 1992; Milner, Johnson et al. 1992; Martin, Veis et al. 1993; Rowe, Peng-Pilon et al. 1994; Fries, Miller et al. 1996; Wang, Rowe et al. 1996; Kenney, Guinness et al. 1998; Hong, Yoon et al. 2000; D'Souza, Edelstein et al. 2004; Xiong, Clarke-Katzenberg et al. 2004; Dirmeier, Hoffmann et al. 2005). Récemment, des travaux ont montré que LMP1 pouvait réprimer le gène pro-apoptotique codant la protéine Bax, via la voie NF- κ B (Grimm, Schneider et al. 2005). De plus, la voie PI3K, qui est une autre voie de signalisation induite par LMP1, est très importante pour la survie cellulaire. En effet, plusieurs études montrent l'importance de cette voie dans de nombreux modèles (lymphome de Burkitt, fibroblastes

Rat-1, LCLs) (Brennan, Mehl et al. 2002; Dawson, Tramountanis et al. 2003; Mainou, Everly et al. 2005).

Par ailleurs, LMP1 peut favoriser l'induction de l'apoptose dans certains cas. En effet, LMP1 semble capable de sensibiliser les cellules HeLa à l'apoptose induite par des drogues cytotoxiques comme l'étoposide et le cisplatine (Zhang, Uthaisang et al. 2005). Dans les LCLs, une étude a montré que l'EBV augmente l'expression de Fas au niveau de la surface cellulaire. LMP1 est impliquée dans cette surexpression du récepteur Fas (CD95) (Falk, Trauth et al. 1992), sensibilisant ainsi les cellules à la mort induite par les lymphocytes T exprimant le ligand de Fas (FasL) à leur surface (Le Clorennec, Youlyouz-Marfak et al. 2006).

IV.5- LMP1 augmente les propriétés invasives des cellules

In vivo, la migration cellulaire nécessite plusieurs étapes pour arriver au déplacement de la cellule. En effet, la cellule doit tout d'abord pouvoir modifier son adhérence, détruire ensuite les éléments du stroma lui faisant obstacle et enfin, se déplacer. LMP1 intervient dans toutes ces étapes. En effet, LMP1 modifie profondément l'expression des molécules d'adhérence. LMP1 peut surexprimer et hyperactiver l'activité enzymatique de plusieurs membres de la famille des MMP (Matrix MetalloProteinases), permettant ainsi aux cellules de dégrader des éléments de la matrice extracellulaire, afin de se déplacer. Dans de nombreux cas de CNP, l'activation de ces MMP est retrouvée (Lu, Chua et al. 2003; Kondo, Wakisaka et al. 2005; Stevenson, Charalambous et al. 2005). De plus, LMP1 diminue l'expression de gènes empêchant la migration cellulaire, comme RECK qui est un régulateur des MMPs (Liu, Peng et al. 2003).

Dans les cellules épithéliales MDCK, LMP1 par son domaine CTAR1 induit le facteur transcriptionnel ETS1, provoquant l'expression de gènes impliqués dans la morphogenèse et la migration (PAI-1, l'inhibiteur de l'activateur de plasminogène ; uPA, l'activateur urokinase-like du plasminogène ; c-Met, le récepteur de l'Hepatocyte Growth Factor) et permettant ainsi de modifier la morphologie cellulaire et d'augmenter leur pouvoir invasif (Kim, Yoshizaki et al. 2000; Horikawa, Sheen et al. 2001).

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Au sein du laboratoire, les travaux de comparaison des transcriptomes des lignées de Burkitt EBV- et EBV+ avaient suggéré que la latence III de l'EBV est associée à l'activation conjointe des gènes cibles de NF- κ B et de STAT1. Ainsi, au plan général, il avait été formulé la question des cibles transcriptionnelles cellulaires de l'EBV dans la transformation.

Mon objectif de thèse a donc consisté à tout d'abord les relations entre les cibles transcriptionnelles du virus, notamment NF- κ B et STAT1, et l'apoptose ou la prolifération des lymphocytes B. Puis, nous avons étudié la régulation par ces mêmes facteurs transcriptionnels du récepteur pro-apoptotique FAS (CD95) dans les lymphocytes B infectés par l'EBV, modèle de gène dont le promoteur intègre à la fois des signaux de survie comme NF- κ B et des signaux d'apoptose comme STAT1 ou p53 et dont la fonction dans des cellules EBV positives n'était pas comprise. A la suite de cette dernière étude, nous avons débuté un travail portant sur l'effet apoptotique induit par une surexpression de LMP1 dans les lymphocytes B infectés par l'EBV.

Une première partie du travail durant ma thèse a consisté à étudier le rôle du facteur de transcription STAT1 dans le contexte EBV. Ce travail a été effectué en collaboration avec l'EA 3406 de l'université Paris XIII.

Dans une première étude, correspondant à l'article 1, nous avons étudié le rôle de STAT1 dans l'apoptose induite par des dommages à l'ADN dans des lymphocytes B immortalisés par l'EBV (LCLs). Ainsi, nous montrons que l'expression de STAT1 β inhibe la phosphorylation, l'activité de fixation à l'ADN ainsi que l'activité transcriptionnelle de STAT1 α , aussi bien que l'expression de ces gènes cibles (p21WAF1/CIP1, TAP1, IRF1 et PKR). De plus, nous montrons que l'inhibition de STAT1 α par STAT1 β augmente d'une part la croissance cellulaire des cellules transfectées, et d'autre part, leur résistance à l'apoptose induite par la Fludarabine* et participe à l'arrêt du cycle cellulaire.

De plus, nous montrons que STAT1 α pourrait réguler l'activité de p53, et sensibiliserait les lymphocytes B à l'apoptose induite par la Fludarabine*.

Cette partie nous a permis de comprendre la contribution des facteurs transcriptionnels p53, STAT1 et NF- κ B induit par LMP1, dans le contexte de l'EBV.

Dans une deuxième étude, présentée dans l'article 2, nous montrons dans des lymphocytes B immortalisés par l'EBV (LCLs), que l'activation constitutive du facteur transcriptionnel NF- κ B par LMP1 provoque une activation de STAT1 (phosphorylation de STAT1) via une boucle autocrine de sécrétion des interférons. (Najjar I et al, J.Virol, 2005).

Nous avons ensuite étudié la contribution de ces 3 facteurs transcriptionnels, p53, STAT1 et NF- κ B induit par LMP1, dans la régulation du CD95 (FAS). Dans cette étude présentée correspondant à l'article 3, nous montrons que l'induction de l'expression de Fas via la protéine LMP1 de l'EBV, sensibilise les lymphocytes B infectés par l'EBV à l'induction de l'apoptose médiée par FAS. Cette régulation de FAS par LMP1 s'effectuant via NF- κ B, STAT1 et p53. Nous montrons par conséquent, que le programme de latence III de l'EBV sensibilise les lymphocytes B infectés par l'EBV, à l'apoptose médiée par ce récepteur de mort. Du point de vue de l'équilibre virus/hôte, ce processus pourrait rendre susceptible les lymphocytes B infectés par l'EBV en latence III, d'être éliminés par le système immunitaire.

Enfin, dans cette dernière partie des résultats, nous présentons quelques résultats préliminaires correspondant à une étude qui a émergé au sein du laboratoire et qui met en lumière les propriétés pro-apoptotiques de LMP1. Nous avons commencé à étudier les voies cellulaires impliquées dans la réponse apoptotique induite par LMP1. Ces résultats préliminaires montrent que la surexpression de LMP1 induit l'apoptose très précocement et que cette apoptose est médiée par l'auto-activation de Fas indépendamment de son ligand via une induction des ROS cellulaire par LMP1 dans les lymphocytes infectés par l'EBV (LCLs).

RESULTATS

Avant la présentation stricte des résultats, nous présenterons les outils moléculaires et cellulaires que nous avons utilisés.

➤ Les modèles cellulaires

- Nous avons utilisé des lignées de lymphomes de Burkitt infectées ou non par la souche B95.8 de l'EBV (BL2 et BL2+), ainsi que des lignées lymphoblastoïdes (LCLs) infectées par l'EBV en état de latence III (1602 et PRI) et une lignée cellulaire LCL particulière, la lignée EREB2-5. Cette dernière a la particularité de contenir un gène EBNA2 chimérique avec le récepteur à l'oestradiol. Ainsi pour induire le programme de latence III de l'EBV, nous devons rajouter dans le milieu de culture de l'œstrogène (Figure 70). Cette lignée EREB2-5 a été établie dans le laboratoire de Pr. Georg W. Bornkamm (Gordadze et al., 2001).

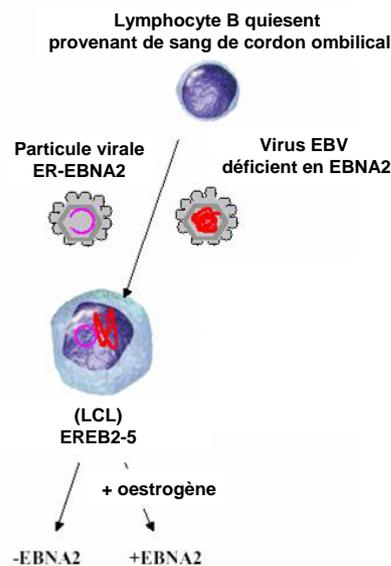


Figure 70 : Obtention de la lignée cellulaire lymphoblastoïde (LCL) EREB2-5. (D'après GW Bornkamm)

➤ Les vecteurs d'expression

- Nous avons utilisé des vecteurs d'expression (pRT-1) très particuliers dans les travaux présentés dans l'article 2 et 3, ainsi que dans les résultats préliminaires. Ce sont des vecteurs stables épisomiques inductibles développés par le laboratoire du Dr. Georg W. Bornkamm (Bornkamm et al., 2005), qui possèdent un ensemble de propriétés très intéressantes regroupées en un seul plasmide (Figure 71) :

- Ces vecteurs sont stables car ils n'ont pas besoin de s'intégrer au génome cellulaire puisqu'ils possèdent la séquence de l'origine de réplication plasmidique oriP de l'EBV, ainsi que l'expression constante d'EBNA1.
- Ces vecteurs sont inducibles par la tétracycline et ses analogues (doxycycline et vibramycine) « Tet-on » et expriment les protéines nécessaires à cette induction.
- L'induction du gène d'intérêt et du marqueur d'inductibilité, la protéine NGFRt ou la protéine GFP (Green Fluorescent Protein) est sous contrôle d'un promoteur bidirectionnel permettant l'expression simultanée et dans les mêmes quantités de la protéine d'intérêt et de ce marqueur d'inductibilité (récepteur NGFR tronqué pour purifier les cellules induites exprimant la protéine d'intérêt ou la protéine GFP pour discriminer les cellules transfectées par ce plasmide et induites par cellules non transfectées).

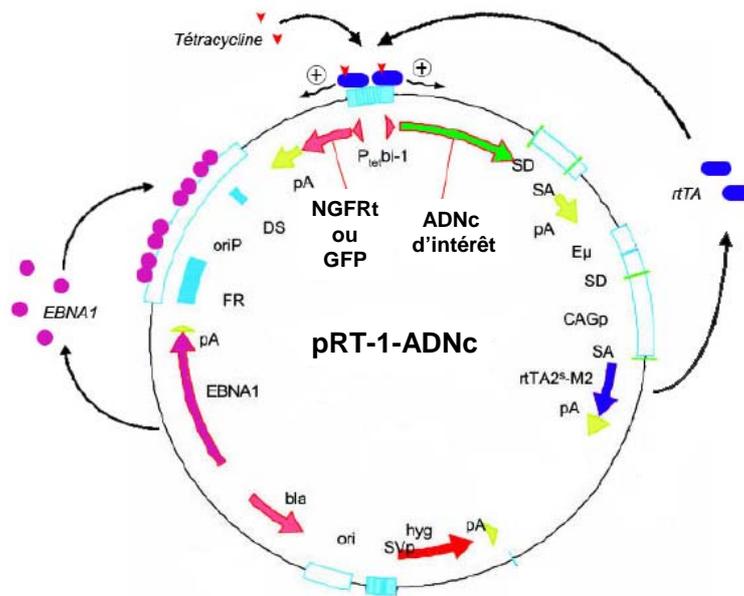


Figure 71 : Propriétés du vecteur pRT-1. Voir texte pour détails

➤ Les ADNc utilisés

Dans nos différentes études, nous avons utilisé une série d'ADNc différents que nous avons sous cloné dans les vecteurs inducibles épisomaux, pRT1. Ce sont les ADNc codant I- κ B α (dominant négatif de NF- κ B), l'isoforme active (STAT1 α) et inactive (STAT1 β) de STAT1, p53 sauvage, un mutant dominant négatif de LMP1 (LMP1CT) et LMP1 sauvage.

- 1- Dans des lymphocytes B infectés par l'EBV en état de latence de type III, le traitement à la fludarabine induit l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que l'apoptose avec la mise en évidence du rôle de STAT1 α et de STAT1 β .**

Article N°1

Differential roles of STAT1alpha and STAT1beta in fludarabine-induced cell cycle arrest and apoptosis in human B cells.

Baran-Marszak F, Feuillard J, Najjar I, Le Clorennec C, Bechet JM, Dusanter-Fourt I, Bornkamm GW, Raphael M, Fagard R.

Blood. 2004 Oct 15;104(8):2475-83.

Présentation de l'article 1

La question du rôle du facteur de transcription STAT1 dans la biologie de l'EBV est encore actuellement posée. En effet, LMP1 active constitutivement STAT1 dont l'action comme gène suppresseur dans différents modèles cellulaires, *in vitro* et *in vivo* a été identifiée, ralentissant la prolifération cellulaire et favorisant l'apoptose.

Nous avons choisi d'inhiber spécifiquement STAT1 afin d'analyser son rôle dans les LCLs. Plusieurs outils sont utilisables dont la surexpression d'un inhibiteur « naturel » de STAT1. La protéine STAT1 contient un domaine carboxy-terminal TAD essentiel à son activité transcriptionnelle. Deux formes de STAT1 sont alternativement transcrites, une forme correspondant à STAT1 α possédant le domaine TAD, et une forme tronquée correspondant à STAT1 β ne possédant pas ce domaine et agissant comme dominant négatif de STAT1 α . Nous avons généré un vecteur épisomal tétracycline-inductible capable d'exprimer STAT1 β ainsi qu'un marqueur d'inductibilité GFP fluorescent. Ce vecteur a été transfecté dans une lignée lymphoblastoïde (LCLs) appelé PRI. Ce système nous a permis de comparer des cellules induites, surexprimant STAT1 β avec des cellules non induites. Ces mêmes cellules ont été transfectées avec un vecteur épisomal tétracycline inductible pour STAT1 α ont servi de contrôle.

Ce travail a été effectué par la collaboration de l'EA 3406 de l'université Paris XIII et l'UMR CNRS 6101 de Limoges et a aboutit à deux articles publiés (Najjar I et al, J.Virol, 2005) et (Baran-Marszak F et al, Blood, 2004).

Nous avons tout d'abord vérifié que ce système inhibe bien spécifiquement l'activité de STAT1 α , puis nous avons analysé le retentissement de cette inhibition sur l'expression des gènes cibles connus de STAT1 α , et enfin analysé l'effet de cette inhibition sur la prolifération et l'apoptose induite par des altérations de l'ADN après traitement par des drogues cytotoxiques comme la fludarabine.

Au laboratoire, nous avons purifié les cellules LCLs PRI transfectées, soit par le vecteur inductible épisomal CKR-516STAT1 β ou soit par le CKR-516STAT1 α , induites à la doxycycline par tri cellulaire. Les cellules transfectées par l'un de ces deux vecteurs d'expression et induites, exprimant le marqueur d'inductibilité GFP fluorescent ont été triées à l'aide d'un trieur-cytomètre en flux. Nous avons ensuite réalisé des extraits ARN de ces cellules induites triées et non induites, afin d'analyser le niveau d'expression des transcrits d'ARNm codés par les gènes cibles de STAT1 (p21, IRF1, TAP1, PKR), par PCR quantitative. De plus, nous avons analysé par cette technique le niveau d'expression des transcrits p53 et MDM2 dans différentes conditions de traitement à l'IFN γ et à la Fludarabine.

Commentaires

La protéine STAT1 est activée dans les cellules infectées par l'EBV bien qu'étant paradoxalement identifiée comme un gène suppresseur de tumeur, inhibant la croissance cellulaire et facilitant l'apoptose. L'inhibition spécifique de la forme active STAT1 α en surexprimant le dominant négatif STAT1 β , nous a permis d'analyser le retentissement de ce déséquilibre d'expression sur le cycle cellulaire et l'apoptose et d'émettre des hypothèses quand aux mécanismes d'action de STAT1.

La surexpression de STAT1 β inhibe l'activation de la transcription des gènes cibles de STAT1 α comme p21, TAP1 et l'inhibition de l'expression de c-myc. Nous montrons que l'inhibition de STAT1 α rend les cellules résistantes à l'arrêt du cycle et diminue la sensibilité à l'apoptose induite par la fludarabine. Townsend et al. confirment que des cellules déficientes en STAT1 sont résistantes à l'apoptose induite par des agents induisant des altérations de l'ADN comme la fludarabine. Ces agents induisent l'apoptose en activant les protéines p53 et STAT1. Or, STAT1 régulerait négativement l'expression de MDM2, inhibiteur naturel de p53. MDM2 interagirait directement avec p53, formant un complexe proapoptotique possédant une activité maximale. STAT1 serait essentiel à l'apoptose induite par la fludarabine en formant un complexe avec p53. Au laboratoire, ces résultats ont ouvert un nouveau champ d'investigation sur les interactions entre STAT1 et p53.

La forme STAT1 α comme dans les autres modèles cellulaires, ralentirait ainsi la prolifération, en induisant l'expression de la protéine inhibitrice du cycle cellulaire p21 et en inhibant l'expression de c-myc. De plus, la surexpression de STAT1 β rendrait les cellules résistantes à l'apoptose induite par la Fludarabine puisque le domaine interagissant avec p53 correspond au TAD et que MDM2 est surexprimé dans les cellules surexprimant STAT1 β . De plus, STAT1 dans d'autres modèles, induit l'expression des caspases.

Ces résultats suggèrent que la balance STAT1 α/β ralentirait la prolifération cellulaire et favoriserait l'apoptose, dans le cas où la forme STAT1 α est supérieure en expression protéique à la forme STAT1 β . La croissance cellulaire serait favorisée et l'apoptose inhibée dans le cas où la forme STAT1 β serait supérieure en expression à la forme STAT1 α .

Ces données sont un premier résultat montrant que LMP1 induit l'activation des facteurs transcriptionnels pro-apoptotiques.

2- Dans des lymphocytes B infectés par l'EBV, en état de latence de type III de l'EBV, la régulation de la signalisation STAT1 se fait par effet autocrine NF-kappa B dépendante.

Article N°2

Latent Membrane Protein 1 regulates STAT1 through NF-κB-dependent interferon secretion in Epstein-Barr virus-immortalized B cells.

Najjar I, Baran-Marszak F, Le Clorenec C, Laguiller C, Schischmanoffl P, Youlyouz-Marfak I, Schlee M., Bornkamm GW, Raphaël M, Feuillard J and Fagard R

J Virol. 2005 Apr;79(8):4936-43.

Présentation de l'article 2

La protéine LMP1, protéine majeure transformante de l'EBV, contenant en plus de ces domaines extracellulaire et transmembranaire, un domaine cytoplasmique induisant différentes voies de signalisation dont les voies NF-kB et STAT1 de façon constitutive. Par ses régions cytoplasmiques spécialisées CTAR1 et CTAR2, LMP1 recrute des protéines intermédiaires TRAFs/TRADD et active NF-kB. Il a été observé une activation constitutive de STAT1 dans les tumeurs associées à l'EBV comprenant le carcinome du nasopharynx (Chen et al., 2001), le lymphome de Hodgkin (Garcia et al., 2003), et dans les LCLs (Fagard et al., 2002; Weber-Nordt et al., 1996). La protéine STAT1 est associée à des réponses cellulaires induites par les interférons (IFNs), réduisant la prolifération cellulaire et augmentant l'apoptose. Dans le contexte de LCLs transformé par l'EBV, LMP1 active constitutive STAT1. D'après certaines données de la littérature, l'expression de LMP1 elle-même est suffisante pour induire un haut niveau d'activation de STAT1 (Richardson et al., 2003), mais le mécanisme impliqué reste encore mal compris. Une activation directe de STAT1 a été suggérée, après l'interaction de JAK3 sur une pseudo-région nommée CTAR3, située entre les domaines CTAR1 et CTAR2. Cette interaction de JAK3 avec LMP1 permettrait la phosphorylation de STAT1 et donc son activation (Gires et al., 1999). Cependant, aucun travail ultérieur n'a confirmé cela. Il a été montré par la suite qu'il n'y a ni association de JAK3 au pseudo-domaine CTAR3 de LMP1, ni activation de JAK3 par ce domaine (Higuchi et al., 2002). Des études ont plutôt montré que LMP1 mutée dans CTAR1 et dans CTAR2, supprime l'expression et l'activité constitutive de STAT1 (Brennan et al., 2001; Richardson et al., 2003), suggérant donc, un rôle possible pour NF-kB dans l'activation de STAT1 par LMP1. Les lymphocytes B immortalisés par l'EBV expriment les IFNs α , β et γ aussi bien que les gènes cibles de l'IFN γ (Baran-Marszak et al., 2002; Brewster and

Sullivan, 1983; Cahir-McFarland et al., 2004; Carter et al., 2002; Peng and Lundgren, 1992). NF- κ B est connu pour augmenter la transcription de plusieurs gènes codant des cytokines (Lu and Stark, 2004), comme l'IFN γ (Sica et al., 1997), le récepteur α à l' IFN γ (IFN γ R α) (Cahir-McFarland et al., 2004) et le récepteur 2 des IFN α/β (IFN α/β Receptor 2) (Li and Verma, 2002). Pour déterminer si des mécanismes indirects sont impliqués dans l'activation constitutive de STAT1 par LMP1, nous avons alors étudié la capacité des supernageants de culture des cellules de LCLs, de stimuler la phosphorylation de la tyrosine 701 de STAT1.

Dans cette étude, nous avons utilisé deux lignées cellulaires, une lignée de lymphome de Burkitt EBV- (BL2) et une lignée lymphoblastoïde (LCLs) EBV+ (PRI). De plus, nous avons utilisé un nouveau vecteur d'expression inductible épisomal pRT1 (Bornkamm et al., 2005), afin d'inhiber spécifiquement NF- κ B. Ce vecteur possède quelques particularités, comme d'être sous le contrôle d'un promoteur bidirectionnel inductible par la doxycycline, permettant l'expression de la protéine d'intérêt, ainsi que d'un marqueur d'inductibilité, le récepteur NGFR tronqué NGFRt. Ce dernier permet de pouvoir trier les cellules induites et exprimant la protéine d'intérêt.

Nous avons donc cloné l'ADNc du dominant négatif I κ B α , puis nous avons transfecté les cellules LCLs PRI avec pRT1-I κ B α dn et induit son expression par le traitement des cellules à la doxycycline. Nous avons réalisé des tris cellulaires des cellules transfectées et induites, puis différentes analyses en PCR quantitative afin de déterminer si NF- κ B était impliqué dans la phosphorylation de STAT1. Nous montrons ainsi que l'inhibition de NF- κ B, soit par l'inhibiteur I κ B α dn, soit par le BAY11 inhibiteur chimique de NF- κ B, ne provoque plus la phosphorylation de STAT1. Par conséquent, les interférons α , β et γ , sont donc impliqués dans l'activation constitutive de STAT1. Nous montrons par PCR quantitative que ces interférons sont bien induits par NF- κ B.

La contribution du laboratoire à ce travail a consisté en la purification par tri-cellulaire magnétique des cellules LCLs PRI transfectées par pRT1-I κ B α dn induites à la doxycycline. Sur ces cellules induites ou non induites, nous avons analysé le profil d'expression des différents interférons (IFN α et IFN γ) par PCR quantitative, ainsi que l'état de phosphorylation de la protéine STAT1 sur sa tyrosine 701. De plus, par traitement chimique des cellules par le Bay11, inhibiteur de NF- κ B, nous avons analysé la décroissance d'expression de ces interférons dans le modèle cellulaire PRI.

Nous avons donc montré que l'activation constitutive de STAT1 par LMP1 est due presque exclusivement à une boucle autocrine de sécrétion des interférons produit par l'activation de NF- κ B, lui-même activé constitutivement par LMP1.

Commentaires

La phosphorylation, l'activation et la surexpression des STATs ont été démontrées dans plusieurs études sur des lymphocytes B transformés par l'EBV et sur des tissus infectés par l'EBV (Fagard et al., 2002; Garcia et al., 2003; Weber-Nordt et al., 1996). La surexpression de STAT1 dans le contexte EBV s'est avéré être fortement associé au niveau d'expression de LMP1 dans la cellule et dépendant de l'activité NF- κ B (Richardson et al., 2003; Zhang et al., 2004). Bien que ces études aient clairement démontré que l'augmentation d'expression de STAT1 dans les cellules immortalisées par l'EBV dépend de LMP1 et de NF- κ B, elles n'ont pas montré le mécanisme précis impliqué et elles n'ont pas exploré le mécanisme de l'activation de la phosphorylation de STAT1 dans les cellules où LMP1 est exprimé.

Dans la présente étude, nous avons démontré que la sécrétion des IFNs, elle-même résultant de l'activation de NF- κ B par LMP1, est le mécanisme principal expliquant l'activation de STAT1.

En effet, nous avons montré que la surexpression de l'inhibiteur naturel I κ B α dn dans les LCLs PRI, conduisait à l'inhibition complète de l'expression de l'IFN γ et à une inhibition incomplète de l'IFN α . Cela suggère, que l'activation constitutive de NF- κ B par LMP1 est bien responsable de la production des IFNs. Ainsi, l'activation de NF- κ B par LMP1 stimule non seulement la sécrétion d'IFN- γ mais également la sécrétion d'IFN- α (Zhang and Pagano, 2002). De plus, la surexpression de I κ B α dn provoque une diminution de la phosphorylation de STAT1 sur sa tyrosine 701, suggérant donc que NF- κ B induit par LMP1, est bien responsable de l'activation de STAT1 et que les interférons IFN γ et IFN α en sont les principaux intermédiaires.

Le débat est-il tranché entre effet autocrine et activation par LMP1 ?

Nous avons noté dans nos expériences qu'une phosphorylation résiduelle faible mais certaine de STAT1 était constamment présente, selon les conditions expérimentales (inhibition de NF- κ B ou lavage des cellules ou incubation en présence des anticorps monoclonaux anti-IFNs). Celle-ci peut résulter de l'inhibition incomplète de l'activité de NF- κ B ou de la neutralisation partielle des IFNs. En effet, bien que la sécrétion d'IFN- γ soit complètement supprimée après l'induction d'I κ B α dn, la sécrétion d'IFN- α ne l'est pas (Figure 7 de l'article 2). Par ailleurs,

nous ne pouvons pas exclure la possibilité que la phosphorylation de STAT1 résulte en partie d'un mécanisme intracellulaire impliquant LMP1, comme précédemment suggéré (Gires et al., 1999). Il est également possible que cette activité STAT1 résiduelle corresponde à un stress cellulaire (nombreux lavages des cellules) avec pour effet d'activer p53 qui secondairement pourrait induire l'activation de STAT1 par interaction directe, ainsi que le suggère certains résultats non encore publiés du laboratoire.

3- Le programme de latence III de l'EBV sensibilise les lymphocytes B infectés par l'EBV à l'apoptose médiée par Fas/CD95 via la protéine LMP1 : rôle de NF- κ B, STAT1 et p53.

Article N°3

EBV Latency III immortalization program sensitizes B-cells to induction of CD95 mediated apoptosis via LMP1: role of NF- κ B, STAT1 and p53.

Le Cloennec C, Youlyouz-Marfak I, Adriaenssens E, Coll J, Bornkamm GW, Feuillard J. Blood. 2006 Mar 1;107(5):2070-8.

Présentation Article 3

Dans ce dernier article, nous avons étudié la régulation du CD95 (FAS), récepteur de mort, induit par LMP1 dans les lymphocytes B infectés par l'EBV.

En effet d'après la littérature, l'expression de Fas est régulée par divers agents chimiotoxiques tels que TNF α , IFN γ , ou Daunorubicine, capable d'induire les facteurs de transcription NF- κ B, STAT1 et p53 respectivement. Le promoteur du gène codant Fas est connu pour posséder des sites de fixation pour ces facteurs. L'expression et l'activité de ces derniers sont modulées pendant l'infection des lymphocytes B par l'EBV. Ce virus est connu pour induire l'expression de Fas.

L'objectif de ce travail a été de comprendre la contribution de p53, STAT1 et NF- κ B dans la régulation de l'expression de Fas par l'EBV.

Dans cette étude, nous avons utilisé largement les vecteurs inductibles épisomaux pRT1 de nouvelle génération, ayant la particularité d'avoir le gène d'intérêt exprimé sous la dépendance d'un promoteur bidirectionnel régulé par la doxycycline permettant ainsi l'expression simultanée du récepteur tronqué NGFR, utilisé comme marqueur d'inductibilité, et de la protéine d'intérêt.

Nous avons sous-cloné les ADNc suivants : I- κ B α dominant négatif de NF- κ B, l'isoforme active (STAT1 α) et le dominant négatif de STAT1 (STAT1 β), p53 sauvage, un mutant dominant négatif de LMP1 (LMP1ct) et LMP1 sauvage. Après transfection stable dans des LCLs (lignée cellulaire lymphoblastoïde B), l'induction de l'ADNc d'intérêt a été effectuée par traitement à la doxycycline pendant 24h. Les cellules exprimant le récepteur NGFR à leur surface ont été purifiées en utilisant des billes magnétiques couplées avec l'anticorps anti-NGFR et ont été traitées ensuite avec TNF α , IFN γ ou Fludarabine* pendant 24H. Les

techniques employées pour mettre en évidence cette régulation de Fas ont été d'une part, de la PCR quantitative pour étudier la régulation des transcrits, d'autre part des techniques de western blot et d'immunomarquage révélé par cytométrie en flux.

Pour étudier le rôle de LMP1 seul ou dans le contexte du programme de latence III, nous avons utilisé la lignée cellulaire EREB 2-5 contenant le gène EBNA2 sous dépendance de l'œstrogène, transfectée ou non avec les vecteurs pRT1.

La fonctionnalité de Fas a été étudiée en mesurant l'apoptose par des techniques de sous-pic G1 ainsi que des marquages en annexine V révélés par cytométrie en flux, après le traitement des cellules par un anticorps spécifique de Fas permettant l'activation du récepteur.

Nous avons montré que l'inhibition de LMP1 diminue l'expression de Fas. Cette expression est à peine régulée par NF- κ B, par contre elle est régulée beaucoup plus fortement par STAT1 et p53. Cependant, NF- κ B régule l'activation de STAT1 et de p53. De plus, nous avons montré que l'induction de l'expression de Fas via la protéine LMP1 de l'EBV, sensibilisait les lymphocytes B infectés par l'EBV à l'induction de l'apoptose médiée par le récepteur FAS. Cette régulation de Fas par LMP1 s'effectuant via les facteurs transcriptionnels NF- κ B, STAT1 et p53.

Ainsi, nous avons pu montrer que le programme de latence III de l'EBV sensibilise les lymphocytes B infectés par l'EBV, à l'apoptose médiée par Fas. Du point de vue de l'équilibre virus/hôte, ce processus permettrait l'élimination par le système immunitaire des lymphocytes B infectés par l'EBV restés en latence III.

Commentaires

Dans les lymphocytes B immortalisés par l'EBV en latence III, il a été précédemment montré une expression importante de Fas (Falk et al., 1992). Des travaux ont même suggéré un rôle de LMP1 dans la régulation de l'expression de Fas (Henriquez et al., 1999).

Dans cette étude, nous avons montré, que l'induction de l'expression de LMP1 dans les cellules EREB2-5 provoque une induction de l'expression de Fas. De plus, la surexpression de la forme dominante négative de LMP1, LMP1CT inhibant la signalisation de LMP1, dans les cellules LCLs PRI provoque une diminution de l'expression de Fas. Ces résultats suggèrent donc une régulation directe de l'expression de Fas par LMP1. D'après, les données de la littérature, le promoteur du gène codant Fas possède des sites de fixation pour les facteurs transcriptionnels STAT1, NF- κ B et p53. Nous avons alors modulé l'activité de ces facteurs de transcription afin de comprendre leur contribution respective dans la régulation de l'expression de Fas. La surexpression de I κ B α dn, dominant négatif de NF- κ B, ou de STAT1 β , inhibiteur de STAT1 α provoque le blocage de l'augmentation de l'expression de Fas, respectivement induite par le TNF α et l'IFN γ . La surexpression de p53wt forme sauvage, provoque une massive expression de Fas, augmentée par le traitement des cellules à la Fludarabine. Ces résultats suggèrent donc que ces trois facteurs transcriptionnels participent à la régulation de l'expression de Fas, mais de façon inégale. En effet, nous montrons que la surexpression de I κ B α dn provoque une diminution de l'activité de STAT1 et de p53. Par conséquent, l'activation de STAT1 et de p53 dépend de l'activation de NF- κ B pour la régulation de l'expression de Fas, soulevant la question de la relation entre l'activation de NF- κ B par LMP1 et l'activation de STAT1 ou de p53.

De plus, l'induction de l'apoptose via le récepteur Fas est dépendante de la signalisation LMP1. En effet, la surexpression de LMP1CT diminue l'apoptose induite par le récepteur Fas activé par un anticorps agoniste, tandis que la surexpression de LMP1wt augmente cette apoptose. L'effet de LMP1CT sur cette apoptose induite par Fas est probablement dû à la moindre présence de Fas à la surface des cellules, puisque la surexpression de ce dominant négatif de LMP1 provoque une diminution d'expression de Fas.

A l'inverse, l'effet de LMP1wt sur l'apoptose induite par le CD95 résulterait d'une augmentation de la densité membranaire de Fas.

Enfin, nous avons montré que la voie apoptotique induite par Fas est fonctionnelle et est susceptible de participer à la mort cellulaire des lymphocytes B immortalisés par l'EBV en latence III induite par les lymphocytes T. Ces résultats, en accord avec certaines données de la littérature, prouvent que l'EBV protège les cellules infectées contre l'apoptose par l'activation de NF- κ B et les sensibilisent à l'apoptose induite par Fas.

Les résultats présentés dans cet article suggèrent que le programme de latence III de l'EBV, en plus de l'immortalisation des lymphocyte B, sensibilise les cellules infectées à leur propre élimination par les lymphocytes T. Ces résultats suggèrent que l'induction de Fas par l'EBV joue un rôle clé dans le contrôle par l'hôte des lymphocytes B immortalisés par l'EBV *in vivo*, et soulignent l'importance des événements génétiques secondaires dans l'émergence de désordres lymphoprolifératifs associés à l'EBV.

Résultats Préliminaires

4- La surexpression de LMP1 conduit à l'apoptose médiée par l'autoactivation de Fas indépendamment de FasL via l'induction des ROS dans les lymphocytes B infectés par l'EBV.

Dans cette dernière partie, nous présentons quelques résultats préliminaires correspondant à une étude qui a émergé au sein du laboratoire et qui met en lumière les propriétés pro-apoptotiques de LMP1. Ces résultats préliminaires suggèrent que la surexpression de LMP1 induit l'apoptose très précocement et que cette apoptose est médiée par l'autoactivation de Fas indépendamment de son ligand via une induction des ROS cellulaire par LMP1 dans les lymphocytes infectés par l'EBV (LCLs).

Dans des travaux antérieurs, nous avons démontré que LMP1 était responsable de la régulation de l'expression de Fas dans des lymphocytes B infectés par l'EBV (LCLs) par l'intermédiaire de différents facteurs transcriptionnels dont NF- κ B (Le Clorenec et al., 2006). Dans cette précédente étude, nous avons remarqué que dans les cellules LCLs PRI transfectées stablement par le vecteur inducible épisomal pRT1-LMP1WT, traité à la doxycycline pendant 48h, une apoptose spontanée était détectée en cytométrie de flux par la technique de sous-pic G1.

Nous avons alors étudié les effets de l'induction de LMP1 par la doxycycline sur l'induction de l'apoptose dans les LCLs (par des techniques de sous-pic G1, et de marquage annexine V), par cytométrie en flux. Cette étape fonctionnelle a permis de déterminer les conditions d'induction d'apoptose par LMP1, nous permettant ainsi de décrire le phénotype apoptotique en rapport.

