

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole Doctorale 524 Biologie-Santé

Faculté des Sciences et Techniques

CNRS UMR 6101

« Physiologie Moléculaire de la Réponse Immune et des Lymphoproliférations »

Equipe « Mécanismes Moléculaires de la Lymphomagenèse »

N°19 - 2010

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Présentée et soutenue publiquement par

Aurélié CHANUT

Le 30 Juin 2010

**Rôle des voies d'activation classique et alternative du
facteur transcriptionnel NF- κ B dans la prolifération et
la protection contre l'apoptose induites par
l'oncoprotéine LMP-1 du virus d'Epstein-Barr**

Co-dirigée par :

Pr. Jean Feuillard et Dr. Nathalie Faumont

Président :

Monsieur Michel COGNE, Professeur des Universités, Limoges.

Rapporteurs :

Madame Joëlle WIELS, Directeur de Recherche, CNRS, Villejuif.

Monsieur Gilles COURTOIS, Directeur de Recherche, INSERM, Paris.

Examineurs :

Madame Marie KORNER, Directeur de Recherche, CNRS, Villejuif.

Monsieur Jean FEUILLARD, Professeur des Universités, Limoges.

Mademoiselle Nathalie FAUMONT, Docteur ès sciences, Limoges.

Rôle des voies d'activation classique et alternative du facteur transcriptionnel NF- κ B dans la prolifération et la protection contre l'apoptose induites par l'oncoprotéine LMP-1 du virus d'Epstein-Barr

Mes travaux de thèse ont porté sur l'étude de l'activation du facteur de transcription NF- κ B par l'oncogène majeur du virus d'Epstein-Barr (EBV), la protéine LMP-1. A partir de variants naturels de LMP-1 isolés de cas de lymphomes de Hodgkin et de lymphocytes B normaux, des analyses fonctionnelles ont été réalisées dans le modèle cellulaire Ba/F3, dont la prolifération dépend de l'ajout d'IL-3. Nous montrons que, en absence d'IL-3, tous les variants LMP-1 isolés des cellules tumorales ou de Reed-Sternberg sont oncogéniques pour seulement 30 % des variants isolés de lymphocytes B non tumoraux. Tous les variants LMP-1 activent le facteur de transcription NF- κ B, mais à des niveaux différents. Nous avons établi une corrélation entre le niveau d'activation de NF- κ B et le niveau de protection contre l'apoptose. La suite de l'étude a mis en évidence que LMP-1 active quasi exclusivement la voie classique d'activation de NF- κ B avec l'induction d'une activité de liaison à l'ADN correspondant à des complexes contenant les sous-unités RelA, p50 et c-Rel. L'expression de la sous-unité RelA dans la LCL EREB2-5 induit à la fois une augmentation de la prolifération et la survie des cellules, alors que RelB prévient seulement les cellules de l'apoptose. L'étude a été élargie à des cas de lymphomes B diffus à grandes cellules (LNH GC) de type activé (ABC pour Activated B Cell like). Les expériences de retard sur gel réalisées à partir d'extraits nucléaires de biopsies congelées ont montré que RelA est retrouvée dans 100 % des tumeurs, et RelB seulement dans 22 % des cas et toujours associé à RelA. Nos résultats montrent donc que la voie classique d'activation de NF- κ B est la voie prépondérante dans l'apparition des lymphomes associés à l'EBV et de type ABC.

Mots-clefs : NF- κ B, LMP-1, EBV, LCL, lymphomes.

Role of classical and alternative activation pathways of transcription factor NF- κ B in proliferation and protection against apoptosis induced by the oncoprotein LMP-1 of Epstein-Barr virus

My PhD thesis work is about the activation of the transcription factor NF- κ B by the major oncogene of Epstein-Barr virus (EBV), LMP-1 protein. Using natural variants of LMP-1 isolated from Hodgkin's lymphoma cases and from normal B lymphocytes, functional analyses have been performed in Ba/F3 cells, a cellular model dependent in IL-3 for proliferation. In absence of IL-3, all variants isolated from Reed-Sternberg tumor cells were oncogenic. By contrast, only 30% variants isolated from non-tumor B lymphocytes were oncogenic. We show that all LMP-1 variants activated the transcription factor NF- κ B, but at different levels. We have established a correlation between the level of NF- κ B activation and the level of protection against apoptosis. Despite NF- κ B activation and protection from apoptosis, some LMP-1 variants were not oncogenic, suggesting that additional pathways or factors are needed. Results revealed that LMP-1 activated almost exclusively the classical NF- κ B activation pathway with the induction of DNA binding activity corresponding to complexes containing the subunits RelA, p50 and c-Rel. Expression of the RelA subunit in the LCL EREB2-5 increased not only proliferation but also cell survival, whereas RelB only protected cells from apoptosis. This study was extended to a series of patients with EBV negative activated B cell like diffuse large lymphoma (ABC-DLBCL). EMSA experiments performed on nuclear extracts from frozen biopsies showed that RelA was observed in 100% of tumors, and RelB only in 22% of cases, being always associated with RelA. Our results showed that the classical NF- κ B activation pathway is predominant in the development of B cell lymphomas associated with EBV and of ABC-DLBCL type.

Keywords : NF- κ B, LMP-1, EBV, LCL, lymphomas.

Aurélien CHANUT - CNRS UMR 6101

« Physiologie Moléculaire de la Réponse Immune et des Lymphoproliférations »

Equipe « Mécanismes Moléculaires de la Lymphomagenèse »

2 rue du Dr MARCLAND – 87025 LIMOGES cedex

« Lorsqu'on décide de vivre sa vie, on n'a pas grand choix de la prendre comme elle vient, au jour le jour, avec ses joies et ses peines, mais en essayant de toujours garder le sourire à ceux qui donnent un sens à cette vie. »

A Maëlie et Guillaume

A mes parents

A toute ma famille et mes amis

REMERCIEMENTS

Je remercie Michel Cogné de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse.

Je tiens à remercier Jean Feuillard pour m'avoir encadrée tout au long de ce travail, pour sa disponibilité, sa culture et ses connaissances scientifiques qui m'ont guidée au cours de ma thèse.

Tous mes remerciements à Nathalie Faumont, qui a co-dirigé ma thèse, pour tout ce qu'elle m'a appris depuis le master et pour sa disponibilité, même à des centaines de kilomètres. J'ai eu beaucoup de chance de l'avoir à mes côtés ces cinq années. Bonne chance pour ta carrière au CNRS !

Je remercie Joëlle WIELS et Gilles COURTOIS pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit. Je remercie également Marie KORNER d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

Je remercie l'Association pour la Recherche sur le Cancer et la Société Française d'Hématologie pour leur soutien financier accordé lors de ma dernière année de thèse.

Merci à tous les membres de l'équipe du 2^{ème} ; merci aux « anciens », Christophe et Tan pour leurs conseils et Ibtissam (alias Madame p53) pour tes conseils, ton soutien et les moments partagés, bonne chance pour la suite avec Abdel et pti' Nour. Merci à Bernadette, Delphine puis Makiadi Garcia pour leur aide quotidienne dans notre labo. Merci à Catherine, Chantal, David et Nadine et aux nouvelles recrues Amandine et Pauline, bonne chance pour la suite ! Merci à Isabelle, tes encouragements et ta bonne humeur ont participé à la bonne rédaction de ma thèse. Un grand merci à Stéphanie pour ton amitié, ta bonne humeur, et les discussions partagées autour du café, les fous rires, les coups de gueule... tous les services rendus et les réponses aux questions, surtout ces derniers temps. Bref, rien n'aurait été pareil sans toi ! Courage et bonne chance pour la suite.

Je remercie tous mes collègues du 3^{ème}, pour leur bonne humeur journalière et pour les discussions sympathiques, scientifiques ou non. Anne-Gaëlle (bonne chance de l'autre côté de l'Atlantique), Aurélien, Brice, Carine, Cathy D, Cendrine, Chahrazed, Christelle O, Christelle V-F, Christian (pour toutes les commandes passées), Claire (pour tous les conseils et les services rendus), Christophe, Eric (pour ton aide en radioactivité surtout), Fabien, Guillaume, Laurent, Marie M, Rada (vive l'OM !), Rémi, Sébastien, Sophie D, Sophie P, Virginie, V2, Véronique, Yves et

Zéliha. Merci également aux B Cell Designers, Armelle, Cécile, Gaël et Marie B. Je remercie Joël et Brigitte du labo d'Hémato pour toutes les commandes, ainsi qu'Estelle, bon courage pour la suite !

Plus personnellement, je tiens à remercier mes amis, Stéphanie et Olivier, pour leur soutien et les grands moments partagés de nos vies, Mélanie, Alexandre, et Clarisse, pour votre amitié et votre aide particulièrement ces derniers jours, Audrey et Kiki, pour tous ces moments partagés autour d'une bonne bouffe (et d'un bon vin !), les rescapées de mes années Fac j'ai nommé Corinne, pour tes messages et ton soutien par e-mail depuis l'IUT et Sylvie, bonne chance à toi pour ta thèse le 2 juillet, on aurait voulu le faire... j'espère vous revoir très vite. Enfin, un énorme merci à Sandrine, pour tes encouragements, ton optimisme communicatif et pour l'intérêt que tu as eu pour ce que je faisais avec mes « petites cellules », elle est loin notre 6^{ème}E et pourtant nous sommes encore là.

Je remercie toute ma famille, en particulier, Mamy Jeannou partie trop vite pendant ma thèse et Mamy Marinette 90 ans cette année et la première à savoir ce qu'était un Docteur ès sciences, quand tu me demanderas si je suis toujours dans les études... je vais pouvoir te répondre « non » ! Merci à Colette, JP, Huguette et Lucie pour votre soutien pendant toutes mes années Fac et merci aussi à toute ma belle-famille. Merci à ma sœur Cathy pour ton soutien, Joy et Emy qui à 5 ans m'a demandé « Tata, qu'est-ce que tu fais comme métier ? »... après le résumé grand public, le résumé pour les 4-8 ans... pas facile ! Merci à Sébastien et à ma sœur Sandrine pour votre soutien depuis le début de ma thèse. Je remercie mes parents toujours présents, vous m'avez toujours soutenue dans mes choix et avez suivi de très près mon parcours de ville en ville, pour une fille qui voulait faire des études courtes, je vous ai gâtés ! Je vous souhaite de passer une retraite paisible et de profiter de la vie (et du jardin) ! Enfin, je remercie les deux personnes qui partagent ma vie, Guillaume pour ton soutien de tous les jours et pour m'avoir permis de garder les pieds sur terre. Merci d'avoir fait le public des répétitions de mes présentations, et d'avoir supporté mon stress, heureusement que tu étais à mes côtés ! Merci à ma petite puce Maëlie, une belle petite parenthèse dans ma thèse, qui m'a donné beaucoup de courage.

A tous, un grand MERCI !!!

Abréviations

| | |
|--|---|
| AA : ACIDE AMINÉ | CREB : C-AMP-RESPONSE ELEMENT-BINDING PROTEIN |
| ABC : ACTIVATED B CELL LIKE | CTAR : CARBOXY-TERMINAL ACTIVATION REGION |
| ADN : ACIDE DESOXYRIBONUCLEIQUE | CTL : CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES |
| ADNC : ADN COMPLEMENTAIRE | DD : DEATH DOMAIN |
| AKT : AK TRANSFORMING | DEL : DÉLÉTION |
| ALA : ALANINE | DLBCL : DIFFUSE LARGE B CELL LYMPHOMA |
| AML1 : ACUTE MYELOID LEUKEMIA 1 | DS : DYAD SYMMETRY |
| AP1/2 : ACTIVATOR PROTEIN 1 / 2 | E2F : E2 PROMOTER BINDING FACTOR |
| ARF : ALTERNATE READING FRAME | EBER : EBV-ENCODED RNA |
| ARG : ARGININE | EBNA : EBV-ENCODED NUCLEAR ANTIGENS |
| ARN : ACIDE RIBONUCLÉIQUE | EBV : EPSTEIN-BARR VIRUS |
| ATF : ACTIVATING TRANSCRIPTION FACTOR | ED-L1 : ECORI D FRAGMENT-LOCATED LMP-1 |
| BAFF : B CELL ACTIVATING FACTOR | ELK1 : ETS (E-TWENTY SIX) LIKE 1 |
| BALF : BAMHI A LEFTWARD READING FRAME | EMSA : ELECTROMOBILITY SHIFT ASSAY |
| BARF : BAMHI A RIGHTWARD READING FRAME | ERK : EXTRACELLULAR REGULATED KINASE |
| BART : BAMHI A REGION'S RIGHTWARD TRANSCRITS | FR : FAMILY OF REPEATS |
| BAX : BCL2-ASSOCIATED PROTEIN X | GAS : INTERFERON-GAMMA ACTIVATION SITE |
| BCL : B CELL LYMPHOMA | GCB : GERMINAL CENTER B CELL LIKE |
| BCL-XL : B CELL LEUKEMIA XL | GCN5 : GENERAL CONTROL OF AMINO-ACID SYNTHESIS 5 |
| BCR : B CELL RECEPTOR | GLY : GLYCINE |
| BCR-ABL : BREAKPOINT CLUSTER REGION-ABELSON MURINE LEUKEMIA | GSK3 : GLYCOGEN SYNTHASE KINASE 3 |
| BFL-1 : BCL-2-RELATED PROTEIN A1 | HAT : HISTONE ACETYLTRANSFERASE |
| BHRF1 : BAMH I FRAGMENT H RIGHTWARD ORF1 | HDAC : HISTONE DEACETYLASE |
| BL : BURKITT LYMPHOMA | HHV4 : HERPES VIRUS HUMAIN DE TYPE 4 |
| BR-HLH : BASIC REGION-HELIX LOOP HELIX | HLH : HELIX-LOOP-HELIX |
| CARMA1 : CASPASE RECRUITMENT DOMAIN (CARD)/MEMBRANE-ASSOCIATED GUANYLATE KINASE (MAGUK) 1 | HTLV : HUMAN T-LYMPHOTROPIC VIRUS |
| CAT : CHLORAMPHENICOL ACETYLTRANSFERASE | ICAM : INTRACELLULAR ADHESION MOLECULE |
| CBF1 : CENTROMERE BINDING FACTOR 1 | IE/E/L : IMMEDIATE EARLY / EARLY / LATE |
| CBM : CARMA1-BCL10-MALT1 COMPLEX | IFN : INTERFERONS |
| CBP : CREB BINDING PROTEIN | IG : IMMUNOGLOBULINE |
| CCC : COVALENTLY CLOSED CIRCLE | IKK : IκB KINASE |
| CCL : CC CHEMOKINE LIGAND | IL : INTERLEUKINE |
| CD : CLUSTER OF DIFFERENTIATION | IR : INTERNAL REPEAT |
| CDK : CYCLIN DEPENDANT KINASE | IRF7 : INTERFERON REGULATORY FACTOR 7 |
| C-IAP : C-INHIBITORS OF APOPTOSIS | ITAM : IMMUNORECEPTOR TYROSINE-BASED ACTIVATION MOTIF |
| CIR : C-PROMOTER BINDING FACTOR INTERACTING COREPRESSEUR | IκB : INHIBITOR OF NF-κB |
| CMH-I/II : COMPLEXE MAJEUR D'HISTOCOMPATIBILITE DE CLASSE I / II | JAK3 : JANUS ACTIVATED KINASE 3 |
| C-Myc : CELLULAR MYELOCYTOMATOSIS | JNK : C-JUN NH2-TERMINAL KINASE |
| CRE : C-AMP-RESPONSE ELEMENT | KO : KNOCK OUT |
| | kDa : KILODALTONS |
| | KIP1 : KINASE INHIBITOR PROTEIN |
| | LCL : LYMPHOBLASTOÏD CELL LINE |
| | LMP : LATENT MEMBRANE PROTEIN |

LM-PCR : LIGATION-MEDIATED POLYMERASE CHAIN REACTION

LNH : LYMPHOMES NON HODGKINIENS

LUC : LUCIFERASE

MALT1 : MUCOSA-ASSOCIATED LYMPHOID TISSUE LYMPHOMA TRANSLOCATION PROTEIN 1

MAPK : MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASE

MAR : MATRIX ASSOCIATED REGION / MATRIX ATTACHMENT REGION

MAX : MYC-ASSOCIATED FACTOR X

MDM2 : MURINE DOUBLE MINUTE 2

MEF : MOUSE EMBRYONIC FIBROBLAST

mi-ARN : MICROARN

MM : MYÉLOMES MULTIPLES

MMP9 : MATRIX METALLOPEPTIDASE 9

MnSOD : MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE

N-CoR : NUCLEAR RECEPTOR COREPRESSOR

NEMO : NF- κ B ESSENTIAL MODULATOR

NF- κ B : NUCLEAR FACTOR κ B

NGFR : NERVE GROWTH FACTOR RECEPTOR

NIK : NF- κ B-INDUCING KINASE

NK : NATURAL KILLER

NLS : NUCLEAR LOCALIZATION SEQUENCE

oriP : ORIGINE DE REPLICATION

pB : PAIRE DE BASES

PBS : PHOSPHATE BUFFERED SALINE

PCAF : P300 CBP ASSOCIATED FACTOR

PI3K : PHOSPHATIDYLINOSITOL 3 KINASE

POL : POLYMÉRISE

POLY(dI:dC) : POLY(DEOXYINOSINIC-DEOXYCYTIDYLIC)

