

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science – Technologie – Santé N°258

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LIMOGES

UMR 6101 CNRS

« Physiologie Moléculaire de la Réponse Immune et des Lymphoproliférations »

Groupe « Mécanismes moléculaires de la lymphomagenèse »

Thèse n° 69 - 2008

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Tan-sothéa OUK

Le 1^{er} décembre 2008

*Rôle de la protéine LMP1 dans la balance survie/apoptose
des cellules infectées par le virus d'Epstein-Barr*

Thèse dirigée par M. le Professeur Jean Feuillard - PU-PH, Limoges

Jury :

Président

M. Michel Cogné - PU-PH, Limoges

Rapporteurs

M. Patrick Legembre - Chargé de Recherche 2^{ème} classe, Bordeaux

M. Henri Gruffat - Chargé de Recherche 1^{ère} classe, Lyon

Examineurs

M. Eric Adriaenssens - Professeur des Universités, Lille

M. Aimé Vazquez - Directeur de Recherche 1^{ère} classe, Villejuif

M. Jean Feuillard - PU-PH, Limoges

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science – Technologie – Santé N°258

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LIMOGES

UMR 6101 CNRS

« Physiologie Moléculaire de la Réponse Immune et des Lymphoproliférations »

Groupe « Mécanismes moléculaires de la lymphomagenèse »

Thèse n° 69 - 2008

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Tan-sothéa OUK

Le 1^{er} décembre 2008

*Rôle de la protéine LMP1 dans la balance survie/apoptose
des cellules infectées par le virus d'Epstein-Barr*

Thèse dirigée par M. le Professeur Jean Feuillard - PU-PH, Limoges

Jury :

Président

M. Michel Cogné - PU-PH, Limoges

Rapporteurs

M. Patrick Legembre - Chargé de Recherche 2^{ème} classe, Bordeaux

M. Henri Gruffat - Chargé de Recherche 1^{ère} classe, Lyon

Examineurs

M. Eric Adriaenssens - Professeur des Universités, Lille

M. Aimé Vazquez - Directeur de Recherche 1^{ère} classe, Villejuif

M. Jean Feuillard - PU-PH, Limoges

A Cathy. Merci pour ton amour, pour ton soutien durant la thèse avec ses moments difficiles, ses hauts et ses bas, pour ta présence auprès de moi.

A mes parents, qui m'ont toujours soutenu durant toutes mes années.

Merci de votre confiance et de l'affection qu'ils me portent. Voici le résultat de tous vos efforts.

A mes frères (Thavarak, Vanny et SothTra) et à ma sœur (HongHoa), qui m'ont toujours soutenu. Je suis heureux et fier de vous avoir à mes côtés.

A mes futurs beaux-parents, qui m'ont accueilli au sein de leur famille. Merci pour votre gentillesse.

A tous mes amis de longue date, Stéphane, Sébastien Quiévreux, Sébastien Dumont, Cédric, Bertrand, Samuel, Guillaume, Benoît, François, Xavier et tous les autres...

Merci à vous tous...

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier et rendre hommage à une personne qui a beaucoup compté pour moi, tant humainement que scientifiquement, il s'agit de **Jean Coll**, mon ancien directeur de DEA à Lille. Si j'en suis là actuellement, je crois que je le dois à lui (et il y a encore pas mal de boulot !!!). Je te remercie d'avoir cru en mes capacités. Il a su me transmettre sa passion de la recherche avec une grand R car c'était son « dada », sa science, son intelligence, son humour,... Il m'a toujours soutenu quand les manip ne marchaient pas (il me disait : « tu sais, Tan, dis-toi une chose, quand tu fais des manip, seules 5 à 10% marchent alors il ne faut pas te laisser abattre, il faut avancer). Et c'est vrai, il ne faut pas se laisser abattre. En tout cas, je retiendrai de lui sa grande ouverture d'esprit et sa gentillesse.

Tu es parti bien trop tôt. Adieu mon ami, adieu Jean.



Je remercie **Michel Cogné** de m'avoir reçu dans son laboratoire et d'avoir accepté d'être le Président de mon jury de thèse. Merci de votre disponibilité quand j'avais des questions à vous poser, notamment au sujet des post-docs.

Je tiens personnellement à remercier **Jean Feuillard**, une autre personne qui a beaucoup compté durant la thèse. Je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre équipe et de votre confiance. Je sais pertinemment que grâce à vous si j'ai pu réaliser cette thèse. Merci d'avoir pensé à moi, quand vous aviez une allocation de recherche à l'automne 2005. Ce fut pour moi un réel plaisir d'avoir travaillé avec vous. Vous avez une intelligence qui est assez hors norme. Vous avez parfois deux à trois idées d'avance sur nous, et ça m'impressionne énormément. Merci de votre patience lors de la rédaction de thèse, je l'ai mis à rude épreuve, surtout sur la fin. Merci de votre soutien durant toute la durée de la thèse.

Je souhaite remercier les deux rapporteurs de ma thèse, **Henri Gruffat** et **Patrick Legembre**, d'avoir accepté d'évaluer ma thèse. Je vous remercie de votre patience et de votre intérêt dans la lecture du manuscrit. Encore merci pour les différentes modifications que vous avez apportées à la thèse, qui n'ont fait que la rendre meilleure assurément.

Je tiens à remercier **Aimé Vazquez**, d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse. Encore merci pour votre disponibilité car je sais que votre étudiant passe sa thèse le lendemain

Un grand merci à **Eric Adriaenssens**, de faire partie de mon jury de thèse. Merci de m'avoir co-encadré (avec Jean Coll) durant mon arrivée en DEA à Lille. Ce fut très instructif aussi bien scientifiquement que personnellement (virées au McEwans, au Biplan, travaux chez la petite Lau...). Bref, ce fut un plaisir de travailler à tes côtés. J'espère qu'on aura encore l'occasion de le faire.

Je tiens à remercier **Chantal Jayat-Vignoles** qui est arrivé pratiquement en même temps que moi dans l'équipe de Jean Feuillard. J'ai beaucoup appris à tes côtés, tu m'as transmis ta passion de la cytométrie en flux et je t'en remercie car c'est une technique plus que passionnante. Merci pour les nombreuses discussions que nous avons eues à la paillasse, pour ta bonne humeur, tes conseils techniques, ton ouverture d'esprit et ton encadrement. Merci de m'avoir aidé pour la préparation de mon oral de thèse, tes conseils ont été très précieux. Merci pour ses trois années très agréables.

Je tiens à remercier tous les membres (présents ou anciens) de l'équipe de Jean Feuillard au 2^{ème} étage pour leur accueil à mon arrivée en 2006, leur gentillesse, leur disponibilité et leurs conseils techniques. Merci à **Nathalie, Aurélie, Stéphanie, Ibtissam, Christophe, Nadine** et enfin **David**.

Je tiens également à remercier tous les membres de l'équipe de Michel Cogné au 3^{ème} étage pour leur accueil, leur gentillesse, et leur disponibilité. Merci à **Eric Pinaud, Laurent, Christophe Sirac, Sophie Duchez, Claire, Armelle, Zéliha, Sébastien, Catherine Decourt, Rada, Virginie, Chahrazed, Gaël, Guillaume, Christelle Oblet, Marie Bosselut, Cécile, Karine, Cendrine, Anne-Gaëlle, Rémi, Christelle Vincent, Yves, Véronique, Marie Marquet** et nos deux super gestionnaires **Christian** et **Carine**. J'en oublie sûrement et je m'en excuse.

Je tiens à remercier tous les membres de l'équipe de Jean Coll et de Véronique Pancré (UMR8161, équipe 9, Cancers Viro-induits de l'Institut de Biologie de Lille) : **Gautier, Alex, Guillaume, Alioune, Nathalie Spruyt, Nathalie Berteaux, Nadira, Véronique Pancré, Olivier**, et les anciens de l'ex-UMR8527 : **Isabelle, Claudie, Myriam, Anne, Laurence**. A tous et à ceux que j'oublie, merci pour les belles années passées avec vous durant mon DEA.

A tous, un grand MERCI...

RESUME

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est un herpèsvirus humain qui infecte 90% de la population, mais l'infection est, le plus souvent, asymptomatique. Après infection, le virus établit une latence virale caractérisée par l'expression restreinte de gènes viraux, appelés gènes de latence permettant au virus de persister tout au long de la vie. On définit trois latences virales (I, II et III) selon le profil d'expression des gènes de latence codant les antigènes EBNA (-1, -2, -3 et -LP) et les protéines membranaires LMPs (-1 et -2). L'immortalisation *in vitro* des lymphocytes B aboutit à des lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL de latence III), exprimant la totalité des gènes de latence. L'EBV est associée à des cancers (lymphome de Burkitt, lymphomes liés à un déficit immunitaire innée ou acquis, lymphome de Hodgkin, carcinome du rhinopharynx). Hors dans le lymphome de Burkitt, LMP-1 est exprimée dans toutes les pathologies malignes, et constitue l'oncogène majeur du virus. Les propriétés oncogènes de LMP-1 sont liées à sa capacité d'activer de façon chronique des voies de signalisation cellulaire telles que les voies NFκB, JNK et p38. Malgré son pouvoir transformant, LMP-1 induit la surexpression du récepteur proapoptotique Fas/CD95 via les facteurs NFκB, p53 et STAT1, sensibilisant les cellules à l'action des lymphocytes T cytotoxiques. Des résultats préliminaires ont montré que LMP-1 induit l'apoptose des LCLs.

Nous avons d'abord cherché à déterminer l'origine de l'expression de LMP-1 lors de la latence II. En effet, la latence II est caractérisée par l'absence d'EBNA-2, principal transactivateur viral de LMP-1. Nous montrons que LMP-1 autorégule sa propre expression via l'induction d'une balance entre les voies de signalisation NFκB (répresseur) et JNK (activateur). Ce mode de régulation est également retrouvé au cours de la latence III.

Puis, nous avons voulu décrire les bases moléculaires de la cytotoxicité cellulaire de LMP-1 dans les LCLs et déterminer le rôle de Fas/CD95. Nous démontrons que LMP-1 induit l'autoactivation de Fas/CD95, indépendamment de son ligand FasL/CD95L et l'activation des caspases. Ces résultats suggèrent le caractère ambivalent de LMP-1 qui induit simultanément des signaux de survie et d'apoptose, notamment grâce à la voie de signalisation NFκB. L'apoptose contribuerait alors à l'homéostasie cellulaire du compartiment lymphocytaire B infecté par l'EBV.

Mots-clé : EBV, LMP-1, NFκB, autorégulation, survie, Fas/CD95, apoptose.

ROLE OF THE PROTEIN LMP1 IN THE BALANCE SURVIVAL/APOPTOSIS IN EBV-INFECTED CELLS

ABSTRACT

Epstein-Barr Virus (EBV) is a human herpesvirus which infects 90% of worldwide population, but the infection is often asymptomatic. After infection, EBV establishes a viral latency characterized by the expression of viral genes called latency genes, allowing the virus to persist throughout life. Three viral latency are defined (I, II et III) according to the profile of expression of genes coding for EBNA antigens (-1, -2, -3 et -LP) and latent membrane proteins LMPs (-1 and -2). The immortalization *in vitro* of B lymphocytes leads to lymphoblastoid cell lines (LCL sharing a latency III), expressing all the latency genes. EBV is associated with cancer (Burkitt's lymphoma, lymphomas linked to an innate immune deficiency or acquired Hodgkin's lymphoma, carcinoma of rhinopharynx). Out in Burkitt's lymphoma, LMP-1 is expressed in all malignant diseases, and is the major viral oncogenic protein. Oncogenic properties of LMP-1 are linked to its ability to activate a chronic cellular signaling pathways such as NFκB, JNK and p38 pathways. Despite its transforming power, LMP-1 induced overexpression of the receptor proapoptotique Fas/CD95 via NFκB, p53, and STAT1 factors, sensitizing cells to action of cytotoxic T lymphocytes. Preliminary results showed that LMP-1 induced apoptosis LCLs.

We first sought to determine the origin of the expression of LMP-1 in latency II. Indeed, the latency II is characterized by the absence of EBNA-2, the main viral transactivator of LMP-1. We show that LMP-1 induced its self-expression through induction of a balance between signaling pathways NFκB (repressor) and JNK (activator). This mode of regulation is also found during the latency III.

Then, we wanted to describe the molecular basis of cellular cytotoxicity of LMP-1 in LCLs and to determine the role of Fas/CD95. We demonstrate that LMP-1 induced autoactivation of Fas/CD95, regardless of its FasL/CD95L ligand and activation of caspases. These results suggest the ambivalence of LMP-1 which induced simultaneously survival and apoptosis, via the NFκB signaling pathway. Apoptosis would then homeostasis cellular compartment B lymphocyte infected with EBV.

Keywords : EBV, LMP-1, NFκB, autoregulation, survival, Fas/CD95, apoptosis.

Adresse du laboratoire d'accueil de la thèse :

**UMR 6101 CNRS, Physiologie Moléculaire de la Réponse Immune et des Lymphoproliférations (PMRIL), Equipe « Mécanismes Moléculaires de la Lymphomagenèse ». Faculté de Médecine.
2 rue du Dr Marcland 87025 Limoges cedex**

SOMMAIRE

Préambule	11
<i>I - Quelques notions sur la régulation transcriptionnelle</i>	14
<i>I.1 : La chromatine</i>	14
<i>I.2 : Les promoteurs</i>	15
<i>I.3 : Les facteurs de transcription</i>	16
<i>I.4 : La machinerie basale de la transcription</i>	17
<i>I.5 : Les répresseurs de la transcription</i>	17
<i>II - Principales voies de signalisation détournées par LMP-1</i>	18
<i>II.1 : La voie NFκB (Nuclear Factor kappa B)</i>	18
<i>II.2 : La voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases)</i>	23
<i>II.3 : La voie PI3K (Phosphatidyl-Inositide 3 Kinase)</i>	24
<i>II.4 : La voie des JAK/STAT (JAnus Kinase/Signals Transducers and Activator of Transcription)</i>	25
<i>III - Généralités sur le processus d'apoptose</i>	26
<i>III.1 : Rôles physiologiques de l'apoptose</i>	27
<i>III.2 : Les principaux acteurs de l'apoptose</i>	27
III.2.1 : Les différentes voies de l'apoptose.....	27
III.2.2 : Les récepteurs de mort (Death Receptors).....	28
III.2.3 : Les caspases	28
III.2.4 : Les membres de la famille Bcl2.....	28
III.2.5 : Les inhibiteurs de l'apoptose	29
<i>III.3 : Mécanismes moléculaires de l'apoptose</i>	30
III.3.1 : La voie des récepteurs ou la voie extrinsèque	30
III.3.2 : La voie mitochondriale ou la voie intrinsèque.....	31
Introduction bibliographique	33
<i>I - Généralités sur le virus d'Epstein-Barr (EBV)</i>	33
<i>I.1 : Introduction</i>	33
<i>I.2 : Historique</i>	33
<i>I.3 : Taxonomie</i>	35
<i>II - Caractéristiques du virus d'Epstein-Barr</i>	36
<i>II.1 : Structure du virion</i>	36
<i>II.2 : Structure du génome viral</i>	37
<i>II.3 : Nomenclature</i>	38
<i>III- L'infection par l'EBV</i>	40
<i>III.1 : L'infection latente</i>	40
III.1.1 : Les différents types de latences virales.....	40
III.1.2: Les protéines de latence : description, régulation et fonction.....	43
<i>III.1.2.1 : Les promoteurs des protéines de latence</i>	43
<i>III.1.2.2 : La famille des Antigènes Nucléaires de l'EBV, les protéines EBNA</i> s	44
III.1.2.2.A : EBNA-LP.....	44
III.1.2.2.B : EBNA-2.....	45
III.1.2.2.C : EBNA-3 (-3A, -3B et -3C).....	50
III.1.2.2.D : EBNA-1	52
<i>III.1.2.3 : Les protéines membranaires de latence</i>	56

III.1.2.3.A : LMP-1 (Latent Membrane Protein-1)	56
III.1.2.3.B : LMP-2 (Latent Membrane Protein-2)	56
III.1.2.4 : Les ARN EBERs	59
III.1.2.5 : Les transcrits de la région BamHI A (BART, BamHI A Rightward Transcripts)	60
III.2 : L'infection lytique	62
III.2.1 : Les gènes très précoces	64
III.2.2 : Les gènes précoces	64
III.2.3 : Les gènes tardifs	65
IV - Physiopathologie de l'infection par le virus d'Epstein-Barr	67
IV.1 : Cellules-cibles infectées par l'EBV	67
IV.1.1 : Cellules conventionnelles	67
IV.1.1.1 : Les lymphocytes B	67
IV.1.1.2 : Les cellules épithéliales	68
IV.1.2 : Cellules non-conventionnelles	70
IV.1.2.1 : Les cellules NK (Natural Killer)	71
IV.1.2.2 : Les lymphocytes T	71
IV.1.2.3 : Les monocytes	72
IV.2 : Dynamique de l'infection par l'EBV	72
IV.2.1 : L'infection par l'EBV in vitro	72
IV.2.2 : L'infection par l'EBV in vivo	74
IV.2.2.1 : Infection par l'EBV dans l'organisme	74
IV.2.2.2 : L'EBV et la différenciation cellulaire des lymphocytes B	77
IV.2.3.1 : Réponse immunitaire lors de la primo-infection	79
IV.2.3.2 : Immunité à médiation cellulaire	79
IV.3 : Pathologies associées au virus d'Epstein-Barr	80
IV.3.1 : Pathologies chez l'individu immunocompétent	80
IV.3.1.1 : Pathologie bénigne, la mononucléose infectieuse	80
IV.3.1.2 : Pathologies malignes	81
IV.3.1.2.B : Le lymphome de Hodgkin	81
IV.3.1.2.C : Le carcinome du rhinopharynx	82
IV.3.1.2.D : Autres cancers	83
IV.3.2 : Pathologies chez l'individu immunodéprimé	83
IV.3.2.1 : Chez les patients atteints du VIH	83
IV.3.2.1.A : Leucoplasie chevelue de la langue	83
IV.3.2.1.B : Lymphomes non-hodgkiniens	83
IV.3.2.2 : Chez les patients transplantés	83
IV.3.2.3 : Le syndrome de Purtillo	84
IV.3.3 : Pathologies auto-immunes	84
V - La protéine LMP-1	85
V.1 : Régulation de l'expression de LMP-1	86
V.1.1 : Les promoteurs contrôlant l'expression de LMP-1	86
V.1.2 : Transactivation du promoteur ED-L1 (pLMP1)	87
V.1.2.1 : Transactivation par EBNA-2	87
V.1.2.2 : Autres transactivateurs du pLMP-1	88
V.1.2.2.A : Transactivateurs viraux	88
V.1.2.2.B : Transactivateurs cellulaires	89
V.2 : Structure	89
V.2.1 : La partie Amino-Terminale	90

V.2.2 : La partie Transmembranaire	90
V.2.3 : La partie Carboxy Terminale	91
V.3 : La forme lytique de la protéine LMP-1	93
V.4 : Voies de signalisation induites par la protéine LMP-1	93
V.4.1 : La voie NFkB	93
V.4.1.1 : A partir du domaine CTAR1/TES1	94
V.4.1.2 : A partir du domaine CTAR2/TES2	95
V.4.2 : La voie des MAP Kinases	96
V.4.2.1 : La voie JNK	96
V.4.2.2 : La voie p38	98
V.4.2.3 : La voie ERK	98
V.4.3 : La voie de la PI3 Kinase	99
V.4.4 : La voie des JAK/STATs	100
V.4.5 : LMP-1, une signalisation très complexe	101
V.5 : Propriétés fonctionnelles de la protéine LMP-1	102
V.5.1 : LMP-1 induit des altérations phénotypiques	102
V.5.2 : LMP-1 régule l'expression et la production de cytokines	103
V.5.3 : LMP-1 contribue au pouvoir métastatique des cellules infectées	103
V.5.4 : LMP-1 régule la prolifération et la différenciation cellulaire	104
V.5.5 : LMP-1 possède des propriétés cytostatiques et cytotoxiques	105
V.5.6 : LMP-1 est impliquée dans le processus d'apoptose	106
Objectifs du travail	108
Matériels et méthodes	110
I – Modèles cellulaires	110
II – Vecteur inductible	111
III – ADN complémentaires (ADNc) utilisés	112
Présentation de l'article 1	114
Présentation de l'article 2	117
Discussion générale	121
I - Régulation de l'expression de LMP-1	121
II - Rôle du stress du reticulum endoplasmique dans l'apoptose induite par LMP-1 ?	123
III - Rôle de NFkB dans l'apoptose induite par LMP-1 ?	125
IV - Rôle de p53 dans l'apoptose induite par LMP-1 ?	127
V - Implication du récepteur Fas/CD95	129
VI - Implication des autres récepteurs de mort	132
VII - Rôle de cFLIP dans l'apoptose induite par LMP-1	134
Conclusions et Perspectives	137
Références Bibliographiques	140

PREAMBULE

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est le premier virus immortalisant et transformant identifié chez l'homme. L'EBV infecte une très grande majorité de la population adulte mais ces infections restent, pour la plupart, asymptomatiques. La cible cellulaire privilégiée de ce virus est le lymphocyte B. Après l'infection, le virus établit une latence virale caractérisée par l'expression restreinte de gènes viraux, appelés gènes de latence permettant au virus de persister tout au long de la vie. On définit trois latences virales (I, II et III) selon le profil d'expression des gènes de latence codant les antigènes EBNA (-1, -2, -3 et -LP) et les protéines membranaires LMPs (-1 et -2). *In vitro*, l'immortalisation des lymphocytes B aboutit à l'obtention de lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL, *Lymphoblastoid Cell Lines*), caractérisées par l'expression de tous les gènes de latence (latence III). L'EBV est associé à différents cancers, incluant notamment le lymphome de Burkitt, les lymphomes liés à un déficit immunitaire, le lymphome de Hodgkin et le carcinome du rhinopharynx. Hormis dans le lymphome de Burkitt (caractérisé par une latence I et la seule expression d'EBNA-1), la protéine LMP-1 (*Latent Membrane Protein-1*) est exprimée lors de ces différentes pathologies malignes, et est décrite comme une molécule clé pour le pouvoir transformant de l'EBV.

L'objet de ma thèse est la protéine LMP-1. La protéine LMP-1 est fonctionnellement apparentée aux membres de la famille du récepteur au TNF α , dont le récepteur au TNF α de type 1 (TNFR1) et le CD40. Contrairement à ces derniers, l'activation de LMP-1 n'est pas contrôlée par la fixation d'un ligand extracellulaire, et est constitutivement active. LMP-1 détourne les adaptateurs impliqués dans la signalisation du TNFR1, les molécules TRAFs grâce à deux domaines cytoplasmiques CTAR1/TES1 et CTAR2/TES2 que nous verrons en détail dans le chapitre V de l'introduction bibliographique consacré à LMP-1. L'activation constitutive de LMP-1 et le

recrutement des TRAFs aboutissent à la dérégulation chronique des voies de signalisation cellulaire associées, dont la voie NFkB, la voie JNK et la voie p38, résultant en la protection des cellules contre l'induction de l'apoptose

Dans la première partie de la thèse effectuée principalement à Lille au sein de l'UMR8161 à l'IBL (Institut de Biologie de Lille), je me suis intéressé aux mécanismes contrôlant l'expression de LMP-1 en latence II. En effet, la grande majorité des cancers associés à l'EBV est définie par un profil d'expression des gènes de latence restreint, la latence II, caractérisée par l'absence d'EBNA-2 principal transactivateur viral de LMP-1. En latence II, le mécanisme responsable de l'expression de LMP-1 n'est pas complètement expliqué. Ainsi, au sein de l'équipe « Cancers viro-induits » du Dr Jean Coll de l'UMR 8161 CNRS, j'ai participé à l'étude des mécanismes pouvant induire l'expression de LMP-1 dans la latence II. Nous montrons que LMP-1 est capable d'activer son propre promoteur via son domaine CTAR2/TES2 et une balance entre les voies de signalisation NFkB (répressive) et JNK (activatrice). Nous démontrons également que l'autorégulation de LMP-1 est effective aussi bien en absence d'EBNA-2 (latence II) qu'en présence d'EBNA-2 (latence III).

Dans la deuxième partie de ma thèse, je me suis intéressé aux mécanismes moléculaires de la cytotoxicité cellulaire de la protéine LMP-1. Bien que LMP-1 soit surtout connue pour ses propriétés immortalisantes, on lui attribue certaines propriétés cytotoxiques, soit en induisant l'apoptose de cellules épithéliales, soit en sensibilisant les cellules à l'apoptose induite par des drogues chimiothérapeutiques. Une étude menée au laboratoire avait montré la relation entre les facteurs NFkB, STAT1 et p53 dans l'induction de l'expression du récepteur proapoptotique Fas/CD95 dans les LCLs, sensibilisant les cellules à l'action des lymphocytes T cytotoxiques. Suite à ce travail, je me suis intéressé aux mécanismes moléculaires de l'apoptose induite par LMP- ainsi qu'au rôle de Fas/CD95 au cours de cette apoptose. Nous démontrons que LMP-1 induit

l'activation, indépendante de son ligand, de Fas/CD95 et des caspases (acteurs moléculaires importants de l'apoptose).

En conclusion de ces deux travaux, nous proposons que la protéine LMP-1 présente un caractère ambivalent, en induisant à la fois la survie cellulaire et l'apoptose grâce notamment à la voie de signalisation NFκB qui, d'une part réprime l'expression de LMP-1 et d'autre part induit l'expression de molécules proapoptotiques dont Fas/CD95.

Avant de présenter la partie bibliographique sur l'EBV, j'introduirai tout d'abord quelques rappels succints de biologie cellulaire afin d'apporter une meilleure compréhension de l'action des protéines de latence sur différentes fonctions cellulaires (régulation de la transcription, voies de signalisation) contribuant à l'immortalisation cellulaire par l'EBV. Enfin, un chapitre sera consacré à des rappels sur l'apoptose qui fait l'objet de la thèse.

Dans la partie bibliographique, je décrirai les principales caractéristiques de l'infection par l'EBV, la physiopathologie associée à l'EBV et le dernier chapitre sera consacré à la présentation de la protéine LMP-1.

La présentation des résultats obtenus au cours de ma thèse se fera en deux parties. La première partie est consacrée à l'étude de l'autorégulation de LMP-1. Ce travail est publié dans *Journal of Virology* (2006) par Goormachtigh G, Ouk TS et al. La deuxième partie est consacrée à l'étude des mécanismes moléculaires de l'apoptose induite par LMP-1. Ce travail est publié dans *Journal of Virology* (2008) par LeClourenec C, Ouk TS et al. Je terminerai ce mémoire par une discussion générale des résultats obtenus et par une conclusion/perspectives de ce mémoire.

Rappels de biologie

I - Quelques notions sur la régulation transcriptionnelle

I.1 : La chromatine

Chez les eucaryotes, l'ADN est associé à des protéines au sein d'une structure appelée chromatine. Les principales protéines de la chromatine sont les histones, des protéines très conservées et chargées positivement (basiques) qui s'associent très étroitement avec l'ADN (chargé négativement). En microscopie électronique, la chromatine donne l'image d'un collier de perles où des segments d'ADN nus séparent des repliements globulaires composés d'ADN et d'histones : les nucléosomes (**figure 1**).

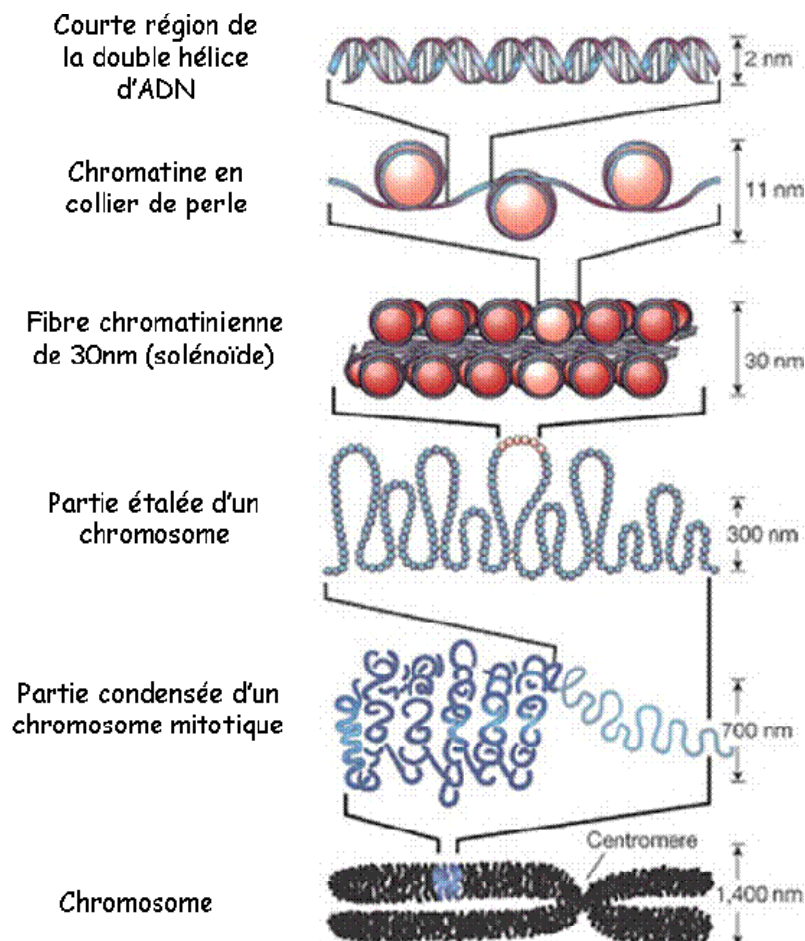


Figure 1 : Les différents niveaux de compaction de l'ADN au sein des chromosomes (modifié d'après Felsenfeld G and Groudine M, Nature 2003)

Chaque nucléosome, d'un diamètre de 11 nm, est constitué de deux hétérodimères d'histones H2A-H2B et d'un tétramère d'histones H3-H4 autour desquels l'ADN s'enroule en faisant 1,65 tour sur

une longueur totale de 146 paires de bases. Les régions N-Terminales de ces histones riches en résidus de lysine, pointent vers l'extérieur des nucléosomes et sont la cible de nombreuses modifications covalentes (méthylation, acétylation, ...). Cet assemblage nucléoprotéique est verrouillé par les histones H1 et H5 qui interagissent avec l'ADN. Deux nucléosomes sont séparés par environ 20 à 90 paires de bases. Le chapelet de nucléosomes est enroulé sur lui-même selon une hélice régulière (solénoïde) comprenant 6 nucléosomes par tour (**figure 1**). La structure en solénoïde d'un diamètre de 30 nm est ancrée de façon transitoire sur la matrice nucléaire, formant ainsi des boucles d'ADN ayant une taille de 60 kb. Enfin, des protéines non-histones du groupe HMG (*High-Mobility Group*) ou SIR (*Silent Information Regulator*) participent à un empaquetage encore plus complexe de l'ADN, allant de l'euchromatine où des régions activement transcrites sont décondensées, à l'hétérochromatine, structure la plus dense qui caractérise les régions silencieuses du génome.

1.2 : Les promoteurs

Le promoteur minimal est défini comme la plus petite unité nécessaire et suffisante à l'initiation de la transcription *in vitro* par l'ARN Pol II (ARN polymérase II) et les facteurs généraux de transcription, à partir du site d'initiation de la transcription (**figure 2**).

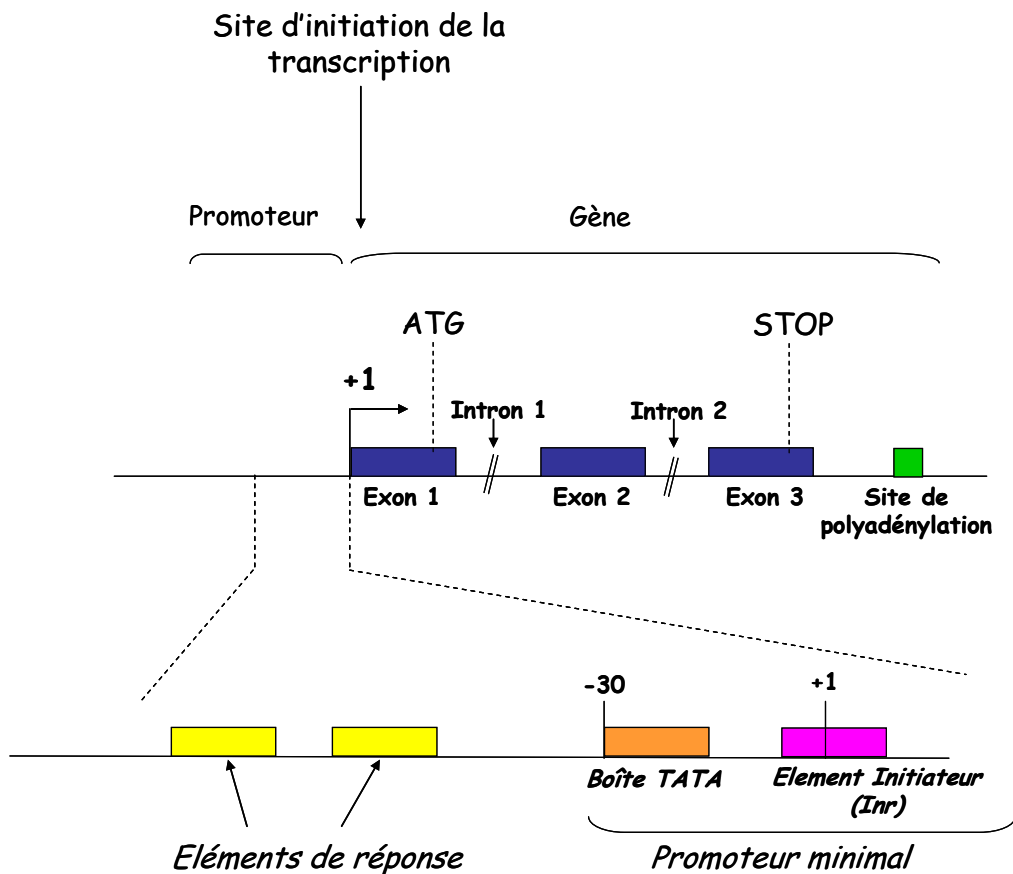


Figure 2 : Représentation schématique des différentes séquences d'ADN impliquées dans la régulation de la transcription. (Modifiée d'après la thèse d'Anne Keriel, 2000)

L'élément principal est constitué par la boîte TATA et/ou par un élément initiateur (Inr). La boîte TATA, dont la séquence consensus est TATA(A/T)A(A/T), est localisée à environ une trentaine de paires de bases en amont du site d'initiation ATG. Cette séquence est reconnue par la machinerie transcriptionnelle via la sous-unité TBP (*TATA Binding Protein*) du facteur de transcription TFIID (*Transcription Factor II D*). L'élément Inr est situé autour du site d'initiation et est constitué d'une séquence riche en pyrimidines, moins conservée que la boîte TATA. L'élément Inr permet, en général, la transcription des gènes qui ne contiennent pas de boîte TATA.

1.3 : Les facteurs de transcription

Les facteurs de transcription sont des protéines qui interagissent avec les promoteurs des cellules eucaryotes afin de réguler l'activité des ARN polymérases. Ces facteurs de transcription présentent une organisation commune, avec un domaine de liaison à l'ADN (DBD, *DNA-Binding*

Domain) et un ou plusieurs domaines transactivateurs (TAD, *TransActivation Domain*). Le domaine DBD permet au facteur de transcription de se fixer sur des régions d'ADN spécifiques ou éléments de réponse : par exemple le facteur de transcription NFκB se fixe sur des éléments de réponses appelés sites κB (voir section V.4.1). Le domaine TAD permet de recruter la machinerie basale de la transcription au niveau des promoteurs.

1.4 : La machinerie basale de la transcription

La régulation des gènes implique l'interaction entre la chromatine, les protéines activatrices et modulatrices ainsi qu'avec la machinerie générale de transcription. La machinerie basale de transcription, également nommée holoenzyme, comporte : l'ARN polymérase II et les facteurs généraux de transcription (TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF et TFIIH). Associé à TFIID, les protéines TAFs (TBP-Associated Factors) renforcent l'association de TFIID à l'ADN. Un complexe de co-activateurs fait également partie de l'holoenzyme, mais il diffère d'un gène à l'autre (**figure 3**). La conséquence du recrutement de ces activateurs est la décondensation de la chromatine, favorable à la transcription.

1.5 : Les répresseurs de la transcription

La répression transcriptionnelle ou « *silencing* », renvoie à la capacité de certains facteurs de transcription, tels que le facteur CBF1/RBPJk (voir section III.1.1.2.B), à inhiber l'activité de base de certains promoteurs sur lesquels ils sont fixés en recrutant un complexe répresseur (**figure 3**) qui entraîne la compaction de la chromatine, défavorable à la transcription.

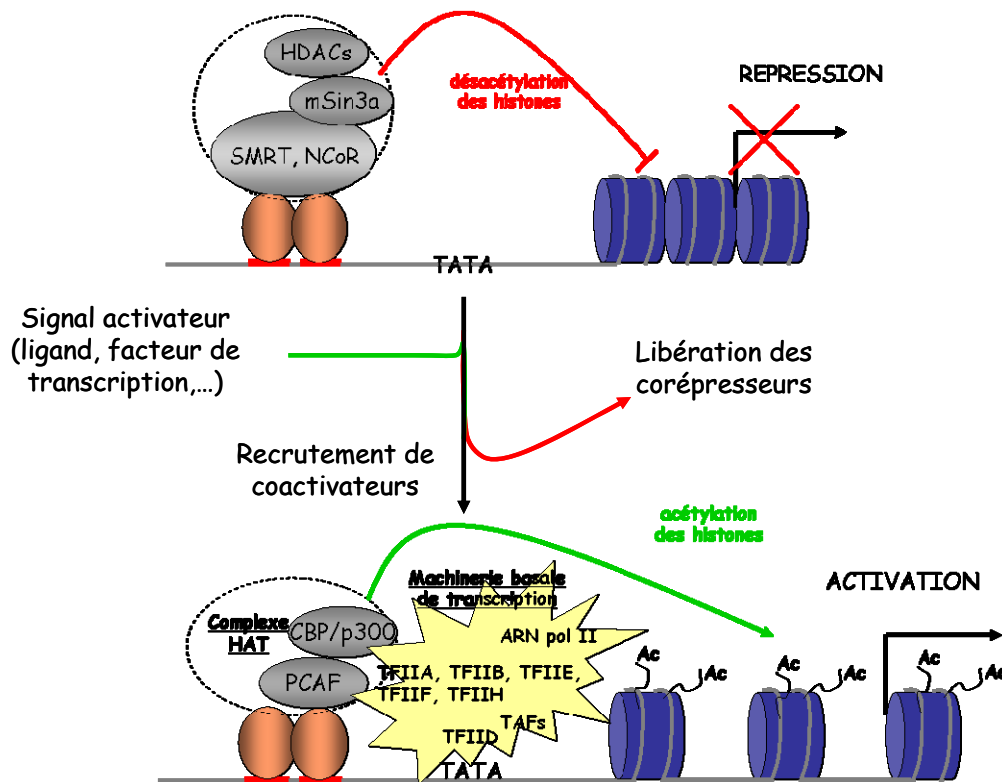


Figure 3 : Représentation schématique de la régulation de la transcription. En absence de signal activateur, le facteur de transcription recrute un complexe répresseur composé de corépresseurs (SMRT, NCoR, mSin3a) et des HDACs. Les HDACs désacétylent les histones et entraînent la compaction de la chromatine dans un état défavorable à la transcription. La présence d'un signal activateur induit la libération des corépresseurs et le recrutement de coactivateurs. Parmi ces coactivateurs, les HAT (PCAF et CBP/p300) acétylent les histones, décondensent la chromatine dans un état favorable à la transcription. La machinerie basale de la transcription (TFIIA, TFIIB, TFIIE, TFIIIF, TFIIH, TAFs, ARN pol II) est ensuite recrutée au niveau du promoteur pour permettre l'activation de la transcription. *SMRT* = *Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptor*, *NCoR* = *Nuclear receptor CoRepressor*, *HDAC* = *Histone DeAcetylase*, *TFIIs* = *Transcription Factor IIs*, *TAFs* = *TBP-Binding Factors*. (Modifiée d'après la thèse d'Anne Keriél, 2000)

II - Principales voies de signalisation détournées par LMP-1

II.1 : La voie NFκB (Nuclear Factor kappa B)

La voie de signalisation NFκB est surtout connue pour son rôle de protection contre l'apoptose. Plusieurs études ont ensuite révélé le rôle essentiel de NFκB dans la prolifération, la différenciation, l'oncogenèse et l'inflammation. La liste des activateurs de la voie NFκB inclut les cytokines (TNFα, CD40L, IL1), les produits bactériens (LPS, *LipoPolySaccharide*) et les signaux

de stress cellulaire. De plus, certains virus, dont l'EBV, utilisent cette voie de signalisation pour promouvoir la survie.

Les complexes NFκB sont retenus dans le cytoplasme par une famille d'inhibiteurs, connus sous le nom d'IκB (*Inhibitor of NFκB*, **figure 5**). L'activation de NFκB implique la phosphorylation d'IκB par les kinases IKK (*IκB Kinase*) qui résulte en la dégradation d'IκB (**figure 4**) et la translocation nucléaire des complexes NFκB.

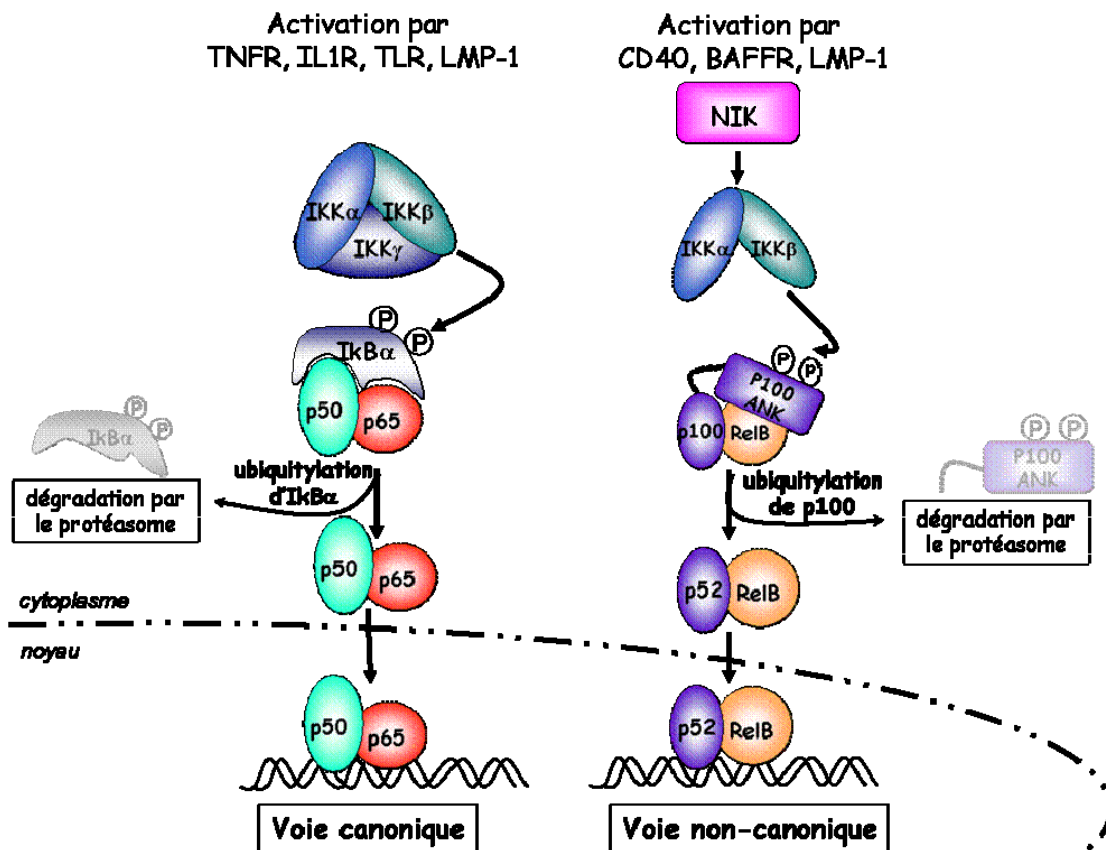


Figure 4 : Représentation schématique de l'activation de la voie canonique et non-canonique de NFκB. Les principaux inducteurs de la voie canonique sont le TNFα, l'IL1, le LPS et LMP-1. Ces récepteurs induisent l'activation de kinases, dont TAK1 notamment, qui vont phosphoryler et activer le complexe IKK (IKKα, IKKβ, IKKγ). IKKα, IKKβ phosphorylent IκBα, induisant sa dégradation par le protéasome. Leur motif NLS découvert, les sous-unités RelA/p65 et p50 peuvent être transloqué dans le noyau et se fixer au niveau de sites κB (5'- GGGRNYYYCC -3'). Pour la voie non-canonique, les récepteurs CD40, BAFFR et LMP-1 induisent la kinase NIK qui active IKKα et IKKβ. Ces kinases phosphorylent p100, induisant son clivage pour donner la sous-unité p52. La partie restante de p100 est dégradée par le protéasome. Les sous-unités p52 et RelB peuvent alors migrer dans le noyau. *NFκB* = Nuclear Factor kappa B, *IKK* = *IκB Kinase*, *NIK* = *NFκB Inducing Kinase*, *IκBα* = *Inhibitor of nfκB*, *ANK* = *ANKyrin*. (Modifié d'après Braun T et al., CellDeathDiffer2006)

Les facteurs de transcription de la famille Rel/NFκB comportent 5 membres (**figure 5**) : RelA (p65), RelB, c-Rel, NFκB1 (p105/p50) et NFκB2 (p100/p52). Ces protéines forment des homo- ou des hétérodimères pour réguler l'expression de gènes-cibles. Ces facteurs de transcription peuvent induire et réprimer l'expression génique en se fixant à des séquences d'ADN, appelées éléments de réponse κB, présents au niveau de différents promoteurs cellulaires. Ces éléments de réponse κB sont composés de 10 paires de bases dont la séquence consensus est 5'- GGGRNYYYCC -3' (R représente un résidu purine, Y une pyrimidine et N un résidu quelconque). Ces protéines possèdent toutes un domaine conservé d'environ 300 aas, appelé domaine RHD (*Rel Homology Domain*) permettant la fixation à l'ADN, la dimérisation, la localisation nucléaire (séquence NLS) et la liaison à la protéine inhibitrice IκB (Perkins ND, NatRevMolCellBiol2007). On distingue trois principaux IκB (IκBα, IκBβ et IκBε, **figure 5**) qui fonctionnent en masquant la séquence NLS contenue dans le domaine RHD des différentes sous-unités NFκB et induisent leur rétention dans le cytoplasme. Les IκBs possèdent une séquence d'exportation nucléaire (NES, *Nuclear Export Signal*) qui leur permet d'exercer un rétrocontrôle de la voie NFκB.

Bcl3 est apparenté aux IκB classiques (*IκB-like*) et contient sept domaines de répétition ankyrine (**figure 5**). Cependant, à la différence des IκB classiques, Bcl3 est localisé dans le noyau se comporte comme un activateur transcriptionnel de NFκB (Caamano JH et al., MCB 1996). Bcl3 possède une spécificité de liaison vis-à-vis de p50 et de l'homodimère p52.

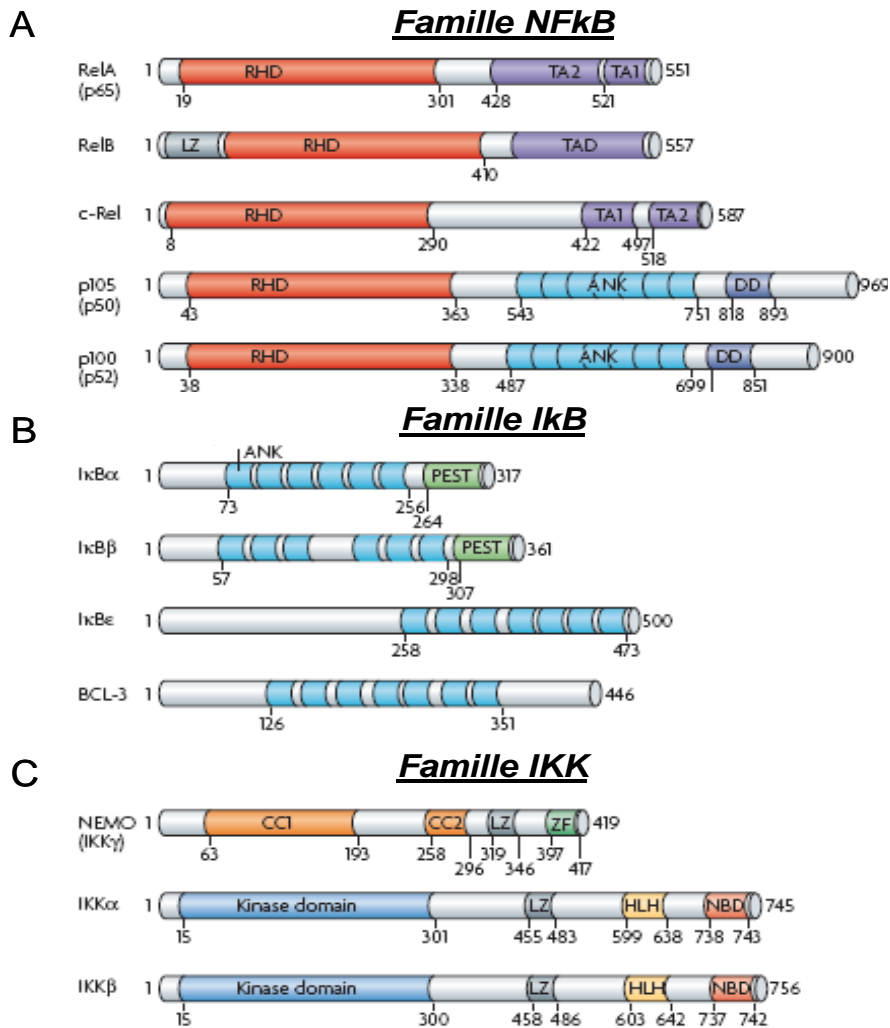


Figure 5 : Structure et domaines fonctionnels des membres des familles NFκB, IκB et IKK. (A) La famille NFκB compte cinq membres : RelA/p65, RelB, cRel, p50/p105 (NFκB1) et p52/p100 (NFκB2). Ils contiennent tous, en Nterm, un motif RHD qui assure la dimérisation et la fixation à l'ADN. Au sein de ce motif se trouve un motif NLS. RelA, RelB et cRel contiennent en Cterm un domaine de transactivation TAD (TA1 et TA2 sont des sous-domaines de TAD). (B) La famille des IκB comprend IκBα, IκBβ, IκBε et Bcl3. Ils contiennent des motifs répétés ANK. (C) La famille IKK comprend IKKα, IKKβ et IKKγ. Seules IKKα et IKKβ ont une activité kinase grâce à leur domaine kinase en Nterm. IKKγ est la sous-unité régulatrice et est aussi appelée NEMO. CC = Coiled-Coil, DD = region with homology to a Death Domain, HLH = Helix-Loop-Helix, LZ = Leucine Zipper, NBD = NEMO-Binding Domain, NEMO = NFκB Essential Modifier, PEST = domain rich in proline (P), glutamate (E), serine (S) et thréonine (T), ZF = Zinc Finger domain. (D'après Perkins ND, NatureRevMolCellBiol2007)

Les protéines NFκB sont classées en deux sous-familles selon leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles.

La première classe est représentée par les sous-unités p50 et p52. Ces sous-unités sont synthétisées à partir de précurseurs plus longs, respectivement p105 et p100. Ces précurseurs contiennent, dans leur partie Cterm, un motif répété Ankyrin, responsable de leur localisation

cytosolique (motif ANK, **figure 5**) et semblable à celui des I κ Bs. Les deux précurseurs p105 et p100 sont dégradés partiellement respectivement en p50 et p52 après clivage protéolytique par le protéasome.

Les trois protéines de la deuxième classe, cRel, RelB et p65/RelA sont directement synthétisées sous leur forme définitive. Elles contiennent toutes trois un domaine d'activation de la transcription (TAD) dans leur partie CTerm (**figure 5**). Toutes les protéines Rel peuvent former des homo- ou des hétérodimères. Sous forme d'homodimères, p50 et p52 échappent à la régulation par les I κ Bs classiques et se trouvent constitutivement dans le noyau. Sous forme d'hétérodimères avec RelA ou c-Rel, p50 et p52 sont séquestrés dans le cytoplasme par les I κ Bs classiques. Le complexe p52-RelB a une faible affinité pour les I κ Bs et échappe à ce mode de régulation (Solan NJ et al., JBC 2002). Cette diversité de combinaisons contribue à la régulation différentielle d'un grand nombre de gènes.

Il existe différents modes d'activation de NF κ B (**figure 4**). Des stimuli comme le TNF α ou l'IL1 induisent la voie NF κ B dite « voie canonique » ou voie classique. Elle se caractérise par une activation du complexe IKK α /IKK β /IKK γ qui cible les complexes NF κ B séquestrés par les I κ Bs. Les sous-unités α et β des IKK phosphorylent deux résidus sérines dans la partie NTerm d'I κ B α . IKK γ /NEMO ne possède pas d'activité enzymatique et structure le complexe IKK. La phosphorylation d'I κ B α entraîne une polyubiquitinylation en Lys48 d'I κ B α aboutissant à sa dégradation par le protéasome et donc, à la libération du dimère NF κ B et sa translocation dans le noyau.

D'autres stimuli, tels que la stimulation par le CD40 ou BAFF-R, activent la voie alternative ou « voie non-canonique ». Elle ne nécessite que la kinase IKK α qui cible les complexes NF κ B possédant NF κ B2/p100. Cette kinase phosphoryle également deux sérines présentes dans la partie CTerm au niveau du motif Ankyrin de p100. Cette phosphorylation entraîne également une polyubiquitinylation en Lys48 mais celle-ci aboutit à la maturation de p100 en p52.

II.2 : La voie des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases)

La famille des kinases MAP (MAPK) inclut notamment JNK, p38 et ERK (**figure 6**) qui sont les principales MAPK induites par LMP-1. Ces MAPK contrôlent un grand nombre de processus cellulaires tels que la croissance, la prolifération, la différenciation, la migration cellulaire et l'apoptose (Dhillon AS et al., Oncogene 2007). L'activation des MAPK implique une cascade d'évènements au cours desquels une MAP d'ordre 3 (MAPKKK, MAP Kinase Kinase Kinase) phosphoryle et active une MAP d'ordre 2 (MAPKK) puis la MAP d'ordre 1 (MAPK, **figure 6**). Les gènes-cibles de ces MAPK sont très diverses, mais on peut citer cJun/AP1 pour JNK, Elk1 pour ERK et STAT1 pour p38.

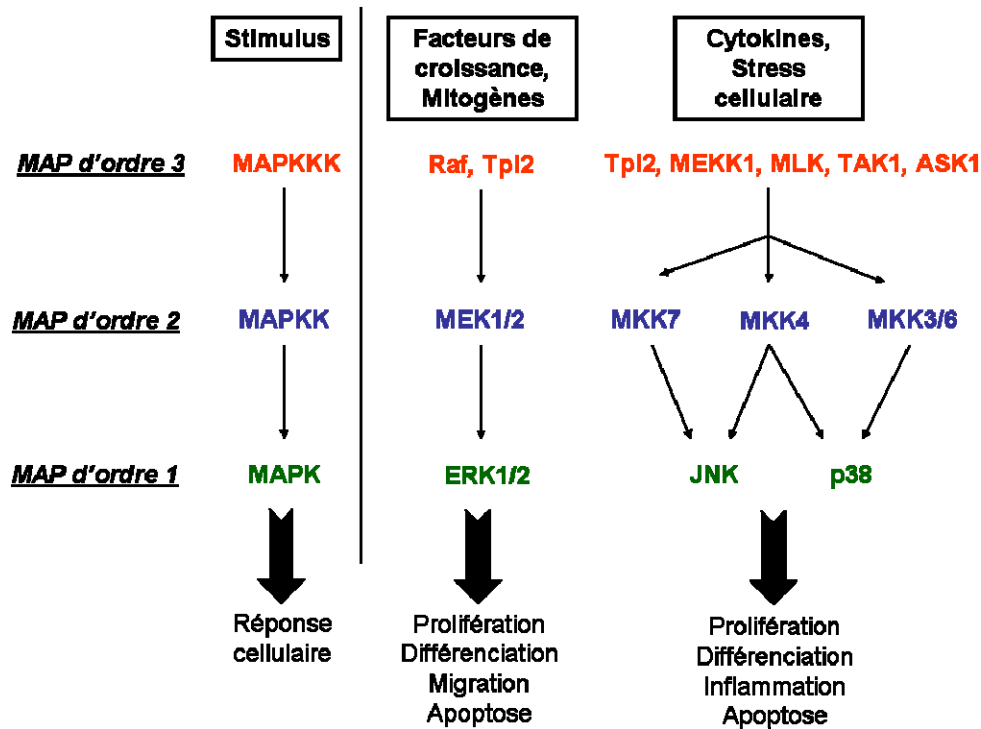


Figure 6 : Organisation fonctionnelle des voies des MAP (Mitogen-Activated Protein). Suite à un stimulus, une cascade d'activation et de phosphorylation se met en place. Une MAP d'ordre 3 (MAPKKK) phosphoryle et active une MAP d'ordre 2 (MAPKK), qui à son tour phosphoryle et active une MAP d'ordre 1 (MAPK). Pour plus de précisions, voir le texte. (modifié d'après Dhillon AS et al., Oncogene 2007).

II.3 : La voie PI3K (*Phosphatidyl-Inositide 3 Kinase*)

La voie de signalisation PI3K est importante dans de nombreux aspects de la croissance cellulaire et de la survie (**figure 7**). Les PI3K constituent une famille de lipide sérine/thréonine kinases et sont constituées de deux sous-unités : une sous-unité régulatrice p85 et une sous-unité catalytique p110. Après activation, la PI3K phosphoryle le PIP2 (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate*) générant le second messenger PIP3 (*Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*). Le PIP3 active un certain nombre de kinases dont Akt/PKB (*Protein Kinase B*) et PDK1 (*Phosphoinositide-Dependent Kinase 1*). Akt contrôle différents processus cellulaires (Samuels Y and Ericson K, *CurrOpOncology* 2006) : inhibition de l'apoptose (inhibition de Bad et caspase-9 notamment), survie cellulaire (activation de la voie NFκB), prolifération cellulaire (inhibition du régulateur négatif du cycle GSK3, *Glycogen Synthase Kinase 3*) et contrôle de la traduction des ARNm (activation de mTOR, *mammalian Target Of Rapamycin*).

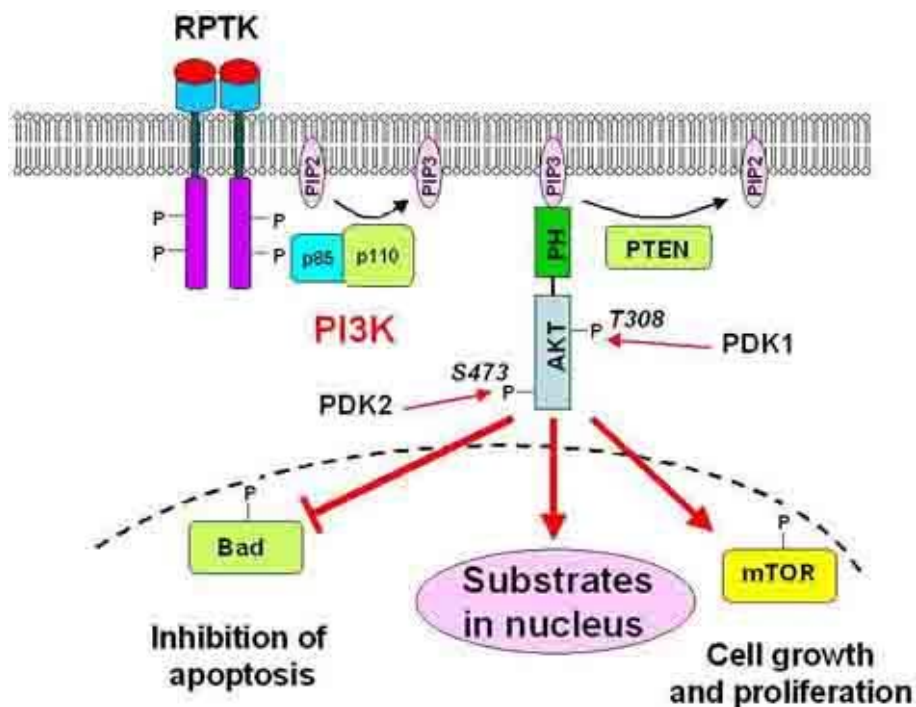


Figure 7 : Représentation schématique de la voie PI3K. (D'après Meier F et al., *Frontiers in Biosciences* 2005).