Résultats

1) La surexpression de LMP1 induit l'apoptose dans les LCLs PRI

Comme montré en Figure 72, l'induction de LMP1wt après 24h de traitement à la doxycycline, est associée à une augmentation du nombre de cellules apoptotiques détectées en sous-pic G1, 31% dans la condition traitée contre 2% pour les mêmes cellules mais non-traitées, servant de contrôles négatifs (Figure 72). A 48h d'induction à la doxycycline, le taux

d'apoptose est de 22% contre 3% dans les cellules contrôles. Ces résultats prouvent que la surexpression de LMP1 dans les LCLs infectées par l'EBV induit l'apoptose.

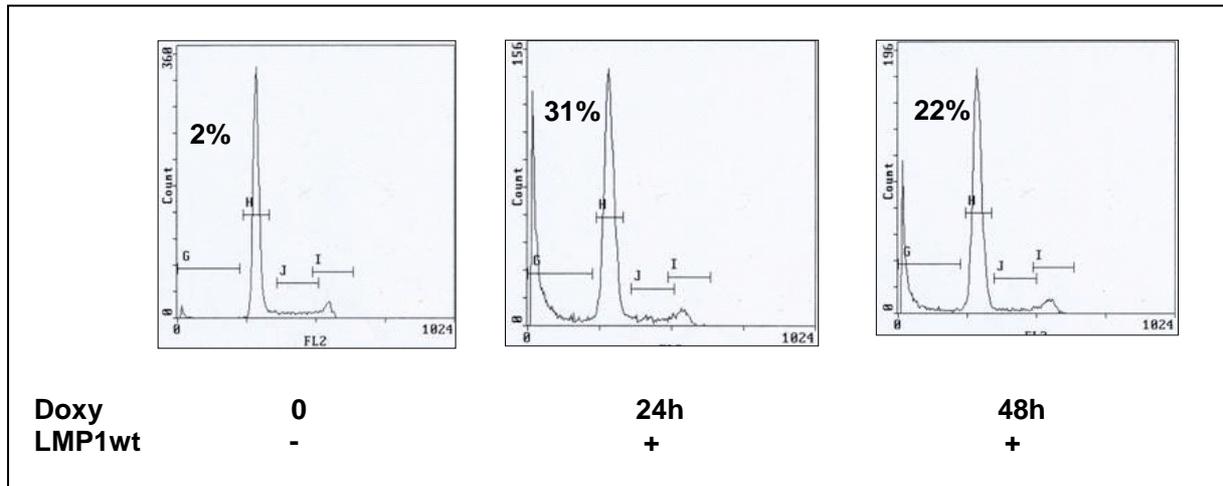


Figure 72 : L'induction de LMP1wt provoque l'apoptose dans les cellules LCLs PRI.

Les cellules LCLs PRI transféctées par le vecteur inducible pRT1-LMP1WT sont induites à la doxycycline durant 48h. L'apoptose a été quantifiée par cytométrie en mesurant le pourcentage de cellules en sous-pic G1, après incubation des cellules avec de l'iodure de propidium.

Afin de confirmer ces résultats, nous avons évalué dans ces cellules PRI transfectés, et induites à la doxycycline, le phénomène d'externalisation des phosphatidylsérines (PS) sur la membrane des cellules subissant le processus d'apoptose. Nous avons discriminé les cellules induites des cellules non-induites grâce au marqueur d'inductibilité NGFRt, par un marquage anti-NGFR-PE, réalisé préalablement avant le marquage AnnexinV-FITC.

Ainsi, nous avons remarqué une augmentation très significative de cellules Annexin V positives, après traitement des cellules transféctées induites à la doxycycline pendant 24h ou 48h (Figure 73). La surexpression de LMP1wt pendant 24h, provoque une apoptose dans 31% des cellules transféctées induites contre 10% dans les cellules contrôles qui sont les cellules transféctées non-induites. A 48h d'induction de LMP1wt, ce nombre augmente à 58% contre 14% dans les cellules contrôles. Dans les cellules contrôles, nous ne remarquons aucune augmentation du pourcentage de cellules Annexin V positives, au cours du temps. Par conséquent, l'augmentation croissante de l'apoptose peut être mise en parallèle de l'induction de l'expression de LMP1. Cette constatation indique que la surexpression de LMP1 dans les LCLs induit une apoptose précoce et croissante avec le temps.

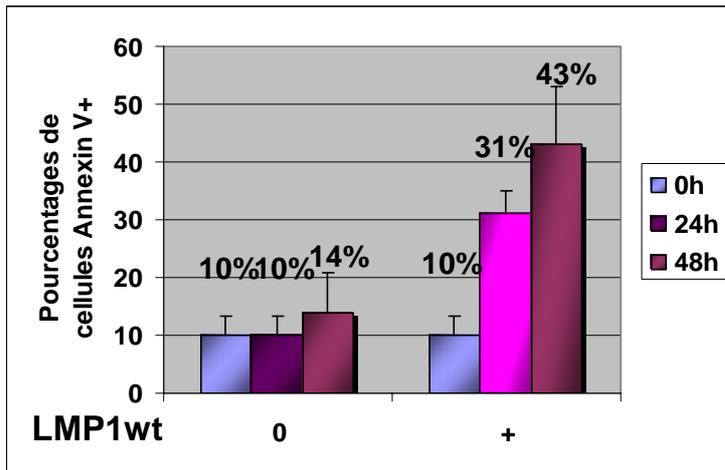


Figure 73 : L'induction de LMP1wt provoque l'apoptose dans les cellules LCLs PRI.

Les cellules LCLs PRI transfectées par pRT1-LMP1WT sont induites à la doxycycline durant 48h. Les cellules induites ont été préalablement marquées par l'anticorps primaire monoclonal anti-NGFR non couplé, puis avec un anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé à la phycoérythrine (PE), fluorophore émettant dans le canal de fluorescence FL2 (Orange) avant le marquage à l'Annexin V/7AAD. L'apoptose des cellules a été quantifiée par cytométrie en flux par le marquage des cellules à l'Annexin V. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts entre les deux expériences réalisées.

La morphologie cellulaire de ces cellules induite pour LMP1 a été examinée par microscopie confocale. Ces cellules ont été traitées pendant 24h à la doxycycline, puis ont été étalées sur lames de verres par cytopspin. Ces lames ont ensuite été marquées, en premier lieu par un anticorps monoclonal anti-LMP1 (CS1.4), puis marquées par un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé au fluorophore Alexa 488. Ensuite, la coloration du noyau a été faite par incubation au colorant TOPRO. Après lavages, les lames ont été analysées par microscopie confocale. Le phénomène de fragmentation du noyau a été observé à 24h d'induction de LMP1wt dans les cellules transfectées induites surexprimant LMP1 (Figure 74).

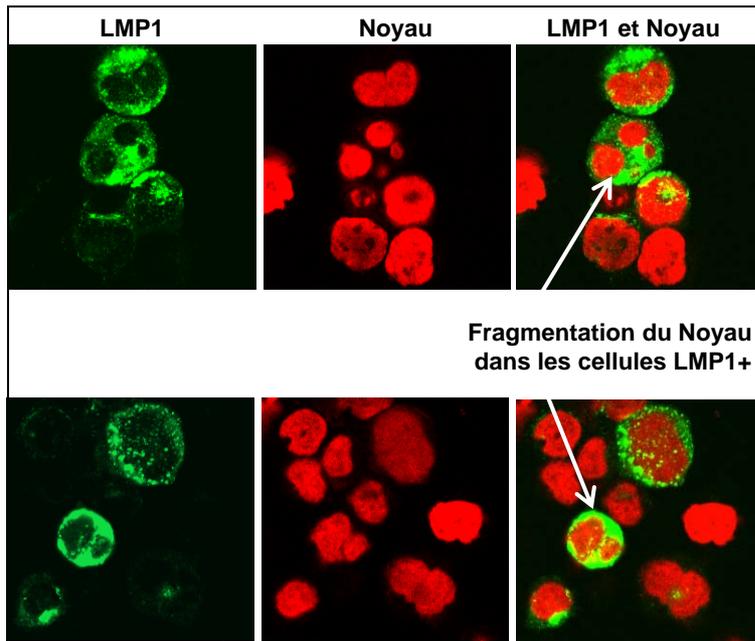


Figure 74 : L'induction de LMP1wt provoque la fragmentation du noyau.

Les cellules LCLs PRI ont été transfectées stablement par pRT1-LMP1WT, puis induites à la doxycycline pendant 24h. Ensuite, elles ont été étalées sur lame de verre par cytopspin, puis ces lames ont été marquées par un anticorps monoclonal de souris anti-LMP1 (CS1.4) non couplé. Après des lavages successifs, les cellules ont été incubées avec un anticorps secondaire de lapin anti-IgG de souris couplé à l'Alexa 488 (émettant une fluorescence verte). Après des lavages successifs, les cellules ont été incubées avec un colorant du noyau (TOPRO) qui émet une fluorescence rouge après excitation de celui-ci par un laser. Les lames ont ensuite été analysées sur un microscope confocale. Les photos ainsi réalisées montre la fragmentation du noyau sur les cellules induisant fortement LMP1.

Par western blot, nous avons montré que la PARP était clivée après 24h de traitement à la doxycycline, des cellules transfectées pRT1-LMP1wt (Figure 75). Ce clivage augmente durant l'induction de LMP1wt.

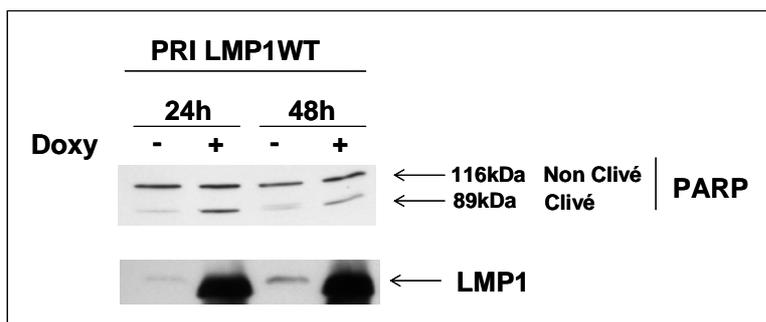


Figure 75 : L'induction de LMP1wt provoque le clivage de PARP.

Les cellules LCLs PRI transfectées par pRT1-LMP1WT ont été triées par tri magnétique. Avant ce tri, elles ont été induites à la doxycycline pendant 24h, puis elles ont été marquées par un anticorps monoclonal anti-NGFR non couplé, puis après des lavages successifs, un deuxième marquage avec un anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé à des billes, a été réalisé. Après incubation les cellules ont été lavées, puis on subit le tri magnétique. Ensuite des extraits protéiques des cellules induites triées et des cellules non-induites ont été faits en utilisant du bleu laemli. Les différents échantillons ont été analysés par Western Blot. Afin de révéler la PARP, un anticorps anti-PARP, reconnaissant la forme entière et la forme clivée, a été utilisé. Les protéines ont été révélées par un kit chemoluminescent.

- 2) LMP1 provoque une surexpression du récepteur pro-apoptotique FAS, ainsi qu'une agrégation de celui-ci

L'étude de l'expression et de la localisation membranaire de Fas a été réalisée par microscopie confocale. Les cellules LCLs PRI stablement transfectées par pRT1-LMP1WT sont traitées comme dans les expériences précédentes à la doxycycline pendant une durée de 120h. A différents temps d'induction, ces cellules sont étalées sur lames de verre, et ensuite marquées par deux anticorps différents, un anti-LMP1 monoclonal (CS1.4) et un anti-Fas polyclonal (C-20). Deux anticorps secondaires, un anti-IgG de souris et un anti-IgG de lapin, couplés respectivement à deux fluorophores différents, Alexa 488 (fluorescence verte) et Alexa 594 (fluorescence rouge) sont utilisés pour révéler les deux protéines LMP1 et FAS marquées par les deux anticorps primaires.

Ce double marquage permet de révéler un regroupement des protéines LMP1 à la surface des cellules (polarisation et capping), résultat en cohérence avec les études ayant montré que LMP1 s'agrège dans les lipid rafts afin d'activer constitutivement sa signalisation.

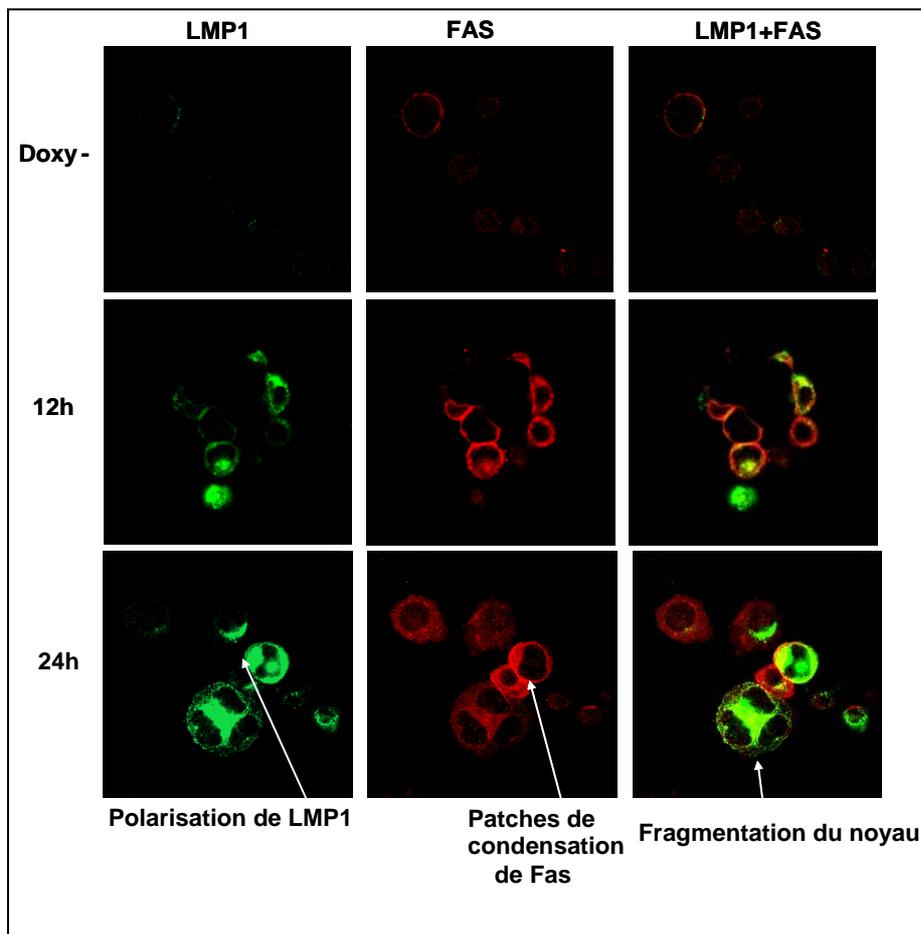


Figure 76 : L'induction de LMP1wt provoque une surexpression du récepteur pro-apoptotique FAS, ainsi qu'un regroupement en patches de condensation de celui-ci.

Les cellules LCLs PRI ont été transfectées stablement par pRT1-LMP1WT, puis induites à la doxycycline pendant 24h. Ensuite, elles ont été étalées sur lame de verre par cytopspin, puis ces lames ont été marquées par l'anticorps monoclonal de souris anti-LMP1 (CS1.4) et un anti-FAS polyclonal (C-20). Ces deux anticorps primaires sont non couplés. Après des lavages successifs, les cellules ont été incubées avec deux anticorps secondaires, un anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé à l'Alexa 488 (émettant une fluorescence verte), et un anticorps de chèvre anti-IgG de lapin couplé à l'Alexa 594 (émettant une fluorescence Rouge). Les lames ont ensuite été analysées sur un microscope confocale. Les photos ainsi réalisées montre la localisation de LMP1 et FAS dans les cellules induites pour LMP1wt.

Les cellules non transfectées ou non induites à la doxycycline, ne surexprimant pas LMP1 possèdent un faible niveau d'expression de FAS sur leurs surfaces cellulaires. D'autre part, dès 12h d'induction de LMP1, nous constatons une augmentation très importante en expression de Fas à la surface membranaire. Au point 24h, la protéine FAS semble s'agréger à des endroits particuliers de la membrane cytoplasmique sous forme patches ou points de condensation (Figure 76). De plus, il semblerait que les protéines LMP1 et Fas ne co-localisent pas ensemble, suggérant qu'elles ne sont pas dans les mêmes complexes de signalisation.

3) La surexpression de LMP1 induit la phosphorylation de FADD

Par la suite, nous avons analysé par western blot l'expression de la protéine FADD, protéine essentielle dans la voie apoptotique des récepteurs de mort cellulaire, entrant dans la formation du complexe DISC avec la procaspase-8. Nous avons aussi regardé la phosphorylation de FADD sur sa sérine 194. Nous avons remarqué que la surexpression de LMP1wt ne provoque pas d'augmentation d'expression de FADD, par contre nous détectons une phosphorylation de FADD sur sa sérine 194. FADD phosphorylée est recrutée dans le DISC. Ce résultat suggère que l'apoptose induite par LMP1 met en jeu la formation d'un DISC sur un récepteur de mort, indiquant donc que l'induction de l'apoptose par LMP1 fait appel à un récepteur à domaine de mort comme FAS, TRAIL-R, ou TNFR1.

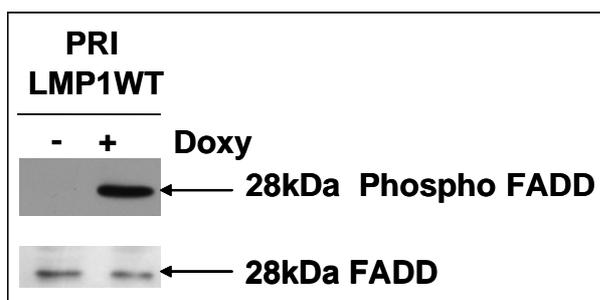


Figure 77 : LMP1wt induit la phosphorylation de FADD

4) Implication du récepteur de mort cellulaire FAS dans l'apoptose induite par LMP1 avec la formation du DISC sur FAS.

D'après les constatations faites précédemment, nous nous sommes posé la question de savoir si l'apoptose induite par LMP1 était due à la formation du complexe DISC sur un récepteur de mort cellulaire comme par exemple, FAS.

Ainsi, nous avons réalisé des expériences d'immunoprécipitation des protéines mis en jeu dans le processus d'apoptose.

Nous avons tout d'abord dans les LCLs PRI transfectées stablement par pRT1-LMP1WT après un Ficoll, induit la surexpression de LMP1 par un traitement des cellules à la doxycycline pendant 24h. Nous avons réalisé un tri cellulaire des cellules induites surexprimant LMP1, et exprimant également le marqueur d'inductibilité, NGFRt à leur surface cellulaire. Les cellules avant le tri cellulaire magnétique, ont été préalablement marquées par un anticorps monoclonal anti-NGFR, puis marquées par un anticorps secondaire anti-IgG de souris couplé à des billes. Ensuite, nous avons fait des extraits protéiques de ces cellules triées en tampon RIPA. Nous avons alors réalisé une co-immunoprécipitation de FAS.

Par des analyses en western blot, lorsque l'on co-immunoprécipite FAS, nous constatons une augmentation du recrutement de la procaspase-8 dans la condition cellules induites (Figure 78). Ce résultat suggère que l'induction de LMP1wt provoque un recrutement précoce de la procaspase-8 sur FAS, dès 24h d'induction. Cela nous indique que lors de la surexpression de LMP1, dans les LCLs infectées par l'EBV en état de latence III, une apoptose est induite par LMP1, et elle met en jeu la formation du DISC sur le récepteur FAS, permettant l'activation de la caspase-8, qui va à son tour activer, la cascade de caspases, aboutissant à la mort cellulaire.

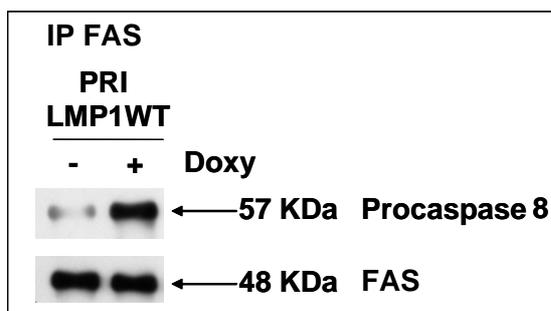


Figure 78 : Immunoprécipitation de FAS

Ces quelques résultats préfigurent un mécanisme bien particulier d'apoptose induite par LMP1 mettant en jeu une surexpression du récepteur de mort FAS, qu'il va activer. Ces résultats préliminaires seront discutés dans la discussion générale.

Ainsi ces résultats montrent clairement que la surexpression de LMP1 induit l'apoptose, confirme également l'induction d'expression de FAS et enfin suggère un recrutement de la procaspase-8 et de FADD dans le DISC sur FAS avec phosphorylation de FADD.

DISCUSSION GENERALE

Discussion générale

Afin de déterminer les relations entre les cibles transcriptionnelles de l'EBV, notamment NF-kB et STAT1, et l'apoptose ou la prolifération des lymphocytes B, nous avons tout d'abord étudié le rôle du facteur de transcription STAT1 dans le contexte EBV. Nous avons étudié le rôle de STAT1 dans l'apoptose dans des lymphocytes B immortalisés par l'EBV (LCLs). Nous avons contribué à montrer que les deux isoformes naturelles de STAT1, STAT1 α et STAT1 β possédaient des rôles totalement opposés. STAT1 β bloque l'apoptose induite par un inducteur connu de p53, la Fludarabine, tandis que STAT1 α les sensibilise, de plus STAT1 α pourrait réguler l'activité de p53. Ensuite, nous avons étudié le mécanisme responsable de l'activation constitutive de STAT1 par LMP1 en mettant en lumière l'implication de NF-kB dans ce mécanisme. Nous avons contribué à montrer qu'une boucle autocrine des IFNs induite par NF-kB, était impliquée dans l'activation constitutive de STAT1. Puis, nous avons voulu connaître l'implication de ces mêmes facteurs transcriptionnels dans la régulation de FAS (CD95) par LMP1 dans le contexte EBV+. Nous avons donc démontré que ces trois facteurs transcriptionnels, NF-kB, STAT1 et p53 induit par LMP1 était responsables de la régulation en expression de FAS dans le contexte EBV+. Enfin, nous avons débuté un travail portant sur l'effet apoptotique de LMP1 dans les lymphocytes B infectés par l'EBV. De façon préliminaire, nous montrons que la surexpression de LMP1 induit l'apoptose très précocement et que cette apoptose est médiée par l'auto-activation de Fas indépendamment de FasL via une induction des ROS cellulaire par LMP1 dans les lymphocytes infectés par l'EBV (LCLs).

I. LMP1 et STAT1

Les voies de signalisation JAKs/STATs sont activées par un grand nombre de facteurs de croissance, de cytokines et contrôlent la prolifération, l'apoptose et l'expression de marqueurs de surface. Dans les lignées lymphoblastoïdes (LCLs), STAT1 est activé de façon constitutive (Weber-Nordt, Egen et al. 1996; Fagard, Mouas et al. 2002). En effet, l'activation de STAT1 est retrouvée dans de nombreuses pathologies associées à l'EBV. Ainsi, STAT1 est constitutivement activé dans les cellules de Reed-Sternberg (Garcia, Camacho et al. 2003) et dans les lymphomes B à grandes cellules médiastinaux (Savage, Monti et al. 2003). Ces

pathologies partagent des voies communes de signalisation avec les lymphomes de Hodgkin, passant notamment par l'activation de NF- κ B. Le rôle de STAT1 a été le plus souvent associé à l'apoptose et à l'arrêt de la prolifération. Ce facteur de transcription est retrouvé activé dans les lymphoproliférations B caractérisées par une inhibition de l'apoptose dépendante de NF- κ B.

D'après la littérature précédant notre travail, il était suggéré que l'activation constitutive de STAT1 par la protéine LMP1 (Gires, Kohlhuber et al. 1999; Richardson, Fielding et al. 2003) se fasse probablement de façon indirecte via l'activation de NF- κ B (Richardson, Fielding et al. 2003). En effet, LMP1 active NF- κ B par ses domaines CTAR1 et CTAR2 qui lorsqu'ils sont mutés abolissent l'activation de STAT1. Lorsque des cellules sont transfectées avec LMP1 et I- κ B α muté, STAT1 n'est pas activé. L'expression de LMP1 induit une rapide augmentation de l'activité de liaison à l'ADN de STAT1 dans les lymphocytes B (Gires, Kohlhuber et al. 1999). D'après nos résultats (Article 2), nous montrons que l'activation constitutive de NF- κ B par LMP1 permet l'expression des interférons (IFN α et IFN γ) qui une fois sécrétés vont activer leurs récepteurs spécifiques et permettre l'activation par les voies JAKs de STAT1. Ces résultats suggèrent donc que le pseudo-domaine « CTAR3 », situé entre CTAR1 et CTAR2 de LMP1, n'est pas utile dans l'activation de STAT1.

Les facteurs STATs sont très hétérogènes par leurs fonctions. L'activation de certains STATs a été associée à la transformation induite par les virus ou les oncogènes. STAT3 est activé dans les cellules transformées par la tyrosine kinase Src (Yu, Meyer et al. 1995) et pourrait fonctionner comme un oncogène (Bromberg, Wrzeszczynska et al. 1999). Une activation des STATs a été observée dans des cellules transformées par des virus, comme HTLV1 (Migone, Lin et al. 1995), v-Abl (Danial, Pernis et al. 1995) et l'EBV (Weber-Nordt, Egen et al. 1996). STAT1 et STAT5 sont activés dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) et myéloblastiques (Gouilleux-Gruart, Gouilleux et al. 1996). Les translocations Tel/Jak2 rencontrées dans certaines LAL et Bcr/Abl des leucémies myéloïdes chroniques (LMC) activent constitutivement STAT1 (Nguyen, Ho et al. 2001). Des souris déficientes en STAT1 sont sensibles aux infections virales et pathogènes intracellulaires (Durbin, Hackenmiller et al. 1996). Des souris déficientes en STAT3 ne sont pas viables. Le facteur de transcription STAT4 intervient sélectivement dans la signalisation par l'IL12. STAT5 répond à l'IL2 et régule les cyclines D. Et enfin, STAT6 répond à l'IL4 et l'IL13, et intervient dans le

développement des lymphocytes T. Ainsi il est clair que les différents facteurs transcriptionnels de la famille des STATs possèdent différentes fonctions. Initialement, le facteur de transcription STAT1 a été décrit comme activé en réponse au deux types d'interférons (IFN α et IFN γ). Par la suite de nombreuses autres cytokines ont été impliquées, comme l'IL6 et l'IL10.

Le rôle précis de la protéine STAT1 dans les lymphocytes B infectés par l'EBV n'avait pas été clairement établi lorsque nous avons commencé nos travaux sur ce sujet. STAT1 possède deux isoformes, STAT1 α et STAT1 β , qui possèdent des propriétés bien différentes. En effet, STAT1 β , qui ne contient pas de domaine carboxy-terminal TAD, n'a aucune activité transcriptionnelle, contrairement à l'isoforme STAT1 α . De plus, STAT1 β se comporte comme un dominant négatif de STAT1 α en se fixant à ce dernier, inhibant son activité transcriptionnelle. Dans notre première étude (article 1), nous montrons que la surexpression de STAT1 β inhibe la phosphorylation de STAT1 α , et provoque une augmentation de sa propre phosphorylation. Ainsi, STAT1 β peut interférer avec l'activation de STAT1 α par la saturation des sites de fixation de STAT1 α au niveau du récepteur, confirmant de ce fait, l'activation constitutive de la voie de signalisation aboutissant à la phosphorylation de STAT1 dans les LCLs. De plus, nous montrons que STAT1 β peut également inhiber STAT1 α en occupant ses séquences de fixation à l'ADN dans le noyau, inhibant la transcription des gènes cibles de STAT1 α .

La surexpression de STAT1 β , bloquant la phosphorylation de STAT1 α , ainsi que sa spécificité de fixation à l'ADN, bloque également l'induction des gènes cellulaires endogènes cibles de STAT1 α comme TAP1, IRF1, PKR, et p21WAF1/CIP1. Réciproquement, nous montrons que la diminution de l'expression de c-myc connue comme résultant de la stimulation de STAT1 α par l'IFN γ est « reversée » par la surexpression de STAT1 β . Enfin, nous montrons que STAT1 β protège les cellules contre l'apoptose induite par l'activation de p53 par la Fludarabine.

II. p53, STAT1 et NF-kB

La régulation de l'activité de p53 dans les lymphocytes B infectés par l'EBV est le résultat d'un effet complexe entre divers facteurs cellulaires. LMP1 induit des gènes anti-apoptotiques et pro-apoptotiques, comme les gènes cibles de p53 (Dirmeier, Hoffmann et al. 2005). c-myc, qui est induit par EBNA2 (Kaiser, Laux et al. 1999), contribue à la régulation de l'expression du gène TP53 (Kirch, Flaswinkel et al. 1999). L'induction et l'activation de p53 pendant l'infection des lymphocytes B par l'EBV dépend également de l'activation de NF-kB (Chen and Cooper 1996). Comme nous l'avons montré dans l'article 1, l'activation de STAT1 est susceptible de favoriser l'activation de p53 (Baran-Marszak, Feuillard et al. 2004; Townsend, Scarabelli et al. 2004). Cependant, l'induction de l'apoptose par p53 est inhibée dans les lymphocytes B infectés par l'EBV par la protéine A20 (Fries, Miller et al. 1996), un inhibiteur de p53 qui est un gène cible de NF-kB (Laherty, Hu et al. 1992). La sous-unité p65/RelA de NF-kB diminue également l'activité transcriptionnelle de p53 par compétition avec la protéine CBP/p300 (Ravi, Mookerjee et al. 1998; Webster and Perkins 1999).

A l'inverse, il semblerait que la protéine STAT1 puisse interagir physiquement avec la protéine p53 au sein d'un complexe multiprotéique, incluant STAT1, p53, c-Abl ainsi que ATM, dans le cas de dommages à l'ADN provoqués par des drogues cytotoxiques comme la Fludarabine et la doxorubicine. En effet, certains résultats obtenus au laboratoire semblent prouver que la présence de p53 est nécessaire pour l'induction de l'activation de STAT1 dans le cas de stress génotoxiques comme le traitement des cellules à la Fludarabine ou la doxorubicine. Ainsi, le statut de p53 dans les cellules serait important pour l'activation efficace du facteur de transcription STAT1 (résultats non publiés du laboratoire).

La protéine LMP1 a un rôle majeur dans la transformation des lymphocytes B par l'activation constitutive de NF-kB, via ces deux domaines cytoplasmiques CTAR1 et CTAR2. Nos résultats suggèrent que NF-kB peut conduire à deux voies, l'une promouvant la survie et l'autre l'apoptose via les IFNs et STAT1. Ainsi, l'activation de NF-kB par LMP1 permet d'induire les gènes cibles de STAT1 codant pour des protéines pro-apoptotiques comme le récepteur de mort Fas/CD95, IRF1 ou Caspase3 (Porta, Hadj-Slimane et al. 2005). NF-kB permet probablement l'activation de p53 peut être via la protéine STAT1. Il est intéressant de noter que l'induction de p53 provoque une activation de NF-kB qui est corrélée avec la capacité de p53 d'induire l'apoptose (Ryan, Ernst et al. 2000). Les auteurs de ce papier montre

que l'inhibition ou la perte de l'activité NF-kB ne permet plus l'apoptose induite par p53, indiquant que NF-kB est essentiel dans la mort cellulaire médiée par p53 (Ryan, Ernst et al. 2000).

Par conséquent la protéine LMP1, protéine majeure transformante de l'EBV, via l'activation constitutive de NF-kB, peut avoir deux rôles totalement opposés. En effet, cette protéine peut permettre la survie cellulaire ou dans certaines conditions particulières induire l'apoptose des cellules infectées par l'EBV. Le facteur de transcription NF-kB tient le rôle central de ces effets physiologiques contraires. De fait, les lymphocytes B immortalisés par l'EBV en latence III contiennent des facteurs pro-apoptotiques et anti-apoptotique activés, avec des inhibitions et/ou activations réciproques entre eux, ayant pour résultat un équilibre dynamique, susceptible d'être évolutif selon le micro-environnement, pouvant mener la cellule infectée à l'apoptose ou à la prolifération.

III. EBV et FAS

D'après certaines études déjà anciennes, il a été rapporté une expression importante de FAS dans les lymphocytes B immortalisés par l'EBV en latence III (Falk, Trauth et al. 1992). De plus, il a été montré qu'*in vitro* et *in vivo*, ces LCL exprimait fortement FAS et pouvait subir l'apoptose par stimulation du récepteur FAS avec un anticorps monoclonal agoniste spécifique anti-Apo-1. Ainsi, Durandy et al. ont montré que dans des souris SCID immunodéficientes, et préalablement inoculées avec des LCLs humaines et contractant des tumeurs, l'administration de l'anticorps agoniste anti-Apo-1 provoquait de manière significative un retardement de la progression des tumeurs (Durandy, Le Deist et al. 1997). D'après cette étude, il a été suggéré que les lymphocytes B immortalisés par l'EBV étaient sensibles à l'apoptose induite par FAS et que ces cellules pouvaient être détruites par les lymphocytes T cytotoxiques. Certaines études ont montré que la forte densité du récepteur CD40 et l'activation de celui-ci par son ligand permettait une surexpression de FAS dans les lymphocytes B EBV+ (De paoli et al., 1997). De plus, il a été constaté que des tumeurs de lymphocytes B EBV+ possédaient une forte expression de FAS sur la surface cellulaire (Baiocchi, Khatri et al. 1997). L'irradiation de ces lymphocytes B néo-plastiques EBV+ provoque une apoptose qui est augmentée par l'activation du récepteur FAS. De plus, l'exposition prolongée à IL-2 augmente l'expression membranaire de FAS ainsi que l'apoptose induite par ce récepteur (Baiocchi, Khatri et al.

1997). Ces résultats suggéraient donc que les lymphocytes B infectés par l'EBV surexprimaient bien FAS et que celui-ci était pleinement fonctionnel et pouvait donc induire spécifiquement l'apoptose des cellules EBV+.

Il avait été suggéré un rôle de LMP1 dans la régulation de l'expression de FAS (Henriquez, Floettmann et al. 1999). En effet, en comparant des lignées cellulaires EBV négative avec des lignées EBV positives exprimant la protéine LMP1, Gutierrez et al. ont mis en évidence pour la première fois un lien existant entre LMP1 et l'expression forte de FAS. De plus ces auteurs ont montré que la stimulation du CD40 par le CD40L augmentait l'expression du CD95 à la surface cellulaire (Gutierrez, Cherney et al. 1999). Ces résultats ont donc suggéré que la signalisation de LMP1 et la signalisation du CD40 était impliquée dans la régulation de l'expression de FAS. *In vivo*, l'expression cellulaire et la concentration en sérum de FAS sont nettement augmentées chez des patients contractant une mononucléose infectieuse (Sato, Hirasawa et al. 2000).

Nous avons constaté, dans des lignées cellulaires de lymphome de Burkitt infectées ou non (BL2 EBV+ et BL2) par la souche B95.8 de l'EBV, une différence du niveau d'expression de FAS (résultats non montrés), les cellules BL2 EBV+ exprimant fortement FAS, tandis que les cellules BL2 l'expriment très faiblement, posant la question de la régulation de FAS par l'EBV.

Le promoteur du gène codant FAS comporte des sites de fixation pour les facteurs de transcription NF-kB, STAT1, et p53 (Klas, Debatin et al. 1993; Leithauser, Dhein et al. 1993; Behrmann, Walczak et al. 1994; Muller, Wilder et al. 1998). Des agents connus pour activer ces 3 systèmes transcriptionnels tels que le TNF α , IFN γ , ou des agents génotoxiques comme par exemple la Fludarabine sont connus pour induire l'expression de FAS (Krammer 2000).