pRB : PROTEINE DU RETINOBLASTOME

PRO : PROLINE

PTLD : POST-TRANSPLANT LYMPHOPROLIFERATIVE DISEASE

PUMA : p53 UP-REGULATED MODULATOR OF APOPTOSIS

RANK : RECEPTOR ACTIVATOR OF NUCLEAR FACTOR κ B

RANTES : REGULATED UPON ACTIVATION NORMAL T-CELL EXPRESSED AND SECRETED

RBP-J κ : RECOMBINATION-BINDING PROTEIN JKAPPA

RHD : REL HOMOLOGY DOMAIN

RIP : RECEPTOR-INTERACTING SERINE/THREONINE-PROTEIN

RLU : RELATIVE LIGHT UNITS

RS : REED-STERNBERG

RTA : R TRANSACTIVATOR

SAP30 : SIN3A-ASSOCIATED PROTEIN

SIDA : SYNDROME DE L'IMMUNODEFICIENCE ACQUISE

SKIP : SKI-INTERACTING PROTEIN

SMRT : SILENCING MEDIATOR FOR RETINOID AND THYROID-HORMONE RECEPTOR

SPI-1 : SPLEEN FOCUS FORMING VIRUS (SFFV) PROVIRAL INTEGRATION

ssDNA : SALMON SPERM DNA

STAT : SIGNAL TRANSDUCER ACTIVATOR OF TRANSCRIPTION

SWI/SNF : SWITCH/SUCROSE NONFERMENTABLE

TAB : TAK1-BINDING PROTEIN

TAD : TRANSCRIPTIONAL ACTIVATION DOMAIN

TAF : TATA-BINDING PROTEIN-ASSOCIATED FACTOR

TAK1 : TGF-BETA ACTIVATED KINASE 1

TBP : TATA-BINDING PROTEIN

TES : TRANSFORMATION EFFECTOR SITE

TFII : TRANSCRIPTION FACTOR II

TGF β : TRANSFORMING GROWTH FACTOR BETA

TM : TRANSMEMBRANE

TNF : TUMOR NECROSIS FACTOR

TNFR : TNF RECEPTOR

TRADD : TNFR-ASSOCIATED DEATH DOMAIN

TRAF : TNFR-ASSOCIATED FACTORS

TR-L1 : TERMINAL REPEAT-LOCATED LMP-1

UL : UNIQUE LONG

US : UNIQUE SHORT

UTR : UNTRANSLATED REGION

VCAM : VASCULAR CELL ADHESION MOLECULE

VEGF : VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR

vFLIP : FADD-LIKE INTERFERON CONVERTING ENZYME OR CASPASE 8 (FLICE) INHIBITORY PROTEIN

VIH : VIRUS DE L'IMMUNODEFICIENCE HUMAINE

ZEBRA : Z EPSTEIN-BARR VIRUS REPLICATION ACTIVATOR

ZTA : Z TRANSACTIVATOR

Liste des figures et tables

INTRODUCTION

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Représentation de la phylogénie de la famille des Herpesviridae | 5 |
| Figure 2 : Structure du virion de l'EBV | 6 |
| Figure 3 : Organisation génomique linéaire..... | 7 |
| Figure 4 : Les cadres de lecture ouverts pour les protéines de latence | 8 |
| Figure 5 : Représentation schématique de l'organisation épisomale..... | 8 |
| Figure 6 : Structure de la protéine EBNA-1 | 11 |
| Figure 7 : Structure de la protéine EBNA-2 | 12 |
| Figure 8 : Signalisation de la protéine LMP-2A | 16 |
| Figure 9 : Le passage du cycle latent au cycle lytique..... | 19 |
| Figure 10 : Etapes de l'infection in vitro pour l'établissement d'une LCL | 20 |
| Figure 11 : Immunophénotype des lymphocytes présents dans les cryptes des amygdales | 20 |
| Figure 12 : Modèle de l'infection des lymphocytes B par l'EBV | 22 |
| Figure 13 : Structure schématique du gène BNLF1..... | 25 |
| Figure 14 : Séquences régulatrices du promoteur ED-L1 | 26 |
| Figure 15 : Modèle de transactivation du promoteur ED-L1 par EBNA-2 | 27 |
| Figure 16 : Structure schématique de la protéine LMP-1 | 29 |
| Figure 17 : Structure schématique des protéines TRAF | 32 |
| Figure 18 : Représentation schématique du recrutement des protéines TRAF par LMP-1 | 34 |
| Figure 19 : Structure des membres de la famille NF- κ B | 36 |
| Figure 20 : Structure schématique des inhibiteurs I κ B α , β et ϵ | 37 |
| Figure 21 : Deux modes de liaison à NF- κ B pour p100 et p105 | 38 |
| Figure 22 : Voie d'activation classique de NF- κ B | 39 |
| Figure 23 : Voie d'activation alternative de NF- κ B | 41 |
| Figure 24 : Quelques gènes cibles du facteur de transcription NF- κ B | 43 |
| Figure 25 : LMP-1 active les facteurs de transcription NF- κ B..... | 45 |
| | |
| Tableau 1 : Programmes de latence des gènes de l'EBV | 10 |
| Tableau 2 : Les protéines de latence de l'EBV et leurs principales fonctions..... | 16 |

Liste des figures et tables

RESULTATS & DISCUSSION

| | |
|--|-----|
| Fig. 1 : L'EBV dans le lymphome de Hodgkin | 61 |
| Fig. 2 : Variants LMP-1 pour l'étude des complexes NF- κ B..... | 86 |
| Fig. 3 : Le modèle des cellules inductibles EREB2-5..... | 86 |
| Fig. 4 : Structure schématique du vecteur inductible pRT-1 | 87 |
| Fig. 5 : Immunodétection de la protéine LMP-1 dans LCL et les BL2 | 89 |
| Fig. 6 : Expression des sous-unités NF- κ B dans les clones Ba/F3-LMP-1 | 90 |
| Fig. 7 : Activation de NF- κ B par les variants naturels de LMP1 | 91 |
| Fig. 8 : Expression des sous-unités NF- κ B dans les LCL et les BL..... | 92 |
| Fig. 9 : Activation de NF- κ B dans les LCL et les BL2..... | 93 |
| Fig. 10 : Activité NF- κ B dans les PRI transfectées stablement par pRT-1-LMP-1 et RelB | 94 |
| Fig. 11 : Inductibilité des cellules transfectées EREB2-5 : exemple d'une série de transfections .. | 100 |
| Fig. 12 : L'activation constitutive de NF- κ B dans la cellule cancéreuse | 143 |
| | |
| Table 1 : Les variants naturels de LMP-1 | 62 |

Table des matières

| | |
|---|----------|
| I. Avant-propos..... | 1 |
| II. Introduction | 5 |
| A. LE VIRUS D'EPSTEIN-BARR | 5 |
| 1. <i>Historique, taxonomie et épidémiologie.....</i> | 5 |
| 2. <i>Structures physiques et génomiques.....</i> | 6 |
| a) La particule virale : le virion..... | 6 |
| b) Le génome | 7 |
| 3. <i>Les phases du cycle viral.....</i> | 9 |
| a) La phase de latence | 9 |
| (1) Les types de latence | 9 |
| (2) Les protéines EBNA : les antigènes nucléaires | 10 |
| (3) Les protéines membranaires LMP | 14 |
| (4) Les ARN non codants | 17 |
| b) La phase lytique..... | 18 |
| 4. <i>La physiologie de l'infection</i> | 19 |
| a) In vitro : infection des cellules lymphoïdes | 19 |
| b) In vivo : infection de l'organisme..... | 20 |
| (1) L'infection aiguë | 20 |
| (2) L'infection persistante..... | 22 |
| 5. <i>La lymphomagenèse B et l'EBV.....</i> | 23 |
| a) Le lymphome de Hodgkin | 23 |
| b) Le lymphome de Burkitt..... | 23 |
| c) Les lymphomes B des sujets immunodéprimés | 24 |
| B. LA PROTEINE DE LATENCE LMP-1 | 24 |
| 1. <i>Le gène BNLFI</i> | 25 |
| a) Structure génique | 25 |

| | |
|---|----|
| b) Le promoteur ED-L1 | 25 |
| c) Régulation de l'expression de LMP-1 | 26 |
| (1) Transactivation grâce à EBNA-2 | 26 |
| (2) Autres modes de transactivation | 27 |
| 2. <i>Structure de la protéine LMP-1</i> | 28 |
| a) Structure générale de LMP-1 | 28 |
| b) Le domaine amino-terminal..... | 29 |
| c) Les 6 domaines transmembranaires | 29 |
| d) Le domaine carboxy-terminal..... | 30 |
| e) Forme lytique de la protéine LMP-1..... | 30 |
| 3. <i>LMP-1 et la signalisation TRAF</i> | 31 |
| a) Les protéines TRAF..... | 31 |
| b) Le domaine CTAR1 (aa 194 à 232)..... | 32 |
| c) Le domaine CTAR2 (aa 351 à 386)..... | 33 |
| d) Le domaine CTAR3 (aa 232 à 351)..... | 33 |
| C. LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION NF- κ B | 34 |
| 1. <i>Les sous-unités NF-κB</i> | 35 |
| 2. <i>Les inhibiteurs IκB</i> | 36 |
| 3. <i>L'activation NF-κB</i> | 38 |
| a) La voie d'activation classique (canonique)..... | 38 |
| b) La voie d'activation alternative (non canonique)..... | 40 |
| 4. <i>Les gènes cibles de NF-κB</i> | 41 |
| a) Identification..... | 41 |
| b) Fonctions des gènes cibles..... | 42 |
| 5. <i>LMP-1 et NF-κB</i> | 43 |
| D. LMP-1 ET TRANSFORMATION CELLULAIRE | 45 |
| 1. <i>Le pouvoir transformant de LMP-1</i> | 45 |
| 2. <i>Les variants naturels de LMP-1</i> | 47 |
| 3. <i>NF-κB et transformation par LMP-1</i> | 48 |
| a) Voies d'activation NF- κ B et transformation | 48 |
| b) Gènes cibles de NF- κ B et transformation | 49 |

| | |
|--|----|
| 4. <i>Les autres voies de transformation</i> | 50 |
| a) La voie de signalisation des MAP kinases..... | 50 |
| b) La voie de signalisation de la PI3 kinase..... | 50 |
| c) La voie de signalisation JAK/STAT | 51 |

III. Objectifs55

IV. Résultats61

** Publication n°1 : Analyse comparative des propriétés oncogéniques et de l'activité du facteur nucléaire kappa B des variants naturels de la protéine membranaire de latence 1 isolés de cellules de Reed-Sternberg de lymphomes Hodgkin et des lymphocytes B normaux..... 61*

** LMP-1 active la voie classique de NF- κ B dans les clones Ba/F3-LMP-1 et dans les lignées infectées par l'EBV 85*

** Publication n°2 : Différence de fonction des complexes NF- κ B contenant RelB et RelA dans les lymphocytes B transformés par le virus d'Epstein-Barr et dans les lymphocytes B activées des lymphomes B diffus à grandes cellules..... 99*

V. Discussion.....137

| | |
|--|-----|
| A. LES RETARDS SUR GEL : PRINCIPE ET PROBLEMES..... | 137 |
| B. POLYMORPHISME DE LMP-1 ET CONSERVATION DE L'ACTIVITE NF- κ B | 139 |
| C. LA NATURE DES COMPLEXES NF- κ B | 141 |
| D. NF- κ B DANS LES LYMPHOMES ET MYELOMES | 143 |
| E. ET APRES ?..... | 145 |

VI. Conclusion.....148

VII. Références bibliographiques151

VIII. ANNEXES175

A. LISTE DES ANTICORPS..... 175

B. SONDÉS UTILISÉES POUR LES RETARDS SUR GEL 176

C. COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES 177

AVANT-PROPOS

I. AVANT-PROPOS

J'ai réalisé mes travaux de recherche de thèse dans l'unité CNRS UMR6101 dirigée par le Professeur Cogné qui a pour thématique de recherche la Physiologie Moléculaire de la Réponse Immune et des Lymphoproliférations. J'ai intégré l'équipe du Professeur Feuillard qui s'intéresse plus précisément aux mécanismes de la lymphomagenèse associée au virus d'Epstein-Barr (EBV).

Chez un individu sain, environ 60 000 milliards de cellules, se divisant en un peu plus de deux cents types cellulaires, cohabitent et communiquent de façon précise afin de préserver l'organisme. Le cancer est une maladie qui se traduit par une prolifération incontrôlée des cellules tumorales. En se multipliant de façon anarchique, les cellules cancéreuses donnent naissance à des tumeurs. Parmi tous les types de cancer, on distingue généralement les carcinomes (cancer d'un épithélium), les sarcomes (cancers proliférant dans des tissus conjonctifs comme les os) et les cancers hématopoïétiques (cancer des cellules sanguines). Environ 15 % des cancers peuvent être associés à des agents infectieux. Ces agents peuvent être des virus (virus de l'hépatite B et cancer du foie, papillomavirus et cancer du col de l'utérus, EBV et lymphomes ou carcinomes) ou plus rarement des bactéries (*Helicobacter pylori* dans le cas de cancer gastrique ou de lymphomes). Dans tous les autres cas hors infection, on retrouve des altérations d'oncogènes (par exemple *c-myc* et *ras*) ou de gènes suppresseurs de tumeurs (par exemple *p53* et *pRb*). L'agent infectieux est co-facteur dans l'induction du processus de cancérogenèse, et parfois causal.

Les lymphomes (cancers des lymphocytes) représentent environ 5% de tous les cancers et peuvent se développer dans n'importe quel organe contenant du tissu lymphoïde, ganglions lymphatiques, autres organes lymphoïdes (amygdales, anneaux de Waldeyer, rate et muqueuses notamment). Parmi les lymphomes, on distingue le lymphome de Hodgkin et les lymphomes non hodgkiniens. Le lymphome de Hodgkin est caractérisé par la présence, au sein des lésions, d'une cellule tumorale appelée cellule de Reed Sternberg. Le nombre élevé de types de lymphomes non hodgkiniens a imposé une classification, maintenant internationale, reposant notamment sur des critères histologiques. Certains des lymphomes comme le lymphome de Hodgkin, le lymphome de Burkitt, les lymphomes T/NK et les lymphomes B des sujets immunodéprimés sont associés à l'EBV. Pour tous ces lymphomes,

l'EBV participe aux mécanismes de la lymphomagenèse grâce à l'expression des protéines de latence qui détournent au profit du virus les mécanismes cellulaires normaux de l'homéostasie. Parmi les protéines de latence, la protéine LMP-1 est responsable d'une grande partie des effets cancérigènes du virus. En effet, l'activation constitutive de LMP-1 aboutit à la dérégulation des voies de signalisation cellulaire, dont les voies d'activation du facteur de transcription NF- κ B.

L'objectif de ma thèse a été d'étudier, dans un contexte lymphocytaire B, l'activation du facteur de transcription NF- κ B par l'oncogène majeur du virus d'Epstein-Barr, la protéine LMP-1.

Dans la partie bibliographique, je décrirai les principales caractéristiques de l'infection par l'EBV, les propriétés de la protéine de latence LMP-1 et l'activation des voies de signalisation de NF- κ B. La deuxième partie présentera les résultats obtenus au cours de ma thèse. Un premier volet est consacré à l'étude des propriétés fonctionnelles de différents variants naturels de LMP-1 isolés de lymphome de Hodgkin faisant l'objet d'une publication (N Faumont, A Chanut *et al.*, Haematologica 2009). Le deuxième volet est consacré à l'étude de l'activation de NF- κ B par les différents variants naturels de LMP-1 ainsi que dans des lignées transformées par le virus d'Epstein-Barr. Le troisième volet est consacré à l'étude des voies d'activation de NF- κ B dans des lignées transformées par l'EBV associés à des tumeurs de cas de lymphomes non hodgkiniens diffus à grandes cellules, dont les résultats ont été soumis pour publication à Oncogene. Enfin, je terminerai ce mémoire par une discussion générale des résultats obtenus lors de ma thèse ainsi que par les perspectives de ces travaux.

INTRODUCTION

II. INTRODUCTION

A. Le virus d'Epstein-Barr

1. Historique, taxonomie et épidémiologie

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) ou herpes virus humain de type 4 (HHV 4) a été découvert en 1964 dans des lignées de lymphomes de Burkitt établies à partir de tumeurs affectant des enfants d'Afrique sub-saharienne, par les chercheurs Epstein, Barr et Achong (Epstein et al. 1964). Quelques années plus tard, des Lignées Cellulaires Lymphoblastoïdes ou LCL (Lymphoblastoid Cell Lines) sont obtenues après infection et immortalisation de lymphocytes B *in vitro* par l'EBV (Pope et al. 1968). Par la suite, afin d'identifier les patients risquant de développer un lymphome de Burkitt, Gertrude et Werner Henlé mettent au point un test sérologique. Leurs travaux montrent 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 (MNI) (Henle et al. 1968). Les résultats d'une étude séro-épidémiologique prouvent une relation de causalité entre l'EBV et le lymphome de Burkitt (de-The et al. 1978). Depuis les années 1980, l'EBV est connu pour être impliqué dans des pathologies malignes diverses d'origine épithéliale comme le carcinome du rhinopharynx et le carcinome mammaire, ou d'origine lymphoïde comme les lymphomes de Hodgkin et de Burkitt, les lymphomes non hodgkiniens des déficits immunitaires et les lymphomes T/NK nasals.

L'EBV appartient à la famille des *Herpesviridae* qui regroupe huit virus strictement humains classés en trois sous-familles : *Gamma*, *Alpha* et *Beta-herpesvirinae* ; et six genres (Figure 1). L'EBV appartient à la famille des *Gamma-Herpesviridae* et au genre *Lymphocryptovirus* (Ecker et al. 2005).

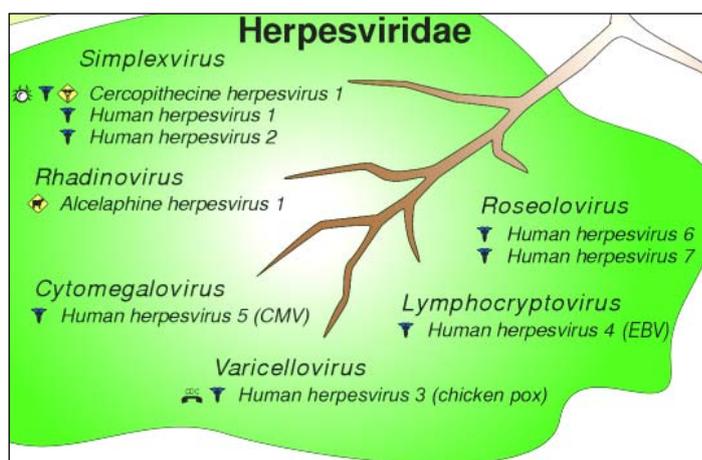


Figure 1 : Représentation de la phylogénie de la famille des Herpesviridae

La famille des *Herpesviridae* comporte six genres : *Simplexvirus*, *Rhadinovirus*, *Cytomegalovirus*, *Varicellovirus*, *Roseolovirus* et *Lymphocryptovirus*. D'après (Ecker et al. 2005).

Le réservoir viral de l'EBV est strictement humain. Il s'agit d'un virus ubiquitaire. Plus de 95% des adultes portent la trace de la primo-infection, cela quelle que soit la répartition géographique. La primo-infection a lieu le plus souvent chez l'enfant chez qui elle est généralement asymptomatique. Lorsque l'infection a lieu plus tard, chez l'adolescent ou l'adulte jeune, elle peut provoquer la MNI. Il s'agit d'une maladie lymphoproliférative bénigne caractérisée par une asthénie importante, par une angine et par une inflammation intense des ganglions. Elle se traduit par une prolifération polyclonale des lymphocytes B qui va elle-même induire une réponse immunologique exagérée sous forme d'une prolifération polyclonale de lymphocytes T CD8+ et NK, responsable de la symptomatologie. La transmission du virus se fait généralement par l'intermédiaire des sécrétions oropharyngées et exceptionnellement par transfusion sanguine et transplantation. Le virus de l'EBV est détectable durant toute la vie de l'individu dans les lymphocytes B mémoires (1 sur 10⁶) circulants, traduisant l'état de latence du virus, et dans la salive représentatif de la phase lytique du virus (Hochberg et al. 2004, Yao et al. 1989).

2. Structures physiques et génomiques

a) La particule virale : le virion

Le virion de l'EBV fait environ 120 à 200 nm et présente une structure commune à tous les herpès virus (Figure 2) :

- ↳ l'**enveloppe lipidique** est composée d'un double feuillet lipidique correspondant à des fragments de membrane plasmique de la cellule hôte au niveau de laquelle le virus exprime ses antigènes de membrane permettant sa fixation sur le récepteur cellulaire CD21 (récepteur pour la fraction C3d du complément),
- ↳ le **tégument** qui est composé de protéines virales d'aspect fibrillaire,
- ↳ la **nucléocapside** de forme icosaédrique,
- ↳ et le **nucléoïde** qui contient le génome du virus linéarisé sous forme d'ADN double brin enroulé autour d'une structure protéique appelé le *core*.