II.4 : La voie des JAK/STAT (Janus Kinase/Signals Transducers and Activator of Transcription)

La voie des JAK/STAT régule diverses fonctions cellulaires comme la prolifération, l'apoptose et l'expression de marqueurs de surface (Rawlings JS et al., JCellSci 2004). Les protéines JAK représentent une famille de 4 tyrosines kinases : JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk2. La famille des protéines STAT est plus étendue et compte 7 membres : STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6 (Darnell JE Jr, Science 1997). L'activation de JAK (**figure 8**), notamment par les interférons (IFN), entraîne la phosphorylation et la translocation nucléaire des protéines STATs, qui vont se fixer sur des éléments ISRE (*Interferon-Stimulated Response Element*) et GAS (*interferon-Gamma Activation Site*) présents au niveau de promoteurs de gènes impliqués dans des processus d'apoptose, de prolifération cellulaire, de la réponse immunitaire.

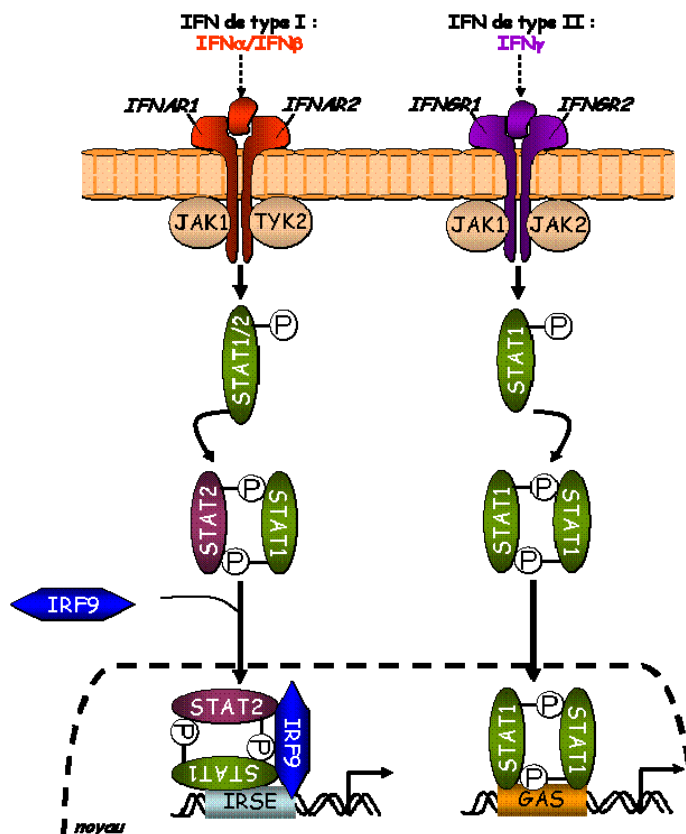


Figure 8 : Représentation schématique de l'activation de la voie JAK/STAT. On distingue deux types d'IFN : l'IFN de type I (IFN α /IFN β) qui se fixe sur le récepteur IFNAR1 et 2 puis l'IFN de type II (IFN γ) qui se fixe sur le récepteur IFNGR1 et 2. Les récepteurs IFNAR1/2 et IFNGR1/2 recrutent les tyrosines kinases de la famille JAK, qui induisent la phosphorylation des protéines

STATs. Les protéines STAT-P se dimérisent et sont transloquées dans le noyau pour se fixer à des éléments de réponse IRSE et GAS menant à l'expression de protéines impliquées dans la réponse antivirale, la prolifération cellulaire et l'apoptose. Dans le cas des IFNs de type I, IRF9 se fixe au dimère STAT1/STAT2 et favorise leur translocation nucléaire puis leur fixation aux séquences IRSE. *IFNAR1/2 = IFN α Receptor1/2*, *IFNGR1/2 = IFN γ Receptor1/2*, *JAK = Janus Kinase*, *STAT = Signals Transducers and Activator of Transcription*, *IRF9 = IFN regulatory Factor 9*, *IRSE = IFN-Stimulated Response Element*, *GAS = interferon-Gamma Activation Site* (Modifié et adapté d'après Shuai K and Liu B, NatRevImmunol 2003)

III - Généralités sur le processus d'apoptose

Il existe deux types principaux de mort cellulaire : l'apoptose et la nécrose.

La **nécrose** est le résultat d'une agression environnementale des cellules (exposition à un produit toxique, une infection virale ou bactérienne). Elle est considérée comme une mort cellulaire désordonnée. La rupture de la membrane cytoplasmique libère le contenu cellulaire dans l'espace extracellulaire et déclenche une réaction inflammatoire.

L'**apoptose** est un processus de mort cellulaire programmée. Elle résulte de l'exécution d'un programme hautement régulé qui va induire la destruction d'une cellule, tout en préservant l'intégrité tissulaire environnante. Ce phénomène a été décrit par Kerr (Kerr JF et al., BritJCancer 1972). L'apoptose est caractérisée par un certain nombre de modifications :

- morphologiques : diminution du volume cellulaire, maintien de l'intégrité de la membrane plasmique au début du processus, relocalisation des organites cytoplasmiques, condensation de la chromatine puis fragmentation du noyau.

- biochimiques : chute du potentiel mitochondrial transmembranaire, externalisation de lipides membranaires (phosphatidylsérines), activation des caspases et fragmentation de l'ADN. L'exposition des phosphatidylsérines est reconnue par les macrophages pour la phagocytose (Messmer UK and Pfeilschifter J, Bioessays 2000).

III.1 : Rôles physiologiques de l'apoptose

L'apoptose survient naturellement au cours de l'embryogenèse, du renouvellement tissulaire et lors du vieillissement. Lors du développement du système immunitaire, l'apoptose joue un rôle crucial dans la sélection lymphocytaire au cours de laquelle les lymphocytes T et B auto-immuns sont éliminés. Cependant, elle peut également se produire dans diverses conditions pathologiques. Une activation anormale de l'apoptose va donner lieu à un phénomène de dégénérescence, observé au cours de nombreuses maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson. Un défaut d'apoptose peut entraîner l'apparition de syndrômes prolifératifs associés à un processus de cancérisation, tout particulièrement au niveau des tissus à renouvellement rapide comme le système immunitaire (lymphome, leucémie).

III.2 : Les principaux acteurs de l'apoptose

III.2.1 : Les différentes voies de l'apoptose

Il existe deux voies principales de signalisation aboutissant à l'apoptose. La première est la voie des récepteurs de mort (**voie extrinsèque**). La deuxième voie est la voie mitochondriale (**voie intrinsèque**) mettant en jeu la mitochondrie. Ces deux voies aboutissent à l'activation des molécules effectrices de l'apoptose, les caspases. Toutefois, il existe une troisième voie activée en réponse à un stress et faisant intervenir le reticulum endoplasmique (RE).

III.2.2 : Les récepteurs de mort (Death Receptors)

Les récepteurs de mort appartiennent à la famille du récepteur du TNF α . Cette famille inclut notamment le récepteur du TNF α de type I (TNF-R1), les récepteurs du TRAIL (*TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand*) DR4 et DR5, et le récepteur Fas/CD95. La fixation de leur ligand conduit à la trimérisation de chacun de ces récepteurs (Ashkenazi A, *NatureRevCancer* 2002).

III.2.3 : Les caspases

Les caspases sont des protéases à cystéine qui possèdent une spécificité stricte de clivage de leurs substrats après un résidu d'acide aspartique, d'où leur nom générique (*Cysteine Aspartate Protease*, Alnemri ES et al., *Cell* 1996). Les caspases ont toutes une structure très conservée et sont synthétisées sous forme de zymogène ou procaspase. Ces procaspases comprennent un pro-domaine en N-Terminal de taille variable et un domaine catalytique en C-Terminal, organisé lui-même en deux sous-unités de 20kDa et 10kDa. Les caspases à petit pro-domaine (caspases 3, 6 et 7) représentent les caspases effectrices et clivent différents substrats cellulaires tels que l'enzyme de réparation de l'ADN, PARP (*PolyADPRibosePolymerase*) ou la protéine de la lamine nucléaire, LamineA. Les caspases à long pro-domaine (dont les caspases 8, 9 et 10) sont appelées caspases initiatrices qui clivent et activent les caspases effectrices.

III.2.4 : Les membres de la famille Bcl2

Bcl2 (*B-cell leukemia 2*) a été identifié comme proto-oncogène dans les lymphomes B folliculaires où une translocation chromosomique t(14;18)(q32;q21) conduit à son expression constitutive. La famille Bcl2 peut être divisée en deux sous-familles : les protéines anti-apoptotiques (Bcl2, BclXL, Mcl1, A1, Bfl1,...) et les protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak, Bid, Bim,...). Tous les membres de la famille Bcl2 possèdent un des 4 motifs conservés BH1 à 4 (*Bcl2 Homology domain*) indispensables pour les interactions protéiques. Seules les protéines anti-apoptotiques possèdent les 4 domaines BH. Parmi les protéines pro-apoptotiques, on distingue les

protéines Bid, Bad et Bim qui ne possèdent que le domaine BH3 (*BH3-only family*) et les protéines Bax, Bak (*Bax-like proteins*).

Les protéines Bax et Bak forment des pores au niveau de la membrane des mitochondries afin de relarguer dans le cytoplasme, le cytochrome C. Le cytochrome C forme un complexe avec Apaf1 notamment, appelé apoptosome menant à l'activation de la caspase 9. La protéine Bcl2 exerce leur effet protecteur en empêchant l'action de Bax et de Bak.

III.2.5 : Les inhibiteurs de l'apoptose

Plusieurs régulateurs naturels de l'apoptose sont décrits. L'apoptose peut être régulée lors de l'étape d'initiation par la protéine cFLIP (*cellular FLICE Inhibitory Protein*, Irmeler M et al., Nature 1997a). cFLIP possède deux domaines DED (*Death Effector Domain*) par lesquels il se lie aux prodomaines des caspases 8 et 10, empêchant leur recrutement aux récepteurs de mort (Bump NJ et al., Science 1995). On décrit plusieurs transcrits de cFLIP. Le plus long, cFLIP-L (*cFLIP-Long*) possède en plus deux domaines DED, un domaine équivalent au domaine catalytique de la caspase 8. Cependant, cFLIP-L ne possède pas d'activité catalytique. Deux autres transcrits plus courts, cFLIP-S (*cFLIP-Short*) et cFLIP-R (*cFLIP Raji*) ne possèdent que les deux domaines DED. cFLIP-L a été décrit comme pouvant protéger de l'apoptose (Hu S et al., JBC 1997; Irmeler M et al., Nature 1997a) ou induire l'apoptose (Han DK et al., JBC 1997; Inohara N et al., PNAS 1997) selon la nature du transcrit et le type cellulaire considéré. Cependant, dans des conditions physiologiques, cFLIP-L semble fonctionner comme un inhibiteur de la procaspase 8.

Les IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*) comportent au moins 5 homologues chez les mammifères : NAIP, cIAP1, cIAP2, XIAP et la survivine. Ces protéines possèdent toutes des domaines BIR (*Baculovirus IAP Repeats*) qui semblent indispensables pour inhiber l'activation des caspases (Deveraux QL et al., Nature 1997; Takahashi R et al., JBC 1998).

La protéine Smac/Diablo (*Second Mitochondrial Activator of Caspases / Direct IAP Binding protein with Low pI*), une fois synthétisée, est importée à la mitochondrie. Au cours de l'apoptose,

Smac/Diablo est libérée et se lie aux IAPs empêchant leur action protectrice et permettant aux caspases (caspase 9 notamment) d'être activées.

III.3 : Mécanismes moléculaires de l'apoptose

III.3.1 : La voie des récepteurs ou la voie extrinsèque

L'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose se fait en réponse à la fixation de ligands spécifiques de type cytokine sur des récepteurs de mort (figure 9).

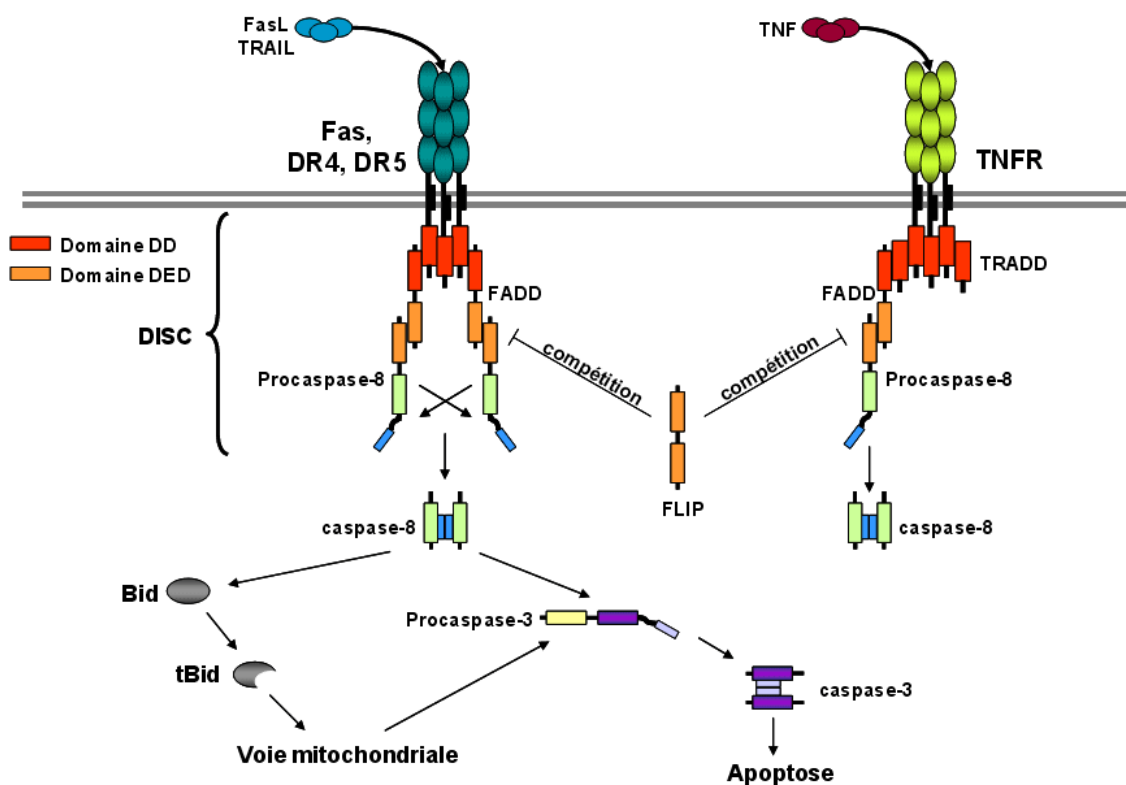


Figure 9 : La voie extrinsèque de l'apoptose ou la voie des récepteurs de mort. Après fixation des ligands, les récepteurs de mort se trimérisent et recrutent grâce à leur domaine de mort (domaine DD) la protéine FADD, soit directement (Fas, DR4 et DR5) soit indirectement par l'intermédiaire de TRADD (TNF-R1). Les protéines FADD recrutent, grâce à leur domaine effecteur de mort (domaine DED), les caspases initiatrices, les procaspases 8 et 10, pour former un complexe DISC. Les caspases initiatrices s'activent par auto-clivage et activent la caspase effectrice, caspase 3. La caspase 8 active peut cliver Bid en une forme tronquée tBid, qui va se lier à Bax et activer la voie mitochondriale. Un régulateur négatif de la caspase 8, FLIP, qui entre en compétition avec les procaspases 8 et 10 pour la fixation à FADD. DD = Death Domain, DED = Death Effector Domain, FADD = Fas-Associated Death Domain, TRADD = TNFR-Associated Death Domain, DR = Death Receptor, TNFR = Tumor Necrosis Factor Receptor, FLIP = FLICE Inhibitory Protein, DISC = Death-Inducing Signaling Complex. (D'après la thèse de David Léger, 2006)

III.3.2 : La voie mitochondriale ou la voie intrinsèque

La voie mitochondriale de l'apoptose est induite par des signaux de stress cellulaire tels que l'exposition à des radiations UV, une irradiation γ , des dommages à l'ADN, une déprivation en facteurs de survie ou encore suite à l'action d'oncoprotéines, de protéines suppresseur de tumeurs comme la protéine p53 ou de protéines de virulence virale. Enfin, la voie mitochondriale est activée par la plupart des agents chimiothérapeutiques (Kaufmann SH and Earnshaw WC, ExpCellRes 2000 ; Kroemer G, BBRC 2003).

La première perturbation cellulaire est la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial (ψ_m), suivie par la libération des facteurs apoptogènes tels que le cytochrome c, Smac/DIABLO, l'AIF (*Apoptosis-Inducing Factor*) et l'endonucléase G (Parone PA et al., Biochimie 2002, **figure 10**).

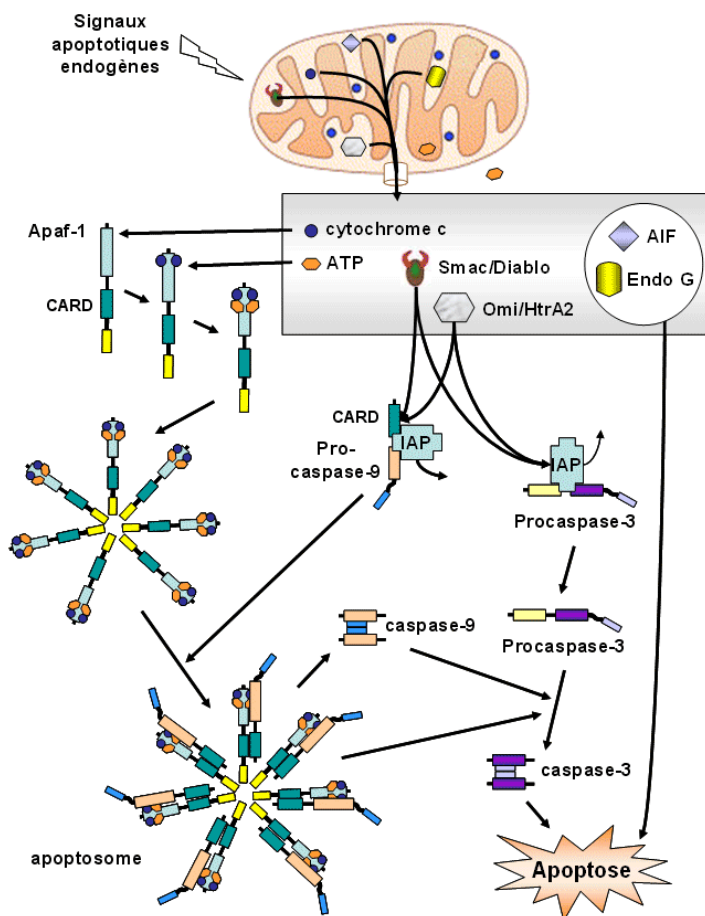


Figure 10 : La voie intrinsèque ou la voie mitochondriale. La perturbation du potentiel mitochondrial ψ_m et la formation de pores au niveau membranaire permettent le relargage dans le cytoplasme du cytochrome c, de Smac/Diablo, d'AIF et de l'Endo G. Le cytochrome c et l'ATP se fixent à Apaf1. Grâce à un domaine CARD, Apaf1 fixe les procaspases 9, formant un complexe appelé apoptosome, générant la caspase 9 qui active les caspases 3 et 7. Les protéines Smac/Diablo et Omi/HtrA2 se fixent aux domaines BIR des IAPs, empêchant l'inhibition de la maturation des procaspases 9 et 3. L'AIF et l'EndoG, relarguées de la mitochondrie, migrent vers le noyau grâce à une séquence de localisation nucléaire et clivent l'ADN en plusieurs fragments. *Apaf1 = Apoptotic Protease Activating Factor1*, *ATP = Adenosine TriPhosphate*, *AIF = Apoptosis-Inducing Factor*, *CARD = Caspase Recruitment Domain*, *IAP = Inhibitor of Apoptosis Protein*, *EndoG = Endonuclease G*, *Smac/Diablo = Second Mitochondrial Activator of Caspases / Direct IAP Binding protein with Low pI*, *Omi/HtrA2 = High Temperature Requirement protein A2*. (D'après la thèse de David Léger, 2006)

Le lien entre les deux voies d'induction de l'apoptose est assuré dans ces cellules par une petite protéine de la famille des protéines Bcl-2, appelée Bid (**figure 9**). En effet, la caspase 8 active clive Bid au niveau de la partie N-Terminale, permettant l'exposition de son domaine BH3. La forme tronquée de Bid appelée tBid est alors rapidement transloquée du cytosol vers la membrane mitochondriale où elle se lie à des protéines pro-apoptotiques dont Bax, induisant l'activation de la voie mitochondriale de l'apoptose (Luo X et al., Cell 1998).

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I - Généralités sur le virus d'Epstein-Barr (EBV)

I.1 : Introduction

L'EBV appartient à la famille des Herpesviridae et infecte près de 95% de la population adulte. La primo-infection est majoritairement asymptomatique, mais peut se manifester par une maladie bénigne, la mononucléose infectieuse, durant l'adolescence le plus souvent. L'EBV a un tropisme prédominant pour les lymphocytes B. Suite à la primo-infection, le virus établit une infection latente ou latence virale, lui permettant de persister tout au long de la vie des individus, sous forme d'épisome dans les cellules infectées. La latence virale est caractérisée par l'expression restreinte de gènes viraux, appelés gènes de latence codant les antigènes nucléaires (les EBNA) et les protéines membranaires (les LMPs). Selon le profil d'expression des gènes de latence, trois types de latence virale (I, II et III) sont référencés. L'EBV est associé à de nombreuses pathologies malignes : le lymphome de Burkitt (pathologie répandue en Afrique), le lymphome de Hodgkin (à forte incidence dans les pays développés), le carcinome du rhinopharynx (très répandue en Asie du Sud-Est) ou les syndromes lymphoprolifératifs suite à un déficit immunitaire.

I.2 : Historique

Dans les années 1950, un médecin anglais, Denis Burkitt, décrit les caractéristiques cliniques et épidémiologiques d'une tumeur survenant chez l'enfant en Afrique de l'Est, appelée lymphome de Burkitt (LB) (Burkitt D, BritJSurgery 1958). Le caractère endémique de cette maladie laissait supposer à Denis Burkitt qu'un agent infectieux serait à l'origine de ce lymphome.

En 1961, suite à une conférence à Londres de Denis Burkitt, Anthony Epstein décida de rechercher cet agent infectieux sur des biopsies de tumeurs issues de ce lymphome. Malgré des recherches infructueuses, Anthony Epstein et Yvonne Barr réussirent à établir des lignées

cellulaires *in vitro* dérivant de tumeurs de Burkitt (Epstein MA and Barr YM, Lancet 1964). Après observation par microscopie électronique de ces lignées, Anthony Epstein, Yvonne Barr et Bert Achong y découvrirent la présence de particules virales morphologiquement apparentées aux herpèsvirus appelées virus d'Epstein-Barr ou EBV (Epstein MA et al., Lancet 1964).

Afin d'identifier les patients risquant de développer un lymphome de Burkitt, Gertrude et Werner Henlé mirent au point un test sérologique. Ces études séro-épidémiologiques montrèrent qu'une grande majorité de la population adulte possède des anticorps dirigés contre l'EBV et que ce virus est l'agent étiologique de la mononucléose infectieuse (Henlé G et al., PNAS 1968). A la même période, le génome viral est détecté dans des cellules malignes de LB et de carcinomes du rhinopharynx (CRP), confirmant l'implication de ce virus dans la survenue de cancers chez l'homme (Henlé W and Henlé G, Bibl Haematologica 1970).

L'obtention de lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL, *Lymphoblastoid Cell Lines*, Pope JH et al., Int J Cancer 1968) après immortalisation des lymphocytes B *in vitro* et la capacité du virus à provoquer des lymphomes chez le primate sont alors démontrés et conforte l'hypothèse que l'EBV est un agent oncogène chez l'homme. En 1975, l'équipe de Tomas Lindahl décrit, la première, que l'EBV est présent dans les lymphocytes B sous forme d'épisome et qu'il se lie à la chromatine (Adams A and Lindahl T, PNAS 1975).

Dans les années 1980 à 1990, l'implication de l'EBV est formellement démontrée dans de nombreuses pathologies malignes, outre le LB et le CRP, telles que la maladie de Hodgkin (LH), les lymphomes T et les lymphomes suite à un déficit immunitaire. En 1984, l'EBV est le premier virus humain dont le génome ait été entièrement séquencé (Baer R et al., Nature 1984). La même année, le récepteur CD21, ou récepteur de la fraction CR2 du complément, est décrit pour la première fois comme impliqué dans la fixation du virus sur les lymphocytes B (Fingerroth JD et al., PNAS 1984). Lors de cette période très prolifique, on décrit quasiment toutes les protéines de latence, dont EBNA-1 (présente dans toutes les latences virales), EBNA-2 (essentielle à l'immortalisation des

lymphocytes B *in vitro* par l'EBV) et LMP-1 (protéine virale capable de transformer à elle seule des fibroblastes de rat).

Des années 1990 à nos jours, de nombreuses équipes améliorent notre connaissance sur la physiopathologie de l'infection par l'EBV et des cancers lui étant associés et sur les différentes protéines de latence au niveau de leur rôle dans la transformation cellulaire ainsi qu'au niveau de leur signalisation. Parmi les résultats majeurs, nous pouvons citer la découverte des microARNs de la région BART (que nous verrons en détail dans la section III.1.2.6).

I.3 : Taxonomie

L'EBV appartient à la famille des Herpesviridae humains, qui compte à l'heure actuelle, 8 membres. Ces herpèsvirus humains ou HHV (*Human Herpes Virus*) ont une étroite communauté de structure, portant sur quatre éléments : un génome à ADN double brin linéaire, une capside icosaédrique à 162 capsomères, une structure protéique fibrillaire formant le tégument et une enveloppe dérivée des membranes nucléaire et plasmique portant des glycoprotéines virales.

Ces herpèsvirus humains sont regroupés en trois sous-familles : les *Alpha-Herpesvirinae*, *Bêta-Herpesvirinae* et *Gamma-Herpesvirinae* (figure 11).

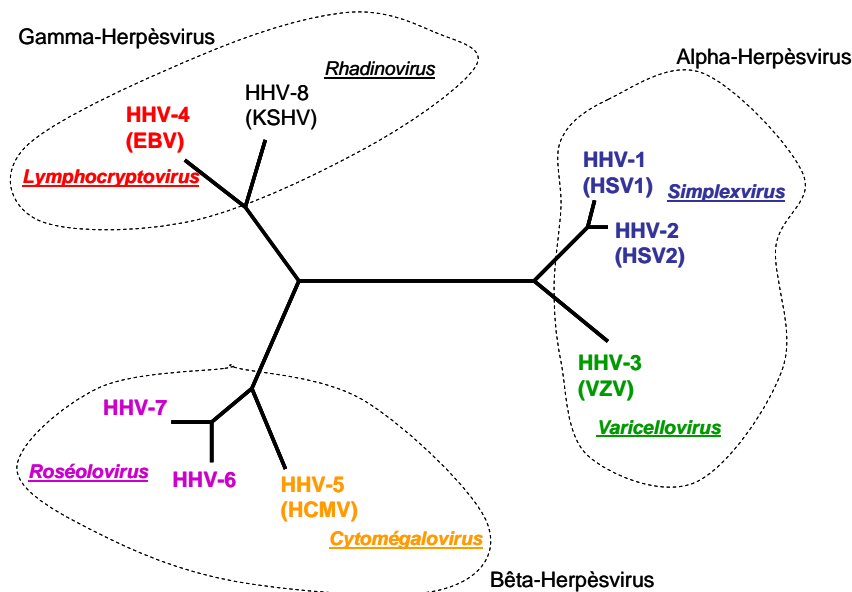


Figure 11 : Arbre phylogénétique des Herpèsvirus humains. Chaque virus possède un nom standard (HHV-n) et un nom usuel donné lors de leur découverte. *HSV* = *Herpes Simplex Virus* ;

VZV = Varicella Zoster Virus ; HCMV = Human CytoMegaloVirus ; HBLV = Human B-Lymphotropic Virus ; EBV = Epstein-Barr Virus ; KSHV = Kaposi's Sarcoma HerpesVirus (d'après Moore PS et al., J.Virol 1996).

L'EBV (ou HHV-4) appartient à la famille des *Gamma-Herpesviridae* et au genre *Lymphocryptovirus*.

II - Caractéristiques du virus d'Epstein-Barr

II.1 : Structure du virion

Comme mentionné précédemment, l'EBV possède une structure commune aux différents membres de la famille des Herpèsvirus (**figure 12**).

Dans le virion, l'ADN génomique de l'EBV est un ADN double brin, linéaire, enroulé autour de protéines basiques, l'ensemble formant le nucléoïde ou core. Cette structure majeure est entourée d'une nucléocapside icosaédrique (20 faces et 12 sommets) de 162 capsomères (150 hexamères et 12 pentamères) d'environ 125 nm de diamètre. Le tégument est un matériel globuleux composé de protéines virales et cellulaires, réparti entre la nucléocapside et l'enveloppe (Johannsen E et al., PNAS 2004). Les particules virales sont également formées d'une enveloppe lipidique composée par les membranes nucléaire et plasmique de la cellule infectée. Cette enveloppe contient notamment des glycoprotéines virales, les gp350/220 qui servent à l'attachement du virion à la surface de la cellule-hôte par interaction avec le récepteur de la fraction CR2 du complément (Fingerroth JD et al., PNAS 1984 ; Tanner J et al., JVirol 1988 ; Szakonyi G et al., NatStructMolBiol 2006). D'autres glycoprotéines virales, les gp42/38, gp85 (gH) et gp25 (gL) se fixent aux molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe II et ont un rôle de co-récepteurs, menant à l'internalisation du virus (Molesworth SJ et al., J.Virol 2000 ; Mullen MM et al., MolCell 2002).

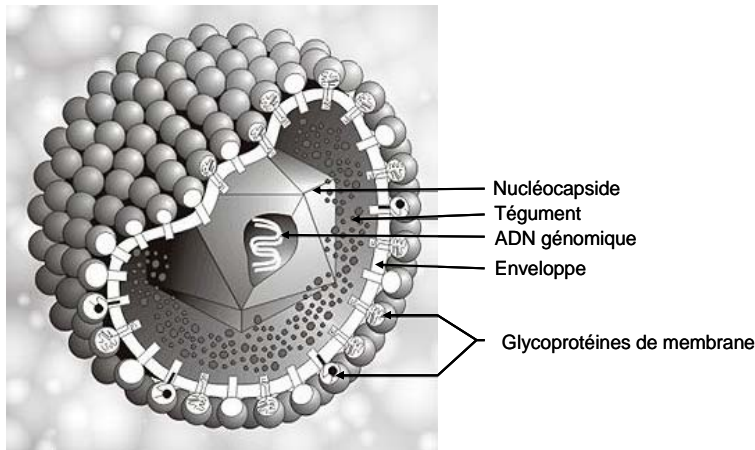


Figure 12 : Structure du virion de l'EBV. Schéma adapté du site

<http://web.njit.edu/~pkb3/>

II.2 : Structure du génome viral

Le génome de l'EBV est un ADN linéaire et bicaténaire d'environ 172 kpb (**figure 13A**). Les principales caractéristiques du génome de l'EBV (et par extension des autres lymphocryptovirus, par exemple PoVH-1 et PoVH-3 qui infectent respectivement le chimpanzé et le gorille) incluent des séquences terminales répétées de 0,5 kpb (TR, *Terminal Repeat*) aux deux extrémités du génome et des séquences internes répétées (IR1 à IR4, *Internal Repeat*). Une de ces séquences répétées internes, IR1 de 3 kpb, divise le génome en deux régions uniques, une région courte U_S (*Short Unique region*) comprenant la région U1 et une région longue U_L (*Long Unique region*) comprenant les régions U2 à U5 (Kieff E, Fields Virology 3rd edition).

Lors de l'infection de la cellule-hôte, le génome de l'EBV se circularise grâce aux séquences terminales TR par un mécanisme encore inconnu (**figure 13B**). L'ADN viral forme alors un épisome ou CCC (*Covalently Closed Circle*, Adams A and Lindahl T, PNAS 1975 ; Lindahl T et al., JMolBiol 1976) et se lie étroitement à la chromatine cellulaire. Sous cette forme épisomique, l'EBV peut se maintenir dans la cellule-hôte sans s'intégrer au génome de celle-ci.

Deux origines de réplication sont décrites (**figure 13A**). L'origine de réplication latente OriP permet au virus de se maintenir sous forme épisomique et les deux origines de réplication lytique OriLyt, fonctionnelles durant la phase productive, que nous verrons en détail en section III.2.

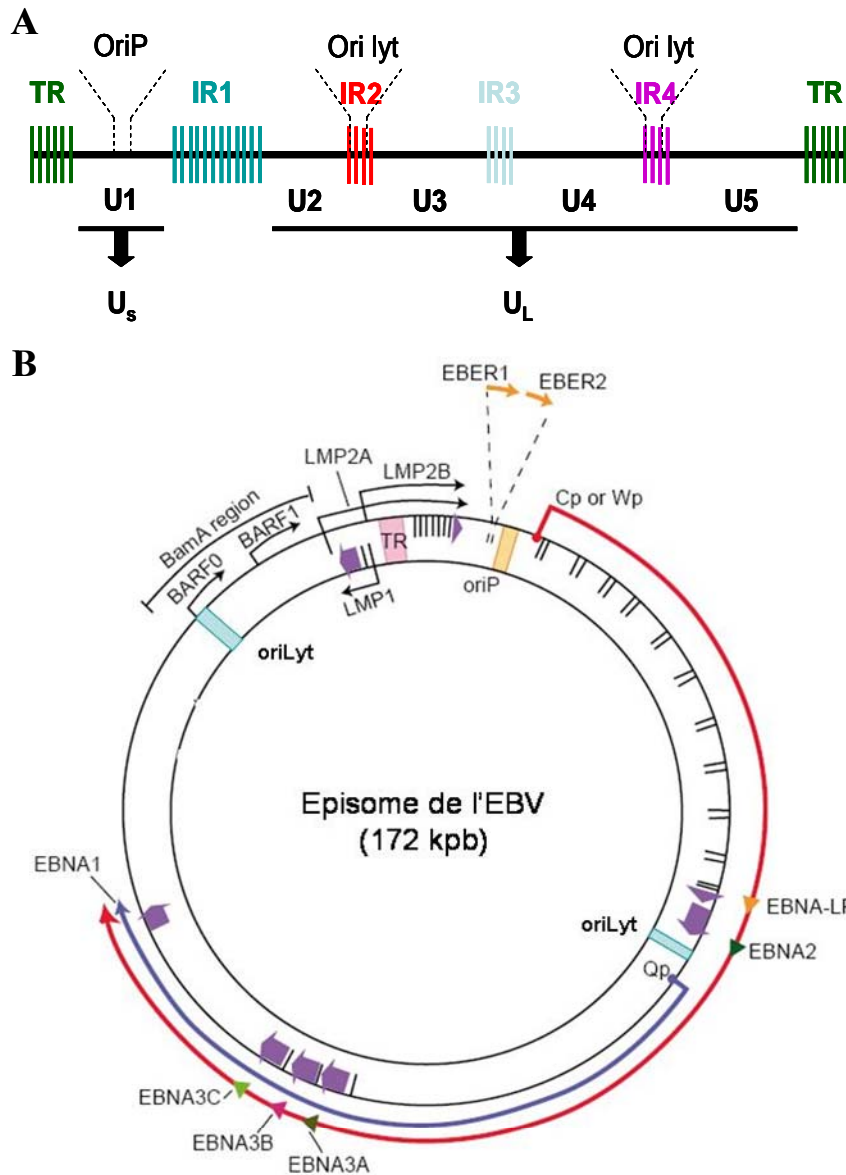


Figure 13 : Représentation schématique du génome de l'EBV sous forme linéaire (A) et sous forme épisomique (B). Les régions codantes des protéines de latence sont représentées par les flèches violettes. Ces protéines de latence sont composées des 6 Antigènes Nucléaires (EBNA-LP, -1, -2, -3A, -3B et -3C) et des 3 Protéines Membranaires de Latence (LMP-1, LMP-2A et -2B). Les flèches orange représentent les ARNs transcrits non-traduits, EBER-1 et -2. Cp, Wp et Qp sont les différents promoteurs de ce génome. TR = Terminal Repeats ; IR = Internal Repeats ; oriP (en orange) = origine de répliation latente ; oriLyt (en vert) = origine de répliation lytique (modifié d'après Murray PG and Young LS, Expert Reviews in Molecular Medecine 2001)

II.3 : Nomenclature

La souche virale utilisée pour le séquençage du génome de l'EBV est la souche B95.8, produite par la lignée lymphoïde de singe B95.8. Cette lignée lymphoïde présente l'avantage de

produire de hauts titres de virions infectieux en culture. L'analyse de la séquence entière (**figure 14**) de la souche prototypique B95.8 a permis l'identification d'une centaine de cadres ouverts de lecture ou ORF (*Open Reading Frame*). Il est à noter que la souche prototypique de l'EBV, B95.8, présente une délétion interne de 12 kpb dans la région U_L, comparativement à la souche W91 issue de tumeurs de lymphomes de Burkitt (Given D and Kieff E *JVirol*1978 ; Bornkamm GW et al., *JVirol* 1980, Raab-Traub N et al., *Cell* 1980).

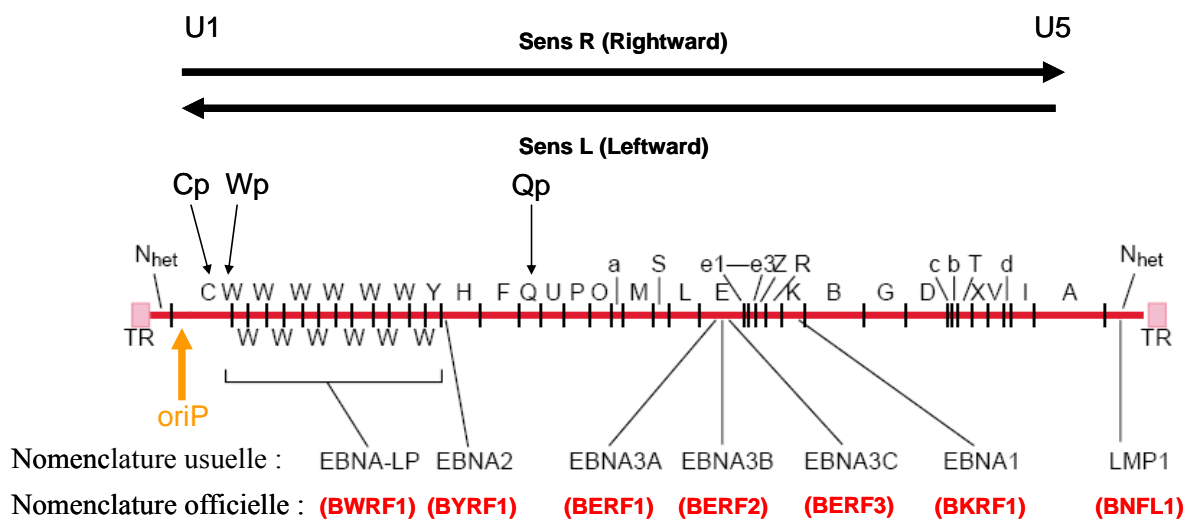


Figure 14 : Carte de restriction du génome de l'EBV (souche B95.8) après digestion par l'enzyme BamHI et localisation des ORF des protéines de latence. Les fragments BamHI obtenus sont classés par ordre alphabétique de A à Z (lettres majuscules) et par ordre de taille (A étant le plus grand fragment). Les lettres en minuscules désignent les fragments très courts. Cp, Wp et Qp sont les différents promoteurs du génome de l'EBV (d'après Murray PG and Young LS, *Expert Reviews in Molecular Medecine* 2001)

Les cadres ouverts de lecture de l'EBV sont répertoriés d'après les fragments obtenus suite à une digestion de l'ADN viral par l'enzyme de restriction BamHI. Les fragments générés sont classés par taille et par ordre alphabétique, le fragment A étant le fragment le plus grand. Les gènes de l'EBV sont, dans la nomenclature officielle (Farell PJ, *Methods in MolecularBiology* vol.174), nommés en fonction du fragment BamHI dans lesquels ils sont localisés et selon l'orientation de leur transcription (**figure 13A** et **figure 14**). Le sens R (*Rightward*) va d'U1 vers U5 et le sens L (*Leftward*) va d'U5 vers U1. Ainsi, le gène codant la protéine EBNA-1 a pour nom officiel BKRF1 (*BamHI K Rightward Frame 1*) : **B** (BamHI) **K** (fragment K) **R** (sens de transcription R) **F1** (1^{er} phase de lecture ou Frame 1).

III- L'infection par l'EBV

Comme tous les membres de la famille des herpesvirus, deux types d'infection sont décrits : une infection latente et une infection lytique. L'**infection latente** permet le maintien du génome viral sous forme d'épisome à l'intérieur des noyaux cellulaires des cellules infectées, favorisant ainsi leur prolifération et la persistance de l'EBV. L'**infection lytique** déclenche la production et la libération de nouvelles particules virales, pouvant infecter les cellules avoisinantes.

III.1 : L'infection latente

L'EBV infecte et immortalise des lymphocytes B *in vitro*. On obtient alors des lignées cellulaires lymphoblastoïdes ou LCL (*Lymphoblastoid Cell Lines*). Deux phénomènes sont essentiels pendant la période de latence : le maintien du génome viral sous forme épisomique dans les noyaux cellulaires et la répression du cycle lytique. De fait, ces LCLs sont très peu permissives à la réplication virale.

Lors de l'infection latente, seuls quelques gènes viraux, appelés gènes de latence, sont transcrits (**figure 15**) : les protéines EBNA (*Epstein-Barr Nuclear Antigen*), les protéines LMP (*Latent Membrane Protein*), les ARN EBER (*EBV-Encoded small nonpolyadenylated RNAs*) et les BARTs (*BamHI A Rightward Transcripts*).

L'expression de ces gènes de latence confère à l'EBV ses propriétés d'immortalisation.

III.1.1 : Les différents types de latences virales

On distingue 4 types de latence virale (0, I, II et III) en fonction des différents gènes exprimés (**figure 15**). Les latences de type I, II et III ont en commun l'expression des ARN non-transcrits EBER (EBER-1 et EBER-2) et les transcrits de la région BamHI A (BARTs). Dans la latence 0, état quasi-silencieux du virus, seuls sont décrits les ARN EBER et la protéine LMP-2A, l'expression des BART reste à déterminer.

Le profil de latence est associé à une utilisation différentielle des promoteurs viraux Qp, Cp, Wp et des promoteurs des LMPs.

La **latence de type I** est décrite les cellules de lymphomes de Burkitt (BL), infectées par l'EBV. Cette latence est caractérisée par la répression des promoteurs viraux Cp, Wp et des promoteurs des LMPs. Le promoteur Qp non-méthylé reste seul actif pour la transcription. Le promoteur Qp permet la transcription d'EBNA-1, seule protéine exprimée au cours de la latence I dans les BL. L'EBV n'a qu'un rôle de cofacteur, et la prolifération des cellules est en rapport avec la translocation du gène codant cMyc avec le locus des gènes des immunoglobulines. Ces cellules de BL, infectées ou non par l'EBV, expriment des marqueurs de différenciation particuliers (CD, *Cluster of Differentiation*) CD10, CD77 et CD38 (RoweM et al., EMBOJ 1987) et sont peu immunogènes.

La **latence de type II** est décrite dans les carcinomes du rhinopharynx, dans la maladie de Hodgkin et dans certains lymphomes T/NK. Cette latence est caractérisée par les promoteurs Cp/Wp réprimés et le promoteur Qp actif (expression d'EBNA-1). Contrairement à la latence de type I, le promoteur des LMPs est actif et permet la transcription de LMP-1, LMP-2A et LMP-2B.

La **latence de type III** est décrite dans les lymphocytes B infectés *in vitro* par l'EBV (LCL) et dans les syndromes lymphoprolifératifs des sujets immunodéprimés après transplantation d'organes (PTLD, *Post-Transplant Lymphoproliferative Disease*). Elle est caractérisée par l'expression de la totalité des gènes de latence (EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-LP, LMP-1, LMP-2A et LMP-2B) à partir des promoteurs Wp puis Cp. Au cours de cette latence, le promoteur Qp n'est cependant pas actif. Les cellules expriment différents marqueurs de d'activation (CD21, CD23, CD30, CD39, CD70) et de marqueurs d'adhésion (CD11a, CD54, CD58).

Ces trois types de latence sont typiquement retrouvés dans certaines pathologies malignes associées à l'EBV, que nous verrons plus tard au cours de l'introduction dans la section IV.3.

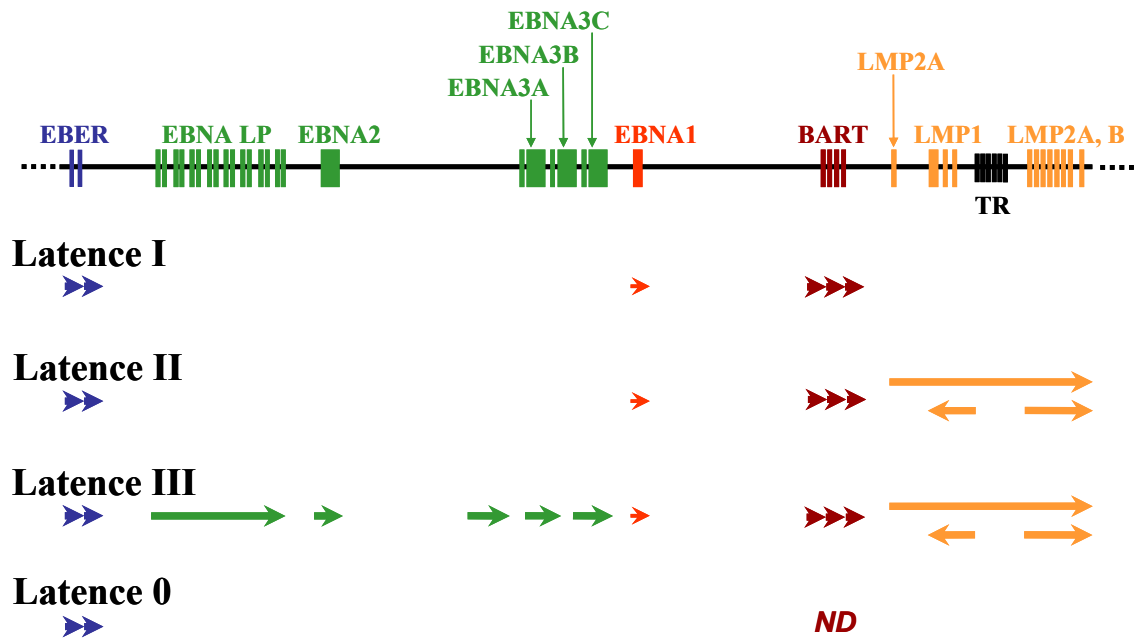


Figure 15 : Profil d'expression des gènes viraux des différents types de latence.

Aucune étude n'a encore été effectuée pour déterminer la présence des transcrits de la région BART dans la latence virale type 0 (ND). (modifié d'après Young LS et al., MolPathol 2000)

Il existe un polymorphisme au niveau des gènes de latence codant EBNA-2 et EBNA-3, permettant de définir deux souches de l'EBV, EBV-A (type 1) et EBV-B (type 2). La souche de type 1 est prévalente en Occident, alors qu'en Afrique et en Nouvelle-Guinée, les types 1 et 2 ont la même prévalence. *In vitro*, ces deux souches ont des propriétés immortalisantes différentes : la souche EBV-A induit principalement une infection latence et la souche EBV-B induit une infection lytique et une prolifération lymphocytaire moindre que le type A. Il existe également un polymorphisme génétique au sein d'une même souche virale au niveau de certains gènes de latence. On peut citer le gène BNL1, codant LMP-1, qui présente plusieurs variants naturels. En effet, il a été décrit différentes mutations au niveau de la partie carboxy-terminale de LMP-1, qui pourraient avoir une incidence sur le pouvoir immortalisant de l'EBV.

III.1.2: Les protéines de latence : description, régulation et fonction

Les protéines de latence dérégulent un certain nombre de fonctions cellulaires en détournant la régulation transcriptionnelle et différentes voies de signalisation cellulaire, aboutissant à l'immortalisation de la cellule-hôte.

III.1.2.1 : Les promoteurs des protéines de latence

Comme indiqué en section III.1.1, trois promoteurs sont particulièrement décrits (figure 3B) : Cp, Wp et Qp, respectivement situé dans les fragments BamH1 C, W et Q. Les promoteurs Cp et Wp contrôlent l'expression des protéines EBNA, alors que le promoteur Qp contrôle l'expression de la protéine EBNA-1 en absence d'EBNA-2. EBNA-2 est une protéine essentielle à l'immortalisation *in vitro* des lymphocytes et n'est exprimée qu'au cours de la latence virale de type III (**figure 15**).

La transcription des gènes codant les EBNA par le promoteur Cp semble restreinte aux lymphocytes B alors que celle par le promoteur Wp est ubiquitaire quel que soit le type cellulaire infecté (Contreras-Brodin C et al., JGenVirol 1996). Les promoteurs Cp et Wp sont exclusifs l'un l'autre (Woisetschlaeger M et al., PNAS 1989). Aux stades initiaux de l'infection virale, Wp permet l'expression d'EBNA-LP, EBNA2 et EBNA1, alors que Cp est réprimé par méthylation. Ensuite, après la répression de Wp par méthylation des motifs CpG, Cp prend le relais de la transcription des gènes de latence (Woisetschlaeger M et al., PNAS 1990 ; Schlager S et al., JVirol 1996). La répression du promoteur Wp dépendrait d'EBNA-2 et d'EBNA-LP puisque lors de l'infection par des virus déficients pour le gène codant EBNA-2 et/ou ayant une mutation sur le gène codant EBNA-LP, il n'y avait plus de switch entre Wp et Cp (Jin XW and Speck SH, JVirol 1992).

Le promoteur Qp est dépourvu d'une boîte minimale de type TATA. Il a été également montré que Qp est hypométhylé et constitutivement activé quelles que soient les tumeurs et les types cellulaires étudiés (Tao Q et al., JVirol 1998).

III.1.2.2 : La famille des Antigènes Nucléaires de l'EBV, les protéines EBNA_s

III.1.2.2.A : EBNA-LP

La protéine EBNA-LP (ou EBNA-5) est la première des protéines EBNA_s à être exprimée à partir du promoteur W_p et joue un rôle important dans l'immortalisation *in vitro* des lymphocytes B par l'EBV (MannickJB et al., JVirol 1991). Elle est composée d'une partie amino-terminale (Nterm) constituée de tandems répétés codés par deux exons W1 (22 aas) et W2 (44 aas) dérivés de la région IR1 et d'une partie carboxy-terminale (Cterm) de 45 aas codés deux exons uniques Y1 et Y2 (**figure 16**, Sample J et al., PNAS 1986 ; Ling PD et al., EMBOJ 2005).

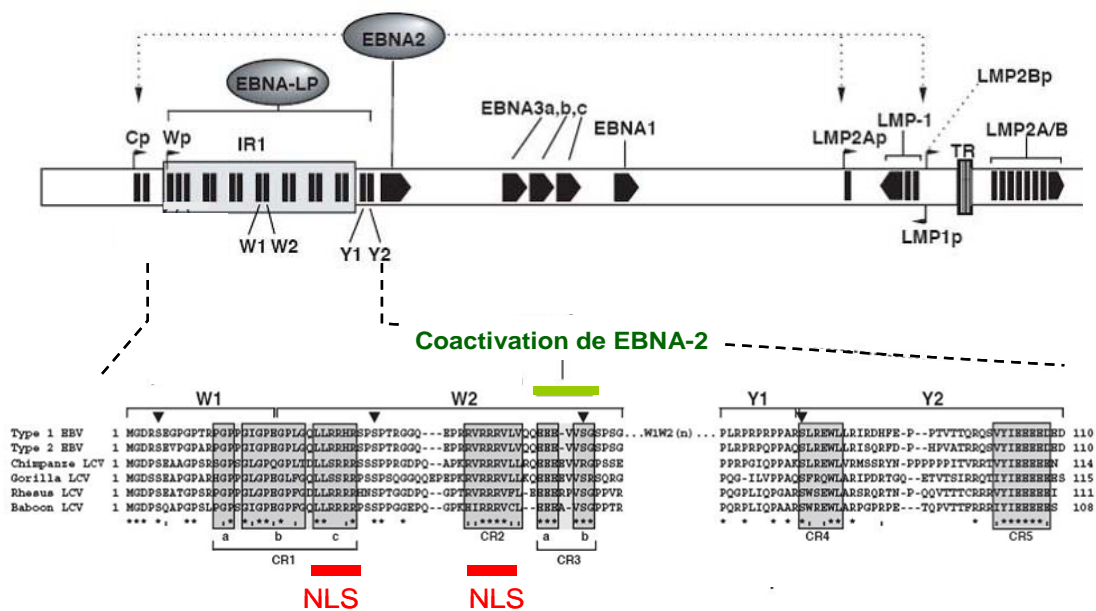


Figure 16 : Séquence primaire d'EBNA-LP de différents lymphocryptovirus. EBNA-LP est constitué de domaines répétés en tandems W1 et W2 et de deux domaines uniques Y1 et Y2. Ces domaines sont composés de régions conservées CR1 à CR5. Les flèches indiquent la position des résidus sérines phosphorylés. CR = Conserved Region, NLS = Nuclear Localization Signal. (d'après LingPD et al., EMBOJ 2005, S1A).

EBNA-LP est essentiellement nucléaire et est retrouvé colocalisé à des structures particulières du noyau, les corps nucléaires PML (*ProMyelocytic Leukemia*, Szekely L et al., JVirol 1996). EBNA-LP possède, au sein des exons W2 et des régions conservées CR1 et CR2 (*Conserved Region 1 et 2*), des séquences basiques de localisation nucléaire ou NLS (*Nuclear Localization Signal*, Peng R

et al., JVirol 2000 ; McCann EM et al., JGenVirol 2001). Cependant, certaines études ont retrouvé EBNA-LP colocalisé à des protéines cytoplasmiques (Kawaguchi Y et al., JVirol 2000 ; Matsuda G et al., MicrobiolImmunol 2003 ; Forsman A et al., JProteomeRes 2008).

Une des principales fonctions d'EBNA-LP est de participer à l'activation de l'expression des protéines membranaires de latence, dont LMP-1, par EBNA-2 et du promoteur Cp (Nitsche F et al., JVirol 1997 ; Harada S and Kieff E, JVirol 1997 ; Peng R et al., JVirol 2000). L'interaction entre EBNA-LP et EBNA-2 grâce aux domaines W1 et W2 est régulée par phosphorylation au niveau de résidus sérine S₃₅ et S₆₃ (Yokoyama A et al., JVirol 2001 ; McCann EM et al., JGenVirol 2001).

EBNA-LP se fixe aux protéines pRB, p53, p14^{ARF}, HA95, Sp100 ou CBP suggérant que cet EBNA est impliqué dans la régulation de la transcription, du cycle cellulaire et de la mort cellulaire (Szekely L et al., PNAS 1993 ; Kashuba E et al., IntJCancer2003 ; Han I et al., JVirol 2001 ; Ling PG et al., EMBOJ 2005 ; Bandobashi K et al., Virology 2001).

En coopération avec EBNA-2, EBNA-LP est capable d'induire la transition de la phase G₀ à la phase G₁ du cycle cellulaire. Ainsi, EBNA-LP permet aux lymphocytes B primaires de sortir de leur état de quiescence grâce à l'activation de la cycline D2 (Sinclair AJ et al., EMBOJ 1994 ; Sinclair AJ and Farrell PJ, JVirol 1995).

Récemment, une étude de spectrométrie de masse a montré qu'EBNA-LP interagit avec les protéines chaperones Hsp70 (*Heat-Shock Protein 70*) et BAG2 (*Bcl2-associated AthanoGene 2*), deux protéines impliquées dans le contrôle de la qualité des protéines en permettant aux protéines mal-conformées d'être dirigées soit vers un système de reconformation de la protéine, soit vers un système de dégradation par le protéasome de la protéine (Forsman A et al., JProteomeRes 2008).

III.1.2.2.B : EBNA-2

A la fin des années 70, a été caractérisé une souche virale d'EBV incapable d'immortaliser les lymphocytes B *in vitro* : la souche P3HR-1. Le séquençage de P3HR-1 et la comparaison avec la

souche B95.8 (immortalisante) ont révélé une délétion au niveau de la région U2 codant EBNA-2 et une partie d'EBNA-LP (Dambaugh T et al., PNAS 1984 ; Mueller-Lantzsch N et al., EMBOJ 1985). EBNA-2 est, avec EBNA-LP, parmi les premières protéines exprimées lors de l'infection des lymphocytes B quiescents. Le rôle essentiel joué par EBNA-2 dans l'initiation et le maintien de l'immortalisation par l'EBV a été démontré, par des expériences de complémentation fonctionnelle, en restaurant son expression dans des cellules infectées par la souche P3HR-1 déficient en EBNA-2 (Cohen JI et al., PNAS 1989 ; Kempkes B et al., EMBOJ 1995).

Le séquençage de la protéine EBNA-2 provenant de différents herpesvirus a montré l'existence de deux types de variants, EBNA-2A et EBNA-2B qui diffèrent selon leur taille, respectivement de 487 aas et 443 aas (Ling PD et al., JVirol 1993). EBNA-2 est majoritairement composée de résidus chargés négativement.

In vitro et *in vivo*, la protéine EBNA-2 est retrouvée sous forme d'homodimères grâce à sa partie aminoterminal (résidus d'aas 2 à 230, **figure 17**, Tsui S and Schubach WH, JVirol 1994). Elle comprend : une région DIM d'homo-dimérisation (1-58, Zimmer-Strobl U and Strobl LJ, SeminCancerBiol 2001) suivie d'une région riche en résidus proline (58-97) puis d'une région variable selon le type de variants (EBNA-2A/EBNA-2B, 135-280)



Figure 17 : Structure d'EBNA-2 (souche B95.8). EBNA2 est constitué de différentes parties caractéristiques : un domaine d'homodimérisation (DIM), une région riche en résidus proline (PRO), une région variable selon le type de variants EBNA2A ou EBNA2B (Diversity), un domaine d'interaction avec RBP-Jkappa (RBP-Jk), une région riche en résidus Arginine-Glycine (RG), un domaine de transactivation (TAD) et une région contenant une séquence de localisation nucléaire (NLS). (Schéma adapté de Zimmer-Strobl U and Strobl LJ, SeminCancerBiol 2001).