Nos résultats montrent clairement que le rétablissement du programme de latence III de l'EBV, par l'induction de l'expression de EBNA2, responsable de l'induction d'expression de la protéine LMP1 induit l'expression de FAS. NF-kB est le facteur de transcription principal dans la régulation de l'expression de FAS par LMP1. NF-kB contrôle également l'activation constitutive de STAT1 et de p53 en ce qui concerne la régulation de l'expression de FAS, soulevant la question de la relation entre l'activation de NF-kB par LMP1 et l'activation de STAT1 ou p53. De plus, nous avons constaté que la contribution de LMP1 à la régulation de l'expression de FAS était plus importante que celle de chacun des 3 facteurs

transcriptionnels, NF-kB, p53 et STAT1, pris individuellement. Cela suggère probablement qu'il pourrait y avoir une interaction synergique ou coopérative entre ces facteurs dans la régulation du promoteur du gène codant FAS. Les protéines p53 et STAT1 favorisent également l'apoptose, tandis que NF-kB est anti-apoptotique. La voie d'apoptose induite par FAS est fonctionnelle et est susceptible de participer à la mort cellulaire induite par les lymphocytes T des lymphocytes B immortalisés par l'EBV en latence III. Ces résultats, avec certaines données de la littérature, prouvent que l'EBV protège les cellules infectées contre l'apoptose par l'activation de NF-kB et les rend susceptibles à l'apoptose induite par FAS.

L'EBV est l'un des agents de transformation les plus puissants des lymphocytes B *in vivo* et *in vitro*. Ce potentiel d'immortalisation est contre balancé par la capacité de l'hôte d'élaborer une réponse immune cytotoxique vigoureuse contre le virus. Le résultat final est l'établissement d'un équilibre hôte/virus de sorte que l'EBV persiste dans le compartiment des lymphocytes B mémoire circulant sous une forme silencieuse pendant toute la vie de l'individu infecté par l'EBV (Thorley-Lawson and Babcock 1999; Thorley-Lawson 2001). L'EBV a co-évolué avec son hôte humain et s'est ainsi très bien adapté. De façon intéressante, il a été suggéré que la pression de sélection exercée sur le virus tant à favoriser son immunogénicité (Khanna, Slade et al. 1997). Le rôle des lymphocytes T cytotoxiques dans la régulation de la charge en EBV est bien établi. La primo-infection de l'EBV est associée aux réponses cytotoxiques des cellules NK et des lymphocytes T contre le virus, avec une expansion clonale disproportionnée de lymphocytes T spécifiques de l'EBV (Callan, Steven et al. 1996; Callan, Tan et al. 1998). En outre, les lymphocytes T CD4+ ont un rôle clé dans la mort cellulaire cytotoxique induite par FAS des lymphocytes B immortalisés par l'EBV en latence III (Lewinsohn, Bement et al. 1998; Sun, Burton et al. 1999). Les lymphocytes T spécifiques de l'EBV peuvent, en effet, empêcher l'immortalisation par le virus de cellules de sang de cordon (Wilson and Morgan 2002). Les traitements immunosuppresseurs, mis en place après les transplantations d'organes sont responsables des désordres lymphoprolifératifs associés à l'EBV qui peuvent régresser quand l'immunosuppression est diminuée (Knowles 1999). Les désordres lymphoprolifératifs après transplantation (PTLDs) sont précédés par une augmentation de la charge virale en EBV, et l'injection de lymphocytes donneurs provoque une réduction marquée des cellules infectées par l'EBV et prévient des PTLDs (Rooney, Smith et al. 1998).

Non seulement les défauts en lymphocyte T, mais également les défauts dans l'induction et l'exécution de l'apoptose peuvent mener à l'apparition de maladies lymphoprolifératives associées à l'EBV. Ceci est illustré par la fréquence des lymphomes associés à l'EBV dans le syndrome de l'ataxie telangiectasia, qui correspond aux mutations secondaires d'ATM aboutissant à un défaut de l'activation de p53 dans le cas de cassure du double brin d'ADN (Okano 1986; Artuso, Esteve et al. 1995; Meijer, Zhivotovsky et al. 1999). Les syndromes lymphoprolifératifs atypique (ALPS), décrits comme des désordres génétiques qui impliquent la voie de mort cellulaire Fas-FasL, et qui a été rapporté pour la première fois être lié à des mutations germinales de FAS (Fisher, Rosenberg et al. 1995; Rieux-Laucat, Le Deist et al. 1995). Les ALPS peuvent être associés à l'infection chronique active de l'EBV chez les enfants, maladie provoquée par un défaut de lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) et des cellules tueuses NK (Wakiguchi 2002). Le risque de développer des lymphomes non-Hodgkinien et des lymphomes de Hodgkin dans les ALPS est, respectivement, de 14 à 51 fois plus, que dans les sujets sains (Straus, Jaffe et al. 2001). Une proportion significative de ces tumeurs est associée à l'EBV, et il a été supposé qu'un défaut dans la voie de mort cellulaire induite par FAS responsable de l'apoptose des cellules infectées par le virus pourrait permettre la persistance virale de l'EBV (Straus, Jaffe et al. 2001)).

Dans leur ensemble, nos résultats suggèrent clairement la notion que le programme de latence III de l'EBV, dit programme d'immortalisation cellulaire, active aussi un programme cellulaire sensibilisant les cellules infectées à leur propre élimination par les lymphocytes T. Ces résultats suggèrent que l'induction de FAS par l'EBV joue un rôle clé dans le contrôle par l'hôte des lymphocytes B immortalisés par l'EBV, *in vivo*, et soulignent l'importance des événements génétiques secondaires dans l'émergence de désordres lymphoprolifératifs associés à l'EBV.

IV. LMP1 et régulation de l'apoptose

IV.1- LMP1 inhibe l'apoptose

La protéine LMP1 possède la propriété particulière de réprimer l'apoptose. Cette propriété, contribuant à son oncogénicité, est en rapport direct avec l'activation de la voie NF- κ B par LMP1. Ainsi, certaines équipes ont montrées, que l'inhibition de NF- κ B par un mutant dominant négatif I κ B α ou par un inhibiteur chimique de NF- κ B, le BAY 11-7082, que

l'apoptose était induite dans les LCLs immortalisées par l'EBV et dans des cellules transfectées par LMP1 (Asso-Bonnet, Feuillard et al. 1998; Cahir-McFarland, Davidson et al. 2000; Cahir-McFarland, Carter et al. 2004). Certains de nos résultats de l'article 3, suggèrent que l'inhibition de NF- κ B, par la surexpression de I κ B α dn dans les LCLs infectées par l'EBV, augmente légèrement l'apoptose et que cette inhibition permet également de sensibiliser les cellules à une apoptose massive médiée par FAS.

LMP1 utilise la voie NF- κ B pour réguler positivement l'expression de plusieurs protéines anti-apoptotiques, telles que A20, TRAF1, l'inhibiteur de caspase c-IAP et les membres de la famille Bcl-2, comme Bcl-2, Bcl-XL, Bfl1 ou Mcl1 (Gregory, Dive et al. 1991; Henderson, Rowe et al. 1991; Laherty, Hu et al. 1992; Milner, Johnson et al. 1992; Martin, Veis et al. 1993; Rowe, Peng-Pilon et al. 1994; Fries, Miller et al. 1996; Wang, Rowe et al. 1996; Kenney, Guinness et al. 1998; Hong, Yoon et al. 2000; D'Souza, Edelstein et al. 2004; Xiong, Clarke-Katzenberg et al. 2004; Dirmeier, Hoffmann et al. 2005). La voie NF- κ B induite par LMP1 possède donc un rôle central dans l'inhibition de l'apoptose médiée par LMP1. Des travaux récents ont montré que LMP1 pouvait réprimer le gène pro-apoptotique codant la protéine Bax, via la voie NF- κ B (Grimm, Schneider et al. 2005). De plus, la voie PI3K, autre voie de signalisation induite par LMP1, est très importante pour la survie cellulaire. En effet, plusieurs études ont montré l'importance de cette voie dans de nombreux modèles (lymphome de Burkitt, fibroblastes Rat-1, LCLs) (Brennan, Mehl et al. 2002; Dawson, Tramontanis et al. 2003; Mainou, Everly et al. 2005).

Certaines études ont aussi montré un rôle important de l'EBV dans la résistance à l'apoptose FAS dépendante et étoposide ou fludarabine induite (Komano, Sugiura et al. 1998; Zhao, Song et al. 1998; Fagard, Mouas et al. 2002). Cette résistance à l'apoptose semble due à une surexpression de la protéine Bcl2 (Komano and Takada 2001) et une incapacité des cellules à activer la cascade des caspases. En effet, il a été également démontré que NF- κ B, peut protéger les lymphocytes B de l'apoptose via la surexpression de Bcl2 (Feuillard, Schuhmacher et al. 2000). La protéine Bfl1, protéine anti-apoptotique de la famille Bcl2, est surexprimée par LMP1. L'expression de Bfl1, via LMP1 et dépendante de NF- κ B, permettrait la survie des lignées issues de lymphocytes B (D'Souza, Edelstein et al. 2004). Outre un mécanisme, passant visiblement par Bcl2 et d'autres protéines anti-apoptotiques, il a été démontré qu'il existe un défaut de formation du DISC et une réduction de l'activation de la caspase 8 dans les lignées EBV positives issues de lymphocyte B (Tepper and Seldin 1999). En effet, les auteurs démontrent qu'il existe un plus haut niveau d'expression de c-FLIP, par

rapport à la caspase 8. Les protéines c-FLIP vont alors pouvoir saturer le DISC à la place de la procaspase-8. La caspase-8 ne peut donc pas s'auto-activer et activer la cascade de caspase. La surexpression de c-FLIP conduit les lymphocytes B infectés par l'EBV à une résistance à l'apoptose FAS dépendante. Beaucoup plus récemment, l'équipe de Yamanashi, a démontré le rôle de l'EBV dans l'expression du système CD40-CD40L, qui permettrait le maintien de l'infection et la survie des cellules tumorales (Imadome, Shirakata et al. 2003).

La littérature très abondante sur ce sujet et nos résultats permettent d'affirmer sans aucun doute que la protéine LMP1, protéine majeure transformante du programme de latence III de l'EBV, permet la survie cellulaire, par l'activation constitutive de NF- κ B, qui surexprime des gènes anti-apoptotiques bloquant le processus d'apoptose.

IV.2- LMP1 induit l'apoptose

Paradoxalement, malgré son rôle anti-apoptotique certain, LMP1 pourrait aussi induire l'apoptose. Ainsi, les travaux de Zhang et al. ont montré par l'utilisation d'un système inductible dans des cellules épithéliales Hela que LMP1 potentialise l'apoptose induite par le récepteur FAS ou l'étoposide (Zhang, Hu et al. 2002). Dans cette étude, il est constaté une diminution de l'expression de Bcl2, une activation de la caspase 3 effectrice, un clivage de la PARP et une condensation de la chromatine, avec inhibition de la voie des TNF-R. LMP1 potentialise également le processus induit par l'étoposide par l'activation de la caspase 2 initiatrice et de la caspase 3 effectrice avec une dissipation du potentiel transmembranaire mitochondrial, suivie du relarguage du cytochrome c et enfin une condensation de la chromatine (Zhang, Uthaisang et al. 2005). La potentialisation par LMP1 de l'apoptose induite intervient précocement dans la réponse apoptotique (en amont de la caspase 2) et implique le domaine C-terminal de LMP1. Nos résultats montrent également une apoptose lors de la surexpression de LMP1 dans les LCLs EBV positives. Nous remarquons une fragmentation très rapide du noyau, ainsi que le clivage de la PARP (Figure 72, 73, 74, 75). De plus, nous avons constaté également une activation de la caspase 3 et de la caspase 9 très précocement (résultats non montrés). Ces résultats suggèrent que la mitochondrie est impliquée dans l'apoptose induite par la surexpression de LMP1.

Comme exposé en introduction, certains travaux ont montré que le niveau d'expression élevé de LMP1 pourrait provoquer l'apoptose des cellules épithéliales se traduisant par une fragmentation de l'ADN (Lu, Chen et al. 1996). L'EBV peut également

infecter et induire l'apoptose chez les neutrophiles (Laroche, Flaman et al. 1998). La réponse apoptotique semble impliquer la voie Fas/FasL, avec une augmentation du complexe formé et de FasL soluble. L'EBV inhibe par ailleurs le développement des cellules dendritiques en provoquant l'apoptose de leurs précurseurs monocytaires en présence de GM-CSF et d'IL-4 (Li, Liu et al. 2002). En fait, il a été montré dans des lymphocytes B que LMP1 est exprimé dans une gamme de 2.10^5 à 4.10^5 molécules/cellule. Le niveau d'expression de LMP1 compris dans cette gamme a comme conséquence l'inhibition de la prolifération des cellules (Sandberg, Kaykas et al. 2000). Aux concentrations inférieures, les effets de LMP1 sont prolifératifs pour les cellules (Kaykas and Sugden 2000). Nous constatons alors qu'un niveau largement supérieur d'expression de LMP1 provoque l'activation de l'apoptose.

Comme nous l'avons rapporté précédemment, les modifications cellulaires induites par l'effet toxique de LMP1, et reconnues comme caractéristiques des processus apoptotiques, sont nombreuses. Il est observé une dissipation du potentiel transmembranaire mitochondrial, un relargage du cytochrome C, l'activation de la caspase 2 initiatrice et de la caspase 3 effectrice, une diminution de l'expression de Bcl2, très précocement une exposition des phosphatidyl sérine sur la face externe de la membrane plasmique, une condensation de la chromatine, le clivage de la PARP, la fragmentation de l'ADN ou encore l'induction de la voie FAS/FAS Ligand dans les cellules épithéliales (Zhang, Uthaisang et al. 2005).

Nous n'avons pas constaté d'induction du messenger de FasL dans le modèle des LCLs en latence III (résultats non montrés). Par contre, nos résultats montrent que la procaspase-8 est recruté dans le complexe DISC très rapidement, celui-ci étant formé sur le récepteur FAS (Figure 78), suggérant que la surexpression de LMP1 provoque une apoptose via l'auto-activation du récepteur de mort Fas, indépendamment de FasL.

Dans une étude de 2003, Nitta et al. ont montré que la mort cellulaire induite par LMP1 dans des cellules épithéliales dépendait de la régulation de l'expression des gènes par NF- κ B, comme TRAIL ou FAS (Nitta, Chiba et al. 2003).

L'auto-activation de Fas en absence de stimulation par FasL peut se produire par l'agrégation de Fas dans les radeaux lipidiques membranaires (lipid rafts). Cette agrégation fait intervenir une modification des constituants de certaines régions membranaires. Cette agrégation est l'élément initiateur de l'induction de FAS et va provoquer la formation d'un DISC avec les protéines FADD et procaspase-8 afin d'activer par la caspase-8 clivé la cascade des capsases aboutissant aux étapes tardives de l'apoptose (Cremesti, Paris et al.

2001; Scheel-Toellner, Wang et al. 2002; Grassme, Cremesti et al. 2003; Miyaji, Jin et al. 2005).

Les travaux de Huang et al. ont montré que l'irradiation gamma provoquant des dommages à l'ADN, provoque une production importante des espèces réactives oxygénées (ROS) qui vont permettre l'agrégation du récepteur Fas, ainsi que son auto-activation indépendamment de FasL et l'activation de la cascade de caspases par FADD et la caspase-8, aboutissant à l'apoptose des cellules. L'absence de la caspase-8 ou de Fas réduit considérablement la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par les dommages à l'ADN. D'autres travaux ont confirmé l'implication des ROS dans l'agrégation de Fas dans les lipides rafts et on fait le lien entre le niveau élevé des ROS dans la cellule et la formation des céramides induite par la sphingomyélinase acide (SM) (Scheel-Toellner, Wang et al. 2004).

D'après nos résultats préliminaires, nous constatons que l'induction du programme de latence III augmente le niveau des ROS cellulaires, possiblement en rapport avec l'induction de LMP1 (résultats préliminaires non montrés). De plus, l'inhibition de la formation des ROS par la catalase, transformant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O), inhibe significativement l'apoptose induite par LMP1. Ces quelques résultats préliminaires semblent pouvoir confirmer le fait que les ROS accumulés dans la cellule peuvent permettre l'agrégation de Fas, permettant ainsi l'initiation de l'apoptose Fas dépendante via l'induction de l'expression de LMP1.

Une étude a montré que des lignées cellulaires de lymphome de Burkitt EBV positives expriment des niveaux élevés de MAPK activée et des niveaux élevés de ROS (Cerimele, Battle et al. 2005). Ces travaux ont également montré une régulation directe de l'activation de NF- κ B par les ROS (Cerimele, Battle et al. 2005). Ces travaux montrent aussi que la protéine LMP1 induirait la production des ROS dans des lymphocytes B en latence III de l'EBV (Cerimele, Battle et al. 2005). Nos résultats préliminaires semblent en accord avec ces constatations suggérant donc que la surexpression de LMP1 provoque, d'une part, une augmentation des ROS cellulaires, permettant l'initiation de l'agrégation du récepteur FAS.

Les voies connues de signalisation du CD40 pourraient suggérer des hypothèses pour expliquer l'induction des ROS par LMP1. En effet, le CD40, une fois activée par son ligand, peut induire la surexpression de FAS à la surface membranaire (Wischhusen, Schneider et al. 2005) et peut provoquer l'agrégation de FAS par l'augmentation des ROS cellulaires. D'après

certaines études, l'activation du récepteur CD40 par son ligand, CD40L, induit une production des ROS cellulaire dans les lymphocytes B. Cette production des ROS peut se faire par deux voies de signalisation différentes. L'une est la voie de la NADPH oxydase où le CD40 via la protéine adaptatrice TRAF3 s'associe avec la sous-unité de la NDAPH oxydase, p40(phox). L'autre voie impliquée est la voie de la PI3K, qui va être activé par l'association du CD40 activé par CD40L avec la sous-unité p85 de la PI3K (Ha and Lee 2004).

Tous ces résultats réunis suggèrent que LMP1 permet d'une part la sensibilisation des lymphocytes B infectés par l'EBV à l'apoptose induite par les lymphocytes T cytotoxiques via Fas-FasL, permettant l'élimination de ces lymphocytes B par le système immunitaire. De plus, le niveau élevé d'expression de LMP1 induit une apoptose spontanée des lymphocytes B, via la surexpression de FAS et son auto-activation par l'accumulation des ROS cellulaires. Ce modèle hypothétique pourrait expliquer que la protéine LMP1 est régulée en expression dans les cellules infectées par l'EBV.

L'ensemble de nos résultats suggère clairement que dans les LCLs EBV+ en latence III, les niveaux d'expression de la protéine LMP1 doivent être régulés finement pour exercer son plein effet oncogénique. Ainsi, le niveau d'expression de LMP1 est particulièrement important pour maintenir un équilibre entre les deux processus de survie et de mort cellulaire.

L'activation des voies NF-kB et JNK par LMP1 exercerait des effets régulateurs opposés sur le promoteur de LMP1, JNK étant activateur et NF-kB répresseur de la transcription du gène BNLF1 codant LMP1 (Goormachtigh, Ouk et al. 2006).

Une autre hypothèse est que les cellules soient « sélectionnées » pour le « bon niveau » de LMP1. Selon le variant EBV et le contexte cellulaire, les niveaux d'expression de LMP1 variables d'une cellule à l'autre, résulteraient d'un équilibre entre les voies de survie et les voies d'apoptose induite par LMP1. Cette dernière hypothèse expliquerait pourquoi, *in vivo*, les niveaux d'expression de LMP1, sont très hétérogènes d'une cellule à l'autre, comme par exemple dans la maladie de Hodgkin ou dans les lymphomes des déficits immunitaires.

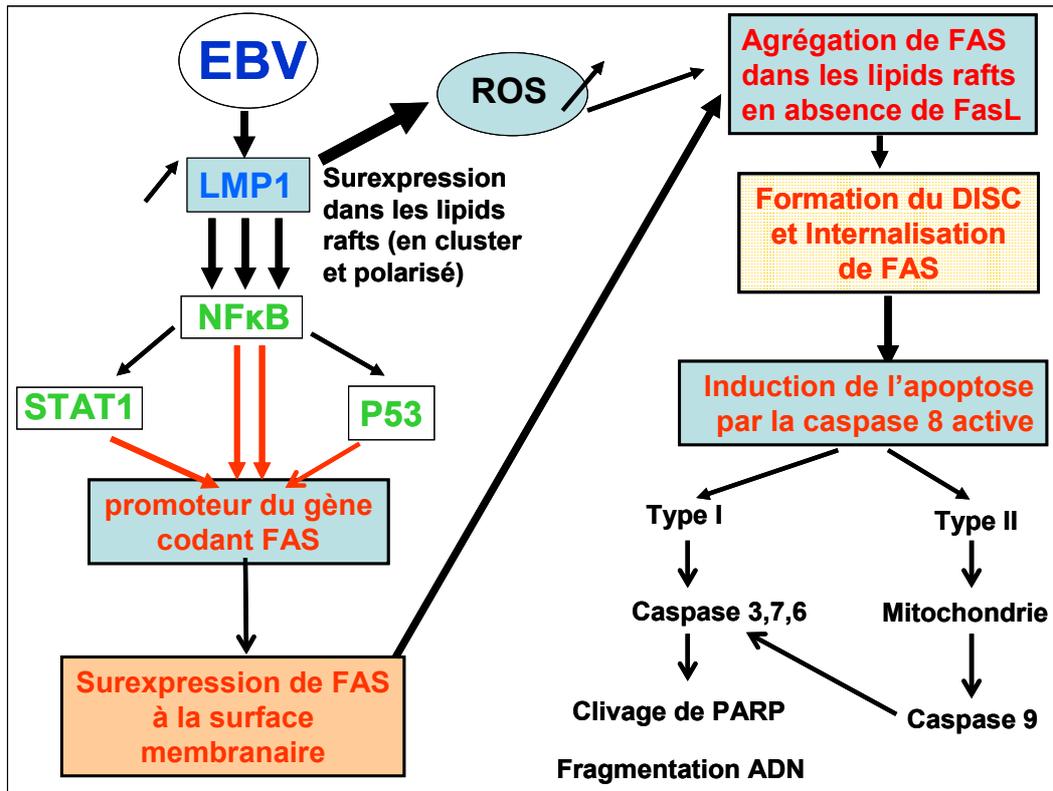


Figure 79 : Schéma hypothétique de l'induction de l'apoptose par LMP1

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusions et Perspectives

Les différents travaux réalisés au cours de ma thèse dans le laboratoire, en collaboration ou sur mon sujet propre, ont permis de répondre à différentes questions sur les contributions des facteurs de transcriptions NF- κ B, STAT1 et p53 dans la signalisation de LMP1. Dans notre modèle de lymphocyte B immortalisés par l'EBV en latence III, nous avons montré que le facteur de transcription NF- κ B possède un rôle central dans la signalisation de LMP1 conduisant à une surexpression de facteurs pro-apoptotiques comme le récepteur de mort Fas/CD95. L'activation de STAT1 et p53 par LMP1 est secondaire à NF- κ B. L'activation constitutive de STAT1 par LMP1, dans ces lymphocytes B EBV+, est due à une boucle autocrine des IFNs, ces derniers étant induits en expression par NF- κ B. De plus, nous avons montré que les isoformes de STAT1, STAT1 α et STAT1 β , participent aux deux processus physiologiques majeurs, la prolifération et l'apoptose. En effet, nous montrons que l'isoforme majoritaire STAT1 α est pro-apoptotique et que son inhibition par sa forme naturelle dominante négative, STAT1 β , protège les lymphocytes B infectés par l'EBV contre l'apoptose induite par des agents génotoxiques comme la Fludarabine.

En activant ces trois facteurs de transcription NF- κ B, STAT1 et p53, régulant l'expression de FAS à la surface cellulaire des lymphocytes B infectés par l'EBV, nous montrons que LMP1 permet de sensibiliser ces lymphocytes B à l'apoptose médiée par les lymphocytes T cytotoxiques du système immunitaire. Du point de vue de l'équilibre virus/hôte, ce processus permettrait l'élimination des lymphocytes B infectés par l'EBV restés en latence III, par le système immunitaire.

La surexpression de LMP1 provoque une apoptose spontanée dans les lymphocytes infectés par l'EBV, et nos premiers résultats montrent que cette apoptose induite par LMP1 est médiée par le récepteur Fas qui, étant surexprimé, s'agrège et s'auto-active indépendamment de FasL, provoquant ainsi une apoptose caspase dépendante.

Certains de nos résultats non présentés dans ce manuscrit mettent aussi en lumière l'implication des ROS dans ce phénomène d'apoptose induit par LMP1 et médiée Fas. En utilisant, un inhibiteur spécifique de la formation des ROS, la catalase, dans ces cellules LCLs EBV+ transfectées par LMP1wt et surexprimant LMP1, nous constatons une très forte inhibition de cette apoptose. Ceci nous conduit à proposer l'hypothèse que le récepteur pro-apoptotique Fas est le médiateur principal de l'induction de l'apoptose par LMP1, et que les ROS sont indispensables à l'auto-activation de Fas.

Pour tester cette hypothèse nous voulons d'abord confirmer l'implication majeure de Fas dans l'induction de l'apoptose par LMP1, par des expériences de siRNA contre la protéine Fas dans les cellules LCLs EBV+ surexprimant LMP1. De plus, nous voulons également confirmer le rôle majeur des ROS comme le médiateur de l'agrégation de Fas, par l'utilisation de la catalase, transformant le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O). Il serait donc intéressant alors de regarder si le pré-traitement des cellules à la catalase diminuerait le recrutement de la procaspase-8 dans le DISC de Fas. Ainsi, nous pourrions voir si le niveau élevé des ROS cellulaires permettrait effectivement l'agrégation de Fas, ainsi que l'initiation du processus apoptotique via la formation du DISC et l'activation de la caspase-8 et par conséquent l'activation de la cascade de caspases.

D'après certaines données de la littérature, les radicaux oxygénés au sens large, c'est-à-dire les ROS et les RNS (Radicaux nitrogénés comme les NO), provoqueraient l'apoptose dépendante de Fas. En effet, les NO, qui peuvent être produits par l'enzyme inductible iNOS (inductible Nitrogen Oxyde Synthase), sont susceptibles, en fonction du type cellulaire d'induire l'apoptose Fas-dépendante (Chlichlia et al., 1998). Les NO possèdent aussi bien des rôles anti-apoptotiques que pro-apoptotiques. Nous faisons l'hypothèse que ces derniers possèdent des rôles de médiateurs facilitant l'agrégation de Fas à la surface cellulaire, permettant l'auto-activation du récepteur et l'enclenchement de l'apoptose. D'après certains de nos résultats préliminaires (non montrés), le pré-traitement des cellules LCLs transfectées par LMP1wt et surexprimant LMP1 avec un inhibiteur chimique de la iNOS, l'AG (Aminoguanidine hemisulfate), inhibe très significativement l'apoptose induite par LMP1. Ces quelques résultats peuvent suggérer que les ROS et les NO sont requis et sollicités pour l'induction de l'apoptose par LMP1 médiée par Fas. Au vu de ces derniers résultats il nous paraît important de déterminer les voies de signalisation mises en jeu par LMP1 dans l'augmentation des ROS cellulaires et des NO lors de la surexpression de LMP1, ces derniers étant secondaires dans le mécanisme de l'apoptose induite par LMP1. Nous pourrions, par exemple utiliser des mutants de LMP1 délétés soit du domaine CTAR1 soit du domaine CTAR2 soit des deux domaines afin de déterminer en premier lieu le domaine fonctionnel de LMP1 mis en jeu pour l'induction des ROS et NO, nous orientant par la suite vers la voie de signalisation pouvant être impliquée dans cette induction comme peut être la voie NF- κ B. Nous pourrions aussi utilisé les dominants négatifs des différents facteurs de transcription NF- κ B, STAT1 et p53, respectivement I- κ B, STA1 β et p53muté ou encore des inhibiteurs chimiques des différents facteurs de transcription induit directement par LMP1 comme le

BAY11-7082, inhibiteur chimique spécifique de NF- κ B ou la wortmannin, inhibiteur chimique de la PI3K ou encore l'inhibiteur chimique des MAPK comme le PD98059. Nous pourrions alors mesurer le niveau de ROS et de NO après l'inhibition séquentielle des différentes voies de signalisation induite par LMP1, nous renseignant sur la voie essentielle à l'induction des radicaux oxygénés par LMP1.

Parce que la voie des sphingomyélinases acides est juste en aval des ROS et est nécessaire à l'agrégation de Fas dans les lipids rafts, nous voulons aussi déterminer si cette voie est impliquée dans le processus d'apoptose induit par LMP1. Nous pourrions par exemple mesurer l'activité de l'enzyme sphingomyélinase acide durant l'induction de LMP1 en quantifiant la quantité de céramides libérée par cette enzyme. Nous pourrions aussi utiliser des inhibiteurs de la polymérisation des filaments d'actine qui empêcherons alors la translocation de l'ASM, inhibant ainsi son activation.

D'autres hypothèses alternatives sont également envisagées pour expliquer le processus d'apoptose induit par LMP1, notamment le rôle de la protéine c-FLIP. Il a été montré par cDNA microarrays, une surexpression du transcrite codant la protéine c-FLIP (Cahir-McFarland et al., 2004) dans les LCLs. La surexpression de la protéine c-FLIP pourrait inhiber l'apoptose induite par la voie des récepteurs à domaine de mort, provoquant une résistance majeure à la voie apoptotique Fas. Des travaux très récents prouvent que dans des lymphomes B EBV+, la protéine LMP1 via son domaine CTAR2 induisant la voie de signalisation NF- κ B, induit la surexpression de c-FLIP (Snow et al., 2006). Le facteur de transcription NF- κ B transactive le gène codant c-FLIP (Snow et al., 2006). La surexpression de c-FLIP permet un blocage partiel de l'apoptose induite par la voie Fas et par la voie de TRAIL en permettant le recrutement de c-FLIP surexprimé dans le DISC empêchant le recrutement complet de la procaspase-8 dans celui-ci. En confrontant nos résultats avec ces travaux, nous nous apercevons que nos modèles cellulaires de LCLs sont sensibles à la voie Fas malgré l'induction possible de c-FLIP. Il serait donc intéressant d'étudier le mécanisme mis en place dans nos modèles cellulaires de LCLs EBV positives afin de contrecarrer l'inhibition de l'apoptose, dans le cas où la protéine c-FLIP serait bien surexprimée et accomplirait pleinement son rôle inhibiteur sur la voie Fas. Il serait facilement envisageable de regarder par western blot, l'expression de c-FLIP lors de la surexpression de LMP1, en regardant l'expression des différentes isoformes, c-FLIP_L et c-FLIP_S. D'autres part, nous pourrions regarder par co-immunoprécipitation quelles isoformes de c-FLIP seraient recruté dans le DISC du récepteur à domaine de mort Fas. Nous pourrions alors conclure sur le rôle de c-FLIP dans le phénomène d'apoptose dépendant de Fas et induit par la surexpression de

LMP1. Nous étudierions alors l'implication potentielle de c-FLIP dans la régulation de l'activité des autres récepteurs à domaine de mort comme DR4 et DR5 dont le ligand est TRAIL ; et contre lequel l'EBV pourrait avoir un effet protecteur. Nous pourrions, de ce fait, étudier d'une part la sensibilité des cellules à l'induction de l'apoptose médiée par TRAIL, par le traitement des cellules EBV+ avec du TRAIL recombinant, et d'autre part étudier la régulation de TRAIL et de ses récepteurs spécifiques, DR4 et DR5 par LMP1, par western blot et par PCR quantitative. De plus, il serait intéressant de voir si les voies apoptotiques Fas et TRAIL-R seraient synergiques dans notre modèle cellulaire. Bien sûr, dans l'hypothèse où notre modèle cellulaire soit sensible à la voie apoptotique de TRAIL.

In vivo, le potentiel d'immortalisation de l'EBV est contre balancé par la capacité de l'hôte infecté par ce virus d'établir une réponse immune cytotoxique efficace. Au final, il s'établit un équilibre hôte/virus de tel sorte que l'EBV persiste dans le compartiment des lymphocytes B mémoires circulant sous une forme silencieuse pendant toute la vie de l'individu infecté par l'EBV (Thorley-Lawson, 2001; Thorley-Lawson and Babcock, 1999). Les lymphocytes T cytotoxiques maintiennent donc une pression sélective permettant une régulation de la charge virale en EBV dans l'individu infecté. D'autre part, la primo-infection de l'EBV est associée aux réponses cytotoxiques des cellules NK et des lymphocytes T contre le virus, avec une expansion clonale disproportionnée de lymphocytes T spécifiques de l'EBV (Callan et al., 1996; Callan et al., 1998). En outre, les lymphocytes T CD4+ possèdent un rôle clé d'effecteur de la cytotoxicité médiée par FAS contre les lymphocytes B immortalisés par l'EBV en latence III (Lewinsohn et al., 1998; Sun et al., 1999). Une approche pourrait consister à étudier dans des modèles animaux le rôle de FAS dans le contrôle de la charge virale en EBV. Par exemple, il serait peut être intéressant d'étudier l'expression de Fas et FasL dans les différentes sous-populations lymphocytaires T médiant la réponse immune comme les lymphocytes T CD4+ contre les populations de lymphocytes B infectés par l'EBV dans des souris SCID infectés par l'EBV. Nous pourrions alors à partir d'un donneur humain, séropositif pour l'EBV, prélever l'ensemble des lymphocytes et purifier les lymphocytes T CD4+ et T CD8+ que nous conserverions congelés dans du DMSO, ainsi que de purifier les lymphocytes B que nous infecterions par l'EBV afin de transformer ces lymphocytes B en lignées lymphoblastoïdes (LCLs). Une fois les lignées LCLs établies, nous pourrions les transfecter par notre vecteur épisomal inductible pRT1-LMP1wt, et par des dominants négatifs de FADD, ou de FAS. Nous pourrions alors greffer ces cellules LCLs chez des souris SCID, puis réinjecter des lymphocytes du même donneur. Par la suite, nous pourrions alors regarder in vivo si une réponse immune des lymphocytes T spécifiques des antigènes de

l'EBV provenant du même donneur est induite contre les cellules LCLs infectées par l'EBV, et si il s'établit une résistance contre la mort cellulaire cytotoxique induite par les lymphocytes T contre les LCLs EBV+. Nous pourrions alors bien comprendre le rôle de FAS in vivo dans le contrôle par le système immunitaire des lymphocytes B infectés par l'EBV.

Une autre approche pourrait être l'étude de tumeurs associées à l'EBV chez l'homme. L'association de la maladie de Hodgkin à l'EBV est caractérisée par une latence virale de type où seules les protéines virales LMP1 et EBNA1 sont exprimées (Thorley-Lawson, 2001). Il serait donc intéressant d'étudier, par marquage immuno-histochimique in situ, l'expression des protéines LMP1 et FAS dans les tumeurs EBV positives de la maladie de Hodgkin, où les cellules de Reed-Sternberg expriment les marqueurs protéiques CD30, CD40 et FAS. Ainsi, nous pourrions corréler l'expression de ces deux protéines et émettre certaines hypothèses sur le rôle in vivo de FAS dans les pathologies tumorales associées à l'EBV.

Cette approche in situ permettrait également d'aborder la question de la résistance à l'apoptose induite par FAS dans les tumeurs associées à l'EBV. Par exemple, la maladie de Hodgkin est caractérisée par une activation constitutive de NF- κ B et la surexpression de c-FLIP en même temps que FAS. L'étude des proformes et des formes activées des intermédiaires de la signalisation FAS contribuerait à formuler des hypothèses mécanistiques de résistance à FAS.

Ces quelques propositions de travail reposent d'une façon générale le problème du rôle de l'EBV dans la transformation du lymphocyte B dans le contexte global des interactions hôte-virus pour lesquelles le récepteur pro-apoptotique FAS est sans doute un médiateur essentiel.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Remarques :

Dans ce manuscrit : je me réfère parfois aux références de Kieff et Rickinson de 2001, ces deux références correspondent à deux chapitres pris dans le livre « *Fields Virology* », les références exactes sont :

Kieff, E., and A.B. Rickinson. Epstein-Barr virus and its replication, (2001), 2511-2574. In D. M. Knipe and P.M. Howley (ed.) *Fields virology*, 4th ed., vol. 2. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. PA

Rickinson, A.B., and E. Kieff. Epstein-Barr virus and its replication, (2001), 2511-2574. In D. M. Knipe and P.M. Howley (ed.) *Fields virology*, 4th ed., vol. 2. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. PA

Aasland, R., Gibson, T. J., and Stewart, A. F. (1995). The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci* 20, 56-59.

Abbot, S. D., Rowe, M., Cadwallader, K., Ricksten, A., Gordon, J., Wang, F., Rymo, L., and Rickinson, A. B. (1990). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus-encoded latent membrane protein. *J Virol* 64, 2126-2134.

Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., and Akey, C. W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 9, 423-432.

Adams, J. M., and Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281, 1322-1326.

Adida, C., Crotty, P. L., McGrath, J., Berrebi, D., Diebold, J., and Altieri, D. C. (1998). Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse differentiation. *Am J Pathol* 152, 43-49.