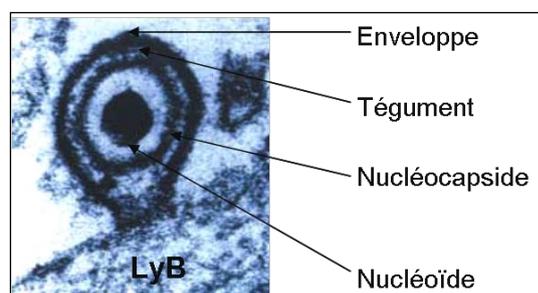


Figure 2 : Structure du virion de l'EBV

Image d'un virion dans la première phase de l'infection d'un lymphocyte B par microscopie électronique. Adaptée de (Pour revue, (Young and Rickinson 2004)).

b) Le génome

En 1984, le génome de l'EBV a été entièrement séquencé à partir de la souche virale de référence B95.8 provenant de lymphocytes B de marmouset infectés par l'EBV (Baer et al. 1984). Le génome viral est formé par un ADN double brin d'environ 172 kb sous sa forme linéaire dans la particule virale complète et sous sa forme circulaire dans la cellule hôte.

Dans le virion, le génome linéaire est flanqué de deux séquences terminales répétées (Terminal Repeat, TR) permettant la formation de l'épisome ou CCC (Covalently Closed Circle). Des répétitions internes en tandem (IR1) s'intercalent entre deux régions uniques : Unique short, US et Unique Long, UL. D'autres séquences répétées courtes (IR2, 3 et 4) sont présentes dans la séquence unique UL (Figure 3) (Adams and Lindahl 1975).

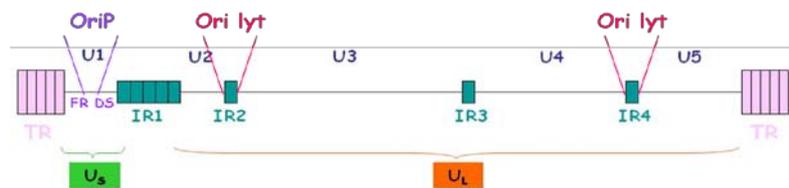


Figure 3 : Organisation génomique linéaire

La forme linéaire du génome est retrouvée dans le virion de l'EBV.

TR = Terminal Repeats, IR = Internal Repeats, U = Unique Region, OriP et Ori lyt. = origines de réplication.

Le séquençage du génome de l'EBV a été fait à partir d'une banque de fragments d'ADN viral de la souche de référence B95.8 provenant de la digestion des enzymes de restriction *EcoRI* et *BamHI*. Les données ont permis de définir une nomenclature de la transcription des différents gènes viraux. Ainsi, les gènes et les sites de régulation ou de transcription sont référencés par rapport aux fragments spécifiques du génome obtenus après digestion par *BamHI*. Deux sens de lecture sont possibles et ont été arbitrairement choisis. Ainsi, le génome linéaire de gauche à droite, c'est à dire d'U1 à U5, est le sens R (Rightward), et de droite à gauche, c'est à dire d'U5 à U1, est le sens L (Leftward) (Figure 4)¹ (Given and Kieff 1978).

¹ Par exemple, le gène codant la protéine LMP-1 (Latent Membrane Protein 1) a été baptisé *BNFL1*, signifiant séquence N dans la cartographie BamHI (BN), transcrite dans le sens droite vers la gauche (L), dans le premier cadre de lecture (F1).

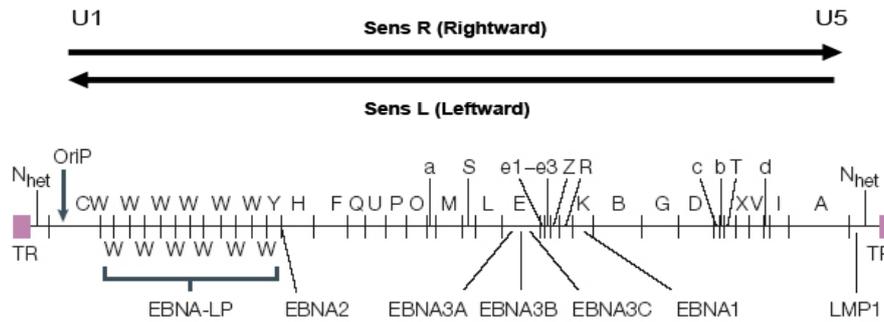


Figure 4 : Les cadres de lecture ouverts pour les protéines de latence

Les fragments obtenus après digestion sont classés par ordre de taille de A à Z. Les lettres en minuscules désignent les fragments très courts. D'après (Pour revue, (Young and Rickinson 2004)).

Dans la cellule infectée, le génome viral est retrouvé sous sa forme circulaire permettant ainsi le maintien de l'EBV à l'état latent sans avoir à s'intégrer dans le génome de la cellule hôte, en se liant étroitement à la chromatine cellulaire (Adams and Lindahl 1975). Les TR permettent au génome viral de se circulariser. La circularisation est approximative et conduit donc à un polymorphisme dans le nombre de répétitions. Grâce au nombre de motifs dans les TR, il est possible de déterminer si l'infection virale est monoclonale ou polyclonale dans les différentes pathologies associées à l'EBV (Raab-Traub and Flynn 1986).

La Figure 5 montre la position et la transcription des gènes de latence sur l'épisome. L'origine de réplication latente OriP se situe dans la région U1 (Figure 3) et trois promoteurs de latence sont décrits : Cp, Wp et Qp. Le génome code environ 80 protéines impliquées dans la réplication et la latence du virus.

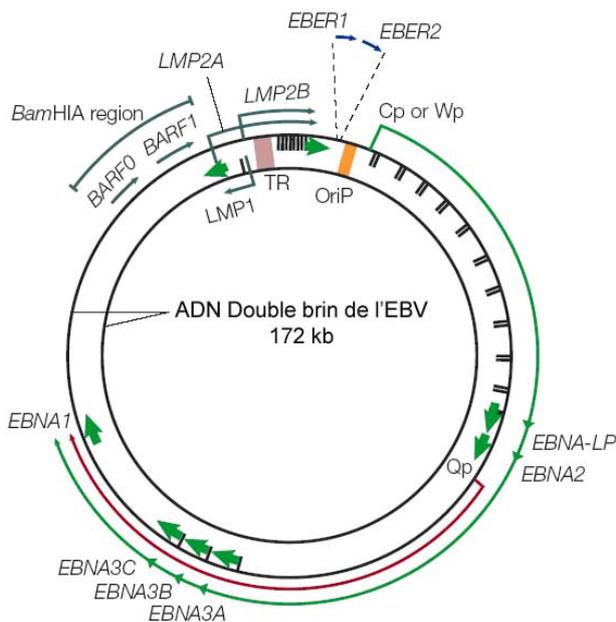


Figure 5 : Représentation schématique de l'organisation épisomale

Les régions codantes des protéines de latence sont représentées par les flèches vertes. 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 bleues représentent les ARN transcrits non-traduits EBER. Cp, Wp et Qp sont les promoteurs de la latence. D'après (Young and Rickinson 2004).

3. Les phases du cycle viral

a) *La phase de latence*

Lors de l'obtention d'une lignée cellulaire lymphoblastoïde (LCL) par infection *in vitro* des lymphocytes B par l'EBV, deux événements sont essentiels au maintien du virus : d'une part, l'inhibition du passage vers le cycle lytique et le maintien de la structure épisomale et d'autre part, l'expression des gènes dits de latence. Les produits des gènes de latence sont les protéines EBNA (Epstein-Barr Nuclear Antigen), les protéines LMP (Latent Membrane Protein) et les ARN EBER (EBV Encoded RNAs) et BART (BamHI A region's Rightward Transcripts). Les protéines de latence dérèglent les fonctions cellulaires en détournant la régulation transcriptionnelle et différentes voies de signalisation cellulaires, aboutissant à l'immortalisation de la cellule hôte.

Six protéines nucléaires EBNA sont décrites : EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C et -LP. Toutes, sauf EBNA-3B, sont essentielles à l'immortalisation des lymphocytes B infectés *in vitro*. Les trois protéines membranaires sont LMP-1, LMP-2A et LMP-2B. LMP-1 est la protéine la plus abondante durant la phase de latence, et est nécessaire à l'immortalisation de la cellule infectée. Les ARN EBER sont des petits ARN non polyadénylés et non traduits, présents en grande quantité.

(1) Les types de latence

Il existe différentes latences virales selon le jeu de gènes exprimés par l'EBV (Tableau 1). Quelle que soit la latence, on observe l'expression des ARN EBER et BART.

- La **latence de type I** est caractérisée par l'expression uniquement de la protéine EBNA-1, ce qui permet le maintien du génome viral dans la cellule. Cette latence est retrouvée dans le lymphome de Burkitt, lorsqu'il est associé à l'EBV.
- La **latence de type II** est caractérisée par l'expression des protéines EBNA-1, LMP-1, LMP-2A et LMP-2B. Les pathologies associées à ce type de latence sont notamment le carcinome du rhinopharynx, la maladie de Hodgkin et les lymphomes T/NK.
- La **latence de type III** est établie lorsque le facteur de transcription EBNA-2 active l'expression de toutes les protéines de latence EBNA-1, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-LP, LMP-1, LMP-2A et LMP-2B. Elle est retrouvée *in vitro* dans les LCL et *in vivo* dans les lymphoproliférations B des sujets immunodéprimés.
- La **latence de type 0** n'est décrite qu'*in vivo* dans les lymphocytes B au repos circulants infectés. Les ARN codants les protéines LMP-2A et EBNA-1 sont parfois détectés.

| | Occurrences | Programme de latence / Expression des gènes de latence |
|-----|---|---|
| I | Burkitt lymphoma | Type I latency (EBNA1, LMP2, EBERs, BARTs) |
| II | Hodgkin lymphoma | Type II latency (EBNA1, LMP1, LMP2, EBERs, BARTs) |
| | AIDS-related Burkitt or primary effusion lymphoma | Type II |
| | Peripheral T cell lymphoma | Type II |
| | NK/T cell lymphoma, nasal type | Type II |
| | Nasopharyngeal carcinoma | Type II |
| | Gastric adenocarcinoma | Type II |
| III | Post-transplant lymphoproliferative disorder | Type III latency (EBNA1, -2, -3A, -3B, -3C; LMP1, LMP2, EBERs, BARTs) |
| | AIDS-related immunoblastic or brain lymphoma | Type III |
| | Infectious mononucleosis | Type III |
| | Chronic active EBV infection | Type III |
| | Lymphoblastoid cell lines <i>in vitro</i> | Type III |
| 0 | Circulating B cells | Type 0 latency (EBNA-1, LMP-2A) |

Tableau 1 : Programmes de latence des gènes de l'EBV

L'expression des gènes de latence est fonction du type de latence, différent selon la pathologie. D'après (Gulley and Tang 2008).

D'autres programmes de latence « non conventionnels » ont été décrits dans des lymphomes de Burkitt endémiques associés à l'EBV. Dans 20 % des cas, les cellules tumorales présenteraient des latences atypiques, soit avec l'expression des protéines nucléaires EBNA-1, -3A, -3B, -3C et une forme tronquée de EBNA-LP sans expression d'EBNA-2 (délétion du gène) ni des LMP (« **latence Wp restreinte** »), soit sans expression des LMP uniquement (**latence EBNA2⁺/LMP⁻**) (Kelly et al. 2002, Kelly et al. 2006). Cette dernière latence est à rapprocher des latences atypiques décrites dans les cellules B du centre germinatif chez les patients atteints de MNI (Kurth et al. 2003). Des travaux récents montrent que les cas de lymphomes de Burkitt avec une « latence Wp restreinte » expriment un homologue viral de la protéine Bcl-2, BHRF1 qui participe à la survie des cellules tumorales (Watanabe et al. 2010).

(2) Les protéines EBNA : les antigènes nucléaires

↳ EBNA-1

La protéine EBNA 1 est codée par le gène *BKRF1*. Les transcrits codant EBNA-1 peuvent être initiés grâce à différents promoteurs selon le programme de latence dans lequel se trouve la cellule. Dans les premières étapes de l'infection, lors de la circularisation du génome de l'EBV, la transcription est initiée au promoteur Wp (Bodescot et al. 1986). Ensuite, le contrôle de la transcription passe sous le contrôle du promoteur Cp (Woisetschlaeger et al. 1990). Durant les phases de latence de type I et II, les promoteurs Wp et Cp sont rendus transcriptionnellement inactifs par méthylation, c'est donc le promoteur Qp qui prend le contrôle (Schaefer et al. 1995b). Ce promoteur est régulé par le cycle cellulaire d'une part (Davenport and Pagano 1999), et par des cytokines d'autre part, telle que le TGF- β (Liang et al. 2000). Lors de l'entrée dans le cycle lytique, la transcription est sous le contrôle d'un quatrième promoteur, le promoteur Fp (Schaefer et al. 1995a).

La protéine EBNA-1 est la protéine de latence requise pour la réplication et la maintenance de l'épisome viral durant les divisions cellulaires. Composée de 641 acides aminés, elle est constituée d'un domaine amino-terminal basique, riche en répétition Glycine-Alanine, d'un court domaine également basique contenant un signal de localisation nucléaire et d'un long domaine Carboxy-terminal hydrophobe contenant les domaines de dimérisation et de fixation à l'ADN (Figure 6) (Ambinder et al. 1991).

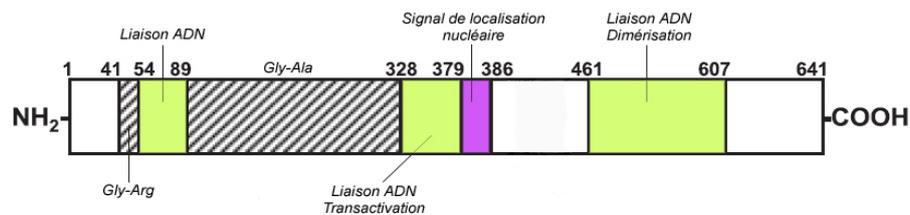


Figure 6 : Structure de la protéine EBNA-1

EBNA-1 est constituée de différents domaines : trois domaines de liaison à l'ADN, un domaine riche en résidus de Glycine et Arginine (Gly-Arg), un domaine riche en Glycine et Alanine (Gly-Ala), une séquence signal de localisation nucléaire, un domaine de transactivation et un domaine de dimérisation. D'après (Pour revue, (Iwakiri et al. 2006).

Les homodimères EBNA-1 se lient aux chromosomes cellulaires et sont à l'origine de réplication OriP sur le génome de l'EBV (Figure 3). L'OriP est constituée des séquences FR (Family of Repeats) et DS (Dyad Symmetry) sur lesquelles vient se fixer EBNA-1 formant ainsi une boucle de 1 kb stabilisant les interactions (Goldsmith et al. 1993, Hebner et al. 2003, Leight and Sugden 2000). EBNA-1 peut également se fixer aux promoteurs viraux (Qp, Cp et LMP-1p). EBNA-1 interagit avec des promoteurs de gènes cellulaires impliqués dans la croissance, comme le gène codant la cycline D1, ou dans la migration, comme les chémokines CCL3 et CCL4 (Canaan et al. 2009, Hebner et al. 2003, Leight and Sugden 2000).

Bien qu'EBNA-1 soit une protéine exogène, les cellules infectées par l'EBV exprimant EBNA-1 ne sont pas reconnues par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL, Cytotoxic T lymphocytes). La région Amino-terminale riche en Glycine-Alanine empêche la dégradation de la protéine EBNA1 par le protéasome, bloquant ainsi sa présentation par le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe I aux CTL (Levitskaya et al. 1997). Elle semble en revanche induire des réponses T CD4 grâce aux peptides présentés par le CMH de classe II (Khanna et al. 1997).

De par son rôle dans le maintien des épisomes dans la cellule, EBNA-1 est essentielle à l'immortalisation des cellules B. L'expression d'EBNA-1 dans les cellules B de souris transgéniques provoque l'apparition de lymphomes et de leucémies suggérant un rôle

oncogénique *in vivo* (Wilson et al. 1996, Wilson and Levine 1992). De plus, un dominant-négatif de EBNA-1 tronqué en amino-terminal conduit à une diminution importante de la croissance des cellules de lignées de lymphomes de Burkitt *in vitro* et *in vivo* (Imai et al. 2005).

↳ EBNA-2

La protéine EBNA-2 est codée par le gène *BYRF-1*. La transcription de EBNA-2 est initiée à partir des promoteurs Wp et Cp (Bodescot et al. 1986). Associée à la latence III, EBNA-2 est la première protéine virale exprimée après l'introduction du génome viral dans le noyau de la cellule hôte par l'intermédiaire du promoteur Wp. Le séquençage de la protéine EBNA-2 provenant de différentes souches d'EBV a montré l'existence de deux variants, EBNA-2A et EBNA-2B qui diffèrent selon leur taille, respectivement de 487 aa et 443 aa (Addinger et al. 1985). Ces variants permettent de définir deux souches de l'EBV, EBV-A et EBV-B. Ces deux souches ont une répartition géographique différente, le type A est retrouvé en Occident, alors que les deux types sont retrouvés en Afrique et en Nouvelle-Guinée. De plus, EBV-A induit principalement une infection latente et la souche EBV-B une infection lytique (Rowe et al. 1989).

EBNA-2 présente en position amino-terminale un domaine de dimérisation chargé négativement et une région riche en proline. La protéine possède une région variable à l'origine des variants, un domaine d'interaction avec la protéine CBF1/RBP-Jκ (Centromere Binding Factor 1 / Recombination-Binding Protein Jkappa) et une région riche en Arginine-Glycine. La partie carboxy-terminale renferme le domaine de transactivation et le signal de localisation nucléaire (Horvath and Schubach 1993, Waltzer et al. 1994).

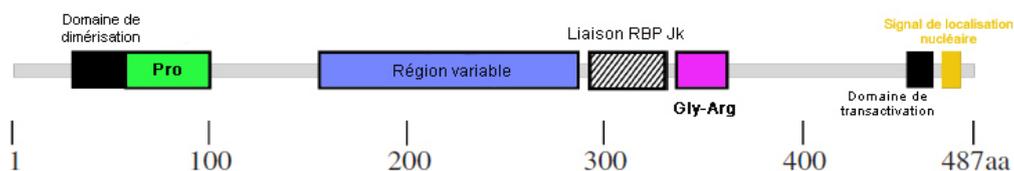


Figure 7 : Structure de la protéine EBNA-2

EBNA-2 est constituée de différents domaines : un domaine d'homodimérisation, une région riche en proline (Pro), une région variable selon le type de variants EBNA-2A ou EBNA-2B, un domaine d'interaction avec la protéine RBP-Jkappa (RBP-Jk), une région riche en Arginine et Glycine (Gly-Arg), un domaine de transactivation et une région contenant une séquence signal de localisation nucléaire. D'après (Zimber-Strobl and Strobl 2001).