Dans la partie carboxyterminale d'EBNA-2, quatre régions ont été décrites : une région d'interaction avec le facteur CBF1/RBP-Jkappa (280-337), une région riche en résidus Arginine-Glycine (RG, 341-355), un domaine de transactivation (TAD, 437-475) et une région contenant une

séquence de translocation nucléaire (NLS, 477-483). Différentes études de mutagenèse ont permis d'améliorer notre compréhension sur l'importance de ces régions dans les propriétés fonctionnelles d'EBNA-2. Une étude approfondie de la partie aminotermine indique que la région DIM (1-58) et une région allant des aa 96 à 210 sont requises pour l'association homotypique d'EBNA-2 (Harada S et al., JVirol 2001). Cependant, une délétion de cette partie aminotermine ne semble pas affecter les propriétés d'EBNA-2, excepté quelques résidus proline de la région ((58-97), Yalamanchili R et al., JVirol 1996). Ceci est d'autant plus surprenant que cette partie d'EBNA-2 est particulièrement conservée et qu'elle semble intervenir dans l'induction de l'expression de la protéine LMP-1 (Gordadze AV et al., JVirol 2004). La partie carboxyterminale d'EBNA-2 comprend quatre régions très conservées (RBP-Jk, RG, TAD et NLS) absolument essentielles pour l'immortalisation des lymphocytes B primaires. Ces régions sont nécessaires à la localisation nucléaire et à l'interaction d'EBNA-2 à l'ADN (Cohen JI et al., JVirol 1991 ; Cohen JI and Kieff E, JVirol 1991, Ling PD et al., JVirol 1993 ; Tong X et al., JVirol 1994 ; Harada S et al., JVirol 2001).

EBNA-2 est un puissant transactivateur de gènes cellulaires et viraux. Il est le principal transactivateur des gènes viraux grâce au promoteur Cp (Sung NS et al., JVirol 1991 ; Woisetschlager M et al., PNAS 1990 ; Jin XW and Speck SH, JVirol 1992) et des promoteurs des gènes codant les protéines LMP-1 et LMP-2. EBNA-2 est également le transactivateur de gènes cellulaires : c-Myc, CD23, c-fgr, CD21 (Kaiser C et al., JVirol 1999 ; Wang F et al., PNAS 1987 ; Knutson JC, JVirol 1990 ; Cordier M et al., JVirol 1990 ; Zimmer-Strobl U et al., EMBOJ 1993). EBNA-2 se fixe à l'ADN par l'intermédiaire de CBF1/RBPJk (*Cpromoter Binding Factor1 / Recombination-Binding Protein Jk*). Une fois fixé sur CBF1/RBPJk, EBNA-2 peut interagir avec d'autres facteurs de transcription tels que ATF2 (*Activating Transcription Factor2*), Spi1/PU1 et SpiB (Ling PD et al., JVirol 1994 ; Waltzer L et al., EMBOJ 1994 ; Henkel T et al., Science 1994 ; Sjoblom A et al., JVirol 1998 ; Laux G et al., EMBOJ 1994).

CBF1/RBPJk est l'homologue de SuH (*Suppressor of Hairless*) de la drosophile et de Lag-1 de *C.elegans*. Ces protéines, aussi appelées CSL pour CBF1/SuH/Lag1, sont connues pour être les protéines effectrices de la voie Notch, voie de transduction essentielle dans de nombreux processus cellulaires : embryogenèse, différenciation musculaire et granulocytaire, lignage des cellules hématopoïétiques,... (Zimber-strobl U and Strobl LS, *SeminCancerBiol* 2001). L'interaction du récepteur Notch et de ses ligands induit un ensemble de clivages protéolytiques à l'origine du relargage dans le cytoplasme de la partie active du récepteur, NotchIC (Notch IntraCellulaire) qui va être transloqué dans le noyau et interagir avec le facteur CBF1/RBPJk (Brou C et al., *MolCell*2000 ; DeStrooper B et al., *Nature*1999).

EBNA-2 et NotchIC interagissent avec le facteur CBF1/RBPJk pour moduler l'expression génique induite par ce facteur. Par son mode d'action, EBNA-2 est considéré comme l'homologue fonctionnel viral de la partie active du récepteur Notch. En absence d'EBNA-2 et de NotchIC, CBF1/RBPJk fonctionne comme un répresseur transcriptionnel en interagissant avec un complexe répresseur de la transcription (**figure 3 et 18**, Olave I et al., *GenDev* 1998 ; Hayward SD, *SeminCancerBiol* 2004). La fixation d'EBNA-2 et de NotchIC au domaine répresseur de CBF1/RBPJk lève la répression transcriptionnelle en déplaçant la liaison avec les HDAC (Hsieh JJ and Hayward SD, *Science* 1995 ; Waltzer L et al., *NAR* 1995).

EBNA-2 est un puissant activateur transcriptionnelle en recrutant par son domaine TAD (TransActivation Domain) des protéines de la machinerie transcriptionnelle par un mécanisme similaire à NotchIC (**figure 18**, Hsieh JJ et al., *MolCellBiol* 1996). EBNA-2 recrute des complexes coactivateurs constitués d'un complexe histone acétyltransférase HAT (PCAF, *p300/CBP-Associated Factor*) et CBP/p300, *CREB-Binding Protein/p300*) et de la machinerie basale de la transcription (**figure 3 et 18**, Tong X et al., *PNAS* 1995 ; Tong X et al., *MolCellBiol* 1995 ; Tong X et al., *JVirol* 1995 ; Wang L et al., *PNAS* 2000). Il a été également montré qu'EBNA-2 recrute les molécules Swi/Snf, impliquées dans le remodelage de la chromatine favorisant la transcription (Wu

DY et al., JVirol 1996 ; Wu DY et al., JVirol 2000). Associé à EBNA-2, EBNA-LP joue de co-activateur (Nitsche F et al., JVirol 1997 ; Bandobashi K et al., Virology 2001).

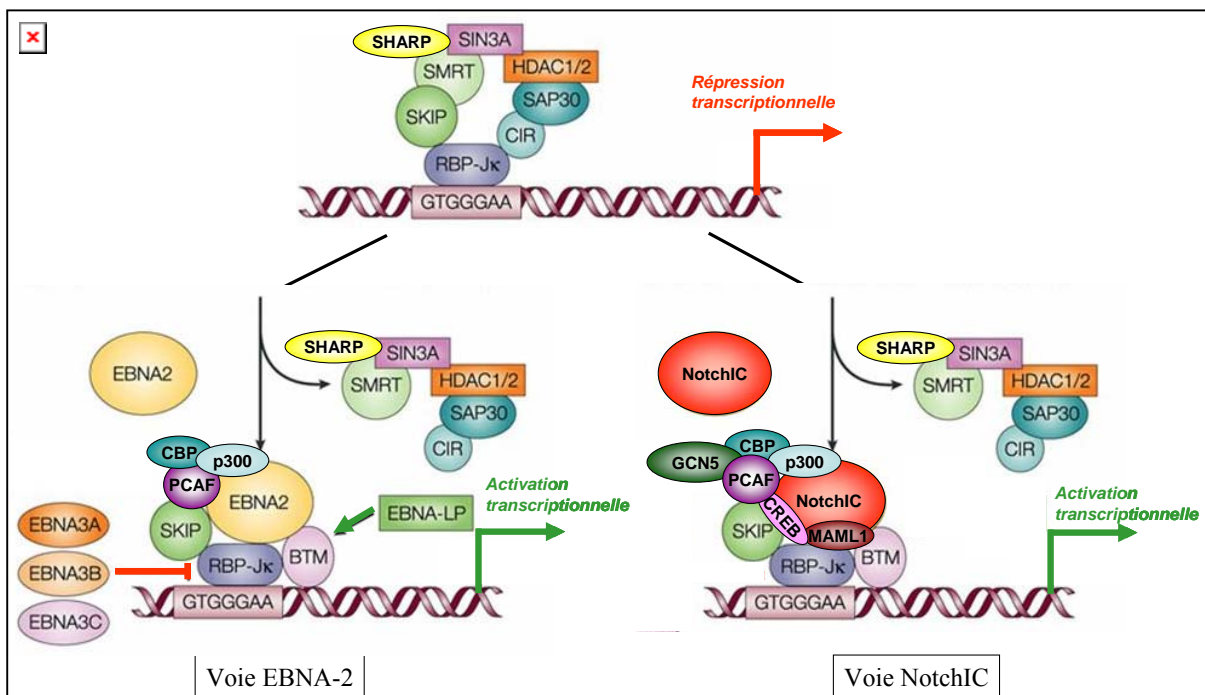


Figure 18 : Levée de la répression transcriptionnelle associée à CBF1/RBPJk par les voies EBNA-2 et Notch1C. En l'absence d'EBNA-2 et de Notch1C, CBF1/RBPJk recrute des corépresseurs transcriptionnels (SHARP, SMRT, mSin3A, HDAC1/2, SAP30, CIR) et réprime la transcription. En présence d'EBNA-2 et Notch1C, la répression, levée par le déplacement du complexe inhibiteur, est suivie par le recrutement de protéines co-activatrices communes (p300, CBP, PCAF), et de GCN5, CREB, MAML1 spécifiques à Notch1C. *CBP = CREB-Binding Protein, PCAF = p300/CBP-Associated Factor, SKIP = Ski Interacting Protein, BTM = Basal Transcription Machinery, CREB = cAMP Response-Element-Binding protein, MAML1 = MasterMind-Like 1, SHARP/MINT = Mx2-Interacting Nuclear Target protein, SMRT = Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormones, CIR = CBF1-interacting coRepressor, SAP30 = Sin3-Associated Protein 30, HDAC = Histone DeAcetylase.* (Modifié et inspiré de Young LS and Rickinson AB, NatRevCancer 2004).

L'activation transcriptionnelle d'EBNA-2 peut être modulée négativement. En effet, les protéines EBNA-3A, -3B et -3C entrent en compétition avec EBNA-2 pour la fixation de CBF1/RBPJk en étant mutuellement exclusifs (Johannsen E et al., JVirol 1996 ; Waltzer L et al., JVirol 1996 ; Robertson ES et al., JVirol 1996). Outre ce phénomène, EBNA-3A et EBNA-3C sont capables de recruter l'HDAC1 et contre-balancer l'activation transcriptionnelle d'EBNA-2 (Bourillot PY et al., JGenVirol 1998 ; Radkov SA et al., JVirol 1999). De plus, le transcrit viral RPMS de la région

BART peut stabiliser l'interaction entre SKIP et CIR et empêcher ainsi le déplacement du complexe répresseur de CBF1/RBPJk par EBNA-2 et NotchIC (**figure 18**, Zhang J et al., JVirol 2001).

En transactivant plusieurs promoteurs cellulaires et viraux, EBNA-2 est essentielle à l'immortalisation *in vitro* des lymphocytes B et à leur survie cellulaire (Kempkes B et al., EMBOJ 1995). Ainsi, la protéine EBNA-2 régule notamment :

- Les gènes codant les EBNAs par l'intermédiaire du promoteur Cp
- Les gènes codant LMP-1 et LMP-2
- Les gènes codant CD21, CD23, c-fgr, et c-Myc.

III.1.2.2.C : EBNA-3 (-3A, -3B et -3C)

Les protéines EBNA-3A, EBNA-3B et EBNA-3C (ou EBNA-3, EBNA-4 et EBNA-6) sont codées par trois exons issus du fragment BamHI E et transcrits à partir du promoteur Cp (Hennessy K et al., PNAS 1985 ; Dillner J et al., IntJCancer 1986 ; Hennessy K et al., PNAS 1986). Avec EBNA-2, les protéines EBNA-3 sont à l'origine du polymorphisme entre les variants de l'EBV (EBV de type I et de type II, Rowe M et al., JVirol 1989 ; Sample J et al., JVirol 1990).

Bien qu'elles soient issues du même fragment BamHI E, elles ne possèdent pas le même rôle. En effet, il a été démontré qu'EBNA-3A et EBNA-3C sont essentielles pour l'immortalisation des LCLs (Tomkinson B et al., JVirol 1993) contrairement à EBNA-3B qui ne semble pas nécessaire (Tomkinson B and Kieff E, JVirol 1992). La délétion complète de l'exon codant EBNA-3B ne perturbe ni l'immortalisation ni la croissance des LCLs *in vitro* (Chen A et al., JVirol 2005).

Les EBNA-3 sont des protéines nucléaires grâce à leurs séquences NLS (Burgess A et al., JGenVirol 2006 ; Buck M et al., JGenVirol 2006) et, comme EBNA-2, se fixent indirectement à l'ADN sur CBF1/RBPJk (Robertson ES et al., JVirol 1996). Cependant, les fixations d'EBNA-2 et des EBNA-3 à CBF1/RBPJk, notamment EBNA-3A et EBNA-3C, semblent mutuellement exclusives (Johannsen E et al., JVirol 1996). En se fixant à CBF1/RBPJk, EBNA-3A et EBNA-3C déplacent la liaison de ce facteur à l'ADN et régulent négativement ainsi la transactivation des

gènes par EBNA-2 (Waltzer L et al., *JVirol* 1996), dont la protéine LMP-1 (LeRoux A et al., *Virology* 1994). Par ce même mécanisme, EBNA-3C est capable de réguler l'expression de tous les EBNAs en réprimant le promoteur viral Cp (Radkov SA et al., *JVirol* 1997) et exercerait un rétro-contrôle afin de maintenir les EBNAs et les LMPs à un certain niveau d'expression (Robertson ES et al., *JVirol* 1995 ; Lin J et al., *JVirol* 2002).

De plus, EBNA-3C a un rôle de répresseur transcriptionnel intrinsèque en recrutant des HDACs (HDAC1 et HDAC2) et des co-répresseurs tels que CtBP, mSin3A et NCoR grâce à une interaction avec la ProThymosin alpha (Radkov SA et al., *JVirol* 1999 ; Touitou R et al., *JVirol* 2001 ; Knight JS et al., *JVirol* 2003). L'action répressive d'EBNA-3C ne requiert cependant pas l'interaction avec CBF1/RBPJk (Bain M et al., *JVirol* 1996 ; Bourillot PY et al., *JGenViro* 1998). Le traitement à la TSA (TrichoStatineA), inhibiteur des HDAC n'inhibe que partiellement l'activité déacétylase de ce complexe suggérant que d'autres protéines à activité déacétylase insensibles à la TSA seraient impliquées (Knight JS et al., *JVirol* 2003).

Néanmoins, certaines études ont montré qu'EBNA-3C pourrait agir comme un activateur transcriptionnel en induisant l'expression du CD23, de LMP-1 (Wang F et al., *JVirol* 1990) et de LMP-2B (Jimenez-Ramirez C et al., *JVirol* 2006) grâce à l'association avec les facteurs Sp1 et PU.1 (Marshall D and Sample C, *JVirol* 1995 ; Lin J et al., *JVirol* 2002). Dans ces circonstances, EBNA-3C aurait un rôle similaire à EBNA-LP. EBNA-3C est capable d'interagir, par l'intermédiaire de la ProThymosin alpha, avec des molécules co-activatrices telles que l'acétyltransférase p300 (Cotter MA 2nd and Robertson ES, *MolCellBiol* 2000 ; Subramanian C et al., *JVirol* 2002).

EBNA-3C est essentiel à la pathogenèse associée à l'EBV en régulant la prolifération, le cycle cellulaire et les capacités métastatiques des cellules infectées par ce virus. EBNA-3C est capable d'interagir et de stabiliser c-Myc grâce au recrutement de son co-activateur Skp2, augmentant ainsi la transcription des gènes dépendants de c-Myc (Bajaj BG et al., *JVirol* 2008). EBNA-3C fonctionne comme une oncoprotéine en ciblant le rétinoblastome Rb (Parker G et al.,

Oncogene 1996) par différents mécanismes. EBNA-3C peut, d'une part, augmenter la phosphorylation de Rb (Knight JS and Robertson ES, JVirol 2004 and Knight JS et al., JVirol 2004) et d'autre part recruter SCFSkp2 qui dégrade Rb (Knight JS et al., PNAS 2005) permettant la progression du cycle cellulaire. EBNA-3C peut également agir sur un autre inhibiteur du cycle cellulaire, p27^{Kip} soit en empêchant son accumulation (Parker GA et al., Oncogene 2000), soit en augmentant sa dégradation (Knight JS et al., MolCellBiol 2005).

EBNA-3C peut supprimer l'arrêt du cycle en G2/M en réponse à des drogues génotoxiques (Krauer KG et al., Oncogene 2004) et pourrait contribuer à l'accumulation de dommages à l'ADN (Wade M and Allday MJ, MolCellBiol 2000).

Enfin, EBNA-3C augmente les capacités métastatiques des cellules infectées par l'EBV en interagissant avec le suppresseur de métastases, Nm23-H1 et inhibe la capacité de Nm23-H1 à supprimer la migration des cellules de lymphome de Burkitt et des cellules du cancer du sein (Subramanian C et al., NatureMed 2001). Grâce à l'interaction avec Nm23-H1, EBNA-3C induit l'expression de la métalloprotéase MMP-9 (connue pour son implication dans les lymphomes agressifs, Koppers DA et al., JVirol 2005) et de la cyclo-oxygénase COX-2, impliquée dans les phénomènes inflammatoires via les facteurs CRE, AP1 et NFkB (Kaul R et al., JVirol 2006).

III.1.2.2.D : EBNA-1

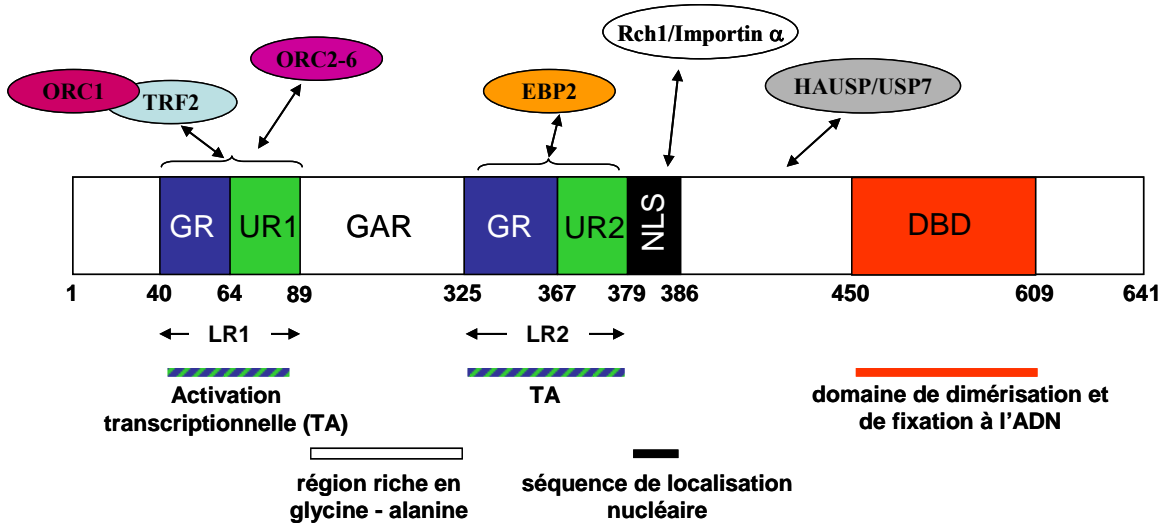
En latence III, la protéine EBNA-1 est transcrite à partir du promoteur Wp puis à partir du promoteur Cp après circularisation du génome (Kieff E, Fields Virology 1996). Lors des latences virales de type I et II où EBNA-1 est la seule des protéines EBNA à être produite, les promoteurs Wp et Cp sont réprimés par méthylation et c'est le promoteur Qp qui reprend le relais pour la transcription d'EBNA-1 (Schaefer BC et al., PNAS 1995). Hormis dans la latence de type 0, EBNA-1 est la seule des protéines de latence à être exprimée dans les cellules infectées par l'EBV (Rowe DT et al., EMBOJ 1986). La protéine EBNA-1 est la protéine de latence requise pour la réplication et la maintenance de l'épisome viral. EBNA-1 se fixe au niveau de l'origine de

réplication latente OriP (Lupton S and Levine AJ, MolCellBiol 1985). Bien qu'EBNA-1 soit essentiel à la maintenance du génome sous forme épisomique, il semblerait qu'EBNA-1 ne soit pas nécessaire à l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro* (Humme S et al., PNAS 2003). En effet, l'équipe d'Aloys Schepers a réussi à établir des LCLs après infection des lymphocytes B par des virions déficients en EBNA-1. Dans ces LCLs-EBNA-1 Δ , les auteurs constatent que le génome de l'EBV est intégré au génome de la cellule-hôte et qu'il exprime l'intégralité des gènes de latence, permettant aux LCLs-EBNA-1 Δ de proliférer.

EBNA-1 est une protéine de 641 aas (**figure 19**) localisée au niveau des chromosomes mitotiques (Marechal V et al., JVirol 1999 ; Kanda T et al., MolCellBiol 2001), dont la partie Nterm de 89 aas est séparée du reste de la molécule par une région répétée de résidus de glycine et d'alanine ou région GAR (*Glycine-Alanine Repeat*) de 239 aas (résidus 89 à 325, Lindner SE and Sugden B, Plasmid 2007). La partie Cterm est constituée d'un domaine de dimérisation et de fixation à l'ADN (résidus 450 à 609, Bochkarev A et al., Cell 1995 ; Lindner SE and Sugden B, Plasmid 2007). EBNA-1 possède une séquence de localisation nucléaire (NLS) située entre les résidus 379 et 386. EBNA-1 est composée de domaines basiques riches en résidus de glycine et d'arginine 40-64 et 325-367 (GR, *Glycine Arginine-rich region*) et de régions uniques UR1 et UR2 (*Unique Region 1 and 2*), formant les motifs LR1 (*Linker Region 1* : GR 40-64 + UR1) et LR2 (GR 325-367 + UR2). Ces motifs sont impliqués dans la maintenance de l'épisome, la réplication virale et l'activation transcriptionnelle (Kanda T et al., MolCellBiol 2001 ; Marechal V et al., JVirol 1999 ; Wu H et al., JVirol 2002). En effet, EBNA-1 est décrit comme un activateur transcriptionnel et augmente l'expression de gènes viraux à partir des promoteurs viraux Cp et de LMP-1 (Gahn TA and Sugden B, JVirol 1995 ; Kieff E, Chapitre 23, Fields Virology 1996) grâce à son domaine UR1 (Altmann M et al., PNAS 2006).

EBNA-1 est également capable de se fixer au promoteur viral Qp pour réguler sa propre expression (Nonkwelo C et al., JVirol 1996). Cette autorégulation d'EBNA-1 est active quel que

soit le type de latence (Sample J et al., JVirol 1992). Certains facteurs cellulaires, IRF2 et IRF7, peuvent contribuer à la répression de l'expression d'EBNA-1 (Zhang L and Pagano JS, MolCellBiol 1997 ; Zhang L and Pagano JS, MolCellBiol 1999).



Figure

19 : Structure de la protéine EBNA-1. EBNA-1 est constitué de différents domaines caractéristiques : deux domaines d'activation transcriptionnelle LR1 (GR + UR1, 40-89) et LR2 (GR +UR2, 325-367), un domaine riche en résidus de glycine et d'alanine (GAR, 89-325), une séquence de localisation nucléaire NLS (379-379) et un domaine de dimérisation et de fixation à l'ADN (DBD, 450-609). Le domaine d'activation transcriptionnelle (TA) est constitué d'une région GR riche en résidus de glycine et d'arginine puis d'une région unique UR. Ces régions TA permettent le recrutement de facteurs cellulaires impliqués dans le processus de réplication (ORC1-6, TRF2, EBP2). Le domaine GAR permet d'éviter la présentation de l'antigène en inhibant la dégradation par la protéasome d'EBNA-1. Au niveau de la séquence NLS est recrutée l'importine α qui contribue au transport d'EBNA-1 dans le noyau. Une dernière région (386-450) recrute HAUSP/USP7 connue pour déubiquitiner p53. GR = *Glycine-Arginine rich region*, UR = *Unique Region*, TA = *Transcriptional Activation region*, LR = *Linker Region*, GAR = *Glycine-Alanine Repeat*, NLS = *Nuclear Localization Sequence*, DBD = *DNA-Binding and Dimerization*, ORC = *Origin Recognition Complex*, TRF2 = *Telomere Repeat-binding Factor 2*, EBP2 = *EBNA-1 Binding Protein 2*, HAUSP/USP7 = *Herpes-Associated Ubiquitin-Specific-Protease / Ubiquitin-Specific Proteases*. (modifié et adapté de Lindner SE and Sugden B, Plasmid2007).

La fonction principale d'EBNA-1 est de maintenir l'épisome viral au cours des divisions cellulaires. La ségrégation stable du génome viral requiert la reconnaissance par EBNA-1 de l'élément FR (*Family of Repeats*) et de l'élément DS (*Dyad Symmetry*) d'OriP (**figure 20**) et l'attachement d'EBNA-1 aux chromosomes mitotiques grâce à la protéine EBP2 (*EBNA-1 Binding Protein 2*, Hung SC et al., PNAS 2001 ; Kanda T et al., MCB 2001 ; Kapoor P et al., MCB 2005). EBP2 est une protéine nucléolaire impliquée dans la biogenèse des ribosomes (Shire K et al., JVirol

1999). Cependant, son rôle est remis en cause. La délétion de la région d'interaction avec EBP2 n'a aucune conséquence sur la maintenance du génome viral (Altmann M et al., PNAS 2006).

EBNA-1 recrute différents facteurs cellulaires pour l'initiation de la réplication (Chaudhuri B et al., PNAS 2001 ; Dhar SK et al., Cell 2001 ; Schepers A et al., EMBOJ 2001). Parmi celles-ci, TRF2 (*Telomere Repeat binding Factor 2*) se fixe à la partie Nterm au niveau du motif LR1 et augmente l'affinité d'EBNA-1 pour l'élément DS d'OriP (Deng Z et al., MolCell 2002 ; Atanasiu C et al., EMBO Report 2006). L'interaction entre EBNA-1 et l'élément DS entraîne le recrutement de facteurs cellulaires du complexe pré-réplcatif (pre-RC ou *pre Replicative Complex*) constitué d'ORC1 à ORC6 (*Origin Recognition Complex 1-6*), des hélicases MCM2 à 7 (Chaudhuri B et al., PNAS 2001, Dhar SK et al., Cell 2001) et de la protéine RPA (*Replication Protein A*, Zhang D et al., NAR 1998).

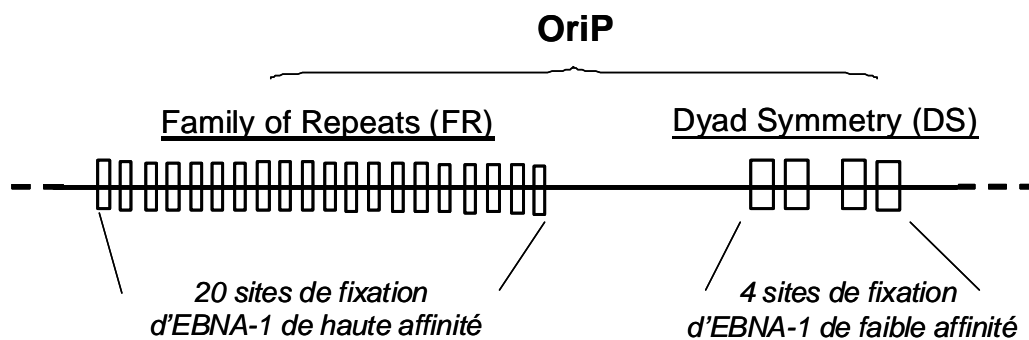


Figure 20 : Représentation schématique de l'origine de réplication OriP. OriP est constitué de deux éléments : FR et DS. L'élément FR est composé de 20 sites de fixation d'EBNA-1 de haute affinité alors que l'élément DS compte 4 sites organisés en doublets.

Une dernière fonction attribuée à EBNA-1 est de prévenir la présentation par le CMH de classe I (Levitskaya J et al., Nature 1995 ; Levitskaya J et al., PNAS 1997 ; Yin Y et al., Science 2003), grâce à la présence d'une région riche en résidus de glycine et d'alanine, GAR (*Glycine Alanine Repeats*, 89-325, **figure 19**) dont la taille varie selon les souches d'EBV (Levitskaya J et al., Nature 1995). Ainsi, la région GAR prévient la présentation d'antigènes aux lymphocytes CD8+ (Chen F et al., JVirol 1995). Cependant, il a été démontré récemment que des lymphocytes CD4+ et CD8+ étaient capables de reconnaître des épitopes spécifiques d'EBNA-1 après présentation par le CMH de classe II (Münz C, JExpMed 2004).

III.1.2.3 : Les protéines membranaires de latence

III.1.2.3.A : LMP-1 (Latent Membrane Protein-1)

Le chapitre V sera entièrement consacré à la description de la protéine LMP-1.

LMP-1 est transcrit à partir de la région BamHI N du génome viral et du gène BNLF1 (BamHI N Leftward Frame1). LMP-1 est indispensable à l'immortalisation par l'EBV et est considéré comme l'oncogène majeur du virus (Eliopoulos AG and Young LS, *SeminCancerBiol* 2001). LMP-1 se comporte comme un homologue fonctionnel de la famille des récepteurs du TNF α , notamment du récepteur CD40. *In vivo*, LMP1 peut se substituer à CD40 en induisant l'expression d'un grand nombre de gènes cellulaires impliqués dans les processus d'activation et de prolifération cellulaire dans les lymphocytes B (Uchida J et al., *Science* 1999). Contrairement aux récepteurs cellulaires dont l'activation dépend d'un ligand, LMP-1 est constitutivement actif et son expression se traduit par un détournement et une dérégulation chronique de voies de transduction et de leurs gènes cibles impliqués notamment dans des processus prolifératifs (Gires O et al., *EMBOJ* 1997).

III.1.2.3.B : LMP-2 (Latent Membrane Protein-2)

Les deux protéines LMP-2 (LMP-2A et LMP-2B) sont codées par le même gène mais par deux exons différents après circularisation du génome viral et la fusion des *Terminal Repeats* (TR, Laux G et al., *EMBOJ* 1988 ; Sample J et al., *JVirol* 1989). LMP-2B est délété des 119 aas situés dans la partie Nterm de LMP-2A. Ces deux protéines ont, respectivement, un poids moléculaire de 40kDa et 54kDa (**figure 21**, Longnecker R and Kieff E, *JVirol* 1990). L'expression des LMP-2 est induite par EBNA-2 (Zimber-Strobl U et al., *EMBOJ* 1993). En absence de celui-ci, l'activation transcriptionnelle de Notch est induite par LMP-2A, régulant ainsi sa propre expression (Anderson LJ and Longnecker R, *Virology* 2008).

LMP-2A et LMP-2B ne sont pas essentiels à l'infection et l'immortalisation *in vitro* des lymphocytes B primaires par l'EBV (Longnecker R et al., JVirol 1992 ; Longnecker R et al., JVirol 1993 ; Longnecker R et al., JVirol 1993) mais LMP-2A semble toutefois contribuer à l'efficacité de l'immortalisation (Brielse M et al., JGenVirol 1996). *In vivo*, LMP-2A joue un rôle important dans le maintien du virus à l'état latent (Miller CL et al., PNAS 1994; Fukuda M and Longnecker R, JVirol 2005).

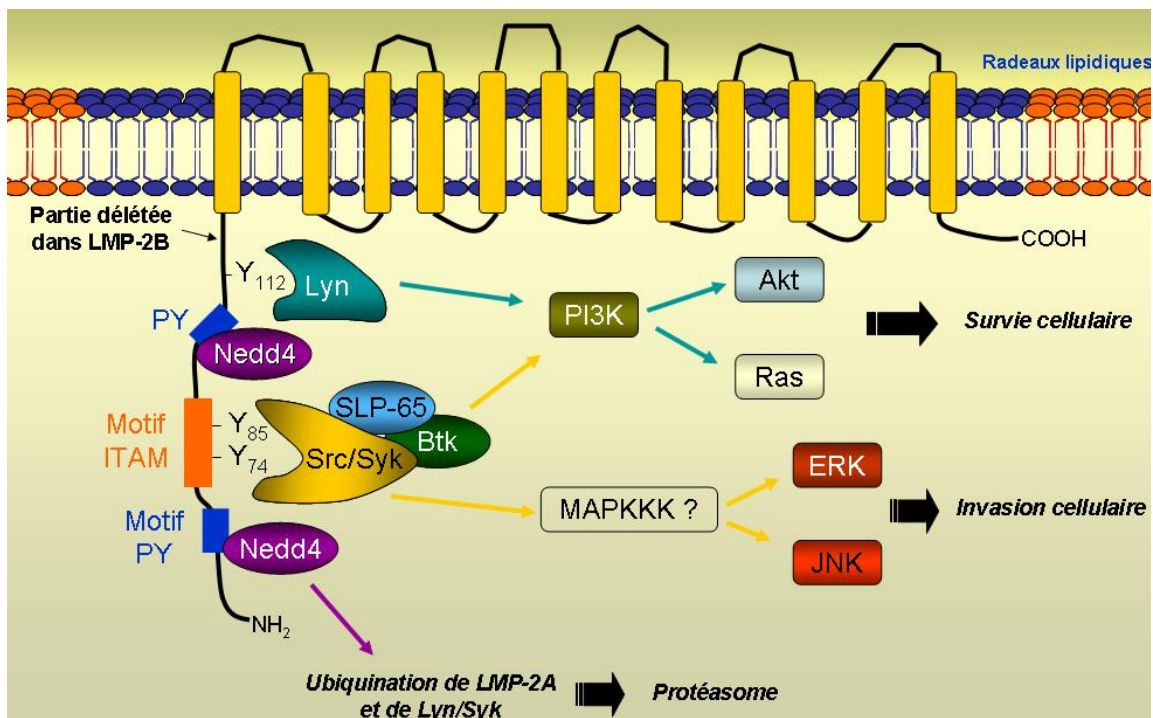


Figure 21 : Structure de LMP-2A. LMP-2A est constitué de 12 domaines transmembranaires et de deux queues cytoplasmiques en Cterm et en Nterm de la protéine. Les 167 aas de la queue Nterm, délétes dans LMP-2B, représentent la partie signalisatrice. LMP- 2A est phosphorylé au niveau de tyrosines pour le recrutement de protéines tyrosine kinases (PTK) : Y₁₁₂ recrute Lyn puis Y₈₅ et Y₇₄ (formant le motif ITAM) recrutent Src/Syk. Le recrutement des PTK mène à l'activation des voies Ras/PI₃K/Akt et des voies des MAPK ERK et JNK. Les motifs riches Proline (motifs PY) permettent le recrutement d'E3 ubiquitine ligases de la famille Nedd4. La MAP d'ordre 3 (MAPKKK) à l'origine de l'activation d'ERK et de JNK n'est pas encore identifiée. *ITAM* = *Immunoreceptor Tyrosine-based Activators Motifs* ; *SLP-65* = *Src homology 2 domain-containing Leukocyte adaptor Proteins-65* ; *Btk* = *Bruton agammaglobulinemia Tyrosine Kinase* ; *PI3K* = *PhosphoInositide-3 kinase* ; *MAPKKK* = *MitogenActivatedProteinKinaseKinaseKinase* ; *ERK* = *Extracellular signal-Regulated Kinase* ; *JNK* = *cJunNterminalKinase*.

L'extrémité Nterminale est la région signalisatrice, importante pour la fonction de LMP-2A. LMP2-A interagit avec ERK, une sérine/thréonine kinase de la famille des MAP Kinases (*Mitogen-Activated Protein Kinases*, Chen SY et al., JVirol 2002). LMP-2A possède un motif ITAM

(*Immunoreceptor Tyrosine-based Activators Motifs*) constitué de résidus de tyrosine Y₇₄ et Y₈₅. Ce motif ITAM permet l'interaction avec les protéines tyrosine kinases de la famille Src, Lyn et Syk (Longnecker R et al., *JVirol* 1991 ; Burkhardt AL et al., *JVirol* 1992) de la signalisation du BCR (*B Cell Receptor*).

De plus, LMP-2A possède deux motifs PY, riches en résidus de proline qui interagissent avec les membres de la famille Nedd4. Nedd4 est une E3 ubiquitine ligase capable d'ubiquitinyler la partie Nterminale de LMP-2A et les molécules impliquées dans la signalisation du BCR (Ikeda A et al., *JVirol* 2003). La conséquence de cette ubiquitinylation est la régulation négative de la signalisation induite par LMP-2A.

Une des propriétés principales de LMP-2A est de moduler le signal induit par le BCR en agissant comme un dominant négatif, en recrutant les molécules de la signalisation du BCR, SLP-65 et Btk (Engels N et al., *JExpMed* 2001 ; Merchant M and Longnecker R, *Virology* 2001 ; Miller CL et al., *JVirol* 1993 ; Miller CL et al., *Immunity* 1995 ; Fruehling S et al., *JVirol* 1998). Ainsi, LMP-2A peut se substituer au BCR et induire les réponses calciques puis la production de cytokines (Beaufils P et al., *EMBOJ* 1993). De plus, LMP-2A est capable d'assurer le développement et la survie des lymphocytes B en absence de signal provenant du BCR (Caldwell RG et al., *Immunity* 1998).

LMP-2A contribue à la pathogenèse des NPC. En effet, LMP-2A active de manière constitutive les voies de signalisation Ras, PI₃kinase/Akt, connues pour la survie cellulaire et inhibe l'apoptose induite par le TGF- β (Scholle F et al., *JVirol* 2000 ; Portis T and Longnecker R, *Oncogene* 2004 ; Fukuda M and LongneckerR, *JVirol* 2007). LMP-2A induit l'activation des voies des MAPkinases ERK et JNK (Chen SY et al., *JVirol* 2002) puis l'expression de l'intégrine alpha-6 (ITGalpha-6, Pegtel DM et al., *JVirol* 2005), augmentant les capacités métastatiques des cellules de NPC. Il a été ensuite démontré que LMP-2A induit l'expression de la β -caténine, l'oncoprotéine

centrale de la voie de signalisation Wnt. Cette voie Wnt est impliquée dans 90% des cancers du colon (Morrison JA et al., JVirol 2003).

La fonction de LMP-2B dans l'immortalisation par l'EBV et dans la signalisation de LMP-2A n'est pas bien définie. LMP-2B et LMP-2A colocalisent au niveau de régions périnucléaires (Lynch DT et al., JGenVirol 2002). LMP-2B semble inhiber la phosphorylation de LMP-2A. LMP-2B restaure ainsi la signalisation du BCR (Rovedo M and Longnecker R, JVirol 2007) et inhibe la capacité de LMP-2A à maintenir la répression de la réactivation virale (Rechsteiner MP et al., JGenVirol 2007 ; Rechsteiner MP et al., JVirol 2008).

III.1.2.4 : Les ARN EBERs

Les EBERs (*Epstein-Barr Encoded RNA*), composés d'EBER-1 et EBER-2, sont les transcrits viraux les plus abondants dans les cellules infectées par l'EBV (Rymo L, JVirol 1979). EBER-1 et EBER-2 sont de petits ARN non-polyadénylés de 167 et 172 nucléotides respectivement (figure 22, Rosa MD et al., MolCellBiol 1981).

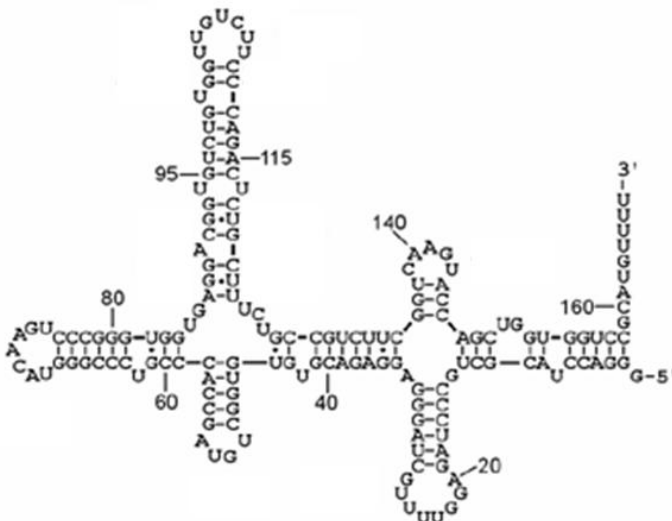


Figure 22 : Structure secondaire d'EBER-1. (D'après Vuyisich M et al., EMBORep 2002)

Contrairement à la majorité des gènes de l'EBV qui sont transcrits par l'ARN polymérase II, les EBERs sont transcrits par l'ARN polymérase III (Rosa MD et al., MolCellBiol 1981 ; Arrand JR and Rymo L, JVirol 1982 ; Jat P and Arrand JR, NAR 1982), (l'ARN polymérase II est responsable

de la synthèse des ARNm (ARN messenger), alors que l'ARN polymérase III permet la synthèse des ARNt et ARNr 5S (ARN de transfert et ARN ribosomal 5S)). Les EBERs sont exprimés aussi bien lors de l'infection latente que lors de l'infection lytique (Weigel R et al., JVirol 1985). Cependant, il a été montré que la transcription des EBERs est diminuée lors de l'induction de l'infection lytique (Greifenegger N et al., JVirol 1998)

Les EBERs sont essentiellement localisés dans le noyau au niveau de complexes ribonucléoprotéiques mais ils ont également été détectés dans le cytoplasme au niveau périnucléaire dans le reticulum endoplasmique rugueux (REG) et dans le golgi (Howe JG and Steitz JA, PNAS 1986 ; Schwemmle M et al., PNAS 1992).

De nombreuses données indiquent que les EBERs jouent un rôle essentiel dans la persistance de l'EBV chez son hôte. En effet, les EBERs sont capables d'induire l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-2 (Komano J et al., JVirol 1999 ; Ruf IK et al., JVirol 2000 ; Yamamoto N et al., FEBSLett 2000) et contribuant à la malignité du lymphome de Burkitt. Ensuite, les EBERs semblent induire l'expression de l'IL-10. Cette cytokine immuno-suppressive maintient la croissance des cellules de BL (Kitawaga N et al., EMBOJ 2000) grâce à un boucle autocrine et contribue à l'inhibition de la réponse cytotoxique Th1. De plus, l'expression de LMP-1 peut être induite par l'IL10 (Kis LL et al., Blood 2006). Les EBERs inhibent l'activité antivirale des interférons IFN α et γ en interagissant et en bloquant l'activation de la PKR, protéine kinase activée par des ARN double-brin. PKR est essentielle à l'effet antiviral des IFNs (Sharp TV et al., NAR 1993 ; Clarke PA et al., EurJBiochem 1990).

III.1.2.5 : Les transcrits de la région BamHI A (BART, BamHI A Rightward Transcripts)

Les transcrits de la région BART ont été découverts dans des coupes de tissus de carcinomes du naso-pharynx (NPC) et représentent les transcrits viraux les plus abondants (Hitt MM et al., EMBOJ 1989 ; Gilligan K et al., JVirol 1990). Les transcrits BARTs sont exprimés dans les LCLs

et dans tous les types de latence virale mais à des niveaux moindres (Brooks LA et al., JVirol 1993). La délétion de la région BART n'altère pas l'immortalisation des lymphocytes B primaires, ce qui semble indiquer qu'ils ne sont pas essentiels à l'établissement des LCLs (Robertson ES et al., JVirol 1994).

Plusieurs cadres de lecture ouverts (ORF) ont été identifiés dans la région BART : BARF0 ; RK-BARF0 (extension de BARF0), RPMS et BARF1 (Smith PR et al., JVirol 1993 ; Sadler RH et al., JVirol 1995, Wei MX and Ooka T, EMBOJ 1989).

RK-BARF0, une des protéines BARF0, est exprimée dans les cellules infectées par l'EBV *in vitro* (Fries KL et al., JVirol 1997) mais semblent difficilement détectables *in vivo* (vanBeek J et al., JGenVirol 2003). RK-BARF0 est associée à des structures nucléaires (Kienzle N et al., JVirol 1999). RK-BARF0 interagit avec le domaine de fixation du ligand du récepteur Notch4 et induit la translocation nucléaire de celui-ci (Kusano S and Raab-Traub N, JVirol 2001). L'accumulation nucléaire de Notch4 diminuerait la quantité totale de Notch fixé à CBF1/RBPJk. Cette diminution s'expliquerait par l'induction par RK-BARF0 de leur dégradation par le protéasome (Thornburg NJ et al., JVirol 2004) favorisant ainsi la fixation d'EBNA-2 à CBF1/RBPJk. En absence d'EBNA-2, RK-BARF0 peut induire l'expression de LMP-1 grâce à son interaction avec Notch et CBF1/RBPJk (Kusano S and Raab-Traub N, JVirol 2001).

Un autre transcrite de la région BART, RPMS a un rôle de régulateur négatif de la voie Notch et EBNA-2 (voir section III.1.2.3.B).

BARF1, transcrite à partir de la région BamHI A, est particulièrement intéressant. En effet, la surexpression de BARF1 conduit à la transformation de cellules épithéliales (Wei MX and Ooka T, EMBOJ 1989 ; Wei MX et al., Oncogene 1997). BARF1 est considéré comme un oncogène en induisant l'expression de Bcl2, molécule mitochondriale antiapoptotique (Sheng W et al., Oncogene 2001 ; Wang Q et al., CancerLett 2006) et en stimulant le cycle cellulaire via l'induction de la cyclineD1 (Wiech T et al., VirchowsArch 2008). BARF1 est sécrété par les cellules infectées par

l'EBV (Fiorini S and Ooka T, *Virology* 2008) et se comporte comme un homologue soluble du récepteur de la cytokine CSF1 (*Colony-Stimulating Factor1*, Strockbine LD et al., *JVirology* 1998). BARF1 piège CSF1 et inhibe la sécrétion de l'IFN α à partir des cellules mononucléées et pourrait moduler la réponse immune innée de l'hôte dirigée contre l'EBV (Cohen JI and Lekstrom K, *JVirology* 1999).

Enfin, c'est dans la région BART au sein des introns, qu'ont été découverts les premiers microARN (miARN) de l'EBV (Pfeffer S et al., *Science* 2004). Ces miARN sont parfaitement conservés au cours de l'évolution et exprimés à de forts taux dans les cellules épithéliales puis à des degrés moindres dans les LCLs (Cai X et al., *PloS Pathogens* 2006). Le rôle exact de ces miARN dans la pathogenèse liée à l'EBV reste à élucider, même si certaines études montrent que ces miARN auraient un rôle régulateur de l'immortalisation par l'EBV (Pfeffer S et al., *Science* 2004 ; Lo AK et al., *PNAS* 2007).

III.2 : L'infection lytique

L'EBV se maintient dans un état latent dans les LCLs. Cependant, dans un certain nombre de cellules, le virus peut être réactivé durant le cycle lytique. Mais, il est difficile d'étudier le cycle lytique en raison de l'absence d'un modèle cellulaire approprié.

La réactivation lytique *in vitro* des lymphocytes B infectés par l'EBV peut être induite par l'activation du BCR par une Ig de surface, par des agents chimiques (Sodium Butyrate, Phorbol Ester) ou par le TGF β (**figure 23**, Kieff E, *Fields Virology* 3rd edition 1996). Il a été ensuite démontré que l'interaction entre des lymphocytes T CD4⁺ et des LCLs induit le cycle lytique (Fu Z and Cannon MJ, *JVirology* 2000). L'efficacité de la réactivation virale dépend du type de lymphocytes B infectées. En effet, 50% des cellules de BL traitées par une Ig de surface entrent dans le cycle lytique, contre 5 à 10% pour les LCLs. La présence des protéines LMP-1 et LMP-2A, connues pour bloquer le cycle lytique, peut expliquer que les LCLs sont moins permissives à une réactivation

virale (Adler B et al., PNAS 2002 ; Prince S et al., JVirol 2003 ; Miller CL et al., PNAS 1994; Fukuda M and Longnecker R, JVirol 2005).

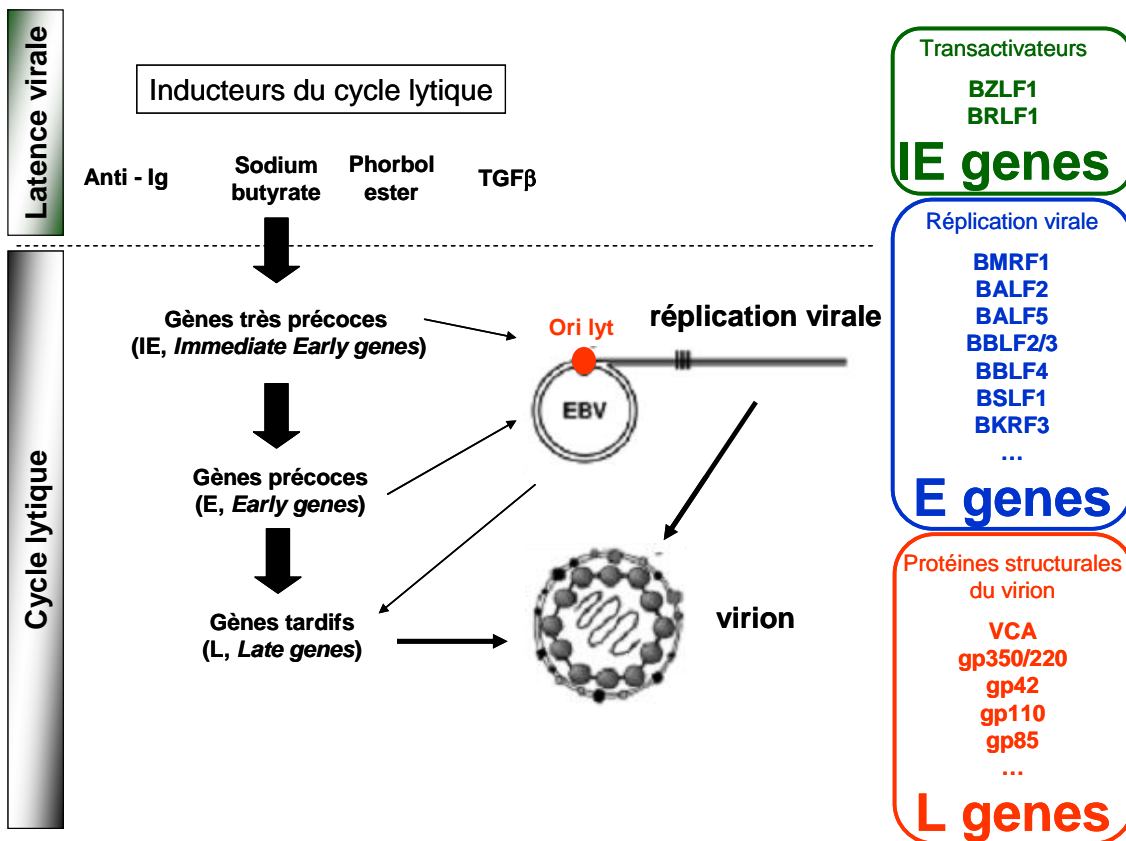


Figure 23 : Représentation schématique du passage de la latence vers le cycle lytique. Le cycle lytique peut être induit par différents inducteurs : Ig de surface, agents chimiques (sodium butyrate, phorbol ester), TGFβ. Les premiers gènes induits sont appelés « très précoces » ou *Immediate Early genes* (IE) représentés par BZFL1 et BRLF1 qui sont les principaux transactivateurs du cycle lytique. Ces deux protéines induisent l'expression des gènes « précoces » ou *Early genes* (E). Les gènes précoces interviennent dans la réplication virale et induisent l'expression des gènes « tardifs » ou *Late genes* (L). Les gènes tardifs codent les protéines structurales menant à la formation du virion.

L'expression des gènes menant à la production de virions s'effectue dans un ordre temporel et séquentiel. La réactivation virale induit l'expression de gènes dits « très précoces » ou *Immediate Early genes* (IE genes), BZFL1 et BRLF1 qui contrôlent le passage de la latence vers le cycle lytique. BZFL1 code la protéine ZEBRA (*Z Epstein-Barr virus Replication Activator* ou Zta ou EB1) et BRLF1 code le transactivateur Rta (*R transactivator*). Ces deux protéines contrôlent l'expression des gènes dits « précoces » ou *Early genes* (E genes, Chavrier P et al., JVirol 1989 ; Chevallier-Greco A et al., JVirol 1989). Les dernières protéines exprimées sont codées par des

gènes dits « tardifs » ou *Late genes* (*L genes*) menant à l'expression des protéines de la capside et des glycoprotéines de l'enveloppe.

III.2.1 : Les gènes très précoces

La seule expression de ZEBRA est nécessaire et suffisante pour induire le cycle lytique (Grogan E et al., PNAS 1987). ZEBRA réprime les promoteurs Cp, Wp et le promoteur des LMPs, promouvant la transition de la phase latente à la phase lytique (Kenney S et al., JVirol 1989). De plus, ZEBRA interagit physiquement avec la protéine p53 protégeant les cellules contre l'apoptose durant la réplication virale (Zhang Q et al., MCB 1994). ZEBRA induit sa propre expression (Flemington E and Speck H, JVirol 1990) et celle d'une autre protéine très précoce, Rta codée par le gène BRLF1 (Packham G et al., JVirol 1990 ; Bhende PM et al., JVirol 2005) qui est également capable de stimuler sa propre expression et celle de ZEBRA par une boucle d'amplification (Ragoczy T and Miller G, JVirol 2001). ZEBRA et Rta sont essentiels à la transactivation des gènes précoces (Ragoczy T and Miller G, JVirol 1999) codant notamment des protéines nécessaires à la réplication virale. Bien que cette transactivation soit insensible à l'action de drogues antivirales, elle peut être inhibée par des facteurs cellulaires tels que la sous-unité RelA/p65 de NFkB (Gutsch DE et al., MCB 1994 ; Brown HJ et al., JVirol 2003), ZEB (*Zinc finger E-box Binding factor*, Kraus RJ et al., JVirol 2003) ou YY1 (*YinYang1*, Zalani S et al., JVirol 1997), maintenant les cellules à l'état latent.

III.2.2 : Les gènes précoces

ZEBRA et Rta induisent de manière synergique l'expression des protéines précoces (Feederle R et al., EMBOJ 2000). Le système minimal de réplication inclut BALF5 (ADN polymérase), BMRF1 (facteur de processivité lié à l'ADN polymérase : permet de maintenir l'interaction entre l'ADN et l'ADN polymérase), BALF2 (protéine de liaison à l'ADN simple brin), BSLF1 (primase), BBLF4 (hélicase), BBLF2/3 (composants de complexe primase-hélicase),

BKRF3 (uracyl DNA glycosylase), ZEBRA et Rta (transactivateurs du cycle lytique). Les topoisomérases I et II cellulaires semblent également requises pour la réplication virale (Fixman ED et al., JVirol 1992).

Une des protéines précoces induites par ZEBRA et Rta est BMRF1 (Holley-Guthrie EA et al., JVirol 1990). BMRF1 est associée à l'ADN polymérase virale (BALF5) et en assure sa processivité (Tsurumi T et al., JVirol 1993).

EB2 (BMLF1 ou Mta ou SM) est une protéine essentielle à la production de virions (Gruffat H et al., JVirol 2002). En effet, beaucoup de gènes lytiques codant des protéines précoces et tardives ne possèdent pas d'introns. Ainsi EB2 augmente la stabilité des transcrits sans introns et assure leur transport vers le cytoplasme. (Semmes OJ et al., JVirol 1998 ; Boyer JL et al., JVirol 2002 ; Batisse J et al., JVirol 2005). BHRF1 est l'homologue viral de Bcl2 et prévient l'apoptose durant le cycle lytique (Henderson S et al., PNAS 1993).

III.2.3 : Les gènes tardifs

Les protéines dites « tardives » permettent la formation de la capsid virale. Les antigènes de capsid ou VCA (*Viral Capsid Antigen*) sont notamment composés de BcLF1, BNRF1, BXRF1, BPLF1 (Hummel M and Kieff E, PNAS 1982 ; Johannsen E et al., PNAS 2004). Les glycoprotéines virales d'enveloppe ou antigènes d'enveloppe (MA, *Membrane Antigen*) comprennent BLLF1 (gp350/220), BALF4 (gp110), BXLF2 (gp85), BDLF3 (gp150) BZLF2 (gp42) (Kieff E, Fields Virology 3rd edition 1996 ; Johannsen E et al., PNAS 2004).

BCRF1 est l'homologue viral de l'IL10, cytokine immunosuppressive de la réponse des cellules NK et des lymphocytes T cytotoxiques (deWaal-Malefyt R et al., JExpMed 1991). BCRF1 permet d'inhiber la réponse immunitaire durant la réplication virale.

Pendant le cycle lytique, les cellules permissives subissent un changement cytologique qui se traduit par la formation d'une inclusion intranucléaire, une "margination" de la chromatine nucléaire, l'assemblage des capsides à l'intérieur du noyau près de la membrane nucléaire, le bourgeonnement

du virus au travers de la membrane nucléaire et la formation de vésicules cytoplasmiques (**figure 24**).

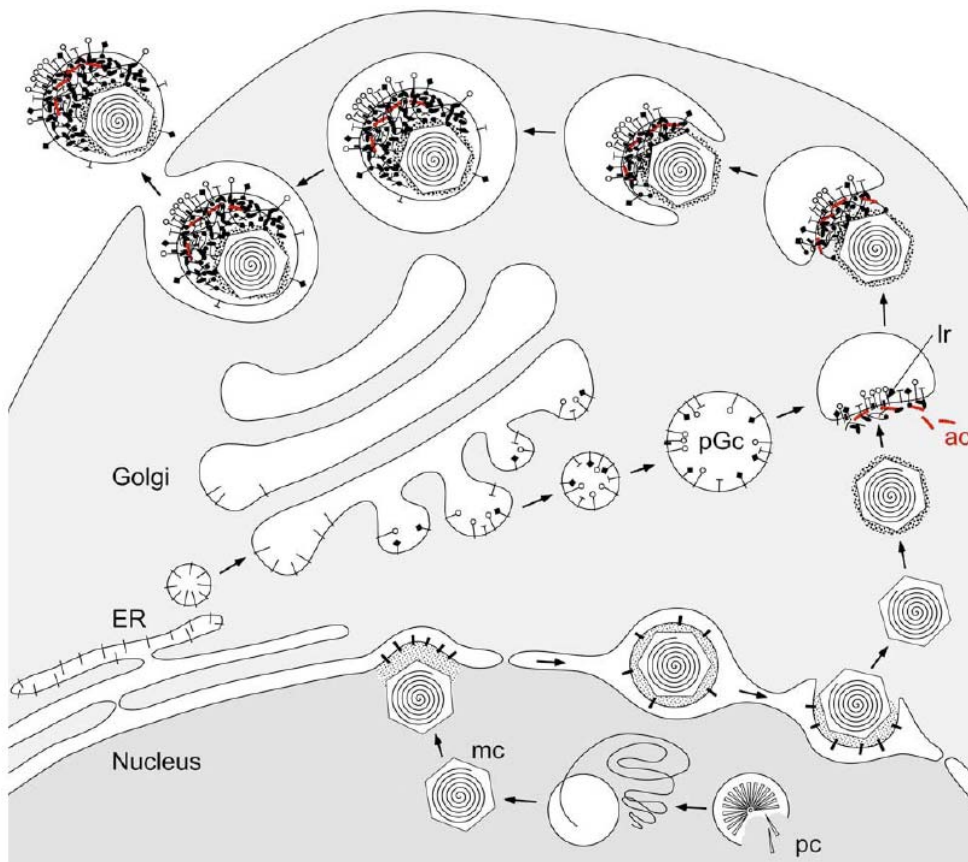


Figure 24 : Assemblage et sortie du virion. Les précurseurs de capsides (pc) s'assemblent dans le noyau. L'ADN viral (gl : génome linéaire) est alors empaqueté formant alors les nucléocapsides mûres (ncm) qui sortent du noyau par enveloppement à la membrane nucléaire interne et désenveloppement à la 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 (pt) avec les domaines intracytosoliques des glycoprotéines regroupées à un emplacement spécialisé (impliquant peut-être des radeaux lipidiques - rl). Des protéines du tégment (pt) sont recrutées sur un échafaudage se prolongeant entre la capside et la membrane dans un processus pouvant impliquer les microfilaments d'actine (ac). La nucléocapside et son tégment sont finalement internalisés dans la vpG. Finalement, les virions relargués dans l'espace extracellulaire par fusion de la membrane externe de la vpG avec la membrane plasmique. (d'après Grünewald K et al., Science 2003, données supplémentaires S4).