Aggarwal, B. B., Singh, S., LaPushin, R., and Totpal, K. (1995). Fas antigen signals proliferation of normal human diploid fibroblast and its mechanism is different from tumor necrosis factor receptor. *FEBS Lett* 364, 5-8.

Ahn, J. H., Park, S. M., Cho, H. S., Lee, M. S., Yoon, J. B., Vilcek, J., and Lee, T. H. (2001). Non-apoptotic signaling pathways activated by soluble Fas ligand in serum-starved human fibroblasts. Mitogen-activated protein kinases and NF-kappaB-dependent gene expression. *J Biol Chem* 276, 47100-47106.

- Ahsan, N., Kanda, T., Nagashima, K., and Takada, K. (2005).** Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 plays a critical role in virus production. *J Virol* 79, 4415-4424.
- Alam, A., Cohen, L. Y., Aouad, S., and Sekaly, R. P. (1999).** Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J Exp Med* 190, 1879-1890.
- Alderson, M. R., Armitage, R. J., Maraskovsky, E., Tough, T. W., Roux, E., Schooley, K., Ramsdell, F., and Lynch, D. H. (1993).** Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J Exp Med* 178, 2231-2235.
- Alfieri, C., Birkenbach, M., and Kieff, E. (1991).** Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes. *Virology* 181, 595-608.
- Algeciras-Schimmich, A., and Peter, M. E. (2003).** Actin dependent CD95 internalization is specific for Type I cells. *FEBS Lett* 546, 185-188.
- Algeciras-Schimmich, A., Shen, L., Barnhart, B. C., Murmann, A. E., Burkhardt, J. K., and Peter, M. E. (2002).** Molecular ordering of the initial signaling events of CD95. *Mol Cell Biol* 22, 207-220.
- Allan, G. J., Inman, G. J., Parker, B. D., Rowe, D. T., and Farrell, P. J. (1992).** Cell growth effects of Epstein-Barr virus leader protein. *J Gen Virol* 73 (Pt 6), 1547-1551.
- Allday, M. J., and Farrell, P. J. (1994).** Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA3C/6 expression maintains the level of latent membrane protein 1 in G1-arrested cells. *J Virol* 68, 3491-3498.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., and Yuan, J. (1996).** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87, 171.
- Ambrosini, G., Adida, C., and Altieri, D. C. (1997).** A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 3, 917-921.
- Ameisen, J. C. (2002).** On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ* 9, 367-393.
- Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Kreschel, C., and Stein, H. (1995).** Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood* 85, 744-750.
- Ansieau, S., and Leutz, A. (2002).** The conserved Mynd domain of BS69 binds cellular and oncoviral proteins through a common PXLXP motif. *J Biol Chem* 277, 4906-4910.
- Aragane, Y., Kulms, D., Metze, D., Wilkes, G., Poppelmann, B., Luger, T. A., and Schwarz, T. (1998).** Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J Cell Biol* 140, 171-182.

Arbach, H., Vignasky, V., Lefeu, F., Guinebretiere, J. M., Ramirez, V., Bride, N., Boualaga, N., Bauchet, T., Peyrat, J. P., Mathieu, M. C., et al. (2006). Epstein-Barr virus (EBV) genome and expression in breast cancer tissue: effect of EBV infection of breast cancer cells on resistance to paclitaxel (Taxol). *J Virol* 80, 845-853.

Arch, R. H., Gedrich, R. W., and Thompson, C. B. (1998). Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev* 12, 2821-2830.

Ardila-Osorio, H., Clause, B., Mishal, Z., Wiels, J., Tursz, T., and Busson, P. (1999). Evidence of LMP1-TRAF3 interactions in glycosphingolipid-rich complexes of lymphoblastoid and nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Cancer* 81, 645-649.

Arron, J. R., Vologodskaya, M., Wong, B. R., Naramura, M., Kim, N., Gu, H., and Choi, Y. (2001). A positive regulatory role for Cbl family proteins in tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine (trance) and CD40L-mediated Akt activation. *J Biol Chem* 276, 30011-30017.

Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., and Fortini, M. E. (1995). Notch signaling. *Science* 268, 225-232.

Artuso, M., Esteve, A., Bresil, H., Vuillaume, M., and Hall, J. (1995). The role of the Ataxia telangiectasia gene in the p53, WAF1/CIP1(p21)- and GADD45-mediated response to DNA damage produced by ionising radiation. *Oncogene* 11, 1427-1435.

Arvanitakis, L., Yaseen, N., and Sharma, S. (1995). Latent membrane protein-1 induces cyclin D2 expression, pRb hyperphosphorylation, and loss of TGF-beta 1-mediated growth inhibition in EBV-positive B cells. *J Immunol* 155, 1047-1056.

Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305-1308.

Ashkenazi, A., and Dixit, V. M. (1999). Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11, 255-260.

Ashwell, J. D. (2006). The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 6, 532-540.

Asso-Bonnet, M., Feuillard, J., Ferreira, V., Bissieres, P., Tarantino, N., Korner, M., and Raphael, M. (1998). Relationship between IkappaBalpha constitutive expression, TNFalpha synthesis, and apoptosis in EBV-infected lymphoblastoid cells. *Oncogene* 17, 1607-1615.

Atkinson, E. A., Ostergaard, H., Kane, K., Pinkoski, M. J., Caputo, A., Olszowy, M. W., and Bleackley, R. C. (1996). A physical interaction between the cell death protein Fas and the tyrosine kinase p59fynT. *J Biol Chem* 271, 5968-5971.

Atkinson, P. G., Coope, H. J., Rowe, M., and Ley, S. C. (2003). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus stimulates processing of NF-kappa B2 p100 to p52. *J Biol Chem* 278, 51134-51142.

Aviel, S., Winberg, G., Massucci, M., and Ciechanover, A. (2000). Degradation of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) by the ubiquitin-proteasome pathway. Targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *J Biol Chem* 275, 23491-23499.

- Babcock, G. J., Decker, L. L., Freeman, R. B., and Thorley-Lawson, D. A. (1999).** Epstein-barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J Exp Med* 190, 567-576.
- Babcock, G. J., Decker, L. L., Volk, M., and Thorley-Lawson, D. A. (1998).** EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* 9, 395-404.
- Babcock, G. J., Hochberg, D., and Thorley-Lawson, A. D. (2000).** The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity* 13, 497-506.
- Babcock, G. J., and Thorley-Lawson, D. A. (2000).** Tonsillar memory B cells, latently infected with Epstein-Barr virus, express the restricted pattern of latent genes previously found only in Epstein-Barr virus-associated tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12250-12255.
- Bader, A. G., Kang, S., Zhao, L., and Vogt, P. K. (2005).** Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* 5, 921-929.
- Baer, R., Bankier, A. T., Biggin, M. D., Deininger, P. L., Farrell, P. J., Gibson, T. J., Hatfull, G., Hudson, G. S., Satchwell, S. C., Seguin, C., and et al. (1984).** DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 310, 207-211.
- Baichwal, V. R., and Sugden, B. (1987).** Posttranslational processing of an Epstein-Barr virus-encoded membrane protein expressed in cells transformed by Epstein-Barr virus. *J Virol* 61, 866-875.
- Baichwal, V. R., and Sugden, B. (1988).** Transformation of Balb 3T3 cells by the BNLF-1 gene of Epstein-Barr virus. *Oncogene* 2, 461-467.
- Baiocchi, R. A., Khatry, V. P., Lindemann, M. J., Ross, M. E., Papoff, G., Caprio, A. J., Caprio, T. V., Fenstermaker, R., Ruberti, G., Bernstein, Z. P., and Caligiuri, M. A. (1997).** Phenotypic and functional analysis of Fas (CD95) expression in primary central nervous system lymphoma of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* 90, 1737-1746.
- Baker, S. J., and Reddy, E. P. (1998).** Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17, 3261-3270.
- Bandobashi, K., Maeda, A., Teramoto, N., Nagy, N., Szekely, L., Taguchi, H., Miyoshi, I., Klein, G., and Klein, E. (2001).** Intranuclear localization of the transcription coadaptor CBP/p300 and the transcription factor RBP-Jk in relation to EBNA-2 and -5 in B lymphocytes. *Virology* 288, 275-282.
- Bar-Sagi, D., and Hall, A. (2000).** Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* 103, 227-238.
- Baran-Marszak, F., Fagard, R., Girard, B., Camilleri-Broet, S., Zeng, F., Lenoir, G. M., Raphael, M., and Feuillard, J. (2002).** Gene array identification of Epstein Barr virus-regulated cellular genes in EBV-converted Burkitt lymphoma cell lines. *Lab Invest* 82, 1463-1479.

Baran-Marszak, F., Feuillard, J., Najjar, I., Le Clorennec, C., Bechet, J. M., Dusanter-Fourt, I., Bornkamm, G. W., Raphael, M., and Fagard, R. (2004). Differential roles of STAT1alpha and STAT1beta in fludarabine-induced cell cycle arrest and apoptosis in human B cells. *Blood* 104, 2475-2483.

Barnhart, B. C., Alappat, E. C., and Peter, M. E. (2003). The CD95 type I/type II model. *Semin Immunol* 15, 185-193.

Barth, S., Liss, M., Voss, M. D., Dobner, T., Fischer, U., Meister, G., and Grasser, F. A. (2003). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 binds via its methylated arginine-glycine repeat to the survival motor neuron protein. *J Virol* 77, 5008-5013.

Bauer, M. K., Vogt, M., Los, M., Siegel, J., Wesselborg, S., and Schulze-Osthoff, K. (1998). Role of reactive oxygen intermediates in activation-induced CD95 (APO-1/Fas) ligand expression. *J Biol Chem* 273, 8048-8055.

Behrmann, I., Walczak, H., and Krammer, P. H. (1994). Structure of the human APO-1 gene. *Eur J Immunol* 24, 3057-3062.

Beltinger, C., Fulda, S., Kammertoens, T., Meyer, E., Uckert, W., and Debatin, K. M. (1999). Herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir-induced apoptosis involves ligand-independent death receptor aggregation and activation of caspases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8699-8704.

Benschop, R. J., and Cambier, J. C. (1999). B cell development: signal transduction by antigen receptors and their surrogates. *Curr Opin Immunol* 11, 143-151.

Berberich, I., Shu, G., Siebelt, F., Woodgett, J. R., Kyriakis, J. M., and Clark, E. A. (1996). Cross-linking CD40 on B cells preferentially induces stress-activated protein kinases rather than mitogen-activated protein kinases. *Embo J* 15, 92-101.

Bertin, J., Armstrong, R. C., Otilie, S., Martin, D. A., Wang, Y., Banks, S., Wang, G. H., Senkevich, T. G., Alnemri, E. S., Moss, B., *et al.* (1997). Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1172-1176.

Bertin, J., Nir, W. J., Fischer, C. M., Tayber, O. V., Errada, P. R., Grant, J. R., Keilty, J. J., Gosselin, M. L., Robison, K. E., Wong, G. H., *et al.* (1999). Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J Biol Chem* 274, 12955-12958.

Bickham, K., Goodman, K., Paludan, C., Nikiforow, S., Tsang, M. L., Steinman, R. M., and Munz, C. (2003). Dendritic cells initiate immune control of epstein-barr virus transformation of B lymphocytes in vitro. *J Exp Med* 198, 1653-1663.

Bishop, G. A. (2004). The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B-cell function. *Nat Rev Immunol* 4, 775-786.

Blake, S. M., Eliopoulos, A. G., Dawson, C. W., and Young, L. S. (2001). The transmembrane domains of the EBV-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) variant CAO regulate enhanced signalling activity. *Virology* 282, 278-287.

- Boatright, K. M., and Salvesen, G. S. (2003).** Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 15, 725-731.
- Bodescot, M., Perricaudet, M., and Farrell, P. J. (1987).** A promoter for the highly spliced EBNA family of RNAs of Epstein-Barr virus. *J Virol* 61, 3424-3430.
- Boehrer, S., Nowak, D., Hochmuth, S., Kim, S. Z., Trepohl, B., Afkir, A., Hoelzer, D., Mitrou, P. S., Weidmann, E., and Chow, K. U. (2005a).** Daxx overexpression in T-lymphoblastic Jurkat cells enhances caspase-dependent death receptor- and drug-induced apoptosis in distinct ways. *Cell Signal* 17, 581-595.
- Boehrer, S., Nowak, D., Kukoc-Zivojnov, N., Hochmuth, S., Kim, S. Z., Hoelzer, D., Mitrou, P. S., Weidmann, E., and Chow, K. U. (2005b).** Expression of Daxx sensitizes Jurkat T-cells to the apoptosis-inducing effect of chemotherapeutic agents. *Pharmacol Res* 51, 367-374.
- Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., and Wallach, D. (1996).** Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.
- Boldin, M. P., Varfolomeev, E. E., Pancer, Z., Mett, I. L., Camonis, J. H., and Wallach, D. (1995).** A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 270, 7795-7798.
- Bonnet, M., Guinebretiere, J. M., Kremmer, E., Grunewald, V., Benhamou, E., Contesso, G., and Joab, I. (1999).** Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 91, 1376-1381.
- Bornkamm, G. W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J. M., Laux, G., Bachl, J., Korndoerfer, M., Schlee, M., Holzel, M., Malamoussi, A., *et al.* (2005).** Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res* 33, e137.
- Borza, C. M., and Hutt-Fletcher, L. M. (2002).** Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med* 8, 594-599.
- Bouillet, P., Purton, J. F., Godfrey, D. I., Zhang, L. C., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J. M., and Strasser, A. (2002).** BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* 415, 922-926.
- Bouillet, P., and Strasser, A. (2002).** BH3-only proteins - evolutionarily conserved proapoptotic Bcl-2 family members essential for initiating programmed cell death. *J Cell Sci* 115, 1567-1574.
- Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P. O., Bergamini, G., Croughton, K., Cruciat, C., Eberhard, D., Gagneur, J., Ghidelli, S., *et al.* (2004).** A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol* 6, 97-105.
- Boyce, M., Degtarev, A., and Yuan, J. (2004).** Caspases: an ancient cellular sword of Damocles. *Cell Death Differ* 11, 29-37.
- Brancolini, C., Sgorbissa, A., and Schneider, C. (1998).** Proteolytic processing of the adherens junctions components beta-catenin and gamma-catenin/plakoglobin during apoptosis. *Cell Death Differ* 5, 1042-1050.

- Braun, T., Carvalho, G., Fabre, C., Grosjean, J., Fenaux, P., and Kroemer, G. (2006).** Targeting NF-kappaB in hematologic malignancies. *Cell Death Differ* *13*, 748-758.
- Brennan, P., Floettmann, J. E., Mehl, A., Jones, M., and Rowe, M. (2001).** Mechanism of action of a novel latent membrane protein-1 dominant negative. *J Biol Chem* *276*, 1195-1203.
- Brennan, P., Mehl, A. M., Jones, M., and Rowe, M. (2002).** Phosphatidylinositol 3-kinase is essential for the proliferation of lymphoblastoid cells. *Oncogene* *21*, 1263-1271.
- Brewster, F. E., and Sullivan, J. L. (1983).** Epstein-Barr virus-infected B lymphoblastoid cell lines: dynamics of interferon and 2'5'-oligoadenylate synthetase activity. *Antiviral Res* *3*, 195-209.
- Brinkmann, M. M., and Schulz, T. F. (2006).** Regulation of intracellular signalling by the terminal membrane proteins of members of the Gammaherpesvirinae. *J Gen Virol* *87*, 1047-1074.
- Brodeur, S. R., Cheng, G., Baltimore, D., and Thorley-Lawson, D. A. (1997).** Localization of the major NF-kappaB-activating site and the sole TRAF3 binding site of LMP-1 defines two distinct signaling motifs. *J Biol Chem* *272*, 19777-19784.
- Bromberg, J. F., Wrzeszczynska, M. H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R. G., Albanese, C., and Darnell, J. E., Jr. (1999).** Stat3 as an oncogene. *Cell* *98*, 295-303.
- Bromley, S. K., Burack, W. R., Johnson, K. G., Somersalo, K., Sims, T. N., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., and Dustin, M. L. (2001).** The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* *19*, 375-396.
- Brown, H. J., Song, M. J., Deng, H., Wu, T. T., Cheng, G., and Sun, R. (2003).** NF-kappaB inhibits gammaherpesvirus lytic replication. *J Virol* *77*, 8532-8540.
- Brown, K. D., Hostager, B. S., and Bishop, G. A. (2002).** Regulation of TRAF2 signaling by self-induced degradation. *J Biol Chem* *277*, 19433-19438.
- Budd, R. C., Yeh, W. C., and Tschopp, J. (2006).** cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nat Rev Immunol* *6*, 196-204.
- Bump, N. J., Hackett, M., Hugunin, M., Seshagiri, S., Brady, K., Chen, P., Ferenz, C., Franklin, S., Ghayur, T., Li, P., and et al. (1995).** Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* *269*, 1885-1888.
- Burkitt, D. (1958).** A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg* *46*, 218-223.
- Burkitt, D. (1962).** Determining the climatic limitations of a children's cancer common in Africa. *Br Med J* *5311*, 1019-1023.
- Busson, P., Ooka, T., and Corbex, M. (2004).** [Nasopharyngeal carcinomas and Epstein-Barr virus: from epidemiology and detection to therapy]. *Med Sci (Paris)* *20*, 453-457.
- Busuttil, V., Bottero, V., Frelin, C., Imbert, V., Ricci, J. E., Auberger, P., and Peyron, J. F. (2002).** Blocking NF-kappaB activation in Jurkat leukemic T cells converts the survival agent and tumor promoter PMA into an apoptotic effector. *Oncogene* *21*, 3213-3224.

- Cahir-McFarland, E. D., Carter, K., Rosenwald, A., Giltane, J. M., Henrickson, S. E., Staudt, L. M., and Kieff, E. (2004).** Role of NF-kappa B in cell survival and transcription of latent membrane protein 1-expressing or Epstein-Barr virus latency III-infected cells. *J Virol* 78, 4108-4119.
- Cahir-McFarland, E. D., Davidson, D. M., Schauer, S. L., Duong, J., and Kieff, E. (2000).** NF-kappa B inhibition causes spontaneous apoptosis in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6055-6060.
- Cahir McFarland, E. D., Izumi, K. M., and Mosialos, G. (1999).** Epstein-barr virus transformation: involvement of latent membrane protein 1-mediated activation of NF-kappaB. *Oncogene* 18, 6959-6964.
- Caldwell, R. G., Brown, R. C., and Longnecker, R. (2000).** Epstein-Barr virus LMP2A-induced B-cell survival in two unique classes of EmuLMP2A transgenic mice. *J Virol* 74, 1101-1113.
- Caldwell, R. G., Wilson, J. B., Anderson, S. J., and Longnecker, R. (1998).** Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* 9, 405-411.
- Callan, M. F., Steven, N., Krausa, P., Wilson, J. D., Moss, P. A., Gillespie, G. M., Bell, J. I., Rickinson, A. B., and McMichael, A. J. (1996).** Large clonal expansions of CD8+ T cells in acute infectious mononucleosis. *Nat Med* 2, 906-911.
- Callan, M. F., Tan, L., Annels, N., Ogg, G. S., Wilson, J. D., O'Callaghan, C. A., Steven, N., McMichael, A. J., and Rickinson, A. B. (1998).** Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus *In vivo*. *J Exp Med* 187, 1395-1402.
- Camerini, D., Walz, G., Loenen, W. A., Borst, J., and Seed, B. (1991).** The T cell activation antigen CD27 is a member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor gene family. *J Immunol* 147, 3165-3169.
- Campbell, K. J., Rocha, S., and Perkins, N. D. (2004).** Active repression of antiapoptotic gene expression by RelA(p65) NF-kappa B. *Mol Cell* 13, 853-865.
- Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T., and Goeddel, D. V. (1996).** TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383, 443-446.
- Cardone, M. H., Salvesen, G. S., Widmann, C., Johnson, G., and Frisch, S. M. (1997).** The regulation of anoikis: MEKK-1 activation requires cleavage by caspases. *Cell* 90, 315-323.
- Carpenter, C. L., and Cantley, L. C. (1996).** Phosphoinositide kinases. *Curr Opin Cell Biol* 8, 153-158.
- Carter, K. L., Cahir-McFarland, E., and Kieff, E. (2002).** Epstein-barr virus-induced changes in B-lymphocyte gene expression. *J Virol* 76, 10427-10436.
- Cerimele, F., Battle, T., Lynch, R., Frank, D. A., Murad, E., Cohen, C., Macaron, N., Sixbey, J., Smith, K., Watnick, R. S., et al. (2005).** Reactive oxygen signaling and MAPK activation distinguish Epstein-Barr Virus (EBV)-positive versus EBV-negative Burkitt's lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 175-179.

- Cermak, L., Simova, S., Pintzas, A., Horejsi, V., and Andera, L. (2002).** Molecular mechanisms involved in CD43-mediated apoptosis of TF-1 cells. Roles of transcription Daxx expression, and adhesion molecules. *J Biol Chem* 277, 7955-7961.
- Cesarman, E. (2002).** Epstein-Barr virus (EBV) and lymphomagenesis. *Front Biosci* 7, e58-65.
- Chan, F. K., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L., and Lenardo, M. J. (2000).** A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288, 2351-2354.
- Chang, H. Y., Nishitoh, H., Yang, X., Ichijo, H., and Baltimore, D. (1998).** Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science* 281, 1860-1863.
- Chang, H. Y., Yang, X., and Baltimore, D. (1999a).** Dissecting Fas signaling with an altered-specificity death-domain mutant: requirement of FADD binding for apoptosis but not Jun N-terminal kinase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1252-1256.
- Chang, Y., Tung, C. H., Huang, Y. T., Lu, J., Chen, J. Y., and Tsai, C. H. (1999b).** Requirement for cell-to-cell contact in Epstein-Barr virus infection of nasopharyngeal carcinoma cells and keratinocytes. *J Virol* 73, 8857-8866.
- Chaudhary, P. M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalter, A., Murray, J., and Hood, L. (1997).** Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* 7, 821-830.
- Chaudhary, P. M., Eby, M. T., Jasmin, A., Kumar, A., Liu, L., and Hood, L. (2000).** Activation of the NF-kappaB pathway by caspase 8 and its homologs. *Oncogene* 19, 4451-4460.
- Chen, H., Hutt-Fletcher, L., Cao, L., and Hayward, S. D. (2003).** A positive autoregulatory loop of LMP1 expression and STAT activation in epithelial cells latently infected with Epstein-Barr virus. *J Virol* 77, 4139-4148.
- Chen, H., Lee, J. M., Wang, Y., Huang, D. P., Ambinder, R. F., and Hayward, S. D. (1999).** The Epstein-Barr virus latency BamHI-Q promoter is positively regulated by STATs and Zta interference with JAK/STAT activation leads to loss of BamHI-Q promoter activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9339-9344.
- Chen, H., Lee, J. M., Zong, Y., Borowitz, M., Ng, M. H., Ambinder, R. F., and Hayward, S. D. (2001).** Linkage between STAT regulation and Epstein-Barr virus gene expression in tumors. *J Virol* 75, 2929-2937.
- Chen, L. Y., and Chen, J. D. (2003).** Daxx silencing sensitizes cells to multiple apoptotic pathways. *Mol Cell Biol* 23, 7108-7121.
- Chen, W., and Cooper, N. R. (1996).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 and latent membrane protein independently transactivate p53 through induction of NF-kappaB activity. *J Virol* 70, 4849-4853.
- Chen, Z. J. (2005).** Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* 7, 758-765.

- Cheng, E. H., Kirsch, D. G., Clem, R. J., Ravi, R., Kastan, M. B., Bedi, A., Ueno, K., and Hardwick, J. M. (1997).** Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278, 1966-1968.
- Cheng, J., Zhou, T., Liu, C., Shapiro, J. P., Brauer, M. J., Kiefer, M. C., Barr, P. J., and Mountz, J. D. (1994).** Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 263, 1759-1762.
- Chlichlia, K., Peter, M. E., Rocha, M., Scaffidi, C., Bucur, M., Krammer, P. H., Schirmacher, V., and Umansky, V. (1998).** Caspase activation is required for nitric oxide-mediated, CD95(APO-1/Fas)-dependent and independent apoptosis in human neoplastic lymphoid cells. *Blood* 91, 4311-4320.
- Chevallier-Greco, A., Manet, E., Chavrier, P., Mosnier, C., Daillie, J., and Sergeant, A. (1986).** Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors, EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter. *Embo J* 5, 3243-3249.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Lane, B. R., and Dixit, V. M. (1997).** Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9: a molecular framework for cell death. *Science* 275, 1122-1126.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V. M. (1995).** FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-512.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Yu, G. L., Lyons, R. H., Garg, M., Duan, D. R., Xing, L., Gentz, R., Ni, J., and Dixit, V. M. (1996).** Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. *Science* 274, 990-992.
- Christensen, T. (2005).** Association of human endogenous retroviruses with multiple sclerosis and possible interactions with herpes viruses. *Rev Med Virol* 15, 179-211.
- Chu, P. G., Chang, K. L., Chen, Y. Y., Chen, W. G., and Weiss, L. M. (2001).** No significant association of Epstein-Barr virus infection with invasive breast carcinoma. *Am J Pathol* 159, 571-578.
- Cikala, M., Wilm, B., Hobmayer, E., Bottger, A., and David, C. N. (1999).** Identification of caspases and apoptosis in the simple metazoan Hydra. *Curr Biol* 9, 959-962.
- Cirone, M., De Maria, R., D'Alessandro, A., Frati, L., Faggioni, A., and Ragona, G. (1995).** Epstein-Barr virus DNA is present both in CD10/CD77 positive and negative subsets of human tonsillar lymphocytes. *Cancer Lett* 89, 125-128.
- Coffin, W. F., 3rd, Erickson, K. D., Hoedt-Miller, M., and Martin, J. M. (2001).** The cytoplasmic amino-terminus of the Latent Membrane Protein-1 of Epstein-Barr Virus: relationship between transmembrane orientation and effector functions of the carboxy-terminus and transmembrane domain. *Oncogene* 20, 5313-5330.
- Conradt, B., and Horvitz, H. R. (1998).** The *C. elegans* protein EGL-1 is required for programmed cell death and interacts with the Bcl-2-like protein CED-9. *Cell* 93, 519-529.

Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Zimmer, U., Rousselet, G., Pavlish, O., Banchereau, J., Tursz, T., Bornkamm, G., and Lenoir, G. M. (1990). Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23. *J Virol* 64, 1002-1013.

Cory, S., Huang, D. C., and Adams, J. M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590-8607.

Couzinet, A., Hérincs, Z., Hueber, AO. (2002). Régulation de la mort cellulaire programmée: vers une conception plus dynamique. *MEDECINE/SCIENCES* 18, 841-852.

Cremersti, A., Paris, F., Grassme, H., Holler, N., Tschopp, J., Fuks, Z., Gulbins, E., and Kolesnick, R. (2001). Ceramide enables fas to cap and kill. *J Biol Chem* 276, 23954-23961.

Crompton, M. (2000). Bax, Bid and the permeabilization of the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 12, 414-419.

Crook, N. E., Clem, R. J., and Miller, L. K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* 67, 2168-2174.

Curtin, J. F., and Cotter, T. G. (2003). Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal* 15, 983-992.

D'Souza, B. N., Edelstein, L. C., Pegman, P. M., Smith, S. M., Loughran, S. T., Clarke, A., Mehl, A., Rowe, M., Gelinis, C., and Walls, D. (2004). Nuclear factor kappa B-dependent activation of the antiapoptotic bfl-1 gene by the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and activated CD40 receptor. *J Virol* 78, 1800-1816.

Danial, N. N., Gramm, C. F., Scorrano, L., Zhang, C. Y., Krauss, S., Ranger, A. M., Datta, S. R., Greenberg, M. E., Licklider, L. J., Lowell, B. B., *et al.* (2003). BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* 424, 952-956.

Danial, N. N., and Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.

Danial, N. N., Pernis, A., and Rothman, P. B. (1995). Jak-STAT signaling induced by the v-abl oncogene. *Science* 269, 1875-1877.

Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M. E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.

Davenport, M. G., and Pagano, J. S. (1999). Expression of EBNA-1 mRNA is regulated by cell cycle during Epstein-Barr virus type I latency. *J Virol* 73, 3154-3161.

Davis, R. J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-252.

Dawson, C. W., Rickinson, A. B., and Young, L. S. (1990). Epstein-Barr virus latent membrane protein inhibits human epithelial cell differentiation. *Nature* 344, 777-780.

Dawson, C. W., Tramountanis, G., Eliopoulos, A. G., and Young, L. S. (2003). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. *J Biol Chem* 278, 3694-3704.

- de Thonel, A., Bettaieb, A., Jean, C., Laurent, G., and Quillet-Mary, A. (2001).** Role of protein kinase C zeta isoform in Fas resistance of immature myeloid KG1a leukemic cells. *Blood* 98, 3770-3777.
- Deak, J. C., Cross, J. V., Lewis, M., Qian, Y., Parrott, L. A., Distelhorst, C. W., and Templeton, D. J. (1998).** Fas-induced proteolytic activation and intracellular redistribution of the stress-signaling kinase MEKK1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5595-5600.
- Decker, T., Muller, M., and Stockinger, S. (2005).** The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat Rev Immunol* 5, 675-687.
- Degterev, A., Boyce, M., and Yuan, J. (2003).** A decade of caspases. *Oncogene* 22, 8543-8567.
- Delecluse, H. J., Bartnizke, S., Hammerschmidt, W., Bullerdiek, J., and Bornkamm, G. W. (1993).** Episomal and integrated copies of Epstein-Barr virus coexist in Burkitt lymphoma cell lines. *J Virol* 67, 1292-1299.
- Delmas, D., Rebe, C., Lacour, S., Filomenko, R., Athias, A., Gambert, P., Cherkaoui-Malki, M., Jannin, B., Dubrez-Daloz, L., Latruffe, N., and Solary, E. (2003).** Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells. *J Biol Chem* 278, 41482-41490.
- Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., and Chen, Z. J. (2000).** Activation of the IkappaB kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103, 351-361.
- Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1998).** IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J* 17, 2215-2223.
- Devergne, O., Cahir McFarland, E. D., Mosialos, G., Izumi, K. M., Ware, C. F., and Kieff, E. (1998).** Role of the TRAF binding site and NF-kappaB activation in Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-induced cell gene expression. *J Virol* 72, 7900-7908.
- Devergne, O., Hatzivassiliou, E., Izumi, K. M., Kaye, K. M., Kleijnen, M. F., Kieff, E., and Mosialos, G. (1996).** Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 16, 7098-7108.
- Dimanche-Boitrel, M. T., Meurette, O., Rebillard, A., and Lacour, S. (2005).** Role of early plasma membrane events in chemotherapy-induced cell death. *Drug Resist Updat* 8, 5-14.
- Dirmeier, U., Hoffmann, R., Kilger, E., Schultheiss, U., Briseno, C., Gires, O., Kieser, A., Eick, D., Sugden, B., and Hammerschmidt, W. (2005).** Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus coordinately regulates proliferation with control of apoptosis. *Oncogene* 24, 1711-1717.
- Dirmeier, U., Neuhierl, B., Kilger, E., Reisbach, G., Sandberg, M. L., and Hammerschmidt, W. (2003).** Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by Epstein-Barr virus. *Cancer Res* 63, 2982-2989.

- Dolcetti, R., and Masucci, M. G. (2003).** Epstein-Barr virus: induction and control of cell transformation. *J Cell Physiol* *196*, 207-218.
- Droin, N. M., and Green, D. R. (2004).** Role of Bcl-2 family members in immunity and disease. *Biochim Biophys Acta* *1644*, 179-188.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000).** Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* *102*, 33-42.
- Duckett, C. S., Nava, V. E., Gedrich, R. W., Clem, R. J., Van Dongen, J. L., Gilfillan, M. C., Shiels, H., Hardwick, J. M., and Thompson, C. B. (1996).** A conserved family of cellular genes related to the baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *Embo J* *15*, 2685-2694.
- Durandy, A., Le Deist, F., Emile, J. F., Debatin, K., and Fischer, A. (1997).** Sensitivity of Epstein-Barr virus-induced B cell tumor to apoptosis mediated by anti-CD95/Apo-1/fas antibody. *Eur J Immunol* *27*, 538-543.
- Durbin, J. E., Hackenmiller, R., Simon, M. C., and Levy, D. E. (1996).** Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell* *84*, 443-450.
- Durkop, H., Latza, U., Hummel, M., Eitelbach, F., Seed, B., and Stein, H. (1992).** Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor receptor family that is characteristic for Hodgkin's disease. *Cell* *68*, 421-427.
- Dutton, A., Young, L. S., and Murray, P. G. (2006).** The role of cellular FLICE inhibitory protein (c-FLIP) in the pathogenesis and treatment of cancer. *Expert Opin Ther Targets* *10*, 27-35.
- Duvall, E., Wyllie, A. H., and Morris, R. G. (1985).** Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology* *56*, 351-358.
- Dykstra, M. L., Longnecker, R., and Pierce, S. K. (2001).** Epstein-Barr virus coopts lipid rafts to block the signaling and antigen transport functions of the BCR. *Immunity* *14*, 57-67.
- Eischen, C. M., Dick, C. J., and Leibson, P. J. (1994).** Tyrosine kinase activation provides an early and requisite signal for Fas-induced apoptosis. *J Immunol* *153*, 1947-1954.
- Eliopoulos, A. G., Blake, S. M., Floettmann, J. E., Rowe, M., and Young, L. S. (1999a).** Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 activates the JNK pathway through its extreme C terminus via a mechanism involving TRADD and TRAF2. *J Virol* *73*, 1023-1035.
- Eliopoulos, A. G., Davies, C., Blake, S. S., Murray, P., Najafipour, S., Tschlis, P. N., and Young, L. S. (2002a).** The oncogenic protein kinase Tpl-2/Cot contributes to Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1-induced NF-kappaB signaling downstream of TRAF2. *J Virol* *76*, 4567-4579.
- Eliopoulos, A. G., Dawson, C. W., Mosialos, G., Floettmann, J. E., Rowe, M., Armitage, R. J., Dawson, J., Zapata, J. M., Kerr, D. J., Wakelam, M. J., *et al.* (1996).** CD40-induced growth inhibition in epithelial cells is mimicked by Epstein-Barr Virus-encoded LMP1: involvement of TRAF3 as a common mediator. *Oncogene* *13*, 2243-2254.

Eliopoulos, A. G., Dumitru, C. D., Wang, C. C., Cho, J., and Tschlis, P. N. (2002b). Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals. *Embo J* 21, 4831-4840.

Eliopoulos, A. G., Gallagher, N. J., Blake, S. M., Dawson, C. W., and Young, L. S. (1999b). Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J Biol Chem* 274, 16085-16096.

Eliopoulos, A. G., Stack, M., Dawson, C. W., Kaye, K. M., Hodgkin, L., Sihota, S., Rowe, M., and Young, L. S. (1997). Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF-kappaB pathway involving TNF receptor-associated factors. *Oncogene* 14, 2899-2916.

Eliopoulos, A. G., Waites, E. R., Blake, S. M., Davies, C., Murray, P., and Young, L. S. (2003). TRAF1 is a critical regulator of JNK signaling by the TRAF-binding domain of the Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1 but not CD40. *J Virol* 77, 1316-1328.

Eliopoulos, A. G., and Young, L. S. (1998). Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *Oncogene* 16, 1731-1742.

Eliopoulos, A. G., and Young, L. S. (2001). LMP1 structure and signal transduction. *Semin Cancer Biol* 11, 435-444.

Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 44, 817-829.

Enari, M., Hug, H., and Nagata, S. (1995). Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature* 375, 78-81.

Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.

Epstein, M. A., Achong, B. G., and Barr, Y. M. (1964). Virus Particles In Cultured Lymphoblasts From Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 15, 702-703.

Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., and Martinou, J. C. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol* 20, 929-935.

Everly, D. N., Jr., Mainou, B. A., and Raab-Traub, N. (2004). Induction of Id1 and Id3 by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus and regulation of p27/Kip and cyclin-dependent kinase 2 in rodent fibroblast transformation. *J Virol* 78, 13470-13478.

Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekewitz, R. A., and Henson, P. M. (2000). A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405, 85-90.

Fagard, R., Mouas, H., Dusanter-Fourt, I., Devillers, C., Bissieres, P., Martin, A., Lenoir, G., VanTan, H., Feuillard, J., and Raphael, M. (2002). Resistance to fludarabine-induced apoptosis in Epstein-Barr virus infected B cells. *Oncogene* 21, 4473-4480.