La liaison du facteur EBNA-2 à l'ADN ne se fait pas directement mais elle a lieu par l'intermédiaire de la protéine CBF1/RBP-Jκ, protéine effectrice de la voie Notch (Waltzer et al. 1994). EBNA-2 recrute par son domaine de transactivation des protéines de la machinerie transcriptionnelle par un mécanisme similaire à Notch (Hsieh et al. 1996). En l'absence d'EBNA-2, RBP-Jκ interagit avec un complexe répresseur comprenant SMRT/N-CoR (Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid hormone receptor/ Nuclear receptor CoRepressor), CIR (C-promoter binding factor Interacting Corepresseur), SKIP (SKI-Interacting Protein), Sin3A, SAP30 (Sin3-Associated Polypeptide 30) et HDAC-1 et -2 (Histone DeACetylases), aboutissant à la répression transcriptionnelle (Zhou et al. 2000). EBNA-2 activerait le promoteur en déplaçant le complexe répresseur par compétition dans la liaison à RBP-Jκ et en recrutant des protéines ayant une activité Histone Acétyl Transférase.

↪ **EBNA-LP (Leader Protein ou EBNA-5)**

La protéine EBNA-LP est codée par le gène *BWRF1*. Elle est la première à être exprimée avec EBNA-2 à partir du promoteur Wp lors de l'infection. Elle présente une partie amino-terminale constituée de répétitions en tandem codées par deux exons W1 et W2 dérivés de la région IR1 (Figure 3) et d'une partie carboxy-terminale codée par deux exons Y1 et Y2 (Ling et al. 2005).

EBNA-LP n'est pas indispensable au processus d'immortalisation mais elle en augmente l'efficacité (Mannick et al. 1991). Elle potentialiserait les effets d'EBNA-2 en augmentant son activité transcriptionnelle. De plus, EBNA-LP co-localise notamment avec les protéines pRb (Rétinoblastome), p53 et p14ARF (inhibe la dégradation de p53) suggérant son rôle dans la régulation du cycle cellulaire. En coopération avec EBNA-2, EBNA-LP est capable d'induire la transition de la phase G0 à la phase G1 du cycle cellulaire (Kashuba et al. 2003, Sinclair et al. 1994).

↪ **Les EBNA-3 (3A/3, 3B/4, 3C/6)**

Les protéines EBNA-3A, -3B et -3C sont codées respectivement par les cadres de lectures *BLRF3/BERF1*, *BERF2a/BERF2b* et *BERF3/BERF4* localisées en tandem sur le génome viral. De même que pour EBNA-1 et EBNA-2, la transcription des gènes codant les protéines EBNA-3A, 3B et 3C est sous le contrôle des promoteurs Wp et Cp (Bodescot et al. 1986). Ce sont les ARN les moins abondants dans la cellule infectée, et les trois protéines sont

localisées dans le noyau au niveau de la matrice nucléaire et du nucléoplasme (Joab et al. 1987).

Les protéines EBNA-3A et EBNA-3C sont essentielles à l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro*, contrairement à la protéine EBNA-3B (Tomkinson and Kieff 1992). La délétion complète de l'exon codant EBNA-3B ne perturbe ni l'immortalisation ni la croissance des cellules B *in vitro* (Chen et al. 2005).

Les EBNA-3 ne se fixent pas directement à l'ADN et pourraient agir *via* l'interaction avec des protéines cellulaires capables de se lier à l'ADN comme CBF1/RBP-JK (Robertson et al. 1995, Robertson et al. 1996). L'utilisation de la technique du double hybride a permis de mettre en évidence le rôle de répresseurs transcriptionnels d'EBNA-3A et -3C (Bourillot et al. 1998). Les EBNA-3 pourraient inhiber la transcription en déplaçant CBF1/RBP-Jk de sa cible ADN, inhibant ainsi le recrutement d'activateurs de transcription comme EBNA-2. En effet, il a été décrit que les EBNA-3 inhibent l'activation par EBNA2 des promoteurs latents montrant ainsi une boucle de régulation au niveau de l'expression virale (Johannsen et al. 1996).

L'expression d'EBNA-3C dans des fibroblastes perturbe les points de contrôle du cycle cellulaire *via* les protéines régulatrices pRb et p27^{KIP1} (Parker et al. 2000). Dans les LCL, EBNA-3C est associée à c-Myc permettant la stabilisation de la protéine c-Myc, modulant ainsi son activité transcriptionnelle (Bajaj et al. 2008). Enfin, *in vivo* et *in vitro* dans les LCL, EBNA-3C stabilise la protéine Mdm2 en empêchant sa dégradation. Ainsi EBNA-3C induit la dégradation de p53, *via* Mdm2, favorisant la prolifération cellulaire (Saha et al. 2009).

(3) Les protéines membranaires LMP

↳ LMP-1

La protéine LMP-1 est codée par le gène *BNLFI1* qui est transcrit dans le sens L (de U5 à U1, Figure 3) de façon très abondante dans les lymphocytes B infectés. LMP-1 est considérée comme LA protéine transformante de l'EBV. LMP-1 est un récepteur constitutivement actif, homologue fonctionnel des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor Receptor) (Eliopoulos and Rickinson 1998). Les signaux de transduction sont médiés par la partie carboxy-terminale de LMP-1 qui interagit avec les membres de la famille des TRAF (TNFR-associated factor) et avec TRADD (TNFR-associated death domain).

La partie B de ce chapitre est consacrée à la protéine LMP-1.

↳ LMP-2A et -2B

Les protéines LMP-2A et LMP-2B sont codées par le même gène mais présentent un épissage alternatif. La transcription ne peut se faire que lorsque le génome est sous forme circulaire car elle est initiée au niveau des régions répétées terminales (Figure 3).

LMP-2A et -2B possèdent 12 domaines transmembranaires, suivis d'un domaine carboxy-terminal transmembranaire hydrophile. La partie amino-terminale de LMP-2A permet la signalisation. Cette partie est délétée pour LMP-2B. LMP-2A, plus étudiée que LMP-2B, donne un signal de survie à la cellule hôte et empêche le passage de la latence au cycle lytique. LMP-2A mime les activités du BCR (B Cell Receptor) activé (Dykstra et al. 2001). LMP-2B modulerait l'agrégation LMP-2A et ainsi régulerait négativement les fonctions de LMP-2A (Longnecker 2000).

Une des propriétés principales de LMP-2A est donc de moduler le signal induit par le BCR (Figure 8). D'une part, LMP-2A mime la signalisation du BCR et d'autre part, elle agit comme un dominant négatif, bloquant l'activation du BCR. La protéine LMP-2A possède un motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) lui permettant d'interagir avec les tyrosines kinases Lyn et Syk de la signalisation du BCR (Burkhardt et al. 1992). LMP-2A augmente la dégradation de ces kinases induisant le blocage de la signalisation du BCR (Winberg et al. 2000). De plus, LMP-2A, localisée dans les radeaux lipidiques, bloque la translocation du BCR dans ces micro domaines lipidiques et l'internalisation du complexe BCR/antigène (Dykstra et al. 2001). Des données sur des souris transgéniques LMP-2A montrent que la protéine LMP-2A ne présente pas de propriétés oncogéniques mais donne aux lymphocytes B un signal de survie leur permettant d'échapper à l'apoptose en l'absence de sélection *in vivo* dans les centres germinatifs (Caldwell et al. 2000, Caldwell et al. 1998, Mancao and Hammerschmidt 2007).

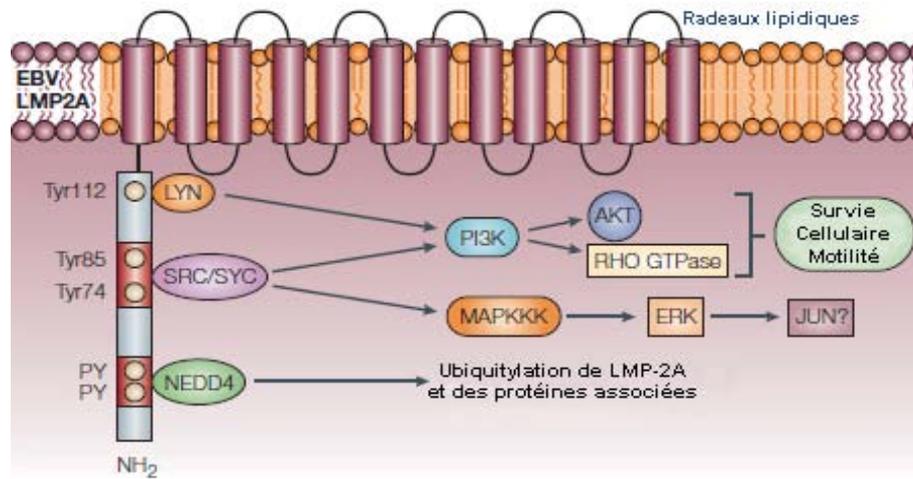


Figure 8 : Signalisation de la protéine LMP-2A

La protéine LMP-2A est constituée de 12 domaines transmembranaires et d'un domaine cytoplasmique amino-terminal. Les 167 acides aminés du domaine amino-terminal représentant la partie signalisatrice sont délétés chez LMP-2B. LMP-2A est phosphorylée au niveau de tyrosines pour le recrutement de tyrosine kinases (Lyn et Syk). Ce recrutement permet l'activation des voies PI3K et MAP kinase permettant la survie et l'invasion cellulaire. Les motifs riches en résidus Proline (motifs PY) permettent le recrutement de l'ubiquitine ligase Nedd4. D'après (Pour revue, (Young and Rickinson 2004).

| Protéines | Latence | Localisation | Fonctions principales |
|------------------|------------|--------------|---|
| EBNA-1 | I, II, III | Nucléaire | Immortalisation des lymphocytes B Maintien du génome viral sous forme épisomale |
| EBNA-2 | III | | Immortalisation des lymphocytes B Activateur de transcription cellulaire et virale en se fixant à RBP-J κ |
| EBNA-3A (EBNA-3) | III | | Répresseur de l'action d'EBNA-2, se lie à RBP-J κ , participe à l'immortalisation des lymphocytes B |
| EBNA-3B (EBNA-4) | III | | Inconnue, se lie à RBPJ κ |
| EBNA-3C (EBNA-6) | III | | Répresseur de l'action d'EBNA2, agit sur le cycle cellulaire, se lie à RBP-J κ , participe à l'immortalisation des lymphocytes B |
| EBNA-LP (EBNA-5) | III | | Cofacteur d'EBNA-2 Interagit avec p53 et pRb |
| LMP-1 | II, III | Membranaire | Oncogène majeur Active les voies NF- κ B |
| LMP-2A | II, III | | Module le signal du BCR Prévient la réactivation virale |
| LMP-2B | II, III | | Inconnue |

Tableau 2 : Les protéines de latence de l'EBV et leurs principales fonctions

(4) Les ARN non codants

↪ Les **ARN EBER1 et EBER2** (EBV Encoded RNAs) sont de petits ARN non poly-adénylés (166 et 172 nt) transcrits par l'ARN polymérase III qui synthétise les ARN de transfert cellulaires. En moyenne, un million de copies sont détectées dans la cellule infectée et ils présentent une structure secondaire en forme de trèfle. Ils sont retrouvés essentiellement dans le noyau au sein de complexes ribonucléoprotéiques. Ces ARN joueraient un rôle dans l'épissage des ARN des protéines EBNA et LMP (Kieff 2001) et de façon plus générale, dans le maintien de l'EBV dans l'organisme hôte. En effet, ils sont impliqués dans des mécanismes anti-apoptotiques (Yamamoto et al. 2000), suppriment l'effet antiviral des interférons α et γ et induisent la production d'IL-10, cytokine immuno-suppressive (Sharp et al. 1993).

↪ Les ARN de la région BamHI A **BART** (BamHI A region's Rightward Transcripts) ont été découverts initialement dans le carcinome du rhinopharynx, mais sont également retrouvés dans d'autres cancers associés à l'EBV comme le lymphome de Hodgkin et le lymphome de Burkitt. Ils présentent dans leur extrémité 5', un cadre de lecture ouvert, BARF0. L'expression de la protéine BARF0 n'est pas retrouvée *in vivo* du fait de sa durée de vie très courte. Un autre transcrit est généré à partir de la région BAMHI et code BARF1 retrouvée dans des tumeurs d'origines épithéliales (Strockbine et al. 1998).

C'est dans la région BART, au sein des introns, qu'ont été découverts les premiers micro ARN (ou miR-BART) de l'EBV (Pfeffer et al. 2004). Plusieurs miR-BART divisés en trois groupes (cluster 1, cluster 2 et le mi-BART2) ont été identifiés, ils sont transcrits pendant la phase latente de l'infection. Des données récentes du groupe de Nancy Raab-Traub montrent que ces miARN sont produits à partir d'un transcrit initial avant son épissage (Edwards et al. 2008). Le rôle des miARN est encore mal connu mais des études récentes suggèrent un rôle dans la pathogenèse associée à l'EBV et un rôle de régulateur dans l'expression des protéines de latence. En effet, certains miARN du cluster 1 interagissent avec la région 3' non traduite (3'UTR) du transcrit de LMP-1 pour réguler négativement son expression, permettant de diminuer sa présentation par le CMH de classe I et ainsi de contrôler de la réponse immune anti-LMP-1 (Lo et al. 2007). De la même manière, le miR-BART22 (cluster 2), fortement exprimé dans des cas de carcinome du rhinopharynx, régule l'expression de la protéine LMP-2A permettant l'échappement au système immunitaire des cellules infectées par l'EBV (Lung et al. 2009). Le miR-BART2 diminue l'expression de l'ADN polymérase BALF5 empêchant le passage du cycle de latence au cycle lytique (Barth

et al. 2008). Enfin, le miR-BART5 (cluster 1) inhibe l'expression de la protéine pro-apoptotique induite par p53, la protéine PUMA (p53 Up-regulated Modulator of Apoptosis), favorisant ainsi la survie cellulaire (Choy et al. 2008).

b) La phase lytique

La réactivation lytique intervient occasionnellement dans les lymphocytes B mémoires infectés par l'EBV. Elle est étudiée *in vitro* dans les lignées cellulaires immortalisées par l'EBV (Hadinoto et al. 2008). Le passage de la phase de latence à la phase lytique peut-être influencé par l'environnement dans lequel se trouve la cellule qui devient alors permissive à la réplication virale. Le cycle lytique peut être induit par stimulation du BCR ou en utilisant des agents chimiques comme le butyrate de sodium et des esters de phorbol. Le cycle lytique permet, au final, l'amplification du génome viral d'un facteur 100 à 1000, aboutissant ainsi au maintien et à la diffusion de l'EBV.

L'expression des gènes aboutissant à l'amplification du génome viral se déroule de manière ordonnée (Figure 9). Après induction du programme lytique, les deux gènes lytiques très précoces (IE), *BZLF1* et *BRLF1*, sont exprimés. Ces gènes codent deux transactivateurs, la protéine Zta (ou ZEBRA : Z Epstein-Barr Replication Activator) et la protéine Rta respectivement. Elles ont pour rôles d'activer certains promoteurs viraux et cellulaires conduisant à une cascade d'expression ordonnée de gènes viraux. On observe donc l'activation de l'expression des gènes précoces (E) impliqués dans la réplication de l'ADN et dans le métabolisme, suivie par l'expression des gènes tardifs (L) codants des protéines virales structurales pour la formation des virions (Tsurumi et al. 2005).

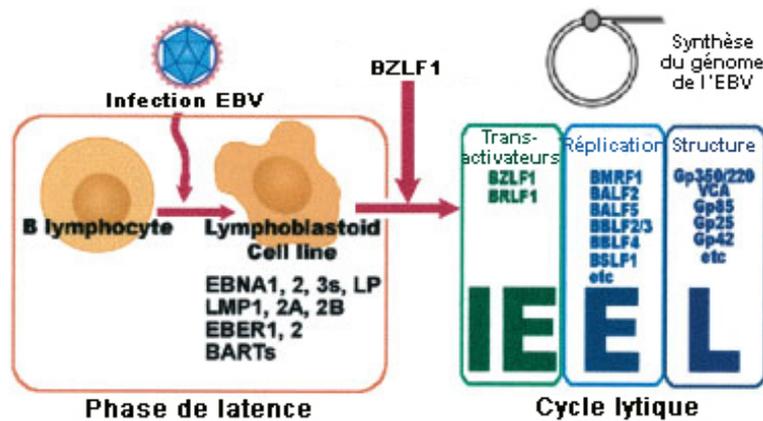


Figure 9 : Le passage du cycle latent au cycle lytique

Les premiers gènes induits (**IE**, Immediate Early genes) sont *BZFL1* et *BRLF1*. Les deux protéines produites (*Zta* et *Rta*) induisent l'expression des gènes précoces (**E**, Early genes). L'expression des gènes précoces induit l'expression des gènes tardifs (**L**, Late genes). Les gènes tardifs codent les protéines de structure du virion. D'après (Pour revue (Tsurumi et al. 2005)).

4. La physiologie de l'infection

a) *In vitro* : infection des cellules lymphoïdes

Deux stratégies peuvent être employées pour l'obtention d'une LCL : infecter *in vitro* des lymphocytes B humains circulants au repos ou utiliser des lymphocytes B du sang périphérique de patients séropositifs pour l'EBV (Nilsson 1992).

Les étapes de l'infection sont illustrées dans la Figure 10. La première étape est la fixation de l'EBV sur le récepteur CD21 et sur le CMH de classe II grâce aux glycoprotéines de l'enveloppe virale gp350/220 et gp85/25/42 respectivement (Tanner et al. 1987). La nucléocapside pénètre ensuite dans le noyau et libère la molécule d'ADN linéaire. Le promoteur Wp permet tout d'abord l'expression des protéines EBNA-2 et EBNA-LP. Après 12h d'infection, les protéines LMP-1, EBNA-3A, -3B et -3C sont exprimées à partir du promoteur viral Cp. Progressivement au cours de l'infection, une seule copie du génome viral se circularise sous forme d'un épisode grâce aux régions terminales répétées (TR) tandis que les autres copies linéaires sont éliminées au cours des divisions cellulaires. L'épisode viral est répliqué 10 à 100 fois en même temps que les chromosomes cellulaires au cours de la phase de synthèse d'ADN. A ce stade, le processus d'immortalisation est complet. L'expression de LMP-2A et -2B, des ARN non-transcrits EBER (EBER-1 et EBER-2) et des transcrits BART complètent l'établissement de la latence de type III. Vingt-quatre heures après l'infection, les lymphocytes B obtenus sont capables de proliférer indéfiniment permettant l'établissement d'une LCL grâce au programme de prolifération ou latence III de l'EBV (Pour revue, (Middeldorp et al. 2003)).