IV - Physiopathologie de l'infection par le virus d'Epstein-Barr

IV.1 : Cellules-cibles infectées par l'EBV

L'EBV est impliqué dans un grand nombre de pathologies telles que le lymphome de Burkitt, la maladie de Hodgkin, des lymphomes T/NK et le carcinome du rinopharynx. Le large spectre de pathologies associées à l'EBV reflète un tropisme prédominant mais non-exclusif aux lymphocytes B et aux cellules épithéliales qui représentent les cellules-cibles « conventionnelles » de l'EBV. L'EBV est capable d'infecter des cellules « non conventionnelles » incluant les lymphocytes T, les cellules NK et les monocytes.

IV.1.1 : Cellules conventionnelles

IV.1.1.1 : Les lymphocytes B

L'EBV a un tropisme privilégié pour le lymphocyte B qui peut être facilement infecté et immortalisé *in vitro* (Kieff E, Fields Virology 3rd edition 1996). La principale voie d'entrée du virus est représentée par l'interaction entre la glycoprotéine d'enveloppe virale gp350/220 et le récepteur CD21 du lymphocyte B puis entre la gp42 et le CMH de classe II. Le lymphocyte B présente la capacité unique de pouvoir supporter à la fois une infection latente et une infection lytique selon l'état d'activation et de différenciation. *In vitro*, les lymphocytes B infectés présentent une latence de type III qui permet aux LCLs de proliférer de façon autonome. Ces cellules expriment un certain nombre de marqueurs d'activation (CD23 ; CD39 ; CD40) et d'adhésion (CD54/ICAM1, CD58/LFA3, CD11a/LFA1) et ressemblent aux immunoblastes normaux stimulés par un antigène. *In vivo*, les cellules B mémoires à longue vie constituent le réservoir viral des individus sains séropositifs, porteurs d'1 à 50 lymphocytes B EBV+ pour 1 million de cellules dans le sang périphérique (Babcock GJ et al., Immunity 1998).

IV.1.1.2 : Les cellules épithéliales

Outre les pathologies malignes lymphoïdes, l'EBV est associé à plusieurs cancers épithéliaux, incluant le carcinome du rhinopharynx (CRP) ou le carcinome gastrique (Dolcetti R and Menezes J, *AdvCancerRes* 2003). Le CRP présente une latence de type II (EBNA-1, LMP-1 et LMP-2).

Contrairement aux lymphocytes B, les cellules épithéliales ne peuvent pas facilement être infectées ni immortalisées par l'EBV. Le récepteur CD21 n'est pas exprimé dans les cellules épithéliales (Speck P et al., *Virology* 2000). Différentes équipes ont réussi à infecter efficacement des cellules épithéliales en les co-cultivant avec des LCLs suggérant que des contacts directs entre ces deux types cellulaires pourrait permettre l'entrée du virus dans des cellules n'exprimant pas de CD21 (Yoshiyama H et al., *JVirol* 1997 ; Imai S et al., *JVirol* 1998 ; Chang Y et al., *JVirol* 1999 ; Speck P and Longnecker R, *JNCI* 2000). Trois voies d'entrée du virus ont été décrites.

Une étude *in vitro* a montré que des immunoglobulines A (IgA) spécifiques de gp350/220 de l'EBV favorisent l'infection des cellules épithéliales par un mécanisme impliquant l'endocytose du complexe IgA-EBV (Sixbey JW and Yao QY, *Science* 1992). En absence du CD21/CR2, un complexe composé des glycoprotéines gL/gp25 et gH/85 peut prendre le relais pour l'infection des cellules épithéliales (Molesworth SJ et al., *JVirol* 2000 ; Borza CM et al., *JVirol* 2004). Les virions produits par la LCL possèdent peu de gp42 à leur surface, augmentant le tropisme pour la cellule épithéliale. A l'inverse, les virions produits par la cellule épithéliale contiennent de plus hauts niveaux de gp42 qui interagiront avec le CMH de classe II du lymphocyte B (**figure 25**, Borza CM and Hutt-Fletcher LM, *NatMed* 2002). Ainsi, le complexe gH/gL et la gp42 sont mutuellement exclusifs lors de l'infection des cellules épithéliales contrairement aux lymphocytes B qui nécessitent le complexe gH/gL/gp42 (Borza CM et al., *JVirol* 2004).

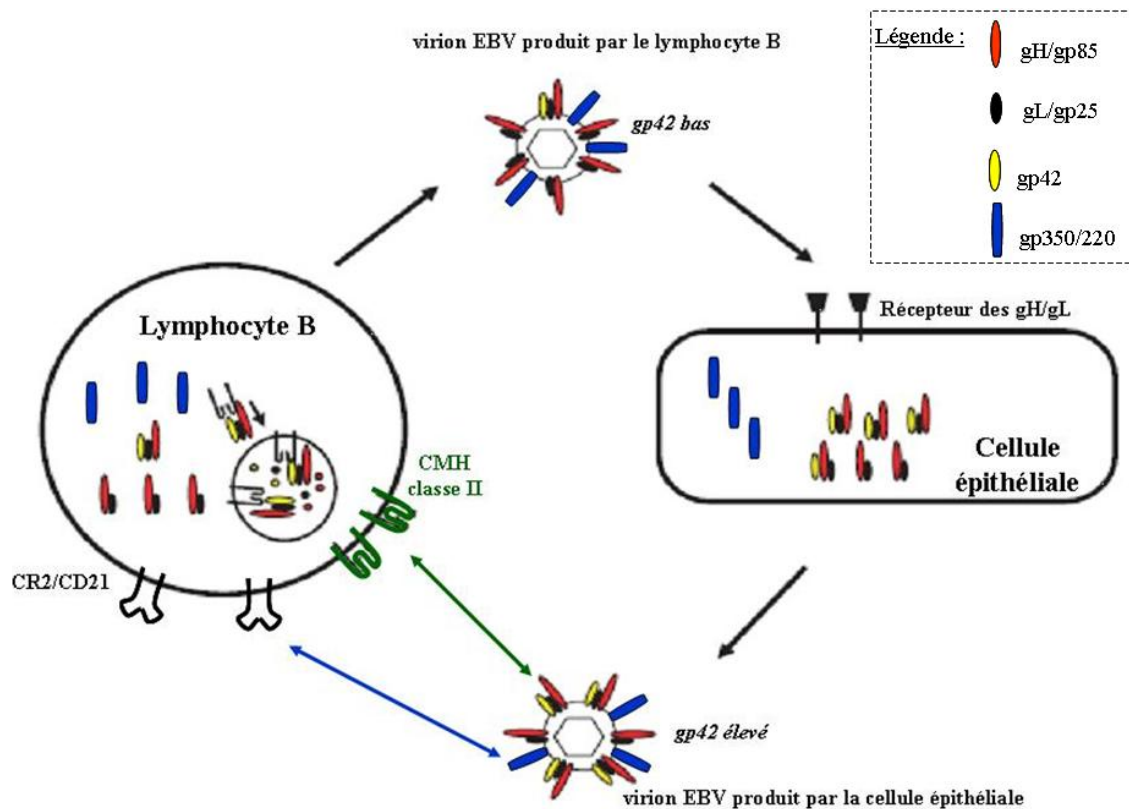


Figure 25 : Modèles d'infection des lymphocytes B et des cellules épithéliales par l'EBV. L'EBV infecte les lymphocytes B par interaction entre la gp350/220 et le CD21 puis entre le complexe gp25/gp85/gp42 et le CMH de classe II. Les virions produits par la LCL sont dépourvus de la gp42 qui est séquestrée par le CMH II et peuvent infecter les cellules épithéliales grâce à l'interaction du complexe gp85/gp25 et de son récepteur. Les virions produits par la réplication virale dans les cellules épithéliales expriment de hauts niveaux de gp42 qui peuvent infecter d'autres lymphocytes B (modifié d'après Hutt-Fletcher LM, JVirol 2007).

Une autre glycoprotéine du virus, BMRF2, a été décrite lors de l'infection des cellules épithéliales polarisées, environnement proche de celui que le virus rencontre *in vivo*. BMRF2, grâce à son motif RGD (ArgGlyAsp), interagit avec les intégrines de la famille β_1 exprimées à la surface basolatérale des cellules polarisées (**figure 26**, Tugizov SM et al., NatureMed 2003). Cette interaction permet l'infection des cellules épithéliales par des virus libres. De plus, le virus peut être transmis aux cellules adjacentes au niveau des membranes latérales par les jonctions serrées et les desmosomes (Tugizov SM et al., NatureMed 2003).

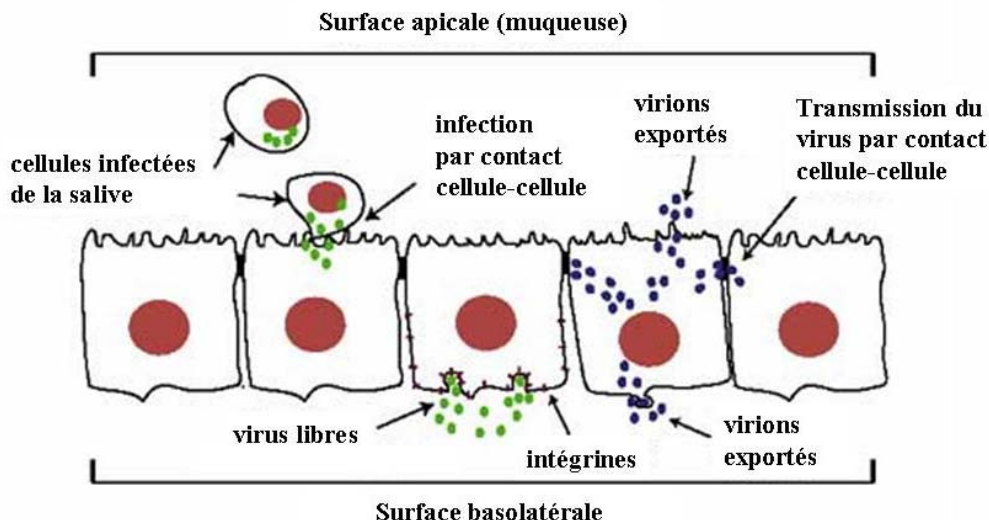


Figure 26 : Modèle d'infection des cellules épithéliales polarisées. Les lymphocytes B infectés de la salive peuvent infecter les cellules épithéliales polarisées par contact cellulaire direct. Au niveau basolatéral, des virus libres, qui expriment la glycoprotéine BMRF2, se fixent aux intégrines de la famille $\beta 1$. Au sein de ces cellules, le virus peut être transmis aux cellules adjacentes grâce aux jonctions intercellulaires. (modifié d'après Tugizov SM et al., NatMed 2003)

Enfin, récemment les équipes de Rickinson et de Delecluse ont montré que les lymphocytes B au repos n'internalisent pas systématiquement le virus. L'EBV reste fixé à la surface cellulaire et est transféré aux cellules épithéliales par formation d'une « synapse virale » entre lymphocytes B et cellules épithéliales. Le contact entre ces deux cellules est permis par les glycoprotéines virales gp85, gp25 et gp110, indépendamment de gp42 (Shannon-Lowe CD et al., PNAS 2006).

IV.1.2 : Cellules non-conventionnelles

Les autres modèles cellulaires infectables par l'EBV sont représentés, en majorité, par les cellules Natural Killer (NK), les lymphocytes T et les monocytes. Contrairement aux cellules NK et aux lymphocytes T, on ne décrit aucune tumeur monocyttaire associée à l'EBV. D'autres cellules ont été rapportées dans la littérature : les granulocytes neutrophiles (Larochelle B et al., Blood 1998), les cellules dendritiques folliculaires (Lindhout E et al., JExpMed 1994) et les astrocytes (Menet A et al., JVirol 1999). La modalité d'infection de ces cellules est encore mal connue, même si un transfert synaptique du CD21 est possible de la LCL vers la cellule NK (Tabiasco J et al., JImmunol 2003).

IV.1.2.1 : Les cellules NK (Natural Killer)

La première indication montrant que l'EBV infecte les cellules NK est l'implication de ce virus dans les lymphoproliférations des cellules NK (Kawa-Ha K et al., JClinInvest 1989). Depuis, de nombreuses études décrivent une infection latente des cellules NK (Kanegane H et al., BrJHaematol 1996 ; Kanegane H et al., Blood 1996 ; Trempat P et al., JVirol 2002). Les cellules NK sont dépourvues du CD21, suggérant l'entrée du virus par une voie alternative. Une étude a montré que les cellules NK forment une synapse immunologique avec des lymphocytes B autologues infectés par l'EBV. Lors du contact avec sa cible, la cellule NK acquiert, par transfert synaptique, le CD21 de manière transitoire permettant sans doute à l'EBV d'infecter ces cellules (Tabiasco J et al., JImmunol 2003).

IV.1.2.2 : Les lymphocytes T

Différentes études ont montré que l'EBV est capable d'infecter des lymphocytes T (Watry D et al., JExpMed 1991 ; Groux H et al., Blood 1997). Bien que certains lymphocytes T possèdent le marqueur CD21/CR2 (Fischer E et al., JImmunol 1991 ; Tsoukas CD and Lambris JD, ImmunolToday 1993), la modalité d'entrée du virus n'est pas encore claire. Les lymphocytes T circulants et les lignées T infectées par l'EBV présentent une latence virale de type II exprimant EBNA-1, LMP-1 et LMP-2 (Fujiwara S and Ono Y, JVirol 1995 ; Imai S et al., Blood 1996 ; Groux H et al., Blood 1997).

L'équipe de Jean Coll et ses collaborateurs ont réussi à infecter et à immortaliser des lymphocytes T périphériques *in vitro* par l'EBV. Ces cellules présentent le phénotype immunologique des lymphocytes T naïfs et sécrètent de l'IL2 suite à une stimulation antigénique. Enfin ces cellules sont tumorigènes chez la souris *nude* confirmant la possible implication de l'EBV dans les lymphomes T (Groux H et al., Blood 1997 ; Montpellier C et al., MédecineSciences 1998).

IV.1.2.3 : Les monocytes

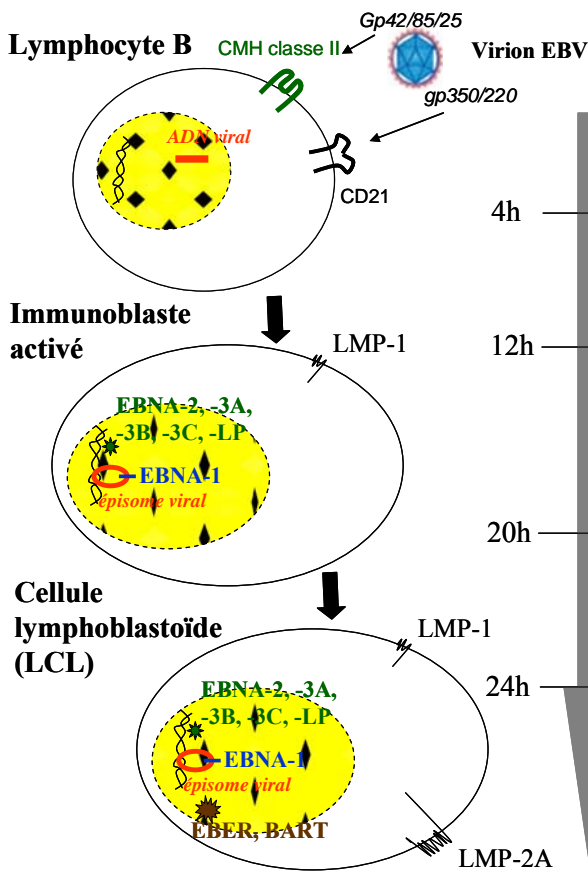
Les phagocytes mononucléés jouent un rôle actif dans la défense de l'organisme contre l'invasion virale. Le recrutement rapide de ces monocytes/macrophages au site d'infection permet de limiter la propagation du virus durant les phases précoces de l'infection. L'inhibition des capacités de phagocytose de ces cellules permet aux virus d'échapper à la réponse immunitaire. Actuellement, le tropisme de l'EBV pour le monocyte/macrophage est encore mal compris. Cependant, le génome de l'EBV a été détecté dans ces cellules (Revoltella RP et al., JGenVirol 1989 ; Shimakage M et al., ArchVirol 1999). *In vitro*, l'EBV peut interagir avec les monocytes par un récepteur distinct de CD21 (Gosselin J et al., EurJImmunol 1991) et les infecter sans pour autant les immortaliser (Savard M et al., JVirol 2000). Le mécanisme par lequel l'EBV interagit avec les monocytes est encore inconnu. L'EBV exerce son effet immunomodulateur en diminuant la production de TNF α , IL1 et IL6 des monocytes (Gosselin J et al., EurJImmunol 1991 ; Gosselin J et al., JImmunol 1992).

Outre les lymphocytes T périphériques, l'équipe de Jean Coll et ses collaborateurs ont réussi à immortaliser des monocytes/macrophages *in vitro*. Après infection et immortalisation, ces cellules ont gardé leurs propriétés de phagocytose et de production de cytokines (TNF α , IL1 et IL6) et présentent une latence virale de type II (Masy E et al., JVirol 2002).

IV.2 : Dynamique de l'infection par l'EBV

IV.2.1 : L'infection par l'EBV *in vitro*

Les interactions entre l'EBV et les lymphocytes B ont été étudiées dans des modèles de culture cellulaire *in vitro* (**figure 27**). La fixation de l'EBV sur son récepteur CD21 induit l'activation du lymphocyte B qui devient transcriptionnellement compétent. La pénétration du virus dans la cellule requiert le complexe gp85/25/42 (se fixant au CMH de classe II, Molesworth SJ et al., JVirol 2000).



Etapes de l'infection *in vitro*

1. Fixation du virus au lymphocyte B
- attachement du virion par gp350/220 et CMH II
 2. Transport de l'ADN viral vers le noyau
 3. Expression d'EBNA-LP, EBNA-2 (~ 4h)
- dérégulation de p53, Rb et RBPJk
 4. Expression de LMP-1, EBNA-3A, -3B, -3C (~ 12h)
- survie cellulaire (TRAFs, NFkappaB,...)
- immunomodulation (IL10)
 5. Circularisation du génome viral sous forme d'épisome (~ 20h)
 6. Expression d'EBNA-1 (~ 20h)
- maintenance et réplique de l'épisome
- ← **Immortalisation complète** →
7. Expression de LMP-2A et -2B, EBEB, BARFO (> 24h)
- inhibition de la différenciation et l'activation cellulaire
- ← **Latence III complète** →

Figure 27 : Représentation de l'infection des lymphocytes B par l'EBV *in vitro*. L'EBV se fixe au lymphocyte B grâce à la gp350/220 qui reconnaît le récepteur CD21. La gp42 (reconnu par le CMH de classe II) permet la fusion de la membrane plasmique et de la nucléocapside puis l'ADN viral linéaire transite jusqu'au noyau. Les premières protéines exprimées, 4h après le début de l'infection, sont EBNA-2 et EBNA-LP puis LMP-1 et les EBNA-3s (12h post-infection). Le génome viral se circularise sous forme d'épisome puis maintenu par EBNA-1 et répliqué lors des divisions cellulaires (20h post-infection). Les derniers transcrits de latence exprimés sont représentés par les LMP-2s, les ARN EBEB et les BARTs, complétant ainsi la latence de type III, appelée programme de prolifération (inspiré d'après Middeldorp JM et al., CriticalRevOncoHemato 2003).

Après pénétration du virus, le génome viral, sous forme linéaire, transite jusqu'au noyau.

Grâce au promoteur viral Wp, les premières protéines de latence exprimées, 4h post-infection, sont EBNA-LP et EBNA-2 (comme indiqué en section III.1.1.1). Ces deux EBNAs dérégulent le cycle cellulaire et la transcription cellulaire en se fixant à p53, Rb et CBF1/RBPJk.

Après 12h d'infection, ce sont les protéines LMP1, EBNA-3A, -3B et -3C qui sont exprimées sous l'action, notamment, d'EBNA-2 à partir du promoteur viral Cp. A ce moment de l'infection, LMP-1 détourne les molécules de la famille des TRAFs pour induire des signaux de

survie par la voie NFkB, A20 et Bcl2. De plus, LMP-1 induit l'expression de l'IL10 suggérant l'inhibition de la réponse immunitaire durant l'établissement de la latence.

Progressivement au cours de l'infection (20h post-infection), le génome viral se circularise sous forme d'épisome. L'épisome viral sera répliqué en même temps que les chromosomes cellulaires au cours de la phase S, grâce à la protéine EBNA-1 qui maintient le génome viral sous forme d'épisomes. A cette étape, le processus d'immortalisation du lymphocyte en LCLs est accompli et ces cellules transformées peuvent proliférer de manière autonome.

D'autres transcrits de latence sont exprimés, les LMP-2 (LMP-2A et -2B), les ARN non-transcrits EBER (EBER-1 et EBER-2) et les transcrits de la région BamHI (BARTs). Ces derniers transcrits complètent l'établissement de la latence de type III, caractéristiques des lymphocytes B infectés par l'EBV *in vitro*. Au terme de l'infection, le nombre de copies d'épisomes au sein de chaque cellule varie de 10 à 100 et transmis aux cellules-filles lors de la division cellulaire. Dans certains cas, le génome de l'EBV semble pouvoir s'intégrer (Takakuwa T et al., VirusRes 2005).

IV.2.2 : L'infection par l'EBV in vivo

IV.2.2.1 : Infection par l'EBV dans l'organisme

L'oropharynx est riche en agrégats de tissus lymphoïdes, d'amygdales linguales, palatines ou pharyngées. Les amygdales sont recouvertes d'un épithélium qui plonge dans le tissu conjonctif pour former des structures appelées cryptes. Il existe deux types d'épithélium : un épithélium stratifié à la surface et un épithélium réticulaire à l'intérieur des cryptes. L'épithélium réticulaire peut-être interrompu par des cellules lymphoïdes qui infiltrent les couches épithéliales formant un « lymphoépithélium ». Cette organisation spécialisée représente la première ligne de défense contre les infections microbiennes. Il est possible que l'EBV exploite cette structure pour infecter directement les lymphocytes B (**étape 1, figure 28**). Il semblerait que les lymphocytes B puissent être infectés indirectement par l'intermédiaire des cellules épithéliales, qui transmettent le virus par

transcytose (**étape 1, figure 28**). Cependant, la présence de cellules épithéliales infectées par l'EBV n'a jamais été détectée dans les amygdales de sujets atteints de mononucléose infectieuse.

Ces lymphocytes B prolifèrent et produisent des virions qui en infectent d'autres. A ce stade, on observe dans les lymphocytes B une latence de type III (**étape 2, figure 28**). Cette première phase d'invasion virale induit une réponse immunitaire qui aboutit progressivement au contrôle de la prolifération cellulaire par élimination des cellules en phase de latence III (Falk MH et al., Blood 1992). Ceci se traduit parfois, lors la MNI, par une hyperlymphocytose qui reflète une expansion des lymphocytes T CD8⁺ activés. Cependant, certaines cellules échappant à cette réponse immunitaire de l'hôte et forment le réservoir de lymphocytes B mémoires (latence virale de type 0, **étape 3, figure 28**) dans lesquelles aucune des protéines de latence n'est exprimée. Lors des divisions cellulaires, ces lymphocytes B mémoires expriment EBNA-1 et occasionnellement LMP-2A (Qu L and Rowe DT, JVirol 1992 ; Babcock GJ et al., Immunity2000). Ces lymphocytes B mémoires contenant l'épisome viral atteignent la circulation générale. Ces lymphocytes B mémoires peuvent rejoindre les organes lymphoïdes secondaires (amygdales) mais leur survie nécessite l'induction du programme de latence de type II (**étape 4, figure 28**).

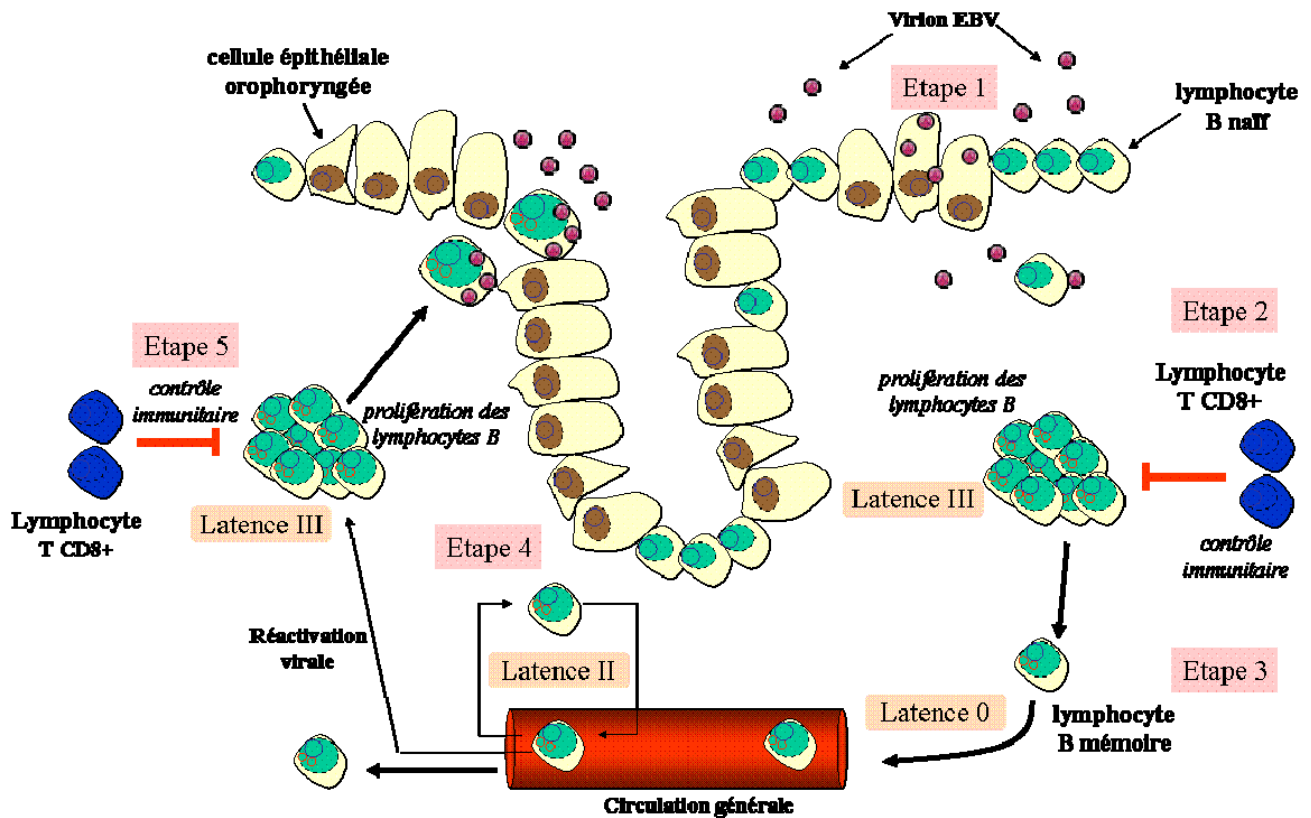


Figure 28 : Modèle d'infection par l'EBV *in vivo*. **Etape 1 :** lors de la primo-infection, le virion peut infecter soit directement le lymphocyte B soit indirectement après transcytose des cellules épithéliales. **Etape 2 :** les lymphocytes B infectés prolifèrent et expriment une latence de type III. A ce stade, se met en place, la réponse immunitaire (lymphocytes T CD8+) afin d'éradiquer la prolifération cellulaire. **Etape 3 :** Certaines cellules infectées échappent alors au système immunitaire et se différencient en lymphocytes B mémoires (latence de type O) qui atteignent la circulation générale. **Etape 4 :** Les cellules B mémoires sortent de la circulation générale vers les amygdales. Leur survie nécessite l'induction d'un programme de survie (latence II) puis les cellules rejoignent la circulation générale. **Etape 5 :** Sporadiquement, une réactivation virale s'effectue et des lymphocytes B prolifèrent. Cette prolifération est contrôlée par le système immunitaire, résultant à une excrétion virale à la production de nouveaux virions infectieux. (Inspiré d'après Faulkner GC et al., TrendsMicrobiol 2000).

Au sein des organes lymphoïdes secondaires peuvent se produire des expansions de lymphocytes B en phase de latence III suite à une réactivation virale (**étape 5, figure 28**). Cependant, les signaux menant à la réactivation virale restent encore mal connus. *In vitro*, il est possible d'induire la réactivation via l'utilisation, notamment, d'Ig de surface (Kieff E, Fields Virology 3rd edition 1996). Les Ig de surface activent la signalisation du BCR et l'induction du cycle lytique. Alors, une stimulation antigénique serait en partie responsable de la réactivation virale. Chez les sujets immunocompétents, l'expansion des lymphocytes B infectés est rapidement

contrôlée par la réponse immunitaire cellulaire, résultant en une excrétion virale asymptomatique qui permet l'infection d'autres lymphocytes B oropharyngés.

IV.2.2.2 : L'EBV et la différenciation cellulaire des lymphocytes B

Le modèle de Thorley-Lawson propose que les lymphocytes B naïfs soient infectés par l'EBV et que cette infection mime les différentes étapes de la différenciation cellulaire normale du lymphocyte B (**figure 29**). Après infection, les lymphocytes B naïfs se différencient en lymphoblastes B et expriment le programme de latence virale de type III. Dans le centre germinatif (GC, *Germinal Centre*), les lymphoblastes B se différencient en centroblastes (cellule B GC) puis en centrocytes (cellules post-GC). Au cours de ces deux stades, le programme viral change de la latence III à la latence II. Deux signaux sont nécessaires aux lymphocytes B normaux, présents dans le GC, pour survivre à l'apoptose : un signal issu du BCR (*B Cell Receptor*) de forte affinité et l'activation du CD40 (via le CD40 ligand des cellules dendritiques et/ou des lymphocytes Th2). En latence II, LMP-1 et LMP-2A déclenchent des signaux de survie en mimant respectivement la signalisation du CD40 et du BCR. De plus, un travail de l'équipe Lazlo Szekely a tenté d'expliquer le changement de latence virale (latence III vers latence II). Les lymphocytes B infectés recevraient un signal CD40/CD40L, entraînant la diminution de l'expression d'EBNA-2 puis de l'activité du promoteur viral Cp, ainsi que la surexpression du marqueur du GC, CD77 (Pokrovskaja K et al., *IntJCancer* 2002). En absence du promoteur Cp et d'EBNA-2, EBNA-1 maintiendrait l'expression des LMPs (voir section III.1.2.3.D). Les centrocytes se différencient en lymphocytes B mémoires (latence de type 0).

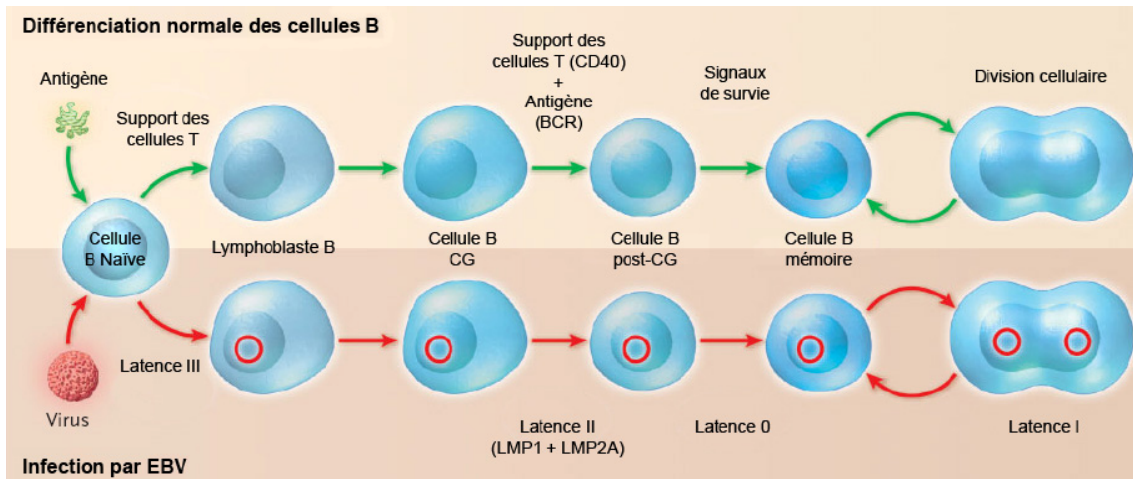


Figure 29 : Modèle de Thorley-Lawson : les lymphocytes infectés par l'EBV miment la différenciation physiologique des lymphocytes B. (D'après Thorley-Lawson DA and Gross A, NEJM 2004)

Un autre modèle a été proposé suite aux travaux de l'équipe de Ralf Küppers. Ce groupe a montré que les lymphocytes infectés par l'EBV, exprimant LMP-1 mais pas d'EBNA-2 (latence II), sont localisés au niveau des zones interfolliculaires et de manière occasionnelle dans les centres germinatifs (Kurth J et al., Immunity 2000 ; Kurth J et al., PNAS 2003). L'analyse des mutations des gènes des Ig de ces lymphocytes montre qu'ils peuvent migrer d'un compartiment à l'autre, des zones interfolliculaires vers les centres germinatifs. Ainsi dans ce modèle, les lymphocytes B infectés par l'EBV lors de la MNI correspondraient en même temps :

- aux lymphocytes B naïfs (lymphocytes pré centre germinatif),
- aux lymphocytes B du centre germinatif, infectés par l'EBV, après acquisition des mutations somatiques,
- aux lymphocytes B mémoires (post centre germinatif) précédemment infectés par l'EBV retournant dans l'amygdale, exprimant une latence de type II.

IV.2.3 : Contrôle de l'infection par le système immunitaire

IV.2.3.1 : Réponse immunitaire lors de la primo-infection

La réponse immunitaire a un rôle capital pour limiter l'infection primaire par l'EBV. Lors de la primo-infection, l'infection des cellules épithéliales et des lymphocytes B entraîne une réponse immunitaire humorale, dirigée d'abord contre les antigènes du cycle lytique. Dans un second temps, le virus entre dans une phase de latence associée à l'expression des protéines EBNA et des LMPs, contre lesquelles une réaction immunitaire humorale est dirigée. Successivement, apparaissent des anticorps contre les protéines d'enveloppe (anti-MA, *Membrane Antigen*, anti-gp350/220, gp85), contre les protéines de capsid (anti-VCA, *Virus Capsid Antigen*, protéines tardives), les protéines précoces (anti-EA, *Early Antigen*) et très précoces (anti-ZEBRA) puis contre les protéines de latence (anti-EBNA). Peu d'anticorps dirigés contre LMP-1 et LMP-2A sont détectés lors la MNI. Progressivement, les anti-EA et anti-ZEBRA disparaissent alors que les anti-VCA et anti-EBNA persistent.

IV.2.3.2 : Immunité à médiation cellulaire

Les cellules NK sont les premières cellules du système immunitaire impliquées dans le contrôle de l'infection. Elles entraînent la lyse des cellules infectées sans qu'il n'y ait de reconnaissance spécifique d'antigènes. Les cellules NK sont capables de limiter l'infection par l'EBV grâce au relargage d'IFN γ qui inhibe la réplication virale (Strowig T et al., PLoS Pathogen 2008).

Les lymphocytes T CD8⁺ reconnaissent des antigènes provenant des protéines de latence (EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, LMP-1 et LMP-2A) et des protéines du cycle lytique (ZEBRA et Rta). EBNA-1 n'est pas reconnue par les lymphocytes T CD8⁺ (**figure 30**).

Contrairement aux lymphocytes T CD8⁺, les lymphocytes T CD4⁺ ne subissent pas d'expansion lors de la MNI (Maini MK et al., J Immunol 2000). Cependant, les lymphocytes T

CD4+ sont capables de reconnaître certains antigènes de protéines du cycle lytique (ZEBRA et BMLF1) et de latence (EBNA-3C). Etonnamment, ces lymphocytes possèdent une bonne réactivité vis-à-vis d'antigènes provenant d'EBNA-1 (Hislop AD et al., AnnuRevImmunol 2007).

Les lymphocytes T CD8+, tout comme les lymphocytes T CD4+, peuvent limiter la croissance des LCLs grâce à l'interaction CD95/CD95L (Wilson AD et al., IntImmunol 1998).

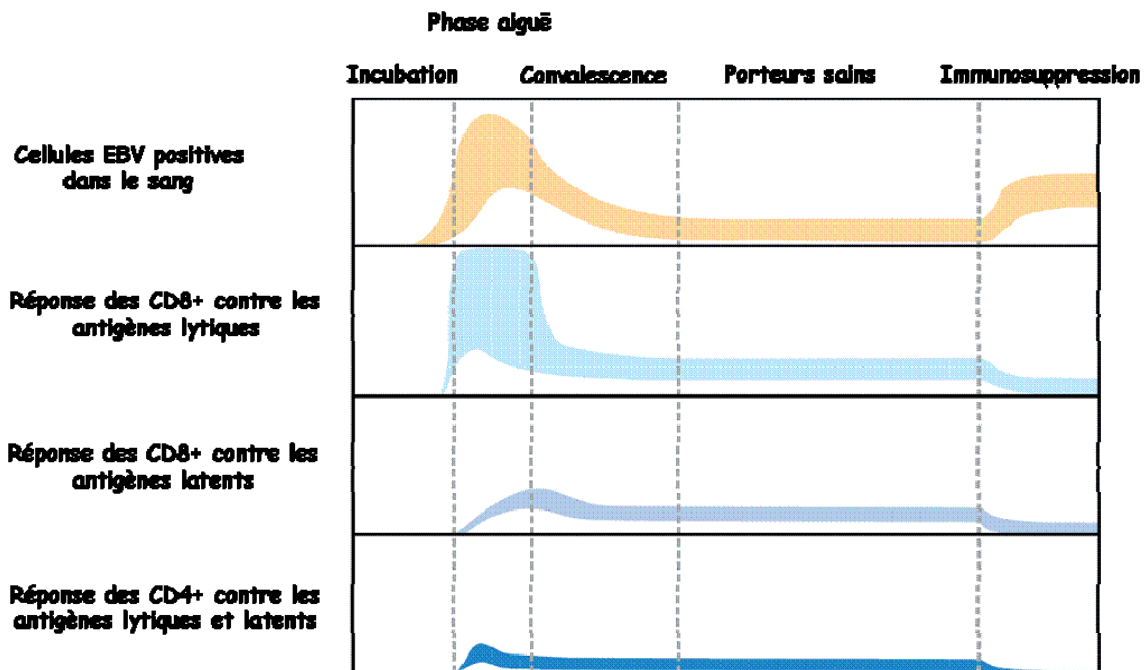


Figure 30 : Réponse immunitaire cellulaire durant l'infection par l'EBV. La réponse cellulaire CD8+ est dirigée contre les antigènes des protéines du cycle lytique (ZEBRA et Rta) puis contre les antigènes des protéines de latence (EBNAs et LMPs). On détecte une réponse cellulaire CD4+ dirigée contre les antigènes lytiques et latents mais l'amplitude est moindre par rapport à la réponse CD8+. *EBNA = Epstein-Barr Nuclear Antigen, LMP = Latent Membrane Protein, ZEBRA = Z Epstein-Barr virus Replication Activator, Rta = R Transactivator.* (d'après Hislop AD et al., AnnuRevImmunol 2007).

IV.3 : Pathologies associées au virus d'Epstein-Barr

IV.3.1 : Pathologies chez l'individu immunocompétent

IV.3.1.1 : Pathologie bénigne, la mononucléose infectieuse

La mononucléose infectieuse (MNI) est une infection bénigne généralement spontanément résolutive. C'est la forme clinique symptomatique de la primo-infection à EBV. Elle se traduit par une fièvre dans 90% des cas, d'adénopathies généralisées, d'une asthénie sévère. Cette affection se

caractérise par une hyperleucocytose (augmentation anormale du taux de leucocytes) et la présence de lymphocytes atypiques de grande taille hyperbasophiles constituant jusqu'à 30% des lymphocytes. Ces lymphocytes correspondent majoritairement à des lymphocytes CD8+ activés.

Des complications peuvent survenir de façon peu fréquente : rupture de rate, méningite ou encéphalite. Dans certains cas, la MNI peut évoluer vers une infection chronique active (CAEBV ou *Chronic Active Epstein-Barr Virus infection*) qui persiste plus d'un an. Dans sa forme sévère, elle est associée à une mortalité élevée et peut évoluer vers un lymphome (Kimura H et al., Blood 2001).

IV.3.1.2 : Pathologies malignes

IV.3.1.2.A : Le lymphome de Burkitt

L'EBV a été découvert dans des cellules tumorales en culture provenant de patients atteints de lymphomes de Burkitt (LB ou BL, *Burkitt Lymphoma*). La cellule lymphomateuse dérive d'un lymphocyte B issu du centre germinatif. Dans tous les cas de lymphomes de Burkitt, le lymphocyte malin comprend l'une des translocations suivantes : t(8,14) la plus fréquente, t(2,8) et t(8,22) qui place le gène codant l'oncogène c-Myc (chromosome 8) sous le contrôle du locus des gènes codant les chaînes lourdes des immunoglobulines (chromosome 14) ou des chaînes légères (chromosome 2 ou 22). Ces translocations chromosomiques conduisent à la surexpression de c-Myc. Ces cellules présentent une latence de type I restreinte à l'expression d'EBNA-1.

IV.3.1.2.B : Le lymphome de Hodgkin

Environ 2/3 des lymphomes de Hodgkin (LH ou HL, *Hodgkin Lymphoma*) sont associés à l'EBV. Le LH est caractérisé par la présence de cellules néoplasiques particulières appelées cellules de Reed-Sternberg et la désorganisation de l'architecture ganglionnaire (Kapatai G and Murray P, JClinPathol 2007). Le LH représente près de 30% des lymphomes. Les cellules de Reed-Sternberg, qui dérivent du centre germinatif, constituent 1 à 3% de la masse tumorale. Ces cellules sont

souvent de grandes cellules binucléées avec des nucléoles proéminents et un immunophénotype peu commun : CD15+ et CD30+. De plus, ces cellules présentent une latence virale de type II avec l'expression d'EBNA-1, LMP-1 et LMP-2 ainsi que l'expression des ARNs EBER et les transcrits de la région BamHI (BARTs).

IV.3.1.2.C : Le carcinome du rhinopharynx

Bien que l'EBV ait un tropisme privilégié pour les lymphocytes B, il est l'un des facteurs étiologiques responsables du carcinome du rhinopharynx (CRP ou NPC, *NasoPharyngeal Carcinoma*). Le CRP représente 20% des cancers en Chine. Ce carcinome est caractérisé par des cellules carcinomateuses indifférenciées associées à un important infiltrat lymphocytaire de type T. Ces cellules présentent une latence virale de type II (EBERs, BARTs, EBNA-1, LMP-1 et LMP-2). Son incidence est élevée dans certains pays de l'Asie du Sud-est (Viêt-Nam, Indonésie) et de l'Afrique du Nord (Tunisie,...). Certains facteurs environnementaux peuvent influencer l'apparition de cette pathologie. Ces facteurs comportent surtout des habitudes alimentaires ou culturelles (méthodes de conservation du poisson, herbes médicinales en Chine, méthodes de conservation de la viande et assaisonnements en Afrique du Nord,...).

IV.3.1.2.D : Autres cancers

L'EBV est retrouvé associé à certains lymphomes T et lymphomes T/NK nasaux. De plus, l'EBV est détecté dans le cancer du sein et le carcinome gastrique. Cependant, l'association entre l'EBV et le cancer du sein est encore discutée.

IV.3.2 : Pathologies chez l'individu immunodéprimé

IV.3.2.1 : Chez les patients atteints du VIH

IV.3.2.1.A : Leucoplasie chevelue de la langue

Au cours de l'infection par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), la leucoplasie chevelue de la langue est fréquente, surtout lors des immunodéficiences sévères. Elle se traduit par une production chronique d'EBV par les cellules épithéliales de la langue.

IV.3.2.1.B : Lymphomes non-hodgkiniens

Au cours de l'infection par le VIH, les lymphomes non-hodgkinien (LNH) sont 60 à 150 fois plus fréquents que dans la population générale. La localisation préférentielle est surtout extra-ganglionnaire (tube digestif, moelle osseuse,...). Ces LNH du VIH ont un très mauvais pronostic. On distingue trois types de LNH associés au VIH : le lymphome de Burkitt, les lymphomes immunoblastiques et les lymphomes à grandes cellules.

IV.3.2.2 : Chez les patients transplantés

Chez les patients greffés soumis à une immunosuppression au long cours, les proliférations lymphoïdes sont 30 à 50 fois plus fréquentes que dans la population générale. Globalement, 95% de ces tumeurs sont associées à l'EBV. L'incidence diffère selon le type de transplantation (1% pour le rein, 2,2% pour le foie,...), selon la nature des médicaments immunosuppresseurs. Le délai d'apparition de la lymphoprolifération varie de 6 à 48 mois.

IV.3.2.3 : Le syndrome de Purtillo

Le syndrome de Purtillo est une forme grave de la primo-infection à l'EBV survenant chez les garçons atteints d'un déficit immunitaire lié au chromosome X (XLP, *X-linked LymphoProliferative syndrome*). En absence d'infection par l'EBV, ces garçons possèdent une immunité normale. Une infection par l'EBV déclenche une prolifération lymphocytaire B massive qui infiltre le foie (hépatite fulminante) et les autres organes lymphoïdes. L'évolution est mortelle dans deux tiers des cas.

La cause génétique est liée à un gène localisé sur le chromosome X au niveau de la région Xq25 qui code une protéine intervenant dans les mécanismes physiologiques de l'activation lymphocytaire T. Cette protéine appelée SH2D1A ou SAP (*SLAM-Associated Protein*) interagit avec SLAM (*Signaling Lymphocyte Activation Molecule*). La mutation du gène codant SAP résulte en une perturbation de l'immunité à médiation cellulaire anti-EBV.

IV.3.3 : Pathologies auto-immunes

L'EBV est de plus en plus souvent mis en cause dans le développement de certaines pathologies autoimmunes, telles que le syndrome de Sjörgen, le lupus érythémateux, la polyarthrite rhumatoïde et la sclérose en plaques. En effet, on détecte des titres élevés d'anticorps dirigés contre les protéines de latence et du cycle lytique dans les séras des patients atteints de ces pathologies autoimmunes (Balandraud N et al., *Autoimmunity* Rev 2004). Le mécanisme par lequel l'EBV contribue à la survenue de ces pathologies est encore inconnu.

Pathologies	Association à l'EBV (%)	Latence virale
Lymphome de Burkitt endémique (Afrique)	~95	I
Lymphome de Burkitt non-endémique	20 à 30	I
Lymphome de Hodgkin	50 à 70	II
Lymphome B immunoblastique (associé au VIH)	~95	III
Lymphome B des sujets transplantés	~95	III
Lymphome B lié à l'X (syndrome de Purtillo)	~95	III
Lymphome T périphérique	~40	II
Lymphome T/NK nasal extranodal	~95	II
Carcinome du rhinopharynx	~95	II
Carcinome gastrique	~10	II

Figure 31 : Principales pathologies associées à l'EBV. Les différentes pathologies sont représentées selon leur fréquence d'association (%) à l'EBV, ainsi que le type de latence virale qu'elles présentent. La **latence de type I** n'exprime qu'EBNA-1. La **latence de type II** exprime EBNA-1, LMP-1 et LMP-2A/B. Dans la **latence de type III**, toutes les protéines de latence, EBNA-LP, EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A/B/C, LMP-1 et LMP-2A/B sont exprimées.. (Modifié d'après la thèse de Gautier Goormachtigh, 2006).

V - La protéine LMP-1

La présence de LMP-1 dans les biopsies de tumeurs provenant de patients atteints de la maladie de Hodgkin ou du carcinome du rhinopharynx, suggère qu'il pourrait contribuer à la tumorigénèse et l'apparition des pathologies associées à l'EBV. L'équipe d'Elliot Kieff et ses collaborateurs ont montré, les premiers, que LMP-1 est capable de transformer des fibroblastes de rat Rat-1. L'injection de ces cellules exprimant LMP-1 dans des souris *nude* induit l'apparition de tumeurs, suggérant que les cellules transformées par LMP1 sont également tumorigènes (Wang D et al., Cell 1985). LMP1 représente ainsi la protéine virale majeure impliquée dans l'immortalisation par l'EBV (Kaye KM et al., PNAS 1993).

Bien qu'il ne partage pas d'homologie de séquences, LMP-1 partage des propriétés fonctionnelles communes avec des membres de la famille du récepteur du TNF α , dont le récepteur de l'IL1 (IL1-R, Luftig M et al., PNAS 2003), le récepteur du TNF α de type I (TNF-R1, Mosialos G et al., Cell 1995) et le CD40 (Gires O et al., EMBOJ 1997 ; Uchida J et al., Science 1999). En effet, LMP1 détourne des médiateurs de la signalisation et des adaptateurs de la famille des TRAFs pour induire les voies de signalisation menant à l'activation de NF κ B, JNK, ...etc.

V.1 : Régulation de l'expression de LMP-1

V.1.1 : Les promoteurs contrôlant l'expression de LMP-1

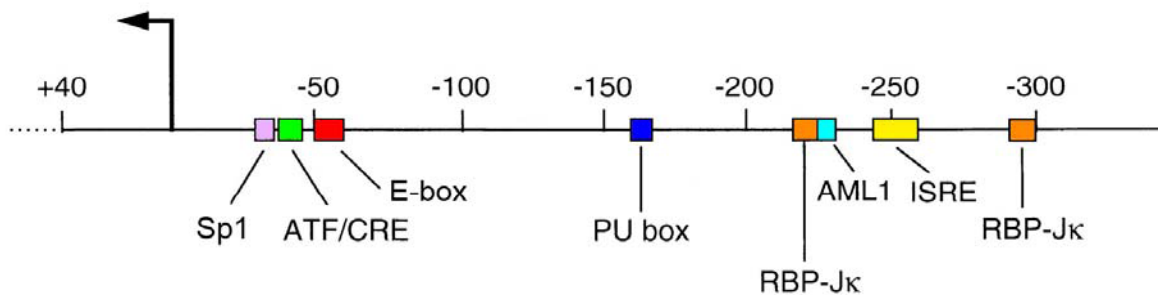
Deux promoteurs contrôlant l'expression de LMP-1 ont été décrits : TR-L1 et ED-L1.

Le promoteur **TR-L1** (*Terminal Repeat-located LMP-1 promoter*) est situé, comme son nom l'indique, dans l'extrémité TR du génome viral. Il représente le promoteur le plus distal en amont de l'initiation de la transcription. Ce promoteur est surtout actif dans les cellules épithéliales (latence virale de type II, Sadler RH and Raab-Traub N, JVirol 1995). Cependant, il semblerait que l'activité de TR-L1 soit détectée dans certains lymphomes de Hodgkin. Ce promoteur serait positivement régulé par les facteurs transcriptionnels de la famille STAT (Chen H et al., JVirol 2001 ; Chen H et al., JVirol 2003).

Le second promoteur décrit est **ED-L1** (*EcoRI D fragment-located LMP-1 promoter*) et est également appelé pLMP-1. Ce promoteur dirige l'expression de LMP-1 dans les LCLs (latence de type III). Le transactivateur principal de ce promoteur est la protéine EBNA-2 (Abbot SD et al., JVirol 1990 ; Wang F et al., JVirol 1990). Ce promoteur a la particularité d'être bidirectionnel en permettant la transcription de la protéine LMP-2B (Laux G et al., JVirol 1994a).

Un certain nombre de sites de fixation pour des facteurs de transcription au niveau du promoteur ED-L1/pLMP-1 ont été décrits (**figure 32**). Les premiers sont des sites de fixation des facteurs

CBF1/RBPJk (de -223 à -213 puis de -298 à -290). Ces sites CBF1/RBPJk sont essentiels à la fixation d'EBNA-2. D'autres sites ont ensuite été analysés sur ce promoteur (**figure 32**).



Figure

32 : Représentation schématique du promoteur ED-L1/pLMP-1. Outre les sites de fixation des facteurs CBF1/RBPJk (**orange** : -223 à -213 et -298 à -290, fixation d'EBNA-2, Johannsen E et al., JVirol 1995), il a été décrit un élément de réponse ISRE (**jaune** : -256 à -243, fixation des STATs), un site de fixation à AML1 (**bleu clair** : -229 à -224, Grossman SR et al., PNAS 1994), un site de fixation à PU.1/Spi1 (**bleu foncé** : -169 à -158, Johannsen E et al., JVirol 1995), un site de fixation E-box (**rouge** : -56 à -51, fixation de Mad et de Max, Sjöblom-Hallen A et al., JVirol 1999), un site de fixation CRE (**vert** : -37 à -44, Sjöblom A et al., JVirol 1998) et un site de fixation à Sp1 (**rose** : -30 à -39, Sjöblom A et al., JGenVirol 1995). *RBPJk* = *Jk Recombination signal sequence Binding Protein*, *EBNA-2* = *Epstein-Barr Nuclear Antigen-2*, *ISRE* = *Interferon-Stimulated Response Element*, *STAT* = *Signals Transducers and Activators of Transcription*, *AML1* = *Acute Myeloid Leukemia 1*, *CRE* = *cAMP Response Element*. (Modifié d'après Sjöblom A et al., JVirol 1998)

V.1.2 : Transactivation du promoteur ED-L1 (pLMP1)

V.1.2.1 : Transactivation par EBNA-2

La protéine EBNA-2 est exprimée près de 4h après infection par l'EBV. EBNA-2 transactive le promoteur de LMP-1, notamment par l'intermédiaire de la protéine CBF1/RBPJk (**figure 33**, Waltzer L et al., EMBOJ 1994 ; Johannsen E et al., JVirol 1995).

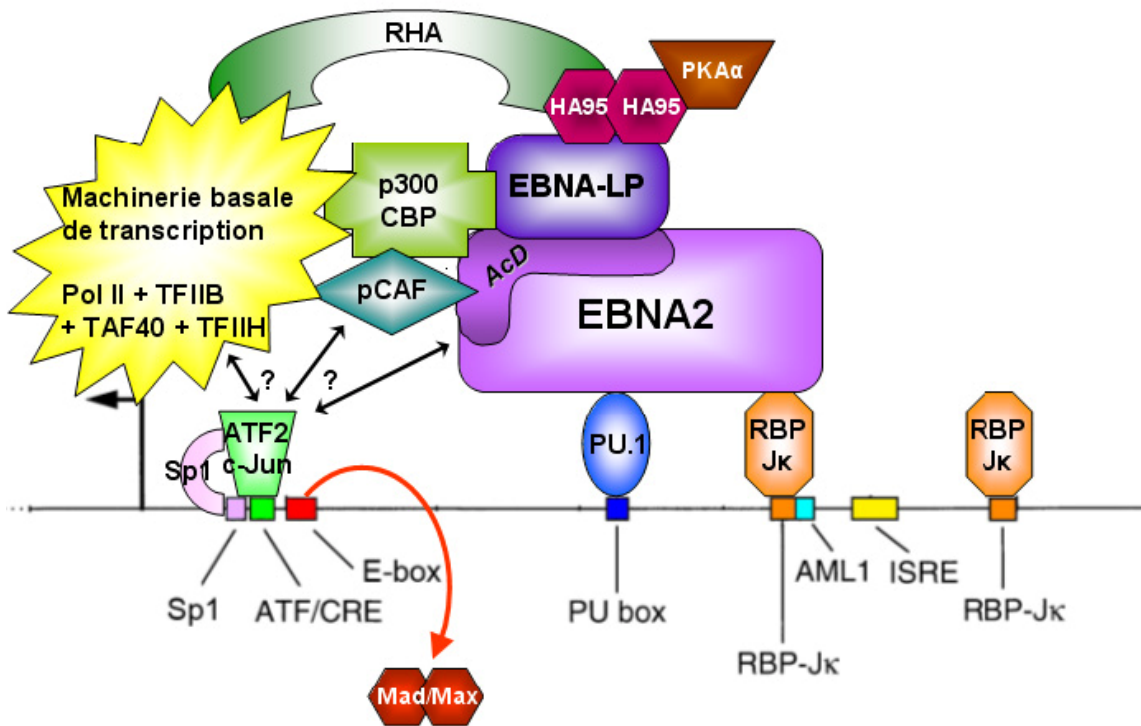


Figure 33 : Transactivation du promoteur ED-L1/pLMP-1 par EBNA-2. EBNA-2 est recruté par la protéine CBF1/RBPJk. EBNA-2 recrute des protéines de la machinerie transcriptionnelle : TFIID, TFIIE, TFIIB, TAF40, CBP/p300 et PCAF. EBNA-2 peut se fixer au promoteur pLMP-1 par l'intermédiaire d'ATF2, Sp1 et PU.1/Spi1. EBNA-LP joue un rôle de coactivateur et permet le recrutement de HA95. HA95 recrute à la fois une protéine coactivatrice RHA et une protéine coinhibitrice PKA (*Protein Kinase A*), régulant l'activation transcriptionnelle par EBNA-2. La transactivation du pLMP-1 par EBNA-2 est associée au déplacement de la fixation du complexe Mad/Max, empêchant son activité inhibitrice. *AcD* = *Activation Domain*, *CBP* = *CREB-Binding Protein*, *pCAF* = *p300/CBP-Associated Factor*, *RHA* = *RNA Helicase A*, *PKA* = *Protein Kinase A*, *Pol II* = *DNA polymerase II*, *TFIIB/H* = *Transcription Factor II B/H*, *TAF10*, *TransActivator Factor 40*. (D'après la thèse de Gautier Goormachtigh, 2006)

Comme indiqué en section III.1.1.2.C, EBNA-3A, -3B et -3C régulent négativement la transactivation du promoteur ED-L1/pLMP-1 par EBNA-2.

V.1.2.2 : Autres transactivateurs du pLMP-1

V.1.2.2.A : Transactivateurs viraux

Le promoteur de LMP-1 peut être transactivé par d'autres protéines virales. En absence d'EBNA-2, la protéine RK-BARF0, transcrit de la région BamHI A, peut induire l'expression de LMP-1 grâce à son interaction avec Notch et CBF1/RBPJk (Kusano S and Raab-Traub N, *JVirol*

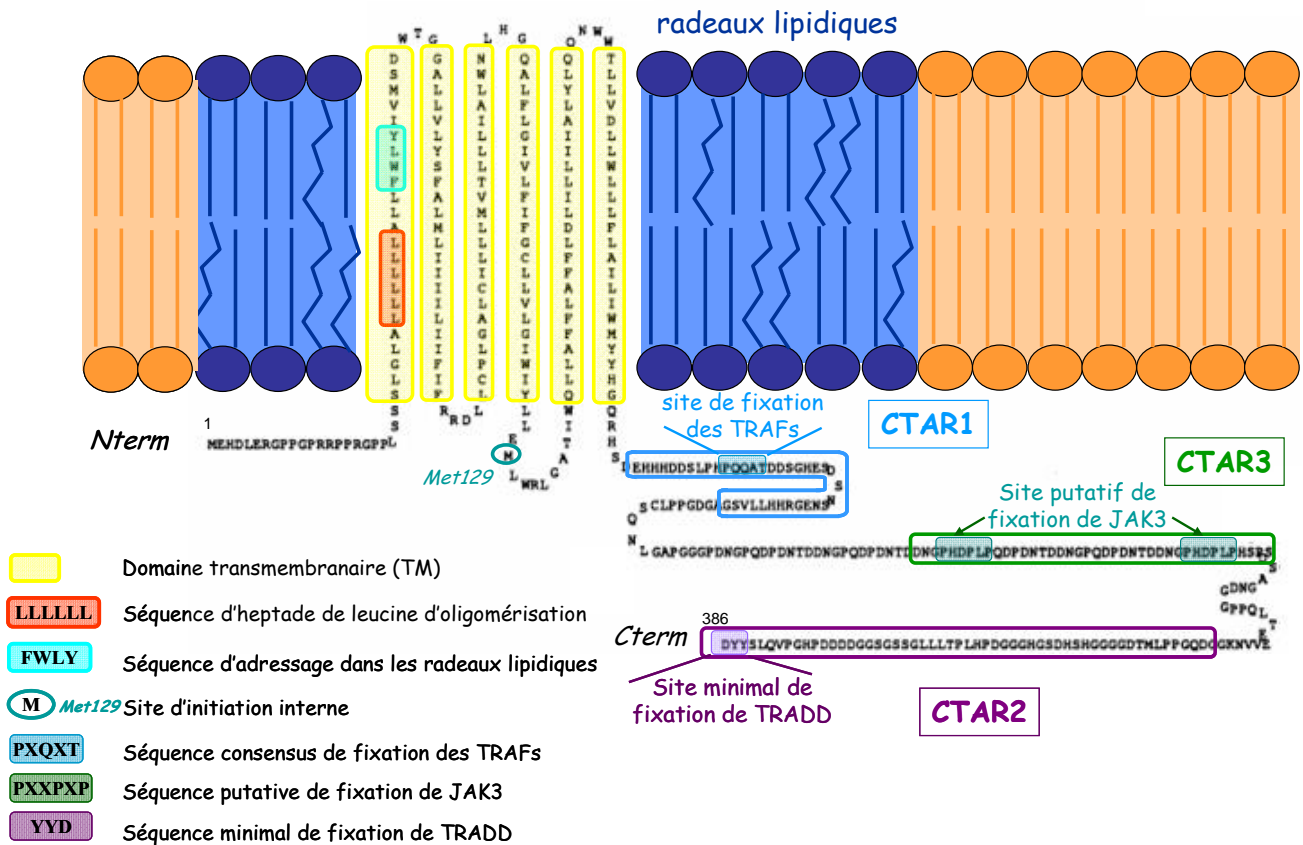
2001). La protéine du cycle lytique Rta (BRLF1) peut induire l'expression de LMP-1 à partir des deux promoteurs TR-L1 et ED-L1/pLMP-1 (Chang Y et al., JVirol 2004).