- Fahraeus, R., Jansson, A., Ricksten, A., Sjoblom, A., and Rymo, L. (1990).** Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 2 activates the viral latent membrane protein promoter by modulating the activity of a negative regulatory element. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7390-7394.
- Fahraeus, R., Jansson, A., Sjoblom, A., Nilsson, T., Klein, G., and Rymo, L. (1993).** Cell phenotype-dependent control of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 gene regulatory sequences. *Virology* 195, 71-80.
- Fais, S., De Milito, A., and Lozupone, F. (2005).** The role of FAS to ezrin association in FAS-mediated apoptosis. *Apoptosis* 10, 941-947.
- Falk, K., Gratama, J. W., Rowe, M., Zou, J. Z., Khanim, F., Young, L. S., Oosterveer, M. A., and Ernberg, I. (1995a).** The role of repetitive DNA sequences in the size variation of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigens, and the identification of different EBV isolates using RFLP and PCR analysis. *J Gen Virol* 76 (Pt 4), 779-790.
- Falk, K., Linde, A., Johnson, D., Lennette, E., Ernberg, I., and Lundkvist, A. (1995b).** Synthetic peptides deduced from the amino acid sequence of Epstein-Barr virus nuclear antigen 6 (EBNA 6): antigenic properties, production of monoreactive reagents, and analysis of antibody responses in man. *J Med Virol* 46, 349-357.
- Falk, M. H., Trauth, B. C., Debatin, K. M., Klas, C., Gregory, C. D., Rickinson, A. B., Calender, A., Lenoir, G. M., Ellwart, J. W., Krammer, P. H., and et al. (1992).** Expression of the APO-1 antigen in Burkitt lymphoma cell lines correlates with a shift towards a lymphoblastoid phenotype. *Blood* 79, 3300-3306.
- Faqing, T., Zhi, H., Liqun, Y., Min, T., Huanhua, G., Xiyun, D., and Ya, C. (2005).** Epstein-Barr virus LMP1 initiates cell proliferation and apoptosis inhibition via regulating expression of Survivin in nasopharyngeal carcinoma. *Exp Oncol* 27, 96-101.
- Farrell, P. J. (2002).** Tumour viruses--could they be an Achilles' heel of cancer? *Eur J Cancer* 38, 1815-1816.
- Faulkner, G. C., Krajewski, A. S., and Crawford, D. H. (2000).** The ins and outs of EBV infection. *Trends Microbiol* 8, 185-189.
- Fennewald, S., van Santen, V., and Kieff, E. (1984).** Nucleotide sequence of an mRNA transcribed in latent growth-transforming virus infection indicates that it may encode a membrane protein. *J Virol* 51, 411-419.
- Ferri, K. F., and Kroemer, G. (2000).** Control of apoptotic DNA degradation. *Nat Cell Biol* 2, E63-64.
- Feuillard, J., Memet, S., Goudeau, B., Lilienbaum, A., Schmidt-Ullrich, R., Raphael, M., and Israel, A. (2000a).** In vivo identification of lymphocyte subsets exhibiting transcriptionally active NF-kappaB/Rel complexes. *Int Immunol* 12, 613-621.

- Feuillard, J., Schuhmacher, M., Kohanna, S., Asso-Bonnet, M., Ledeur, F., Joubert-Caron, R., Bissieres, P., Polack, A., Bornkamm, G. W., and Raphael, M. (2000b).** Inducible loss of NF-kappaB activity is associated with apoptosis and Bcl-2 down-regulation in Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes. *Blood* 95, 2068-2075.
- Fingerroth, J. D., Weis, J. J., Tedder, T. F., Strominger, J. L., Biro, P. A., and Fearon, D. T. (1984).** Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 4510-4514.
- Fisher, G. H., Rosenberg, F. J., Straus, S. E., Dale, J. K., Middleton, L. A., Lin, A. Y., Strober, W., Lenardo, M. J., and Puck, J. M. (1995).** Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell* 81, 935-946.
- Floettmann, J. E., and Rowe, M. (1997).** Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) C-terminus activation region 2 (CTAR2) maps to the far C-terminus and requires oligomerisation for NF-kappaB activation. *Oncogene* 15, 1851-1858.
- Foehr, E. D., Lorente, G., Vincent, V., Nikolich, K., and Urfer, R. (2005).** FAS associated phosphatase (FAP-1) blocks apoptosis of astrocytomas through dephosphorylation of FAS. *J Neurooncol* 74, 241-248.
- Forcet, C., Ye, X., Granger, L., Corset, V., Shin, H., Bredesen, D. E., and Mehlen, P. (2001).** The dependence receptor DCC (deleted in colorectal cancer) defines an alternative mechanism for caspase activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3416-3421.
- Freiberg, R. A., Spencer, D. M., Choate, K. A., Duh, H. J., Schreiber, S. L., Crabtree, G. R., and Khavari, P. A. (1997).** Fas signal transduction triggers either proliferation or apoptosis in human fibroblasts. *J Invest Dermatol* 108, 215-219.
- Fries, K. L., Miller, W. E., and Raab-Traub, N. (1996).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 blocks p53-mediated apoptosis through the induction of the A20 gene. *J Virol* 70, 8653-8659.
- Fries, K. L., Miller, W. E., and Raab-Traub, N. (1999).** The A20 protein interacts with the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) and alters the LMP1/TRAF1/TRADD complex. *Virology* 264, 159-166.
- Friesen, C., Herr, I., Krammer, P. H., and Debatin, K. M. (1996).** Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med* 2, 574-577.
- Froelich, C. J., Dixit, V. M., and Yang, X. (1998).** Lymphocyte granule-mediated apoptosis: matters of viral mimicry and deadly proteases. *Immunol Today* 19, 30-36.
- Fruehling, S., Swart, R., Dolwick, K. M., Kremmer, E., and Longnecker, R. (1998).** Tyrosine 112 of latent membrane protein 2A is essential for protein tyrosine kinase loading and regulation of Epstein-Barr virus latency. *J Virol* 72, 7796-7806.
- Fuentes-Panana, E. M., Peng, R., Brewer, G., Tan, J., and Ling, P. D. (2000).** Regulation of the Epstein-Barr virus C promoter by AUF1 and the cyclic AMP/protein kinase A signaling pathway. *J Virol* 74, 8166-8175.

Fujiwara, S., and Ono, Y. (1995). Isolation of Epstein-Barr virus-infected clones of the human T-cell line MT-2: use of recombinant viruses with a positive selection marker. *J Virol* 69, 3900-3903.

Fukazawa, T., Fujiwara, T., Uno, F., Teraishi, F., Kadowaki, Y., Itoshima, T., Takata, Y., Kagawa, S., Roth, J. A., Tschopp, J., and Tanaka, N. (2001). Accelerated degradation of cellular FLIP protein through the ubiquitin-proteasome pathway in p53-mediated apoptosis of human cancer cells. *Oncogene* 20, 5225-5231.

Fukuda, M., Kurosaki, W., Yanagihara, K., Kuratsune, H., and Sairenji, T. (2002). A mechanism in Epstein-Barr virus oncogenesis: inhibition of transforming growth factor-beta 1-mediated induction of MAPK/p21 by LMP1. *Virology* 302, 310-320.

Fukuda, M., and Longnecker, R. (2005). Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 2A regulates B-cell receptor-induced apoptosis and EBV reactivation through tyrosine phosphorylation. *J Virol* 79, 8655-8660.

Fulda, S., Scaffidi, C., Pietsch, T., Krammer, P. H., Peter, M. E., and Debatin, K. M. (1998). Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells. *Cell Death Differ* 5, 884-893.

Fulda, S., Sieverts, H., Friesen, C., Herr, I., and Debatin, K. M. (1997). The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 57, 3823-3829.

Gajate, C., Del Canto-Janez, E., Acuna, A. U., Amat-Guerri, F., Geijo, E., Santos-Beneit, A. M., Veldman, R. J., and Mollinedo, F. (2004). Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. *J Exp Med* 200, 353-365.

Gajate, C., Fonteriz, R. I., Cabaner, C., Alvarez-Noves, G., Alvarez-Rodriguez, Y., Modolell, M., and Mollinedo, F. (2000a). Intracellular triggering of Fas, independently of FasL, as a new mechanism of antitumor ether lipid-induced apoptosis. *Int J Cancer* 85, 674-682.

Gajate, C., and Mollinedo, F. (2001). The antitumor ether lipid ET-18-OCH(3) induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. *Blood* 98, 3860-3863.

Gajate, C., and Mollinedo, F. (2005). Cytoskeleton-mediated death receptor and ligand concentration in lipid rafts forms apoptosis-promoting clusters in cancer chemotherapy. *J Biol Chem* 280, 11641-11647.

Gajate, C., Santos-Beneit, A. M., Macho, A., Lazaro, M., Hernandez-De Rojas, A., Modolell, M., Munoz, E., and Mollinedo, F. (2000b). Involvement of mitochondria and caspase-3 in ET-18-OCH(3)-induced apoptosis of human leukemic cells. *Int J Cancer* 86, 208-218.

Gamen, S., Anel, A., Lasierra, P., Alava, M. A., Martinez-Lorenzo, M. J., Pineiro, A., and Naval, J. (1997). Doxorubicin-induced apoptosis in human T-cell leukemia is mediated by caspase-3 activation in a Fas-independent way. *FEBS Lett* 417, 360-364.

Garcia-Calvo, M., Peterson, E. P., Leiting, B., Ruel, R., Nicholson, D. W., and Thornberry, N. A. (1998). Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem* 273, 32608-32613.

- Garcia, J. F., Camacho, F. I., Morente, M., Fraga, M., Montalban, C., Alvaro, T., Bellas, C., Castano, A., Diez, A., Flores, T., et al. (2003).** Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. *Blood* 101, 681-689.
- Garcia, Z., Kumar, A., Marques, M., Cortes, I., and Carrera, A. C. (2006).** Phosphoinositide 3-kinase controls early and late events in mammalian cell division. *Embo J* 25, 655-661.
- Garvey, T. L., Bertin, J., Siegel, R. M., Wang, G. H., Lenardo, M. J., and Cohen, J. I. (2002).** Binding of FADD and caspase-8 to molluscum contagiosum virus MC159 v-FLIP is not sufficient for its antiapoptotic function. *J Virol* 76, 697-706.
- Ghosh, S., and Karin, M. (2002).** Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl, S81-96.
- Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M., and Hammerschmidt, W. (1999).** Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *Embo J* 18, 3064-3073.
- Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D., and Hammerschmidt, W. (1997).** Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *Embo J* 16, 6131-6140.
- Golks, A., Brenner, D., Krammer, P. H., and Lavrik, I. N. (2006).** The c-FLIP-NH2 terminus (p22-FLIP) induces NF-kappaB activation. *J Exp Med* 203, 1295-1305.
- Golstein, P., Marguet, D., and Depraetere, V. (1995).** Homology between reaper and the cell death domains of Fas and TNFR1. *Cell* 81, 185-186.
- Gomez-Angelats, M., Bortner, C. D., and Cidlowski, J. A. (2000).** Protein kinase C (PKC) inhibits fas receptor-induced apoptosis through modulation of the loss of K⁺ and cell shrinkage. A role for PKC upstream of caspases. *J Biol Chem* 275, 19609-19619.
- Gomez-Angelats, M., and Cidlowski, J. A. (2001).** Protein kinase C regulates FADD recruitment and death-inducing signaling complex formation in Fas/CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 276, 44944-44952.
- Gonzalez-Garcia, M., Garcia, I., Ding, L., O'Shea, S., Boise, L. H., Thompson, C. B., and Nunez, G. (1995).** bcl-x is expressed in embryonic and postnatal neural tissues and functions to prevent neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4304-4308.
- Goormachtigh, G., Ouk, T. S., Mougel, A., Tranchand-Bunel, D., Masy, E., Le Clorennec, C., Feuillard, J., Bornkamm, G. W., Auriault, C., Manet, E., et al. (2006).** Autoactivation of the Epstein-Barr virus oncogenic protein LMP1 during type II latency through opposite roles of the NF-kappaB and JNK signaling pathways. *J Virol* 80, 7382-7393.
- Gordadze, A. V., Onunwor, C. W., Peng, R., Poston, D., Kremmer, E., and Ling, P. D. (2004).** EBNA2 amino acids 3 to 30 are required for induction of LMP-1 and immortalization maintenance. *J Virol* 78, 3919-3929.

Gordadze, A. V., Peng, R., Tan, J., Liu, G., Sutton, R., Kempkes, B., Bornkamm, G. W., and Ling, P. D. (2001). Notch1IC partially replaces EBNA2 function in B cells immortalized by Epstein-Barr virus. *J Virol* 75, 5899-5912.

Gosselin, J., and Borgeat, P. (1997). Epstein-Barr virus modulates 5-lipoxygenase product synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 89, 2122-2130.

Gosselin, J., Flamand, L., D'Addario, M., Hiscott, J., and Menezes, J. (1992). Infection of peripheral blood mononuclear cells by herpes simplex and Epstein-Barr viruses. Differential induction of interleukin 6 and tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest* 89, 1849-1856.

Gouilleux-Gruart, V., Gouilleux, F., Desaint, C., Claisse, J. F., Capiod, J. C., Delobel, J., Weber-Nordt, R., Dusanter-Fourt, I., Dreyfus, F., Groner, B., and Prin, L. (1996). STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients. *Blood* 87, 1692-1697.

Grassme, H., Cremesti, A., Kolesnick, R., and Gulbins, E. (2003). Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation. *Oncogene* 22, 5457-5470.

Grassme, H., Jekle, A., Riehle, A., Schwarz, H., Berger, J., Sandhoff, K., Kolesnick, R., and Gulbins, E. (2001). CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 276, 20589-20596.

Gregory, C. D., Dive, C., Henderson, S., Smith, C. A., Williams, G. T., Gordon, J., and Rickinson, A. B. (1991). Activation of Epstein-Barr virus latent genes protects human B cells from death by apoptosis. *Nature* 349, 612-614.

Gregory, C. D., Rowe, M., and Rickinson, A. B. (1990). Different Epstein-Barr virus-B cell interactions in phenotypically distinct clones of a Burkitt's lymphoma cell line. *J Gen Virol* 71 (Pt 7), 1481-1495.

Grimm, T., Schneider, S., Naschberger, E., Huber, J., Guenzi, E., Kieser, A., Reitmeir, P., Schulz, T. F., Morris, C. A., and Sturzl, M. (2005). EBV latent membrane protein-1 protects B cells from apoptosis by inhibition of BAX. *Blood* 105, 3263-3269.

Grinstein, S., Preciado, M. V., Gattuso, P., Chabay, P. A., Warren, W. H., De Matteo, E., and Gould, V. E. (2002). Demonstration of Epstein-Barr virus in carcinomas of various sites. *Cancer Res* 62, 4876-4878.

Grossman, S. R., Johannsen, E., Tong, X., Yalamanchili, R., and Kieff, E. (1994). The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivator is directed to response elements by the J kappa recombination signal binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7568-7572.

Groux, H., Cottrez, F., Montpellier, C., Quatannens, B., Coll, J., Stehelin, D., and Auriault, C. (1997). Isolation and characterization of transformed human T-cell lines infected by Epstein-Barr virus. *Blood* 89, 4521-4530.

Grozinger, C. M., and Schreiber, S. L. (2002). Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chem Biol* 9, 3-16.

Gulbins, E., and Grassme, H. (2002). Ceramide and cell death receptor clustering. *Biochim Biophys Acta* 1585, 139-145.

- Gutierrez, M. I., Cherney, B., Hussain, A., Mostowski, H., Tosato, G., Magrath, I., and Bhatia, K. (1999).** Bax is frequently compromised in Burkitt's lymphomas with irreversible resistance to Fas-induced apoptosis. *Cancer Res* 59, 696-703.
- Ha, Y. J., and Lee, J. R. (2004).** Role of TNF receptor-associated factor 3 in the CD40 signaling by production of reactive oxygen species through association with p40phox, a cytosolic subunit of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *J Immunol* 172, 231-239.
- Haan, K. M., Kwok, W. W., Longnecker, R., and Speck, P. (2000).** Epstein-Barr virus entry utilizing HLA-DP or HLA-DQ as a coreceptor. *J Virol* 74, 2451-2454.
- Hammarskjold, M. L., and Simurda, M. C. (1992).** Epstein-Barr virus latent membrane protein transactivates the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat through induction of NF-kappa B activity. *J Virol* 66, 6496-6501.
- Hammerschmidt, W., and Sugden, B. (1989).** Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature* 340, 393-397.
- Han, D. K., Chaudhary, P. M., Wright, M. E., Friedman, C., Trask, B. J., Riedel, R. T., Baskin, D. G., Schwartz, S. M., and Hood, L. (1997).** MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11333-11338.
- Han, I., Harada, S., Weaver, D., Xue, Y., Lane, W., Orstavik, S., Skalhegg, B., and Kieff, E. (2001).** EBNA-LP associates with cellular proteins including DNA-PK and HA95. *J Virol* 75, 2475-2481.
- Han, I., Xue, Y., Harada, S., Orstavik, S., Skalhegg, B., and Kieff, E. (2002).** Protein kinase A associates with HA95 and affects transcriptional coactivation by Epstein-Barr virus nuclear proteins. *Mol Cell Biol* 22, 2136-2146.
- Harada, S., and Kieff, E. (1997).** Epstein-Barr virus nuclear protein LP stimulates EBNA-2 acidic domain-mediated transcriptional activation. *J Virol* 71, 6611-6618.
- Harder, T., and Simons, K. (1999).** Clusters of glycolipid and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in lymphoid cells: accumulation of actin regulated by local tyrosine phosphorylation. *Eur J Immunol* 29, 556-562.
- Hatzivassiliou, E., Miller, W. E., Raab-Traub, N., Kieff, E., and Mosialos, G. (1998).** A fusion of the EBV latent membrane protein-1 (LMP1) transmembrane domains to the CD40 cytoplasmic domain is similar to LMP1 in constitutive activation of epidermal growth factor receptor expression, nuclear factor-kappa B, and stress-activated protein kinase. *J Immunol* 160, 1116-1121.
- Hauser, H. P., Bardroff, M., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (1998).** A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *J Cell Biol* 141, 1415-1422.
- He, K. L., and Ting, A. T. (2002).** A20 inhibits tumor necrosis factor (TNF) alpha-induced apoptosis by disrupting recruitment of TRADD and RIP to the TNF receptor 1 complex in Jurkat T cells. *Mol Cell Biol* 22, 6034-6045.

- He, Z., Xin, B., Yang, X., Chan, C., and Cao, L. (2000).** Nuclear factor-kappaB activation is involved in LMP1-mediated transformation and tumorigenesis of rat-1 fibroblasts. *Cancer Res* *60*, 1845-1848.
- Hebner, C., Lasanen, J., Battle, S., and Aiyar, A. (2003).** The spacing between adjacent binding sites in the family of repeats affects the functions of Epstein-Barr nuclear antigen 1 in transcription activation and stable plasmid maintenance. *Virology* *311*, 263-274.
- Henderson, S., Rowe, M., Gregory, C., Croom-Carter, D., Wang, F., Longnecker, R., Kieff, E., and Rickinson, A. (1991).** Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* *65*, 1107-1115.
- Hengartner, M. O. (2000).** The biochemistry of apoptosis. *Nature* *407*, 770-776.
- Hengartner, M. O., and Horvitz, H. R. (1994).** Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Opin Genet Dev* *4*, 581-586.
- Henle, G., and Henle, W. (1966).** Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J Bacteriol* *91*, 1248-1256.
- Henle, G., Henle, W., Clifford, P., Diehl, V., Kafuko, G. W., Kirya, B. G., Klein, G., Morrow, R. H., Munube, G. M., Pike, P., et al. (1969).** Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups. *J Natl Cancer Inst* *43*, 1147-1157.
- Henle, G., Henle, W., and Diehl, V. (1968).** Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *59*, 94-101.
- Henle, W., Diehl, V., Kohn, G., Zur Hausen, H., and Henle, G. (1967).** Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. *Science* *157*, 1064-1065.
- Henle, W., and Henle, G. (1970).** Evidence for a relation of Epstein-Barr virus to Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Bibl Haematol*, 706-713.
- Hennino, A., Berard, M., Krammer, P. H., and Defrance, T. (2001).** FLICE-inhibitory protein is a key regulator of germinal center B cell apoptosis. *J Exp Med* *193*, 447-458.
- Henriquez, N. V., Floettmann, E., Salmon, M., Rowe, M., and Rickinson, A. B. (1999).** Differential responses to CD40 ligation among Burkitt lymphoma lines that are uniformly responsive to Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *J Immunol* *162*, 3298-3307.
- Herrant, M., Luciano, F., Loubat, A., and Auberger, P. (2002).** The protective effect of phorbol esters on Fas-mediated apoptosis in T cells. Transcriptional and postranscriptional regulation. *Oncogene* *21*, 4957-4968.
- Herrero, J. A., Mathew, P., and Paya, C. V. (1995).** LMP-1 activates NF-kappa B by targeting the inhibitory molecule I kappa B alpha. *J Virol* *69*, 2168-2174.
- Heyninck, K., and Beyaert, R. (2005).** A20 inhibits NF-kappaB activation by dual ubiquitin-editing functions. *Trends Biochem Sci* *30*, 1-4.

- Higuchi, M., Izumi, K. M., and Kieff, E. (2001).** Epstein-Barr virus latent-infection membrane proteins are palmitoylated and raft-associated: protein 1 binds to the cytoskeleton through TNF receptor cytoplasmic factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4675-4680.
- Higuchi, M., Kieff, E., and Izumi, K. M. (2002).** The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 putative Janus kinase 3 (JAK3) binding domain does not mediate JAK3 association or activation in B-lymphoma or lymphoblastoid cell lines. *J Virol* 76, 455-459.
- Hill, M. M., Adrain, C., and Martin, S. J. (2003).** Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows. *Mol Interv* 3, 19-26.
- Hislop, A. D., Annels, N. E., Gudgeon, N. H., Leese, A. M., and Rickinson, A. B. (2002).** Epitope-specific evolution of human CD8(+) T cell responses from primary to persistent phases of Epstein-Barr virus infection. *J Exp Med* 195, 893-905.
- Hochberg, D., Middeldorp, J. M., Catalina, M., Sullivan, J. L., Luzuriaga, K., and Thorley-Lawson, D. A. (2004).** Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 239-244.
- Hofelmayer, H., Strobl, L. J., Marschall, G., Bornkamm, G. W., and Zimmer-Strobl, U. (2001).** Activated Notch1 can transiently substitute for EBNA2 in the maintenance of proliferation of LMP1-expressing immortalized B cells. *J Virol* 75, 2033-2040.
- Holmgren, L., Szeles, A., Rajnavolgyi, E., Folkman, J., Klein, G., Ernberg, I., and Falk, K. I. (1999).** Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood* 93, 3956-3963.
- Hong, M., Murai, Y., Kutsuna, T., Takahashi, H., Nomoto, K., Cheng, C. M., Ishizawa, S., Zhao, Q. L., Ogawa, R., Harmon, B. V., et al. (2006).** Suppression of Epstein-Barr nuclear antigen 1 (EBNA1) by RNA interference inhibits proliferation of EBV-positive Burkitt's lymphoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 132, 1-8.
- Hong, S. Y., Yoon, W. H., Park, J. H., Kang, S. G., Ahn, J. H., and Lee, T. H. (2000).** Involvement of two NF-kappa B binding elements in tumor necrosis factor alpha -, CD40-, and Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-mediated induction of the cellular inhibitor of apoptosis protein 2 gene. *J Biol Chem* 275, 18022-18028.
- Horikawa, T., Sheen, T. S., Takeshita, H., Sato, H., Furukawa, M., and Yoshizaki, T. (2001).** Induction of c-Met proto-oncogene by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 and the correlation with cervical lymph node metastasis of nasopharyngeal carcinoma. *Am J Pathol* 159, 27-33.
- Hsu, H., Shu, H. B., Pan, M. G., and Goeddel, D. V. (1996).** TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* 84, 299-308.
- Hsu, S. Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., and Hsueh, A. J. (1997).** Bcl-2 is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12401-12406.

- Hu, L. F., Zabarovsky, E. R., Chen, F., Cao, S. L., Ernberg, I., Klein, G., and Winberg, G. (1991).** Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol* 72 (*Pt 10*), 2399-2409.
- Hu, S., Vincenz, C., Ni, J., Gentz, R., and Dixit, V. M. (1997).** I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272, 17255-17257.
- Hu, W. H., Johnson, H., and Shu, H. B. (2000).** Activation of NF-kappaB by FADD, Casper, and caspase-8. *J Biol Chem* 275, 10838-10844.
- Hu, Y., Benedict, M. A., Ding, L., and Nunez, G. (1999).** Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *Embo J* 18, 3586-3595.
- Hu, Y., Benedict, M. A., Wu, D., Inohara, N., and Nunez, G. (1998).** Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 4386-4391.
- Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., and Fesik, S. W. (1996).** NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature* 384, 638-641.
- Huang, H. L., Fang, L. W., Lu, S. P., Chou, C. K., Luh, T. Y., and Lai, M. Z. (2003).** DNA-damaging reagents induce apoptosis through reactive oxygen species-dependent Fas aggregation. *Oncogene* 22, 8168-8177.
- Hudson, G. S., Farrell, P. J., and Barrell, B. G. (1985).** Two related but differentially expressed potential membrane proteins encoded by the EcoRI Dhet region of Epstein-Barr virus B95-8. *J Virol* 53, 528-535.
- Huen, D. S., Henderson, S. A., Croom-Carter, D., and Rowe, M. (1995).** The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene* 10, 549-560.
- Hurley, E. A., Agger, S., McNeil, J. A., Lawrence, J. B., Calendar, A., Lenoir, G., and Thorley-Lawson, D. A. (1991).** When Epstein-Barr virus persistently infects B-cell lines, it frequently integrates. *J Virol* 65, 1245-1254.
- Ikeda, A., Caldwell, R. G., Longnecker, R., and Ikeda, M. (2003).** Itchy, a Nedd4 ubiquitin ligase, downregulates latent membrane protein 2A activity in B-cell signaling. *J Virol* 77, 5529-5534.
- Ikeda, M., Ikeda, A., Longan, L. C., and Longnecker, R. (2000).** The Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A PY motif recruits WW domain-containing ubiquitin-protein ligases. *Virology* 268, 178-191.
- Ikeda, M., Ikeda, A., and Longnecker, R. (2001).** PY motifs of Epstein-Barr virus LMP2A regulate protein stability and phosphorylation of LMP2A-associated proteins. *J Virol* 75, 5711-5718.
- Ikeda, M., Ikeda, A., and Longnecker, R. (2002).** Lysine-independent ubiquitination of Epstein-Barr virus LMP2A. *Virology* 300, 153-159.

- Imadome, K., Shirakata, M., Shimizu, N., Nonoyama, S., and Yamanashi, Y. (2003).** CD40 ligand is a critical effector of Epstein-Barr virus in host cell survival and transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 7836-7840.
- Imai, Y., Kimura, T., Murakami, A., Yajima, N., Sakamaki, K., and Yonehara, S. (1999).** The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature* *398*, 777-785.
- Imaizumi, K., Morihara, T., Mori, Y., Katayama, T., Tsuda, M., Furuyama, T., Wanaka, A., Takeda, M., and Tohyama, M. (1999).** The cell death-promoting gene DP5, which interacts with the BCL2 family, is induced during neuronal apoptosis following exposure to amyloid beta protein. *J Biol Chem* *274*, 7975-7981.
- Inman, G. J., and Farrell, P. J. (1995).** Epstein-Barr virus EBNA-LP and transcription regulation properties of pRB, p107 and p53 in transfection assays. *J Gen Virol* *76 (Pt 9)*, 2141-2149.
- Inohara, N., Ding, L., Chen, S., and Nunez, G. (1997).** harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *Embo J* *16*, 1686-1694.
- Inohara, N., Koseki, T., del Peso, L., Hu, Y., Yee, C., Chen, S., Carrio, R., Merino, J., Liu, D., Ni, J., and Nunez, G. (1999).** Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem* *274*, 14560-14567.
- Irmeler, M., Hofmann, K., Vaux, D., and Tschopp, J. (1997a).** Direct physical interaction between the *Caenorhabditis elegans* 'death proteins' CED-3 and CED-4. *FEBS Lett* *406*, 189-190.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.* (1997b).** Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* *388*, 190-195.
- Israel, A., Yano, O., Logeat, F., Kieran, M., and Kourilsky, P. (1989).** Two purified factors bind to the same sequence in the enhancer of mouse MHC class I genes: one of them is a positive regulator induced upon differentiation of teratocarcinoma cells. *Nucleic Acids Res* *17*, 5245-5257.
- Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y., and Nagata, S. (1991).** The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* *66*, 233-243.
- Ivanov, V. N., Lopez Bergami, P., Maulit, G., Sato, T. A., Sassoon, D., and Ronai, Z. (2003).** FAP-1 association with Fas (Apo-1) inhibits Fas expression on the cell surface. *Mol Cell Biol* *23*, 3623-3635.
- Ivanov, V. N., Ronai, Z., and Hei, T. K. (2006).** Opposite roles of FAP-1 and dynamin in the regulation of Fas (CD95) translocation to the cell surface and susceptibility to Fas ligand-mediated apoptosis. *J Biol Chem* *281*, 1840-1852.

Izumi, K. M., Cahir McFarland, E. D., Riley, E. A., Rizzo, D., Chen, Y., and Kieff, E. (1999a). The residues between the two transformation effector sites of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 are not critical for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 73, 9908-9916.

Izumi, K. M., Cahir McFarland, E. D., Ting, A. T., Riley, E. A., Seed, B., and Kieff, E. D. (1999b). The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated proteins TRADD and receptor-interacting protein (RIP) but does not induce apoptosis or require RIP for NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 19, 5759-5767.

Izumi, K. M., Kaye, K. M., and Kieff, E. D. (1994). Epstein-Barr virus recombinant molecular genetic analysis of the LMP1 amino-terminal cytoplasmic domain reveals a probable structural role, with no component essential for primary B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 68, 4369-4376.

Izumi, K. M., Kaye, K. M., and Kieff, E. D. (1997). The Epstein-Barr virus LMP1 amino acid sequence that engages tumor necrosis factor receptor associated factors is critical for primary B lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1447-1452.

Izumi, K. M., and Kieff, E. D. (1997). The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12592-12597.

Jeanmougin, F., Wurtz, J. M., Le Douarin, B., Chambon, P., and Losson, R. (1997). The bromodomain revisited. *Trends Biochem Sci* 22, 151-153.

Jelaska, A., and Korn, J. H. (1998). Anti-Fas induces apoptosis and proliferation in human dermal fibroblasts: differences between foreskin and adult fibroblasts. *J Cell Physiol* 175, 19-29.

Jiang, W. Q., Szekely, L., Wendel-Hansen, V., Ringertz, N., Klein, G., and Rosen, A. (1991). Co-localization of the retinoblastoma protein and the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-5. *Exp Cell Res* 197, 314-318.

Jin, X. W., and Speck, S. H. (1992). Identification of critical cis elements involved in mediating Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-dependent activity of an enhancer located upstream of the viral BamHI C promoter. *J Virol* 66, 2846-2852.

Jin, Y. H., Yoo, K. J., Lee, Y. H., and Lee, S. K. (2000). Caspase 3-mediated cleavage of p21WAF1/CIP1 associated with the cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complex is a prerequisite for apoptosis in SK-HEP-1 cells. *J Biol Chem* 275, 30256-30263.

Johannsen, E., Koh, E., Mosialos, G., Tong, X., Kieff, E., and Grossman, S. R. (1995). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivation of the latent membrane protein 1 promoter is mediated by J kappa and PU.1. *J Virol* 69, 253-262.

Johansen, L. M., Deppmann, C. D., Erickson, K. D., Coffin, W. F., 3rd, Thornton, T. M., Humphrey, S. E., Martin, J. M., and Taparowsky, E. J. (2003). EBNA2 and activated Notch induce expression of BATF. *J Virol* 77, 6029-6040.

Johnson, D., Lanahan, A., Buck, C. R., Sehgal, A., Morgan, C., Mercer, E., Bothwell, M., and Chao, M. (1986). Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell* 47, 545-554.

Joseph, A. M., Babcock, G. J., and Thorley-Lawson, D. A. (2000a). Cells expressing the Epstein-Barr virus growth program are present in and restricted to the naive B-cell subset of healthy tonsils. *J Virol* *74*, 9964-9971.

Joseph, A. M., Babcock, G. J., and Thorley-Lawson, D. A. (2000b). EBV persistence involves strict selection of latently infected B cells. *J Immunol* *165*, 2975-2981.

Juo, P., Kuo, C. J., Yuan, J., and Blenis, J. (1998). Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol* *8*, 1001-1008.

Kaiser, C., Laux, G., Eick, D., Jochner, N., Bornkamm, G. W., and Kempkes, B. (1999). The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol* *73*, 4481-4484.

Kang, M. S., Hung, S. C., and Kieff, E. (2001). Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 activates transcription from episomal but not integrated DNA and does not alter lymphocyte growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 15233-15238.

Kang, M. S., Lu, H., Yasui, T., Sharpe, A., Warren, H., Cahir-McFarland, E., Bronson, R., Hung, S. C., and Kieff, E. (2005). Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 does not induce lymphoma in transgenic FVB mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 820-825.

Karin, M., and Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* *3*, 221-227.

Kasahara, Y., and Yachie, A. (2002). Cell type specific infection of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis and chronic active EBV infection. *Crit Rev Oncol Hematol* *44*, 283-294.

Kashuba, E., Mattsson, K., Pokrovskaja, K., Kiss, C., Protopopova, M., Ehlin-Henriksson, B., Klein, G., and Szekely, L. (2003). EBV-encoded EBNA-5 associates with P14ARF in extranucleolar inclusions and prolongs the survival of P14ARF-expressing cells. *Int J Cancer* *105*, 644-653.

Kataoka, T. (2005). The caspase-8 modulator c-FLIP. *Crit Rev Immunol* *25*, 31-58.

Kataoka, T., Budd, R. C., Holler, N., Thome, M., Martinon, F., Irmeler, M., Burns, K., Hahne, M., Kennedy, N., Kovacovics, M., and Tschopp, J. (2000). The caspase-8 inhibitor FLIP promotes activation of NF-kappaB and Erk signaling pathways. *Curr Biol* *10*, 640-648.

Kataoka, T., and Tschopp, J. (2004). N-terminal fragment of c-FLIP(L) processed by caspase 8 specifically interacts with TRAF2 and induces activation of the NF-kappaB signaling pathway. *Mol Cell Biol* *24*, 2627-2636.

Kaye, K. M., Devergne, O., Harada, J. N., Izumi, K. M., Yalamanchili, R., Kieff, E., and Mosialos, G. (1996). Tumor necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF-kappa B activation by latent infection membrane protein 1, the Epstein-Barr virus transforming protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 11085-11090.

Kaye, K. M., Izumi, K. M., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 9150-9154.

- Kaye, K. M., Izumi, K. M., Li, H., Johannsen, E., Davidson, D., Longnecker, R., and Kieff, E. (1999).** An Epstein-Barr virus that expresses only the first 231 LMP1 amino acids efficiently initiates primary B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 73, 10525-10530.
- Kaye, K. M., Izumi, K. M., Mosialos, G., and Kieff, E. (1995).** The Epstein-Barr virus LMP1 cytoplasmic carboxy terminus is essential for B-lymphocyte transformation; fibroblast cocultivation complements a critical function within the terminal 155 residues. *J Virol* 69, 675-683.
- Kaykas, A., and Sugden, B. (2000).** The amino-terminus and membrane-spanning domains of LMP-1 inhibit cell proliferation. *Oncogene* 19, 1400-1410.
- Kaykas, A., Worringer, K., and Sugden, B. (2002).** LMP-1's transmembrane domains encode multiple functions required for LMP-1's efficient signaling. *J Virol* 76, 11551-11560.
- Kennedy, G., Komano, J., and Sugden, B. (2003).** Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14269-14274.
- Kennedy, N. J., Kataoka, T., Tschopp, J., and Budd, R. C. (1999).** Caspase activation is required for T cell proliferation. *J Exp Med* 190, 1891-1896.
- Kenney, J. L., Guinness, M. E., Curiel, T., and Lacy, J. (1998).** Antisense to the Epstein-Barr virus (EBV)-encoded latent membrane protein 1 (LMP-1) suppresses LMP-1 and bcl-2 expression and promotes apoptosis in EBV-immortalized B cells. *Blood* 92, 1721-1727.
- Keppler, O. T., Peter, M. E., Hinderlich, S., Moldenhauer, G., Stehling, P., Schmitz, I., Schwartz-Albiez, R., Reutter, W., and Pawlita, M. (1999).** Differential sialylation of cell surface glycoconjugates in a human B lymphoma cell line regulates susceptibility for CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus. *Glycobiology* 9, 557-569.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972).** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Khan, G., Miyashita, E. M., Yang, B., Babcock, G. J., and Thorley-Lawson, D. A. (1996).** Is EBV persistence in vivo a model for B cell homeostasis? *Immunity* 5, 173-179.
- Khanna, R., Burrows, S. R., Kurilla, M. G., Jacob, C. A., Misko, I. S., Sculley, T. B., Kieff, E., and Moss, D. J. (1992).** Localization of Epstein-Barr virus cytotoxic T cell epitopes using recombinant vaccinia: implications for vaccine development. *J Exp Med* 176, 169-176.
- Khanna, R., Slade, R. W., Poulsen, L., Moss, D. J., Burrows, S. R., Nicholls, J., and Burrows, J. M. (1997).** Evolutionary dynamics of genetic variation in Epstein-Barr virus isolates of diverse geographical origins: evidence for immune pressure-independent genetic drift. *J Virol* 71, 8340-8346.
- Kienzle, N., Buck, M., Greco, S., Krauer, K., and Sculley, T. B. (1999).** Epstein-Barr virus-encoded RK-BARF0 protein expression. *J Virol* 73, 8902-8906.