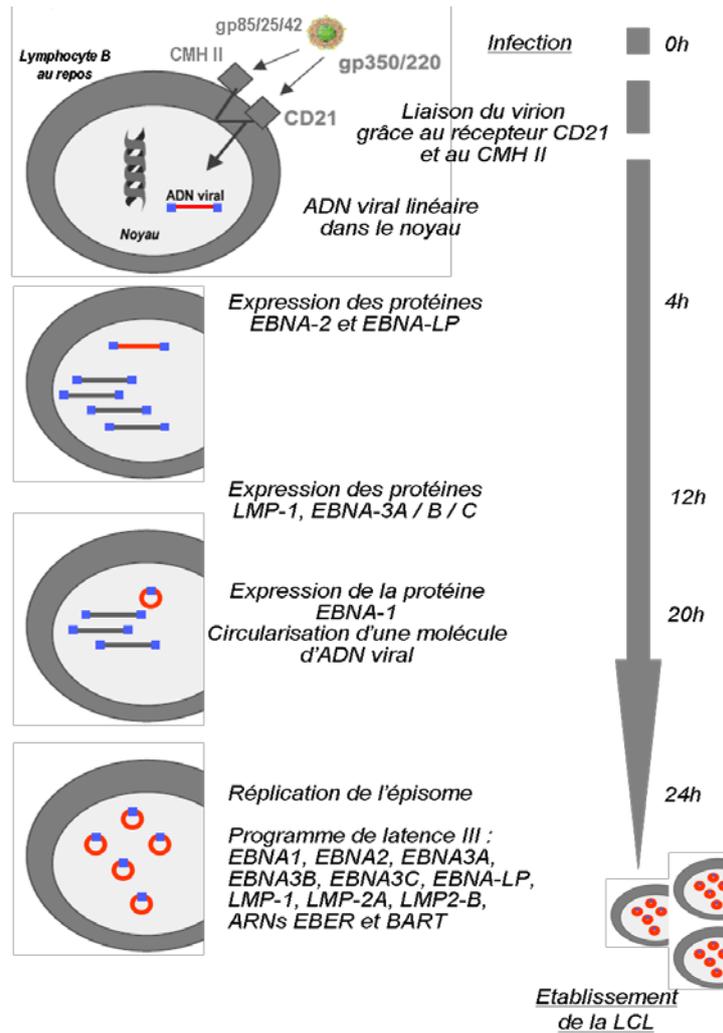


Figure 10 : Etapes de l'infection in vitro pour l'établissement d'une LCL

L'immortalisation des lymphocytes B s'effectue par étapes de la fixation du virion sur la cellule jusqu'à la prolifération des lymphocytes B exprimant le programme de latence de type III. D'après (Pour revue (Middeldorp et al. 2003)).

b) In vivo : infection de l'organisme

(1) L'infection aiguë

L'EBV provenant de la salive échangée avec un individu contaminé peut pénétrer dans l'oropharynx et entrer à l'intérieur des cryptes des amygdales (Figure 11).

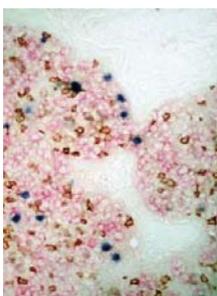


Figure 11 : Immunophénotype des lymphocytes présents dans les cryptes des amygdales

Hybridation in situ à l'aide d'une sonde spécifique des ARN EBER (en bleu) et immunohistochimie à l'aide d'anticorps spécifiques des lymphocytes B (CD20, en rose) et lymphocytes T (CD3, en marron). D'après (Hudnall et al. 2005).

Le virus doit franchir la barrière de cellules épithéliales, qui n'expriment pas le récepteur CD21, avant d'infecter les lymphocytes B présents dans l'oropharynx, suivant un mécanisme qui reste controversé. L'EBV est associé à des pathologies d'origine épithéliale, ce qui indique que le virus est capable d'infecter les cellules épithéliales *in vivo*.

Deux hypothèses peuvent expliquer le passage des virions au travers de la fine couche d'épithélium :

→ L'EBV infecte directement les lymphocytes B sans infecter les cellules épithéliales. Des hybridations *in situ* sur des biopsies d'amygdales de cas de MNI ont montré que seuls les lymphocytes B sont les cibles de l'infection par l'EBV. Le modèle proposé suggère donc un contact direct entre les lymphocytes B et les virions de l'EBV au niveau des cryptes (Anagnostopoulos et al. 1995). En effet, l'épithélium peut-être interrompu par des cellules lymphoïdes infiltrées formant un « lymphoépithélium ». Il est possible que l'EBV profite de cette structure pour infecter les lymphocytes B.

→ L'EBV infecte les cellules épithéliales puis les lymphocytes B de l'oropharynx. Cette seconde hypothèse est celle privilégiée par la plupart des auteurs. Des expériences de co-culture *ex vivo* de cellules épithéliales issues d'amygdales et des lymphocytes B EBV positifs ont montré que les cellules épithéliales peuvent être infectées par l'EBV (Pegtel et al. 2004). L'attachement de l'EBV aux cellules épithéliales peut être possible grâce à la protéine virale gH/gL et à des intégrines présentes à la surface des cellules épithéliales (Borza et al. 2004, Chesnokova et al. 2009).

Lors de la primo-infection, les lymphocytes B infectés présents dans les amygdales expriment toutes les protéines du programme de latence III permettant leur prolifération. Une réponse immunitaire primaire des lymphocytes T CD8 spécifiques des antigènes de la latence III est déclenchée ainsi qu'une réaction NK non spécifique permettant la lyse d'une très grande majorité des cellules infectées par le virus. Les cellules B qui échappent à cette destruction, passent par les centres germinatifs déjà formés dans le tissu lymphoïde de l'oropharynx. A ce niveau, les lymphocytes B infectés expriment les protéines de la latence II (EBNA-1, LMP-1 et LMP-2). Des données récentes montrent que l'EBV persiste dans les centres germinatifs grâce à un équilibre entre la prolifération et l'apoptose (Roughan et al. 2010). Les cellules B infectées sortent du centre germinatif et évoluent vers un statut B mémoires en latence 0 dans le sang périphérique, elles ne sont alors plus reconnues par l'immunité cellulaire (Figure 12).

(2) L'infection persistante

Les lymphocytes B mémoires infectés par l'EBV peuvent retourner dans l'amygdale puis revenir dans la circulation périphérique en latence 0 (Babcock et al. 2000, Decker et al. 1996, Thorley-Lawson and Babcock 1999). Parfois, les lymphocytes B infectés peuvent repasser en phase lytique de façon asymptomatique pour libérer de nouveaux virions dans la salive. Ces cellules sont différenciées en plasmocytes et cette différenciation plasmocytaire serait à l'origine de la réinduction du cycle lytique de l'EBV (Laichalk and Thorley-Lawson 2005). Les virions produits peuvent infecter de nouveaux lymphocytes B, assurant ainsi, la persistance de l'EBV dans l'organisme, ainsi que sa transmission (Figure 12). Une étude récente montre que l'EBV est détectable à des niveaux différents dans la salive de sujets sains de manière continue et qu'il serait sans cesse renouvelé par l'intermédiaire des cellules épithéliales (Hadinoto et al. 2009).

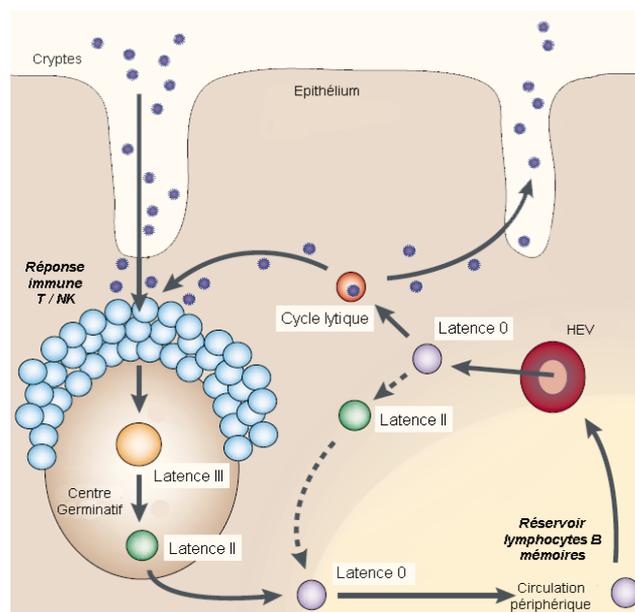


Figure 12 : Modèle de l'infection des lymphocytes B par l'EBV

Lors de la primo-infection, les virions provenant de la salive peuvent infecter soit directement soit indirectement les lymphocytes B. Les lymphocytes B infectés prolifèrent et expriment une latence de type III puis II dans les centres germinatifs. Certaines cellules infectées qui ont échappé au système immunitaire se différencient alors en lymphocytes B mémoires (latence de type 0) et rejoignent la circulation générale. Lors de l'infection persistante, les cellules B mémoires EBV positives sortent de la circulation générale vers les amygdales par les veinules de l'endothélium épais (HEV, High Endothelial Venules). Leur survie nécessite l'induction d'un programme de survie ou latence II puis les cellules retournent dans la circulation générale. Sporadiquement, une réactivation du cycle lytique s'effectue permettant la production de nouveaux virions infectieux qui repasse dans la salive. D'après, pour revue (Thorley-Lawson 2001).

5. La lymphomagenèse B et l'EBV

In vitro, les propriétés immortalisantes de l'EBV sont démontrées par l'établissement de lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL). *In vivo*, les lymphomes B des sujets immunodéprimés, incluant les désordres lymphoprolifératifs post-transplantation, sont causés directement par l'EBV (Rea et al. 1994), ce qui reflète ses capacités transformantes en absence de contrôle par le système immunitaire (Knowles 1999). Comme déjà cité, l'EBV est aussi associé à plusieurs cancers, tels que les lymphomes de Burkitt, les lymphomes de Hodgkin, les lymphomes B à grandes cellules des patients atteints du VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), les lymphomes T/NK nasal, les lymphomes T périphériques et les carcinomes du rhinopharynx.

a) Le lymphome de Hodgkin

Le lymphome de Hodgkin est défini par la présence de grandes cellules atypiques binucléées, appelées cellules de Reed-Sternberg, et par la désorganisation de l'architecture ganglionnaire. Les cellules de Reed-Sternberg sont des cellules lymphoïdes d'origine B dérivant du centre germinatif et présentant des réarrangements clonaux mais anormaux des gènes des immunoglobulines. La cellule tumorale constitue seulement 1 à 5 % de la masse tumorale et présente une latence virale de type II avec l'expression des protéines EBNA-1, LMP-1 et LMP-2 ainsi que l'expression des ARN EBER et BART.

Chez les individus immunocompétents, environ 65 % des lymphomes de Hodgkin sont associés à l'EBV. Chez les patients infectés par le VIH, l'EBV est impliqué dans 100 % des cas. La présence du génome viral a été montrée dans les cellules de Reed-Sternberg et dans des lymphocytes B appelés « bystander » ou de passage, car non clonaux.

Depuis les années 80, plusieurs études ont montré l'implication de l'EBV dans le lymphome de Hodgkin. Les patients ayant eu une MNI, ont un risque accru de développer un lymphome de Hodgkin (Gutensohn and Cole 1980, Hjalgrim et al. 2007).

b) Le lymphome de Burkitt

L'EBV a été découvert dans des cellules tumorales en culture provenant de patients atteints de lymphomes de Burkitt. On distingue différentes formes cliniques : la forme endémique ou Burkitt africain (95-100 % EBV+), la forme sporadique ou Burkitt caucasien (10 à 20 % EBV+) et la forme associée à l'immunodéficience (50 % EBV+). Dans tous les cas de lymphomes de Burkitt, le lymphocyte malin présente une translocation du gène *c-myc* :

t(8,14) dans 80 % des cas, t(2,8) et t(8,22) plus rarement. Ces translocations placent le gène codant l'oncogène *c-myc* (chromosome 8) sous le contrôle du locus des gènes codant les chaînes lourdes (chromosome 14) ou les chaînes légères (chromosome 2 ou 22) des immunoglobulines. Ces translocations chromosomiques conduisent à la surexpression de *c-Myc* et sont l'événement primaire responsable du lymphome de Burkitt.

Les cellules tumorales présentent une latence de type I restreinte à l'expression de la protéine EBNA-1. De ce fait, le rôle de l'EBV dans l'apparition de ces tumeurs reste controversé. En effet, l'EBV pourrait avoir un rôle initiateur lors de la primo-infection des lymphocytes B. La prolifération intense de lymphocytes B en latence III pourrait être à l'origine de la translocation du gène *c-myc*. Cependant, l'EBV pourrait aussi donner un avantage à une cellule déjà porteuse de la translocation. Cet avantage serait donné par les propriétés oncogéniques des protéines de l'EBV (Pour revue, (Klapproth and Wirth 2010)).

c) Les lymphomes B des sujets immunodéprimés

L'immunodépression observée notamment chez les transplantés ou chez les patients atteints du SIDA (Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquisée) est un facteur de risque dans le développement de lymphoproliférations majoritairement de phénotype B et liée à l'augmentation de la charge virale de l'EBV.

Les PTLD (Post-Transplant Lymphoproliferative disorders) surviennent après transplantation d'organe ou de moelle osseuse, pendant le traitement immunosuppresseur administré pour prévenir le rejet de greffe. Le risque de développement d'une lymphoprolifération est variable selon le tissu greffé (10 % dans le cas d'une greffe cœur-poumon, 1 % dans le cas d'une transplantation rénale), la nature et l'intensité du traitement immunosuppresseur. L'EBV est détecté dans toutes les cellules B et dans tous les cas (Timms et al. 2003). Les lymphomes peuvent régresser à la levée partielle de l'immunosuppression ou par injection des lymphocytes du donneur.

B. La protéine de latence LMP-1

La capacité de LMP-1 à transformer des cellules en l'absence d'autres protéines de l'EBV, et sa présence dans la plupart des tumeurs associées à l'EBV, suggèrent un rôle fonctionnel de cette protéine dans la transformation cellulaire.

LMP-1 est impliquée dans l'immortalisation des cellules B par l'EBV *in vitro* (Kaye et al. 1993). L'expression de la protéine LMP-1 dans des fibroblastes confère un phénotype malin aux cellules, induit une perte de l'inhibition de contact et une croissance en privation de

sérum (Baichwal and Sugden 1988, Fahraeus et al. 1990, Moorthy and Thorley-Lawson 1993a, Wang et al. 1985). L'expression de LMP-1 dans des lymphocytes B induit un phénotype de type LCL, c'est-à-dire CD19+, CD20+ et CD23+ (Wroblewski et al. 2002). Toutes les tumeurs EBV+ avec expression de LMP-1 sont associées à une activation constitutive de NF- κ B (Eliopoulos and Young 2001).

1. Le gène *BNLF1*

a) Structure génique

Le gène codant la protéine LMP-1 est *BNLF1*. Il est constitué de trois exons. Deux promoteurs contrôlent son expression pendant la phase de latence : le promoteur ED-L1 (*EcoRI* D fragment-located LMP-1 promoter) et le promoteur TR-L1 (Terminal Repeat-located LMP-1 promoter). A partir de ces deux promoteurs, deux transcrits sont produits. Le premier initié à partir de ED-L1 fait 2,8 kb et l'autre, initié à partir de TR-L1, fait 3,5 kb. Un autre promoteur situé dans le premier intron du gène *BNLF1*, appelé ED-L1A, est actif lors de la phase lytique et permet l'expression d'une protéine tronquée appelée lyLMP-1. Cette forme est traduite à partir du site d'initiation interne situé au niveau de la méthionine 129 (Figure 13).

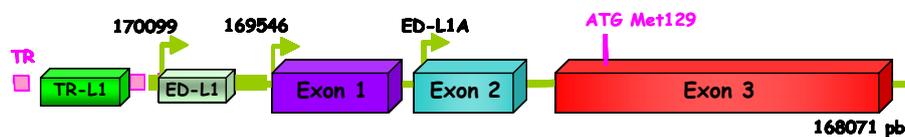


Figure 13 : Structure schématique du gène *BNLF1*

Le gène *BNLF1*, retrouvé au niveau de la séquence U5 (Figure 3), est constitué de trois exons codant les différents domaines de la protéine LMP-1 : exon 1, nucléotides 169546 à 169236 ; exon 2, nucléotides 169157 à 169071 ; et exon 3, nucléotides 168994 à 168071. TR-L1, ED-L1 et ED-L1A sont les trois promoteurs fonctionnels.

b) Le promoteur ED-L1

Le promoteur ED-L1 dirige l'expression de LMP-1. Le transactivateur principal est la protéine EBNA-2 (Wang et al. 1990). Différents sites de fixation pour des facteurs de transcription sont décrits (Figure 14), de l'amont vers l'aval : deux sites de fixation pour la protéine RBP- κ , un élément de réponse ISRE (Interferon-Stimulated Response Element), un site de fixation à AML1 (Acute Myeloid Leukemia 1 ou RUNX1 RUNT-related Transcription Factor 1), un site de fixation à SPI1 (Spleen focus forming virus (SFFV) Proviral Integration)

appelé PU-box (Purine rich), deux sites de fixation à AP-2 (Activating Protein 2), un site de fixation à NF- κ B, un site de fixation E-box (site consensus : CANNTG) permettant la fixation de facteurs à domaine BR-HLH (Basic Region-Helix Loop Helix) tels que Myc/Mad/Max, un site de fixation ATF/CRE (Activating Transcription Factor / Cyclic AMP Response Element) et un site de fixation au facteur de transcription Sp1 (site CpG) (Jansson et al. 2007, Johansson et al. 2009, Sjoblom et al. 1998).

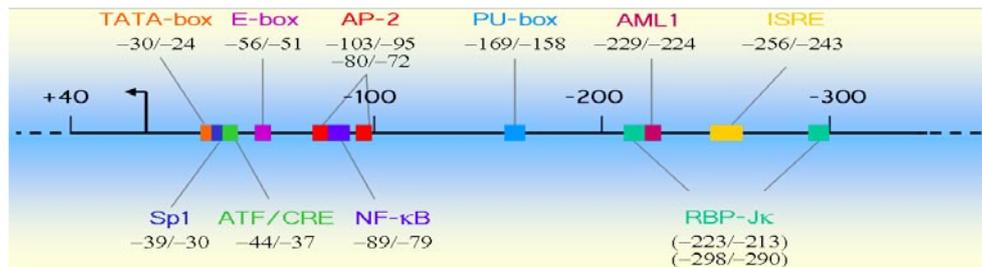


Figure 14 : Séquences régulatrices du promoteur ED-L1

Les sites de fixation des facteurs transcriptionnels sur le promoteur ED-L1 sont représentés par des rectangles de couleurs différentes. La flèche représente le point d'initiation de la transcription du gène *BNLF1*. D'après (Sjoblom et al. 1998).

c) Régulation de l'expression de LMP-1

(1) Transactivation grâce à EBNA-2

L'expression de la protéine LMP-1 dans les cellules en latence III est principalement régulée par le promoteur ED-L1 *via* la protéine de latence EBNA-2 (Kempkes et al. 1995, Wang et al. 1990). Comme nous l'avons vu précédemment, EBNA-2 ne se fixe pas directement à l'ADN, mais *via* des protéines adaptatrices cellulaires, se fixant spécifiquement sur des séquences régulatrices. La mieux étudiée des protéines permettant le recrutement d'EBNA-2 est RBP-J κ (Johannsen et al. 1995, Waltzer et al. 1994). RBP-J κ est une protéine ubiquitaire qui interagit avec EBNA-2 et qui se fixe à une séquence consensus GTGGGAA présente sur les promoteurs des gènes viraux et cellulaires transactivés par EBNA-2 (Zetterberg and Rymo 2005). L'interaction d'EBNA-2 avec RBP-J κ est nécessaire mais pas suffisante pour activer l'expression de *BNLF1* (Zimmer-Strobl et al. 1994). EBNA-2 interagit avec la protéine PU.1, régulateur transcriptionnel des cellules hématopoïétiques, fixée elle-même sur la PU-box (Johannsen et al. 1995, Laux et al. 1994). Grâce à son domaine de transactivation, EBNA2 recrute des facteurs de la machinerie de transcription et des Histones

AcétylTransférases (HAT) permettant l'ouverture de la chromatine au site d'initiation de la transcription (Figure 15).