V.1.2.2.B : Transactivateurs cellulaires

Le promoteur ED-L1/pLMP-1 peut être activé de manière indépendante d'EBNA-2 par différentes protéines cellulaires incluant IRF7 (Ning S et al., JVirol 2003), STAT (Chen H et al., JVirol 2001, USF et ATF2 (Sjöblom-Hallen A et al., JVirol 1999). En sus des facteurs de transcription de la voie JAK/STAT, il a été montré que le facteur de transcription Sp1 peut réguler positivement TR-L1 (Sadler RH and Raab-Traub N, JVirol 1995 ; Chen H et al., JVirol 2001).

V.2 : Structure

LMP-1 est une protéine membranaire de 63 kDa et dont la séquence primaire comporte 386 aas (**figure 34**). La structure de LMP-1 peut être subdivisée en trois parties : un segment N-terminal cytosolique de 24 aas, de 6 domaines transmembranaires, ainsi qu'une queue C-terminale cytosolique de 200 aas.



de LMP-1. La mutation du motif $_{38}\text{Phe-Leu-Tryp-Tyr}_{41}$ ($_{38}\text{FLWY}_{41}$) diminue l'association des domaines TM (1-2) avec les domaines TM (3-6), réduisant ainsi le recrutement des adaptateurs et l'activation de la voie NF κ B (Yasui T et al., PNAS 2004). Un autre motif semble également contribuer à l'agrégation de LMP-1. Il s'agit d'un motif composé de résidus de leucine organisés en heptade. La mutation de ce motif en résidus d'alanine diminue l'auto-agrégation de LMP-1 ainsi que sa localisation dans les radeaux lipidiques. Ces expériences suggèrent que l'auto-agrégation et la localisation de LMP-1 dans les radeaux lipidiques sont nécessaires à l'immortalisation par l'EBV (Kaykas A et al., JVirol 2002).

Le domaine TM de LMP-1 serait impliqué dans un autre processus menant à la réorganisation du cytosquelette et à l'altération morphologique cellulaire (Puls A et al., JCellSci 1999). En effet, Cdc42, une protéine de la famille des Rho GTPases impliquée dans l'organisation du cytosquelette, est activée par le domaine TM de LMP-1 par un mécanisme qui reste encore à définir.

Il a été enfin démontré que ce domaine TM, avec la partie Nterm, est responsable de l'effet cytostatique de LMP-1 (Kaykas A and Sugden B, Oncogene 2000 ; Sandberg ML et al., JVirol 2000). Ces deux domaines sont responsables de l'inhibition de l'expression génique et de la prolifération cellulaire (Kaykas A and Sugden B, Oncogene 2000).

V.2.3 : La partie Carboxy Terminale

La partie carboxy-terminale (Cterm) cytosolique de LMP-1 est constituée de 200 aas et est la partie essentielle pour l'immortalisation par l'EBV. L'équipe de Wolfgang Hammerschmidt a montré, la première, à l'aide de constructions chimériques entre la partie Cterm de LMP-1 et des domaines extracellulaires et transmembranaires de différents récepteurs membranaires (CD2, CD4 et NGFR) que l'oligomérisation de l'extrémité Cterm est nécessaire à la signalisation induite de LMP-1 (Gires O et al., EMBOJ 1997). LMP-1 recrute par cette extrémité Cterm des adaptateurs associés à la famille du récepteur au TNF α , les TRAFs (*TNF Receptor Associated Factors*,

Mosialos G et al., Cell 1995). Ces adaptateurs sont recrutés au niveau de régions nommées CTAR (*C-Terminal Activating Region*). Deux régions CTAR sont particulièrement bien décrites : la région CTAR1 des résidus d'acides aminés 187 à 231 et la région CTAR2 des résidus 352 à 386 (Devergne O et al., MCB 1996).

Au sein des régions CTAR1 et CTAR2, il a été décrit des séquences plus courtes TES1 et TES2 (*Transforming Effector Site 1 and 2*) comprenant respectivement les résidus 196 à 231 et les résidus de 376 à 386 (Izumi KM et al., MCB 1999). Ces régions possèdent des motifs consensus nécessaires à la fixation des adaptateurs. La région CTAR1/TES1 comporte le motif consensus Pro₂₀₄-X-Gln₂₀₆-X-Thr₂₀₈ (P₂₀₄-X-Q₂₀₆-X-T₂₀₈) nécessaire à la fixation des adaptateurs TRAFs. Une mutation des résidus de proline, glutamine et thréonine en résidus d'alanine réduit l'association de LMP-1 avec les TRAFs (Devergne O et al., MCB 1996 ; Devergne O et al., JVirol 1998). Ce motif est retrouvé dans la partie Cterm de CD40 et d'autres membres de la famille du récepteur du TNF α , CD30 et TNF-R1 notamment (Ye H et al., MolCell1999). Au sein de la région CTAR2/TES2, le motif Tyr₃₈₄-Tyr₃₈₅-Asp₃₈₆ (Y₃₈₄-Y₃₈₅-D₃₈₆) est indispensable pour la fixation de l'adaptateur TRADD (*TNF Receptor-Associated Death Domain*). La mutation en Ile₃₈₄-Asp₃₈₅ (I₃₈₄-D₃₈₅) réduit significativement la liaison de TRADD à LMP-1 (Izumi KM et al., PNAS 1997). Entre CTAR1/TES1 et CTAR2/TES2, il a été décrit une troisième région, appelée CTAR3, qui comprend les résidus 232 à 350. Bien qu'elle ne soit pas essentielle pour l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro* (Izumi KM et al., JVirol 1999), la région CTAR3 contient deux motifs potentiels pour la fixation de JAK3 menant à l'activation de la voie des STATs (Pro₂₇₅-X-X-Pro₂₇₈-X-Pro₂₈₀ (P₂₇₅-X-X-P₂₇₈-X-P₂₈₀) et Pro₃₀₂-X-X-Pro₃₀₅-X-Pro₃₀₇ (P₃₀₂-X-X-P₃₀₅-X-P₃₀₇), Gires O et al., EMBOJ 1999). Cependant, la délétion de cette région dans des LCLs ne perturbe pas l'activation de JAK3 et de STAT3 (Higuchi M et al., JVirol 2002). Ces résultats remettent en cause le rôle de la région CTAR3. En réalité, l'activation des STAT par l'EBV résulte sans doute d'un effet autocrine (Najjar I et al., JVirol 2005).

V.3 : La forme lytique de la protéine LMP-1

Un variant naturel tronqué de la protéine LMP-1 est décrit. Ce variant est traduit à partir d'un site d'initiation interne situé au niveau de la méthionine 129 (Met₁₂₉, **figure 34**) et est appelé LMP-1 lytique ou lyLMP-1. LyLMP-1 correspond à la délétion complète de la partie Nterm et des 4 premiers domaines TM de LMP-1. LyLMP-1 est détectée très tôt lors de l'infection par l'EBV et lors de la réactivation virale, suggérant sa présence dans le virion de l'EBV (Erickson KD and Martin JM, *Virology* 1997). Contrairement à LMP-1, lyLMP-1 ne possède pas de propriétés transformantes et semble inhiber la voie de signalisation NFκB induite par LMP-1 sans perturber l'oligomérisation de LMP-1 (Erickson KD and Martin JM, *JVirol* 2000). Le mécanisme par lequel lyLMP-1 inhibe la signalisation de LMP-1 n'est pas clair. LyLMP-1 possède encore sa partie Cterm et ses domaines CTAR1/TES1 et CTAR2/TES2. On pourrait alors penser que lyLMP-1 soit capable de fixer des adaptateurs TRAFs sous forme monomérique et pourrait agir en tant que dominant négatif de LMP-1. LyLMP-1 a été ensuite décrit comme inhibant les propriétés oncogéniques de LMP-1 et diminue sa demi-vie (Pandya J and Walling DM, *JVirol* 2006 ; Pandya J and Walling DM, *JVirol* 2004). En effet, des expériences de transfection transitoire montrent que l'expression de LMP-1 est inversement proportionnelle à celle de lyLMP-1. LyLMP-1 lèverait ainsi l'inhibition du cycle lytique par LMP-1 et aurait pour conséquence de favoriser la progression du cycle lytique (Erickson KD and Martin JM, *JVirol* 2000).

V.4 : Voies de signalisation induites par la protéine LMP-1

V.4.1 : La voie NFκB

LMP-1 est le principal activateur de la voie NFκB de l'EBV. Cette activité est nécessaire à l'expression de gènes anti-apoptotiques (A20 (Laherty CD et al., *JBC* 1992), cIAP2 (Hong SY et al., *JBC* 2000), Bcl2 (Henderson S et al., *Cell* 1991),...), de cytokines (IL6, IL8 (Eliopoulos AG et al., *JBC* 1999),...) et d'antigènes de surface (CD40, CD54,... ; Kieff E, *Fields Virology* 3rd edition

1996). L'inhibition de NFκB diminue les capacités transformantes de LMP-1 (Erickson KD and Martin JM, JVirol 2000) et sensibilise les cellules à l'induction de l'apoptose (Feuillard J et al., Blood 2000). L'activation de la voie NFκB nécessite, au préalable, l'oligomérisation de LMP-1 (Huen DS et al., Oncogene 1995). Deux domaines sont particulièrement essentiels, CTAR1/TES1 et CTAR2/TES2.

V.4.1.1 : A partir du domaine CTAR1/TES1

A partir de CTAR1/TES1, LMP-1 induit la voie non-canonique de NFκB (**figure 35**). CTAR1/TES1 interagit avec les adaptateurs TRAF1, TRAF2, TRAF3 et TRAF5. Parmi ces TRAFs, seul TRAF3 semble indispensable à l'induction de la voie NFκB dans les lymphocytes B (Xie P et al., JExpMed 2004 ; Xie P et al., CytokineGrowthFactorsRev 2008) et est le seul TRAF associée à LMP-1 dans les radeaux lipidiques (Ardila-Osorio H et al., IntJCancer 2005). TRAF3 recrute la kinase NIK (*NFκB-Inducing Kinase*), qui active la kinase IKKα par phosphorylation de résidus sérine. A son tour, IKKα phosphoryle p100 (NFκB2) induisant la formation de la sous-unité active p52 et s'associe avec les sous-unités de RelA ou RelB (Luftig M et al., PNAS 2004).

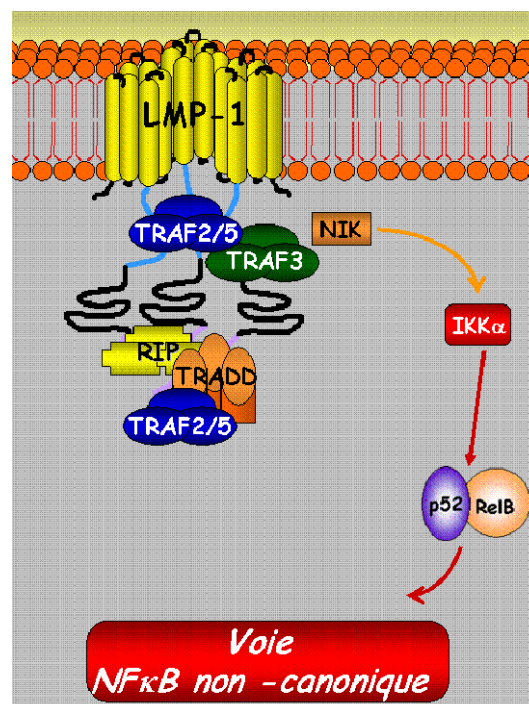


Figure 35 : Représentation schématique de l'activation de la voie non-canonique par LMP-1. Voir le texte pour plus de détails.

V.4.1.2 : A partir du domaine CTAR2/TES2

Le domaine CTAR2/TES2 fixe les adaptateurs TRADD et RIP, qui recrutent les adaptateurs TRAF2 et TRAF5. Récemment, il a été montré que TRADD est essentielle à l'activation de la voie NFκB (**figure 36**, Schneider F et al., PLoSBiol 2008). TRADD recrute les adaptateurs TRAF2 et 5 dont le rôle est inconnu (Luftig M et al., PNAS 2003). Par un mécanisme indépendant de TRAF2 et de TRAF5, LMP-1 recrute TRAF6, adaptateur essentielle de la signalisation du récepteur de l'IL1 (IL1-R, Luftig M et al., PNAS 2003). Ensuite, TRAF6 recrute et active un complexe protéique formé de TAB1, TAB2 et TAK1. Ce complexe active par phosphorylation le complexe des kinases IKK (IKKα/IKKβ/IKKγ). Cependant, il semblerait que TAK1 ne soit pas essentielle dans l'activation de la voie NFκB (Uemura N et al., JBC 2006).

Une autre kinase peut être recrutée en aval de TRAF6, il s'agit d'IRAK1. Cette kinase essentielle à la signalisation de l'IL1-R semble capable d'induire la phosphorylation de la sous-unité RelA/p65 au niveau de la sérine 536 (Song YJ et al., PNAS 2006). Cependant, son rôle a été remis en cause par l'équipe de Zhenguó Wu (Wu L et al., JBC 2006).

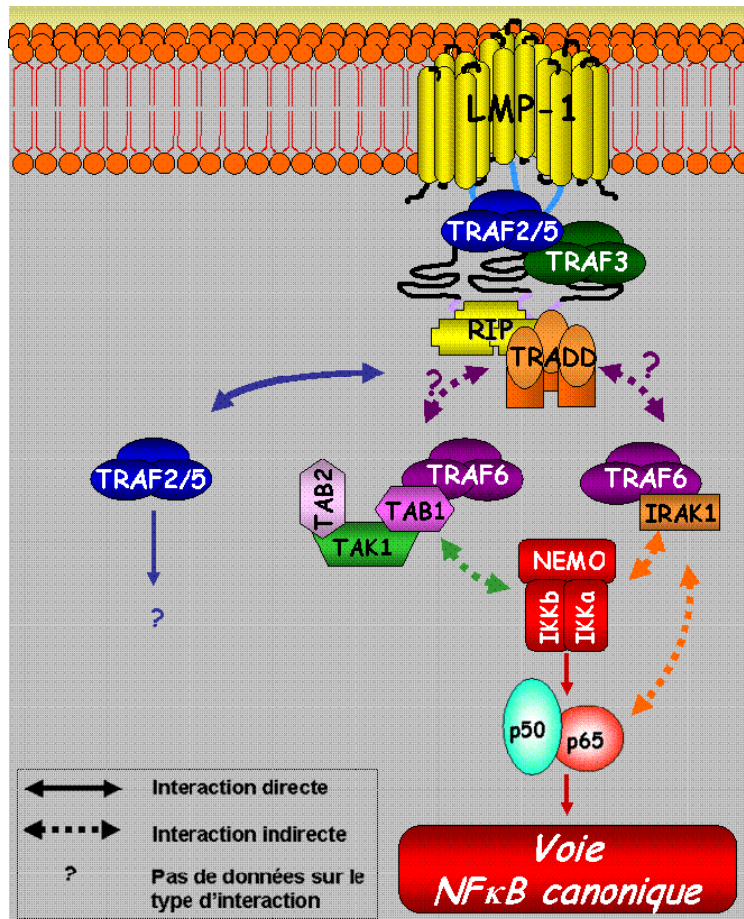


Figure 36 : Représentation schématique de l'activation de la voie canonique par LMP-1. Voir le texte pour plus de détails.

V.4.2 : La voie des MAP Kinases

V.4.2.1 : La voie JNK

Quelque soit le type de variant étudié, la voie JNK est dans tous les cas activée par LMP-1, suggérant que cette voie est essentielle dans la pathogenèse associée à LMP-1. Depuis peu, certaines études ont amélioré notre connaissance sur l'activation de la voie JNK par LMP-1. En effet, l'équipe de Zhenguó Wu a montré très clairement que la molécule-clé pour l'activation de la voie JNK est TRAF6 (Wan J et al., MCB2004). Comme pour la voie canonique de NFκB, TRAF6 recrute le complexe formé de TAB/TAB2/TAK1. TAK1 est une MAP d'ordre 3 (MAPKKK) essentielle à l'activation de la voie JNK (Uemura N et al., JBC 2006). Cette MAPKKK phosphoryle

et active les MAPKK, MKK4 et MKK7, connues pour activer JNK (Weston CR and Davis RJ, CurrOpCellBiol 2007, **figure 6**).

TRAF1 a été décrit comme l'adaptateur principal recruté au domaine CTAR1/TES1 de LMP-1 (Eliopoulos AG et al., JVirol 2003). Le recrutement de TRAF1 aboutit au recrutement de TRAF6 par un mécanisme encore inconnu (**figure 37**). Au domaine CTAR2/TES2, est recrutée la protéine BS69, corépresseur nucléaire, qui fait le pont entre LMP-1 et TRAF6 par une interaction directe (Wan J et al., MCB 2006, **figure 37**). Le recrutement de BS69 nécessite son export nucléaire par LMP-1 par un mécanisme encore inconnu. Cependant, parmi les protéines qui interagissent avec BS69, le facteur de transcription Ets2 est, à l'heure actuelle, la seule décrite comme exportée du noyau par LMP-1 (Ohtani N et al., JCB 2003).

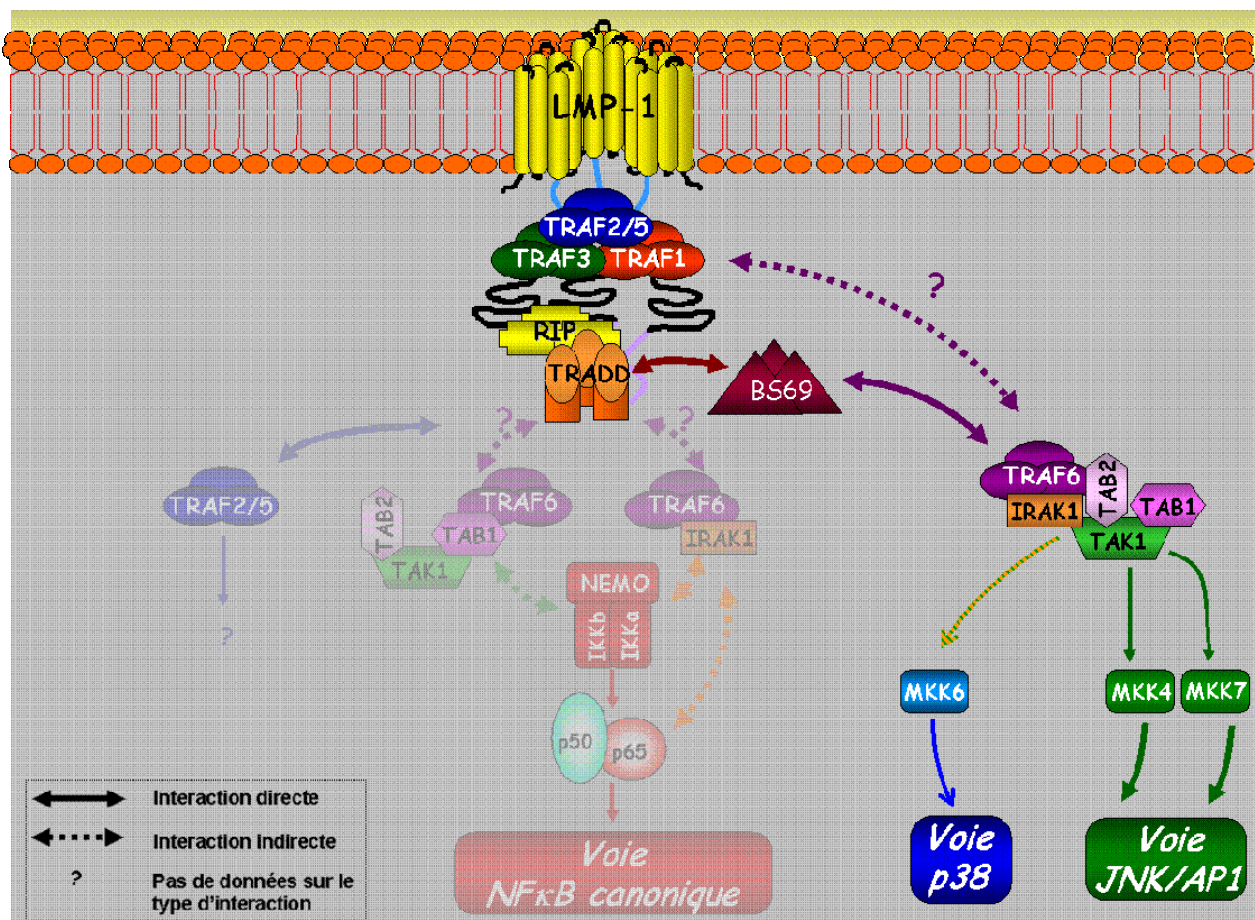


Figure 37 : Représentation schématique de l'activation des voies des MAPK, p38 et JNK, par LMP-1. Voir le texte pour plus de détails.

V.4.2.2 : La voie p38

Chez les mammifères, il existe 4 isoformes de p38 : p38/p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ ; connues aussi sous le nom de SAPK2a, SAPK2B, SAPK3 et SAPK4 (*Stress-Activated Protein Kinase*, protéine kinase activée par un stress). La voie p38 est impliquée dans différents processus cellulaires tels que la sénescence, l'inhibition de contact, la réponse aux dommages de l'ADN et la suppression de tumeurs (Han J and Sun P, TrendsBiochemSci 2007). L'activation de p38 implique une cascade de phosphorylations activatrices initiée par une MAPKKK (MTK1, MLK2/3, DLK, ASK1, TAK1) suivie par une MAPKK (MKK3, MKK4 et MKK6, **figure 6**).

Les deux domaines CTAR1/TES1 et CTAR2/TES2 peuvent induire la voie p38 après recrutement de TRAF2 (Eliopoulos AG et al., JBC 1999, **figure 37**). Ainsi, TRAF6 est recruté par TRAF2 au domaine CTAR1/TES1 et par TRADD au domaine CTAR2/TES2 comme pour la voie NF κ B (Schultheiss U et al., EMBOJ 2001). Cependant, on ne connaît pas quel mécanisme permet de choisir, à ce niveau, la voie p38 ou la voie NF κ B. Après le recrutement de TRAF6, s'ensuivent l'activation d'IRAK1 et le recrutement du complexe protéique TAB1/TAB2/TAK1. TAK1 phosphoryle et active MKK6 qui active à son tour p38 (Schultheiss U et al., EMBOJ 2001 ; Ashwell JD, NatRevImmunol 2006). Enfin, IRAK1 a été décrit comme pouvant induire l'activation de p38 (Song YJ et al., PNAS 2006).

Par la voie p38, LMP-1 induit l'expression d'un certain nombre de cytokines telles que IL6, l'IL8 et la chimiokine IP10 (Eliopoulos AG et al., JBC 1999 ; Vockerodt M et al., Virology 2001) puis l'activation de p53 (phosphorylation en Ser15 et Ser392, Li L et al., CancerLett 2007).

V.4.2.3 : La voie ERK

La voie ERK (*Extracellular Regulated Kinase*, **figure 6**) est impliquée dans des processus cellulaires variés : prolifération, différenciation, migration, survie, apoptose. Une dérégulation de cette voie mène invariablement à une transformation pathologique (McCubrey JA et al., BBA

2007). ERK est activée par une cascade de phosphorylation classique : MAPKKK (Raf) puis MAPKK (MEK1/2).

Peu de données dans la littérature sont disponibles sur les adaptateurs nécessaires à l'induction de cette voie de signalisation par LMP-1. Cependant, il apparaît que LMP-1 détourne la voie ERK (Roberts ML and Cooper NR, *Virology* 1998). En effet, LMP-1 inhibe l'expression de RECK1, un suppresseur de métastases (Liu LT et al., *Oncogene* 2003). Ensuite, il a été démontré que LMP-1 pouvait augmenter la motilité cellulaire et les capacités invasives de cellules épithéliales (Dawson CW et al., *JVirol* 2008). Les auteurs ont montré que la voie ERK est induite par le domaine CTAR1/TES1 de LMP-1, vraisemblablement après recrutement de TRAF2 et TRAF3 (Mainou BA et al., *JVirol* 2007 ; Dawson CW et al., *JVirol* 2008).

V.4.3 : La voie de la PI3 Kinase

Cette voie de signalisation est détournée par LMP-1, induisant la prolifération des LCLs (Brennan P et al., *Oncogene* 2002). En effet, un inhibiteur chimique de la voie PI3K, le LY294002, induit une diminution de l'expression des cyclines D2 et D3, impliquées dans la progression du cycle cellulaire. De même, on observe une augmentation de l'expression de l'inhibiteur du cycle p27^{Kip1}. L'activation de la voie PI3K serait induite par le domaine CTAR1/TES1 par un mécanisme qui reste encore à décrire (Mainou BA et al., *Oncogene* 2005). Depuis, différentes études ont montré que certains processus cellulaires étaient contrôlés par LMP-1 via l'induction de la voie PI3K : survie cellulaire (sans doute conjointement avec la voie NFkB, Dawson CW et al., *JBC* 2003), remodelage du cytosquelette (Dawson CW et al., *JBC* 2003), migration des cellules épithéliales (Shair KH et al., *CancerRes* 2008), répression de la réparation suite aux dommages de l'ADN (Chen YR et al., *JVirol* 2008) et production d'IL10 (Lambert SL and Martinez OM, *JImmunol* 2007).

V.4.4 : La voie des JAK/STATs

JAK3 et Tyk2 ont été décrits dans la signalisation de LMP-1 (Gires O et al., EMBOJ 1999 ; Geiger TM and Martin JM, JVirol2006). Le recrutement de JAK3 est associé au domaine CTAR3 (Gires O et al., EMBOJ 1999, **figure 34**). Cependant, une délétion de ce domaine ne semble pas perturber ce recrutement, suggérant alors que ce domaine CTAR3 n'est pas responsable de la fixation de JAK3 et de Tyk2 (Higuchi M et al., JVirol 2002). Des expériences de coimmunoprécipitation avec différents mutants de LMP-1 n'a pas permis d'identifier le domaine CTAR responsable du recrutement de Tyk2 (Geiger TM and Martin JM, JVirol 2006).

STAT1, STAT2, STAT3 et STAT5a sont les 4 membres de la famille STAT associés à l'EBV dans les cellules infectées par ce virus (Chen H et al., JVirol 2003 ; Zhang L et al., Virology 2004).

Récemment, le mécanisme par lequel LMP-1 active STAT1 a été démontré (Najjar I et al., JVirol 2005). LMP-1 induit l'expression et la sécrétion autocrine de l'IFN α et de l'IFN γ via la voie NF κ B et les domaines CTAR1/TES1 et CTAR2/TES2 (Zhang L et al., Virology 2004 ; Najjar I et al., JVirol 2005). L'IFN α et l'IFN γ se fixent aux récepteurs des IFN (IFNAR1/IFNAR2, *IFN α Receptor 1/2*) et IFNGR1/IFNGR2, *IFN γ Receptor 1/2*) et induisent l'activation de STAT1 (**figure 38**).

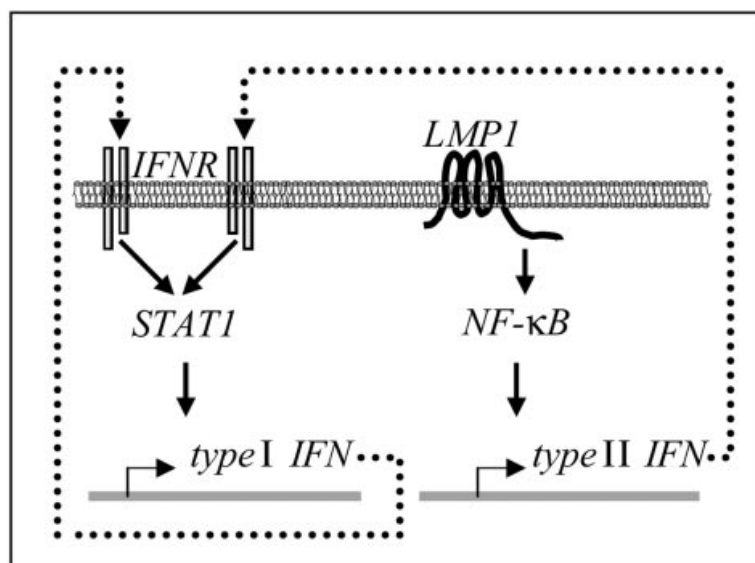


Figure 38 : Représentation schématique de l'activation de STAT1 par LMP-1. LMP-1 induit, par la voie NFκB, l'expression et la sécrétion autocrine de l'IFNα et de l'IFNγ. Ces IFN se fixent sur leur récepteur qui, par l'intermédiaire de STAT1, induisent l'expression et la sécrétion autocrine d'IFNs. (D'après NajjarI et al., JVirol2005).

V.4.5 : LMP-1, une signalisation très complexe

Nous avons vu, dans les précédents paragraphes, comment LMP-1 induit la signalisation menant à la voie NFκB et des MAP kinases. Afin d'étudier ces voies de signalisation, de nombreuses technologies ont été utilisées pour déterminer le rôle des différents adaptateurs ainsi que leur interaction éventuelle. Les auteurs ont utilisé des techniques d'inactivation, génique (*Knock-Out*) ou protéique (ARN interférence), et des techniques de mutagenèse fonctionnelle (dominants négatifs), apportant des données sur le rôle de chacun des adaptateurs dans la signalisation. Ces techniques très différentes (inactivation ou mutagenèse fonctionnelle) ont donné lieu à des résultats contradictoires, comme ce fut le cas pour TRAF2 ou TRADD.

Ensuite, les chercheurs se sont intéressés aux éventuelles interactions protéiques entre chacun des adaptateurs afin de déterminer la dynamique de la signalisation par LMP-1. Pour cela, les auteurs ont utilisé principalement des techniques *in vitro* chez la levure (double-hybride) ou au niveau cellulaire (co-immunoprécipitation). Les résultats obtenus nous ont apporté une meilleure compréhension des interactions protéiques.

Ainsi, nous avons vu précédemment que l'induction des voies NFκB et JNK nécessite le complexe protéique TAB1/TAB2/TAK1. De plus, en amont de ce complexe, on décrit les adaptateurs spécifiques de chacune de ces voies qui orienteraient tantôt vers la voie NFκB (TRADD), tantôt vers la voie JNK (BS69). Cependant, ces différentes technologies ne nous renseignent pas sur la proportion relative de chaque adaptateur optimale pour induire une voie de signalisation spécifique. En effet, on pourrait alors penser qu'un multimère de LMP-1 qui fixe « plus » de protéines TRADD que de protéines BS69, induit préférentiellement la voie NFκB dans l'hypothèse où chacun des adaptateurs interagit avec le même multimère. Mais, on peut également émettre l'hypothèse que

plusieurs multimères de LMP-1 co-existent au niveau cellulaire et qu'ils fixent soit TRADD soit BS69, induisant respectivement la voie NFkB et la voie JNK. Il existerait un mécanisme de régulation, dépendant du type cellulaire ou des conditions cellulaires, qui détermine l'orientation des voies de signalisation.

V.5 : Propriétés fonctionnelles de la protéine LMP-1

V.5.1 : LMP-1 induit des altérations phénotypiques

LMP-1 induit l'expression d'antigènes d'activation des lymphocytes B : le CD21 (récepteur de l'élément C3d du complément), le CD23 (récepteur de basse affinité des IgE), le CD80 et le CD83 (molécules de co-stimulation des lymphocytes B, Dudziak D et al., JVirol 2003), le CD30 (membre de la famille du TNF-R1), le CD40, le CD44 et le CD39 (récepteurs de la famille des Ig, Wang F et al., JVirol 1990 ; Kieff E, Fields Virology 3rd edition 1996). De plus, LMP-1 induit l'expression du CMH de classe II (Zhang Q et al., EurJImmunol 1994) et de classe I (Rowe M et al., EurJImmunol 1995) ainsi que l'expression des transporteurs d'antigènes TAP1 et TAP2 (*Transporter-associated with Antigen Processing 1 and 2*, Pai S and Khanna R, SeminCancerBiol 2001), régulant l'immunogénicité des cellules infectées.

LMP-1 est impliqué dans la surexpression de molécules d'adhésion cellulaire : LFA1/CD11, LFA3/CD58, ICAM1/CD54, (Kieff E, Fields Virology 3rd edition 1996) et de molécules anti-apoptotiques (Bcl2 (Henderson S et al., Cell 1991), A20 (Laherty CD et al., JBC 1992),...). Bien que ces marqueurs soient impliqués dans la réponse immunitaire et la formation de la synapse immunologique B-T, il semble que ces molécules interviennent dans l'interaction homotypique des LCLs, notamment grâce à LFA1 et ICAM1 (Park JH and FallerDV, Virology 2002).

V.5.2 : LMP-1 régule l'expression et la production de cytokines

LMP-1 induit l'expression de chimiokines (CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, IP10). Les chimiokines sont des cytokines de petite taille (8 à 16 kDa) et leur rôle est de recruter notamment les cellules du système immunitaire. Ces chimiokines attirent les lymphocytes T et les cellules NK, éliminant les cellules infectées (Nakayama T et al., *JVirol* 2004 ; Vockerodt M et al., *IntJCancer* 2005 ; Okudaira T et al., *BrJHaematol* 2006). Cependant, LMP-1 contrôle également l'expression de CCL17 et CCL22 qui attirent des lymphocytes T particuliers impliqués dans l'échappement au système immunitaire, les lymphocytes T régulateurs (Nakayama T et al., *JVirol* 2004), permettant aux cellules infectées d'échapper au système immunitaire.

De plus, LMP-1 induit l'expression et la sécrétion de RANTES (ou CCL5). CCL5 se fixe sur son récepteur CCR5, présent sur les monocytes, les éosinophiles ainsi que sur les LCLs (Uchihara JN et al., *IntJCancer* 2005).

LMP-1 contrôle l'expression de certaines interleukines (IL-10, IL-6, IL-8, TNF α). L'IL-10 est une interleukine immunosuppressive impliquée dans l'expression de LMP-1 (Kis LL et al., *Blood* 2006 ; Lambert SL and Martinez OM, *JImmunol* 2007), alors que l'IL-6, l'IL-8 et le TNF α sont des cytokines pro-inflammatoires qui maintiendraient un état d'inflammation chronique propice à la survie de la tumeur (Eliopoulos AG et al., *JBC* 1999 ; Chen H et al., *JVirol* 2003 ; Aggarwal BB et al., *BiochemPharmacol* 2006).

V.5.3 : LMP-1 contribue au pouvoir métastatique des cellules infectées

Les capacités métastatiques et invasives des cellules infectées par l'EBV, notamment les cellules de carcinome du rhinopharynx, sont accrues par l'expression de LMP-1 (Dawson CW et al., *JVirol* 2008 ; Morris MA et al., *EurJCellBiol* 2008). L'action de LMP-1 se situe à trois niveaux.

Certains facteurs angiogéniques sont induits par LMP-1 (HIF1 α , VEGF, FGF2, COX2) et pourraient contribuer au processus de métastases (Murono S et al., PNAS 2001 ; Wakisaka N et al., CancerRes 2002 ; Wakisaka N et al., MCB 2004 ; Ceccarelli S et al., IntJCancer 2007).

LMP-1 régule l'expression de métalloprotéases MMP (*MatrixMetalloProteases*) ; MMP9 (Yoshizaki T et al., PNAS 1998 ; Takeshita H et al., JVirol 1999 ; Murono S et al., CancerRes 2000), MMP1 (Lu J et al., CancerRes 2003). Ces MMPs sont nécessaires au remodelage et à la dégradation de la matrice extracellulaire (collagène) préalable à l'invasion cellulaire. L'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA, *urokinase-type Plasminogen Activator*) et la mucine MUC1 sont deux autres protéines régulées par LMP-1 qui semblent jouer un rôle important dans ce processus (Kim KR et al., Oncogene 2000 ; Kondo S et al., JVirol 2007).

Enfin, LMP-1 est capable d'inhiber l'expression des suppresseurs de métastases RECK1 et l'E-cadhérine (Tsai CN et al., PNAS 2002 ; Liu LT et al., Oncogene 2003). RECK1 (*REversion inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs 1*) bloque l'activité des MMP2 et MMP9 (Baker AH et al., JCellSci 2002). L'E-cadhérine est une protéine d'adhérence assurant le contact intercellulaire qui est réprimée dans de nombreux cancers agressifs. La répression de l'E-Cadhérine augmente la capacité migratoire des cellules de CRP (Tsai CN et al., PNAS 2002).

V.5.4 : LMP-1 régule la prolifération et la différenciation cellulaire

LMP-1 altère la différenciation et la prolifération de différents types cellulaires. LMP-1 peut activer le cycle cellulaire grâce à l'induction de la voie PI3K/Akt qui entraîne la diminution de l'expression de p27^{Kip1}, un inhibiteur du cycle cellulaire (Brennan P et al., Oncogene 2002 ; Mainou BA et al., Oncogene 2005 ; Mainou BA et al., JVirol 2007).

De plus, LMP-1 induit l'export nucléaire des facteurs de transcription E2F4 et E2F5 (E2F4/5) qui sont les effecteurs de l'arrêt du cycle cellulaire. L'export nucléaire de ces molécules lève le blocage de la prolifération cellulaire induit la voie p16^{INK4a}-Rb (Ohtani N et al., JCellBiol 2003). Il a été

ensuite montré que les cellules infectées exprimant LMP-1 sont réfractaires à l'arrêt du cycle cellulaire induit par le TGF β . En effet, LMP-1 inhibe la translocation nucléaire de Smad, connu pour induire l'expression de p27^{Kip1} (Prokova V et al., JBC 2002 ; Fukuda M et al., Virology 2002 ; Mori N et al., IntJCancer 2003).

Enfin, LMP-1 régule l'expression d'Id1 et d'Id3 (*Inhibitor of Differentiation 1 and 3*), protéines impliquées dans la régulation négative de p16^{INK4a}, p27^{Kip1} (Li HM et al., Oncogene 2004 ; Everly DN Jr et al., JVirol 2004). Ainsi, on peut constater que de nombreuses voies sont mises en place pour arriver à un même objectif qui est la levée du blocage du cycle cellulaire.

V.5.5 : LMP-1 possède des propriétés cytostatiques et cytotoxiques

Une étude a montré que LMP-1 est essentielle à la prolifération cellulaire des lymphocytes B (Kilger E et al., EMBOJ 1998). Cependant, l'effet cytotoxique de LMP-1 est montré lorsque cette protéine est fortement surexprimé (Hammerschmidt W et al., EMBOJ 1989). Par la suite, on décrit principalement des effets cytostatiques associés à LMP-1. La cytostase est un phénomène associé à l'arrêt ou l'inhibition de la division et la croissance cellulaire. Ce phénomène est observée lorsque LMP-1 est présent dans la cellule à de hauts niveaux d'expression (voir section V.2.2, Floettmann JE et al., Virology 1996 ; Kaykas A and Sugden B, Oncogene 2000). L'effet cytostatique est associée à la phosphorylation de eIF2 α (*eukaryotic translation Initiation Factor 2 α* , Lam N et al., JVirol 2004), menant à l'arrêt de la traduction (Foufelle F and Ferré P, Médecine Sciences 2007).

Récemment, un résultat étonnant de l'équipe de Bill Sugden montre que de hauts niveaux d'expression de LMP-1 induit la phosphorylation d'eIF2 α par l'intermédiaire de la kinase PERK (*PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase*, Lee DY and Sugden B, Blood 2008, **figure 39**). PERK est une kinase impliquée dans des mécanismes de contrôle de la bonne conformation des protéines, le système UPR (*Unfolded Protein Response*). eIF2 α phosphorylé active ATF4 (*Activating*

Transcription Factor 4), un autre acteur de ce système UPR. ATF4 a la capacité de se fixer au promoteur pLMP-1 et induire l'expression de LMP-1 (Lee DY and Sugden B, Blood 2008).

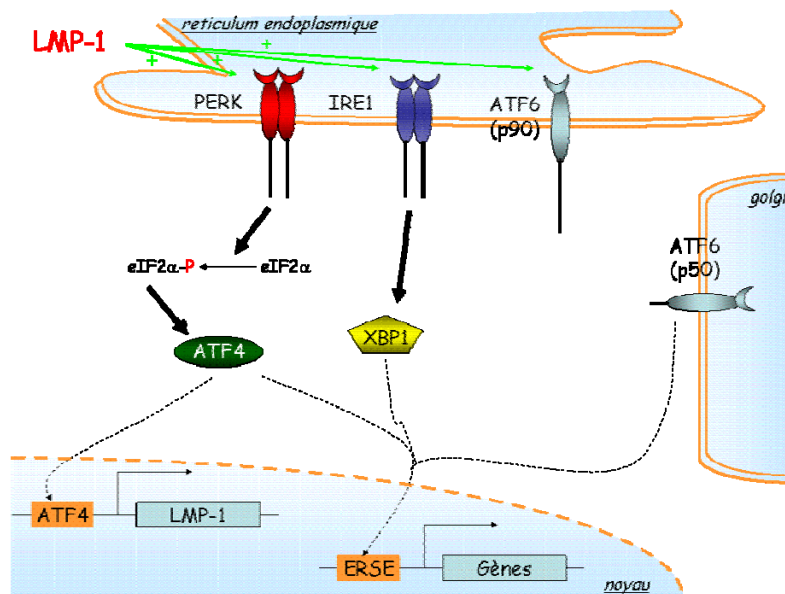


Figure 39 : Activation du système UPR (*Unfolded Protein Response*) par la protéine LMP-1. PERK, IRE1 et ATF6 sont les trois détecteurs du système UPR, en réponse à l'accumulation de protéines mal-conformées, nouvellement synthétisées. PERK induit la phosphorylation d'eIF2α. eIF2α-P active ATF4. IRE1 induit XBP1. ATF6 (p90) subit une maturation protéolytique dans le golgi aboutissant à une forme tronquée ATF6 (p60). ATF4, XBP1 et ATF6 (p60) se fixent à un élément de réponse présent (ERSE) au niveau de promoteurs de gènes impliqués dans la réponse au stress. De hauts d'expression de LMP-1 induisent la phosphorylation d'eIF2α, via PERK. ATF4 peut se fixer au promoteur de LMP-1 et induire son expression. PERK = *PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase*, IRE1 = *Inositol Requirement Enzyme 1*, ATF4/6 = *Activating Transcription Factor 4/6*, XBP1 = *Xbox Binding Protein 1*, eIF2α = *eukaryotic Initiation Factor 2α*, ERSE = *ER Stress response Element*.

V.5.6 : LMP-1 est impliquée dans le processus d'apoptose

Une des propriétés principales de LMP-1 est de protéger les cellules contre l'apoptose en induisant l'expression de molécules anti-apoptotiques (TRAF1, A20, cIAP2). L'expression de ces protéines est sous le contrôle du facteur NFκB (Siegler G et al., *IntJCancer* 2004 ; Laherty CD et al., *JBC* 1992 ; Hong SY et al., *JBC* 2000). Les protéines mitochondriales de la famille Bcl2 sont également la cible de la protéine LMP-1. En effet, LMP-1 augmente le niveau d'expression de Bcl2, Mcl1, Bfl1 (Henderson S et al., *Cell*1991 ; Wang S et al., *CancerRes* 1996 ; D'Souza BN et al., *JVirol* 2004) et réprime l'expression de la molécule pro-apoptotique Bax (Grimm T et al., *Blood* 2005).

A l'inverse, différentes études ont montré que LMP-1 était impliqué dans le processus d'apoptose. LMP-1 potentialise les cellules épithéliales HeLa à l'apoptose induite par le ligand de Fas/CD95 (FasL/CD95L) et par des drogues chimiothérapeutiques telles que l'étoposide et la cisplatine (Zhang X et al., *Virology* 2002 ; Zhang X et al., *IntJCancer* 2005). De plus, LMP-1 est capable d'induire une perturbation de la mitochondrie (relargage du cytochrome c) et l'activation des caspases (Zhang X et al., *IntJCancer* 2005 ; Zhang X et al., *BBRC* 2007). Cependant, LMP-1, lui-même, semble pouvoir induire l'apoptose dans les cellules épithéliales (Nitta T et al., *Virology* 2003). Dans les LCLs, LMP-1 sensibilise les cellules à l'action cytotoxique des lymphocytes T (CTL, *Cytotoxic T Lymphocytes*) en surexprimant le récepteur pro-apoptotique Fas/CD95. Les CTL, qui expriment à leur surface FasL, éliminent les cellules infectées et contrôlent ainsi la prolifération des LCLs (**figure 28**). Cette propriété est en apparence contradiction avec son statut d'oncogène majeur. Cependant, en tant que membre fonctionnel de la famille des TNFR, cette ambivalence "survie/apoptose" de LMP1 n'est pas très surprenante. En effet, elle est partagée par beaucoup de membres de cette famille. Le récepteur Fas/CD95, bien qu'il active la voie NFkB, induit préférentiellement l'apoptose (Peter ME et al., *Cell* 2007). A l'inverse, CD40 induit préférentiellement des signaux de survie cellulaire (Dallman C et al., *Apoptosis* 2003).

Selon le contexte cellulaire, les niveaux d'expression de LMP-1 sont variables d'une cellule à l'autre et résulteraient d'un équilibre dynamique entre ces deux phénomènes (apoptose et survie). Une perturbation de cet équilibre entraînerait l'apoptose des cellules. Ainsi, à des faibles niveaux d'expression de LMP-1, les signaux menant à la survie de la cellule sont insuffisants. A l'inverse, des niveaux d'expression élevée de LMP-1 induisent l'apoptose.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Le virus d'Epstein-Barr est associé à de nombreuses pathologies malignes. La majorité de ces cancers expriment une latence virale de type II (lymphome de Hodgkin, carcinome du rhinopharynx, carcinomes gastriques, lymphomes T,...). La difficulté d'étudier ces pathologies provient du manque de modèles *in vitro* physiologiquement infectés et transformés par l'EBV. C'est dans ce but que l'équipe du Dr Jean Coll (UMR8161 CNRS à l'Institut de Biologie de Lille) a développé des modèles cellulaires d'origine lymphocytaire T (NC5, GrouxH et al., Blood 1997) et d'origine monocytaire (TE1, MasyE et al., JVirol 2002).

Parmi les protéines de latence exprimées, la protéine LMP-1 est essentielle à la survie de ces lignées cellulaires (Masy E et al., JVirol 2002 ; Adriaenssens E et al., Oncogene 2004). Cependant, ces cellules n'expriment pas EBNA-2, le principal transactivateur de LMP-1 dans les LCLs. La problématique de l'équipe est alors de déterminer quel est le transactivateur de LMP-1 dans les latences virales de type II. Nous avons émis l'hypothèse que LMP-1 pouvait réguler sa propre expression.

Ainsi, au cours de la thèse, j'ai participé à la démonstration de l'existence d'une boucle d'autorégulation directe de LMP-1 (**Article 1** : Goormachtigh G, Ouk TS et al., JVirol 2006). Dans cette boucle, LMP1 régule l'activité de son propre promoteur proximal (ED-L1/pLMP-1) *via* les voies de signalisation NFkB et JNK, qui tiennent respectivement les rôles opposés de répresseur et d'activateur. Nous montrons également que cette autorégulation est à la faveur d'une boucle autoactivatrice qui est responsable du maintien de l'expression de LMP1 dans les cellules infectées par EBV, présentant une latence de type II et de type III.

Dans la seconde partie de la thèse, je me suis intéressé au rôle de LMP-1 dans le processus d'apoptose. Il est connu depuis de nombreuses années que LMP-1 a un rôle de protection contre l'apoptose en détournant notamment des voies de signalisation antiapoptotiques, dont la voie NFkB.

Malgré son rôle antiapoptotique, LMP-1 possède des propriétés cytotoxiques (Hammerschmidt W et al., EMBOJ 1989) et est impliqué dans la potentialisation des cellules épithéliales à l'apoptose induite par des agents chimiothérapeutiques (étoposide, cisplatine, Zhang X et al., Virology 2002 ; Zhang X et al., IntJCancer 2005). Il a été ensuite montré que la surexpression de LMP-1 induit l'apoptose de cellules épithéliales par l'intermédiaire de la voie NFkB et de la caspase 3 (Nitta T et al., Virology 2003). Cependant, aucune donnée ne permet de dire si l'activation de la caspase 3 est directement ou indirectement liée à LMP-1.

Aucune étude ne décrit l'implication de LMP-1 dans l'induction de l'apoptose dans les cellules lymphoïdes. Lorsque j'ai démarré ma thèse, le laboratoire d'accueil met en évidence que LMP-1 induit l'expression du récepteur proapoptotique Fas/CD95 via l'induction des voies de signalisation NFkB, p53 et STAT1 dans les LCLs, sensibilisant ces cellules à l'apoptose induite par l'interaction avec des lymphocytes T cytotoxiques (LeClourenec C et al., Blood 2006).

Dans le second article (**Article 2** : LeClourenec C, Ouk TS et al., JVirol 2008), nous démontrons que LMP-1 induit l'apoptose des LCLs via la surexpression et l'autoactivation du récepteur Fas/CD95 et des caspases, indépendamment du ligand FasL/CD95L.

MATERIELS ET METHODES

I – Modèles cellulaires

Dans l'**article 1**, nous avons utilisé la lignée cellulaire épithéliale HEK293 (*Human Embryonic Kidney 293*) et deux lignées lymphoïdes infectées par la souche prototypique B95.8 de l'EBV, PRI (LCLs de latence virale de type III) et TE1 (monocyte de latence virale de type II, Masy E et al., JVirol 2002).

Dans l'**article 2**, nous avons utilisé différentes LCLs (PRI, TSOB, TSOC, 1602, EMICA) ainsi qu'une LCL particulière, les cellules EREB. Les cellules EREB sont des lymphocytes B issus de sang de cordon ombilical infectés par la souche de l'EBV déficiente en EBNA-2, P3HR1 et exprimant de manière conditionnelle EBNA-2. L'expression d'EBNA-2 est placée sous le contrôle du récepteur de l'œstrogène. Ainsi, l'ajout d'œstradiol, analogue de l'œstrogène, induit l'expression d'EBNA-2, restaurant la latence virale de type III (**figure 40**).

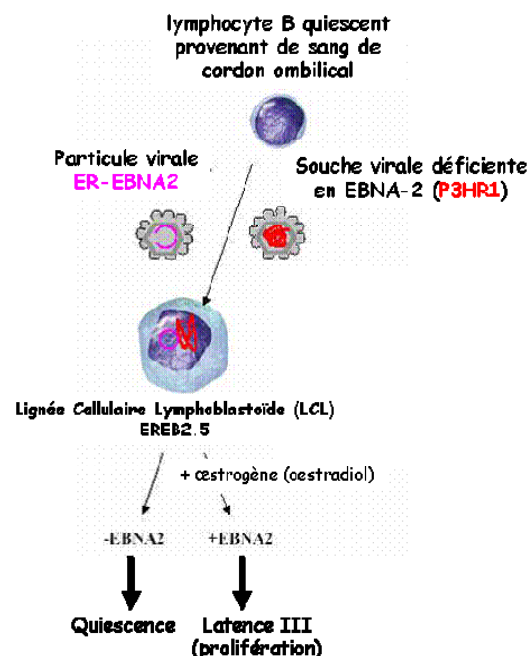


Figure 40 : Représentation schématique de l'obtention des cellules EREB (d'après GW Bornkamm)

II – Vecteur inductible

Les vecteurs épisomiques inductibles ont été développés dans le laboratoire du Pr Georg W. Bornkamm (Bornkamm GW et al., NAR 2005). Le système d'induction de ce vecteur est de type « Tet-On », c'est-à-dire que l'expression des protéines d'intérêt est induite en présence de tétracycline (Gossen M et al., Science 1995).

Ce vecteur possède différentes propriétés (**figure 41**):

- 1- Il possède une résistance à l'hygromycine (**HYGr**) permettant la sélection de ce vecteur dans nos cellules.
- 2- Il se maintient dans la cellule sous forme épisomique grâce à l'expression constitutive de la protéine **EBNA-1** qui va se fixer à l'origine de répllication dérivée de l'EBV, **EBV-OriP**, présente sur ce vecteur.
- 3- Il est inductible par la tétracycline (**Tet**) et son analogue, la doxycycline (ou vibramycine) que nous avons utilisée au cours de nos travaux. La tétracycline se fixe au transactivateur **rtTA** (*reverse tetracyclin TransActivator*), augmentant ainsi l'affinité de rtTA pour l'opéron TetO du promoteur bidirectionnel (**Bi Tet O7**). Le promoteur bidirectionnel permet la transcription simultanée d'un marqueur d'induction (**NGFRt**) et de notre **protéine d'intérêt** (par exemple LMP-1)

Le NGFRt est localisé à la membrane plasmique et est complètement délété de la partie cytoplasmique signalisatrice du NGFR. L'intérêt de ce marqueur d'induction est de pouvoir sélectionner les cellules induites, exprimant donc le NGFRt, soit par tri magnétique, soit par cytométrie en flux.

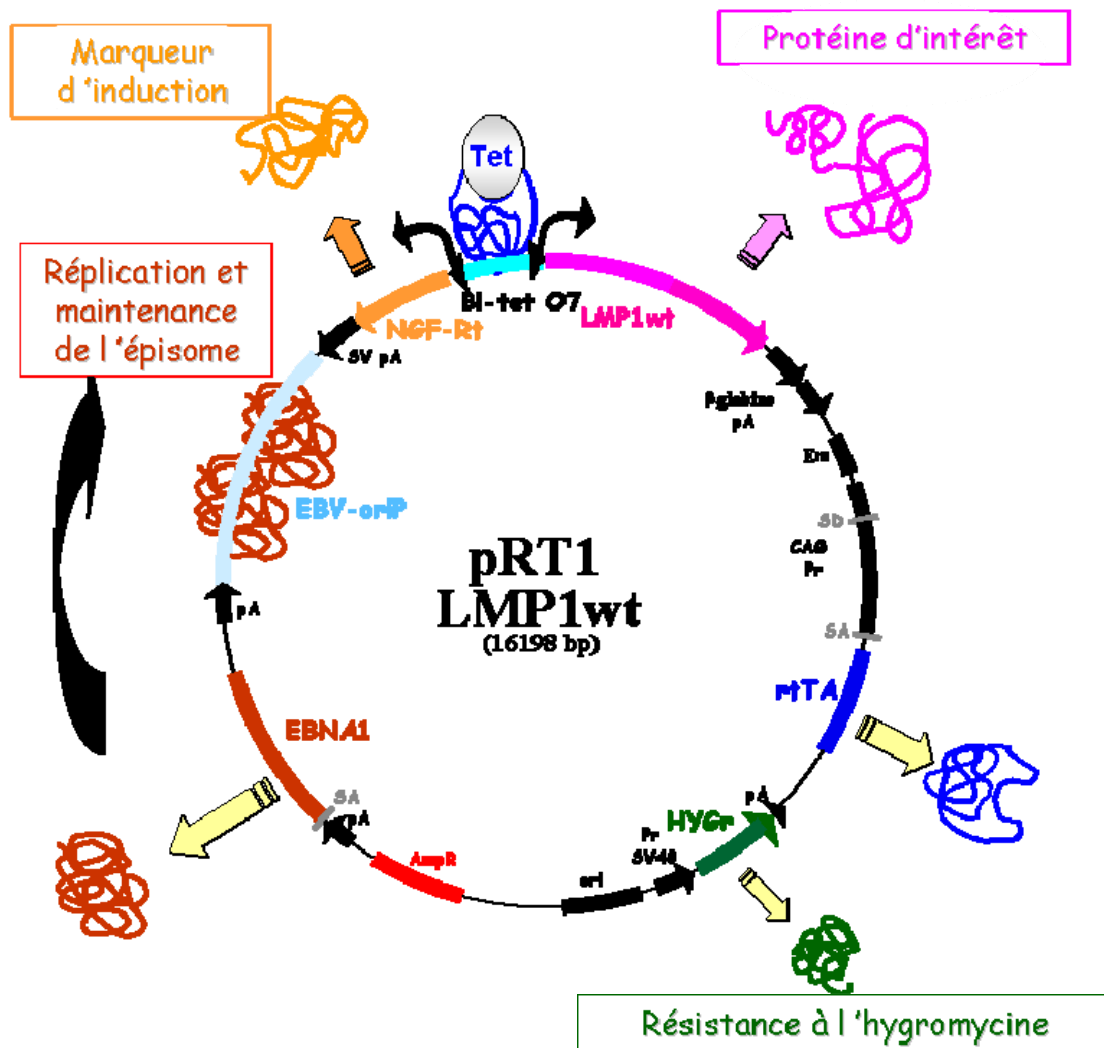


Figure 41 : Représentation schématique du vecteur inducible pRT1-LMP1wt.

III – ADN complémentaires (ADNc) utilisés.

Nous avons utilisé différents ADNc, clonés dans le vecteur précédemment décrit : LMP1wt (LMP-1 sauvage), LMP1CT (dominant négatif de LMP-1, Adriaenssens E et al., Oncogene 2004), IκBm (forme non-phosphorylable d'IκBα, mutée au niveau des Ser32 et Ser36 en Ala, Traenckner EB et al., EMBOJ 1995) et Luc (luciférase, vecteur contrôle).

ARTICLE n°1

Autoactivation of the Epstein-Barr Virus
Oncogenic Protein LMP1 during Type II
Latency through Opposite Roles of the NFkB
and JNK Signaling Pathways

Gautier Goormachtigh, Tan-Sothéa Ouk, Alexandra Mougel, Denis
Tranchand-Bunel, Eric Masy, Christophe Le Clorennec, Jean Feuillard,
Georg W. Bornkamm, Claude Auriault, Evelyne Manet, Véronique Fafeur,
Eric Adriaenssens, and Jean Coll

Journal of Virology August 2006, vol.80 issue 15 pp 7382-7393

PRESENTATION DE L'ARTICLE 1

La majorité des cancers associés à l'EBV (lymphome de Hodgkin, carcinome du rhinopharynx, carcinomes gastriques, lymphomes T,...) est caractérisée par une latence virale de type II. Cependant, en latence II, les cellules n'expriment pas EBNA-2, le principal transactivateur de LMP-1 dans les LCLs. La problématique de cet article est alors de déterminer quel est le transactivateur de LMP-1 dans les latences virales de type II. Nous avons émis l'hypothèse que LMP-1 pouvait réguler sa propre expression. En effet, hors latence III, aucun mécanisme essentiel à l'expression de LMP-1 n'avait été décrit jusqu'à cette étude (à l'exception des études de Ning S et al. en 2005 sur IRF5/IRF7 dans des cellules artificiellement infectées par EBV).