- Kienzle, N., Sculley, T. B., Poulsen, L., Buck, M., Cross, S., Raab-Traub, N., and Khanna, R. (1998).** Identification of a cytotoxic T-lymphocyte response to the novel BAF0 protein of Epstein-Barr virus: a critical role for antigen expression. *J Virol* 72, 6614-6620.
- Kieser, A., Kaiser, C., and Hammerschmidt, W. (1999).** LMP1 signal transduction differs substantially from TNF receptor 1 signaling in the molecular functions of TRADD and TRAF2. *Embo J* 18, 2511-2521.
- Kieser, A., Kilger, E., Gires, O., Ueffing, M., Kolch, W., and Hammerschmidt, W. (1997).** Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade. *Embo J* 16, 6478-6485.
- Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M., and Hammerschmidt, W. (1998).** Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *Embo J* 17, 1700-1709.
- Kim, K. R., Yoshizaki, T., Miyamori, H., Hasegawa, K., Horikawa, T., Furukawa, M., Harada, S., Seiki, M., and Sato, H. (2000).** Transformation of Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) induces expression of Ets1 and invasive growth. *Oncogene* 19, 1764-1771.
- Kirch, H. C., Flaswinkel, S., Rumpf, H., Brockmann, D., and Esche, H. (1999).** Expression of human p53 requires synergistic activation of transcription from the p53 promoter by AP-1, NF-kappaB and Myc/Max. *Oncogene* 18, 2728-2738.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1995).** Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14, 5579-5588.
- Kitamura, R., Sekimoto, T., Ito, S., Harada, S., Yamagata, H., Masai, H., Yoneda, Y., and Yanagi, K. (2006).** Nuclear import of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 mediated by NPI-1 (Importin alpha5) is up- and down-regulated by phosphorylation of the nuclear localization signal for which Lys379 and Arg380 are essential. *J Virol* 80, 1979-1991.
- Kitay, M. K., and Rowe, D. T. (1996).** Cell cycle stage-specific phosphorylation of the Epstein-Barr virus immortalization protein EBNA-LP. *J Virol* 70, 7885-7893.
- Kjoller, L., and Hall, A. (1999).** Signaling to Rho GTPases. *Exp Cell Res* 253, 166-179.
- Klas, C., Debatin, K. M., Jonker, R. R., and Krammer, P. H. (1993).** Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol* 5, 625-630.
- Klein, J. A., Longo-Guess, C. M., Rossmann, M. P., Seburn, K. L., Hurd, R. E., Frankel, W. N., Bronson, R. T., and Ackerman, S. L. (2002).** The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* 419, 367-374.
- Kluck, R. M., Bossy-Wetzell, E., Green, D. R., and Newmeyer, D. D. (1997).** The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275, 1132-1136.
- Knowles, D. M. (1999).** Immunodeficiency-associated lymphoproliferative disorders. *Mod Pathol* 12, 200-217.

- Knox, P. G., Li, Q. X., Rickinson, A. B., and Young, L. S. (1996).** In vitro production of stable Epstein-Barr virus-positive epithelial cell clones which resemble the virus:cell interaction observed in nasopharyngeal carcinoma. *Virology* 215, 40-50.
- Knutson, J. C. (1990).** The level of c-fgr RNA is increased by EBNA-2, an Epstein-Barr virus gene required for B-cell immortalization. *J Virol* 64, 2530-2536.
- Ko, Y. G., Kang, Y. S., Park, H., Seol, W., Kim, J., Kim, T., Park, H. S., Choi, E. J., and Kim, S. (2001).** Apoptosis signal-regulating kinase 1 controls the proapoptotic function of death-associated protein (Daxx) in the cytoplasm. *J Biol Chem* 276, 39103-39106.
- Koenig, U., Eckhart, L., and Tschachler, E. (2001).** Evidence that caspase-13 is not a human but a bovine gene. *Biochem Biophys Res Commun* 285, 1150-1154.
- Komano, J., Sugiura, M., and Takada, K. (1998).** Epstein-Barr virus contributes to the malignant phenotype and to apoptosis resistance in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J Virol* 72, 9150-9156.
- Komano, J., and Takada, K. (2001).** Role of bcl-2 in Epstein-Barr virus-induced malignant conversion of Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J Virol* 75, 1561-1564.
- Komiyama, T., Ray, C. A., Pickup, D. J., Howard, A. D., Thornberry, N. A., Peterson, E. P., and Salvesen, G. (1994).** Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. An example of cross-class inhibition. *J Biol Chem* 269, 19331-19337.
- Kondo, S., Wakisaka, N., Schell, M. J., Horikawa, T., Sheen, T. S., Sato, H., Furukawa, M., Pagano, J. S., and Yoshizaki, T. (2005).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces the matrix metalloproteinase-1 promoter via an Ets binding site formed by a single nucleotide polymorphism: enhanced susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 115, 368-376.
- Korsmeyer, S. J. (1992).** Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood* 80, 879-886.
- Korsmeyer, S. J., Wei, M. C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K. J., and Schlesinger, P. H. (2000).** Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ* 7, 1166-1173.
- Kothakota, S., Azuma, T., Reinhard, C., Klippel, A., Tang, J., Chu, K., McGarry, T. J., Kirschner, M. W., Kohts, K., Kwiatkowski, D. J., and Williams, L. T. (1997).** Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 278, 294-298.
- Krammer, P. H. (2000).** CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795.
- Krauer, K. G., Belzer, D. K., Liaskou, D., Buck, M., Cross, S., Honjo, T., and Sculley, T. (1998).** Regulation of interleukin-1beta transcription by Epstein-Barr virus involves a number of latent proteins via their interaction with RBP. *Virology* 252, 418-430.
- Krauer, K. G., Buck, M., and Sculley, T. (1999).** Characterization of the transcriptional repressor RBP in Epstein-Barr virus-transformed B cells. *J Gen Virol* 80 (Pt 12), 3217-3226.

- Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P., and Wajant, H. (2001).** NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol* 21, 3964-3973.
- Kruger, S., Schroers, R., Rooney, C. M., Gahn, B., and Chen, S. Y. (2003).** Identification of a naturally processed HLA-DR-restricted T-helper epitope in Epstein-Barr virus nuclear antigen type 1. *J Immunother* 26, 212-221.
- Kube, D., Holtick, U., Vockerodt, M., Ahmadi, T., Haier, B., Behrmann, I., Heinrich, P. C., Diehl, V., and Tesch, H. (2001).** STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. *Blood* 98, 762-770.
- Kulwichit, W., Edwards, R. H., Davenport, E. M., Baskar, J. F., Godfrey, V., and Raab-Traub, N. (1998).** Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11963-11968.
- Kumar, S., and Colussi, P. A. (1999).** Prodomains--adaptors--oligomerization: the pursuit of caspase activation in apoptosis. *Trends Biochem Sci* 24, 1-4.
- Kurozumi, K., Nishita, M., Yamaguchi, K., Fujita, T., Ueno, N., and Shibuya, H. (1998).** BRAM1, a BMP receptor-associated molecule involved in BMP signalling. *Genes Cells* 3, 257-264.
- Kurth, J., Hansmann, M. L., Rajewsky, K., and Kuppers, R. (2003).** Epstein-Barr virus-infected B cells expanding in germinal centers of infectious mononucleosis patients do not participate in the germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4730-4735.
- Kurth, J., Spieker, T., Wustrow, J., Strickler, G. J., Hansmann, L. M., Rajewsky, K., and Kuppers, R. (2000).** EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: viral strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency. *Immunity* 13, 485-495.
- Kusano, S., and Raab-Traub, N. (2001).** An Epstein-Barr virus protein interacts with Notch. *J Virol* 75, 384-395.
- Labrecque, L. G., Barnes, D. M., Fentiman, I. S., and Griffin, B. E. (1995).** Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: a breast cancer study. *Cancer Res* 55, 39-45.
- LaCasse, E. C., Baird, S., Korneluk, R. G., and MacKenzie, A. E. (1998).** The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 17, 3247-3259.
- Lacour, S., Hammann, A., Grazide, S., Lagadic-Gossmann, D., Athias, A., Sergent, O., Laurent, G., Gambert, P., Solary, E., and Dimanche-Boitrel, M. T. (2004).** Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res* 64, 3593-3598.
- Laherty, C. D., Hu, H. M., Opipari, A. W., Wang, F., and Dixit, V. M. (1992).** The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J Biol Chem* 267, 24157-24160.
- Laichalk, L. L., Hochberg, D., Babcock, G. J., Freeman, R. B., and Thorley-Lawson, D. A. (2002).** The dispersal of mucosal memory B cells: evidence from persistent EBV infection. *Immunity* 16, 745-754.

- Lamkanfi, M., Kalai, M., and Vandenabeele, P. (2004).** Caspase-12: an overview. *Cell Death Differ* 11, 365-368.
- Larochelle, B., Flamand, L., Gourde, P., Beauchamp, D., and Gosselin, J. (1998).** Epstein-Barr virus infects and induces apoptosis in human neutrophils. *Blood* 92, 291-299.
- Lautscham, G., Haigh, T., Mayrhofer, S., Taylor, G., Croom-Carter, D., Leese, A., Gadola, S., Cerundolo, V., Rickinson, A., and Blake, N. (2003a).** Identification of a TAP-independent, immunoproteasome-dependent CD8+ T-cell epitope in Epstein-Barr virus latent membrane protein 2. *J Virol* 77, 2757-2761.
- Lautscham, G., Rickinson, A., and Blake, N. (2003b).** TAP-independent antigen presentation on MHC class I molecules: lessons from Epstein-Barr virus. *Microbes Infect* 5, 291-299.
- Laux, G., Adam, B., Strobl, L. J., and Moreau-Gachelin, F. (1994a).** The Spi-1/PU.1 and Spi-B ets family transcription factors and the recombination signal binding protein RBP-J kappa interact with an Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 responsive cis-element. *Embo J* 13, 5624-5632.
- Laux, G., Dugrillon, F., Eckert, C., Adam, B., Zimmer-Strobl, U., and Bornkamm, G. W. (1994b).** Identification and characterization of an Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-responsive cis element in the bidirectional promoter region of latent membrane protein and terminal protein 2 genes. *J Virol* 68, 6947-6958.
- Laux, G., Economou, A., and Farrell, P. J. (1989).** The terminal protein gene 2 of Epstein-Barr virus is transcribed from a bidirectional latent promoter region. *J Gen Virol* 70 (Pt 11), 3079-3084.
- Laux, G., Perricaudet, M., and Farrell, P. J. (1988).** A spliced Epstein-Barr virus gene expressed in immortalized lymphocytes is created by circularization of the linear viral genome. *Embo J* 7, 769-774.
- Lavrik, I. N., Golks, A., and Krammer, P. H. (2005).** Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 115, 2665-2672.
- Le Clorennec, C., Youlyouz-Marfak, I., Adriaenssens, E., Coll, J., Bornkamm, G. W., and Feuillard, J. (2006).** EBV latency III immortalization program sensitizes B cells to induction of CD95-mediated apoptosis via LMP1: role of NF-kappaB, STAT1, and p53. *Blood* 107, 2070-2078.
- Lee, K. H., Feig, C., Tchikov, V., Schickel, R., Hallas, C., Schutze, S., Peter, M. E., and Chan, A. C. (2006).** The role of receptor internalization in CD95 signaling. *Embo J* 25, 1009-1023.
- Leevers, S. J., Vanhaesebroeck, B., and Waterfield, M. D. (1999).** Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipids take centre stage. *Curr Opin Cell Biol* 11, 219-225.
- Leight, E. R., and Sugden, B. (2000).** EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Rev Med Virol* 10, 83-100.

- Leithauser, F., Dhein, J., Mechtersheimer, G., Koretz, K., Bruderlein, S., Henne, C., Schmidt, A., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Moller, P. (1993).** Constitutive and induced expression of APO-1, a new member of the nerve growth factor/tumor necrosis factor receptor superfamily, in normal and neoplastic cells. *Lab Invest* 69, 415-429.
- Lens, S. M., Kataoka, T., Fortner, K. A., Tinel, A., Ferrero, I., MacDonald, R. H., Hahne, M., Beermann, F., Attinger, A., Orbea, H. A., et al. (2002).** The caspase 8 inhibitor c-FLIP(L) modulates T-cell receptor-induced proliferation but not activation-induced cell death of lymphocytes. *Mol Cell Biol* 22, 5419-5433.
- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P. M., Klein, G., Kurilla, M. G., and Masucci, M. G. (1995).** Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* 375, 685-688.
- Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A., and Masucci, M. G. (1997).** Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12616-12621.
- Levkau, B., Scatena, M., Giachelli, C. M., Ross, R., and Raines, E. W. (1999).** Apoptosis overrides survival signals through a caspase-mediated dominant-negative NF-kappa B loop. *Nat Cell Biol* 1, 227-233.
- Levy, D. E., and Darnell, J. E., Jr. (2002).** Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 651-662.
- Lewinsohn, D. M., Bement, T. T., Xu, J., Lynch, D. H., Grabstein, K. H., Reed, S. G., and Alderson, M. R. (1998).** Human purified protein derivative-specific CD4+ T cells use both CD95-dependent and CD95-independent cytolytic mechanisms. *J Immunol* 160, 2374-2379.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., and Yuan, J. (1998).** Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.
- Li, H. P., and Chang, Y. S. (2003).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1: structure and functions. *J Biomed Sci* 10, 490-504.
- Li, L., Liu, D., Hutt-Fletcher, L., Morgan, A., Masucci, M. G., and Levitsky, V. (2002a).** Epstein-Barr virus inhibits the development of dendritic cells by promoting apoptosis of their monocyte precursors in the presence of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-4. *Blood* 99, 3725-3734.
- Li, L. Y., Luo, X., and Wang, X. (2001).** Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. (1997a).** Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
- Li, Q., Spriggs, M. K., Kovats, S., Turk, S. M., Comeau, M. R., Nepom, B., and Hutt-Fletcher, L. M. (1997b).** Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. *J Virol* 71, 4657-4662.

- Li, Q., and Verma, I. M. (2002).** NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2, 725-734.
- Li, S. N., Chang, Y. S., and Liu, S. T. (1996).** Effect of a 10-amino acid deletion on the oncogenic activity of latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *Oncogene* 12, 2129-2135.
- Li, X., Yang, Y., and Ashwell, J. D. (2002b).** TNF-RII and c-IAP1 mediate ubiquitination and degradation of TRAF2. *Nature* 416, 345-347.
- Li, Y., Kanki, H., Hachiya, T., Ohyama, T., Irie, S., Tang, G., Mukai, J., and Sato, T. (2000).** Negative regulation of Fas-mediated apoptosis by FAP-1 in human cancer cells. *Int J Cancer* 87, 473-479.
- Liang, C. L., Tsai, C. N., Chung, P. J., Chen, J. L., Sun, C. M., Chen, R. H., Hong, J. H., and Chang, Y. S. (2000).** Transcription of Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1 promoter Qp is repressed by transforming growth factor-beta via Smad4 binding element in human BL cells. *Virology* 277, 184-192.
- Lieberman, P. M., and Berk, A. J. (1990).** In vitro transcriptional activation, dimerization, and DNA-binding specificity of the Epstein-Barr virus Zta protein. *J Virol* 64, 2560-2568.
- Lin, J., Johannsen, E., Robertson, E., and Kieff, E. (2002).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C putative repression domain mediates coactivation of the LMP1 promoter with EBNA-2. *J Virol* 76, 232-242.
- Lin, J. H., Deng, G., Huang, Q., and Morser, J. (2000).** KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family. *Biochem Biophys Res Commun* 279, 820-831.
- Lin, X., Cunningham, E. T., Jr., Mu, Y., Gelezianas, R., and Greene, W. C. (1999).** The proto-oncogene Cot kinase participates in CD3/CD28 induction of NF-kappaB acting through the NF-kappaB-inducing kinase and IkappaB kinases. *Immunity* 10, 271-280.
- Lindhout, E., Lakeman, A., Mevissen, M. L., and de Groot, C. (1994).** Functionally active Epstein-Barr virus-transformed follicular dendritic cell-like cell lines. *J Exp Med* 179, 1173-1184.
- Ling, P. D., Hsieh, J. J., Ruf, I. K., Rawlins, D. R., and Hayward, S. D. (1994).** EBNA-2 upregulation of Epstein-Barr virus latency promoters and the cellular CD23 promoter utilizes a common targeting intermediate, CBF1. *J Virol* 68, 5375-5383.
- Ling, P. D., Peng, R. S., Nakajima, A., Yu, J. H., Tan, J., Moses, S. M., Yang, W. H., Zhao, B., Kieff, E., Bloch, K. D., and Bloch, D. B. (2005).** Mediation of Epstein-Barr virus EBNA-LP transcriptional coactivation by Sp100. *Embo J* 24, 3565-3575.
- Liston, P., Fong, W. G., and Korneluk, R. G. (2003).** The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2. *Oncogene* 22, 8568-8580.
- Liu, L. T., Peng, J. P., Chang, H. C., and Hung, W. C. (2003).** RECK is a target of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *Oncogene* 22, 8263-8270.
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1997).** DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89, 175-184.

- Liu, Y. C., Penninger, J., and Karin, M. (2005).** Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification. *Nat Rev Immunol* 5, 941-952.
- Lockshin, R. A., and Zakeri, Z. (2001).** Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 545-550.
- Locksley, R. M., Killeen, N., and Lenardo, M. J. (2001).** The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.
- Loetscher, H., Pan, Y. C., Lahm, H. W., Gentz, R., Brockhaus, M., Tabuchi, H., and Lesslauer, W. (1990).** Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* 61, 351-359.
- Longnecker, R. (2000).** Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence? *Adv Cancer Res* 79, 175-200.
- Longnecker, R., Druker, B., Roberts, T. M., and Kieff, E. (1991).** An Epstein-Barr virus protein associated with cell growth transformation interacts with a tyrosine kinase. *J Virol* 65, 3681-3692.
- Longnecker, R., and Kieff, E. (1990).** A second Epstein-Barr virus membrane protein (LMP2) is expressed in latent infection and colocalizes with LMP1. *J Virol* 64, 2319-2326.
- Longnecker, R., Merchant, M., Brown, M. E., Fruehling, S., Bickford, J. O., Ikeda, M., and Harty, R. N. (2000).** WW- and SH3-domain interactions with Epstein-Barr virus LMP2A. *Exp Cell Res* 257, 332-340.
- Longthorne, V. L., and Williams, G. T. (1997).** Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *Embo J* 16, 3805-3812.
- Lu, C. D., Altieri, D. C., and Tanigawa, N. (1998).** Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas. *Cancer Res* 58, 1808-1812.
- Lu, J., Chua, H. H., Chen, S. Y., Chen, J. Y., and Tsai, C. H. (2003).** Regulation of matrix metalloproteinase-1 by Epstein-Barr virus proteins. *Cancer Res* 63, 256-262.
- Lu, J. J., Chen, J. Y., Hsu, T. Y., Yu, W. C., Su, I. J., and Yang, C. S. (1996).** Induction of apoptosis in epithelial cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *J Gen Virol* 77 (Pt 8), 1883-1892.
- Lu, T., and Stark, G. R. (2004).** Cytokine overexpression and constitutive NFkappaB in cancer. *Cell Cycle* 3, 1114-1117.
- Luftig, M., Prinarakis, E., Yasui, T., Tschritzis, T., Cahir-McFarland, E., Inoue, J., Nakano, H., Mak, T. W., Yeh, W. C., Li, X., et al. (2003).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activation of NF-kappaB through IRAK1 and TRAF6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15595-15600.

- Luftig, M., Yasui, T., Soni, V., Kang, M. S., Jacobson, N., Cahir-McFarland, E., Seed, B., and Kieff, E. (2004).** Epstein-Barr virus latent infection membrane protein 1 TRAF-binding site induces NIK/IKK alpha-dependent noncanonical NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 141-146.
- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1998).** Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* *94*, 481-490.
- MacDonald, H. R., Wilson, A., and Radtke, F. (2001).** Notch1 and T-cell development: insights from conditional knockout mice. *Trends Immunol* *22*, 155-160.
- Mainou, B. A., Everly, D. N., Jr., and Raab-Traub, N. (2005).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 CTAR1 mediates rodent and human fibroblast transformation through activation of PI3K. *Oncogene* *24*, 6917-6924.
- Mallett, S., Fossum, S., and Barclay, A. N. (1990).** Characterization of the MRC OX40 antigen of activated CD4 positive T lymphocytes--a molecule related to nerve growth factor receptor. *Embo J* *9*, 1063-1068.
- Mandal, M., Maggirwar, S. B., Sharma, N., Kaufmann, S. H., Sun, S. C., and Kumar, R. (1996).** Bcl-2 prevents CD95 (Fas/APO-1)-induced degradation of lamin B and poly(ADP-ribose) polymerase and restores the NF-kappaB signaling pathway. *J Biol Chem* *271*, 30354-30359.
- Manet, E., Sergeant, A., and Gruffat, H. (2003).** Cycle productif du virus d'Epstein-Barr: rôle de la protéine EB1 dans l'activation du cycle productif et interactions protéine EB1-cellule hôtes. *Virologie* *7*, 711-723.
- Mangeat, P., Roy, C., and Martin, M. (1999).** ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol* *9*, 187-192.
- Mann, K. P., and Thorley-Lawson, D. (1987).** Posttranslational processing of the Epstein-Barr virus-encoded p63/LMP protein. *J Virol* *61*, 2100-2108.
- Manoury, B., and Fahraeus, R. (2004).** [Self-inhibition of EBNA1 protein to escape from immune recognition]. *Med Sci (Paris)* *20*, 5-6.
- Marchetti, P., Hirsch, T., Zamzami, N., Castedo, M., Decaudin, D., Susin, S. A., Masse, B., and Kroemer, G. (1996).** Mitochondrial permeability transition triggers lymphocyte apoptosis. *J Immunol* *157*, 4830-4836.
- Marshall, D., and Sample, C. (1995).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C is a transcriptional regulator. *J Virol* *69*, 3624-3630.
- Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Pitti, R. M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Yuan, J., Gurney, A., Goddard, A. D., Godowski, P., and Ashkenazi, A. (1997).** A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol* *7*, 1003-1006.
- Martin, D. A., Siegel, R. M., Zheng, L., and Lenardo, M. J. (1998).** Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *J Biol Chem* *273*, 4345-4349.

- Martin, J., and Sugden, B. (1991).** Transformation by the oncogenic latent membrane protein correlates with its rapid turnover, membrane localization, and cytoskeletal association. *J Virol* 65, 3246-3258.
- Martin, J. M., Veis, D., Korsmeyer, S. J., and Sugden, B. (1993).** Latent membrane protein of Epstein-Barr virus induces cellular phenotypes independently of expression of Bcl-2. *J Virol* 67, 5269-5278.
- Martinon, F., Holler, N., Richard, C., and Tschopp, J. (2000).** Activation of a pro-apoptotic amplification loop through inhibition of NF-kappaB-dependent survival signals by caspase-mediated inactivation of RIP. *FEBS Lett* 468, 134-136.
- Mashima, T., Naito, M., Noguchi, K., Miller, D. K., Nicholson, D. W., and Tsuruo, T. (1997).** Actin cleavage by CPP-32/apopain during the development of apoptosis. *Oncogene* 14, 1007-1012.
- Masy, E., Adriaenssens, E., Montpellier, C., Crepieux, P., Mougel, A., Quatannens, B., Goormachtigh, G., Faumont, N., Meggetto, F., Auriault, C., et al. (2002).** Human monocytic cell lines transformed in vitro by Epstein-Barr virus display a type II latency and LMP-1-dependent proliferation. *J Virol* 76, 6460-6472.
- Mate, M. J., Ortiz-Lombardia, M., Boitel, B., Haouz, A., Tello, D., Susin, S. A., Penninger, J., Kroemer, G., and Alzari, P. M. (2002).** The crystal structure of the mouse apoptosis-inducing factor AIF. *Nat Struct Biol* 9, 442-446.
- Matzke, A., Massing, U., and Krug, H. F. (2001).** Killing tumour cells by alkylphosphocholines: evidence for involvement of CD95. *Eur J Cell Biol* 80, 1-10.
- McIlroy, D., Tanaka, M., Sakahira, H., Fukuyama, H., Suzuki, M., Yamamura, K., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., and Nagata, S. (2000).** An auxiliary mode of apoptotic DNA fragmentation provided by phagocytes. *Genes Dev* 14, 549-558.
- McShane, M. P., Mullen, M. M., Haan, K. M., Jardetzky, T. S., and Longnecker, R. (2003).** Mutational analysis of the HLA class II interaction with Epstein-Barr virus glycoprotein 42. *J Virol* 77, 7655-7662.
- McWhirter, S. M., Pullen, S. S., Holton, J. M., Crute, J. J., Kehry, M. R., and Alber, T. (1999).** Crystallographic analysis of CD40 recognition and signaling by human TRAF2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8408-8413.
- Mehl, A. M., Fischer, N., Rowe, M., Hartmann, F., Daus, H., Trumper, L., Pfreundschuh, M., Muller-Lantzsch, N., and Grasser, F. A. (1998).** Isolation and analysis of two strongly transforming isoforms of the Epstein-Barr-Virus(EBV)-encoded latent membrane protein-1 (LMP1) from a single Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 76, 194-200.
- Mehl, A. M., Floettmann, J. E., Jones, M., Brennan, P., and Rowe, M. (2001).** Characterization of intercellular adhesion molecule-1 regulation by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 identifies pathways that cooperate with nuclear factor kappa B to activate transcription. *J Biol Chem* 276, 984-992.
- Meier, P., Finch, A., and Evan, G. (2000).** Apoptosis in development. *Nature* 407, 796-801.

- Meijer, A. E., Zhivotovsky, B., and Lewensohn, R. (1999).** Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell lines of ataxia telangiectasia patients are defective in X-ray-induced apoptosis. *Int J Radiat Biol* 75, 709-716.
- Menet, A., Speth, C., Larcher, C., Prodinger, W. M., Schwendinger, M. G., Chan, P., Jager, M., Schwarzmann, F., Recheis, H., Fontaine, M., and Dierich, M. P. (1999).** Epstein-Barr virus infection of human astrocyte cell lines. *J Virol* 73, 7722-7733.
- Merchant, M., Caldwell, R. G., and Longnecker, R. (2000).** The LMP2A ITAM is essential for providing B cells with development and survival signals in vivo. *J Virol* 74, 9115-9124.
- Merchant, M., Swart, R., Katzman, R. B., Ikeda, M., Ikeda, A., Longnecker, R., Dykstra, M. L., and Pierce, S. K. (2001).** The effects of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A on B cell function. *Int Rev Immunol* 20, 805-835.
- Mettenleiter, T. C. (2004).** Budding events in herpesvirus morphogenesis. *Virus Res* 106, 167-180.
- Metzstein, M. M., Stanfield, G. M., and Horvitz, H. R. (1998).** Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. *Trends Genet* 14, 410-416.
- Michaelson, J. S., and Leder, P. (2003).** RNAi reveals anti-apoptotic and transcriptionally repressive activities of DAXX. *J Cell Sci* 116, 345-352.
- Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K., and Tschopp, J. (2001).** NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Mol Cell Biol* 21, 5299-5305.
- Micheau, O., Solary, E., Hammann, A., and Dimanche-Boitrel, M. T. (1999).** Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs. *J Biol Chem* 274, 7987-7992.
- Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D. W., Briand, C., and Grutter, M. G. (2002).** The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 277, 45162-45171.
- Middeldorp, J. M., Brink, A. A., van den Brule, A. J., and Meijer, C. J. (2003).** Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit Rev Oncol Hematol* 45, 1-36.
- Migone, T. S., Lin, J. X., Cereseto, A., Mulloy, J. C., O'Shea, J. J., Franchini, G., and Leonard, W. J. (1995).** Constitutively activated Jak-STAT pathway in T cells transformed with HTLV-I. *Science* 269, 79-81.
- Mikolajczyk, J., Scott, F. L., Krajewski, S., Sutherlin, D. P., and Salvesen, G. S. (2004).** Activation and substrate specificity of caspase-14. *Biochemistry* 43, 10560-10569.
- Miller, C. L., Burkhardt, A. L., Lee, J. H., Stealey, B., Longnecker, R., Bolen, J. B., and Kieff, E. (1995).** Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. *Immunity* 2, 155-166.

- Miller, C. L., Lee, J. H., Kieff, E., Burkhardt, A. L., Bolen, J. B., and Longnecker, R. (1994a).** Epstein-Barr virus protein LMP2A regulates reactivation from latency by negatively regulating tyrosine kinases involved in sIg-mediated signal transduction. *Infect Agents Dis* 3, 128-136.
- Miller, C. L., Lee, J. H., Kieff, E., and Longnecker, R. (1994b).** An integral membrane protein (LMP2) blocks reactivation of Epstein-Barr virus from latency following surface immunoglobulin crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 772-776.
- Miller, G. (1974).** The oncogenicity of Epstein-Barr virus. *J Infect Dis* 130, 187-205.
- Miller, N., and Hutt-Fletcher, L. M. (1988).** A monoclonal antibody to glycoprotein gp85 inhibits fusion but not attachment of Epstein-Barr virus. *J Virol* 62, 2366-2372.
- Milner, A. E., Johnson, G. D., and Gregory, C. D. (1992).** Prevention of programmed cell death in Burkitt lymphoma cell lines by bcl-2-dependent and -independent mechanisms. *Int J Cancer* 52, 636-644.
- Miossec, C., Dutilleul, V., Fassy, F., and Diu-Hercend, A. (1997).** Evidence for CPP32 activation in the absence of apoptosis during T lymphocyte stimulation. *J Biol Chem* 272, 13459-13462.
- Mitchell, T., and Sugden, B. (1995).** Stimulation of NF-kappa B-mediated transcription by mutant derivatives of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus. *J Virol* 69, 2968-2976.
- Miyaji, M., Jin, Z. X., Yamaoka, S., Amakawa, R., Fukuhara, S., Sato, S. B., Kobayashi, T., Domae, N., Mimori, T., Bloom, E. T., et al. (2005).** Role of membrane sphingomyelin and ceramide in platform formation for Fas-mediated apoptosis. *J Exp Med* 202, 249-259.
- Miyashita, E. M., Yang, B., Babcock, G. J., and Thorley-Lawson, D. A. (1997).** Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell. *J Virol* 71, 4882-4891.
- Molesworth, S. J., Lake, C. M., Borza, C. M., Turk, S. M., and Hutt-Fletcher, L. M. (2000).** Epstein-Barr virus gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells. *J Virol* 74, 6324-6332.
- Mollinedo, F., and Gajate, C. (2003).** Microtubules, microtubule-interfering agents and apoptosis. *Apoptosis* 8, 413-450.
- Mori, N., Morishita, M., Tsukazaki, T., and Yamamoto, N. (2003).** Repression of Smad-dependent transforming growth factor-beta signaling by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 through nuclear factor-kappaB. *Int J Cancer* 105, 661-668.
- Morita, Y., Kanei-Ishii, C., Nomura, T., and Ishii, S. (2005).** TRAF7 sequesters c-Myb to the cytoplasm by stimulating its sumoylation. *Mol Biol Cell* 16, 5433-5444.
- Morrison, J. A., and Raab-Traub, N. (2005).** Roles of the ITAM and PY motifs of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A in the inhibition of epithelial cell differentiation and activation of {beta}-catenin signaling. *J Virol* 79, 2375-2382.
- Mosialos, G. (2001).** Cytokine signaling and Epstein-Barr virus-mediated cell transformation. *Cytokine Growth Factor Rev* 12, 259-270.

- Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C., and Kieff, E. (1995).** The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 80, 389-399.
- Moynagh, P. N. (2005).** The NF-kappaB pathway. *J Cell Sci* 118, 4589-4592.
- Muller, M., Strand, S., Hug, H., Heinemann, E. M., Walczak, H., Hofmann, W. J., Stremmel, W., Krammer, P. H., and Galle, P. R. (1997).** Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. *J Clin Invest* 99, 403-413.
- Muller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S. L., Galle, P. R., Stremmel, W., Oren, M., and Krammer, P. H. (1998).** p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med* 188, 2033-2045.
- Munro, S. (2003).** Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115, 377-388.
- Murono, S., Inoue, H., Tanabe, T., Joab, I., Yoshizaki, T., Furukawa, M., and Pagano, J. S. (2001).** Induction of cyclooxygenase-2 by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is involved in vascular endothelial growth factor production in nasopharyngeal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6905-6910.
- Murray, P. G., Lissauer, D., Junying, J., Davies, G., Moore, S., Bell, A., Timms, J., Rowlands, D., McConkey, C., Reynolds, G. M., et al. (2003).** Reactivity with A monoclonal antibody to Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1 defines a subset of aggressive breast cancers in the absence of the EBV genome. *Cancer Res* 63, 2338-2343.
- Murray, R. J., Kurilla, M. G., Brooks, J. M., Thomas, W. A., Rowe, M., Kieff, E., and Rickinson, A. B. (1992).** Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the immune control of EBV-positive malignancies. *J Exp Med* 176, 157-168.
- Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., et al. (1996).** FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827.
- Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1998).** An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem* 273, 2926-2930.
- Nagata, S. (1997).** Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.
- Nagata, S., and Golstein, P. (1995).** The Fas death factor. *Science* 267, 1449-1456.
- Najjar, I., Baran-Marszak, F., Le Clorennec, C., Laguillier, C., Schischmanoff, O., Youlyouz-Marfak, I., Schlee, M., Bornkamm, G. W., Raphael, M., Feuillard, J., and Fagard, R. (2005).** Latent membrane protein 1 regulates STAT1 through NF-kappaB-dependent interferon secretion in Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J Virol* 79, 4936-4943.

- Nakano, H., Nakajima, A., Sakon-Komazawa, S., Piao, J. H., Xue, X., and Okumura, K. (2006).** Reactive oxygen species mediate crosstalk between NF-kappaB and JNK. *Cell Death Differ* 13, 730-737.
- Nakayama, T., Hieshima, K., Nagakubo, D., Sato, E., Nakayama, M., Kawa, K., and Yoshie, O. (2004).** Selective induction of Th2-attracting chemokines CCL17 and CCL22 in human B cells by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *J Virol* 78, 1665-1674.
- Nemerow, G. R., Houghten, R. A., Moore, M. D., and Cooper, N. R. (1989).** Identification of an epitope in the major envelope protein of Epstein-Barr virus that mediates viral binding to the B lymphocyte EBV receptor (CR2). *Cell* 56, 369-377.
- Nemerow, G. R., Mold, C., Schwend, V. K., Tollefson, V., and Cooper, N. R. (1987).** Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol* 61, 1416-1420.
- Nguyen, M. H., Ho, J. M., Beattie, B. K., and Barber, D. L. (2001).** TEL-JAK2 mediates constitutive activation of the phosphatidylinositol 3'-kinase/protein kinase B signaling pathway. *J Biol Chem* 276, 32704-32713.
- Nicholson, D. W., and Thornberry, N. A. (1997).** Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* 22, 299-306.
- Niedobitek, G., Herbst, H., Young, L. S., Brooks, L., Masucci, M. G., Crocker, J., Rickinson, A. B., and Stein, H. (1992).** Patterns of Epstein-Barr virus infection in non-neoplastic lymphoid tissue. *Blood* 79, 2520-2526.
- Nilsson, K. (1992).** Human B-lymphoid cell lines. *Hum Cell* 5, 25-41.
- Nitsche, F., Bell, A., and Rickinson, A. (1997).** Epstein-Barr virus leader protein enhances EBNA-2-mediated transactivation of latent membrane protein 1 expression: a role for the W1W2 repeat domain. *J Virol* 71, 6619-6628.
- Nitta, T., Chiba, A., Yamashita, A., Rowe, M., Israel, A., Reth, M., Yamamoto, N., and Yamaoka, S. (2003).** NF-kappaB is required for cell death induction by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *Cell Signal* 15, 423-433.
- Nonkwelo, C., Skinner, J., Bell, A., Rickinson, A., and Sample, J. (1996).** Transcription start sites downstream of the Epstein-Barr virus (EBV) Fp promoter in early-passage Burkitt lymphoma cells define a fourth promoter for expression of the EBV EBNA-1 protein. *J Virol* 70, 623-627.
- Nunez, G., Seto, M., Seremetis, S., Ferrero, D., Grignani, F., Korsmeyer, S. J., and Dalla-Favera, R. (1989).** Growth- and tumor-promoting effects of deregulated BCL2 in human B-lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 4589-4593.
- O'Shea, J. J., Gadina, M., and Schreiber, R. D. (2002).** Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. *Cell* 109 Suppl, S121-131.