La protéine EBNA-LP peut également agir en tant que co-activateur avec EBNA-2 pour l'expression de LMP-1 (McCann et al. 2001). De plus, EBNA-2 peut interagir avec le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF, ce qui renforce l'accessibilité des facteurs à la chromatine (Wu et al. 2000). EBNA-3A, -3B et -3C régulent négativement la transactivation du promoteur ED-L1 par EBNA-2 en se liant à la protéine RBP-Jκ (Robertson et al. 1996).

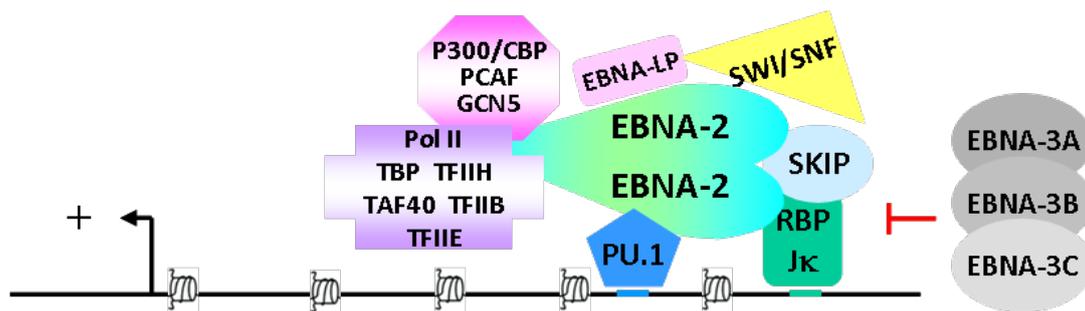


Figure 15 : Modèle de transactivation du promoteur ED-L1 par EBNA-2

EBNA-2 est recrutée par la protéine RBP-Jκ et la protéine SKIP (SKi Interacting Protein). EBNA-2 peut se fixer au promoteur par l'intermédiaire notamment du facteur de transcription PU.1. Elle recrute des protéines de la machinerie transcriptionnelle : la polymérase II (Pol II), la TBP (TATA Binding Protein) et les facteurs TFIID, TFIIE, TFIIA, TFIIB, TAF40. Les histones acétyltransférases p300/CBP (Creb Binding Protein), PCAF (P300/CBP associated Protein) et GCN5 (General Control of amino-acid synthesis 5) ainsi que le complexe SWI/SNF sont recrutés au site d'initiation. EBNA-LP joue un rôle de coactivateur alors que les protéines EBNA-3A, -3B et -3C régule négativement la liaison d'EBNA-2 et RBP-Jκ.

(2) Autres modes de transactivation

Le programme de latence II est observé *in vivo* dans différents types cellulaires dont les lymphocytes B, les cellules NK, les lymphocytes T et les cellules épithéliales, ajoutant à la complexité de la régulation du gène *BNLF1*. Le promoteur ED-L1 est actif en l'absence d'EBNA-2 dans les cellules en latence II.

Le promoteur de LMP-1 peut être activé par d'autres protéines virales. En l'absence d'EBNA-2, RK-BARF0, malgré son faible niveau d'expression, pourrait induire l'expression de la protéine LMP-1 grâce à son interaction avec RBP-Jκ (Kusano and Raab-Traub 2001, Thornburg et al. 2004).

En latence II, des protéines cellulaires peuvent transactiver LMP-1 *via* le promoteur TR-L1. Les protéines STAT3, Sp1 et Sp3 ont été montrées comme activateurs de la transcription de LMP-1 dans les cellules épithéliales (Chen et al. 2001, Tsai et al. 1999). Des travaux récents ont montré que la cytokine anti-inflammatoire IL-10 induit l'expression de la protéine LMP-1 certainement par l'intermédiaire du facteur STAT3 (Kis et al. 2006). D'autres facteurs cellulaires ont été récemment décrits comme activateurs de l'expression de LMP-1, par exemple l'IRF7 (Interferon Regulatory Factor 7) (Ning et al. 2003). Une étude très récente a montré l'implication de la voie de signalisation p38 par l'intermédiaire des facteurs ATF1/CREB dans la transactivation de LMP-1 (Johansson et al. 2010).

La capacité de LMP-1 à activer sa propre transcription a été démontrée renforçant l'idée de boucles autorégulatrices. En 2006, l'équipe de Jean Coll a montré une boucle d'autorégulation de l'expression de LMP-1 grâce à l'activation de la voie JNK et du facteur de transcription AP-1 (Goormachtigh et al. 2006). De plus, l'équipe de Bill Sugden a montré que LMP-1 active la kinase ERK aboutissant à l'expression du facteur de transcription ATF4. Comme cité précédemment, ATF4 transactive à son tour le promoteur du gène *BNLF1* (Lee and Sugden 2008).

Enfin, certaines études montrent l'implication des protéines du cycle lytique dans la régulation de l'expression de LMP-1. La protéine du cycle lytique Rta peut induire l'expression de LMP-1 à partir des deux promoteurs TR-L1 et ED-L1 (Chang et al. 2004). Toutefois, la protéine RTA est paradoxalement inhibée par le facteur de transcription NF- κ B étant lui-même induit par la protéine LMP-1 (Brown et al. 2003).

2. Structure de la protéine LMP-1

a) Structure générale de LMP-1

LMP-1 est une protéine membranaire de 63 kDa et dont la séquence primaire comporte 386 acides aminés (Figure 16). Elle est localisée au niveau de la membrane cellulaire plus précisément au niveau de structures particulières appelées radeaux lipidiques ou « rafts ». La structure de LMP-1 peut être divisée en trois domaines : un segment amino-terminal cytoplasmique de 24 acides aminés, de 6 domaines transmembranaires, ainsi qu'une queue carboxy-terminale cytoplasmique de 200 acides aminés.

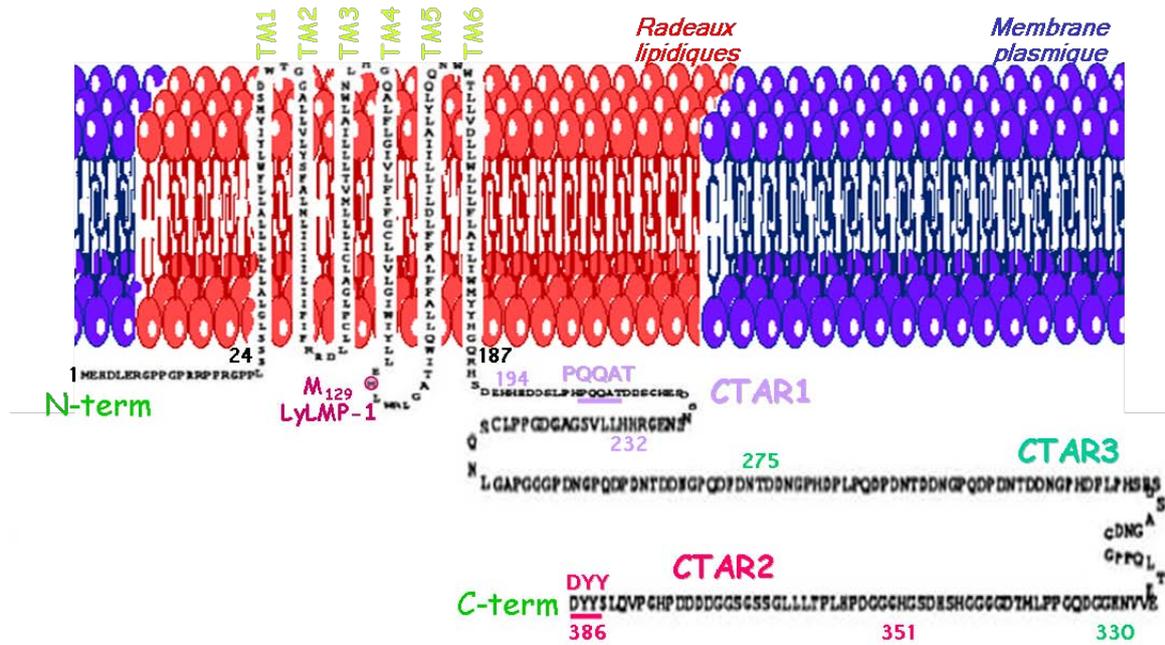


Figure 16 : Structure schématique de la protéine LMP-1

LMP-1 se compose d'une courte séquence amino-terminale cytoplasmique (1-24), de six domaines transmembranaires (25-185), et d'une longue séquence carboxy-terminale cytoplasmique (186-386) contenant les domaines d'activation essentiels à l'initiation des voies de signalisation (CTAR1 2 et 3; Carboxy Terminal Activating Regions). D'après (Moorthy and Thorley-Lawson 1993b).

b) Le domaine amino-terminal

Le domaine amino-terminal cytoplasmique est constitué de 24 acides aminés (MEHDLERGGPPGRRPPRGPPPLSSS). Plusieurs éléments ont montré son implication avec le premier domaine transmembranaire dans la localisation membranaire et le pouvoir transformant de LMP-1 (Izumi et al. 1994, Izumi et al. 1997, Kaye et al. 1993). D'autres travaux ont montré qu'une délétion de n'importe quelle partie de ce domaine n'induit pas de changement dans le processus de transformation du lymphocyte B (Izumi et al. 1994). Enfin, des données *in vitro* et *in vivo* ont montré que ce domaine sert de site d'ubiquitinylation pour permettre la dégradation de LMP-1 par le protéasome (Aviel et al. 2000).

c) Les 6 domaines transmembranaires

Les domaines transmembranaires (TM) de LMP-1 permettent la localisation à la membrane cellulaire au niveau des radeaux lipidiques favorisant ainsi l'agrégation et la signalisation de LMP-1 (Ardila-Osorio et al. 1999, Higuchi et al. 2001). Le groupe de Kieff a

montré récemment que les quatre acides aminés du TM 1 (F₃₈WLY₄₁) ainsi que l'acide aminé W₉₈ du TM 3 sont essentiels à l'association des domaines TM 1 et 2 avec les domaines TM 3 à 6 et par conséquent essentiels au recrutement des protéines adaptatrices et à l'activation de NF-κB (Soni et al. 2006).

d) Le domaine carboxy-terminal

Le domaine cytoplasmique carboxy-terminal est formé par 200 acides aminés et constitué de trois domaines essentiels appelés CTAR (Carboxy-Terminal Activating Regions) (Gires et al. 1999, Huen et al. 1995).

La région CTAR1 se situe entre les acides aminés 194 à 232 et la région CTAR2 entre les acides aminés 352 à 386. La troisième région, CTAR3, moins étudiée, se situe entre les acides aminés 232 et 351.

CTAR1 et CTAR2, contrairement au CTAR3, sont essentielles à l'immortalisation du lymphocyte B (Izumi et al. 1999, Izumi et al. 1997, Kaye et al. 1995). La signalisation de LMP-1 se fait par l'intermédiaire des CTAR et grâce au recrutement des adaptateurs TRAF (TNF Receptor Associated Factors), TRADD (TNF Receptor-Associated Death Domain) et RIP (Receptor Interacting Protein). LMP-1 induit plusieurs voies de signalisation impliquées dans la survie et l'apoptose de la cellule : les voies classique et alternative d'activation de NF-κB (cf. paragraphe C.3), la voie JNK (c-Jun amino-terminal Kinase), la voie p38 MAPK (p38 Mitogen Activated Protein Kinase), la voie PI3K (Phosphatidylinositol 3 Kinase) et la voie JAK3 (Janus Activated Kinase 3).

e) Forme lytique de la protéine LMP-1

Ce variant, appelé LyLMP1, est à l'origine d'une forme tronquée de la protéine. Elle est traduite à partir du site d'initiation interne situé au niveau de la méthionine 129 (Met129, Figure 16). LyLMP-1 correspond à la délétion complète de la partie Amino-terminale et des 4 premiers domaines transmembranaires de LMP-1. Cette forme de la protéine LMP-1 est détectée lors de l'infection par l'EBV et lors de la réactivation (Erickson and Martin 1997). Dans les cellules épithéliales, lyLMP-1 n'est pas oncogénique et inhibe la voie de signalisation NF-κB induite par LMP-1 (Erickson and Martin 2000). De plus, LyLMP-1 inhibe les propriétés oncogéniques de LMP-1 et diminue sa demi-vie (Pandya and Walling 2004, Pandya and Walling 2006). Les résultats sur cette forme tronquée vont en faveur d'un modèle où lyLMP-1 est un dominant négatif naturel de LMP-1. En effet, le modèle LMP-1-

CT (délété des parties amino-terminale et transmembranaire) élaboré par le groupe de Jean Coll à Lille, suggèrent que la protéine tronquée capte les protéines adaptatrices dans le cytoplasme mais ne transduit pas le signal car la protéine ne s'oligomérisse pas (Adriaenssens et al. 2004).

3. LMP-1 et la signalisation TRAF

Comme déjà cité, la région cytoplasmique carboxy-terminale de LMP-1 interagit et s'associe à des protéines cellulaires médiatrices de signaux cytoplasmiques utilisées par les membres de la superfamille des récepteurs au TNF (TNF-R). Les connaissances acquises sur certains membres de cette famille, notamment CD40, ont servi et servent encore à étudier les voies de signalisation induites par LMP-1. LMP-1 recrute des molécules TRAF soit directement, soit par l'intermédiaire de TRADD et RIP. Les trois sous-domaines CTAR1, 2 et 3, sont responsables du recrutement et de l'activation des voies de signalisation.

a) Les protéines TRAF

Six protéines TRAF transductrices du signal ont été mises en évidence (TRAF1 à TRAF6) (Figure 17). TRAF1, TRAF2 et TRAF3 ont été isolées par interaction avec les protéines LMP-1, CD40 et TNF-R2 (Récepteur au TNF de type II), un autre membre de famille des TNF-R. TRAF4, TRAF5 et TRAF6 ont été découvertes notamment grâce à la technique de double hybride chez la levure. Le recrutement des protéines TRAF peut se faire directement ou indirectement. Leur liaison est possible grâce à des petites séquences consensus. Certains membres de la famille TNF-R présentent un domaine appelé domaine de mort (DD, Death Domain) permettant le recrutement de la protéine TRADD, qui recrute à son tour les TRAF et la protéine RIP. Les TRAF permettent l'induction de différentes voies de signalisation impliquées dans la différenciation, la prolifération, la survie et la mort cellulaire (Pour revue, (Soni et al. 2007)).

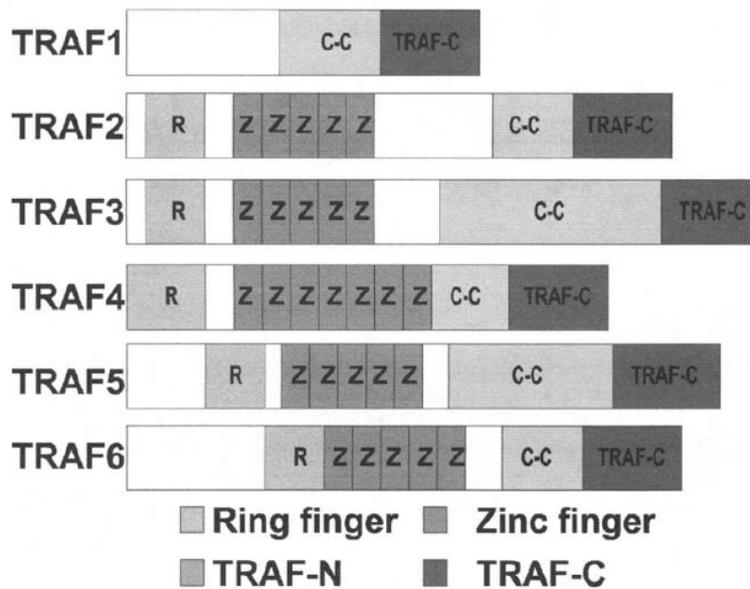


Figure 17 : Structure schématique des protéines TRAF

Les protéines TRAF sont caractérisées par la présence d'un domaine en carboxy-terminal responsable de la dimérisation et important pour la liaison au récepteur. Ce domaine contient une région TRAF-N coiled-coil suivi d'une région conservée TRAF-C. Dans la partie amino-terminale, les motifs ring finger et zinc finger sont importants pour la signalisation en aval. Pour revue (Soni et al. 2007).

b) Le domaine CTAR1 (aa 194 à 232)

La région CTAR1 (ou TES1 Transformation Effector Site 1) contient un site consensus Pro₂₀₄-X-Gln-X-Thr₂₀₈ (PXQXT, X peut être un acide aminé quelconque) de fixation aux protéines TRAF. Le site PQQAT du domaine CTAR1 interagit directement avec TRAF1 et TRAF3 et plus faiblement avec TRAF2 et TRAF5 (Devergne et al. 1996, Gires et al. 1999, Mosialos et al. 1995, Sandberg et al. 1997, Xie and Bishop 2004). TRAF1 co-immunoprécipite avec TRAF2 et LMP-1 dans les LCL alors que TRAF3 co-immunoprécipite avec TRAF5 et LMP-1. LMP-1 recrute donc les protéines sous forme d'hétérodimères TRAF1/TRAF2 et TRAF3/TRAF5 (Devergne et al. 1996). De plus, des analyses mutationnelles montrent qu'une seule mutation dans le site consensus PXQXT réduit l'association de la protéine LMP-1 avec les protéines TRAF (Devergne et al. 1996, Wu et al. 2005). Enfin, des données obtenues sur des mutants LMP-1 CTAR1 délété montrent l'importance de ce domaine dans la capacité à transformer les cellules B, impliquant ainsi les protéines TRAF dans ce processus (Izumi et al. 1997).

c) Le domaine CTAR2 (aa 351 à 386)

Les protéines TRADD et RIP interagissent avec LMP-1 au sein de la région CTAR2 (ou TES2 Transformation Effector Site 2). LMP-1 ne contient pas de domaine DD, par conséquent, TRADD est recrutée dans le sens inverse c'est-à-dire grâce à son extrémité amino-terminale. Le motif Tyr₃₈₄-Tyr-Asp₃₈₆ (YYD) est indispensable pour la fixation de TRADD. En effet, une mutation au niveau de ce site réduit significativement la liaison de TRADD à LMP-1 (Izumi et al. 1997). La protéine adaptatrice TRADD permet le recrutement de la protéine TRAF2 au domaine CTAR2 (Kaye et al. 1996). Des études récentes ont montré que la protéine TRAF6 ne se lie pas directement à LMP-1 mais par l'intermédiaire de la protéine BS69, originellement décrite comme répresseur transcriptionnel (Wan et al. 2004, Wan et al. 2006).

d) Le domaine CTAR3 (aa 232 à 351)

Un troisième domaine a été caractérisé entre CTAR1 et CTAR2. Il ne fixe pas les molécules TRAF mais semble requis pour l'activation de la Janus Kinase 3 (JAK3). Une délétion du domaine CTAR3 n'empêche pas la prolifération des lymphocytes B immortalisés par l'EBV (Izumi et al. 1999). Des analyses *in silico* montrent la présence de trois sites putatifs de fixation riche en proline pour la protéine JAK3 dans le domaine CTAR3. Toutefois, les données concernant une possible association avec la protéine JAK3 sont encore contradictoires et la fonction même du domaine CTAR3 reste discutée (Gires et al. 1999, Higuchi et al. 2002).