Nous montrons, dans un premier temps, que LMP-1, *via* son domaine CTAR2/TES2, peut induire son promoteur proximal ED-L1/pLMP-1. Dans cette partie réalisée en transfection transitoire dans des cellules HEK 293, nous montrons que LMP1 active ED-L1/pLMP-1 par l'induction de la voie JNK mais aussi, qu'il peut inhiber ce promoteur en activant la voie NFkB. Ces résultats de transactivation sont confirmés par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des voies NFkB et JNK dans des cellules infectées par EBV (de latence II, TE1 et de latence III, PRI). Enfin grâce à un système de vecteur stable inductible (**figure 41** de la partie « Matériels »), nous avons montré que le Dominant Négatif (DN) de LMP-1, LMP-1CT, (détaillé ci-dessous) bloque correctement l'expression des gènes cibles de LMP-1, dont lui-même.

Je vais vous présenter les principales caractéristiques fonctionnelles du DN LMP-1CT (**figure 42**). Ce DN est constitué de la partie C-Terminale de LMP-1 fusionnée en aval de la protéine fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*, Adriaenssens E et al., *Oncogene* 2006). Il a été montré que LMP-1CT est localisé dans le cytoplasme et que sa surexpression n'induit pas la signalisation de LMP-1 malgré la présence des deux domaines CTAR1/TES1 et CTAR2/TES2.

LMP1-CT inhibe de façon dose dépendante la signalisation JNK et NFκB induite par une surexpression de LMP-1, qui se traduit par l'inhibition de l'expression d'un gène-cible endogène de LMP-1, ICAM1/CD54. Des expériences de coimmunoprécipitation et de microscopie confocale ont permis de montrer que LMP-1CT inhibe la signalisation de LMP-1 en séquestrant les adaptateurs TRAF2, TRADD dans le cytosol. L'activité de DN de LMP-1CT est étendue à d'autres récepteurs de la famille des récepteurs au TNFα (TNFR1, IL1R) qui utilisent ces mêmes adaptateurs.

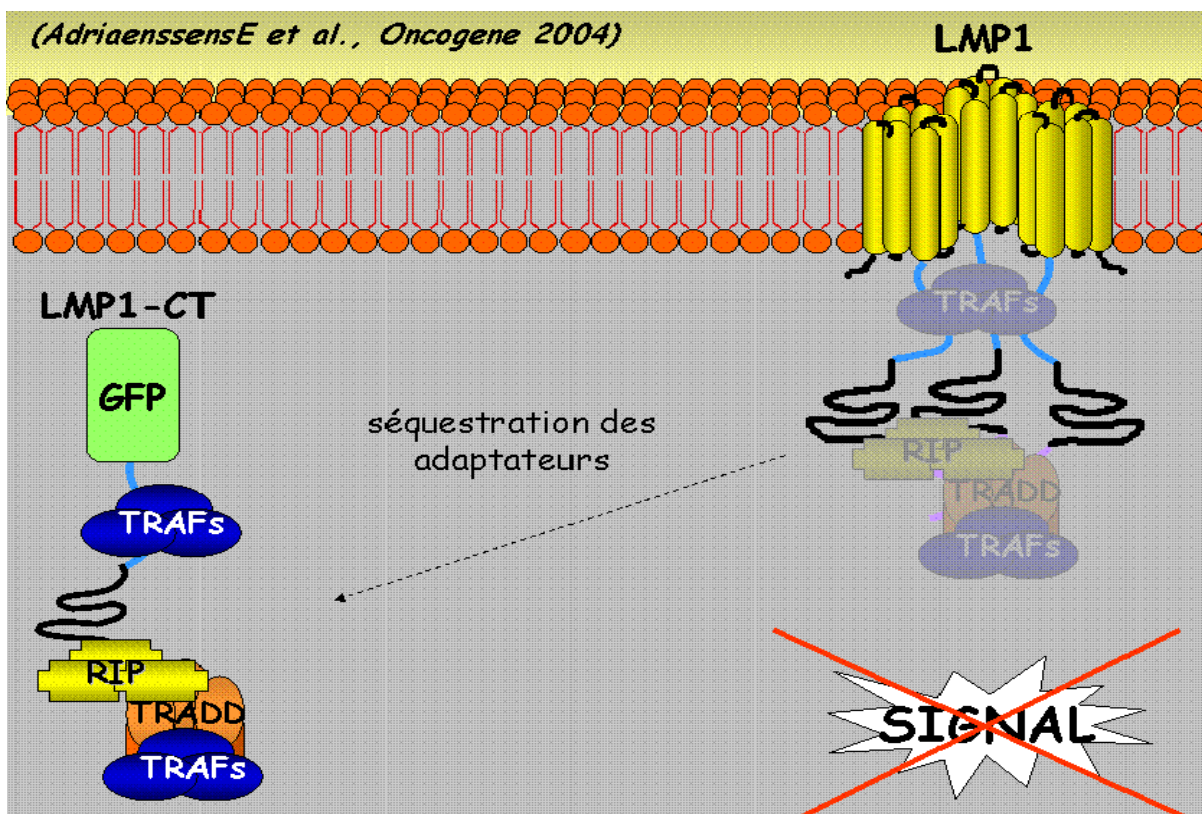


Figure 42 : Modèle d'action du dominant négatif LMP-1CT.

ARTICLE n°2

Molecular Basis of Cytotoxicity of Epstein-Barr
Virus (EBV) Latent Membrane Protein 1 (LMP1) in
EBV Latency III B Cells :
LMP1 Induces Type II Ligand-Independent
Autoactivation of CD95/Fas with Caspase 8-
Mediated Apoptosis

Christophe Le Clorennec,† Tan-Sothéa Ouk,† Ibtissam Youlyouz-Marfak,
Stéphanie Panteix, Catherine-Claude Martin, Julia Rastelli, Eric
Adriaenssens, Ursula Zimmer-Strobl, Jean Coll, Jean Feuillard, and
Chantal Jayat-Vignoles

† = these authors contributed equally to this study

Journal of Virology July 2006, vol.82 issue 13 pp 6721-6733

PRESENTATION DE L'ARTICLE 2

Dans cet article, nous nous intéressons au phénomène de cytotoxicité cellulaire induite par la surexpression de la protéine LMP-1. Bien que ses propriétés cytotoxiques soient connues depuis de nombreuses années, peu de données sont disponibles sur les mécanismes moléculaires induits par LMP-1 pour induire l'apoptose dans les LCLs. Suite à des travaux initiés par LeClourenec et al. en 2006, nous avons voulu décrire les mécanismes moléculaires de la cytotoxicité de LMP-1 et déterminer le rôle du récepteur proapoptotique Fas/CD95 dans les LCLs.

Dans un premier temps, nous montrons que l'expression de LMP-1 est parfaitement corrélée à celle du récepteur Fas/CD95. Ensuite, nous observons que le niveau d'apoptose « spontanée » diffère d'une LCL à l'autre, en rapport avec les niveaux moyens d'expression de LMP-1 et Fas/CD95. Afin de décrire les mécanismes moléculaires de cette apoptose « spontanée », nous avons stablement transfecté les LCLs, qui présentent le plus bas niveau d'apoptose (PRI, EMICA, 1602), avec le vecteur épisomique inductible à la doxycycline pRT1-LMP-1wt (vecteur d'intérêt) ou le vecteur pRT1-Luciférase (vecteur contrôle). Ainsi, nous montrons que LMP-1 est bien responsable de l'apoptose des LCLs.

Puis, à l'aide de siRNAs dirigés contre l'ARNm codant la protéine Fas/CD95, nous mettons en évidence que Fas/CD95, gène-cible de LMP-1, est un acteur essentiel dans l'apoptose induite par LMP-1. Enfin, nous démontrons que LMP-1 induit l'autoactivation, indépendante de son ligand, du récepteur Fas/CD95, et des caspases, menant à l'apoptose des LCLs.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Nuclear integrity according to LMP1 expression level. Analysis were performed using the ImageStream® Imaging Flow Cytometer (Amnis, Seattle, USA), on TSOB and PRI LCLs. Cells were incubated with LMP1 antibodies (clone CS 1-4, DakoCytomation) revealed by an AlexaFluor-488 goat anti-mouse secondary antibody (Invitrogen, France) and with DRAQ5, as a nuclear marker (Coger, France). **(A)** The bivariate plot of LMP1 fluorescence intensity vs. cell area (darkfield, SSC) on TSOB cells was used to determine four increasing expression levels for LMP1 : low, intermediary low, intermediary high and high (Top panel). Cell aggregates and doublets were removed from analysis thanks to the bivariate plot of DRAQ5 intensity vs. cell area (brightfield, BF). The technology allowed the simultaneous acquisition of an image for each cell according to darkfield (SSC), Brightfield (BF), LMP1-A488 and DRAQ5 fluorescences (bottom panel). DRAQ5 staining was used to define nuclear shape by counting the number of lobes in a cell (determined based on the maxima of weighted symmetry features). One lobe means circular nucleus whereas four lobes represent cells with the more fragmented nuclei. **(B)** Nuclear integrity was defined as the ratio of (lobe 1 plus lobe 2) to (lobe 3 plus lobe 4) on TSOB (left panel) and PRI cells (right panel). Cells with intermediate intensities of LMP1 expression showed higher ratio due to the oncogenic property of LMP1, whereas highest LMP1 intensities led to apoptosis and nuclear fragmentation.

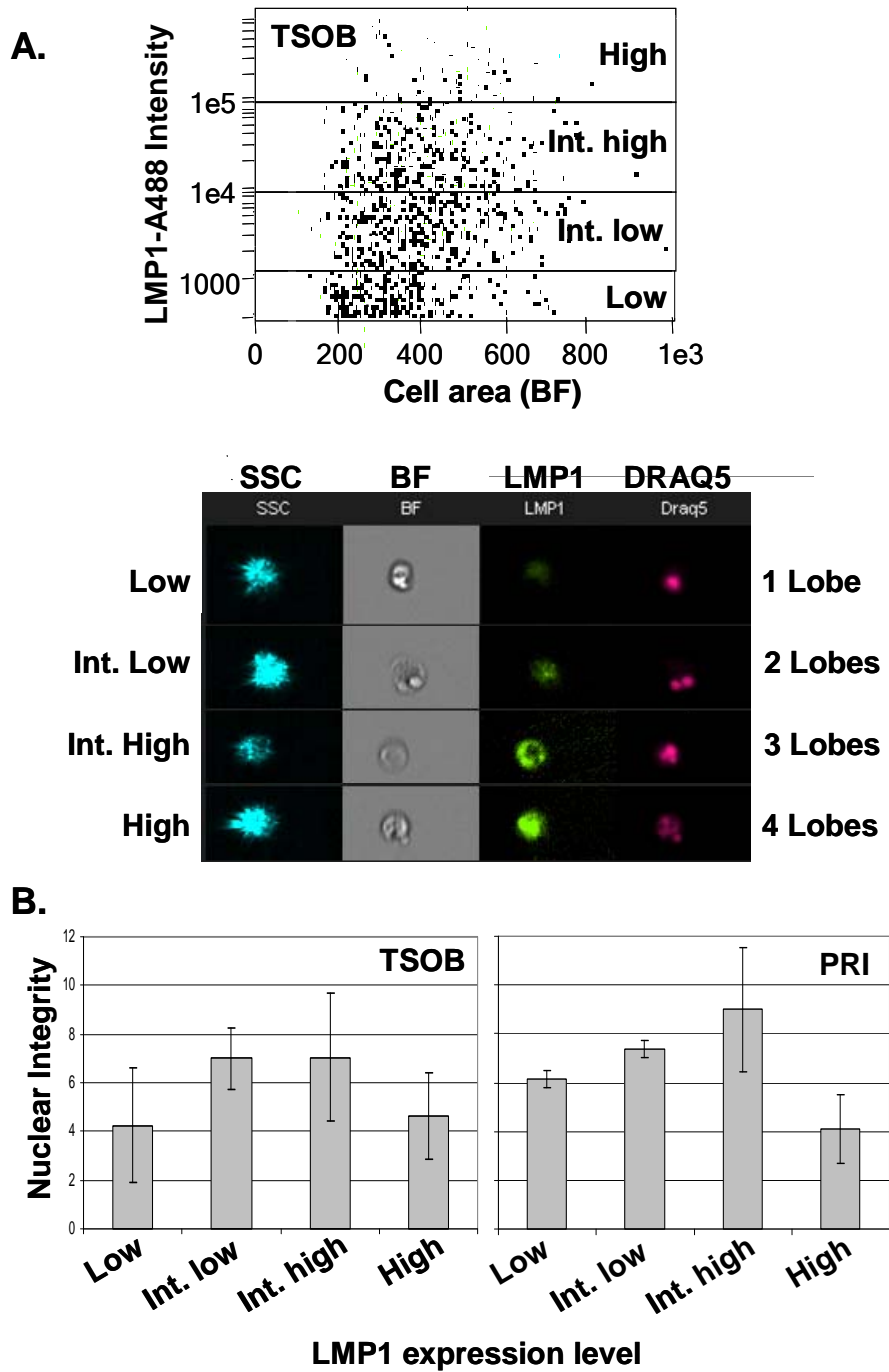


Figure 43 : Intégrité nucléaire en fonction de l'expression de LMP-1 dans les LCLs TSOB et PRI

Commentaires du « *Supplemental Material* »

Grâce à une nouvelle technique d'imagerie en flux (Image Stream® de la société AMNIS Corporation), nous mettons en évidence qu'au sein d'une même population cellulaire, nous observons une hétérogénéité d'expression de LMP-1 à des niveaux différents (**figure 43A**, bas

niveau, niveau intermédiaire et haut niveau). Nous corrélons ces différents niveaux d'expression avec le nombre de lobes nucléaires par le marquage des noyaux par un colorant vital, le DRAQ5. Lorsque les cellules possèdent 1 ou 2 lobes, les cellules sont intègres, tandis que les cellules qui possèdent 3 ou 4 lobes sont en cours d'apoptose (**figure 43B**). Afin de corréler l'intégrité nucléaire au niveau d'expression de LMP-1 (**figure 43C**), nous effectuons le rapport entre le nombre de cellules possédant 1 ou 2 lobes (noyaux intègres) sur le nombre de cellules possédant 3 ou 4 lobes (noyaux apoptotiques) pour chaque niveau d'expression de LMP-1 (Bas, Intermédiaire bas, Intermédiaire haut, Haut). Nous observons alors que les cellules (TSOB ou PRI), exprimant soit de bas niveaux (*Low*) ou de hauts niveaux (*High*) d'expression de LMP-1, ont une intégrité nucléaire faible ($\text{lobe}_{3+4} \gg \text{lobe}_{1+2}$), signifiant que ces cellules sont en cours d'apoptose. A l'inverse, les cellules, exprimant des niveaux d'expression intermédiaires (*Intermediate Low* et *Intermediate High*) d'expression de LMP-1, ont une intégrité nucléaire plus élevée ($\text{lobe}_{1+2} \gg \text{lobe}_{3+4}$) et sont intègres.

Ce résultat nous donne une indication sur l'influence du niveau d'expression de LMP-1 sur la viabilité cellulaire.

DISCUSSION GENERALE

Dans l'article 1, nous démontrons que LMP-1 régule son propre promoteur grâce à une balance impliquant les voies de signalisation NFkB (répresseur) et JNK (activateur). Cependant, peu de données sont disponibles sur l'effet répresseur de NFkB dans la transactivation du promoteur ED-L1/pLMP-1. Ainsi, nous discuterons des mécanismes possibles de l'effet inhibiteur de NFkB sur l'expression de LMP-1 et nous replacerons nos résultats dans le contexte de la latence virale.

Ensuite dans la deuxième partie de ma thèse, je me suis intéressé aux mécanismes moléculaires de l'apoptose induite par LMP-1 dans les LCLs. Nous démontrons que LMP-1 induit l'autoactivation du récepteur proapoptotique Fas/CD95 (indépendamment de son ligand FasL/CD95L). De plus, LMP-1 induit le recrutement du complexe DISC au niveau de Fas/CD95 à l'origine de l'activation de l'apoptose mitochondriale intrinsèque, caractéristique d'une apoptose de type II. L'étude de la littérature conduit à formuler diverses hypothèses quant à l'induction paradoxale de l'apoptose par LMP-1. Nous en examinerons successivement quelques-unes comme le stress du RE, le rôle des facteurs NFkB, p53 dans l'apoptose dépendante de Fas/CD95 puis des mécanismes qui déclencheraient l'autoactivation de ce récepteur. Nous discuterons également de la régulation et l'implication des autres récepteurs de mort (TNFR1, DR4 et DR5) dans nos LCLs, ainsi que de cFLIP-L, régulateur négatif de la procaspase 8.

I - Régulation de l'expression de LMP-1

LMP-1 représente l'oncogène majeur de l'EBV des cellules présentant une latence virale de type II et III. L'utilisation d'ARN antisens dirigés contre LMP-1 ou l'utilisation de dominants négatifs confirment le rôle essentiel de cette protéine dans la survie des cellules infectées par l'EBV. De plus, la majorité des pathologies associées à l'EBV présentent une latence II. Ainsi, il est important de comprendre comment est régulée l'expression de LMP-1.

Comme mentionné en section V.1.1, le promoteur ED-L1/pLMP1 possède des sites de fixation de facteurs de transcription (Sp1, ATF2 et CREB1) qui sont des cibles potentielles de la voie JNK (Chuang JY et al., MCB 2008 ; Bailey J et al., JMolEndocrinol 2005 ; Lee RJ et al., JBC 1999). La répression transcriptionnelle par RelA/p65 peut se faire par le recrutement d'un complexe répresseur incluant les HDACs. Ce mode de répression est démontré pour la protéine proapoptotique Bax qui est réprimée par LMP-1 via p65/p50 (Grimm T et al., Blood 2005). De plus, l'utilisation d'un inhibiteur des HDACs, la trichostatinA (TSA), induit la surexpression de LMP-1, confirmant que les HDACs représentent un mode de répression de l'expression de LMP-1 (Nishikawa J et al., Virus Genes 2004 ; Park JH et al., Virology 2002). Cette hypothèse suppose la fixation de RelA/p65 sur le promoteur de LMP-1. Une étude par la technique de retard sur gel nous permettrait de savoir si les sous-unités de NFkB se fixent ou non sur le promoteur de LMP-1. Ensuite, des expériences complémentaires d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP, *Chromatin ImmunoPrecipitation*) nous permettraient d'analyser les interactions de RelA/p65 avec des molécules impliquées dans la répression transcriptionnelle, dont SMRT. En effet, il a été décrit que RelA/p65 interagit avec SMRT, qui recrute les HDACs (Lee SK et al., JBC 2000). Cependant, aucun site de fixation de NFkB n'est référencé sur le promoteur ED-L1/pLMP-1, suggérant que la répression médiée par NFkB se fait par un mécanisme indirect.

De nombreux travaux ont mis en évidence que les voies NFkB et JNK sont antagonistes grâce à l'induction par NFkB de protéines qui inhibent la signalisation de JNK (Papa S et al., JCellSci 2004) : GADD45 β (*Growth Arrest and DNA Damage 45 β*), Thioredoxin, MnSOD (*Manganese SuperOxideDismutase*). Cependant, nous n'avons pas observé de modification de l'activation de la voie JNK, après inhibition de la voie NFkB, suggérant que ce mode de régulation n'intervient pas dans notre modèle (Goormachtigh G et al., non-publié).

En latence III, le principal transactivateur viral de LMP-1 est EBNA-2. Avant notre étude, aucun autre mode de régulation n'a été décrit (hormis l'étude de Ning S et al. en 2005 sur IRF7). Nous

montrons que LMP-1 régule sa propre expression aussi bien dans les latences II et III. Nous pourrions émettre l'hypothèse que, lors du passage de latence III en latence II, l'expression de LMP-1 serait autorégulée *via* les voies de signalisation NFκB et JNK. La balance entre ces deux voies permettrait de maintenir LMP-1 à un certain niveau d'expression favorable à la survie cellulaire. Certains facteurs cellulaires induits par LMP-1, tel que l'IL10 (Kis LL et al., Blood 2005), induisent l'expression de LMP-1 en absence d'EBNA-2. Ainsi, l'IL10 participerait à une boucle d'autorégulation, permettant à LMP-1 de se maintenir de manière autonome dans les latences II.

II - Rôle du stress du reticulum endoplasmique dans l'apoptose induite par LMP-1 ?

Comme mentionné en section V.5.6, les propriétés cytotoxiques et cytostatiques de LMP-1 ont lieu lorsque cette protéine est exprimée à de hauts niveaux d'expression, lesquels sont corrélés à la phosphorylation d'eIF2α (eIF2α-P, Lam N et al., JVirol 2004). eIF2α est phosphorylé par LMP-1 via la protéine kinase PERK (Lee DY and Sugden B, Blood 2008). La kinase PERK (*Pancreatic Endoplasmic Reticulum Kinase*) représente, avec IRE1 (*Inositol-Required Enzyme 1*) et ATF6 (*Activating Factor Factor 6*), un des composants du système UPR (*Unfolded Protein Response*) présent au niveau du reticulum endoplasmique (RE). Ce système permet de contrôler la conformation des protéines nouvellement synthétisées. Lorsque les capacités de ce système à restaurer la conformation des protéines sont altérées, il y a une accumulation et une agrégation de protéines mal-conformées, générant un stress du RE, qui se traduit par l'induction de l'apoptose. L'apoptose induite par le stress du RE (**figure 44**) fait intervenir notamment la protéine CHOP (*C/EBP HOmologous Protein*) et la voie JNK.

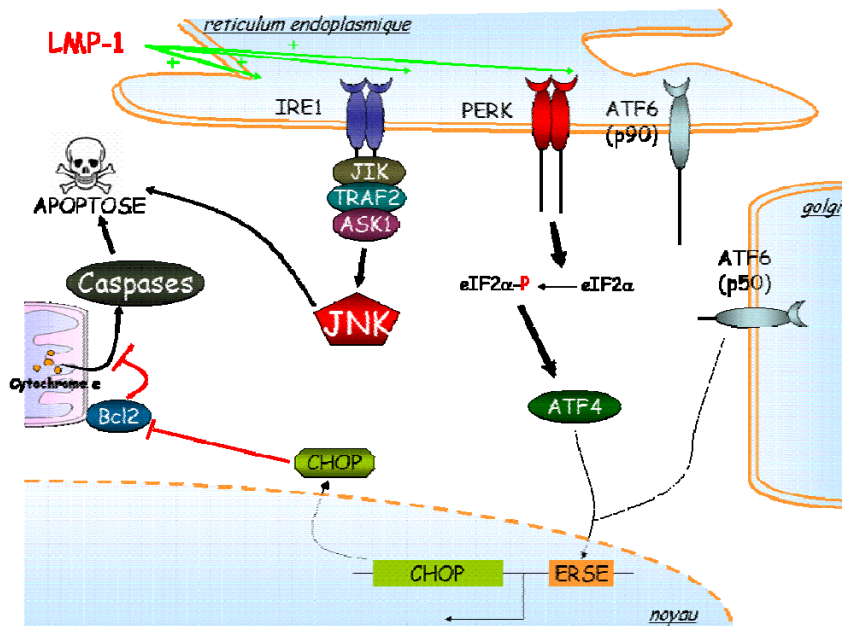


Figure 44 : Représentation schématique de l'apoptose induite par le stress du RE. Suite à un stress du RE intense, la kinase PERK induit la phosphorylation d'eIF2 α puis active ATF4. ATF4, en collaboration avec ATF6, induit la transcription de CHOP, qui inhibe Bcl2, levant l'inhibition de l'activation des caspases par le cytochrome c. De plus, JIK se fixe à IRE1 et fait le pont entre IRE1 et TRAF2. TRAF2 recrute alors ASK1, activant la voie JNK et l'apoptose. Il a été montré que de hauts niveaux d'expression de LMP-1 active le système UPR (LeeDY and SugdenB, Blood2008). *IRE1 = Inositol-Required Enzyme 1, PERK = Pancreatic Endoplasmic Reticulum Kinase, ATF4/6 = Activating Transcription Factor 4/6, eIF2 α = eukaryotic Initiation Factor 2 α , ERSE = Endoplasmic Reticulum Stress response Element, CHOP = C/EBP HOMologous Protein, JNK = cJun NH₂ Kinase, JIK = JNK Inhibitory Kinase, TRAF2 = TNFR-Associated Factor 2, ASK1 = Apoptosis Signal-regulating Kinase1.*

La protéine CHOP inhibe l'action de Bcl2 et sensibiliserait les cellules à l'action de Bax et Bid, permettant le relargage du cytochrome c de la mitochondrie. Ensuite, en réponse à un stress intense du RE, la MAP kinase ASK1 (*Apoptosis Signal regulating Kinase1*) peut être activée par IRE1 par l'intermédiaire de TRAF2. ASK1 est également connu pour activer la voie JNK et l'apoptose lors d'un stress oxydatif (Matsukawa J et al., JBiochem 2004).

Outre l'EBV, la capacité d'activer le système UPR est partagée par d'autres herpèsvirus tels que le CMV ou l'HSV1 (Lee DY et al., JVirol 2008).

L'apoptose du stress du RE peut être une réponse non-spécifique, indépendamment de LMP-1, suite à la surexpression de protéines au niveau intracellulaire. Au cours de notre étude, nous avons utilisé un vecteur de contrôle dans lequel l'ADNc codant LMP-1 est remplacé par celui de la luciférase. Nous montrons qu'il n'y a pas d'induction de l'apoptose, suggérant d'une part que LMP-

Il est bien responsable de l'apoptose et d'autre part que la réponse apoptotique suite au stress du RE non-spécifique (surexpression du NGFRt et de la luciférase) n'intervient pas dans notre modèle.

L'apoptose du stress du RE peut être une réponse spécifique dépendante de LMP-1, soit directement (Lee DY and Sugden B, Blood 2008), soit indirectement via l'induction de protéines qui activeraient le système UPR. Dans notre étude, la surexpression de LMP-1, à des niveaux supérieurs à ceux obtenus par l'équipe de Bill Sugden (Sandberg ML et al., JVirol 2002 ; Lee DY and Sugden B, Blood 2008), pourrait activer le système UPR et le stress du RE, sensibilisant les cellules à l'apoptose. Cette hypothèse pourrait être testée en vérifiant l'expression des protéines-clé de cette apoptose, CHOP et ASK1. Ensuite, il serait intéressant de vérifier, par ARN interférence, l'implication d'IRE1. Si cette hypothèse est juste, quelle est l'importance de ce stress issu du RE dans la dynamique de l'apoptose induite par LMP-1 ? Le stress du RE précéderait-il l'activation du DISC dépendant de Fas/CD95 ? Quelle serait la part relative du stress du RE dans le relargage du cytochrome c par rapport aux signaux venant de Fas/CD95 ?

III - Rôle de NFkB dans l'apoptose induite par LMP-1 ?

Le facteur NFkB est surtout associé à l'inhibition de la mort cellulaire programmée, représentant un processus important dans l'homéostasie cellulaire (voir section V.4.1.1). La surexpression de Bcl2 peut protéger les cellules de l'apoptose dans les cellules déficientes en RelA/p65 (RelA^{-/-}), impliquant que les effets antiapoptotiques de RelA/p65 passent par l'expression de protéines antiapoptotiques telles que TRAF1, A20, cFLIP ou les cIAPs.

Cependant, NFkB est également décrit dans le processus d'apoptose. En effet, RelA/p65 joue un rôle important dans l'apoptose induite par p53 (Ryan KM et al., Nature 2000). NFkB induit ou contribue à l'apoptose par différents mécanismes moléculaires.

NFkB induit l'apoptose en induisant l'expression de gènes proapoptotiques. Selon le type cellulaire et le stimulus, NFkB induit l'expression de gènes proapoptotiques tels que les récepteurs

de mort (Fas/CD95, DR4, DR5, DR6), leurs ligands (FasL/CD95L, TRAIL), les récepteurs négatifs de la mitochondrie (Bax, BclxS) et p53 (Radhakrishnan SK and Kamalakaran S, BBA 2006).

NFkB réprime l'expression de gènes antiapoptotiques tels que BclxL et TRAF1 (Campbell KJ et al., MolCell 2004 ; Pöppelmann B et al., JBC 2005). NFkB peut accroître la mort cellulaire par la régulation positive du suppresseur de tumeur CYLD (*CYLinDromatosis*) qui agit comme une déubiquitinase en enlevant les chaînes d'ubiquitine en Lys₆₃ (ubiquitine activatrice) de TRAF2, de TRAF6 et NEMO, menant au désassemblage du complexe IKK et au rétrocontrôle de NFkB (Brummelkamp TR et al, Nature 2003 ; Jono H et al., JBC 2004). CYLD promeut la déubiquitination du facteur de transcription Bcl3 (membre de la famille des IκB), qui favorise la prolifération cellulaire et la croissance tumorale (Ikeda F and Dikic I, Cell 2006). Bcl3 peut être régulée négativement par p53, favorisant l'association de p52 et l'HDAC1, réprimant l'expression de gènes antiapoptotiques (Rocha S et al., MCB 2003b).

Dans des cellules épithéliales, le rôle de NFkB dans l'apoptose induite par LMP-1 est clairement montré grâce à l'utilisation de dominants négatifs de la voie NFkB (Nitta T et al., CellSignal 2003). De plus, une autre équipe montre que la voie NFkB (et la voie JNK) est impliquée dans la potentialisation de l'apoptose induite par une drogue chimiothérapeutique (Zhang X et al., BBRC 2007).

Cependant, quel est le déterminant moléculaire qui, suite à l'activation de la voie NFkB, orienterait la cellule vers la survie ou l'apoptose ?

Une étude originale de l'équipe d'Alain Israël montre que le niveau de l'activité NFkB doit être régulé pour assurer la survie des lymphocytes B et T (Goudeau B et al., PNAS 2003). Ainsi, trop peu ou trop d'activité NFkB induit l'apoptose. Les lymphocytes B des souris déficientes en IκBα/IκBε, qui présentent une activité NFkB intense grâce à l'accumulation nucléaire des sous-unités de NFkB meurent également par apoptose. Ce travail met en avant le rôle essentiel joué par les protéines de la famille IκB, qui régulent l'activation de la voie NFkB en maintenant dans le

cytoplasme les sous-unités Rel/NFκB. Mais cet article ne nous permet pas de dire que NFκB induit l'apoptose par régulation transcriptionnelle.

Il est possible que les voies canoniques et non-canoniques de NFκB ne jouent pas le même rôle. Une étude des différentes sous-unités Rel/NFκB nous permettrait de déterminer le rôle de chacune de ces sous-unités dans l'apoptose. Quelles sont les sous-unités Rel/NFκB impliquées dans l'induction de gènes antiapoptotiques ou de gènes proapoptotiques ? Comment ces sous-unités sont-elles régulées par LMP-1 ? En effet, il a été démontré que RelA/p65 peut protéger les cellules contre l'apoptose mais également induire l'expression de gènes proapoptotiques dont Fas/CD95 (Kucharczak J et al., *Oncogene* 2003). cRel peut sensibiliser les cellules à l'apoptose en induisant l'expression du gène proapoptotique BclxS, qui inhibe l'action de Bcl2 (Chen X et al., *CancerRes* 2003). Un résultat surprenant montre que p100 (précurseur de la sous-unité p52) sensibilise les cellules à l'apoptose induite par le TNFα (Wang Y et al., *NatCellBiol* 2002 ; Häcker H and Karin M, *CancerCell* 2002). p100 possède un domaine de mort DD (**figure 5**) essentiel à l'induction de l'apoptose. Le recrutement de p100, au niveau des DISC des récepteurs TNFR1 et Fas/CD95, aboutit à l'activation de la caspase 8 suivie de l'apoptose.

Ainsi, dans notre modèle, des expériences d'interférence de l'ARN dirigé contre p100 nous permettraient de déterminer le rôle de p100 dans l'apoptose induite par LMP-1.

IV - Rôle de p53 dans l'apoptose induite par LMP-1 ?

Le suppresseur de tumeur p53 est impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire et dans l'apoptose (Slee EA et al., *Oncogene* 2004). Lors de dommages liés à l'ADN, p53 induit l'arrêt de la croissance cellulaire en surexprimant l'inhibiteur du cycle p21^{waf1} (elDeiry WS et al., *Cell* 1993). Si les dommages de l'ADN sont trop importants, p53 induit la processus d'apoptose en régulant positivement l'expression de gènes pro-apoptotiques tels que Bax (Miyashita T and Reed JC, *Cell* 1995), et les récepteurs de mort Fas/CD95 (Muller M et al., *JExpMed* 1998), DR5 (Wu GS et al.,

NatGenet 1997). De plus, p53 est capable d'inhiber l'expression de gènes anti-apoptotiques tels que Bcl2 (Haldar S et al., CancerRes 1994). Comme mentionné dans la section précédente, un des acteurs majeurs de l'apoptose induite p53 est le facteur NFkB. En effet, en absence de la sous-unité RelA/p65, p53 n'est plus capable d'induire l'apoptose (Ryan KM et al., Nature 2000).

Deux hypothèses expliqueraient le rôle de p53 dans l'apoptose induite par LMP-1. D'une part, la phosphorylation activatrice de p53 induite par LMP-1 pourrait entraîner l'expression de protéines proapoptotiques. D'autre part, des dommages irréversibles de l'ADN, causés par l'expression de LMP-1, pourraient être à l'origine d'une activation de p53, contribuant de manière indirecte à la sensibilisation des LCLs à l'apoptose.

LMP-1 induit la phosphorylation de p53 en Ser15 par l'intermédiaire de la voie NFkB, menant à l'induction de Fas/CD95 (Dirmeier U et al., Oncogene 2005 ; LeClourenec C et al., Blood 2006). D'autres protéines proapoptotiques, telles que Bax, PUMA et NOXA, pourraient être induites par p53 pour bloquer l'activité antiapoptotique de Bcl2 et de BclxL, sensibilisant les cellules à l'apoptose. De plus, il a été montré que LMP-1 peut induire l'expression de p53 via l'oncogène cMyc (Kirch HC et al., Oncogene 1999 ; Dirmeier U et al., Oncogene 2005), contribuant à l'expression de gènes pro-apoptotiques par p53.

Lors de dommages irréversibles de l'ADN, le système ATM/ATR est activé. ATM/ATR active p53, qui induit l'expression de protéines proapoptotiques. LMP-1 pourrait entraîner des dommages de l'ADN par l'intermédiaire de radicaux nitrés NO (*Nitric Oxide*) grâce à l'induction de la iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthase*, YuJS et al., Oncogene 2002). Mais nous n'avons pas retrouvé ce résultat dans nos cellules, suggérant que la voie ATM/ATR ne serait pas à l'origine de l'apoptose induite par p53.

Néanmoins, il existe un mécanisme de rétro-contrôle qui inhibe l'apoptose induite par p53. En effet, LMP-1 induit l'expression de la protéine A20 via la voie NFkB (Fries KL et al., JVirol

1996). Nous montrons que LMP-1 induit la transcription d'A20, suggérant que l'apoptose induite par p53 serait limitée dans notre modèle.

Des expériences d'inactivation protéique de p53 par des siRNA permettraient de déterminer le rôle de cette protéine dans l'apoptose induite par LMP-1.

V - Implication du récepteur Fas/CD95

Diverses études ont montré, dans les LCLs, une surexpression du récepteur Fas/CD95 (Falk MH et al., Blood 1992 ; Durandy A et al., EurJImmunol 1997 ; LeClourenec C et al., Blood 2006). L'expression de Fas/CD95 sensibilise les cellules à l'apoptose induite par un anticorps agoniste de ce récepteur (Falk MH et al., Blood 1992 ; Durandy A et al., EurJImmunol 1997). De plus, les lymphocytes T, qui expriment à leur surface le ligand FasL/CD95L, induisent l'apoptose par une interaction CD95/CD95L, limitant ainsi la prolifération des LCLs *in vitro* (Wilson AD et al., IntImmunol 1998 ; LeClourenec C et al., Blood 2006). Il a été montré que l'expression de Fas/CD95 est gouvernée par l'activation du CD40 après fixation de son ligand CD40L (Schattner EJ et al., JExpMed 1995 ; Hennino A et al., JImmunol 2000), sensibilisant les cellules à l'apoptose dépendante de Fas/CD95 et des caspases. Dans les LCLs, LMP-1 induit l'expression de Fas/CD95, par l'intermédiaire de la voie NFkB (Henriquez NV et al., JImmunol 1999 ; LeClourenec C et al., Blood 2006).

Il est admis depuis quelques années que le récepteur Fas/CD95 peut être présent au niveau cellulaire sous forme de trimères en absence de la fixation de son ligand (Papoff G et al., JBC 1999 ; Siegel RM et al., Science 2000). L'apoptose peut être induite en absence de FasL/CD95L (Gajate C et al., IntJCancer 2000a ; Micheau O et al., JBC 1999), après traitement par des drogues chimiothérapeutiques. De plus, à l'aide de chimères fusionnant la caspase 8 à la partie transmembranaire du CD8, il a été montré que l'oligomérisation de la procaspase 8 semble suffisante à son autoactivation (Muzio M et al., JBC 1998 ; Martin DA et al., JBC 1998).

Au cours de notre étude, nous montrons que LMP-1 induit une augmentation du marquage du CTB (*Cholera Toxin subunitB*) qui se fixe aux gangliomannosides de type I (GM1), suggérant la synthèse des radeaux lipidiques par LMP-1. Nous montrons également que Fas/CD95 est localisée dans les radeaux lipidiques, menant à l'autoactivation de Fas/CD95, indépendante de son ligand, résultant à l'activation de la caspase 8 et au clivage de Bid en Bid tronqué (tBid), caractéristique de l'apoptose de type II. Cependant, quels sont les signaux intracellulaires menant à l'activation de Fas/CD95 et du DISC ?

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer comment Fas/CD95 pouvait être relocalisé et agrégé dans les radeaux lipidiques après induction de LMP-1. Le modèle proposé par l'équipe d'Erich Gulbins (**figure 45**) implique que la fixation de FasL/CD95L sur son récepteur active l'externalisation à la membrane des sphingomyélinases acides (ASM, *Acid SphingoMyelinase*), permettant la production de sphingolipides appelés céramides, constituants des radeaux lipidiques et l'agrégation du récepteur (Grassme H et al., *Oncogene* 2003).

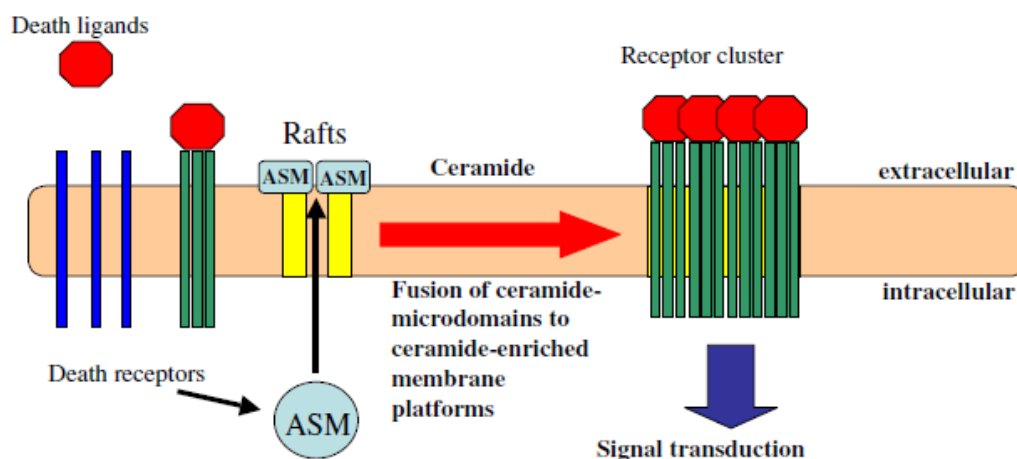


Figure 45 : Représentation schématique du mécanisme d'agrégation de Fas/CD95 dans les radeaux lipidiques. (d'après Carpinteiro A et al., *CancerLett* 2008)

A l'aide de substrats de l'ASM, nous avons mesuré son activité enzymatique après induction de LMP-1. Malheureusement, aucune augmentation de l'activité enzymatique n'a été détectée, suggérant que l'agrégation de Fas/CD95 est indépendante de l'action de l'ASM et des céramides (résultats non-publiés).

Après induction de LMP-1, nous observons par microscopie confocale la formation de patches de radeaux lipidiques au niveau des membranes cellulaires, suggérant que LMP-1 pourrait induire, directement ou indirectement, une réorganisation du cytosquelette. La dynamique du cytosquelette membranaire peut être un autre mécanisme impliqué dans l'agrégation de ce récepteur. L'eitrine, protéine majeure du système ERM (*Ezrin, Radixin, Moesin*), fait le lien entre le cytosquelette d'actine et le récepteur Fas/CD95 (Parlato S et al., EMBOJ 2000 ; Fais S et al., Apoptosis 2005). LMP-1 active la GTPase cdc42 impliquée dans la polymérisation de l'actine (Puls A et al., JCellSci 1999). Cependant, peu de données sont disponibles concernant la régulation du système ERM par LMP-1.

D'une LCL à l'autre, les niveaux d'expression de LMP-1 et Fas/CD95 sont hétérogènes. De plus, l'induction de l'apoptose spontanée est corrélée à l'augmentation du niveau d'expression de Fas/CD95. Ainsi, ce constat pose la question de la dynamique des populations : soit les niveaux d'expression de LMP-1 et de Fas/CD95 sont stables, soit les niveaux d'expression de ces deux protéines sont fluctuants au cours du temps

Dans la première hypothèse, nous aurions une population cellulaire hétérogène avec des cellules ayant un niveau d'expression de LMP-1 faible, des cellules ayant un niveau d'expression de LMP-1 modéré et des cellules ayant un niveau d'expression de LMP-1 élevé. Ces dernières entreraient dans un processus d'apoptose suite au niveau d'expression élevé de Fas/CD95. Dans ce cas, on supposerait qu'après élimination des cellules à forts taux de LMP-1, l'apoptose n'aurait plus lieu, ce qui est en désaccord avec les résultats obtenus puisque nous observons constamment le processus d'apoptose.

Dans la deuxième hypothèse, nous aurions des niveaux d'expression de LMP-1 fluctuants au cours du temps. A un instant donné, nous aurions toujours trois populations cellulaires à des niveaux d'expression de LMP-1 différents (faible, modéré, élevé). A des niveaux élevés, le niveau

d'expression de LMP-1 diminuerait par suractivation de la voie NFkB et répression du promoteur ED-L1/pLMP-1, contribuant à la courte demi-vie de LMP-1 (1,5 à 7h). Ou bien, ces cellules entreraient dans un processus de cytotase ou encore seraient éliminées par apoptose. Une étude récente de l'équipe de Bill Sugden tente de confirmer l'hypothèse d'une expression fluctuante de LMP-1 au cours du temps (Lee DY and Sugden B, Blood 2008). Ces auteurs produisent des virions dans lesquels ils ont fusionné LMP-1 à la protéine fluorescente RFP (*Red Fluorescence Protein*). Ils infectent des lymphocytes B primaires par ces virions recombinants et établissent des LCLs. Ils analysent ensuite l'expression de LMP-1 par cytométrie en flux grâce à la fluorescence intrinsèque de la RFP. Ils trient et isolent les cellules exprimant des niveaux d'expression de LMP-1 différents (faible, modéré et élevé) puis remettent ces cellules en culture. Après 4 à 6 semaines en culture, ils observent que les cellules expriment un niveau d'expression de LMP-1 modéré, qui est comparable dans chacune des populations cellulaires triées. Des niveaux élevés d'expression de LMP-1 aboutissent à une inhibition de la synthèse protéique et à l'induction des processus d'autophagie menant à la mort des cellules infectées (Lam N et al., JVirol 2004 ; Lee DY et al., JVirol 2008). Les cellules qui survivraient à l'autophagie se multiplient au cours de la division cellulaire aboutissant à une population de cellules-filles exprimant des niveaux d'expression de LMP-1 modérés (Lee DY et al., Blood 2008).

VI - Implication des autres récepteurs de mort.

Dans l'article 2, nous démontrons que LMP-1 induit l'apoptose des LCLs par l'intermédiaire de Fas/CD95. Bien que Fas/CD95 soit essentielle, les autres récepteurs de mort tels que le récepteur au TNF α de type 1 (TNFR1) ou les récepteurs au TRAIL (DR4 et DR5) ne semblent pas intervenir dans cette apoptose.

Les LCLs expriment le TNFR1 (récepteur au TNF α , Baran-Marszak F et al., Cytokine 2006) et DR4/5 (récepteurs au TRAIL, Snow AL et al., JImmunol 2006). Cependant, on ne connaît pas comment sont régulés ces récepteurs de mort au cours de nos expériences.

Il a été notamment montré que les LCLs sécrètent de grandes quantités de TNF α par l'intermédiaire de la voie NF κ B (Klein SC et al., LeukemiaRes 1996 ; Asso-Bonnet M et al., Oncogene 1998 ; Baran-Marszak F et al., Cytokine 2006). Bien que l'EBV semble induire l'expression du TNFR1 (Baran-Marszak F et al., LabInvest 2002), les lymphocytes B infectés sont résistants à l'induction de l'apoptose par le TNF α (Baran-Marszak F et al., Cytokine 2006). Cette résistance à l'apoptose par le TNF α serait due à l'induction de gènes anti-apoptotiques (Bcl2, A20, Mcl1,...) par LMP-1. Un autre mécanisme, bien que montré dans les lymphocytes T, indique que LMP-1 confère la résistance au TNF α en recrutant TRADD, adaptateur essentiel à la signalisation du TNFR1, de manière constitutive (Chuang HC et al., AmJPathol 2007). Ce travail confirme les résultats obtenus par le dominant négatif de LMP-1, LMP-1CT, qui est capable de séquestrer les adaptateurs de la signalisation induite par LMP-1 et le TNF α (Adriaenssens E et al., Oncogene 2004).

TRAIL induit l'apoptose de cellules tumorales par l'intermédiaire de deux récepteurs, DR4 et DR5. Les lymphocytes B infectés par l'EBV expriment à leur surface DR4 et DR5 mais semblent résistants à l'induction de l'apoptose par TRAIL, notamment dû à un défaut d'activation des caspases (Snow AL et al., AmJTranspl 2006). De plus, LMP-1 est impliqué dans ce processus de résistance en surexprimant l'inhibiteur catalytique de la caspase 8, cFLIP-L, au niveau de DR4 et DR5 (Cahir-McFarland ED et al., JVirol 2004 ; Snow AL et al., JImmunol 2006). Cependant aucune donnée dans la littérature ne décrit la sécrétion de TRAIL par les cellules infectées par l'EBV.

VII - Rôle de cFLIP dans l'apoptose induite par LMP-1

Comme mentionné en section V.5.7.3.E, trois transcrits de cFLIP sont décrits : cFLIP-L, cFLIP-S et cFLIP-R. Ces transcrits protègent les cellules contre l'apoptose induite par les récepteurs de mort : Fas/CD95, TNFR1, DR4 et DR5. cFLIP-L forme un hétérodimère avec la procaspase 8 et initie le processus autocatalytique de la procaspase 8 mais inhibe son clivage en caspase 8 clivé, ainsi cFLIP-L restreint le degré d'activation de la caspase 8 (Micheau O et al., JBC 2002).

La régulation de l'apoptose par cFLIP se fait à différents niveaux. En absence de cFLIP-L, la procaspase 8 est présente sous forme d'homodimères puis l'activation autocatalytique menant au clivage de la caspase 8 est optimale pour l'induction de l'apoptose. En présence de cFLIP-L, l'activation autocatalytique est restreinte diminuant l'intensité de l'apoptose. Enfin, la présence de cFLIP-S, qui ne contient que deux domaines DED, au niveau du DISC inhibe complètement l'apoptose (figure 46).

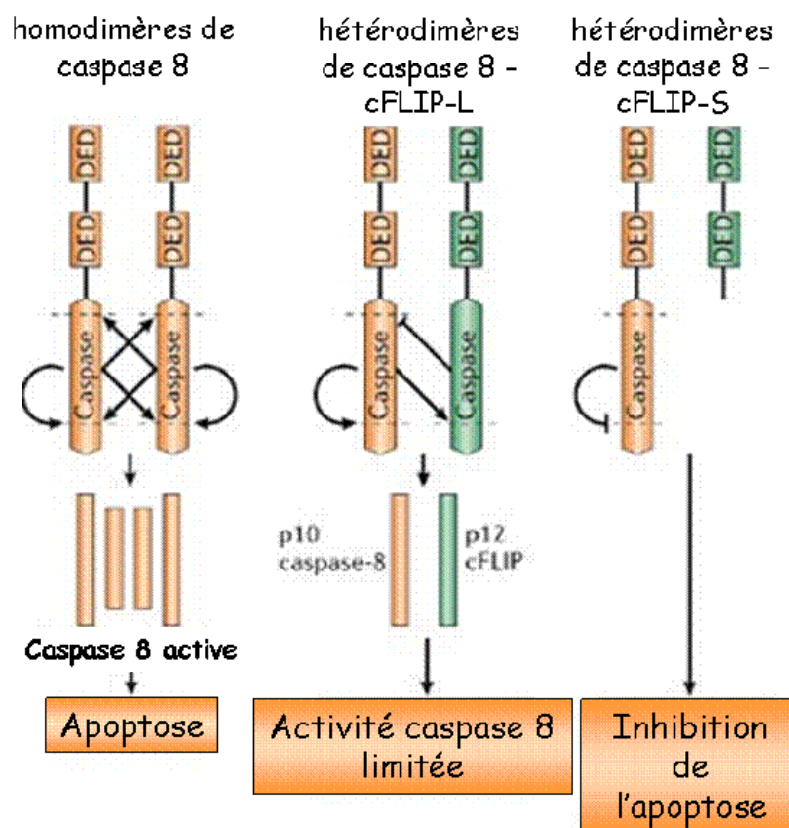


Figure 46 : Régulation de l'apoptose par cFLIP (d'après Budd RC et al., NatureRevImmunol 2006).

L'expression de cFLIP-L peut être induite par différentes cytokines telles que le TNF α , l'IL1, le CD40, ainsi que par le LPS. L'utilisation d'un super-répresseur d'IkB α non-dégradable diminue l'expression de cFLIP, suggérant que la voie NFkB gouverne son expression (Micheau O et al., MCB 2001 ; Kreuz S et al., MCB 2001).

Au cours de notre étude, nous montrons, par des expériences de coimmunoprécipitation, que la surexpression de LMP-1 induit la formation du complexe DISC, avec le recrutement des protéines FADD et de la caspase 8 au niveau de Fas/CD95. De plus, on détecte dans le même temps une activation de la caspase 8 par western-blot. Ainsi, l'expression de cFLIP-L devrait être diminuée au niveau du DISC, facilitant le clivage de la caspase 8. Cependant, LMP-1 représente le principal inducteur de l'expression de cFLIP-L par l'intermédiaire de NFkB (CahirMcFarland ED et al., JVirol 2004 ; Snow AL et al., JImmunol 2006). Des résultats non-publiés du laboratoire confirment que l'expression de cFLIP-L est corrélée à celle de LMP-1. De fait, cFLIP-L devrait être recruté au niveau du DISC de Fas/CD95 et des autres récepteurs de mort (TNFR1, DR4 et DR5). Quel est le rôle de cFLIP-L au cours cette apoptose induite par LMP-1 ? Comment réconcilie-t-on deux évènements antagonistes : surexpression d'une protéine anti-apoptotique (cFLIP-L) et levée de l'inhibition de l'apoptose ?

Afin de comprendre ce phénomène contradictoire, on pourrait proposer une hypothèse stoechiométrique, c'est-à-dire que, selon les conditions cellulaires, un déséquilibre de la balance entre l'expression de Fas/CD95 et celle de cFLIP-L pourrait aboutir à l'apoptose.

Notre modèle d'étude avec les vecteurs épisomiques inductibles n'est pas un système inductible à 100% (comme le montre la figure 1 de l'article 2) et nous observons une hétérogénéité cellulaire avec des niveaux d'expression différents de LMP-1. Nous pourrions induire l'expression de LMP-1, puis à la phase stationnaire, nous analyserions, par western-blot et coimmunoprécipitation, l'expression de Fas/CD95 et de cFLIP-L, dans les cellules exprimant des

niveaux d'expression faible, modéré et élevé de LMP-1. L'activation de l'apoptose aurait lieu lorsque le rapport d'expression entre Fas/CD95 et cFLIP-L augmenterait (expression de Fas/CD95 >> expression de cFLIP-L). Nous disposerions donc d'un test pour évaluer l'hypothèse selon laquelle il y aurait un déséquilibre entre les niveaux d'expression des deux protéines, sensibilisant les cellules à l'apoptose.

Une hypothèse alternative est que cFLIP-L serait séquestré par les autres récepteurs de mort. Nous pourrions analyser l'expression de ces autres récepteurs. Par coimmunoprécipitation, nous analyserions les complexes DISC associés aux récepteurs TNFR1 et DR4/5 dans les cellules exprimant des niveaux d'expression de LMP-1 (faible, modéré et élevé). Mais si tel est le cas, comment expliquer que cFLIP-L ait une affinité privilégiée pour les récepteurs TNFR1 et DR4/5 ? Y aurait-il un facteur moléculaire favorisant le recrutement de cFLIP-L au niveau de ces récepteurs ? Y aurait-il une coinduction de TNFR1 et DR4/5 telle que l'hypothèse stoechiométrique doit prendre en compte l'ensemble des récepteurs de mort ? Si cela est le cas, une surexpression de l'ensemble des récepteurs de mort d'une part, et une affinité privilégiée de cFLIP-L pour TNFR1 et DR4/5 d'autre part, pourraient contribuer au déséquilibre de la balance entre Fas/CD95 et cFLIP-L.

cFLIP-L est un facteur pronostic dans de nombreux types de cancers. Nos résultats publiés et non-publiés suggèrent beaucoup de questions, et l'étude du rôle de cFLIP-L dans la pathogenèse associée à l'EBV mériterait certainement d'être entreprise.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au cours de la thèse, dans un premier temps, nous montrons que la protéine LMP-1 est régulée au niveau de son promoteur ED-L1/pLMP-1 par une balance qui implique les voies de signalisation NFκB/JNK, respectivement répresseur et activateur (**figure 47**, Goormachtigh G, Ouk TS et al., JVirol 2006).

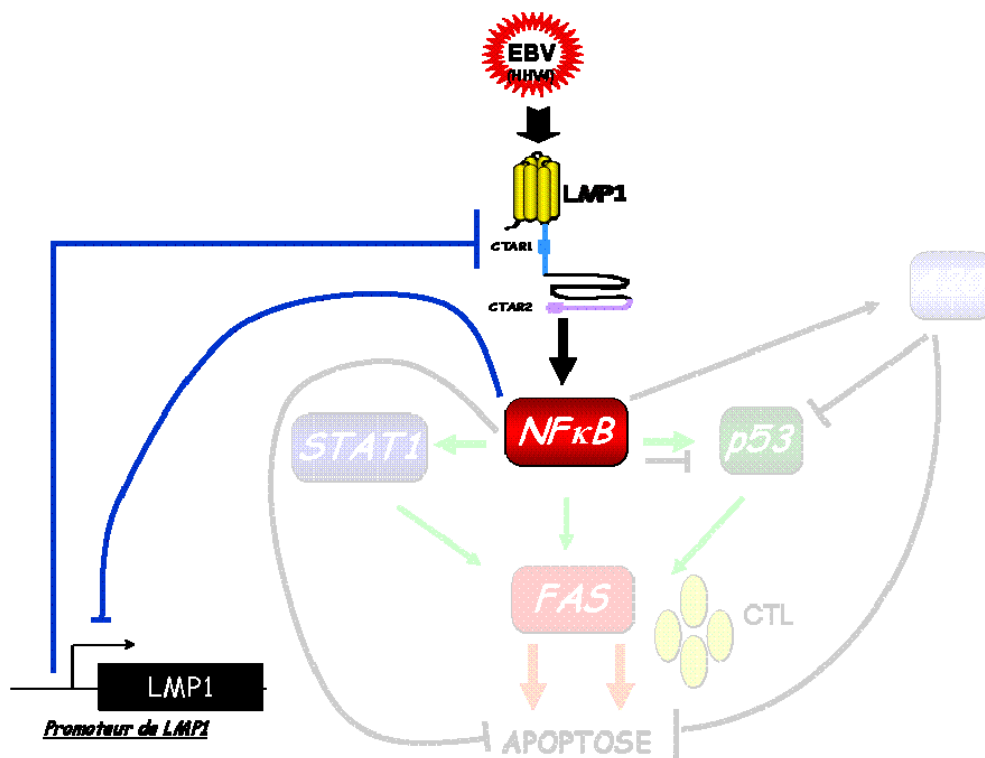


Figure 47 : Régulation négative de l'expression de la protéine LMP-1 par la voie NFκB.

LMP-1, via NFκB, se trouve à l'interface de deux processus cellulaires, la survie et l'apoptose (Dirmeier U et al., Oncogene 2005). Les conditions cellulaires, les stimuli ou le type cellulaire peuvent orienter la balance soit vers la survie, soit vers l'apoptose. D'autres récepteurs de la famille du récepteur au TNFα partagent cette dualité survie/apoptose (TNFR1, CD40, Fas/CD95). Cependant, on peut se poser la question sur le rôle de l'apoptose induite par LMP-1. On peut distinguer l'apoptose « physiologique » suite à l'interaction avec des lymphocytes T CD4+ ou

CD8+ (Wilson AD et al., IntImmuno 1998 ; LeClourenec C et al., Blood 2006), de l'apoptose en absence de cellules effectrices. C'est dans le dernier cas que se situe notre étude (**figure 48**).

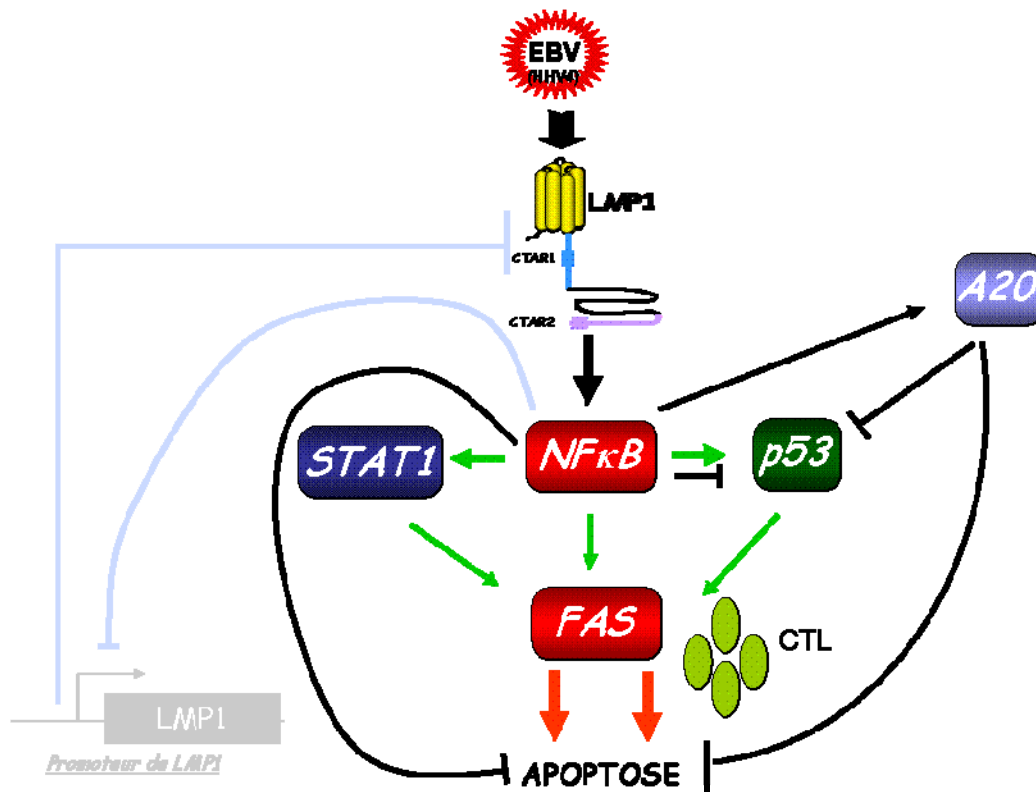


Figure 48 : Fonctions pro et antiapoptotiques de la protéine LMP-1.