Oda, E., Ohki, R., Murasawa, H., Nemoto, J., Shibue, T., Yamashita, T., Tokino, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (2000). Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science* 288, 1053-1058.

Oehm, A., Behrmann, I., Falk, W., Pawlita, M., Maier, G., Klas, C., Li-Weber, M., Richards, S., Dhein, J., Trauth, B. C., and et al. (1992). Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. *J Biol Chem* 267, 10709-10715.

Ohtani, N., Brennan, P., Gaubatz, S., Sanij, E., Hertzog, P., Wolvetang, E., Ghysdael, J., Rowe, M., and Hara, E. (2003). Epstein-Barr virus LMP1 blocks p16INK4a-RB pathway by promoting nuclear export of E2F4/5. *J Cell Biol* 162, 173-183.

Okano, M. (1986). [Studies on Epstein-Barr virus (EBV) infection and reactivity of peripheral B lymphocytes to EBV in patients with ataxia telangiectasia]. *Hokkaido Igaku Zasshi* 61, 584-592.
Okkenhaug, K., and Vanhaesebroeck, B. (2001). New responsibilities for the PI3K regulatory subunit p85 alpha. *Sci STKE* 2001, PE1.

Okudaira, T., Yamamoto, K., Kawakami, H., Uchihara, J. N., Tomita, M., Masuda, M., Matsuda, T., Sairenji, T., Iha, H., Jeang, K. T., et al. (2006). Transactivation of CCL20 gene by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *Br J Haematol* 132, 293-302.

Onfelt, B., Nedvetzki, S., Yanagi, K., and Davis, D. M. (2004). Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *J Immunol* 173, 1511-1513.

Orlinick, J. R., Vaishnav, A., Elkon, K. B., and Chao, M. V. (1997). Requirement of cysteine-rich repeats of the Fas receptor for binding by the Fas ligand. *J Biol Chem* 272, 28889-28894.

Orlofsky, A., Weiss, L. M., Kawachi, N., and Prystowsky, M. B. (2002). Deficiency in the anti-apoptotic protein A1-a results in a diminished acute inflammatory response. *J Immunol* 168, 1840-1846.

Paine, E., Scheinman, R. I., Baldwin, A. S., Jr., and Raab-Traub, N. (1995). Expression of LMP1 in epithelial cells leads to the activation of a select subset of NF-kappa B/Rel family proteins. *J Virol* 69, 4572-4576.

Palumbo, G. J., Pickup, D. J., Fredrickson, T. N., McIntyre, L. J., and Buller, R. M. (1989). Inhibition of an inflammatory response is mediated by a 38-kDa protein of cowpox virus. *Virology* 172, 262-273.

Pan, G., Bauer, J. H., Haridas, V., Wang, S., Liu, D., Yu, G., Vincenz, C., Aggarwal, B. B., Ni, J., and Dixit, V. M. (1998a). Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. *FEBS Lett* 431, 351-356.

Pan, G., O'Rourke, K., and Dixit, V. M. (1998b). Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem* 273, 5841-5845.

Pandya, J., and Walling, D. M. (2004). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP-1) half-life in epithelial cells is down-regulated by lytic LMP-1. *J Virol* 78, 8404-8410.

Panousis, C. G., and Rowe, D. T. (1997). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2 associates with and is a substrate for mitogen-activated protein kinase. *J Virol* 71, 4752-4760.

- Papoff, G., Hausler, P., Eramo, A., Pagano, M. G., Di Leve, G., Signore, A., and Ruberti, G. (1999).** Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J Biol Chem* 274, 38241-38250.
- Park, J. H., and Faller, D. V. (2002).** Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 induction by histone deacetylase inhibitors mediates induction of intercellular adhesion molecule-1 expression and homotypic aggregation. *Virology* 303, 345-363.
- Parker, G. A., Crook, T., Bain, M., Sara, E. A., Farrell, P. J., and Allday, M. J. (1996).** Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA)3C is an immortalizing oncoprotein with similar properties to adenovirus E1A and papillomavirus E7. *Oncogene* 13, 2541-2549.
- Parker, G. A., Touitou, R., and Allday, M. J. (2000).** Epstein-Barr virus EBNA3C can disrupt multiple cell cycle checkpoints and induce nuclear division divorced from cytokinesis. *Oncogene* 19, 700-709.
- Parlato, S., Giammarioli, A. M., Logozzi, M., Lozupone, F., Matarrese, P., Luciani, F., Falchi, M., Malorni, W., and Fais, S. (2000).** CD95 (APO-1/Fas) linkage to the actin cytoskeleton through ezrin in human T lymphocytes: a novel regulatory mechanism of the CD95 apoptotic pathway. *Embo J* 19, 5123-5134.
- Paterson, R. L., Kelleher, C., Amankonah, T. D., Streib, J. E., Xu, J. W., Jones, J. F., and Gelfand, E. W. (1995).** Model of Epstein-Barr virus infection of human thymocytes: expression of viral genome and impact on cellular receptor expression in the T-lymphoblastic cell line, HPB-ALL. *Blood* 85, 456-464.
- Pawson, T., and Gish, G. D. (1992).** SH2 and SH3 domains: from structure to function. *Cell* 71, 359-362.
- Payraastre, B., Missy, K., Giuriato, S., Bodin, S., Plantavid, M., and Gratacap, M. (2001).** Phosphoinositides: key players in cell signalling, in time and space. *Cell Signal* 13, 377-387.
- Pegtel, D. M., Middeldorp, J., and Thorley-Lawson, D. A. (2004).** Epstein-Barr virus infection in ex vivo tonsil epithelial cell cultures of asymptomatic carriers. *J Virol* 78, 12613-12624.
- Pegtel, D. M., Subramanian, A., Sheen, T. S., Tsai, C. H., Golub, T. R., and Thorley-Lawson, D. A. (2005).** Epstein-Barr-virus-encoded LMP2A induces primary epithelial cell migration and invasion: possible role in nasopharyngeal carcinoma metastasis. *J Virol* 79, 15430-15442.
- Pender, M. P. (2003).** Infection of autoreactive B lymphocytes with EBV, causing chronic autoimmune diseases. *Trends Immunol* 24, 584-588.
- Peng, M., and Lundgren, E. (1992).** Transient expression of the Epstein-Barr virus LMP1 gene in human primary B cells induces cellular activation and DNA synthesis. *Oncogene* 7, 1775-1782.
- Peng, R., Moses, S. C., Tan, J., Kremmer, E., and Ling, P. D. (2005).** The Epstein-Barr virus EBNA-LP protein preferentially coactivates EBNA2-mediated stimulation of latent membrane proteins expressed from the viral divergent promoter. *J Virol* 79, 4492-4505.

- Peng, R., Tan, J., and Ling, P. D. (2000).** Conserved regions in the Epstein-Barr virus leader protein define distinct domains required for nuclear localization and transcriptional cooperation with EBNA2. *J Virol* 74, 9953-9963.
- Perrigoue, J. G., den Boon, J. A., Friedl, A., Newton, M. A., Ahlquist, P., and Sugden, B. (2005).** Lack of association between EBV and breast carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14, 809-814.
- Pervaiz, S. (2004).** Chemotherapeutic potential of the chemopreventive phytoalexin resveratrol. *Drug Resist Updat* 7, 333-344.
- Peter, M. E., and Krammer, P. H. (1998).** Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opin Immunol* 10, 545-551.
- Petros, A. M., Olejniczak, E. T., and Fesik, S. W. (2004).** Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta* 1644, 83-94.
- Pinkoski, M. J., Brunner, T., Green, D. R., and Lin, T. (2000).** Fas and Fas ligand in gut and liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278, G354-366.
- Pitti, R. M., Marsters, S. A., Lawrence, D. A., Roy, M., Kischkel, F. C., Dowd, P., Huang, A., Donahue, C. J., Sherwood, S. W., Baldwin, D. T., *et al.* (1998).** Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 396, 699-703.
- Polekhina, G., House, C. M., Traficante, N., Mackay, J. P., Relaix, F., Sassoon, D. A., Parker, M. W., and Bowtell, D. D. (2002).** Siah ubiquitin ligase is structurally related to TRAF and modulates TNF-alpha signaling. *Nat Struct Biol* 9, 68-75.
- Pomerantz, J. L., and Baltimore, D. (2002).** Two pathways to NF-kappaB. *Mol Cell* 10, 693-695.
- Pope, J. H., Horne, M. K., and Scott, W. (1968).** Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *Int J Cancer* 3, 857-866.
- Porta, C., Hadj-Slimane, R., Nejmeddine, M., Pampin, M., Tovey, M. G., Espert, L., Alvarez, S., and Chelbi-Alix, M. K. (2005).** Interferons alpha and gamma induce p53-dependent and p53-independent apoptosis, respectively. *Oncogene* 24, 605-615.
- Portis, T., Dyck, P., and Longnecker, R. (2003).** Epstein-Barr Virus (EBV) LMP2A induces alterations in gene transcription similar to those observed in Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 102, 4166-4178.
- Portis, T., Ikeda, M., and Longnecker, R. (2004).** Epstein-Barr virus LMP2A: regulating cellular ubiquitination processes for maintenance of viral latency? *Trends Immunol* 25, 422-426.
- Portis, T., and Longnecker, R. (2003).** Epstein-Barr virus LMP2A interferes with global transcription factor regulation when expressed during B-lymphocyte development. *J Virol* 77, 105-114.
- Portis, T., and Longnecker, R. (2004).** Epstein-Barr virus (EBV) LMP2A alters normal transcriptional regulation following B-cell receptor activation. *Virology* 318, 524-533.

- Prang, N. S., Hornef, M. W., Jager, M., Wagner, H. J., Wolf, H., and Schwarzmann, F. M. (1997).** Lytic replication of Epstein-Barr virus in the peripheral blood: analysis of viral gene expression in B lymphocytes during infectious mononucleosis and in the normal carrier state. *Blood* 89, 1665-1677.
- Preciado, M. V., Chabay, P. A., De Matteo, E. N., Gonzalez, P., Grinstein, S., Actis, A., and Gass, H. D. (2005).** Epstein-Barr virus in breast carcinoma in Argentina. *Arch Pathol Lab Med* 129, 377-381.
- Precopio, M. L., Sullivan, J. L., Willard, C., Somasundaran, M., and Luzuriaga, K. (2003).** Differential kinetics and specificity of EBV-specific CD4+ and CD8+ T cells during primary infection. *J Immunol* 170, 2590-2598.
- Princiotta, M. F., Finzi, D., Qian, S. B., Gibbs, J., Schuchmann, S., Buttgereit, F., Bennink, J. R., and Yewdell, J. W. (2003).** Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* 18, 343-354.
- Prinetti, A., Chigorno, V., Prioni, S., Loberto, N., Marano, N., Tettamanti, G., and Sonnino, S. (2001).** Changes in the lipid turnover, composition, and organization, as sphingolipid-enriched membrane domains, in rat cerebellar granule cells developing in vitro. *J Biol Chem* 276, 21136-21145.
- Puls, A., Eliopoulos, A. G., Nobes, C. D., Bridges, T., Young, L. S., and Hall, A. (1999).** Activation of the small GTPase Cdc42 by the inflammatory cytokines TNF(alpha) and IL-1, and by the Epstein-Barr virus transforming protein LMP1. *J Cell Sci* 112 (Pt 17), 2983-2992.
- Purring-Koch, C., and McLendon, G. (2000).** Cytochrome c binding to Apaf-1: the effects of dATP and ionic strength. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 11928-11931.
- Puthalakath, H., Huang, D. C., O'Reilly, L. A., King, S. M., and Strasser, A. (1999).** The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell* 3, 287-296.
- Qu, L., and Rowe, D. T. (1992).** Epstein-Barr virus latent gene expression in uncultured peripheral blood lymphocytes. *J Virol* 66, 3715-3724.
- Rabson, M., Gradoville, L., Heston, L., and Miller, G. (1982).** Non-immortalizing P3J-HR-1 Epstein-Barr virus: a deletion mutant of its transforming parent, Jijoye. *J Virol* 44, 834-844.
- Radkov, S. A., Toutou, R., Brehm, A., Rowe, M., West, M., Kouzarides, T., and Allday, M. J. (1999).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with histone deacetylase to repress transcription. *J Virol* 73, 5688-5697.
- Ramsdell, F., Seaman, M. S., Miller, R. E., Tough, T. W., Alderson, M. R., and Lynch, D. H. (1994).** gld/gld mice are unable to express a functional ligand for Fas. *Eur J Immunol* 24, 928-933.
- Rasper, D. M., Vaillancourt, J. P., Hadano, S., Houtzager, V. M., Seiden, I., Keen, S. L., Tawa, P., Xanthoudakis, S., Nasir, J., Martindale, D., et al. (1998).** Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death Differ* 5, 271-288.

- Ravi, R., Bedi, A., Fuchs, E. J., and Bedi, A. (1998a).** CD95 (Fas)-induced caspase-mediated proteolysis of NF-kappaB. *Cancer Res* 58, 882-886.
- Ravi, R., Mookerjee, B., van Hensbergen, Y., Bedi, G. C., Giordano, A., El-Deiry, W. S., Fuchs, E. J., and Bedi, A. (1998b).** p53-mediated repression of nuclear factor-kappaB RelA via the transcriptional integrator p300. *Cancer Res* 58, 4531-4536.
- Ray, C. A., Black, R. A., Kronheim, S. R., Greenstreet, T. A., Sleath, P. R., Salvesen, G. S., and Pickup, D. J. (1992).** Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Cell* 69, 597-604.
- Rebe, C., Cathelin, S., Launay, S., Filomenko, R., Prevotat, L., L'Ollivier, C., Gyan, E., Micheau, O., Grant, S., Dubart-Kupperschmitt, A., *et al.* (2006).** Caspase-8 prevents sustained activation of NF- κ B in monocytes undergoing macrophagic differentiation. *Blood*.
- Reed, J. C., Doctor, K. S., and Godzik, A. (2004).** The domains of apoptosis: a genomics perspective. *Sci STKE* 2004, re9.
- Revoltella, R. P., Vigneti, E., Fruscalzo, A., Park, M., Ragona, G., Rocchi, G., and Calef, E. (1989).** Epstein-Barr virus DNA sequences in precursor monocyte-macrophage cell lines established from the bone marrow of children with maturation defects of haematopoiesis. *J Gen Virol* 70 (Pt 5), 1203-1215.
- Rice, R. L., Tang, D. G., and Taylor, J. D. (1998).** Actin cleavage in various tumor cells is not a critical requirement for executing apoptosis. *Pathol Oncol Res* 4, 135-145.
- Richardson, C., Fielding, C., Rowe, M., and Brennan, P. (2003).** Epstein-Barr virus regulates STAT1 through latent membrane protein 1. *J Virol* 77, 4439-4443.
- Rickinson, A. B., and Lane, P. J. (2000).** Epstein-Barr virus: Co-opting B-cell memory and migration. *Curr Biol* 10, R120-123.
- Rickinson, A. B., and Moss, D. J. (1997).** Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol* 15, 405-431.
- Riedl, S. J., Renatus, M., Snipas, S. J., and Salvesen, G. S. (2001).** Mechanism-based inactivation of caspases by the apoptotic suppressor p35. *Biochemistry* 40, 13274-13280.
- Riedl, S. J., and Shi, Y. (2004).** Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 897-907.
- Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., Hivroz, C., Roberts, I. A., Debatin, K. M., Fischer, A., and de Villartay, J. P. (1995).** Mutations in Fas associated with human lymphoproliferative syndrome and autoimmunity. *Science* 268, 1347-1349.
- Robertson, E. S., Lin, J., and Kieff, E. (1996).** The amino-terminal domains of Epstein-Barr virus nuclear proteins 3A, 3B, and 3C interact with RBPJ(kappa). *J Virol* 70, 3068-3074.
- Rodriguez, J., and Lazebnik, Y. (1999).** Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 13, 3179-3184.

- Rodriguez, M. S., Wright, J., Thompson, J., Thomas, D., Baleux, F., Virelizier, J. L., Hay, R. T., and Arenzana-Seisdedos, F. (1996).** Identification of lysine residues required for signal-induced ubiquitination and degradation of I kappa B-alpha in vivo. *Oncogene* 12, 2425-2435.
- Rooney, C. M., Rowe, D. T., Ragot, T., and Farrell, P. J. (1989).** The spliced BZLF1 gene of Epstein-Barr virus (EBV) transactivates an early EBV promoter and induces the virus productive cycle. *J Virol* 63, 3109-3116.
- Rooney, C. M., Smith, C. A., Ng, C. Y., Loftin, S. K., Sixbey, J. W., Gan, Y., Srivastava, D. K., Bowman, L. C., Krance, R. A., Brenner, M. K., and Heslop, H. E. (1998).** Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 92, 1549-1555.
- Rosendorff, A., Illanes, D., David, G., Lin, J., Kieff, E., and Johannsen, E. (2004).** EBNA3C coactivation with EBNA2 requires a SUMO homology domain. *J Virol* 78, 367-377.
- Rosse, T., Olivier, R., Monney, L., Rager, M., Conus, S., Fellay, I., Jansen, B., and Borner, C. (1998).** Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 391, 496-499.
- Rothenberger, S., Burns, K., Rousseaux, M., Tschopp, J., and Bron, C. (2003).** Ubiquitination of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 depends on the integrity of the TRAF binding site. *Oncogene* 22, 5614-5618.
- Rotonda, J., Nicholson, D. W., Fazil, K. M., Gallant, M., Gareau, Y., Labelle, M., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Ruel, R., Vaillancourt, J. P., et al. (1996).** The three-dimensional structure of apopain/ CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol* 3, 619-625.
- Rowe, M., Peng-Pilon, M., Huen, D. S., Hardy, R., Croom-Carter, D., Lundgren, E., and Rickinson, A. B. (1994).** Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell-specific response that is delayed relative to NF-kappa B activation and to induction of cell surface markers. *J Virol* 68, 5602-5612.
- Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. (1997).** The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo J* 16, 6914-6925.
- Ruchaud, S., Korfali, N., Villa, P., Kottke, T. J., Dingwall, C., Kaufmann, S. H., and Earnshaw, W. C. (2002).** Caspase-6 gene disruption reveals a requirement for lamin A cleavage in apoptotic chromatin condensation. *Embo J* 21, 1967-1977.
- Rudert, F., Wang, Y., Lindridge, E., and Watson, J. (1997).** Apoptosis through CD95 (Fas/APO-1), but not a CD40/CD95 chimeric receptor, is inhibited by phorbol-12-myristate-13-acetate. *DNA Cell Biol* 16, 197-205.
- Ruiz-Ruiz, C., Robledo, G., Font, J., Izquierdo, M., and Lopez-Rivas, A. (1999).** Protein kinase C inhibits CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis by at least two different mechanisms in Jurkat T cells. *J Immunol* 163, 4737-4746.
- Ryan, K. M., Ernst, M. K., Rice, N. R., and Vousden, K. H. (2000).** Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature* 404, 892-897.

- Sadler, R. H., and Raab-Traub, N. (1995).** The Epstein-Barr virus 3.5-kilobase latent membrane protein 1 mRNA initiates from a TATA-Less promoter within the first terminal repeat. *J Virol* 69, 4577-4581.
- Saito, N., Courtois, G., Chiba, A., Yamamoto, N., Nitta, T., Hironaka, N., Rowe, M., Yamamoto, N., and Yamaoka, S. (2003).** Two carboxyl-terminal activation regions of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activate NF-kappaB through distinct signaling pathways in fibroblast cell lines. *J Biol Chem* 278, 46565-46575.
- Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998).** Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96-99.
- Sakai, T., Taniguchi, Y., Tamura, K., Minoguchi, S., Fukuhara, T., Strobl, L. J., Zimmer-Strobl, U., Bornkamm, G. W., and Honjo, T. (1998).** Functional replacement of the intracellular region of the Notch1 receptor by Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol* 72, 6034-6039.
- Saleh, A., Srinivasula, S. M., Acharya, S., Fishel, R., and Alnemri, E. S. (1999).** Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation. *J Biol Chem* 274, 17941-17945.
- Salomoni, P., and Khelifi, A. F. (2006).** Daxx: death or survival protein? *Trends Cell Biol* 16, 97-104.
- Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1999).** Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10964-10967.
- Samejima, K., Svingen, P. A., Basi, G. S., Kottke, T., Mesner, P. W., Jr., Stewart, L., Durrieu, F., Poirier, G. G., Alnemri, E. S., Champoux, J. J., *et al.* (1999).** Caspase-mediated cleavage of DNA topoisomerase I at unconventional sites during apoptosis. *J Biol Chem* 274, 4335-4340.
- Sample, J., Liebowitz, D., and Kieff, E. (1989).** Two related Epstein-Barr virus membrane proteins are encoded by separate genes. *J Virol* 63, 933-937.
- Sandberg, M., Hammerschmidt, W., and Sugden, B. (1997).** Characterization of LMP-1's association with TRAF1, TRAF2, and TRAF3. *J Virol* 71, 4649-4656.
- Sandberg, M. L., Kaykas, A., and Sugden, B. (2000).** Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus inhibits as well as stimulates gene expression. *J Virol* 74, 9755-9761.
- Sartorius, U., Schmitz, I., and Krammer, P. H. (2001).** Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *ChemBiochem* 2, 20-29.
- Sato, T., Hirasawa, A., Kawabuchi, Y., Nishikawa, T., and Wakabayashi, Y. (2000).** Cellular expressions and serum concentrations of Fas ligand and Fas receptor in patients with infectious mononucleosis. *Int J Hematol* 72, 329-336.
- Sato, T., Irie, S., Kitada, S., and Reed, J. C. (1995).** FAP-1: a protein tyrosine phosphatase that associates with Fas. *Science* 268, 411-415.

- Savage, K. J., Monti, S., Kutok, J. L., Cattoretti, G., Neuberg, D., De Leval, L., Kurtin, P., Dal Cin, P., Ladd, C., Feuerhake, F., et al. (2003).** The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood* *102*, 3871-3879.
- Savard, M., Belanger, C., Tardif, M., Gourde, P., Flamand, L., and Gosselin, J. (2000).** Infection of primary human monocytes by Epstein-Barr virus. *J Virol* *74*, 2612-2619.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1998).** Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* *17*, 1675-1687.
- Scaffidi, C., Schmitz, I., Zha, J., Korsmeyer, S. J., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1999).** Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *J Biol Chem* *274*, 22532-22538.
- Schaefer, B. C., Strominger, J. L., and Speck, S. H. (1997).** Host-cell-determined methylation of specific Epstein-Barr virus promoters regulates the choice between distinct viral latency programs. *Mol Cell Biol* *17*, 364-377.
- Schall, T. J., Lewis, M., Koller, K. J., Lee, A., Rice, G. C., Wong, G. H., Gatanaga, T., Granger, G. A., Lentz, R., Raab, H., and et al. (1990).** Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor. *Cell* *61*, 361-370.
- Scheel-Toellner, D., Wang, K., Craddock, R., Webb, P. R., McGettrick, H. M., Assi, L. K., Parkes, N., Clough, L. E., Gulbins, E., Salmon, M., and Lord, J. M. (2004).** Reactive oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signaling. *Blood* *104*, 2557-2564.
- Scheel-Toellner, D., Wang, K., Singh, R., Majeed, S., Raza, K., Curnow, S. J., Salmon, M., and Lord, J. M. (2002).** The death-inducing signalling complex is recruited to lipid rafts in Fas-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* *297*, 876-879.
- Schieven, G. L. (2005).** The biology of p38 kinase: a central role in inflammation. *Curr Top Med Chem* *5*, 921-928.
- Schmitz, I., Kirchhoff, S., and Krammer, P. H. (2000).** Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol* *32*, 1123-1136.
- Schneider, P., and Tschopp, J. (2000).** Apoptosis induced by death receptors. *Pharm Acta Helv* *74*, 281-286.
- Scholle, F., Bendt, K. M., and Raab-Traub, N. (2000).** Epstein-Barr virus LMP2A transforms epithelial cells, inhibits cell differentiation, and activates Akt. *J Virol* *74*, 10681-10689.
- Schultheiss, U., Puschner, S., Kremmer, E., Mak, T. W., Engelmann, H., Hammerschmidt, W., and Kieser, A. (2001).** TRAF6 is a critical mediator of signal transduction by the viral oncogene latent membrane protein 1. *Embo J* *20*, 5678-5691.
- Schuster, V. H., and Muschen, M. (2003).** Epstein-Barr virus and the B cell: a secret romance. *Trends Microbiol* *11*, 243-245.

Schutte, B., Henfling, M., Kolgen, W., Bouman, M., Meex, S., Leers, M. P., Nap, M., Bjorklund, V., Bjorklund, P., Bjorklund, B., et al. (2004). Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. *Exp Cell Res* 297, 11-26.

Seshagiri, S., and Miller, L. K. (1997). *Caenorhabditis elegans* CED-4 stimulates CED-3 processing and CED-3-induced apoptosis. *Curr Biol* 7, 455-460.

Shannon-Lowe, C. D., Neuhierl, B., Baldwin, G., Rickinson, A. B., and Delecluse, H. J. (2006). Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7065-7070.

Sharp, T. V., Raine, D. A., Gewert, D. R., Joshi, B., Jagus, R., and Clemens, M. J. (1999). Activation of the interferon-inducible (2'-5') oligoadenylate synthetase by the Epstein-Barr virus RNA, EBNA1. *Virology* 257, 303-313.

Shaulian, E., and Karin, M. (2002). AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* 4, E131-136.

Sheridan, J. P., Marsters, S. A., Pitti, R. M., Gurney, A., Skubatch, M., Baldwin, D., Ramakrishnan, L., Gray, C. L., Baker, K., Wood, W. I., et al. (1997). Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277, 818-821.

Sheu, L. F., Chen, A., Meng, C. L., Ho, K. C., Lee, W. H., Leu, F. J., and Chao, C. F. (1996). Enhanced malignant progression of nasopharyngeal carcinoma cells mediated by the expression of Epstein-Barr nuclear antigen 1 in vivo. *J Pathol* 180, 243-248.

Shi, C. S., and Kehrl, J. H. (2003). Tumor necrosis factor (TNF)-induced germinal center kinase-related (GCKR) and stress-activated protein kinase (SAPK) activation depends upon the E2/E3 complex Ubc13-Uev1A/TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2). *J Biol Chem* 278, 15429-15434.

Shi, Y. (2002). A conserved tetrapeptide motif: potentiating apoptosis through IAP-binding. *Cell Death Differ* 9, 93-95.

Shimakage, M., Kimura, M., Yanoma, S., Ibe, M., Yokota, S., Tsujino, G., Kozuka, T., Dezawa, T., Tamura, S., Ohshima, A., et al. (1999). Expression of latent and replicative-infection genes of Epstein-Barr virus in macrophage. *Arch Virol* 144, 157-166.

Shin, S., Sung, B. J., Cho, Y. S., Kim, H. J., Ha, N. C., Hwang, J. I., Chung, C. W., Jung, Y. K., and Oh, B. H. (2001). An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. *Biochemistry* 40, 1117-1123.

Shirakata, M., Imadome, K. I., Okazaki, K., and Hirai, K. (2001). Activation of TRAF5 and TRAF6 signal cascades negatively regulates the latent replication origin of Epstein-Barr virus through p38 mitogen-activated protein kinase. *J Virol* 75, 5059-5068.

Shire, K., Kapoor, P., Jiang, K., Hing, M. N., Sivachandran, N., Nguyen, T., and Frappier, L. (2006). Regulation of the EBNA1 Epstein-Barr virus protein by serine phosphorylation and arginine methylation. *J Virol* 80, 5261-5272.

Shu, H. B., Halpin, D. R., and Goeddel, D. V. (1997). Casper is a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis. *Immunity* 6, 751-763.

- Sica, A., Dorman, L., Viggiano, V., Cippitelli, M., Ghosh, P., Rice, N., and Young, H. A. (1997).** Interaction of NF-kappaB and NFAT with the interferon-gamma promoter. *J Biol Chem* 272, 30412-30420.
- Siegel, R. M., Frederiksen, J. K., Zacharias, D. A., Chan, F. K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R. Y., and Lenardo, M. J. (2000).** Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288, 2354-2357.
- Silins, S. L., and Sculley, T. B. (1994).** Modulation of vimentin, the CD40 activation antigen and Burkitt's lymphoma antigen (CD77) by the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-4. *Virology* 202, 16-24.
- Silverman, N., and Maniatis, T. (2001).** NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev* 15, 2321-2342.
- Simons, K., and Toomre, D. (2000).** Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-39.
- Sinclair, A. J., Brimmell, M., Shanahan, F., and Farrell, P. J. (1991).** Pathways of activation of the Epstein-Barr virus productive cycle. *J Virol* 65, 2237-2244.
- Sinclair, A. J., Palmero, I., Peters, G., and Farrell, P. J. (1994).** EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *Embo J* 13, 3321-3328.
- Sjoblom-Hallen, A., Yang, W., Jansson, A., and Rymo, L. (1999).** Silencing of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 gene by the Max-Mad1-mSin3A modulator of chromatin structure. *J Virol* 73, 2983-2993.
- Sjoblom, A., Yang, W., Palmqvist, L., Jansson, A., and Rymo, L. (1998).** An ATF/CRE element mediates both EBNA2-dependent and EBNA2-independent activation of the Epstein-Barr virus LMP1 gene promoter. *J Virol* 72, 1365-1376.
- Slee, E. A., Adrain, C., and Martin, S. J. (1999).** Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ* 6, 1067-1074.
- Smith, C. A., Davis, T., Anderson, D., Solam, L., Beckmann, M. P., Jerzy, R., Dower, S. K., Cosman, D., and Goodwin, R. G. (1990).** A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 248, 1019-1023.
- Snow, A. L., Lambert, S. L., Natkunam, Y., Esquivel, C. O., Krams, S. M., and Martinez, O. M. (2006).** EBV can protect latently infected B cell lymphomas from death receptor-induced apoptosis. *J Immunol* 177, 3283-3293.
- Soldani, C., and Scovassi, A. I. (2002).** Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis* 7, 321-328.
- Song, J. J., and Lee, Y. J. (2003).** Role of the ASK1-SEK1-JNK1-HIPK1 signal in Daxx trafficking and ASK1 oligomerization. *J Biol Chem* 278, 47245-47252.

- Song, J. J., and Lee, Y. J. (2004).** Tryptophan 621 and serine 667 residues of Daxx regulate its nuclear export during glucose deprivation. *J Biol Chem* 279, 30573-30578.
- Song, Q., Wei, T., Lees-Miller, S., Alnemri, E., Watters, D., and Lavin, M. F. (1997).** Resistance of actin to cleavage during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 157-162.
- Songyang, Z., Blechner, S., Hoagland, N., Hoekstra, M. F., Piwnica-Worms, H., and Cantley, L. C. (1994a).** Use of an oriented peptide library to determine the optimal substrates of protein kinases. *Curr Biol* 4, 973-982.
- Songyang, Z., Shoelson, S. E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W. G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R. J., and et al. (1993).** SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72, 767-778.
- Songyang, Z., Shoelson, S. E., McGlade, J., Olivier, P., Pawson, T., Bustelo, X. R., Barbacid, M., Sabe, H., Hanafusa, H., Yi, T., and et al. (1994b).** Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol Cell Biol* 14, 2777-2785.
- Speck, P., and Longnecker, R. (2000).** Infection of breast epithelial cells with Epstein-Barr virus via cell-to-cell contact. *J Natl Cancer Inst* 92, 1849-1851.
- Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (1998).** Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell* 1, 949-957.
- Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Otilie, S., Bullrich, F., Banks, S., Wang, Y., Fernandes-Alnemri, T., Croce, C. M., Litwack, G., Tomaselli, K. J., et al. (1997).** FLAME-1, a novel FADD-like anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *J Biol Chem* 272, 18542-18545.
- Stamenkovic, I., Clark, E. A., and Seed, B. (1989).** A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. *Embo J* 8, 1403-1410.
- Stelman, L. S., Pohnert, S. C., Shelton, J. G., Franklin, R. A., Bertrand, F. E., and McCubrey, J. A. (2004).** JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 18, 189-218.
- Stegh, A. H., Barnhart, B. C., Volkland, J., Algeciras-Schimmich, A., Ke, N., Reed, J. C., and Peter, M. E. (2002).** Inactivation of caspase-8 on mitochondria of Bcl-xL-expressing MCF7-Fas cells: role for the bifunctional apoptosis regulator protein. *J Biol Chem* 277, 4351-4360.
- Steller, H. (1995).** Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267, 1445-1449.
- Stevenson, D., Charalambous, C., and Wilson, J. B. (2005).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (CAO) up-regulates VEGF and TGF alpha concomitant with hyperplasia, with subsequent up-regulation of p16 and MMP9. *Cancer Res* 65, 8826-8835.
- Strasser, A. (2005).** The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5, 189-200.

- Strasser, A., Puthalakath, H., Bouillet, P., Huang, D. C., O'Connor, L., O'Reilly, L. A., Cullen, L., Cory, S., and Adams, J. M. (2000).** The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control. *Ann N Y Acad Sci* 917, 541-548.
- Straus, S. E., Jaffe, E. S., Puck, J. M., Dale, J. K., Elkon, K. B., Rosen-Wolff, A., Peters, A. M., Sneller, M. C., Hallahan, C. W., Wang, J., et al. (2001).** The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* 98, 194-200.
- Strockbine, L. D., Cohen, J. I., Farrah, T., Lyman, S. D., Wagener, F., DuBose, R. F., Armitage, R. J., and Spriggs, M. K. (1998).** The Epstein-Barr virus BARF1 gene encodes a novel, soluble colony-stimulating factor-1 receptor. *J Virol* 72, 4015-4021.
- Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P., and Nagata, S. (1993).** Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75, 1169-1178.
- Sudol, M. (1996).** Structure and function of the WW domain. *Prog Biophys Mol Biol* 65, 113-132.
- Sulston, J. E., Schierenberg, E., White, J. G., and Thomson, J. N. (1983).** The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 100, 64-119.
- Sun, Q., Burton, R. L., Pollok, K. E., Emanuel, D. J., and Lucas, K. G. (1999).** CD4(+) Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-lymphocytes from human umbilical cord blood. *Cell Immunol* 195, 81-88.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., et al. (1999).** Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.
- Suzuki, M., Youle, R. J., and Tjandra, N. (2000).** Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103, 645-654.
- Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., and Takahashi, R. (2001).** Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 8662-8667.
- Swart, R., Ruf, I. K., Sample, J., and Longnecker, R. (2000).** Latent membrane protein 2A-mediated effects on the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt pathway. *J Virol* 74, 10838-10845.
- Szekely, L., Selivanova, G., Magnusson, K. P., Klein, G., and Wiman, K. G. (1993).** EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5455-5459.
- Tabiasco, J., Vercellone, A., Meggetto, F., Hudrisier, D., Brousset, P., and Fournie, J. J. (2003).** Acquisition of viral receptor by NK cells through immunological synapse. *J Immunol* 170, 5993-5998.
- Takada, K., and Nanbo, A. (2001).** The role of EBERs in oncogenesis. *Semin Cancer Biol* 11, 461-467.