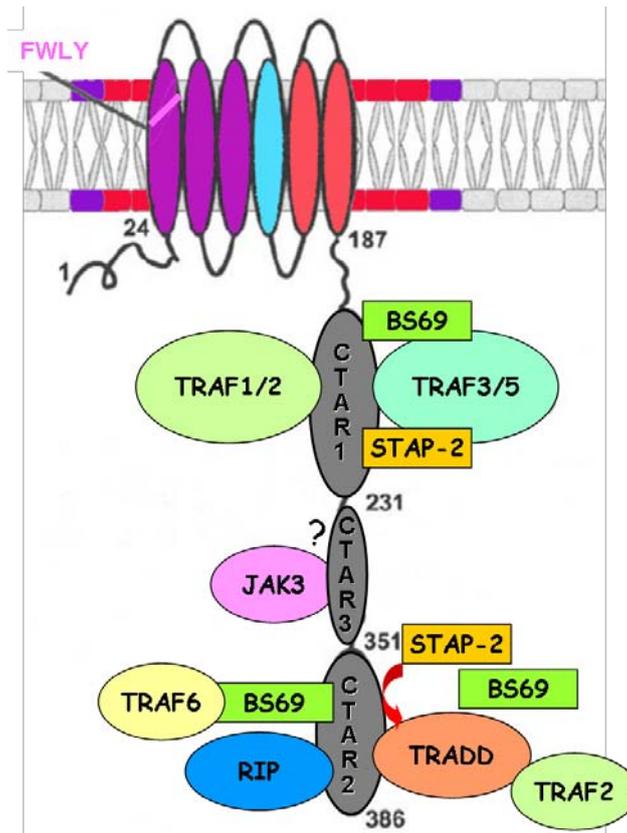


Figure 18 : Représentation schématique du recrutement des protéines TRAF par LMP-1

Le domaine CTAR1 permet la fixation des protéines TRAF1, TRAF2, TRAF3 et TRAF5, alors que le domaine CTAR2 permet la fixation des protéines TRADD, RIP et indirectement TRAF2 par l'intermédiaire de TRADD et TRAF6 par l'intermédiaire de BS69. Les protéines STAP-2 et BS69 régulent négativement la signalisation via TRAF3 et via TRADD. Le domaine intermédiaire, CTAR3, permettrait le recrutement de la protéine kinase JAK3. Pour revue, d'après (Soni et al. 2007) et d'après (Ikeda et al. 2010).

C. Le facteur de transcription NF- κ B

Découvert il y a plus de vingt ans par le groupe de David Baltimore, NF- κ B a été caractérisé grâce aux régions régulatrices de la chaîne légère kappa des immunoglobulines. NF- κ B se lie à l'ADN au niveau du site κ B dont la séquence est 5'-GGGACTTTC-3' (Sen and Baltimore 1986).

Initialement décrit dans les lymphocytes B matures, le facteur NF- κ B est en fait ubiquitaire. Il est impliqué dans le contrôle d'un grand nombre de processus cellulaires, comme la réponse immunitaire, la croissance cellulaire et l'apoptose. En outre, NF- κ B est constitutivement actif dans plusieurs pathologies, y compris le cancer, l'arthrite, l'asthme et des maladies neuro-dégénératives (Pour revue, (Courtois and Gilmore 2006)).

Quatre niveaux de combinatoire peuvent être décrits pour la régulation de l'activité de NF- κ B : la nature des complexes formés par les différentes sous-unités NF- κ B, les inhibiteurs impliqués, les voies de signalisation et les sites κ B retrouvés sur les promoteurs des gènes cibles de NF- κ B partageant le site consensus 5'-GGGRNWYYCC-3'².

1. Les sous-unités NF- κ B

Cinq membres de la famille NF- κ B ont été décrits : p50 et son précurseur p105 (NF- κ B1), p52 et son précurseur p100 (NF- κ B2), RelA (p65), RelB et c-Rel (Figure 19). Toutes les sous-unités sont caractérisées par la présence d'un domaine hautement conservé, le domaine RHD (Rel Homology Domain) responsable de la dimérisation et de la liaison à l'ADN (Pour revue, (Verma et al. 1995)). Les protéines RelA, RelB et c-Rel présentent également un domaine de transactivation dans la partie carboxy-terminale. Les protéines p52 et p50 ne possédant pas de domaine de transactivation, c'est la liaison avec les autres sous-unités qui leur permet de réguler la transcription. Les protéines précurseurs p100 et p105 se distinguent par la présence de nombreuses répétitions ankyrines dans la partie carboxy-terminale. Les domaines ankyrines de la partie carboxy-terminale sont responsables de la localisation cytoplasmique de p100 et p105. L'inhibition des complexes NF- κ B par p100 et p105 sera traitée dans le paragraphe suivant.

² Où R = A ou G, W = A ou T, Y = C ou T et N = A, T, C ou G.

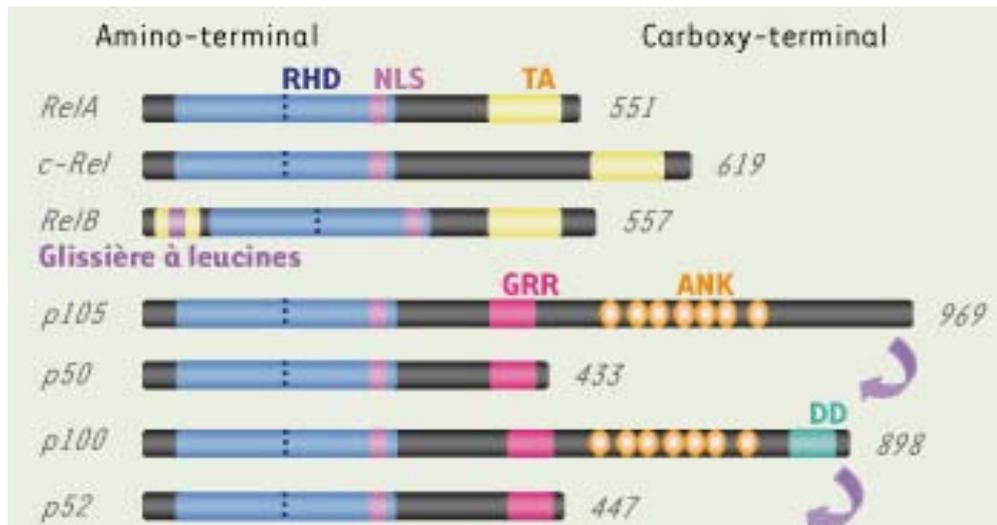


Figure 19 : Structure des membres de la famille NF-κB

Les protéines NF-κB sont caractérisées par la présence d'un **RHD** (Rel Homology Domain), responsable de la dimérisation, de l'interaction avec l'inhibiteur IκB et de la liaison à l'ADN. La séquence de localisation nucléaire (**NLS, Nuclear Localisation Sequence**) permet leur translocation dans le noyau. RelA, c-Rel et RelB contiennent un domaine de transactivation (**TA, TransActivation**). RelB possède un domaine TA amino-terminal contenant un motif de type **glissière à leucines** (Leucine zipper). Les protéines précurseurs p105 et p100 contiennent 7 répétitions ankyrines (**ANK**) qui jouent un rôle dans l'inhibition des protéines, ainsi qu'une région riche en glycines (**GRR, Glycine-Rich Region**), site de maturation par clivage protéolytique (Baud and Jacque 2008).

Toutes les protéines de la famille NF-κB peuvent former des homodimères ou hétérodimères *in vivo*, sauf RelB qui est retrouvée sous forme d'hétérodimères (Huang et al. 2005). Toutes les combinaisons possibles de complexes contribuent à la diversité en termes de régulation transcriptionnelle. En effet, la stabilité des dimères *in vivo* est différente et ils n'ont pas la même affinité pour le site de liaison à l'ADN. Par exemple, les homodimères c-Rel/c-Rel sont plus stables que les homodimères RelA/RelA *in vivo*. Les sous unités p50 et p52 se lient préférentiellement sur la partie 5' du site κB alors que RelA, c-Rel et RelB se lie plutôt à la partie 3' (Chen and Ghosh 1999, Chen et al. 2000).

2. Les inhibiteurs IκB

L'activité de NF-κB est essentiellement régie par l'interaction avec les protéines inhibitrices IκB. Il existe plusieurs protéines IκB ayant des affinités différentes pour les complexes NF-κB. La famille des protéines IκB inclue : les inhibiteurs « classiques » ; IκBα,

I κ B β , I κ B ϵ , les précurseurs p100 (I κ B δ) et p105 (I κ B γ) et les inhibiteurs « atypiques » ; BCL3 (B cell CLL/lymphoma 3), I κ B ζ (ou INAP ou MAIL), et I κ BNS. L'interaction des inhibiteurs classiques et des précurseurs p100 et p105 avec les protéines NF- κ B empêche leur transport vers le noyau grâce au masquage de leur signal de localisation nucléaire.

L'activité des inhibiteurs est régulée par phosphorylation et protéolyse. Les protéines I κ B partagent une structure similaire avec des répétitions ankyrines et des sites de phosphorylation et d'ubiquitinylation permettant leur dégradation par le protéasome (Ghosh et al. 1998, Karin and Ben-Neriah 2000). Par exemple, I κ B α , inhibiteur entre autres des dimères p50/RelA, possède deux résidus sérine (aa 32 et 36) et deux résidus lysine (aa 21 et 22), sites de phosphorylation et d'ubiquitinylation respectivement. En carboxy-terminal, le domaine PEST est riche en résidus proline, glutamate, sérine et thréonine. Ce domaine serait relié au phénomène de dégradation de la protéine I κ B α ainsi qu'à l'inhibition de la liaison à l'ADN du complexe NF- κ B (Malek et al. 1998, Mathes et al. 2008, Phelps et al. 2000) (Figure 20).

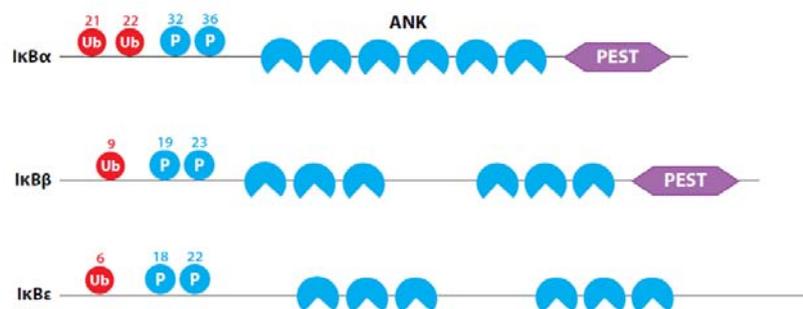


Figure 20 : Structure schématique des inhibiteurs I κ B α , β et ϵ

La structure des membres de la famille des inhibiteurs I κ B contient des répétitions ankyrines (ANK), des sites de phosphorylation (P) et d'ubiquitinylation (Ub) et le domaine PEST est indiqué en carboxy-terminal. Pour revue, (Vallabhapurapu and Karin 2009).

Bien que les inhibiteurs présentent des structures similaires, il existe des différences en termes d'affinités pour les sous-unités NF- κ B. En effet, comme cité plus haut, I κ B α se lie préférentiellement aux hétérodimères RelA/p50 (Pour revue, (Karin and Ben-Neriah 2000)). I κ B ϵ se lie plutôt aux complexes RelA/RelA et c-Rel/RelA alors qu'I κ B β se lie aux complexes RelA/p50 (Weil et al. 1997, Whiteside et al. 1997). BCL3 se lie aux dimères contenant p50 et p52, I κ B ζ et I κ BNS interagissent tous deux avec la sous-unité p50 (Pour revue, (Yamamoto and Takeda 2008)).

Le pro facteur p105 est l'inhibiteur de p50, c-Rel et RelA, et p100 est l'inhibiteur de RelB. Ces deux précurseurs peuvent se lier de deux façons aux sous-unités NF- κ B : soit directement grâce aux domaines de dimérisation RHD soit par l'interaction avec les répétitions ankyrines (Figure 21) (Savinova et al. 2009).

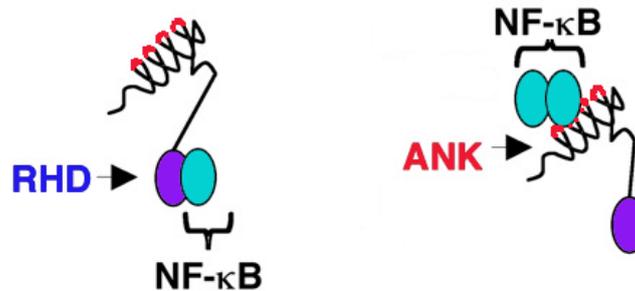


Figure 21 : Deux modes de liaison à NF- κ B pour p100 et p105

La sous-unité NF- κ B peut interagir grâce aux domaines RHD avec p100 ou p105 (à gauche). Les dimères NF- κ B peuvent être fixés aux inhibiteurs p100 et p105 via leur domaine ANK. D'après (Savinova et al. 2009).

3. L'activation NF- κ B

Dans la cellule, les complexes NF- κ B sont à l'état inactif séquestrés dans le cytoplasme par les inhibiteurs décrits précédemment. L'activité des facteurs de transcription NF- κ B est régulée selon deux voies principales induites par différents stimuli : la voie classique ou canonique et la voie alternative ou non canonique. D'autres voies d'activation existent certainement avec par exemple, une troisième voie décrite aboutissant à l'activation des homodimères p50. Nous ne traiterons ici que les deux voies les mieux décrites.

a) La voie d'activation classique (canonique)

La voie canonique est induite par l'activation d'un certain nombre de récepteurs comme ceux des cytokines pro-inflammatoires TNF α et IL-1 (Berberich et al. 1994, Israel et al. 1989, Osborn et al. 1989) et par des produits bactériens ou viraux, comme les protéines LMP-1 de l'EBV et TAX du HTLV (Cahir-McFarland et al. 2000, Herrero et al. 1995, Sun and Ballard 1999).

Lors, par exemple, d'une stimulation par le TNF- α , la fixation du TNF- α sur son récepteur induit le recrutement des différentes protéines adaptatrices TRADD, RIP, TRAF2 et

TRAF5. L'événement clé dans l'activation de la voie classique est la phosphorylation sur les résidus sérine 32 et 36 de l'inhibiteur $I\kappa B\alpha$ par la kinase IKK ($I\kappa B$ kinase), elle-même phosphorylée par la kinase TAK1. La kinase IKK est un complexe multi-protéique comprenant deux sous unités catalytiques, $IKK\alpha$ et $IKK\beta$, et une sous-unité régulatrice $IKK\gamma$ aussi appelée NEMO (NF- κB Essential MOdulator) (Israel 2000, Yamaoka et al. 1998). La phosphorylation de l'inhibiteur $I\kappa B\alpha$ induit alors son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome 26S (Karin and Ben-Neriah 2000). La dégradation de l'inhibiteur permet de démasquer le signal de localisation nucléaire des sous-unités NF- κB et ainsi le transport des complexes dans le noyau. Une fois transloqués, les dimères NF- κB peuvent alors se fixer sur les séquences promotrices et activer ou réprimer les gènes cibles. Cette voie d'activation s'applique majoritairement aux complexes RelA/RelA, RelA/p50 et c-Rel/p50 (Figure 22).

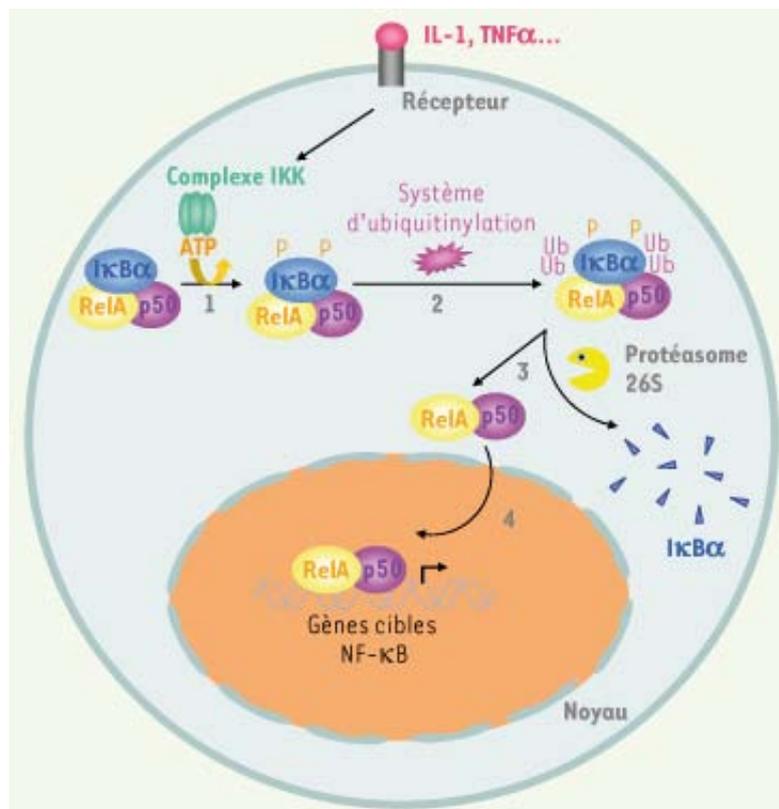


Figure 22 : Voie d'activation classique de NF- κB

*Des stimuli comme le TNF α ou l'IL-1 induisent la voie classique NF- κB , se caractérisant par l'activation du complexe **IKK** qui cible les complexes NF- κB séquestrés par **$I\kappa B\alpha$** . IKK phosphoryle les résidus sérines dans la partie amino-terminale d' $I\kappa B\alpha$ (1) entraînant une polyubiquitinylation d' $I\kappa B\alpha$ (2), aboutissant à sa dégradation par le protéasome (3) et donc à la libération du complexe **p50/RelA** (4). Pour revue, (Baud and Jacque 2008).*

b) La voie d'activation alternative (non canonique)

La voie d'activation alternative est induite par différents membres de la superfamille du TNF comme le CD40 ligand et le facteur BAFF (B cell Activating Factor) (Claudio et al. 2002, Saito et al. 2003, Senftleben et al. 2001).