En effet, l'étude de Sandberg ML et al. définit un niveau d'expression optimum pour la survie cellulaire, situé entre $2 \cdot 10^5$ et $4 \cdot 10^5$ molécules de LMP-1 par cellule (**figure 49**, Sandberg ML et al., JVirol 2000). Ainsi, en absence de cellules effectrices qui limitent la prolifération des LCLs, une dérégulation menant à de très hauts d'expression de LMP-1 pourrait entraîner le « suicide » de la cellule par apoptose. Dans ce cas, on observerait une sélection, exercée par le système immunitaire ou non, des cellules possédant un certain niveau d'expression dont la résultante de la balance survie/apoptose pencherait vers le maintien de la survie.

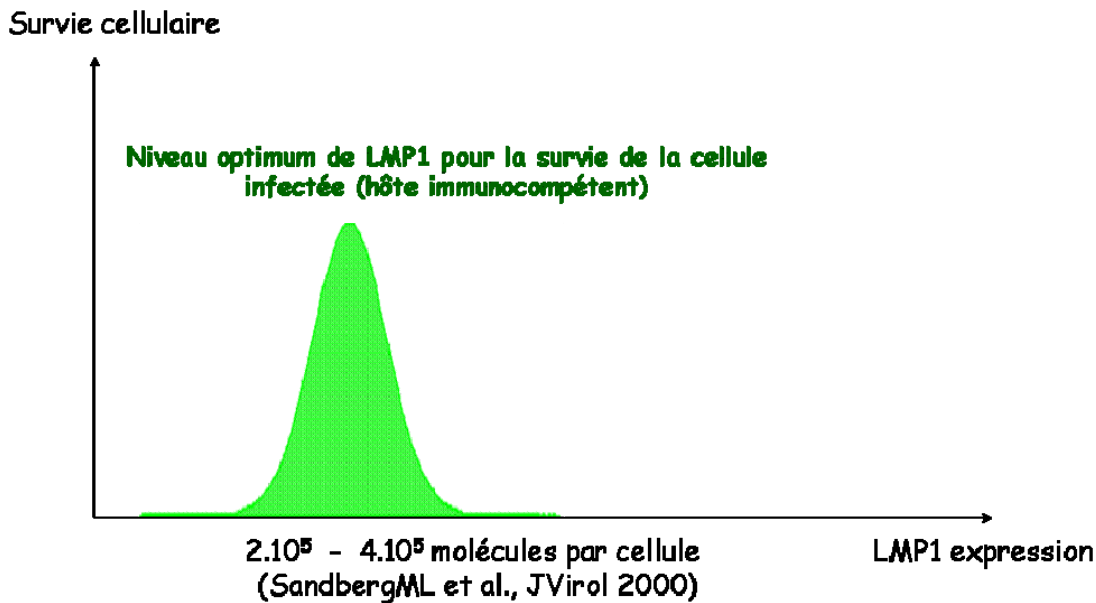


Figure 49 : Relation entre le niveau d'expression de la protéine LMP-1 et la survie cellulaire.

Un des freins moléculaires à la surexpression de LMP-1 est le facteur NFκB, qui inhibe la transactivation du promoteur ED-L1/pLMP-1 (figure 47, GoormachtighG, Ouk TS et al., JVirol 2006). Néanmoins, nous ne savons pas à quel niveau d'expression de LMP-1, NFκB agit comme un « frein » moléculaire. Exerce-t-il son effet à des niveaux d'expression élevée de LMP-1 ? Ou bien exerce-t-il son effet de manière constante ? NFκB jouerait alors un rôle important dans le maintien du niveau optimum pour la prolifération, et la « perte » de ce frein aurait pour conséquence une dérégulation disproportionnée de l'expression de la protéine LMP-1.

Ce niveau optimal d'expression de LMP-1 est certainement suffisant pour assurer la survie des cellules infectées par l'EBV chez le sujet-hôte immunocompétent mais est-il suffisant pour la transformation en absence d'anomalies génétiques retrouvées dans les pathologies présentant une latence II telles que le lymphome de Hodgkin ? Faut-il une expression plus importante de LMP-1 pour induire la tumorigenèse ? Les anomalies géniques protègent-elles de l'apoptose induite par des hauts niveaux d'expression de LMP-1 ? Ces questions sont ouvertes et posent le problème expérimental du modèle permettant d'étudier conjointement le rôle de LMP-1 et des anomalies cytogénétiques dans la transformation.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abbot, S. D., Rowe, M., Cadwallader, K., Ricksten, A., Gordon, J., Wang, F., Rymo, L. & Rickinson, A.B. (1990).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus-encoded latent membrane protein. *Journal of virology*, *64*, pp. 2126-2134.
2. **Adams, A. & Lindahl, T. (1975).** Epstein-Barr virus genomes with properties of circular DNA molecules in carrier cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *72*, pp. 1477-1481.
3. **Adler, B., Schaadt, E., Kempkes, B., Zimmer-Strobl, U., Baier, B. & Bornkamm, G.W. (2002).** Control of Epstein-Barr virus reactivation by activated CD40 and viral latent membrane protein 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*, pp. 437-442.
4. **Adriaenssens, E., Mougel, A., Goormachtigh, G., Loing, E., Fafeur, V., Auriault, C. & Coll, J. (2004).** A novel dominant-negative mutant form of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) selectively and differentially impairs LMP1 and TNF signaling pathways. *Oncogene*, *23*, pp. 2681-2693.
5. **Aggarwal, B. B., Shishodia, S., Sandur, S. K., Pandey, M. K. & Sethi, G. (2006).** Inflammation and cancer: how hot is the link?. *Biochemical pharmacology*, *72*, pp. 1605-1621.
6. **Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W. & Yuan, J. (1996).** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*, *87*, p. 171.
7. **Altmann, M., Pich, D., Ruiss, R., Wang, J., Sugden, B. & Hammerschmidt, W. (2006).** Transcriptional activation by EBV nuclear antigen 1 is essential for the expression of EBV's transforming genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*, pp. 14188-14193.
8. **Anderson, L. J. & Longnecker, R. (2008).** An auto-regulatory loop for EBV LMP2A involves activation of Notch. *Virology*, *371*, pp. 257-266.
9. **Ardila-Osorio, H., Pioche-Durieu, C., Puvion-Dutilleul, F., Clause, B., Wiels, J., Miller, W., Raab-Traub, N. & Busson, P. (2005).** TRAF interactions with raft-like buoyant complexes, better than TRAF rates of degradation, differentiate signaling by CD40 and EBV latent membrane protein 1. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, *113*, pp. 267-275.
10. **Arrand, J. R. & Rymo, L. (1982).** Characterization of the major Epstein-Barr virus-specific RNA in Burkitt lymphoma-derived cells. *Journal of virology*, *41*, pp. 376-389.
11. **Ashkenazi, A. (2002).** Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nature reviews. Cancer*, *2*, pp. 420-430.
12. **Ashwell, J. D. (2006).** The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nature reviews. Immunology*, *6*, pp. 532-540.
13. **Asso-Bonnet, M., Feuillard, J., Ferreira, V., Bissières, P., Tarantino, N., Körner, M. & Raphael, M. (1998).** Relationship between IkappaBalpha constitutive expression, TNFalpha synthesis, and apoptosis in EBV-infected lymphoblastoid cells. *Oncogene*, *17*, pp. 1607-1615.

14. **Atanasiu, C., Deng, Z., Wiedmer, A., Norseen, J. & Lieberman, P.M. (2006).** ORC binding to TRF2 stimulates OriP replication. *EMBO reports*, 7, pp. 716-721.
15. **Aviel, S., Winberg, G., Massucci, M. & 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. *The Journal of biological chemistry*, 275, pp. 23491-23499.
16. **Burkitt, D. (1958).** A sarcoma involving the jaws in African children. *The British journal of surgery*, 46, pp. 218-223.
17. **Babcock, G. J., Decker, L. L., Volk, M. & Thorley-Lawson, D.A. (1998).** EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity*, 9, pp. 395-404.
18. **Babcock, G. J., Hochberg, D. & 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, pp. 497-506.
19. **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., Séguin, C. & et al. (1984).** DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 310, pp. 207-211.
20. **Bailey, J. & Europe-Finner, G.N. (2005).** Identification of human myometrial target genes of the c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) pathway: the role of activating transcription factor 2 (ATF2) and a novel spliced isoform ATF2-small. *Journal of molecular endocrinology*, 34, pp. 19-35.
21. **Bain, M., Watson, R. J., Farrell, P. J. & Allday, M.J. (1996).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C is a powerful repressor of transcription when tethered to DNA. *Journal of virology*, 70, pp. 2481-2489.
22. **Bajaj, B. G., Murakami, M., Cai, Q., Verma, S. C., Lan, K. & Robertson, E.S. (2008).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with and enhances the stability of the c-Myc oncoprotein. *Journal of virology*, 82, pp. 4082-4090.
23. **Baker, A. H., Edwards, D. R. & Murphy, G. (2002).** Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *Journal of cell science*, 115, pp. 3719-3727.
24. **Balandraud, N., Roudier, J. & Roudier, C. (2004).** Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Autoimmunity reviews*, 3, pp. 362-367.
25. **Bandobashi, K., Maeda, A., Teramoto, N., Nagy, N., Székely, L., Taguchi, H., Miyoshi, I., Klein, G. & 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, pp. 275-282.
26. **Baran-Marszak, F., Fagard, R., Girard, B., Camilleri-Broët, S., Zeng, F., Lenoir, G. M., Raphaël, M. & Feuillard, J. (2002).** Gene array identification of Epstein Barr virus-regulated cellular genes in EBV-converted Burkitt lymphoma cell lines. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 82, pp. 1463-1479.
27. **Baran-Marszak, F., Laguillier, C., Youlyouz, I., Feuillard, J., Mariette, X., Fagard, R. & Raphaël, M. (2006).** Effect of tumor necrosis factor alpha and infliximab on apoptosis of B lymphocytes infected or not with Epstein-Barr virus. *Cytokine*, 33, pp. 337-345.
28. **Batisse, J., Manet, E., Middeldorp, J., Sergeant, A. & Gruffat, H. (2005).** Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 is essential for intranuclear capsid assembly and production of gp350. *Journal of virology*, 79, pp. 14102-14111.

29. **Beaufils, P., Choquet, D., Mamoun, R. Z. & Malissen, B. (1993).** The (YXXL/I)2 signalling motif found in the cytoplasmic segments of the bovine leukaemia virus envelope protein and Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A can elicit early and late lymphocyte activation events. *The EMBO journal*, *12*, pp. 5105-5112.
30. **Bhende, P. M., Seaman, W. T., Delecluse, H. & Kenney, S.C. (2005).** BZLF1 activation of the methylated form of the BRLF1 immediate-early promoter is regulated by BZLF1 residue 186. *Journal of virology*, *79*, pp. 7338-7348.
31. **Bochkarev, A., Barwell, J. A., Pfuetzner, R. A., Furey, W. J., Edwards, A. M. & Frappier, L. (1995).** Crystal structure of the DNA-binding domain of the Epstein-Barr virus origin-binding protein EBNA 1. *Cell*, *83*, pp. 39-46.
32. **Bornkamm, G. W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J., Laux, G., Bachl, J., Korndoerfer, M., Schlee, M., Hölzel, M., Malamoussi, A., Chapman, R. D., Nimmerjahn, F., Mautner, J., Hillen, W., Bujard, H. & Feuillard, J. (2005).** Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic acids research*, *33*, p. e137.
33. **Bornkamm, G. W., Delius, H., Zimmer, U., Hudewentz, J. & Epstein, M.A. (1980).** Comparison of Epstein-Barr virus strains of different origin by analysis of the viral DNAs. *Journal of virology*, *35*, pp. 603-618.
34. **Borza, C. M. & Hutt-Fletcher, L.M. (2002).** Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nature medicine*, *8*, pp. 594-599.
35. **Borza, C. M., Morgan, A. J., Turk, S. M. & Hutt-Fletcher, L.M. (2004).** Use of gHgL for attachment of Epstein-Barr virus to epithelial cells compromises infection. *Journal of virology*, *78*, pp. 5007-5014.
36. **Bourillot, P. Y., Waltzer, L., Sergeant, A. & Manet, E. (1998).** Transcriptional repression by the Epstein-Barr virus EBNA3A protein tethered to DNA does not require RBP-Jkappa. *The Journal of general virology*, *79 (Pt 2)*, pp. 363-370.
37. **Braun, T., Carvalho, G., Fabre, C., Grosjean, J., Fenaux, P. & Kroemer, G. (2006).** Targeting NF-kappaB in hematologic malignancies. *Cell death and differentiation*, *13*, pp. 748-758.
38. **Brennan, P., Mehl, A. M., Jones, M. & Rowe, M. (2002).** Phosphatidylinositol 3-kinase is essential for the proliferation of lymphoblastoid cells. *Oncogene*, *21*, pp. 1263-1271.
39. **Brielmeier, M., Mautner, J., Laux, G. & Hammerschmidt, W. (1996).** The latent membrane protein 2 gene of Epstein-Barr virus is important for efficient B cell immortalization. *The Journal of general virology*, *77 (Pt 11)*, pp. 2807-2818.
40. **Brooks, L. A., Lear, A. L., Young, L. S. & Rickinson, A.B. (1993).** Transcripts from the Epstein-Barr virus BamHI A fragment are detectable in all three forms of virus latency. *Journal of virology*, *67*, pp. 3182-3190.
41. **Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J. R., Cumano, A., Roux, P., Black, R. A. & Israël, A. (2000).** A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Molecular cell*, *5*, pp. 207-216.
42. **Brown, H. J., Song, M. J., Deng, H., Wu, T., Cheng, G. & Sun, R. (2003).** NF-kappaB inhibits gammaherpesvirus lytic replication. *Journal of virology*, *77*, pp. 8532-8540.

43. **Brummelkamp, T. R., Nijman, S. M. B., Dirac, A. M. G. & Bernards, R. (2003).** Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature*, 424, pp. 797-801.
44. **Buck, M., Burgess, A., Stirzaker, R., Krauer, K. & Sculley, T. (2006).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3A contains six nuclear-localization signals. *The Journal of general virology*, 87, pp. 2879-2884.
45. **Budd, R. C., Yeh, W. & Tschopp, J. (2006).** cFLIP regulation of lymphocyte activation and development. *Nature reviews. Immunology*, 6, pp. 196-204.
46. **Bump, N. J., Hackett, M., Hugunin, M., Seshagiri, S., Brady, K., Chen, P., Ferenz, C., Franklin, S., Ghayur, T., Li, P. & et al. (1995).** Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science*, 269, pp. 1885-1888.
47. **Burgess, A., Buck, M., Krauer, K. & Sculley, T. (2006).** Nuclear localization of the Epstein-Barr virus EBNA3B protein. *The Journal of general virology*, 87, pp. 789-793.
48. **Burkhardt, A. L., Bolen, J. B., Kieff, E. & Longnecker, R. (1992).** An Epstein-Barr virus transformation-associated membrane protein interacts with src family tyrosine kinases. *Journal of virology*, 66, pp. 5161-5167.
49. **Caamaño, J. H., Perez, P., Lira, S. A. & Bravo, R. (1996).** Constitutive expression of Bcl-3 in thymocytes increases the DNA binding of NF-kappaB1 (p50) homodimers in vivo. *Molecular and cellular biology*, 16, pp. 1342-1348.
50. **Cahir-McFarland, E. D., Carter, K., Rosenwald, A., Giltane, J. M., Henrickson, S. E., Staudt, L. M. & 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. *Journal of virology*, 78, pp. 4108-4119.
51. **Cai, X., Schäfer, A., Lu, S., Bilello, J. P., Desrosiers, R. C., Edwards, R., Raab-Traub, N. & Cullen, B.R. (2006).** Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS pathogens*, 2, p. e23.
52. **Caldwell, R. G., Wilson, J. B., Anderson, S. J. & Longnecker, R. (1998).** Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity*, 9, pp. 405-411.
53. **Campbell, K. J., Rocha, S. & Perkins, N.D. (2004).** Active repression of antiapoptotic gene expression by RelA(p65) NF-kappa B. *Molecular cell*, 13, pp. 853-865.
54. **Carpinteiro, A., Dumitru, C., Schenck, M. & Gulbins, E. (2008).** Ceramide-induced cell death in malignant cells. *Cancer letters*, 264, pp. 1-10.
55. **Ceccarelli, S., Visco, V., Raffa, S., Wakisaka, N., Pagano, J. S. & Torrisi, M.R. (2007).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 promotes concentration in multivesicular bodies of fibroblast growth factor 2 and its release through exosomes. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 121, pp. 1494-1506.
56. **Chang, Y., Lee, H., Chang, S., Hsu, T., Wang, P., Chang, Y., Takada, K. & Tsai, C. (2004).** Induction of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 by a lytic transactivator Rta. *Journal of virology*, 78, pp. 13028-13036.
57. **Chang, Y., Tung, C. H., Huang, Y. T., Lu, J., Chen, J. Y. & Tsai, C.H. (1999).** Requirement for cell-to-cell contact in Epstein-Barr virus infection of nasopharyngeal carcinoma cells and keratinocytes. *Journal of virology*, 73, pp. 8857-8866.

58. **Chaudhuri, B., Xu, H., Todorov, I., Dutta, A. & Yates, J.L. (2001).** Human DNA replication initiation factors, ORC and MCM, associate with oriP of Epstein-Barr virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, pp. 10085-10089.
59. **Chavrier, P., Gruffat, H., Chevallier-Greco, A., Buisson, M. & Sergeant, A. (1989).** The Epstein-Barr virus (EBV) early promoter DR contains a cis-acting element responsive to the EBV transactivator EB1 and an enhancer with constitutive and inducible activities. *Journal of virology*, 63, pp. 607-614.
60. **Chen, A., Divisconte, M., Jiang, X., Quink, C. & Wang, F. (2005).** Epstein-Barr virus with the latent infection nuclear antigen 3B completely deleted is still competent for B-cell growth transformation in vitro. *Journal of virology*, 79, pp. 4506-4509.
61. **Chen, F., Zou, J. Z., di Renzo, L., Winberg, G., Hu, L. F., Klein, E., Klein, G. & Ernberg, I. (1995).** A subpopulation of normal B cells latently infected with Epstein-Barr virus resembles Burkitt lymphoma cells in expressing EBNA-1 but not EBNA-2 or LMP1. *Journal of virology*, 69, pp. 3752-3758.
62. **Chen, H., Huang, J., Wu, F. Y., Liao, G., Hutt-Fletcher, L. & Hayward, S.D. (2005).** Regulation of expression of the Epstein-Barr virus BamHI-A rightward transcripts. *Journal of virology*, 79, pp. 1724-1733.
63. **Chen, H., Hutt-Fletcher, L., Cao, L. & Hayward, S.D. (2003).** A positive autoregulatory loop of LMP1 expression and STAT activation in epithelial cells latently infected with Epstein-Barr virus. *Journal of virology*, 77, pp. 4139-4148.
64. **Chen, H., Lee, J. M., Zong, Y., Borowitz, M., Ng, M. H., Ambinder, R. F. & Hayward, S.D. (2001).** Linkage between STAT regulation and Epstein-Barr virus gene expression in tumors. *Journal of virology*, 75, pp. 2929-2937.
65. **Chen, S., Lu, J., Shih, Y. & Tsai, C. (2002).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A regulates c-Jun protein through extracellular signal-regulated kinase. *Journal of virology*, 76, pp. 9556-9561.
66. **Chen, X., Kandasamy, K. & Srivastava, R.K. (2003).** Differential roles of RelA (p65) and c-Rel subunits of nuclear factor kappa B in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling. *Cancer research*, 63, pp. 1059-1066.
67. **Chen, Y., Liu, M., Chang, Y., Wu, C., Hu, C. & Chen, J. (2008).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 represses DNA repair through the PI3K/Akt/FOXO3a pathway in human epithelial cells. *Journal of virology*, 82, pp. 8124-8137.
68. **Chevallier-Greco, A., Gruffat, H., Manet, E., Calender, A. & Sergeant, A. (1989).** The Epstein-Barr virus (EBV) DR enhancer contains two functionally different domains: domain A is constitutive and cell specific, domain B is transactivated by the EBV early protein R. *Journal of virology*, 63, pp. 615-623.
69. **Chuang, H., Lay, J., Chuang, S., Hsieh, W., Chang, Y. & Su, I. (2007).** Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein-1 down-regulates tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptor-1 and confers resistance to TNF-alpha-induced apoptosis in T cells: implication for the progression to T-cell lymphoma in EBV-associated hemophagocytic syndrome. *The American journal of pathology*, 170, pp. 1607-1617.
70. **Chuang, J., Wang, Y., Yeh, S., Liu, Y., Chang, W. & Hung, J. (2008).** Phosphorylation by c-Jun NH2-terminal kinase 1 regulates the stability of transcription factor Sp1 during mitosis. *Molecular biology of the cell*, 19, pp. 1139-1151.

71. **Clarke, P. A., Sharp, N. A. & Clemens, M.J. (1990).** Translational control by the Epstein-Barr virus small RNA EBER-1. Reversal of the double-stranded RNA-induced inhibition of protein synthesis in reticulocyte lysates. *European journal of biochemistry / FEBS*, 193, pp. 635-641.
72. **Coffin, W. F. 3., Erickson, K. D., Hoedt-Miller, M. & 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, pp. 5313-5330.
73. **Cohen, J. I. & Kieff, E. (1991).** An Epstein-Barr virus nuclear protein 2 domain essential for transformation is a direct transcriptional activator. *Journal of virology*, 65, pp. 5880-5885.
74. **Cohen, J. I. & Lekstrom, K. (1999).** Epstein-Barr virus BARF1 protein is dispensable for B-cell transformation and inhibits alpha interferon secretion from mononuclear cells. *Journal of virology*, 73, pp. 7627-7632.
75. **Cohen, J. I., Wang, F. & Kieff, E. (1991).** Epstein-Barr virus nuclear protein 2 mutations define essential domains for transformation and transactivation. *Journal of virology*, 65, pp. 2545-2554.
76. **Cohen, J. I., Wang, F., Mannick, J. & Kieff, E. (1989).** Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, pp. 9558-9562.
77. **Contreras-Brodin, B., Karlsson, A., Nilsson, T., Rymo, L. & Klein, G. (1996).** B cell-specific activation of the Epstein-Barr virus-encoded C promoter compared with the wide-range activation of the W promoter. *The Journal of general virology*, 77 (Pt 6), pp. 1159-1162.
78. **Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Zimmer, U., Rousselet, G., Pavlish, O., Banchereau, J., Tursz, T., Bornkamm, G. & 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. *Journal of virology*, 64, pp. 1002-1013.
79. **Cotter, M. A. 2. & Robertson, E.S. (2000).** Modulation of histone acetyltransferase activity through interaction of Epstein-Barr nuclear antigen 3C with prothymosin alpha. *Molecular and cellular biology*, 20, pp. 5722-5735.
80. **D'Souza, B. N., Edelstein, L. C., Pegman, P. M., Smith, S. M., Loughran, S. T., Clarke, A., Mehl, A., Rowe, M., Gélinas, C. & 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. *Journal of virology*, 78, pp. 1800-1816.
81. **Dallman, C., Johnson, P. W. M. & Packham, G. (2003).** Differential regulation of cell survival by CD40. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 8, pp. 45-53.
82. **Dambaugh, T., Hennessy, K., Chamnankit, L. & Kieff, E. (1984).** U2 region of Epstein-Barr virus DNA may encode Epstein-Barr nuclear antigen 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81, pp. 7632-7636.
83. **Darnell, J. E. J. (1997).** STATs and gene regulation. *Science*, 277, pp. 1630-1635.

84. **Dawson, C. W., Laverick, L., Morris, M. A., Tramoutanis, G. & Young, L.S. (2008).** Epstein-Barr virus-encoded LMP1 regulates epithelial cell motility and invasion via the ERK-MAPK pathway. *Journal of virology*, 82, pp. 3654-3664.
85. **Dawson, C. W., Tramoutanis, G., Eliopoulos, A. G. & 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. *The Journal of biological chemistry*, 278, pp. 3694-3704.
86. **De Strooper, B., Annaert, W., Cupers, P., Saftig, P., Craessaerts, K., Mumm, J. S., Schroeter, E. H., Schrijvers, V., Wolfe, M. S., Ray, W. J., Goate, A. & Kopan, R. (1999).** A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*, 398, pp. 518-522.
87. **Deng, Z., Lezina, L., Chen, C., Shtivelband, S., So, W. & Lieberman, P.M. (2002).** Telomeric proteins regulate episomal maintenance of Epstein-Barr virus origin of plasmid replication. *Molecular cell*, 9, pp. 493-503.
88. **Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. & Reed, J.C. (1997).** X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, 388, pp. 300-304.
89. **Devergne, O., Hatzivassiliou, E., Izumi, K. M., Kaye, K. M., Kleijnen, M. F., Kieff, E. & 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. *Molecular and cellular biology*, 16, pp. 7098-7108.
90. **Dhar, S. K., Yoshida, K., Machida, Y., Khaira, P., Chaudhuri, B., Wohlschlegel, J. A., Leffak, M., Yates, J. & Dutta, A. (2001).** Replication from oriP of Epstein-Barr virus requires human ORC and is inhibited by geminin. *Cell*, 106, pp. 287-296.
91. **Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O. & Kolch, W. (2007).** MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, 26, pp. 3279-3290.
92. **Dillner, J., Kallin, B., Ehlin-Henriksson, B., Rymo, L., Henle, W., Henle, G. & Klein, G. (1986).** The Epstein-Barr virus determined nuclear antigen is composed of at least three different antigens. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 37, pp. 195-200.
93. **Dirmeier, U., Hoffmann, R., Kilger, E., Schultheiss, U., Briseño, C., Gires, O., Kieser, A., Eick, D., Sugden, B. & Hammerschmidt, W. (2005).** Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus coordinately regulates proliferation with control of apoptosis. *Oncogene*, 24, pp. 1711-1717.
94. **Dolcetti, R. & Menezes, J. (2003).** Epstein-Barr virus and undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: new immunobiological and molecular insights on a long-standing etiopathogenic association. *Advances in cancer research*, 87, pp. 127-157.
95. **Dudziak, D., Kieser, A., Dirmeier, U., Nimmerjahn, F., Berchtold, S., Steinkasserer, A., Marschall, G., Hammerschmidt, W., Laux, G. & Bornkamm, G.W. (2003).** Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus induces CD83 by the NF-kappaB signaling pathway. *Journal of virology*, 77, pp. 8290-8298.
96. **Durandy, A., Le Deist, F., Emile, J. F., Debatin, K. & Fischer, A. (1997).** Sensitivity of Epstein-Barr virus-induced B cell tumor to apoptosis mediated by anti-CD95/Apo-1/fas antibody. *European journal of immunology*, 27, pp. 538-543.
97. **de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G. & de Vries, J.E. (1991).** Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory

- role of IL-10 produced by monocytes. *The Journal of experimental medicine*, 174, pp. 1209-1220.
98. **Epstein, M. A. & Barr, Y.M. (1964).** Cultivation in vitro of human lymphoblasts from Burkitt's malignant lymphoma. *Lancet*, 1, pp. 252-253.
 99. **Epstein, M. A., Achong, B. G. & Barr, Y.M. (1964).** Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet*, 1, pp. 702-703.
 100. **Eliopoulos, A. G. & Young, L.S. (2001).** LMP1 structure and signal transduction. *Seminars in cancer biology*, 11, pp. 435-444.
 101. **Eliopoulos, A. G., Gallagher, N. J., Blake, S. M., Dawson, C. W. & Young, L.S. (1999).** 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. *The Journal of biological chemistry*, 274, pp. 16085-16096.
 102. **Eliopoulos, A. G., Waites, E. R., Blake, S. M. S., Davies, C., Murray, P. & 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. *Journal of virology*, 77, pp. 1316-1328.
 103. **Engels, N., Merchant, M., Pappu, R., Chan, A. C., Longnecker, R. & Wienands, J. (2001).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A (LMP2A) employs the SLP-65 signaling module. *The Journal of experimental medicine*, 194, pp. 255-264.
 104. **Erickson, K. D. & Martin, J.M. (1997).** Early detection of the lytic LMP-1 protein in EBV-infected B-cells suggests its presence in the virion. *Virology*, 234, pp. 1-13.
 105. **Erickson, K. D. & Martin, J.M. (2000).** The late lytic LMP-1 protein of Epstein-Barr virus can negatively regulate LMP-1 signaling. *Journal of virology*, 74, pp. 1057-1060.
 106. **Everly, D. N. J., Mainou, B. A. & 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. *Journal of virology*, 78, pp. 13470-13478.
 107. **el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1993).** WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75, pp. 817-825.
 108. **Fais, S., De Mito, A. & Lozupone, F. (2005).** The role of FAS to ezrin association in FAS-mediated apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, 10, pp. 941-947.
 109. **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. & et al. (1992).** Expression of the APO-1 antigen in Burkitt lymphoma cell lines correlates with a shift towards a lymphoblastoid phenotype. *Blood*, 79, pp. 3300-3306.
 110. **Faulkner, G. C., Krajewski, A. S. & Crawford, D.H. (2000).** The ins and outs of EBV infection. *Trends in microbiology*, 8, pp. 185-189.
 111. **Feederle, R., Kost, M., Baumann, M., Janz, A., Drouet, E., Hammerschmidt, W. & Delecluse, H.J. (2000).** The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the cooperative functions of two transactivators. *The EMBO journal*, 19, pp. 3080-3089.
 112. **Felsenfeld, G. & Groudine, M. (2003).** Controlling the double helix. *Nature*, 421, pp. 448-453.

113. **Feuillard, J., Schuhmacher, M., Kohanna, S., Asso-Bonnet, M., Ledeur, F., Joubert-Caron, R., Bissières, P., Polack, A., Bornkamm, G. W. & Raphaël, M. (2000).** Inducible loss of NF-kappaB activity is associated with apoptosis and Bcl-2 down-regulation in Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes. *Blood*, *95*, pp. 2068-2075.
114. **Fingerroth, J. D., Weis, J. J., Tedder, T. F., Strominger, J. L., Biro, P. A. & Fearon, D.T. (1984).** Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*, pp. 4510-4514.
115. **Fiorini, S. & Ooka, T. (2008).** Secretion of Epstein-Barr virus-encoded BARF1 oncoprotein from latently infected B cells. *Virology journal*, *5*, p. 70.
116. **Fischer, E., Delibrias, C. & Kazatchkine, M.D. (1991).** Expression of CR2 (the C3dg/EBV receptor, CD21) on normal human peripheral blood T lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *146*, pp. 865-869.
117. **Fixman, E. D., Hayward, G. S. & Hayward, S.D. (1992).** trans-acting requirements for replication of Epstein-Barr virus ori-Lyt. *Journal of virology*, *66*, pp. 5030-5039.
118. **Flemington, E. & Speck, S.H. (1990).** Autoregulation of Epstein-Barr virus putative lytic switch gene BZLF1. *Journal of virology*, *64*, pp. 1227-1232.
119. **Floettmann, J. E., Ward, K., Rickinson, A. B. & Rowe, M. (1996).** Cytostatic effect of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 analyzed using tetracycline-regulated expression in B cell lines. *Virology*, *223*, pp. 29-40.
120. **Forsman, A., Rüetschi, U., Ekholm, J. & Rymo, L. (2008).** Identification of intracellular proteins associated with the EBV-encoded nuclear antigen 5 using an efficient TAP procedure and FT-ICR mass spectrometry. *Journal of proteome research*, *7*, pp. 2309-2319.
121. **Foufelle, F. & Ferré, P. (2007).** [Unfolded protein response: its role in physiology and physiopathology]. *Medecine sciences : M/S*, *23*, pp. 291-296.
122. **Fries, K. L., Sculley, T. B., Webster-Cyriaque, J., Rajadurai, P., Sadler, R. H. & Raab-Traub, N. (1997).** Identification of a novel protein encoded by the BamHI A region of the Epstein-Barr virus. *Journal of virology*, *71*, pp. 2765-2771.
123. **Fruehling, S., Swart, R., Dolwick, K. M., Kremmer, E. & Longnecker, R. (1998).** Tyrosine 112 of latent membrane protein 2A is essential for protein tyrosine kinase loading and regulation of Epstein-Barr virus latency. *Journal of virology*, *72*, pp. 7796-7806.
124. **Fu, Z. & Cannon, M.J. (2000).** Functional analysis of the CD4(+) T-cell response to Epstein-Barr virus: T-cell-mediated activation of resting B cells and induction of viral BZLF1 expression. *Journal of virology*, *74*, pp. 6675-6679.
125. **Fujiwara, S. & 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. *Journal of virology*, *69*, pp. 3900-3903.
126. **Fukuda, M. & Longnecker, R. (2005).** Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 2A regulates B-cell receptor-induced apoptosis and EBV reactivation through tyrosine phosphorylation. *Journal of virology*, *79*, pp. 8655-8660.
127. **Fukuda, M. & Longnecker, R. (2007).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A mediates transformation through constitutive activation of the Ras/PI3-K/Akt Pathway. *Journal of virology*, *81*, pp. 9299-9306.

128. **Fukuda, M., Kurosaki, W., Yanagihara, K., Kuratsune, H. & 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, pp. 310-320.
129. **Gahn, T. A. & Sugden, B. (1995).** An EBNA-1-dependent enhancer acts from a distance of 10 kilobase pairs to increase expression of the Epstein-Barr virus LMP gene. *Journal of virology*, 69, pp. 2633-2636.
130. **Gajate, C., Fonteriz, R. I., Cabaner, C., Alvarez-Noves, G., Alvarez-Rodriguez, Y., Modolell, M. & Mollinedo, F. (2000).** Intracellular triggering of Fas, independently of FasL, as a new mechanism of antitumor ether lipid-induced apoptosis. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 85, pp. 674-682.
131. **Geiger, T. R. & Martin, J.M. (2006).** The Epstein-Barr virus-encoded LMP-1 oncoprotein negatively affects Tyk2 phosphorylation and interferon signaling in human B cells. *Journal of virology*, 80, pp. 11638-11650.
132. **Gilligan, K., Sato, H., Rajadurai, P., Busson, P., Young, L., Rickinson, A., Tursz, T. & Raab-Traub, N. (1990).** Novel transcription from the Epstein-Barr virus terminal EcoRI fragment, DJJhet, in a nasopharyngeal carcinoma. *Journal of virology*, 64, pp. 4948-4956.
133. **Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D. & Hammerschmidt, W. (1997).** Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *The EMBO journal*, 16, pp. 6131-6140.
134. **Given, D. & Kieff, E. (1978).** DNA of Epstein-Barr virus. IV. Linkage map of restriction enzyme fragments of the B95-8 and W91 strains of Epstein-Barr Virus. *Journal of virology*, 28, pp. 524-542.
135. **Goormachtigh, G., Ouk, T., Mougel, A., Tranchand-Bunel, D., Masy, E., Le Cloennec, C., Feuillard, J., Bornkamm, G. W., Auriault, C., Manet, E., Fafeur, V., Adriaenssens, E. & Coll, J. (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. *Journal of virology*, 80, pp. 7382-7393.
136. **Gosselin, J., Flamand, L., D'Addario, M., Hiscott, J., Stefanescu, I., Ablashi, D. V., Gallo, R. C. & Menezes, J. (1992).** Modulatory effects of Epstein-Barr, herpes simplex, and human herpes-6 viral infections and coinfections on cytokine synthesis. A comparative study. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 149, pp. 181-187.
137. **Gosselin, J., Menezes, J., D'Addario, M., Hiscott, J., Flamand, L., Lamoureux, G. & Oth, D. (1991).** Inhibition of tumor necrosis factor-alpha transcription by Epstein-Barr virus. *European journal of immunology*, 21, pp. 203-208.
138. **Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Müller, G., Hillen, W. & Bujard, H. (1995).** Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, 268, pp. 1766-1769.
139. **Goudeau, B., Huetz, F., Samson, S., Di Santo, J. P., Cumano, A., Beg, A., Israël, A. & Mémet, S. (2003).** IkappaBalpha/IkappaBepsilon deficiency reveals that a critical NF-kappaB dosage is required for lymphocyte survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, pp. 15800-15805.
140. **Grassmé, H., Cremesti, A., Kolesnick, R. & Gulbins, E. (2003).** Ceramide-mediated clustering is required for CD95-DISC formation. *Oncogene*, 22, pp. 5457-5470.

141. **Greifenegger, N., Jäger, M., Kunz-Schughart, L. A., Wolf, H. & Schwarzmann, F. (1998).** Epstein-Barr virus small RNA (EBER) genes: differential regulation during lytic viral replication. *Journal of virology*, *72*, pp. 9323-9328.
142. **Grimm, T., Schneider, S., Naschberger, E., Huber, J., Guenzi, E., Kieser, A., Reitmeir, P., Schulz, T. F., Morris, C. A. & Stürzl, M. (2005).** EBV latent membrane protein-1 protects B cells from apoptosis by inhibition of BAX. *Blood*, *105*, pp. 3263-3269.
143. **Grogan, E., Jenson, H., Countryman, J., Heston, L., Gradoville, L. & Miller, G. (1987).** Transfection of a rearranged viral DNA fragment, WZhet, stably converts latent Epstein-Barr viral infection to productive infection in lymphoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *84*, pp. 1332-1336.
144. **Groux, H., Cottrez, F., Montpellier, C., Quatannens, B., Coll, J., Stehelin, D. & Auriault, C. (1997).** Isolation and characterization of transformed human T-cell lines infected by Epstein-Barr virus. *Blood*, *89*, pp. 4521-4530.
145. **Gruffat, H., Batisse, J., Pich, D., Neuhierl, B., Manet, E., Hammerschmidt, W. & Sergeant, A. (2002).** Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 is essential for production of infectious virus. *Journal of virology*, *76*, pp. 9635-9644.
146. **Grünewald, K., Desai, P., Winkler, D. C., Heymann, J. B., Belnap, D. M., Baumeister, W. & Steven, A.C. (2003).** Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science*, *302*, pp. 1396-1398.
147. **Gutsch, D. E., Holley-Guthrie, E. A., Zhang, Q., Stein, B., Blonar, M. A., Baldwin, A. S. & Kenney, S.C. (1994).** The bZIP transactivator of Epstein-Barr virus, BZLF1, functionally and physically interacts with the p65 subunit of NF-kappa B. *Molecular and cellular biology*, *14*, pp. 1939-1948.
148. **Haldar, S., Negrini, M., Monne, M., Sabbioni, S. & Croce, C.M. (1994).** Down-regulation of bcl-2 by p53 in breast cancer cells. *Cancer research*, *54*, pp. 2095-2097.
149. **Hammerschmidt, W., Sugden, B. & Baichwal, V.R. (1989).** The transforming domain alone of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus is toxic to cells when expressed at high levels. *Journal of virology*, *63*, pp. 2469-2475.
150. **Han, D. K., Chaudhary, P. M., Wright, M. E., Friedman, C., Trask, B. J., Riedel, R. T., Baskin, D. G., Schwartz, S. M. & Hood, L. (1997).** MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and BclXL and initiates cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *94*, pp. 11333-11338.
151. **Han, I., Harada, S., Weaver, D., Xue, Y., Lane, W., Orstavik, S., Skalhegg, B. & Kieff, E. (2001).** EBNA-LP associates with cellular proteins including DNA-PK and HA95. *Journal of virology*, *75*, pp. 2475-2481.
152. **Han, J. & Sun, P. (2007).** The pathways to tumor suppression via route p38. *Trends in biochemical sciences*, *32*, pp. 364-371.
153. **Harada, S. & Kieff, E. (1997).** Epstein-Barr virus nuclear protein LP stimulates EBNA-2 acidic domain-mediated transcriptional activation. *Journal of virology*, *71*, pp. 6611-6618.
154. **Harada, S., Yalamanchili, R. & Kieff, E. (2001).** Epstein-Barr virus nuclear protein 2 has at least two N-terminal domains that mediate self-association. *Journal of virology*, *75*, pp. 2482-2487.

155. **Hayward, S. D. (2004).** Viral interactions with the Notch pathway. *Seminars in cancer biology*, 14, pp. 387-396.
156. **Henderson, S., Huen, D., Rowe, M., Dawson, C., Johnson, G. & Rickinson, A. (1993).** Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, pp. 8479-8483.
157. **Henderson, S., Rowe, M., Gregory, C., Croom-Carter, D., Wang, F., Longnecker, R., Kieff, E. & 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, pp. 1107-1115.
158. **Henkel, T., Ling, P. D., Hayward, S. D. & Peterson, M.G. (1994).** Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science*, 265, pp. 92-95.
159. **Henle, G., Henle, W. & Diehl, V. (1968).** Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 59, pp. 94-101.
160. **Henle, W. & Henle, G. (1970).** Evidence for a relation of Epstein-Barr virus to Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Bibliotheca haematologica*, , pp. 706-713.
161. **Hennessy, K., Fennewald, S. & Kieff, E. (1985).** A third viral nuclear protein in lymphoblasts immortalized by Epstein-Barr virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82, pp. 5944-5948.
162. **Hennessy, K., Wang, F., Bushman, E. W. & Kieff, E. (1986).** Definitive identification of a member of the Epstein-Barr virus nuclear protein 3 family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, pp. 5693-5697.
163. **Hennino, A., Berard, M., Casamayor-Pallejà, M., Krammer, P. H. & Defrance, T. (2000).** Regulation of the Fas death pathway by FLICE-inhibitory protein in primary human B cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 165, pp. 3023-3030.
164. **Henriquez, N. V., Floettmann, E., Salmon, M., Rowe, M. & 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. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 162, pp. 3298-3307.
165. **Higuchi, M., Kieff, E. & 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. *Journal of virology*, 76, pp. 455-459.
166. **Hislop, A. D., Taylor, G. S., Sauce, D. & Rickinson, A.B. (2007).** Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annual review of immunology*, 25, pp. 587-617.
167. **Hitt, M. M., Allday, M. J., Hara, T., Karran, L., Jones, M. D., Busson, P., Tursz, T., Ernberg, I. & Griffin, B.E. (1989).** EBV gene expression in an NPC-related tumour. *The EMBO journal*, 8, pp. 2639-2651.
168. **Holley-Guthrie, E. A., Quinlivan, E. B., Mar, E. C. & Kenney, S. (1990).** The Epstein-Barr virus (EBV) BMRF1 promoter for early antigen (EA-D) is regulated by the

- EBV transactivators, BRLF1 and BZLF1, in a cell-specific manner. *Journal of virology*, 64, pp. 3753-3759.
169. **Hong, S. Y., Yoon, W. H., Park, J. H., Kang, S. G., Ahn, J. H. & 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. *The Journal of biological chemistry*, 275, pp. 18022-18028.
 170. **Howe, J. G. & Steitz, J.A. (1986).** Localization of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs by in situ hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, pp. 9006-9010.
 171. **Hsieh, J. J. & Hayward, S.D. (1995).** Masking of the CBF1/RBPJ kappa transcriptional repression domain by Epstein-Barr virus EBNA2. *Science*, 268, pp. 560-563.
 172. **Hsieh, J. J., Henkel, T., Salmon, P., Robey, E., Peterson, M. G. & Hayward, S.D. (1996).** Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. *Molecular and cellular biology*, 16, pp. 952-959.
 173. **Hu, S., Vincenz, C., Ni, J., Gentz, R. & Dixit, V.M. (1997).** I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 272, pp. 17255-17257.
 174. **Huen, D. S., Henderson, S. A., Croom-Carter, D. & 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, pp. 549-560.
 175. **Humme, S., Reisbach, G., Feederle, R., Delecluse, H., Bousset, K., Hammerschmidt, W. & Schepers, A. (2003).** The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, pp. 10989-10994.
 176. **Hummel, M. & Kieff, E. (1982).** Mapping of polypeptides encoded by the Epstein-Barr virus genome in productive infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, pp. 5698-5702.
 177. **Hung, S. C., Kang, M. S. & Kieff, E. (2001).** Maintenance of Epstein-Barr virus (EBV) oriP-based episomes requires EBV-encoded nuclear antigen-1 chromosome-binding domains, which can be replaced by high-mobility group-I or histone H1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, pp. 1865-1870.
 178. **Hutt-Fletcher, L. M. (2007).** Epstein-Barr virus entry. *Journal of virology*, 81, pp. 7825-7832.
 179. **Häcker, H. & Karin, M. (2002).** Is NF-kappaB2/p100 a direct activator of programmed cell death?. *Cancer cell*, 2, pp. 431-433.
 180. **Ikeda, A., Caldwell, R. G., Longnecker, R. & Ikeda, M. (2003).** Itchy, a Nedd4 ubiquitin ligase, downregulates latent membrane protein 2A activity in B-cell signaling. *Journal of virology*, 77, pp. 5529-5534.
 181. **Ikeda, F. & Dikic, I. (2006).** CYLD in ubiquitin signaling and tumor pathogenesis. *Cell*, 125, pp. 643-645.

182. **Imai, S., Nishikawa, J. & Takada, K. (1998).** Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells. *Journal of virology*, 72, pp. 4371-4378.
183. **Imai, S., Sugiura, M., Oikawa, O., Koizumi, S., Hirao, M., Kimura, H., Hayashibara, H., Terai, N., Tsutsumi, H., Oda, T., Chiba, S. & Osato, T. (1996).** Epstein-Barr virus (EBV)-carrying and -expressing T-cell lines established from severe chronic active EBV infection. *Blood*, 87, pp. 1446-1457.
184. **Inohara, N., Koseki, T., Hu, Y., Chen, S. & Núñez, G. (1997).** CLARP, a death effector domain-containing protein interacts with caspase-8 and regulates apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, pp. 10717-10722.
185. **Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schröter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E. & Tschopp, J. (1997).** Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 388, pp. 190-195.
186. **Izumi, K. M., Cahir McFarland, E. D., Riley, E. A., Rizzo, D., Chen, Y. & Kieff, E. (1999).** The residues between the two transformation effector sites of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 are not critical for B-lymphocyte growth transformation. *Journal of virology*, 73, pp. 9908-9916.
187. **Izumi, K. M., Cahir McFarland, E. D., Ting, A. T., Riley, E. A., Seed, B. & Kieff, E.D. (1999).** 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. *Molecular and cellular biology*, 19, pp. 5759-5767.
188. **Izumi, K. M., Kaye, K. M. & 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, pp. 1447-1452.
189. **Jat, P. & Arrand, J.R. (1982).** In vitro transcription of two Epstein-Barr virus specified small RNA molecules. *Nucleic acids research*, 10, pp. 3407-3425.
190. **Jiménez-Ramírez, C., Brooks, A. J., Forshell, L. P., Yakimchuk, K., Zhao, B., Fulgham, T. Z. & Sample, C.E. (2006).** Epstein-Barr virus EBNA-3C is targeted to and regulates expression from the bidirectional LMP-1/2B promoter. *Journal of virology*, 80, pp. 11200-11208.
191. **Jin, X. W. & 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. *Journal of virology*, 66, pp. 2846-2852.
192. **Johannsen, E., Koh, E., Mosialos, G., Tong, X., Kieff, E. & 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. *Journal of virology*, 69, pp. 253-262.
193. **Johannsen, E., Luftig, M., Chase, M. R., Weicksel, S., Cahir-McFarland, E., Illanes, D., Sarracino, D. & Kieff, E. (2004).** Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, pp. 16286-16291.

194. **Johannsen, E., Miller, C. L., Grossman, S. R. & Kieff, E. (1996).** EBNA-2 and EBNA-3C extensively and mutually exclusively associate with RBPJkappa in Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes. *Journal of virology*, 70, pp. 4179-4183.
195. **Jono, H., Lim, J. H., Chen, L., Xu, H., Trompouki, E., Pan, Z. K., Mosialos, G. & Li, J. (2004).** NF-kappaB is essential for induction of CYLD, the negative regulator of NF-kappaB: evidence for a novel inducible autoregulatory feedback pathway. *The Journal of biological chemistry*, 279, pp. 36171-36174.
196. **Kaiser, C., Laux, G., Eick, D., Jochner, N., Bornkamm, G. W. & Kempkes, B. (1999).** The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *Journal of virology*, 73, pp. 4481-4484.
197. **Kanda, T., Otter, M. & Wahl, G.M. (2001).** Coupling of mitotic chromosome tethering and replication competence in epstein-barr virus-based plasmids. *Molecular and cellular biology*, 21, pp. 3576-3588.
198. **Kanegane, H., Wado, T., Nunogami, K., Seki, H., Taniguchi, N. & Tosato, G. (1996).** Chronic persistent Epstein-Barr virus infection of natural killer cells and B cells associated with granular lymphocytes expansion. *British journal of haematology*, 95, pp. 116-122.
199. **Kanegane, H., Wang, F. & Tosato, G. (1996).** Virus-cell interactions in a natural killer-like cell line from a patient with lymphoblastic lymphoma. *Blood*, 88, pp. 4667-4675.
200. **Kapatai, G. & Murray, P. (2007).** Contribution of the Epstein Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *Journal of clinical pathology*, 60, pp. 1342-1349.
201. **Kapoor, P., Lavoie, B. D. & Frappier, L. (2005).** EBP2 plays a key role in Epstein-Barr virus mitotic segregation and is regulated by aurora family kinases. *Molecular and cellular biology*, 25, pp. 4934-4945.
202. **Kashuba, E., Mattsson, K., Pokrovskaja, K., Kiss, C., Protopopova, M., Ehlin-Henriksson, B., Klein, G. & Szekely, L. (2003).** EBV-encoded EBNA-5 associates with P14ARF in extranucleolar inclusions and prolongs the survival of P14ARF-expressing cells. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 105, pp. 644-653.
203. **Kaufmann, S. H. & Earnshaw, W.C. (2000).** Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental cell research*, 256, pp. 42-49.
204. **Kaul, R., Verma, S. C., Murakami, M., Lan, K., Choudhuri, T. & Robertson, E.S. (2006).** Epstein-Barr virus protein can upregulate cyclo-oxygenase-2 expression through association with the suppressor of metastasis Nm23-H1. *Journal of virology*, 80, pp. 1321-1331.
205. **Kawa-Ha, K., Ishihara, S., Ninomiya, T., Yumura-Yagi, K., Hara, J., Murayama, F., Tawa, A. & Hirai, K. (1989).** CD3-negative lymphoproliferative disease of granular lymphocytes containing Epstein-Barr viral DNA. *The Journal of clinical investigation*, 84, pp. 51-55.
206. **Kawaguchi, Y., Nakajima, K., Igarashi, M., Morita, T., Tanaka, M., Suzuki, M., Yokoyama, A., Matsuda, G., Kato, K., Kanamori, M. & Hirai, K. (2000).** Interaction of Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein (EBNA-LP) with HS1-associated protein X-1: implication of cytoplasmic function of EBNA-LP. *Journal of virology*, 74, pp. 10104-10111.

207. **Kaye, K. M., Izumi, K. M. & Kieff, E. (1993).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, pp. 9150-9154.
208. **Kaykas, A. & Sugden, B. (2000).** The amino-terminus and membrane-spanning domains of LMP-1 inhibit cell proliferation. *Oncogene*, 19, pp. 1400-1410.
209. **Kaykas, A., Worringer, K. & Sugden, B. (2002).** LMP-1's transmembrane domains encode multiple functions required for LMP-1's efficient signaling. *Journal of virology*, 76, pp. 11551-11560.
210. **Kempkes, B., Spitkovsky, D., Jansen-Dürr, P., Ellwart, J. W., Kremmer, E., Delecluse, H. J., Rottenberger, C., Bornkamm, G. W. & Hammerschmidt, W. (1995).** B-cell proliferation and induction of early G1-regulating proteins by Epstein-Barr virus mutants conditional for EBNA2. *The EMBO journal*, 14, pp. 88-96.
211. **Kenney, S., Kamine, J., Holley-Guthrie, E., Lin, J. C., Mar, E. C. & Pagano, J. (1989).** The Epstein-Barr virus (EBV) BZLF1 immediate-early gene product differentially affects latent versus productive EBV promoters. *Journal of virology*, 63, pp. 1729-1736.
212. **Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A.R. (1972).** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26, pp. 239-257.
213. **Kieff, E. (1996).** Epstein-Barr virus and its replication. In *Fields Virology* vol.2, 3rd edition. Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott-Raven, pp. 2343-2396
214. **Kienzle, N., Buck, M., Greco, S., Krauer, K. & Sculley, T.B. (1999).** Epstein-Barr virus-encoded RK-BARF0 protein expression. *Journal of virology*, 73, pp. 8902-8906.
215. **Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M. & Hammerschmidt, W. (1998).** Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *The EMBO journal*, 17, pp. 1700-1709.
216. **Kim, K. R., Yoshizaki, T., Miyamori, H., Hasegawa, K., Horikawa, T., Furukawa, M., Harada, S., Seiki, M. & 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, pp. 1764-1771.
217. **Kimura, H., Hoshino, Y., Kanegane, H., Tsuge, I., Okamura, T., Kawa, K. & Morishima, T. (2001).** Clinical and virologic characteristics of chronic active Epstein-Barr virus infection. *Blood*, 98, pp. 280-286.
218. **Kirch, H. C., Flaswinkel, S., Rumpf, H., Brockmann, D. & 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, pp. 2728-2738.
219. **Kis, L. L., Takahara, M., Nagy, N., Klein, G. & Klein, E. (2006).** IL-10 can induce the expression of EBV-encoded latent membrane protein-1 (LMP-1) in the absence of EBNA-2 in B lymphocytes and in Burkitt lymphoma- and NK lymphoma-derived cell lines. *Blood*, 107, pp. 2928-2935.
220. **Klein, S. C., Kube, D., Abts, H., Diehl, V. & Tesch, H. (1996).** Promotion of IL8, IL10, TNF alpha and TNF beta production by EBV infection. *Leukemia research*, 20, pp. 633-636.

221. **Knight, J. S. & Robertson, E.S. (2004).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C regulates cyclin A/p27 complexes and enhances cyclin A-dependent kinase activity. *Journal of virology*, 78, pp. 1981-1991.
222. **Knight, J. S., Lan, K., Subramanian, C. & Robertson, E.S. (2003).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C recruits histone deacetylase activity and associates with the corepressors mSin3A and NCoR in human B-cell lines. *Journal of virology*, 77, pp. 4261-4272.
223. **Knight, J. S., Sharma, N. & Robertson, E.S. (2005).** SCFSkp2 complex targeted by Epstein-Barr virus essential nuclear antigen. *Molecular and cellular biology*, 25, pp. 1749-1763.
224. **Knight, J. S., Sharma, N. & Robertson, E.S. (2005).** Epstein-Barr virus latent antigen 3C can mediate the degradation of the retinoblastoma protein through an SCF cellular ubiquitin ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, pp. 18562-18566.
225. **Knight, J. S., Sharma, N., Kalman, D. E. & Robertson, E.S. (2004).** A cyclin-binding motif within the amino-terminal homology domain of EBNA3C binds cyclin A and modulates cyclin A-dependent kinase activity in Epstein-Barr virus-infected cells. *Journal of virology*, 78, pp. 12857-12867.
226. **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. *Journal of virology*, 64, pp. 2530-2536.
227. **Komano, J., Maruo, S., Kurozumi, K., Oda, T. & Takada, K. (1999).** Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *Journal of virology*, 73, pp. 9827-9831.
228. **Kondo, S., Seo, S. Y., Yoshizaki, T., Wakisaka, N., Furukawa, M., Joab, I., Jang, K. L. & Pagano, J.S. (2006).** EBV latent membrane protein 1 up-regulates hypoxia-inducible factor 1alpha through Siah1-mediated down-regulation of prolyl hydroxylases 1 and 3 in nasopharyngeal epithelial cells. *Cancer research*, 66, pp. 9870-9877.
229. **Krauer, K. G., Burgess, A., Buck, M., Flanagan, J., Sculley, T. B. & Gabrielli, B. (2004).** The EBNA-3 gene family proteins disrupt the G2/M checkpoint. *Oncogene*, 23, pp. 1342-1353.
230. **Kraus, R. J., Perrigoue, J. G. & Mertz, J.E. (2003).** ZEB negatively regulates the lytic-switch BZLF1 gene promoter of Epstein-Barr virus. *Journal of virology*, 77, pp. 199-207.
231. **Kreuz, S., Siegmund, D., Scheurich, P. & Wajant, H. (2001).** NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Molecular and cellular biology*, 21, pp. 3964-3973.
232. **Kroemer, G. (2003).** Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochemical and biophysical research communications*, 304, pp. 433-435.
233. **Kucharczak, J., Simmons, M. J., Fan, Y. & Gélinas, C. (2003).** To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene*, 22, pp. 8961-8982.
234. **Kuppers, D. A., Lan, K., Knight, J. S. & Robertson, E.S. (2005).** Regulation of matrix metalloproteinase 9 expression by Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and the suppressor of metastasis Nm23-H1. *Journal of virology*, 79, pp. 9714-9724.

235. **Kurth, J., Hansmann, M., Rajewsky, K. & Küppers, R. (2003).** Epstein-Barr virus-infected B cells expanding in germinal centers of infectious mononucleosis patients do not participate in the germinal center reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, pp. 4730-4735.
236. **Kurth, J., Spieker, T., Wustrow, J., Strickler, G. J., Hansmann, L. M., Rajewsky, K. & Küppers, R. (2000).** EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: viral strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency. *Immunity*, 13, pp. 485-495.
237. **Kusano, S. & Raab-Traub, N. (2001).** An Epstein-Barr virus protein interacts with Notch. *Journal of virology*, 75, pp. 384-395.
238. **Laherty, C. D., Hu, H. M., Opipari, A. W., Wang, F. & Dixit, V.M. (1992).** The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *The Journal of biological chemistry*, 267, pp. 24157-24160.
239. **Lam, N., Sandberg, M. L. & Sugden, B. (2004).** High physiological levels of LMP1 result in phosphorylation of eIF2 alpha in Epstein-Barr virus-infected cells. *Journal of virology*, 78, pp. 1657-1664.
240. **Lambert, S. L. & Martinez, O.M. (2007).** Latent membrane protein 1 of EBV activates phosphatidylinositol 3-kinase to induce production of IL-10. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179, pp. 8225-8234.
241. **Larochelle, B., Flamand, L., Gourde, P., Beauchamp, D. & Gosselin, J. (1998).** Epstein-Barr virus infects and induces apoptosis in human neutrophils. *Blood*, 92, pp. 291-299.
242. **Laux, G., Adam, B., Strobl, L. J. & Moreau-Gachelin, F. (1994).** 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. *The EMBO journal*, 13, pp. 5624-5632.
243. **Laux, G., Dugrillon, F., Eckert, C., Adam, B., Zimmer-Strobl, U. & Bornkamm, G.W. (1994).** 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. *Journal of virology*, 68, pp. 6947-6958.
244. **Laux, G., Perricaudet, M. & Farrell, P.J. (1988).** A spliced Epstein-Barr virus gene expressed in immortalized lymphocytes is created by circularization of the linear viral genome. *The EMBO journal*, 7, pp. 769-774.
245. **Le Clorennec, C., Ouk, T., Youlyouz-Marfak, I., Panteix, S., Martin, C., Rastelli, J., Adriaenssens, E., Zimmer-Strobl, U., Coll, J., Feuillard, J. & Jayat-Vignoles, C. (2008).** Molecular basis of cytotoxicity of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 (LMP1) in EBV latency III B cells: LMP1 induces type II ligand-independent autoactivation of CD95/Fas with caspase 8-mediated apoptosis. *Journal of virology*, 82, pp. 6721-6733.
246. **Le Clorennec, C., Youlyouz-Marfak, I., Adriaenssens, E., Coll, J., Bornkamm, G. W. & 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, pp. 2070-2078.