- Takahashi, A., Alnemri, E. S., Lazebnik, Y. A., Fernandes-Alnemri, T., Litwack, G., Moir, R. D., Goldman, R. D., Poirier, G. G., Kaufmann, S. H., and Earnshaw, W. C. (1996).** Cleavage of lamin A by Mch2 alpha but not CPP32: multiple interleukin 1 beta-converting enzyme-related proteases with distinct substrate recognition properties are active in apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8395-8400.
- Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D. A., Vigna, N., Oltersdorf, T., and Reed, J. C. (1998).** IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res* 58, 5315-5320.
- Tan, L. C., Gudgeon, N., Annels, N. E., Hansasuta, P., O'Callaghan, C. A., Rowland-Jones, S., McMichael, A. J., Rickinson, A. B., and Callan, M. F. (1999a).** A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers. *J Immunol* 162, 1827-1835.
- Tan, Y., Ruan, H., Demeter, M. R., and Comb, M. J. (1999b).** p90(RSK) blocks bad-mediated cell death via a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem* 274, 34859-34867.
- Tang, D., and Kidd, V. J. (1998).** Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis. *J Biol Chem* 273, 28549-28552.
- Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H., and Goeddel, D. V. (1993).** A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* 74, 845-853.
- Tepper, C. G., and Seldin, M. F. (1999).** Modulation of caspase-8 and FLICE-inhibitory protein expression as a potential mechanism of Epstein-Barr virus tumorigenesis in Burkitt's lymphoma. *Blood* 94, 1727-1737.
- Thatte, U., Bagadey, S., and Dahanukar, S. (2000).** Modulation of programmed cell death by medicinal plants. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 46, 199-214.
- Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinl, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J. L., Schroter, M., *et al.* (1997).** Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386, 517-521.
- Thome, M., and Tschopp, J. (2001).** Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. *Nat Rev Immunol* 1, 50-58.
- Thorley-Lawson, D. A. (2001).** Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol* 1, 75-82.
- Thorley-Lawson, D. A. (2005).** EBV the prototypical human tumor virus--just how bad is it? *J Allergy Clin Immunol* 116, 251-261; quiz 262.
- Thorley-Lawson, D. A., and Babcock, G. J. (1999).** A model for persistent infection with Epstein-Barr virus: the stealth virus of human B cells. *Life Sci* 65, 1433-1453.
- Thorley-Lawson, D. A., and Gross, A. (2004).** Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* 350, 1328-1337.

- Thornberry, N. A., Bull, H. G., Calaycay, J. R., Chapman, K. T., Howard, A. D., Kostura, M. J., Miller, D. K., Molineaux, S. M., Weidner, J. R., Aunins, J., and et al. (1992).** A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 356, 768-774.
- Thornberry, N. A., and Lazebnik, Y. (1998).** Caspases: enemies within. *Science* 281, 1312-1316.
- Thornberry, N. A., Peterson, E. P., Zhao, J. J., Howard, A. D., Griffin, P. R., and Chapman, K. T. (1994).** Inactivation of interleukin-1 beta converting enzyme by peptide (acyloxy)methyl ketones. *Biochemistry* 33, 3934-3940.
- Thureau, M., Everett, H., Tapernoux, M., Tschopp, J., and Thome, M. (2006).** The TRAF3-binding site of human molluscipox virus FLIP molecule MC159 is critical for its capacity to inhibit Fas-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 13, 1577-1585.
- Tierney, R. J., Steven, N., Young, L. S., and Rickinson, A. B. (1994).** Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state. *J Virol* 68, 7374-7385.
- Toker, A., and Cantley, L. C. (1997).** Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387, 673-676.
- Tolomeo, M., Dusonchet, L., Meli, M., Grimaudo, S., D'Alessandro, N., Papoff, G., Ruberti, G., and Rausa, L. (1998).** The CD95/CD95 ligand system is not the major effector in anticancer drug-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* 5, 735-742.
- Tomkinson, B., and Kieff, E. (1992).** Use of second-site homologous recombination to demonstrate that Epstein-Barr virus nuclear protein 3B is not important for lymphocyte infection or growth transformation in vitro. *J Virol* 66, 2893-2903.
- Tomkinson, B., Robertson, E., and Kieff, E. (1993).** Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 67, 2014-2025.
- Tong, X., Drapkin, R., Reinberg, D., and Kieff, E. (1995a).** The 62- and 80-kDa subunits of transcription factor IIIH mediate the interaction with Epstein-Barr virus nuclear protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3259-3263.
- Tong, X., Drapkin, R., Yalamanchili, R., Mosialos, G., and Kieff, E. (1995b).** The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain forms a complex with a novel cellular coactivator that can interact with TFIIE. *Mol Cell Biol* 15, 4735-4744.
- Tourneur, L., Buzyn, A., and Chiocchia, G. (2005).** FADD adaptor in cancer. *Med Immunol* 4, 1.
- Tourneur, L., Delluc, S., Levy, V., Valensi, F., Radford-Weiss, I., Legrand, O., Vargaftig, J., Boix, C., Macintyre, E. A., Varet, B., et al. (2004).** Absence or low expression of fas-associated protein with death domain in acute myeloid leukemia cells predicts resistance to chemotherapy and poor outcome. *Cancer Res* 64, 8101-8108.

- Townsend, P. A., Scarabelli, T. M., Davidson, S. M., Knight, R. A., Latchman, D. S., and Stephanou, A. (2004).** STAT-1 interacts with p53 to enhance DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279, 5811-5820.
- Trauth, B. C., Klas, C., Peters, A. M., Matzku, S., Moller, P., Falk, W., Debatin, K. M., and Krammer, P. H. (1989).** Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245, 301-305.
- Tremat, P., Tabiasco, J., Andre, P., Faumont, N., Meggetto, F., Delsol, G., Gascoyne, R. D., Fournie, J. J., Vivier, E., and Brousset, P. (2002).** Evidence for early infection of nonneoplastic natural killer cells by Epstein-Barr virus. *J Virol* 76, 11139-11142.
- Trompouki, E., Hatzivassiliou, E., Tschritzis, T., Farmer, H., Ashworth, A., and Mosialos, G. (2003).** CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature* 424, 793-796.
- Tsai, C. N., Lee, C. M., Chien, C. K., Kuo, S. C., and Chang, Y. S. (1999).** Additive effect of Sp1 and Sp3 in regulation of the ED-L1E promoter of the EBV LMP 1 gene in human epithelial cells. *Virology* 261, 288-294.
- Tsai, C. N., Tsai, C. L., Tse, K. P., Chang, H. Y., and Chang, Y. S. (2002).** The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the downregulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10084-10089.
- Tsang, S. F., Wang, F., Izumi, K. M., and Kieff, E. (1991).** Delineation of the cis-acting element mediating EBNA-2 transactivation of latent infection membrane protein expression. *J Virol* 65, 6765-6771.
- Tschopp, J., Irmeler, M., and Thome, M. (1998).** Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* 10, 552-558.
- Tsoukas, C. D., and Lambris, J. D. (1993).** Expression of EBV/C3d receptors on T cells: biological significance. *Immunol Today* 14, 56-59.
- Tucker, S. J., Rae, C., Littlejohn, A. F., Paul, A., and MacEwan, D. J. (2004).** Switching leukemia cell phenotype between life and death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12940-12945.
- Tugizov, S. M., Berline, J. W., and Palefsky, J. M. (2003).** Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells. *Nat Med* 9, 307-314.
- Tun, T., Hamaguchi, Y., Matsunami, N., Furukawa, T., Honjo, T., and Kawaichi, M. (1994).** Recognition sequence of a highly conserved DNA binding protein RBP-J kappa. *Nucleic Acids Res* 22, 965-971.
- Tzimas, C., Michailidou, G., Arsenakis, M., Kieff, E., Mosialos, G., and Hatzivassiliou, E. G. (2006).** Human ubiquitin specific protease 31 is a deubiquitinating enzyme implicated in activation of nuclear factor-kappaB. *Cell Signal* 18, 83-92.
- Uchida, J., Yasui, T., Takaoka-Shichijo, Y., Muraoka, M., Kulwichit, W., Raab-Traub, N., and Kikutani, H. (1999).** Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science* 286, 300-303.

- Uchihara, J. N., Krensky, A. M., Matsuda, T., Kawakami, H., Okudaira, T., Masuda, M., Ohta, T., Takasu, N., and Mori, N. (2005).** Transactivation of the CCL5/RANTES gene by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *Int J Cancer* *114*, 747-755.
- Ungefroren, H., Kruse, M. L., Trauzold, A., Roeschmann, S., Roeder, C., Arlt, A., Henne-Bruns, D., and Kalthoff, H. (2001).** FAP-1 in pancreatic cancer cells: functional and mechanistic studies on its inhibitory role in CD95-mediated apoptosis. *J Cell Sci* *114*, 2735-2746.
- Uren, A. G., Pakusch, M., Hawkins, C. J., Puls, K. L., and Vaux, D. L. (1996).** Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 4974-4978.
- van Beek, J., Brink, A. A., Vervoort, M. B., van Zijp, M. J., Meijer, C. J., van den Brule, A. J., and Middeldorp, J. M. (2003).** In vivo transcription of the Epstein-Barr virus (EBV) BamHI-A region without associated in vivo BARF0 protein expression in multiple EBV-associated disorders. *J Gen Virol* *84*, 2647-2659.
- van Beek, J., zur Hausen, A., Kranenborg, E. K., Warring, R. J., Bloemena, E., Craanen, M. E., van de Velde, C. J., Middeldorp, J. M., Meijer, C. J., and van den Brule, A. J. (2002).** A rapid and reliable enzyme immunoassay PCR-based screening method to identify EBV-carrying gastric carcinomas. *Mod Pathol* *15*, 870-877.
- Van de Craen, M., Declercq, W., Van den brande, I., Fiers, W., and Vandenabeele, P. (1999).** The proteolytic procaspase activation network: an in vitro analysis. *Cell Death Differ* *6*, 1117-1124.
- van Loo, G., Schotte, P., van Gurp, M., Demol, H., Hoorelbeke, B., Gevaert, K., Rodriguez, I., Ruiz-Carrillo, A., Vandekerckhove, J., Declercq, W., *et al.* (2001).** Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ* *8*, 1136-1142.
- van Wetering, S., van Buul, J. D., Quik, S., Mul, F. P., Anthony, E. C., ten Klooster, J. P., Collard, J. G., and Hordijk, P. L. (2002).** Reactive oxygen species mediate Rac-induced loss of cell-cell adhesion in primary human endothelial cells. *J Cell Sci* *115*, 1837-1846.
- Vander Heiden, M. G., Chandel, N. S., Williamson, E. K., Schumacker, P. T., and Thompson, C. B. (1997).** Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* *91*, 627-637.
- Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., Rebrikov, D., Brodianski, V. M., Kemper, O. C., Kollet, O., *et al.* (1998).** Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* *9*, 267-276.
- Vaux, D. L., Cory, S., and Adams, J. M. (1988).** Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* *335*, 440-442.
- Vaux, D. L., Weissman, I. L., and Kim, S. K. (1992).** Prevention of programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* by human bcl-2. *Science* *258*, 1955-1957.

- Veis, D. J., Sorenson, C. M., Shutter, J. R., and Korsmeyer, S. J. (1993).** Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* *75*, 229-240.
- Velasco, G., Grkovic, S., and Ansieau, S. (2006).** New insights into BS69 functions. *J Biol Chem* *281*, 16546-16550.
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., and Vaux, D. L. (2000).** Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* *102*, 43-53.
- Villa, P. G., Henzel, W. J., Sensenbrenner, M., Henderson, C. E., and Pettmann, B. (1998).** Calpain inhibitors, but not caspase inhibitors, prevent actin proteolysis and DNA fragmentation during apoptosis. *J Cell Sci* *111 (Pt 6)*, 713-722.
- Villunger, A., Egle, A., Kos, M., Hartmann, B. L., Geley, S., Kofler, R., and Greil, R. (1997).** Drug-induced apoptosis is associated with enhanced Fas (Apo-1/CD95) ligand expression but occurs independently of Fas (Apo-1/CD95) signaling in human T-acute lymphatic leukemia cells. *Cancer Res* *57*, 3331-3334.
- Villunger, A., Michalak, E. M., Coultas, L., Mullauer, F., Bock, G., Ausserlechner, M. J., Adams, J. M., and Strasser, A. (2003).** p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science* *302*, 1036-1038.
- Vockerodt, M., Haier, B., Buttgereit, P., Tesch, H., and Kube, D. (2001).** The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces interleukin-10 in Burkitt's lymphoma cells but not in Hodgkin's cells involving the p38/SAPK2 pathway. *Virology* *280*, 183-198.
- Vockerodt, M., Pinkert, D., Smola-Hess, S., Michels, A., Ransohoff, R. M., Tesch, H., and Kube, D. (2005).** The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 induces expression of the chemokine IP-10: importance of mRNA half-life regulation. *Int J Cancer* *114*, 598-605.
- Voss, M. D., Hille, A., Barth, S., Spurk, A., Hennrich, F., Holzer, D., Mueller-Lantzsch, N., Kremmer, E., and Grasser, F. A. (2001).** Functional cooperation of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 and the survival motor neuron protein in transactivation of the viral LMP1 promoter. *J Virol* *75*, 11781-11790.
- Wade, M., and Allday, M. J. (2000).** Epstein-Barr virus suppresses a G(2)/M checkpoint activated by genotoxins. *Mol Cell Biol* *20*, 1344-1360.
- Wajant, H., Haas, E., Schwenzler, R., Muhlenbeck, F., Kreuz, S., Schubert, G., Grell, M., Smith, C., and Scheurich, P. (2000).** Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of Fas-associated death domain protein (FADD). *J Biol Chem* *275*, 24357-24366.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2003).** Non-apoptotic Fas signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* *14*, 53-66.
- Wakiguchi, H. (2002).** Overview of Epstein-Barr virus-associated diseases in Japan. *Crit Rev Oncol Hematol* *44*, 193-202.

- Wakisaka, N., Murono, S., Yoshizaki, T., Furukawa, M., and Pagano, J. S. (2002).** Epstein-barr virus latent membrane protein 1 induces and causes release of fibroblast growth factor-2. *Cancer Res* 62, 6337-6344.
- Waltzer, L., Bourillot, P. Y., Sergeant, A., and Manet, E. (1995).** RBP-J kappa repression activity is mediated by a co-repressor and antagonized by the Epstein-Barr virus transcription factor EBNA2. *Nucleic Acids Res* 23, 4939-4945.
- Waltzer, L., Logeat, F., Brou, C., Israel, A., Sergeant, A., and Manet, E. (1994).** The human J kappa recombination signal sequence binding protein (RBP-J kappa) targets the Epstein-Barr virus EBNA2 protein to its DNA responsive elements. *Embo J* 13, 5633-5638.
- Waltzer, L., Perricaudet, M., Sergeant, A., and Manet, E. (1996).** Epstein-Barr virus EBNA3A and EBNA3C proteins both repress RBP-J kappa-EBNA2-activated transcription by inhibiting the binding of RBP-J kappa to DNA. *J Virol* 70, 5909-5915.
- Wan, J., Sun, L., Mendoza, J. W., Chui, Y. L., Huang, D. P., Chen, Z. J., Suzuki, N., Suzuki, S., Yeh, W. C., Akira, S., et al. (2004).** Elucidation of the c-Jun N-terminal kinase pathway mediated by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1. *Mol Cell Biol* 24, 192-199.
- Wan, J., Zhang, W., Wu, L., Bai, T., Zhang, M., Lo, K. W., Chui, Y. L., Cui, Y., Tao, Q., Yamamoto, M., et al. (2006).** BS69, a specific adaptor in the latent membrane protein 1-mediated c-Jun N-terminal kinase pathway. *Mol Cell Biol* 26, 448-456.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. R., Inoue, J., and Chen, Z. J. (2001a).** TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 412, 346-351.
- Wang, D., Liebowitz, D., and Kieff, E. (1985).** An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* 43, 831-840.
- Wang, D., Liebowitz, D., Wang, F., Gregory, C., Rickinson, A., Larson, R., Springer, T., and Kieff, E. (1988).** Epstein-Barr virus latent infection membrane protein alters the human B-lymphocyte phenotype: deletion of the amino terminus abolishes activity. *J Virol* 62, 4173-4184.
- Wang, F., Gregory, C., Sample, C., Rowe, M., Liebowitz, D., Murray, R., Rickinson, A., and Kieff, E. (1990a).** Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J Virol* 64, 2309-2318.
- Wang, F., Kikutani, H., Tsang, S. F., Kishimoto, T., and Kieff, E. (1991).** Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivates a cis-acting CD23 DNA element. *J Virol* 65, 4101-4106.
- Wang, F., Tsang, S. F., Kurilla, M. G., Cohen, J. I., and Kieff, E. (1990b).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivates latent membrane protein LMP1. *J Virol* 64, 3407-3416.
- Wang, J., Boja, E. S., Tan, W., Tekle, E., Fales, H. M., English, S., Mieyal, J. J., and Chock, P. B. (2001b).** Reversible glutathionylation regulates actin polymerization in A431 cells. *J Biol Chem* 276, 47763-47766.
- Wang, L., Grossman, S. R., and Kieff, E. (2000).** Epstein-Barr virus nuclear protein 2 interacts with p300, CBP, and PCAF histone acetyltransferases in activation of the LMP1 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 430-435.

- Wang, S., Rowe, M., and Lundgren, E. (1996).** Expression of the Epstein Barr virus transforming protein LMP1 causes a rapid and transient stimulation of the Bcl-2 homologue Mcl-1 levels in B-cell lines. *Cancer Res* 56, 4610-4613.
- Wang, X. (2001).** The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15, 2922-2933.
- Wang, X., and Hutt-Fletcher, L. M. (1998).** Epstein-Barr virus lacking glycoprotein gp42 can bind to B cells but is not able to infect. *J Virol* 72, 158-163.
- Wang, X., Kenyon, W. J., Li, Q., Mullberg, J., and Hutt-Fletcher, L. M. (1998).** Epstein-Barr virus uses different complexes of glycoproteins gH and gL to infect B lymphocytes and epithelial cells. *J Virol* 72, 5552-5558.
- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Nagata, S. (1992).** Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356, 314-317.
- Watry, D., Hedrick, J. A., Siervo, S., Rhodes, G., Lamberti, J. J., Lambris, J. D., and Tsoukas, C. D. (1991).** Infection of human thymocytes by Epstein-Barr virus. *J Exp Med* 173, 971-980.
- Weber-Nordt, R. M., Egen, C., Wehinger, J., Ludwig, W., Gouilleux-Gruart, V., Mertelsmann, R., and Finke, J. (1996).** Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. *Blood* 88, 809-816.
- Weber, R. (1964).** Ultrastructural Changes In Regressing Tail Muscles Of *Xenopus* Larvae At Metamorphosis. *J Cell Biol* 22, 481-487.
- Webster, G. A., and Perkins, N. D. (1999).** Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53. *Mol Cell Biol* 19, 3485-3495.
- Wei, G., Schaffner, A. E., Baker, K. M., Mansky, K. C., and Ostrowski, M. C. (2003).** Ets-2 interacts with co-repressor BS69 to repress target gene expression. *Anticancer Res* 23, 2173-2178.
- Wei, Y., Fox, T., Chambers, S. P., Sintchak, J., Coll, J. T., Golec, J. M., Swenson, L., Wilson, K. P., and Charifson, P. S. (2000).** The structures of caspases-1, -3, -7 and -8 reveal the basis for substrate and inhibitor selectivity. *Chem Biol* 7, 423-432.
- White, E. (1996).** Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Genes Dev* 10, 1-15.
- Widmann, C., Gerwins, P., Johnson, N. L., Jarpe, M. B., and Johnson, G. L. (1998a).** MEK kinase 1, a substrate for DEVD-directed caspases, is involved in genotoxin-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 18, 2416-2429.
- Widmann, C., Gibson, S., and Johnson, G. L. (1998b).** Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J Biol Chem* 273, 7141-7147.

- Widmann, C., Johnson, N. L., Gardner, A. M., Smith, R. J., and Johnson, G. L. (1997).** Potentiation of apoptosis by low dose stress stimuli in cells expressing activated MEK kinase 1. *Oncogene* *15*, 2439-2447.
- Wilhelm, S., Wagner, H., and Hacker, G. (1998).** Activation of caspase-3-like enzymes in non-apoptotic T cells. *Eur J Immunol* *28*, 891-900.
- Wilson, A. D., and Morgan, A. J. (2002).** Primary immune responses by cord blood CD4(+) T cells and NK cells inhibit Epstein-Barr virus B-cell transformation in vitro. *J Virol* *76*, 5071-5081.
- Wilson, J. B., Bell, J. L., and Levine, A. J. (1996).** Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. *Embo J* *15*, 3117-3126.
- Wilson, J. B., Weinberg, W., Johnson, R., Yuspa, S., and Levine, A. J. (1990).** Expression of the BNLF-1 oncogene of Epstein-Barr virus in the skin of transgenic mice induces hyperplasia and aberrant expression of keratin 6. *Cell* *61*, 1315-1327.
- Winberg, G., Matskova, L., Chen, F., Plant, P., Rotin, D., Gish, G., Ingham, R., Ernberg, I., and Pawson, T. (2000).** Latent membrane protein 2A of Epstein-Barr virus binds WW domain E3 protein-ubiquitin ligases that ubiquitinate B-cell tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* *20*, 8526-8535.
- Wischhusen, J., Schneider, D., Mittelbronn, M., Meyermann, R., Engelmann, H., Jung, G., Wiendl, H., and Weller, M. (2005).** Death receptor-mediated apoptosis in human malignant glioma cells: modulation by the CD40/CD40L system. *J Neuroimmunol* *162*, 28-42.
- Wong, B. R., Besser, D., Kim, N., Arron, J. R., Vologodskaia, M., Hanafusa, H., and Choi, Y. (1999).** TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol Cell* *4*, 1041-1049.
- Wu, D. Y., Kalpana, G. V., Goff, S. P., and Schubach, W. H. (1996).** Epstein-Barr virus nuclear protein 2 (EBNA2) binds to a component of the human SNF-SWI complex, hSNF5/Ini1. *J Virol* *70*, 6020-6028.
- Wu, H., Kapoor, P., and Frappier, L. (2002).** Separation of the DNA replication, segregation, and transcriptional activation functions of Epstein-Barr nuclear antigen 1. *J Virol* *76*, 2480-2490.
- Wu, L., Nakano, H., and Wu, Z. (2006).** The C-terminal activating region 2 of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 activates NF-kappaB through TRAF6 and TAK1. *J Biol Chem* *281*, 2162-2169.
- Wu, Y. C., Stanfield, G. M., and Horvitz, H. R. (2000).** NUC-1, a caenorhabditis elegans DNase II homolog, functions in an intermediate step of DNA degradation during apoptosis. *Genes Dev* *14*, 536-548.
- Wyllie, A. H. (1980).** Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* *284*, 555-556.
- Wyllie, A. H., Morris, R. G., Smith, A. L., and Dunlop, D. (1984).** Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol* *142*, 67-77.
- Xia, Z. P., and Chen, Z. J. (2005).** TRAF2: a double-edged sword? *Sci STKE* *2005*, pe7.

- Xie, P., and Bishop, G. A. (2004).** Roles of TNF receptor-associated factor 3 in signaling to B lymphocytes by carboxyl-terminal activating regions 1 and 2 of the EBV-encoded oncoprotein latent membrane protein 1. *J Immunol* *173*, 5546-5555.
- Xie, P., Hostager, B. S., and Bishop, G. A. (2004).** Requirement for TRAF3 in signaling by LMP1 but not CD40 in B lymphocytes. *J Exp Med* *199*, 661-671.
- Xie, P., Hostager, B. S., Munroe, M. E., Moore, C. R., and Bishop, G. A. (2006).** Cooperation between TNF receptor-associated factors 1 and 2 in CD40 signaling. *J Immunol* *176*, 5388-5400.
- Xin, B., He, Z., Yang, X., Chan, C. P., Ng, M. H., and Cao, L. (2001).** TRADD domain of Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 is essential for inducing immortalization and suppressing senescence of primary rodent fibroblasts. *J Virol* *75*, 3010-3015.
- Xiong, A., Clarke-Katzenberg, R. H., Valenzuela, G., Izumi, K. M., and Millan, M. T. (2004).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activates nuclear factor-kappa B in human endothelial cells and inhibits apoptosis. *Transplantation* *78*, 41-49.
- Xue, D., and Horvitz, H. R. (1995).** Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature* *377*, 248-251.
- Xue, S. A., Lampert, I. A., Haldane, J. S., Bridger, J. E., and Griffin, B. E. (2003).** Epstein-Barr virus gene expression in human breast cancer: protagonist or passenger? *Br J Cancer* *89*, 113-119.
- Yamamoto, N., Takizawa, T., Iwanaga, Y., Shimizu, N., and Yamamoto, N. (2000).** Malignant transformation of B lymphoma cell line BJAB by Epstein-Barr virus-encoded small RNAs. *FEBS Lett* *484*, 153-158.
- Yanagisawa, J., Takahashi, M., Kanki, H., Yano-Yanagisawa, H., Tazunoki, T., Sawa, E., Nishitoba, T., Kamishohara, M., Kobayashi, E., Kataoka, S., and Sato, T. (1997).** The molecular interaction of Fas and FAP-1. A tripeptide blocker of human Fas interaction with FAP-1 promotes Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* *272*, 8539-8545.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P., and Wang, X. (1997a).** Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* *275*, 1129-1132.
- Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H. Y., and Baltimore, D. (1997b).** Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell* *89*, 1067-1076.
- Yang, Y. L., and Li, X. M. (2000).** The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. *Cell Res* *10*, 169-177.
- Yao, H., Song, E., Chen, J., and Hamar, P. (2004).** Expression of FAP-1 by human colon adenocarcinoma: implication for resistance against Fas-mediated apoptosis in cancer. *Br J Cancer* *91*, 1718-1725.
- Yao, Q. Y., Rickinson, A. B., and Epstein, M. A. (1985).** A re-examination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals. *Int J Cancer* *35*, 35-42.

- Yasui, T., Luftig, M., Soni, V., and Kieff, E. (2004).** Latent infection membrane protein transmembrane FWLY is critical for intermolecular interaction, raft localization, and signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 278-283.
- Ye, H., Park, Y. C., Kreishman, M., Kieff, E., and Wu, H. (1999).** The structural basis for the recognition of diverse receptor sequences by TRAF2. *Mol Cell* *4*, 321-330.
- Ye, H., and Wu, H. (2000).** Thermodynamic characterization of the interaction between TRAF2 and tumor necrosis factor receptor peptides by isothermal titration calorimetry. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 8961-8966.
- Yewdell, J. W., Anton, L. C., and Bennink, J. R. (1996).** Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J Immunol* *157*, 1823-1826.
- Yin, Q., and Flemington, E. K. (2006).** siRNAs against the Epstein Barr virus latency replication factor, EBNA1, inhibit its function and growth of EBV-dependent tumor cells. *Virology* *346*, 385-393.
- Yin, X. M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K. A., and Korsmeyer, S. J. (1999).** Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* *400*, 886-891.
- Yin, Y., Manoury, B., and Fahraeus, R. (2003).** Self-inhibition of synthesis and antigen presentation by Epstein-Barr virus-encoded EBNA1. *Science* *301*, 1371-1374.
- Yonehara, S., Ishii, A., and Yonehara, M. (1989).** A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* *169*, 1747-1756.
- Young, L. S., Dawson, C. W., and Eliopoulos, A. G. (2000).** The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. *Mol Pathol* *53*, 238-247.
- Young, L. S., and Rickinson, A. B. (2004).** Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* *4*, 757-768.
- Yu, C. L., Meyer, D. J., Campbell, G. S., Larner, A. C., Carter-Su, C., Schwartz, J., and Jove, R. (1995).** Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science* *269*, 81-83.
- Yu, J., Zhang, L., Hwang, P. M., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (2001).** PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell* *7*, 673-682.
- Yuan, J., Shaham, S., Ledoux, S., Ellis, H. M., and Horvitz, H. R. (1993).** The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* *75*, 641-652.
- Yue, W., Shackelford, J., and Pagano, J. S. (2006).** cdc2/cyclin B1-dependent phosphorylation of EBNA2 at Ser243 regulates its function in mitosis. *J Virol* *80*, 2045-2050.
- Zamzami, N., Susin, S. A., Marchetti, P., Hirsch, T., Gomez-Monterrey, I., Castedo, M., and Kroemer, G. (1996).** Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med* *183*, 1533-1544.

- Zeng, L., and Zhou, M. M. (2002).** Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS Lett* 513, 124-128.
- Zhang, H., Xu, Q., Krajewski, S., Krajewska, M., Xie, Z., Fuess, S., Kitada, S., Pawlowski, K., Godzik, A., and Reed, J. C. (2000).** BAR: An apoptosis regulator at the intersection of caspases and Bcl-2 family proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 2597-2602.
- Zhang, J., Cado, D., Chen, A., Kabra, N. H., and Winoto, A. (1998).** Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* 392, 296-300.
- Zhang, L., Hong, K., Zhang, J., and Pagano, J. S. (2004).** Multiple signal transducers and activators of transcription are induced by EBV LMP-1. *Virology* 323, 141-152.
- Zhang, L., and Pagano, J. S. (2002).** Structure and function of IRF-7. *J Interferon Cytokine Res* 22, 95-101.
- Zhang, L., Wu, L., Hong, K., and Pagano, J. S. (2001).** Intracellular signaling molecules activated by Epstein-Barr virus for induction of interferon regulatory factor 7. *J Virol* 75, 12393-12401.
- Zhang, W., and Liu, H. T. (2002).** MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 12, 9-18.
- Zhang, X., Hu, L., Fadeel, B., and Ernberg, I. T. (2002).** Apoptosis modulation of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 in the epithelial cell line HeLa is stimulus-dependent. *Virology* 304, 330-341.
- Zhang, X., Uthaisang, W., Hu, L., Ernberg, I. T., and Fadeel, B. (2005).** Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 promotes stress-induced apoptosis upstream of caspase-2-dependent mitochondrial perturbation. *Int J Cancer* 113, 397-405.
- Zhao, B., and Sample, C. E. (2000).** Epstein-barr virus nuclear antigen 3C activates the latent membrane protein 1 promoter in the presence of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 through sequences encompassing an spi-1/Spi-B binding site. *J Virol* 74, 5151-5160.
- Zhao, E. G., Song, Q., Cross, S., Misko, I., Lees-Miller, S. P., and Lavin, M. F. (1998).** Resistance to etoposide-induced apoptosis in a Burkitt's lymphoma cell line. *Int J Cancer* 77, 755-762.
- Zhong, S., Salomoni, P., Ronchetti, S., Guo, A., Ruggero, D., and Pandolfi, P. P. (2000).** Promyelocytic leukemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *J Exp Med* 191, 631-640.
- Zhou, P., Chou, J., Olea, R. S., Yuan, J., and Wagner, G. (1999).** Solution structure of Apaf-1 CARD and its interaction with caspase-9 CARD: a structural basis for specific adaptor/caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11265-11270.
- Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V. M., and Salvesen, G. S. (1997).** Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J Biol Chem* 272, 7797-7800.

Zhou, S., Fujimuro, M., Hsieh, J. J., Chen, L., and Hayward, S. D. (2000). A role for SKIP in EBNA2 activation of CBF1-repressed promoters. *J Virol* 74, 1939-1947.

Zimber-Strobl, U., Kempkes, B., Marschall, G., Zeidler, R., Van Kooten, C., Banchereau, J., Bornkamm, G. W., and Hammerschmidt, W. (1996). Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) is not sufficient to maintain proliferation of B cells but both it and activated CD40 can prolong their survival. *Embo J* 15, 7070-7078.

Zimber-Strobl, U., and Strobl, L. J. (2001). EBNA2 and Notch signalling in Epstein-Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes. *Semin Cancer Biol* 11, 423-434.

Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90, 405-413.

Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. (1999). An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* 274, 11549-11556.

zur Hausen, H., Schulte-Holthausen, H., Klein, G., Henle, W., Henle, G., Clifford, P., and Santesson, L. (1970). EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* 228, 1056-1058.

ANNEXES

Annexe N°1

Indolent lymphoplasmacytic and marginal zone B-cell lymphomas: absence of both IRF4 and Ki67 expression identifies a better prognosis subgroup.

Petit B, Chaury MP, Le Clorennec C, Jaccard A, Gachard N, Moalic-Judge S, Labrousse F, Cogne M, Bordessoule D, Feuillard J.

Haematologica. 2005 Feb;90(2):200-6.

Annexe N°2

**Autoactivation of the Epstein-Barr Virus Oncogenic Protein
LMP1 During Type II Latency Through Opposite Roles of NFκB
and JNK Signaling Pathways**

Goormachtigh G, Ouk TS, Mougel A, Tranchand- Bunel D, Masy E,
Le Clorennec C, Feuillard J, Bornkamm GW, Auriault C, Manet E, Fafeur V,
Adriaenssens E, Coll J.

J Virol. 2006 Aug;80(15):7382-93.

Résumé

L'EBV est le premier virus transformant identifié chez l'homme. Il est associé aux lymphomes des déficits immunitaires, aux lymphomes hodgkiniens, aux lymphomes nasal de type T cytotoxique/NK, aux carcinomes du nasopharynx et aux lymphomes de Burkitt endémiques notamment. L'immortalisation des lymphocytes B par l'EBV implique la mise en jeu et le détournement de facteurs transcriptionnels cellulaires grâce aux protéines de latence de ce virus. Une protéine de latence virale, LMP1, protéine majeure transformante de l'EBV, joue un rôle essentiel dans cette immortalisation des lymphocytes B par l'EBV. LMP1 détourne les molécules de signalisation TRAFs/TRADD des TNF-R impliquées dans la signalisation des TNF-R (CD30, CD40 et Fas/CD95), ayant pour effet l'activation des voies de signalisation NF- κ B, p38/MAPK et JNK1/AP1, et pour résultat de protéger en principe les cellules de l'apoptose et d'augmenter la prolifération cellulaire. Ainsi, la protéine LMP1 active constitutivement la voie NF- κ B via ces deux domaines cytoplasmiques CTAR1 et CTAR2 provoquant l'activation constitutive de la voie de signalisation STAT1.

Nous nous sommes intéressés en l'étude de certaines cibles transcriptionnelles activées par l'EBV. Ainsi, les travaux réalisés durant ma thèse ont porté, d'une part en l'étude des relations entre les cibles transcriptionnelles NF- κ B, STAT1, p53 de l'EBV et l'apoptose, la prolifération des lymphocytes B, et d'autre part sur l'étude de la régulation du récepteur pro-apoptotiques FAS (CD95) dans les lymphocytes B infectés par l'EBV. De plus, suite à cette dernière étude, nous avons débuté une étude sur l'effet apoptotique induit par la surexpression de LMP1 dans les LCLs infectées par l'EBV.

Nous avons clairement montré dans notre modèle de lymphocyte B immortalisés par l'EBV en latence III, que le facteur de transcription NF- κ B possède un rôle central dans la signalisation de LMP1, induisant une surexpression de facteurs pro-apoptotiques comme le récepteur de mort Fas/CD95. L'activation constitutive de STAT1 et de p53 est secondaire à l'activation de NF- κ B par LMP1. En effet, l'activation constitutive de STAT1 par LMP1, dans ces lymphocytes B EBV+, est due à une boucle autocrine des IFNs, ces derniers étant induits en expression par NF- κ B. De plus, nous avons montré que les isoformes de STAT1, STAT1 α et STAT1 β , participent aux deux processus physiologiques majeurs, la prolifération et l'apoptose. En effet, nous avons montré que l'isoforme majoritaire STAT1 α est pro-apoptotique et que son inhibition par sa forme dominante négative, STAT1 β , protège les lymphocytes B infectés par l'EBV contre l'apoptose induite par des agents génotoxiques comme la Fludarabine.

En activant ces trois facteurs de transcriptions NF- κ B, STAT1 et p53, régulant l'expression de FAS à la surface cellulaire des lymphocytes B infectés par l'EBV, LMP1 permet de sensibiliser ces lymphocytes B à l'apoptose médié par les lymphocytes T cytotoxiques du système immunitaire. Du point de vue de l'équilibre virus/hôte, ce processus permettrait l'élimination des lymphocytes B infectés par l'EBV restés en latence III, par le système immunitaire. De plus, la surexpression de LMP1 provoque une apoptose spontanée dans les lymphocytes infectés par l'EBV, et nos premiers résultats montrent que cette apoptose induite par LMP1 médiée par le récepteur FAS qui, étant surexprimé, s'agrège et s'auto-active indépendamment de FasL, provoquant ainsi une apoptose caspase dépendante. Nous suggérons que le médiateur induit par LMP1 permettant l'auto-activation de Fas dans les lymphocytes B infectés par l'EBV est le niveau élevé de ROS.

Adresse du laboratoire d'accueil :

UMR CNRS 6101
« Physiologie de la réponse immune et des lymphoproliférations »
Groupe : « Mécanismes moléculaires de la lymphomagenèse »
Faculté de Médecine
Laboratoire d'Hématologie
2 Rue du Docteur Marcland
87025 LIMOGES