247. **Le Roux, A., Kerdiles, B., Walls, D., Dedieu, J. F. & Perricaudet, M. (1994).** The Epstein-Barr virus determined nuclear antigens EBNA-3A, -3B, and -3C repress EBNA-2-mediated transactivation of the viral terminal protein 1 gene promoter. *Virology*, 205, pp. 596-602.
248. **Lee, D. Y. & Sugden, B. (2008).** The latent membrane protein 1 oncogene modifies B-cell physiology by regulating autophagy. *Oncogene*, 27, pp. 2833-2842.
249. **Lee, D. Y. & Sugden, B. (2008).** The LMP1 oncogene of EBV activates PERK and the unfolded protein response to drive its own synthesis. *Blood*, 111, pp. 2280-2289.
250. **Lee, R. J., Albanese, C., Stenger, R. J., Watanabe, G., Inghirami, G., Haines, G. K. 3., Webster, M., Muller, W. J., Brugge, J. S., Davis, R. J. & Pestell, R.G. (1999).** pp60(v-src) induction of cyclin D1 requires collaborative interactions between the extracellular signal-regulated kinase, p38, and Jun kinase pathways. A role for cAMP response element-binding protein and activating transcription factor-2 in pp60(v-src) signaling in breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 274, pp. 7341-7350.
251. **Lee, S. K., Kim, J. H., Lee, Y. C., Cheong, J. & Lee, J.W. (2000).** Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors, as a novel transcriptional corepressor molecule of activating protein-1, nuclear factor-kappaB, and serum response factor. *The Journal of biological chemistry*, 275, pp. 12470-12474.
252. **Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P. M., Klein, G., Kurilla, M. G. & Masucci, M.G. (1995).** Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature*, 375, pp. 685-688.
253. **Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A. & 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, pp. 12616-12621.
254. **Li, H. M., Zhuang, Z. H., Wang, Q., Pang, J. C. S., Wang, X. H., Wong, H. L., Feng, H. C., Jin, D. Y., Ling, M. T., Wong, Y. C., Eliopoulos, A. G., Young, L. S., Huang, D. P. & Tsao, S.W. (2004).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) upregulates Id1 expression in nasopharyngeal epithelial cells. *Oncogene*, 23, pp. 4488-4494.
255. **Li, L., Guo, L., Tao, Y., Zhou, S., Wang, Z., Luo, W., Hu, D., Li, Z., Xiao, L., Tang, M., Yi, W., Tsao, S. W. & Cao, Y. (2007).** Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus regulates p53 phosphorylation through MAP kinases. *Cancer letters*, 255, pp. 219-231.
256. **Lindhult, T., Adams, A., Bjursell, G., Bornkamm, G. W., Kaschka-Dierich, C. & Jehn, U. (1976).** Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line. *Journal of molecular biology*, 102, pp. 511-530.
257. **Lindhout, E., Lakeman, A., Mevissen, M. L. & de Groot, C. (1994).** Functionally active Epstein-Barr virus-transformed follicular dendritic cell-like cell lines. *The Journal of experimental medicine*, 179, pp. 1173-1184.
258. **Lindner, S. E. & Sugden, B. (2007).** The plasmid replicon of Epstein-Barr virus: mechanistic insights into efficient, licensed, extrachromosomal replication in human cells. *Plasmid*, 58, pp. 1-12.
259. **Ling, P. D., Hsieh, J. J., Ruf, I. K., Rawlins, D. R. & Hayward, S.D. (1994).** EBNA-2 upregulation of Epstein-Barr virus latency promoters and the cellular CD23

- promoter utilizes a common targeting intermediate, CBF1. *Journal of virology*, 68, pp. 5375-5383.
260. **Ling, P. D., Peng, R. S., Nakajima, A., Yu, J. H., Tan, J., Moses, S. M., Yang, W., Zhao, B., Kieff, E., Bloch, K. D. & Bloch, D.B. (2005).** Mediation of Epstein-Barr virus EBNA-LP transcriptional coactivation by Sp100. *The EMBO journal*, 24, pp. 3565-3575.
 261. **Ling, P. D., Ryon, J. J. & Hayward, S.D. (1993).** EBNA-2 of herpesvirus papio diverges significantly from the type A and type B EBNA-2 proteins of Epstein-Barr virus but retains an efficient transactivation domain with a conserved hydrophobic motif. *Journal of virology*, 67, pp. 2990-3003.
 262. **Liu, L., Peng, J., Chang, H. & Hung, W. (2003).** RECK is a target of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *Oncogene*, 22, pp. 8263-8270.
 263. **Lo, A. K. F., To, K. F., Lo, K. W., Lung, R. W. M., Hui, J. W. Y., Liao, G. & Hayward, S.D. (2007).** Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, pp. 16164-16169.
 264. **Longnecker, R. & Kieff, E. (1990).** A second Epstein-Barr virus membrane protein (LMP2) is expressed in latent infection and colocalizes with LMP1. *Journal of virology*, 64, pp. 2319-2326.
 265. **Longnecker, R., Druker, B., Roberts, T. M. & Kieff, E. (1991).** An Epstein-Barr virus protein associated with cell growth transformation interacts with a tyrosine kinase. *Journal of virology*, 65, pp. 3681-3692.
 266. **Longnecker, R., Miller, C. L., Miao, X. Q., Marchini, A. & Kieff, E. (1992).** The only domain which distinguishes Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A (LMP2A) from LMP2B is dispensable for lymphocyte infection and growth transformation in vitro; LMP2A is therefore nonessential. *Journal of virology*, 66, pp. 6461-6469.
 267. **Longnecker, R., Miller, C. L., Miao, X. Q., Tomkinson, B. & Kieff, E. (1993).** The last seven transmembrane and carboxy-terminal cytoplasmic domains of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2 (LMP2) are dispensable for lymphocyte infection and growth transformation in vitro. *Journal of virology*, 67, pp. 2006-2013.
 268. **Longnecker, R., Miller, C. L., Tomkinson, B., Miao, X. Q. & Kieff, E. (1993).** Deletion of DNA encoding the first five transmembrane domains of Epstein-Barr virus latent membrane proteins 2A and 2B. *Journal of virology*, 67, pp. 5068-5074.
 269. **Lu, J., Chua, H., Chen, S., Chen, J. & Tsai, C. (2003).** Regulation of matrix metalloproteinase-1 by Epstein-Barr virus proteins. *Cancer research*, 63, pp. 256-262.
 270. **Luftig, M., Prinarakis, E., Yasui, T., Tsihritzis, T., Cahir-McFarland, E., Inoue, J., Nakano, H., Mak, T. W., Yeh, W., Li, X., Akira, S., Suzuki, N., Suzuki, S., Mosialos, G. & Kieff, E. (2003).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activation of NF-kappaB through IRAK1 and TRAF6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, pp. 15595-15600.
 271. **Luftig, M., Yasui, T., Soni, V., Kang, M., Jacobson, N., Cahir-McFarland, E., Seed, B. & Kieff, E. (2004).** Epstein-Barr virus latent infection membrane protein 1 TRAF-binding site induces NIK/IKK alpha-dependent noncanonical NF-kappaB activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, pp. 141-146.

272. **Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C. & 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, pp. 481-490.
273. **Lupton, S. & Levine, A.J. (1985).** Mapping genetic elements of Epstein-Barr virus that facilitate extrachromosomal persistence of Epstein-Barr virus-derived plasmids in human cells. *Molecular and cellular biology*, 5, pp. 2533-2542.
274. **Lynch, D. T., Zimmerman, J. S. & Rowe, D.T. (2002).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 2B (LMP2B) co-localizes with LMP2A in perinuclear regions in transiently transfected cells. *The Journal of general virology*, 83, pp. 1025-1035.
275. **Maini, M. K., Gudgeon, N., Wedderburn, L. R., Rickinson, A. B. & Beverley, P.C. (2000).** Clonal expansions in acute EBV infection are detectable in the CD8 and not the CD4 subset and persist with a variable CD45 phenotype. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 165, pp. 5729-5737.
276. **Mainou, B. A., Everly, D. N. J. & Raab-Traub, N. (2005).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 CTAR1 mediates rodent and human fibroblast transformation through activation of PI3K. *Oncogene*, 24, pp. 6917-6924.
277. **Mainou, B. A., Everly, D. N. J. & Raab-Traub, N. (2007).** Unique signaling properties of CTAR1 in LMP1-mediated transformation. *Journal of virology*, 81, pp. 9680-9692.
278. **Mannick, J. B., Cohen, J. I., Birkenbach, M., Marchini, A. & Kieff, E. (1991).** The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation. *Journal of virology*, 65, pp. 6826-6837.
279. **Marechal, V., Dehee, A., Chikhi-Brachet, R., Piolot, T., Coppey-Moisan, M. & Nicolas, J.C. (1999).** Mapping EBNA-1 domains involved in binding to metaphase chromosomes. *Journal of virology*, 73, pp. 4385-4392.
280. **Marshall, D. & Sample, C. (1995).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C is a transcriptional regulator. *Journal of virology*, 69, pp. 3624-3630.
281. **Martin, D. A., Siegel, R. M., Zheng, L. & Lenardo, M.J. (1998).** Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8 (FLICE/MACHalpha1) death signal. *The Journal of biological chemistry*, 273, pp. 4345-4349.
282. **Masy, E., Adriaenssens, E., Montpellier, C., Crépieux, P., Mougel, A., Quatannens, B., Goormachtigh, G., Faumont, N., Meggetto, F., Auriault, C., Groux, H. & Coll, J. (2002).** Human monocytic cell lines transformed in vitro by Epstein-Barr virus display a type II latency and LMP-1-dependent proliferation. *Journal of virology*, 76, pp. 6460-6472.
283. **Matsuda, G., Nakajima, K., Kawaguchi, Y., Yamanashi, Y. & Hirai, K. (2003).** Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen leader protein (EBNA-LP) forms complexes with a cellular anti-apoptosis protein Bcl-2 or its EBV counterpart BHRF1 through HS1-associated protein X-1. *Microbiology and immunology*, 47, pp. 91-99.
284. **Matsukawa, J., Matsuzawa, A., Takeda, K. & Ichijo, H. (2004).** The ASK1-MAP kinase cascades in mammalian stress response. *J Biochem*, 136, pp. 261-265.
285. **McCann, E. M., Kelly, G. L., Rickinson, A. B. & Bell, A.I. (2001).** Genetic analysis of the Epstein-Barr virus-coded leader protein EBNA-LP as a co-activator of EBNA2 function. *The Journal of general virology*, 82, pp. 3067-3079.

286. **McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Chappell, W. H., Abrams, S. L., Wong, E. W. T., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D. M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A. M. & Franklin, R.A. (2007).** Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et biophysica acta*, 1773, pp. 1263-1284.
287. **Meier, F., Schitteck, B., Busch, S., Garbe, C., Smalley, K., Satyamoorthy, K., Li, G. & Herlyn, M. (2005).** The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 10, pp. 2986-3001.
288. **Menet, A., Speth, C., Larcher, C., Proding, W. M., Schwendinger, M. G., Chan, P., Jäger, M., Schwarzmann, F., Recheis, H., Fontaine, M. & Dierich, M.P. (1999).** Epstein-Barr virus infection of human astrocyte cell lines. *Journal of virology*, 73, pp. 7722-7733.
289. **Messmer, U. K. & Pfeilschifter, J. (2000).** New insights into the mechanism for clearance of apoptotic cells. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 22, pp. 878-881.
290. **Micheau, O., Lens, S., Gaide, O., Alevizopoulos, K. & Tschopp, J. (2001).** NF-kappaB signals induce the expression of c-FLIP. *Molecular and cellular biology*, 21, pp. 5299-5305.
291. **Micheau, O., Solary, E., Hammann, A. & Dimanche-Boitrel, M.T. (1999).** Fas ligand-independent, FADD-mediated activation of the Fas death pathway by anticancer drugs. *The Journal of biological chemistry*, 274, pp. 7987-7992.
292. **Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschopp, J., Nicholson, D. W., Briand, C. & Grütter, M.G. (2002).** The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *The Journal of biological chemistry*, 277, pp. 45162-45171.
293. **Middeldorp, J. M., Brink, A. A. T. P., van den Brule, A. J. C. & Meijer, C.J.L.M. (2003).** Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Critical reviews in oncology/hematology*, 45, pp. 1-36.
294. **Miller, C. L., Burkhardt, A. L., Lee, J. H., Stealey, B., Longnecker, R., Bolen, J. B. & 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, pp. 155-166.
295. **Miller, C. L., Lee, J. H., Kieff, E. & Longnecker, R. (1994).** An integral membrane protein (LMP2) blocks reactivation of Epstein-Barr virus from latency following surface immunoglobulin crosslinking. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, pp. 772-776.
296. **Miller, C. L., Longnecker, R. & Kieff, E. (1993).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A blocks calcium mobilization in B lymphocytes. *Journal of virology*, 67, pp. 3087-3094.
297. **Miyashita, T. & Reed, J.C. (1995).** Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 80, pp. 293-299.
298. **Molesworth, S. J., Lake, C. M., Borza, C. M., Turk, S. M. & 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. *Journal of virology*, 74, pp. 6324-6332.

299. **Moore, P. S., Gao, S. J., Dominguez, G., Cesarman, E., Lungu, O., Knowles, D. M., Garber, R., Pellett, P. E., McGeoch, D. J. & Chang, Y. (1996).** Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcomae. *Journal of virology*, *70*, pp. 549-558.
300. **Moorthy, R. K. & Thorley-Lawson, D.A. (1993).** Biochemical, genetic, and functional analyses of the phosphorylation sites on the Epstein-Barr virus-encoded oncogenic latent membrane protein LMP-1. *Journal of virology*, *67*, pp. 2637-2645.
301. **Mori, N., Morishita, M., Tsukazaki, T. & Yamamoto, N. (2003).** Repression of Smad-dependent transforming growth factor-beta signaling by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 through nuclear factor-kappaB. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, *105*, pp. 661-668.
302. **Morris, M. A., Young, L. S. & Dawson, C.W. (2008).** DNA tumour viruses promote tumour cell invasion and metastasis by deregulating the normal processes of cell adhesion and motility. *European journal of cell biology*, *87*, pp. 677-697.
303. **Morrison, J. A., Klingelutz, A. J. & Raab-Traub, N. (2003).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A activates beta-catenin signaling in epithelial cells. *Journal of virology*, *77*, pp. 12276-12284.
304. **Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C. & Kieff, E. (1995).** The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell*, *80*, pp. 389-399.
305. **Mueller-Lantzsch, N., Lenoir, G. M., Sauter, M., Takaki, K., Béchet, J. M., Kuklik-Roos, C., Wunderlich, D. & Bornkamm, G.W. (1985).** Identification of the coding region for a second Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA 2) by transfection of cloned DNA fragments. *The EMBO journal*, *4*, pp. 1805-1811.
306. **Mullen, M. M., Haan, K. M., Longnecker, R. & Jardetzky, T.S. (2002).** Structure of the Epstein-Barr virus gp42 protein bound to the MHC class II receptor HLA-DR1. *Molecular cell*, *9*, pp. 375-385.
307. **Murono, S., Inoue, H., Tanabe, T., Joab, I., Yoshizaki, T., Furukawa, M. & 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*, pp. 6905-6910.
308. **Murono, S., Yoshizaki, T., Sato, H., Takeshita, H., Furukawa, M. & Pagano, J.S. (2000).** Aspirin inhibits tumor cell invasiveness induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 through suppression of matrix metalloproteinase-9 expression. *Cancer research*, *60*, pp. 2555-2561.
309. **Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S. & Dixit, V.M. (1998).** An induced proximity model for caspase-8 activation. *The Journal of biological chemistry*, *273*, pp. 2926-2930.
310. **Müller, M., Wilder, S., Bannasch, D., Israeli, D., Lehlbach, K., Li-Weber, M., Friedman, S. L., Galle, P. R., Stremmel, W., Oren, M. & Krammer, P.H. (1998).** p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *The Journal of experimental medicine*, *188*, pp. 2033-2045.

311. **Münz, C. (2004).** Epstein-barr virus nuclear antigen 1: from immunologically invisible to a promising T cell target. *The Journal of experimental medicine*, 199, pp. 1301-1304.
312. **Najjar, I., Baran-Marszak, F., Le Cloennec, C., Laguillier, C., Schischmanoff, O., Youlyouz-Marfak, I., Schlee, M., Bornkamm, G. W., Raphaël, M., Feuillard, J. & Fagard, R. (2005).** Latent membrane protein 1 regulates STAT1 through NF-kappaB-dependent interferon secretion in Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *Journal of virology*, 79, pp. 4936-4943.
313. **Nakayama, T., Hieshima, K., Nagakubo, D., Sato, E., Nakayama, M., Kawa, K. & 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. *Journal of virology*, 78, pp. 1665-1674.
314. **Ning, S., Hahn, A. M., Huye, L. E. & Pagano, J.S. (2003).** Interferon regulatory factor 7 regulates expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1: a regulatory circuit. *Journal of virology*, 77, pp. 9359-9368.
315. **Nishikawa, J., Kis, L. L., Liu, A., Zhang, X., Takahara, M., Bandobashi, K., Kiss, C., Nagy, N., Okita, K., Klein, G. & Klein, E. (2004).** Upregulation of LMP1 expression by histone deacetylase inhibitors in an EBV carrying NPC cell line. *Virus genes*, 28, pp. 121-128.
316. **Nitsche, F., Bell, A. & 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. *Journal of virology*, 71, pp. 6619-6628.
317. **Nitta, T., Chiba, A., Yamashita, A., Rowe, M., Israël, A., Reth, M., Yamamoto, N. & Yamaoka, S. (2003).** NF-kappaB is required for cell death induction by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *Cellular signalling*, 15, pp. 423-433.
318. **Nonkwelo, C., Skinner, J., Bell, A., Rickinson, A. & 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. *Journal of virology*, 70, pp. 623-627.
319. **Ohtani, N., Brennan, P., Gaubatz, S., Sanij, E., Hertzog, P., Wolvetang, E., Ghysdael, J., Rowe, M. & Hara, E. (2003).** Epstein-Barr virus LMP1 blocks p16INK4a-RB pathway by promoting nuclear export of E2F4/5. *The Journal of cell biology*, 162, pp. 173-183.
320. **Okudaira, T., Yamamoto, K., Kawakami, H., Uchihara, J., Tomita, M., Masuda, M., Matsuda, T., Sairenji, T., Iha, H., Jeang, K., Matsuyama, T., Takasu, N. & Mori, N. (2006).** Transactivation of CCL20 gene by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *British journal of haematology*, 132, pp. 293-302.
321. **Olave, I., Reinberg, D. & Vales, L.D. (1998).** The mammalian transcriptional repressor RBP (CBF1) targets TFIID and TFIIA to prevent activated transcription. *Genes & development*, 12, pp. 1621-1637.
322. **Packham, G., Economou, A., Rooney, C. M., Rowe, D. T. & Farrell, P.J. (1990).** Structure and function of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein. *Journal of virology*, 64, pp. 2110-2116.
323. **Pai, S. & Khanna, R. (2001).** Role of LMP1 in immune control of EBV infection. *Seminars in cancer biology*, 11, pp. 455-460.

324. **Pandya, J. & 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. *Journal of virology*, 78, pp. 8404-8410.
325. **Pandya, J. & Walling, D.M. (2006).** Oncogenic activity of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP-1) is down-regulated by lytic LMP-1. *Journal of virology*, 80, pp. 8038-8046.
326. **Papa, S., Zazzeroni, F., Pham, C. G., Bubici, C. & Franzoso, G. (2004).** Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival. *Journal of cell science*, 117, pp. 5197-5208.
327. **Papoff, G., Hausler, P., Eramo, A., Pagano, M. G., Di Leve, G., Signore, A. & Ruberti, G. (1999).** Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *The Journal of biological chemistry*, 274, pp. 38241-38250.
328. **Park, J. H. & 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, pp. 345-363.
329. **Parker, G. A., Crook, T., Bain, M., Sara, E. A., Farrell, P. J. & 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, pp. 2541-2549.
330. **Parker, G. A., Touitou, R. & Allday, M.J. (2000).** Epstein-Barr virus EBNA3C can disrupt multiple cell cycle checkpoints and induce nuclear division divorced from cytokinesis. *Oncogene*, 19, pp. 700-709.
331. **Parlato, S., Giammarioli, A. M., Logozzi, M., Lozupone, F., Matarrese, P., Luciani, F., Falchi, M., Malorni, W. & 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. *The EMBO journal*, 19, pp. 5123-5134.
332. **Parone, P. A., James, D. & Martinou, J.C. (2002).** Mitochondria: regulating the inevitable. *Biochimie*, 84, pp. 105-111.
333. **Pegtel, D. M., Subramanian, A., Sheen, T., Tsai, C., Golub, T. R. & Thorley-Lawson, D.A. (2005).** Epstein-Barr-virus-encoded LMP2A induces primary epithelial cell migration and invasion: possible role in nasopharyngeal carcinoma metastasis. *Journal of virology*, 79, pp. 15430-15442.
334. **Peng, R., Tan, J. & 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. *Journal of virology*, 74, pp. 9953-9963.
335. **Perkins, N. D. (2007).** Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8, pp. 49-62.
336. **Peter, M. E., Budd, R. C., Desbarats, J., Hedrick, S. M., Hueber, A., Newell, M. K., Owen, L. B., Pope, R. M., Tschopp, J., Wajant, H., Wallach, D., Wiltrout, R. H., Zörnig, M. & Lynch, D.H. (2007).** The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell*, 129, pp. 447-450.
337. **Pfeffer, S., Zavolan, M., Grässer, F. A., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., John, B., Enright, A. J., Marks, D., Sander, C. & Tuschl, T. (2004).** Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, 304, pp. 734-736.

338. **Pokrovskaja, K., Ehlin-Henriksson, B., Kiss, C., Challa, A., Gordon, J., Gogolak, P., Klein, G. & Szekely, L. (2002).** CD40 ligation downregulates EBNA-2 and LMP-1 expression in EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 99, pp. 705-712.
339. **Pope, J. H., Horne, M. K. & Scott, W. (1968).** Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 3, pp. 857-866.
340. **Portis, T. & Longnecker, R. (2004).** Epstein-Barr virus (EBV) LMP2A mediates B-lymphocyte survival through constitutive activation of the Ras/PI3K/Akt pathway. *Oncogene*, 23, pp. 8619-8628.
341. **Prince, S., Keating, S., Fielding, C., Brennan, P., Floettmann, E. & Rowe, M. (2003).** Latent membrane protein 1 inhibits Epstein-Barr virus lytic cycle induction and progress via different mechanisms. *Journal of virology*, 77, pp. 5000-5007.
342. **Prokova, V., Mosialos, G. & Kardassis, D. (2002).** Inhibition of transforming growth factor beta signaling and Smad-dependent activation of transcription by the Latent Membrane Protein 1 of Epstein-Barr virus. *The Journal of biological chemistry*, 277, pp. 9342-9350.
343. **Puls, A., Eliopoulos, A. G., Nobes, C. D., Bridges, T., Young, L. S. & 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. *Journal of cell science*, 112 (Pt 17), pp. 2983-2992.
344. **Pöppelmann, B., Klimmek, K., Strozyk, E., Voss, R., Schwarz, T. & Kulms, D. (2005).** NF- κ B-dependent down-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated proteins contributes to interleukin-1-mediated enhancement of ultraviolet B-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry*, 280, pp. 15635-15643.
345. **Qu, L. & Rowe, D.T. (1992).** Epstein-Barr virus latent gene expression in uncultured peripheral blood lymphocytes. *Journal of virology*, 66, pp. 3715-3724.
346. **Raab-Traub, N., Dambaugh, T. & Kieff, E. (1980).** DNA of Epstein-Barr virus VIII: B95-8, the previous prototype, is an unusual deletion derivative. *Cell*, 22, pp. 257-267.
347. **Radhakrishnan, S. K. & Kamalakaran, S. (2006).** Pro-apoptotic role of NF- κ B: implications for cancer therapy. *Biochimica et biophysica acta*, 1766, pp. 53-62.
348. **Radkov, S. A., Bain, M., Farrell, P. J., West, M., Rowe, M. & Allday, M.J. (1997).** Epstein-Barr virus EBNA3C represses Cp, the major promoter for EBNA expression, but has no effect on the promoter of the cell gene CD21. *Journal of virology*, 71, pp. 8552-8562.
349. **Radkov, S. A., Touitou, R., Brehm, A., Rowe, M., West, M., Kouzarides, T. & Allday, M.J. (1999).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with histone deacetylase to repress transcription. *Journal of virology*, 73, pp. 5688-5697.
350. **Ragoczy, T. & Miller, G. (1999).** Role of the Epstein-Barr virus RTA protein in activation of distinct classes of viral lytic cycle genes. *Journal of virology*, 73, pp. 9858-9866.
351. **Ragoczy, T. & Miller, G. (2001).** Autostimulation of the Epstein-Barr virus BRLF1 promoter is mediated through consensus Sp1 and Sp3 binding sites. *Journal of virology*, 75, pp. 5240-5251.

352. **Rawlings, J. S., Rosler, K. M. & Harrison, D.A. (2004).** The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of cell science*, 117, pp. 1281-1283.
353. **Rechsteiner, M. P., Berger, C., Weber, M., Sigrist, J. A., Nadal, D. & Bernasconi, M. (2007).** Silencing of latent membrane protein 2B reduces susceptibility to activation of lytic Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma Akata cells. *The Journal of general virology*, 88, pp. 1454-1459.
354. **Rechsteiner, M. P., Bernasconi, M., Berger, C. & Nadal, D. (2008).** Role of latent membrane protein 2 isoforms in Epstein-Barr virus latency. *Trends in microbiology*, , .
355. **Revoltella, R. P., Vigneti, E., Fruscalzo, A., Park, M., Ragona, G., Rocchi, G. & 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. *The Journal of general virology*, 70 (Pt 5), pp. 1203-1215.
356. **Roberts, M. L. & Cooper, N.R. (1998).** Activation of a ras-MAPK-dependent pathway by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for cellular transformation. *Virology*, 240, pp. 93-99.
357. **Robertson, E. S., Grossman, S., Johannsen, E., Miller, C., Lin, J., Tomkinson, B. & Kieff, E. (1995).** Epstein-Barr virus nuclear protein 3C modulates transcription through interaction with the sequence-specific DNA-binding protein J kappa. *Journal of virology*, 69, pp. 3108-3116.
358. **Robertson, E. S., Lin, J. & Kieff, E. (1996).** The amino-terminal domains of Epstein-Barr virus nuclear proteins 3A, 3B, and 3C interact with RBPJ(kappa). *Journal of virology*, 70, pp. 3068-3074.
359. **Robertson, E. S., Tomkinson, B. & Kieff, E. (1994).** An Epstein-Barr virus with a 58-kilobase-pair deletion that includes BARF0 transforms B lymphocytes in vitro. *Journal of virology*, 68, pp. 1449-1458.
360. **Rocha, S., Martin, A. M., Meek, D. W. & Perkins, N.D. (2003).** p53 represses cyclin D1 transcription through down regulation of Bcl-3 and inducing increased association of the p52 NF-kappaB subunit with histone deacetylase 1. *Molecular and cellular biology*, 23, pp. 4713-4727.
361. **Rosa, M. D., Gottlieb, E., Lerner, M. R. & Steitz, J.A. (1981).** Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII. *Molecular and cellular biology*, 1, pp. 785-796.
362. **Rowe, D. T., Rowe, M., Evan, G. I., Wallace, L. E., Farrell, P. J. & Rickinson, A.B. (1986).** Restricted expression of EBV latent genes and T-lymphocyte-detected membrane antigen in Burkitt's lymphoma cells. *The EMBO journal*, 5, pp. 2599-2607.
363. **Rowe, M., Khanna, R., Jacob, C. A., Argaet, V., Kelly, A., Powis, S., Belich, M., Croom-Carter, D., Lee, S., Burrows, S. R. & et al. (1995).** Restoration of endogenous antigen processing in Burkitt's lymphoma cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1: coordinate up-regulation of peptide transporters and HLA-class I antigen expression. *European journal of immunology*, 25, pp. 1374-1384.
364. **Rowe, M., Rowe, D. T., Gregory, C. D., Young, L. S., Farrell, P. J., Rupani, H. & Rickinson, A.B. (1987).** Differences in B cell growth phenotype reflect novel patterns of Epstein-Barr virus latent gene expression in Burkitt's lymphoma cells. *The EMBO journal*, 6, pp. 2743-2751.

365. **Rowe, M., Young, L. S., Cadwallader, K., Petti, L., Kieff, E. & Rickinson, A.B. (1989).** Distinction between Epstein-Barr virus type A (EBNA 2A) and type B (EBNA 2B) isolates extends to the EBNA 3 family of nuclear proteins. *Journal of virology*, 63, pp. 1031-1039.
366. **Ruf, I. K., Rhyne, P. W., Yang, C., Cleveland, J. L. & Sample, J.T. (2000).** Epstein-Barr virus small RNAs potentiate tumorigenicity of Burkitt lymphoma cells independently of an effect on apoptosis. *Journal of virology*, 74, pp. 10223-10228.
367. **Ryan, K. M., Ernst, M. K., Rice, N. R. & Vousden, K.H. (2000).** Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. *Nature*, 404, pp. 892-897.
368. **Rymo, L. (1979).** Identification of transcribed regions of Epstein-Barr virus DNA in Burkitt lymphoma-derived cells. *Journal of virology*, 32, pp. 8-18.
369. **Sadler, R. H. & Raab-Traub, N. (1995).** Structural analyses of the Epstein-Barr virus BamHI A transcripts. *Journal of virology*, 69, pp. 1132-1141.
370. **Sample, J., Henson, E. B. & Sample, C. (1992).** The Epstein-Barr virus nuclear protein 1 promoter active in type I latency is autoregulated. *Journal of virology*, 66, pp. 4654-4661.
371. **Sample, J., Hummel, M., Braun, D., Birkenbach, M. & Kieff, E. (1986).** Nucleotide sequences of mRNAs encoding Epstein-Barr virus nuclear proteins: a probable transcriptional initiation site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, pp. 5096-5100.
372. **Sample, J., Liebowitz, D. & Kieff, E. (1989).** Two related Epstein-Barr virus membrane proteins are encoded by separate genes. *Journal of virology*, 63, pp. 933-937.
373. **Sample, J., Young, L., Martin, B., Chatman, T., Kieff, E., Rickinson, A. & Kieff, E. (1990).** Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *Journal of virology*, 64, pp. 4084-4092.
374. **Samuels, Y. & Ericson, K. (2006).** Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Current opinion in oncology*, 18, pp. 77-82.
375. **Sandberg, M. L., Kaykas, A. & Sugden, B. (2000).** Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus inhibits as well as stimulates gene expression. *Journal of virology*, 74, pp. 9755-9761.
376. **Savard, M., Bélanger, C., Tardif, M., Gourde, P., Flamand, L. & Gosselin, J. (2000).** Infection of primary human monocytes by Epstein-Barr virus. *Journal of virology*, 74, pp. 2612-2619.
377. **Schaefer, B. C., Strominger, J. L. & Speck, S.H. (1995).** Redefining the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-1 gene promoter and transcription initiation site in group I Burkitt lymphoma cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, pp. 10565-10569.
378. **Schattner, E. J., Elkon, K. B., Yoo, D. H., Tumang, J., Krammer, P. H., Crow, M. K. & Friedman, S.M. (1995).** CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas pathway. *The Journal of experimental medicine*, 182, pp. 1557-1565.
379. **Schepers, A., Ritzi, M., Bousset, K., Kremmer, E., Yates, J. L., Harwood, J., Diffley, J. F. & Hammerschmidt, W. (2001).** Human origin recognition complex binds to

- the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *The EMBO journal*, 20, pp. 4588-4602.
380. **Schlager, S., Speck, S. H. & Woisetschläger, M. (1996).** Transcription of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) gene occurs before induction of the BCR2 (Cp) EBNA gene promoter during the initial stages of infection in B cells. *Journal of virology*, 70, pp. 3561-3570.
 381. **Schneider, F., Neugebauer, J., Griese, J., Liefold, N., Kutz, H., Briseño, C. & Kieser, A. (2008).** The viral oncoprotein LMP1 exploits TRADD for signaling by masking its apoptotic activity. *PLoS biology*, 6, p. e8.
 382. **Scholle, F., Bendt, K. M. & Raab-Traub, N. (2000).** Epstein-Barr virus LMP2A transforms epithelial cells, inhibits cell differentiation, and activates Akt. *Journal of virology*, 74, pp. 10681-10689.
 383. **Schultheiss, U., Püschner, S., Kremmer, E., Mak, T. W., Engelmann, H., Hammerschmidt, W. & Kieser, A. (2001).** TRAF6 is a critical mediator of signal transduction by the viral oncogene latent membrane protein 1. *The EMBO journal*, 20, pp. 5678-5691.
 384. **Schwemmle, M., Clemens, M. J., Hilse, K., Pfeifer, K., Tröster, H., Müller, W. E. & Bachmann, M. (1992).** Localization of Epstein-Barr virus-encoded RNAs EBER-1 and EBER-2 in interphase and mitotic Burkitt lymphoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, pp. 10292-10296.
 385. **Semmes, O. J., Chen, L., Sarisky, R. T., Gao, Z., Zhong, L. & Hayward, S.D. (1998).** Mta has properties of an RNA export protein and increases cytoplasmic accumulation of Epstein-Barr virus replication gene mRNA. *Journal of virology*, 72, pp. 9526-9534.
 386. **Shair, K. H. Y., Bendt, K. M., Edwards, R. H., Bedford, E. C., Nielsen, J. N. & Raab-Traub, N. (2007).** EBV latent membrane protein 1 activates Akt, NFkappaB, and Stat3 in B cell lymphomas. *PLoS pathogens*, 3, p. e166.
 387. **Shair, K. H. Y., Schnegg, C. I. & Raab-Traub, N. (2008).** EBV latent membrane protein 1 effects on plakoglobin, cell growth, and migration. *Cancer research*, 68, pp. 6997-7005.
 388. **Shannon-Lowe, C. D., Neuhierl, B., Baldwin, G., Rickinson, A. B. & Delecluse, H. (2006).** Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, pp. 7065-7070.
 389. **Sharp, T. V., Schwemmle, M., Jeffrey, I., Laing, K., Mellor, H., Proud, C. G., Hilse, K. & Clemens, M.J. (1993).** Comparative analysis of the regulation of the interferon-inducible protein kinase PKR by Epstein-Barr virus RNAs EBER-1 and EBER-2 and adenovirus VAI RNA. *Nucleic acids research*, 21, pp. 4483-4490.
 390. **Sheng, W., Decaussin, G., Sumner, S. & Ooka, T. (2001).** N-terminal domain of BRF1 gene encoded by Epstein-Barr virus is essential for malignant transformation of rodent fibroblasts and activation of BCL-2. *Oncogene*, 20, pp. 1176-1185.
 391. **Shimakage, M., Kimura, M., Yanoma, S., Ibe, M., Yokota, S., Tsujino, G., Kozuka, T., Dezawa, T., Tamura, S., Ohshima, A., Yutsudo, M. & Hakura, A. (1999).** Expression of latent and replicative-infection genes of Epstein-Barr virus in macrophage. *Archives of virology*, 144, pp. 157-166.

392. **Shire, K., Ceccarelli, D. F., Avolio-Hunter, T. M. & Frappier, L. (1999).** EBP2, a human protein that interacts with sequences of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 important for plasmid maintenance. *Journal of virology*, 73, pp. 2587-2595.
393. **Shuai, K. & Liu, B. (2003).** Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 3, pp. 900-911.
394. **Siegel, R. M., Frederiksen, J. K., Zacharias, D. A., Chan, F. K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R. Y. & Lenardo, M.J. (2000).** Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science*, 288, pp. 2354-2357.
395. **Siegler, G., Meyer, B., Dawson, C., Brachtel, E., Lennerz, J., Koch, C., Kremmer, E., Niedobitek, E., Gonnella, R., Pilch, B. Z., Young, L. S. & Niedobitek, G. (2004).** Expression of tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 in nasopharyngeal carcinoma: possible upregulation by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 112, pp. 265-272.
396. **Sinclair, A. J. & Farrell, P.J. (1995).** Host cell requirements for efficient infection of quiescent primary B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *Journal of virology*, 69, pp. 5461-5468.
397. **Sinclair, A. J., Palmero, I., Peters, G. & 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. *The EMBO journal*, 13, pp. 3321-3328.
398. **Sixbey, J. W. & Yao, Q.Y. (1992).** Immunoglobulin A-induced shift of Epstein-Barr virus tissue tropism. *Science*, 255, pp. 1578-1580.
399. **Sjöblom, A., Yang, W., Palmqvist, L., Jansson, A. & Rymo, L. (1998).** An ATF/CRE element mediates both EBNA2-dependent and EBNA2-independent activation of the Epstein-Barr virus LMP1 gene promoter. *Journal of virology*, 72, pp. 1365-1376.
400. **Sjöblom-Hallén, A., Yang, W., Jansson, A. & Rymo, L. (1999).** Silencing of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 gene by the Max-Mad1-mSin3A modulator of chromatin structure. *Journal of virology*, 73, pp. 2983-2993.
401. **Slee, E. A., O'Connor, D. J. & Lu, X. (2004).** To die or not to die: how does p53 decide?. *Oncogene*, 23, pp. 2809-2818.
402. **Smith, P. R., Gao, Y., Karran, L., Jones, M. D., Snudden, D. & Griffin, B.E. (1993).** Complex nature of the major viral polyadenylated transcripts in Epstein-Barr virus-associated tumors. *Journal of virology*, 67, pp. 3217-3225.
403. **Snow, A. L., Chen, L. J., Nepomuceno, R. R., Krams, S. M., Esquivel, C. O. & Martinez, O.M. (2001).** Resistance to Fas-mediated apoptosis in EBV-infected B cell lymphomas is due to defects in the proximal Fas signaling pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167, pp. 5404-5411.
404. **Snow, A. L., Lambert, S. L., Natkunam, Y., Esquivel, C. O., Krams, S. M. & Martinez, O.M. (2006).** EBV can protect latently infected B cell lymphomas from death receptor-induced apoptosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 177, pp. 3283-3293.
405. **Snow, A. L., Vaysberg, M., Krams, S. M. & Martinez, O.M. (2006).** EBV B lymphoma cell lines from patients with post-transplant lymphoproliferative disease are resistant to TRAIL-induced apoptosis. *American journal of transplantation : official journal*

of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, 6, pp. 976-985.

406. **Solan, N. J., Miyoshi, H., Carmona, E. M., Bren, G. D. & Paya, C.V. (2002).** RelB cellular regulation and transcriptional activity are regulated by p100. *The Journal of biological chemistry*, 277, pp. 1405-1418.
407. **Song, Y., Jen, K., Soni, V., Kieff, E. & Cahir-McFarland, E. (2006).** IL-1 receptor-associated kinase 1 is critical for latent membrane protein 1-induced p65/RelA serine 536 phosphorylation and NF-kappaB activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, pp. 2689-2694.
408. **Speck, P. & Longnecker, R. (2000).** Infection of breast epithelial cells with Epstein-Barr virus via cell-to-cell contact. *Journal of the National Cancer Institute*, 92, pp. 1849-1851.
409. **Speck, P., Haan, K. M. & Longnecker, R. (2000).** Epstein-Barr virus entry into cells. *Virology*, 277, pp. 1-5.
410. **Strockbine, L. D., Cohen, J. I., Farrah, T., Lyman, S. D., Wagener, F., DuBose, R. F., Armitage, R. J. & Spriggs, M.K. (1998).** The Epstein-Barr virus BARF1 gene encodes a novel, soluble colony-stimulating factor-1 receptor. *Journal of virology*, 72, pp. 4015-4021.
411. **Strowig, T., Brilot, F., Arrey, F., Bougras, G., Thomas, D., Muller, W. A. & Münz, C. (2008).** Tonsillar NK cells restrict B cell transformation by the Epstein-Barr virus via IFN-gamma. *PLoS pathogens*, 4, p. e27.
412. **Subramanian, C., Cotter, M. A. 2. & Robertson, E.S. (2001).** Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA-3C interacts with the human metastatic suppressor Nm23-H1: a molecular link to cancer metastasis. *Nature medicine*, 7, pp. 350-355.
413. **Subramanian, C., Hasan, S., Rowe, M., Hottiger, M., Orre, R. & Robertson, E.S. (2002).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and prothymosin alpha interact with the p300 transcriptional coactivator at the CH1 and CH3/HAT domains and cooperate in regulation of transcription and histone acetylation. *Journal of virology*, 76, pp. 4699-4708.
414. **Sung, N. S., Kenney, S., Gutsch, D. & Pagano, J.S. (1991).** EBNA-2 transactivates a lymphoid-specific enhancer in the BamHI C promoter of Epstein-Barr virus. *Journal of virology*, 65, pp. 2164-2169.
415. **Szakonyi, G., Klein, M. G., Hannan, J. P., Young, K. A., Ma, R. Z., Asokan, R., Holers, V. M. & Chen, X.S. (2006).** Structure of the Epstein-Barr virus major envelope glycoprotein. *Nature structural & molecular biology*, 13, pp. 996-1001.
416. **Szekely, L., Pokrovskaja, K., Jiang, W. Q., de The, H., Ringertz, N. & Klein, G. (1996).** The Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-5 accumulates in PML-containing bodies. *Journal of virology*, 70, pp. 2562-2568.
417. **Szekely, L., Selivanova, G., Magnusson, K. P., Klein, G. & Wiman, K.G. (1993).** EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, pp. 5455-5459.
418. **Tabiasco, J., Vercellone, A., Meggetto, F., Hudrisier, D., Brousset, P. & Fournié, J. (2003).** Acquisition of viral receptor by NK cells through immunological synapse. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170, pp. 5993-5998.

419. **Takahashi, R., Deveraux, Q., Tamm, I., Welsh, K., Assa-Munt, N., Salvesen, G. S. & Reed, J.C. (1998).** A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *The Journal of biological chemistry*, 273, pp. 7787-7790.
420. **Takakuwa, T., Luo, W., Ham, M. F., Wada, N. & Aozasa, K. (2005).** Identification of Epstein-Barr virus integrated sites in lymphoblastoid cell line (IB4). *Virus research*, 108, pp. 133-138.
421. **Takeshita, H., Yoshizaki, T., Miller, W. E., Sato, H., Furukawa, M., Pagano, J. S. & Raab-Traub, N. (1999).** Matrix metalloproteinase 9 expression is induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 C-terminal activation regions 1 and 2. *Journal of virology*, 73, pp. 5548-5555.
422. **Tanner, J., Whang, Y., Sample, J., Sears, A. & Kieff, E. (1988).** Soluble gp350/220 and deletion mutant glycoproteins block Epstein-Barr virus adsorption to lymphocytes. *Journal of virology*, 62, pp. 4452-4464.
423. **Tao, Q., Robertson, K. D., Manns, A., Hildesheim, A. & Ambinder, R.F. (1998).** The Epstein-Barr virus major latent promoter Qp is constitutively active, hypomethylated, and methylation sensitive. *Journal of virology*, 72, pp. 7075-7083.
424. **Thorley-Lawson, D. A. & Gross, A. (2004).** Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *The New England journal of medicine*, 350, pp. 1328-1337.
425. **Thornburg, N. J., Kusano, S. & Raab-Traub, N. (2004).** Identification of Epstein-Barr virus RK-BARF0-interacting proteins and characterization of expression pattern. *Journal of virology*, 78, pp. 12848-12856.
426. **Tomkinson, B. & 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. *Journal of virology*, 66, pp. 2893-2903.
427. **Tomkinson, B., Robertson, E. & Kieff, E. (1993).** Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *Journal of virology*, 67, pp. 2014-2025.
428. **Tong, X., Drapkin, R., Reinberg, D. & Kieff, E. (1995).** The 62- and 80-kDa subunits of transcription factor IIIH mediate the interaction with Epstein-Barr virus nuclear protein 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, pp. 3259-3263.
429. **Tong, X., Drapkin, R., Yalamanchili, R., Mosialos, G. & Kieff, E. (1995).** The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain forms a complex with a novel cellular coactivator that can interact with TFIIIE. *Molecular and cellular biology*, 15, pp. 4735-4744.
430. **Tong, X., Wang, F., Thut, C. J. & Kieff, E. (1995).** The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain can interact with TFIIB, TAF40, and RPA70 but not with TATA-binding protein. *Journal of virology*, 69, pp. 585-588.
431. **Tong, X., Yalamanchili, R., Harada, S. & Kieff, E. (1994).** The EBNA-2 arginine-glycine domain is critical but not essential for B-lymphocyte growth transformation; the rest of region 3 lacks essential interactive domains. *Journal of virology*, 68, pp. 6188-6197.
432. **Touitou, R., Hickabottom, M., Parker, G., Crook, T. & Allday, M.J. (2001).** Physical and functional interactions between the corepressor CtBP and the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA3C. *Journal of virology*, 75, pp. 7749-7755.

433. **Traenckner, E. B., Pahl, H. L., Henkel, T., Schmidt, K. N., Wilk, S. & Baeuerle, P.A. (1995).** Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *The EMBO journal*, *14*, pp. 2876-2883.
434. **Tremprat, P., Tabiasco, J., Andre, P., Faumont, N., Meggetto, F., Delsol, G., Gascoyne, R. D., Fournie, J., Vivier, E. & Brousset, P. (2002).** Evidence for early infection of nonneoplastic natural killer cells by Epstein-Barr virus. *Journal of virology*, *76*, pp. 11139-11142.
435. **Tsai, C., Tsai, C., Tse, K., Chang, H. & Chang, Y. (2002).** The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the downregulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*, pp. 10084-10089.
436. **Tsoukas, C. D. & Lambris, J.D. (1993).** Expression of EBV/C3d receptors on T cells: biological significance. *Immunology today*, *14*, pp. 56-59.
437. **Tsui, S. & Schubach, W.H. (1994).** Epstein-Barr virus nuclear protein 2A forms oligomers in vitro and in vivo through a region required for B-cell transformation. *Journal of virology*, *68*, pp. 4287-4294.
438. **Tsurumi, T., Daikoku, T., Kurachi, R. & Nishiyama, Y. (1993).** Functional interaction between Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and its accessory subunit in vitro. *Journal of virology*, *67*, pp. 7648-7653.
439. **Tugizov, S. M., Berline, J. W. & Palefsky, J.M. (2003).** Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells. *Nature medicine*, *9*, pp. 307-314.
440. **Uchida, J., Yasui, T., Takaoka-Shichijo, Y., Muraoka, M., Kulwichit, W., Raab-Traub, N. & Kikutani, H. (1999).** Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science*, *286*, pp. 300-303.
441. **Uchihara, J., Krensky, A. M., Matsuda, T., Kawakami, H., Okudaira, T., Masuda, M., Ohta, T., Takasu, N. & Mori, N. (2005).** Transactivation of the CCL5/RANTES gene by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, *114*, pp. 747-755.
442. **Uemura, N., Kajino, T., Sanjo, H., Sato, S., Akira, S., Matsumoto, K. & Ninomiya-Tsuji, J. (2006).** TAK1 is a component of the Epstein-Barr virus LMP1 complex and is essential for activation of JNK but not of NF-kappaB. *The Journal of biological chemistry*, *281*, pp. 7863-7872.
443. **Vockerodt, M., Haier, B., Buttgereit, P., Tesch, H. & 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*, pp. 183-198.
444. **Vuyisich, M., Spanggord, R. J. & Beal, P.A. (2002).** The binding site of the RNA-dependent protein kinase (PKR) on EBER1 RNA from Epstein-Barr virus. *EMBO reports*, *3*, pp. 622-627.
445. **van Beek, J., Brink, A. A. T. P., Vervoort, M. B. H. J., van Zijp, M. J. M., Meijer, C. J. L. M., van den Brule, A. J. C. & 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. *The Journal of general virology*, 84, pp. 2647-2659.
446. **Wade, M. & Allday, M.J. (2000).** Epstein-Barr virus suppresses a G(2)/M checkpoint activated by genotoxins. *Molecular and cellular biology*, 20, pp. 1344-1360.
447. **Wakisaka, N., Kondo, S., Yoshizaki, T., Murono, S., Furukawa, M. & Pagano, J.S. (2004).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces synthesis of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Molecular and cellular biology*, 24, pp. 5223-5234.
448. **Wakisaka, N., Murono, S., Yoshizaki, T., Furukawa, M. & Pagano, J.S. (2002).** Epstein-barr virus latent membrane protein 1 induces and causes release of fibroblast growth factor-2. *Cancer research*, 62, pp. 6337-6344.
449. **Waltzer, L., Bourillot, P. Y., Sergeant, A. & 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 research*, 23, pp. 4939-4945.
450. **Waltzer, L., Logeat, F., Brou, C., Israel, A., Sergeant, A. & 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. *The EMBO journal*, 13, pp. 5633-5638.
451. **Waltzer, L., Perricaudet, M., Sergeant, A. & 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. *Journal of virology*, 70, pp. 5909-5915.
452. **Wan, J., Sun, L., Mendoza, J. W., Chui, Y. L., Huang, D. P., Chen, Z. J., Suzuki, N., Suzuki, S., Yeh, W., Akira, S., Matsumoto, K., Liu, Z. & Wu, Z. (2004).** Elucidation of the c-Jun N-terminal kinase pathway mediated by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1. *Molecular and cellular biology*, 24, pp. 192-199.
453. **Wan, J., Zhang, W., Wu, L., Bai, T., Zhang, M., Lo, K., Chui, Y., Cui, Y., Tao, Q., Yamamoto, M., Akira, S. & Wu, Z. (2006).** BS69, a specific adaptor in the latent membrane protein 1-mediated c-Jun N-terminal kinase pathway. *Molecular and cellular biology*, 26, pp. 448-456.
454. **Wang, D., Liebowitz, D. & Kieff, E. (1985).** An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell*, 43, pp. 831-840.
455. **Wang, F., Gregory, C. D., Rowe, M., Rickinson, A. B., Wang, D., Birkenbach, M., Kikutani, H., Kishimoto, T. & Kieff, E. (1987).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, pp. 3452-3456.
456. **Wang, F., Gregory, C., Sample, C., Rowe, M., Liebowitz, D., Murray, R., Rickinson, A. & Kieff, E. (1990).** 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. *Journal of virology*, 64, pp. 2309-2318.
457. **Wang, F., Tsang, S. F., Kurilla, M. G., Cohen, J. I. & Kieff, E. (1990).** Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivates latent membrane protein LMP1. *Journal of virology*, 64, pp. 3407-3416.
458. **Wang, L., Grossman, S. R. & Kieff, E. (2000).** Epstein-Barr virus nuclear protein 2 interacts with p300, CBP, and PCAF histone acetyltransferases in activation of the LMP1 promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, pp. 430-435.

459. **Wang, S., Rowe, M. & 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 research*, 56, pp. 4610-4613.
460. **Wang, Y., Cui, H., Schroering, A., Ding, J. L., Lane, W. S., McGill, G., Fisher, D. E. & Ding, H. (2002).** NF-kappa B2 p100 is a pro-apoptotic protein with anti-oncogenic function. *Nature cell biology*, 4, pp. 888-893.
461. **Watry, D., Hedrick, J. A., Siervo, S., Rhodes, G., Lamberti, J. J., Lambris, J. D. & Tsoukas, C.D. (1991).** Infection of human thymocytes by Epstein-Barr virus. *The Journal of experimental medicine*, 173, pp. 971-980.
462. **Wei, M. X. & Ooka, T. (1989).** A transforming function of the BARF1 gene encoded by Epstein-Barr virus. *The EMBO journal*, 8, pp. 2897-2903.
463. **Wei, M. X., de Turenne-Tessier, M., Decaussin, G., Benet, G. & Ooka, T. (1997).** Establishment of a monkey kidney epithelial cell line with the BARF1 open reading frame from Epstein-Barr virus. *Oncogene*, 14, pp. 3073-3081.
464. **Weigel, R., Fischer, D. K., Heston, L. & Miller, G. (1985).** Constitutive expression of Epstein-Barr virus-encoded RNAs and nuclear antigen during latency and after induction of Epstein-Barr virus replication. *Journal of virology*, 53, pp. 254-259.
465. **Weston, C. R. & Davis, R.J. (2007).** The JNK signal transduction pathway. *Current opinion in cell biology*, 19, pp. 142-149.
466. **Wiech, T., Nikolopoulos, E., Lassman, S., Heidt, T., Schöpflin, A., Sarbia, M., Werner, M., Shimizu, Y., Sakka, E., Ooka, T. & zur Hausen, A. (2008).** Cyclin D1 expression is induced by viral BARF1 and is overexpressed in EBV-associated gastric cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 452, pp. 621-627.
467. **Wilson, A. D., Redchenko, I., Williams, N. A. & Morgan, A.J. (1998).** CD4+ T cells inhibit growth of Epstein-Barr virus-transformed B cells through CD95-CD95 ligand-mediated apoptosis. *International immunology*, 10, pp. 1149-1157.
468. **Woisetschlaeger, M., Strominger, J. L. & Speck, S.H. (1989).** Mutually exclusive use of viral promoters in Epstein-Barr virus latently infected lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, pp. 6498-6502.
469. **Woisetschlaeger, M., Yandava, C. N., Furmanski, L. A., Strominger, J. L. & Speck, S.H. (1990).** Promoter switching in Epstein-Barr virus during the initial stages of infection of B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, pp. 1725-1729.
470. **Wu, D. Y., Kalpana, G. V., Goff, S. P. & Schubach, W.H. (1996).** Epstein-Barr virus nuclear protein 2 (EBNA2) binds to a component of the human SNF-SWI complex, hSNF5/Ini1. *Journal of virology*, 70, pp. 6020-6028.
471. **Wu, D. Y., Krumm, A. & Schubach, W.H. (2000).** Promoter-specific targeting of human SWI-SNF complex by Epstein-Barr virus nuclear protein 2. *Journal of virology*, 74, pp. 8893-8903.
472. **Wu, G. S., Burns, T. F., McDonald, E. R. 3., Jiang, W., Meng, R., Krantz, I. D., Kao, G., Gan, D. D., Zhou, J. Y., Muschel, R., Hamilton, S. R., Spinner, N. B., Markowitz, S., Wu, G. & el-Deiry, W.S. (1997).** KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nature genetics*, 17, pp. 141-143.

473. **Wu, L., Nakano, H. & 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. *The Journal of biological chemistry*, 281, pp. 2162-2169.
474. **Xie, P. & 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. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 173, pp. 5546-5555.
475. **Xie, P., Hostager, B. S. & Bishop, G.A. (2004).** Requirement for TRAF3 in signaling by LMP1 but not CD40 in B lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, 199, pp. 661-671.
476. **Xie, P., Kraus, Z. J., Stunz, L. L. & Bishop, G.A. (2008).** Roles of TRAF molecules in B lymphocyte function. *Cytokine & growth factor reviews*, 19, pp. 199-207.
477. **Yalamanchili, R., Harada, S. & Kieff, E. (1996).** The N-terminal half of EBNA2, except for seven prolines, is not essential for primary B-lymphocyte growth transformation. *Journal of virology*, 70, pp. 2468-2473.
478. **Yamamoto, N., Takizawa, T., Iwanaga, Y., Shimizu, N. & Yamamoto, N. (2000).** Malignant transformation of B lymphoma cell line BJAB by Epstein-Barr virus-encoded small RNAs. *FEBS letters*, 484, pp. 153-158.
479. **Yasui, T., Luftig, M., Soni, V. & Kieff, E. (2004).** Latent infection membrane protein transmembrane FWLY is critical for intermolecular interaction, raft localization, and signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, pp. 278-283.
480. **Ye, H., Park, Y. C., Kreishman, M., Kieff, E. & Wu, H. (1999).** The structural basis for the recognition of diverse receptor sequences by TRAF2. *Molecular cell*, 4, pp. 321-330.
481. **Yin, Y., Manoury, B. & Fåhraeus, R. (2003).** Self-inhibition of synthesis and antigen presentation by Epstein-Barr virus-encoded EBNA1. *Science*, 301, pp. 1371-1374.
482. **Yokoyama, A., Tanaka, M., Matsuda, G., Kato, K., Kanamori, M., Kawasaki, H., Hirano, H., Kitabayashi, I., Ohki, M., Hirai, K. & Kawaguchi, Y. (2001).** Identification of major phosphorylation sites of Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein (EBNA-LP): ability of EBNA-LP to induce latent membrane protein 1 cooperatively with EBNA-2 is regulated by phosphorylation. *Journal of virology*, 75, pp. 5119-5128.
483. **Yoshiyama, H., Imai, S., Shimizu, N. & Takada, K. (1997).** Epstein-Barr virus infection of human gastric carcinoma cells: implication of the existence of a new virus receptor different from CD21. *Journal of virology*, 71, pp. 5688-5691.
484. **Yoshizaki, T., Sato, H., Furukawa, M. & Pagano, J.S. (1998).** The expression of matrix metalloproteinase 9 is enhanced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, pp. 3621-3626.
485. **Young, L. S. & Rickinson, A.B. (2004).** Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nature reviews. Cancer*, 4, pp. 757-768.
486. **Young, L. S., Dawson, C. W. & Eliopoulos, A.G. (2000).** The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. *Molecular pathology : MP*, 53, pp. 238-247.

487. **Yu, J., Tsai, H., Wu, C., Weng, L., Li, H., Chung, P. & Chang, Y. (2002).** Induction of inducible nitric oxide synthase by Epstein-Barr virus B95-8-derived LMP1 in Balb/3T3 cells promotes stress-induced cell death and impairs LMP1-mediated transformation. *Oncogene*, *21*, pp. 8047-8061.
488. **Zalani, S., Coppage, A., Holley-Guthrie, E. & Kenney, S. (1997).** The cellular YY1 transcription factor binds a cis-acting, negatively regulating element in the Epstein-Barr virus BRLF1 promoter. *Journal of virology*, *71*, pp. 3268-3274.
489. **Zhang, D., Frappier, L., Gibbs, E., Hurwitz, J. & O'Donnell, M. (1998).** Human RPA (hSSB) interacts with EBNA1, the latent origin binding protein of Epstein-Barr virus. *Nucleic acids research*, *26*, pp. 631-637.
490. **Zhang, J., Chen, H., Weinmaster, G. & Hayward, S.D. (2001).** Epstein-Barr virus BamHi-a rightward transcript-encoded RPMS protein interacts with the CBF1-associated corepressor CIR to negatively regulate the activity of EBNA2 and NotchIC. *Journal of virology*, *75*, pp. 2946-2956.
491. **Zhang, L. & Pagano, J.S. (1997).** IRF-7, a new interferon regulatory factor associated with Epstein-Barr virus latency. *Molecular and cellular biology*, *17*, pp. 5748-5757.
492. **Zhang, L. & Pagano, J.S. (1999).** Interferon regulatory factor 2 represses the Epstein-Barr virus BamHI Q latency promoter in type III latency. *Molecular and cellular biology*, *19*, pp. 3216-3223.
493. **Zhang, L., Hong, K., Zhang, J. & Pagano, J.S. (2004).** Multiple signal transducers and activators of transcription are induced by EBV LMP-1. *Virology*, *323*, pp. 141-152.
494. **Zhang, Q., Brooks, L., Busson, P., Wang, F., Charron, D., Kieff, E., Rickinson, A. B. & Tursz, T. (1994).** Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 increases HLA class II expression in an EBV-negative B cell line. *European journal of immunology*, *24*, pp. 1467-1470.
495. **Zhang, Q., Gutsch, D. & Kenney, S. (1994).** Functional and physical interaction between p53 and BZLF1: implications for Epstein-Barr virus latency. *Molecular and cellular biology*, *14*, pp. 1929-1938.
496. **Zhang, X., Hu, L., Fadeel, B. & 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*, pp. 330-341.
497. **Zhang, X., Sanmun, D., Hu, L., Fadeel, B. & Ernberg, I. (2007).** Epstein-Barr virus-encoded LMP1 promotes cisplatin-induced caspase activation through JNK and NF-kappaB signaling pathways. *Biochemical and biophysical research communications*, *360*, pp. 263-268.
498. **Zhang, X., Uthaisang, W., Hu, L., Ernberg, I. T. & Fadeel, B. (2005).** Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 promotes stress-induced apoptosis upstream of caspase-2-dependent mitochondrial perturbation. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, *113*, pp. 397-405.
499. **Zimber-Strobl, U. & Strobl, L.J. (2001).** EBNA2 and Notch signalling in Epstein-Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes. *Seminars in cancer biology*, *11*, pp. 423-434.
500. **Zimber-Strobl, U., Kremmer, E., Grässer, F., Marschall, G., Laux, G. & Bornkamm, G.W. (1993).** The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 interacts with an

EBNA2 responsive cis-element of the terminal protein 1 gene promoter. *The EMBO journal*, 12, pp. 167-175.

501. **el-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. & Vogelstein, B. (1993).** WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75, pp. 817-825.