La kinase NIK (NF- κ B Inducing Kinase) est associée dans le cytoplasme à la protéine TRAF3 qui est elle-même associée avec TRAF2 et aux protéines c-IAP1/2 (Inhibitors of Apoptosis). Dans ces conditions, c-IAP1/2 induit la dégradation de NIK. Dans la cellule, NIK est donc sans cesse renouvelée. Lors d'une stimulation par le CD40-L, le complexe formé par les protéines TRAF3, TRAF2 et c-IAP1/2 est recruté au niveau du récepteur CD40. Les protéines c-IAP1/2 permettent alors la dégradation de TRAF3 conduisant à une diminution de sa concentration intracellulaire. Cette dégradation permet la stabilisation de NIK, puis son activation probablement par autophosphorylation. NIK phosphoryle alors IKK α , qui phosphoryle à son tour les sérines présentes dans les répétitions ankyrines de l'extrémité carboxy-terminale de p100 (Figure 19). Cette phosphorylation entraîne l'ubiquitinylation de p100 provoquant sa dégradation partielle, libérant ainsi les complexes NF- κ B contenant la sous-unité RelB qui sont alors transloqués dans le noyau (Figure 23).

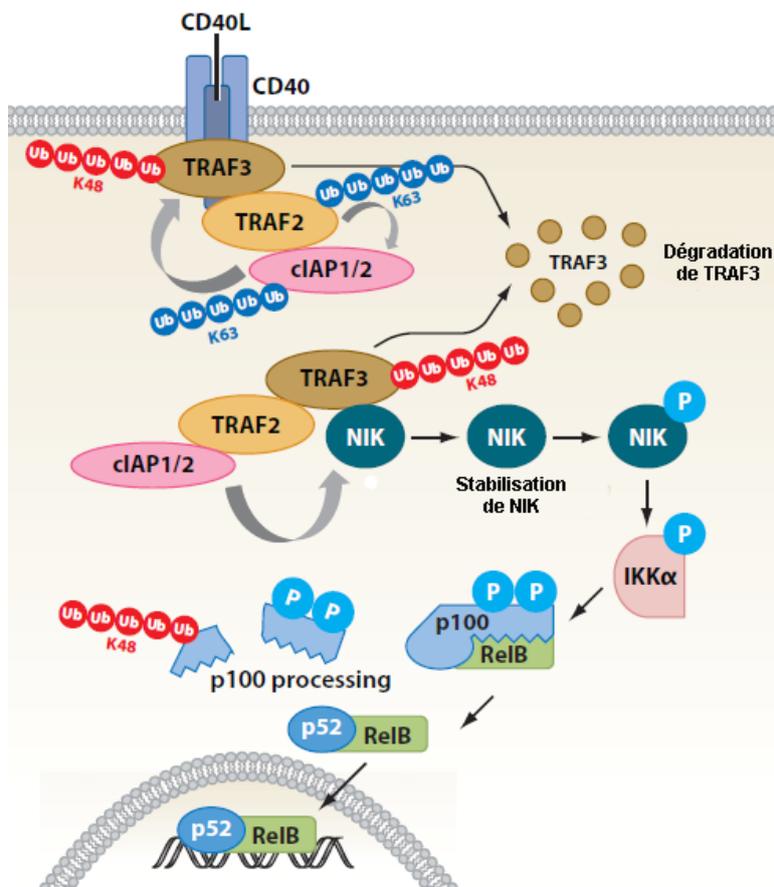


Figure 23 : Voie d'activation alternative de NF-κB

L'activation du récepteur CD40 induit la voie alternative d'activation de NF-κB. Après le recrutement des protéines TRAF2, TRAF3 et c-IAP1/2, TRAF2 induit sa propre ubiquitinylation et celle des protéines c-IAP1/2 (ubK63, ubiquitinylation activatrice non dégradante) ce qui a pour effet d'augmenter l'activité ubiquitine ligase de ces dernières sur TRAF3 (ubK48). TRAF3 est alors dégradé stabilisant la kinase NIK qui phosphoryle la kinase IKKα. IKKα activée phosphoryle p100 aboutissant à sa dégradation par le protéasome et la translocation du complexe p52/RelB dans le noyau. Pour revue, (Vallabhapurapu and Karin 2009).

4. Les gènes cibles de NF-κB

a) Identification

De nombreux gènes sont régulés par NF-κB qui se fixe au niveau de leurs promoteurs par l'intermédiaire du site κB consensus déjà décrit précédemment 5'-GGGRNWYYCC-3'. Un faisceau d'arguments permet de définir les gènes cibles du facteur de transcription NF-κB.

En première ligne, les analyses *in silico* au niveau des promoteurs des gènes permettent de mettre en évidence des sites putatifs de fixation du facteur de transcription. Cependant, cela ne constitue pas une preuve formelle de leur régulation par NF-κB. L'analyse

des niveaux d'ARN et/ou des protéines cellulaires après activation des complexes NF- κ B peut également permettre de détecter les cibles potentielles. Pour établir qu'un gène est véritablement cible du facteur NF- κ B, deux expériences doivent être menées. D'une part, des expériences de retard sur gel ou EMSA (ElectroMobility Shift Assay) sont réalisées à l'aide d'une sonde reprenant une partie de la séquence nucléotidique promotrice du gène d'intérêt et d'une version mutée. L'utilisation d'anticorps spécifiques des sous-unités NF- κ B permet d'établir les complexes fixés *in vitro* sur la séquence promotrice. D'autre part, la séquence promotrice du gène cible et sa version mutée doivent être clonées en amont d'un gène rapporteur (Luciférase ou Chloramphenicol Acetyl Transferase). Ces deux techniques ne permettent pas d'apprécier les interactions du facteur NF- κ B avec le promoteur du gène cible *in vivo*. En effet, la structure chromatinienne ainsi que les cofacteurs associés peuvent réguler la fixation de NF- κ B sur sa séquence cible. Des expériences d'empreinte à la DNase I *in vivo* (ou LM-PCR footprinting) constitue donc une preuve finale, bien que peu employée actuellement, de l'implication de NF- κ B dans l'activation des gènes (Drouin et al. 2009).

b) Fonctions des gènes cibles

Les gènes induits par NF- κ B varient d'un type cellulaire à l'autre. NF- κ B induit une réponse cellulaire conduisant à l'expression de nombreux gènes régulant notamment la survie cellulaire, la prolifération et l'apoptose (Figure 24).

Plus de 150 gènes cibles de NF- κ B ont été mis en évidence. Nous ne présenterons ici qu'une partie des gènes induits par le facteur de transcription NF- κ B. Plusieurs articles et revues, ainsi que le site internet de l'équipe de Dr. Thomas D Gilmore, <http://people.bu.edu/gilmore/nf-kb/index.html>, tentent de répertorier les gènes cibles de NF- κ B (Kucharczak et al. 2003, Lin et al. 2010, Pahl 1999, Prasad et al., Sethi et al. 2008b).

NF- κ B intervient dans l'inflammation en régulant des gènes majeurs de la réponse inflammatoire comme le TNF α , les interleukines IL-6 et IL-8 (Collart et al. 1990, Kang et al. 2007, Son et al. 2008). NF- κ B est connu pour contrôler l'expression de gènes régulateurs du cycle cellulaire comme les cyclines D1 et D2 et CDK6 (Cyclin Dependant Kinase 6) (Iwanaga et al. 2008, Toualbi-Abed et al. 2008). NF- κ B a également pour gènes cibles des gènes codant des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 et A20 (Catz and Johnson 2001, Krikos et al. 1992). Des facteurs angiogéniques ont également été établis comme cible de NF- κ B comme par exemple le plus connu, le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

(Chilov et al. 1997). NF- κ B joue un rôle également dans le phénomène d'invasion et de métastase de la cellule en induisant notamment l'expression des protéines MMP-9 (Matrix MetalloProteinase 9), VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) et ICAM-1 (IntraCellular Adhesion Molecule) (Iademarco et al. 1992, van de Stolpe and van der Saag 1996, Yan et al. 2004).

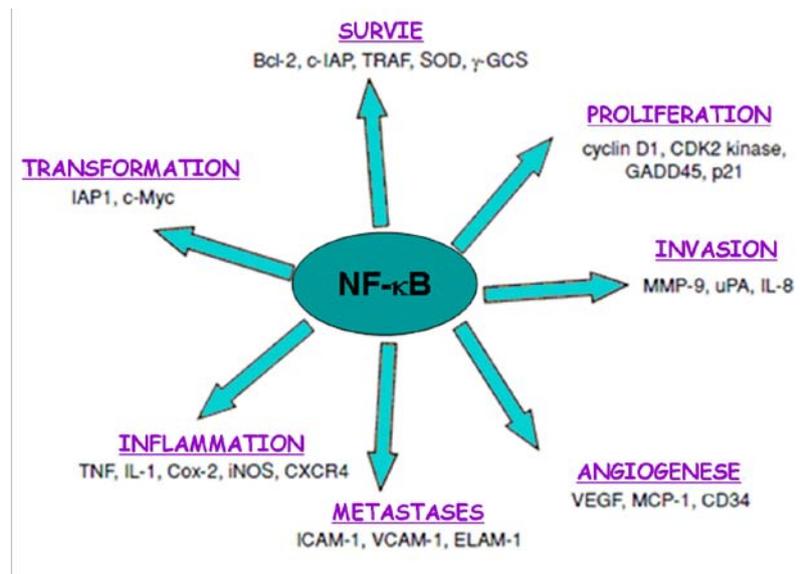


Figure 24 : Quelques gènes cibles du facteur de transcription NF- κ B

NF- κ B cible les promoteurs de gènes impliqués dans de nombreux processus cellulaire. D'après (Prasad et al. 2010).

5. LMP-1 et NF- κ B

De toutes les voies de signalisation activées par la protéine LMP-1, les voies d'activation de NF- κ B sont prédominantes. L'inhibition de NF- κ B dans les LCL, aboutit à la mort des cellules par apoptose (Cahir McFarland et al. 1999, Feuillard et al. 2000, He et al. 2000).

Grâce aux domaines CTAR1 et CTAR2, la protéine LMP-1 localisée dans les radeaux lipidiques, est capable d'induire les deux voies de signalisation aboutissant à l'activation des différents complexes NF- κ B (Laherty et al. 1992, Luftig et al. 2004, Saito et al. 2003) (Figure 25).

Environ 80 % de l'activation NF- κ B est induite par LMP-1 *via* son domaine CTAR2 (He and Chen 2003, Huen et al. 1995, Mitchell and Sugden 1995). Cette activation

correspond à la voie d'activation classique NF- κ B. Le domaine CTAR2 fixe les adaptateurs TRADD et RIP, puis TRAF6 par l'intermédiaire de la protéine BS69 (Izumi et al. 1997, Wan et al. 2006, Wu et al. 2006). Ce recrutement permet l'activation des autres éléments de signalisation. TRAF6 permet le recrutement de la kinase TAK1 (TGF- β Associated Kinase 1) et les protéines TAB1 et TAB2 (TAK1-Binding proteins). Ces protéines sont responsables de la phosphorylation de la sous-unité IKK β du complexe IKK puis directement de l'inhibiteur de NF- κ B, I κ B α . Le complexe IKK phosphoryle la protéine I κ B α qui est dégradée par le protéasome après polyubiquitinylation (Pour revue, (Karin and Ben-Neriah 2000)). Les complexes NF- κ B, contenant majoritairement les sous-unités RelA, p50 et c-Rel sont alors transloqués dans le noyau (Figure 25).

LMP-1 induit la voie alternative de NF- κ B *via* le domaine CTAR1 qui comme nous l'avons décrit précédemment, interagit avec les protéines TRAF1, 2, 3 et 5 (Devergne et al. 1996, Mosialos et al. 1995). Le recrutement de TRAF3 induit l'activation de la kinase NIK (NF- κ B-Inducing Kinase), qui, après autophosphorylation, active la kinase IKK α par phosphorylation. La formation du complexe NIK/IKK α /p100 induit la phosphorylation et la polyubiquitinylation de p100, aboutissant à la formation de la sous-unité active p52 pouvant s'associer préférentiellement à la sous-unité RelB (Atkinson et al. 2003, Luftig et al. 2004) (Figure 25).

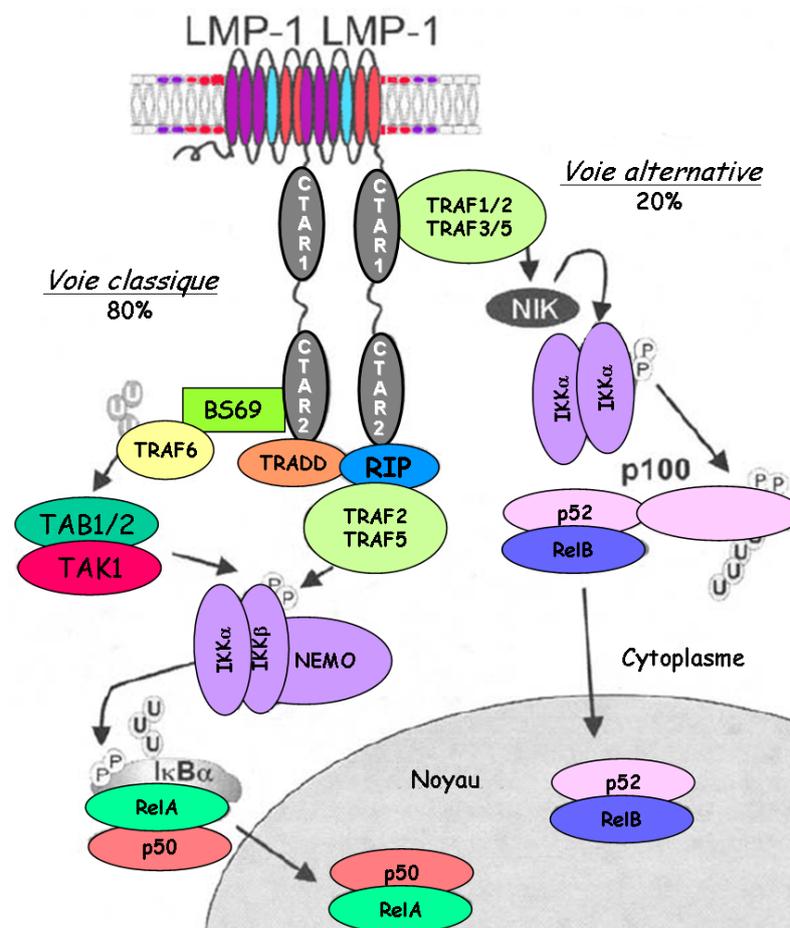


Figure 25 : LMP-1 active les facteurs de transcription NF- κ B

La voie classique d'activation NF- κ B, responsable d'environ 80 % de son activité, est initiée grâce au domaine CTAR2 de la protéine LMP-1. La liaison des adaptateurs permet la phosphorylation du complexe IKK par la protéine TAK1 et par les TRAF. La signalisation conduit à la phosphorylation d'I κ B α . I κ B α est ensuite dégradée par le protéasome. RelA/p50 ainsi libéré passe dans le noyau de la cellule. La voie alternative implique le domaine CTAR1. Les adaptateurs TRAF recrutent la kinase NIK qui phosphoryle la protéine IKK α . La kinase IKK α phosphoryle le précurseur p100. Après protéolyse de p100, les complexes p52/RelB sont libérés dans le noyau. D'après (Pour revue, (Soni et al. 2007).

D. LMP-1 et transformation cellulaire

1. Le pouvoir transformant de LMP-1

Les propriétés oncogéniques de la protéine LMP-1 ont été montrées *in vitro* et *in vivo*. Les premières données obtenues *in vitro* ont montré que LMP-1 est capable de transformer les fibroblastes Rat-1 (Wang et al. 1985). Les données *in vivo* ont d'abord été obtenues sur des souris transgéniques exprimant LMP-1 sous contrôle du promoteur du polyomavirus.

L'expression de LMP-1 dans ces souris est seulement localisée dans les cellules de la peau et elle induit une hyperplasie avec altération de l'expression des gènes de kératine (Wilson et al. 1990).

En 1998, le groupe de Nancy Raab-Traub a établi les premières lignées de souris transgéniques pour LMP-1 dont l'expression est restreinte aux lymphocytes B grâce au promoteur des chaînes lourdes des immunoglobulines. Les trois lignées de souris obtenues développent des lymphomes après 12 mois et l'expression de LMP-1 est détectée à un très fort niveau dans le tissu cancéreux par rapport au tissu lymphoïde normal. Ces résultats ont également permis de corréliser la forte expression de LMP-1 dans les lymphomes avec l'augmentation des niveaux d'expression des protéines A20, BCL-2 et c-Myc, impliquées dans la prolifération et la protection contre l'apoptose (Kulwichit et al. 1998). Grâce à ces lignées transgéniques, d'autres expériences sur fond CD40^{-/-} ont montré que LMP-1 mime le récepteur CD40 en induisant l'activation et la différenciation des cellules B mais ne permet pas la formation des centres germinatifs (Uchida et al. 1999). L'analyse immunophénotypique des tumeurs observées chez les souris transgéniques LMP-1 montre que les cellules tumorales sont IgM forte et IgD faible et CD5⁺, indicateurs des lymphocytes B-1a (Shair et al. 2007). Les lymphomes sont caractérisés par une activation constitutive de STAT3. De plus, l'inhibition des voies PI3K/AKT, NF-κB et STAT3 induit un blocage de la croissance des lymphocytes purifiés *in vitro* (Shair et al. 2007). L'analyse de la signalisation chez les souris transgéniques LMP-1 a permis de montrer qu'il n'y avait pas de différence en terme d'activité AKT, JNK, P38 et NF-κB. Cependant, l'analyse des complexes NF-κB par retard sur gel a montré que la sous-unité c-Rel est retrouvée dans les lymphomes suggérant son rôle dans le développement de ces tumeurs (Thornburg et al. 2006).

Le groupe d'Ursula Zimmer-Strobl a établi des lignées de souris transgéniques exprimant la protéine de fusion CD40/LMP-1, c'est-à-dire avec les domaines extracellulaires et transmembranaires de CD40 et le domaine intracellulaire de LMP-1, ceci dans le but d'étudier la signalisation de la protéine LMP-1 indépendamment de son activité constitutive. Les résultats ont mis en évidence que LMP-1 se substitue au récepteur CD40. En effet, les proportions de cellules B et T sont identiques entre les souris sauvages et les souris CD40/LMP-1^{+//}CD40^{-/-} ainsi que les proportions des cellules de la lignée B et l'architecture des organes lymphoïdes. L'expression de la protéine CD40/LMP-1 induit l'activation de la voie classique de NF-κB ainsi que la phosphorylation des MAP kinases JNK, ERK et p38 (Rastelli et al. 2008). Une autre lignée de souris transgénique a été établie. La partie amino-

terminale et transmembranaire de LMP-1 ont été fusionnées au domaine carboxy-terminal du CD40. Ainsi, l'expression constitutive de cette protéine chimérique, LMP-1/CD40, induit une augmentation du nombre de cellules B et l'apparition de lymphomes B après 12 mois. L'activation constitutive induit l'activation de la voie alternative d'activation de NF- κ B et des MAP kinases JNK et ERK (Homig-Holzel et al. 2008).

La protéine LMP-1 seule est donc capable d'induire la lymphomagenèse B dans des lignées de cellules *in vitro* et *in vivo* dans les souris transgéniques.

2. Les variants naturels de LMP-1

Avec celui d'EBNA-2, le polymorphisme de LMP-1 est à l'origine de la diversité génétique de l'EBV. Chaque variant est décrit par comparaison avec le gène *BNLF1* de la souche de référence B95.8. Les variations observées sont essentiellement retrouvées dans l'exon 3 du gène qui code le domaine carboxy-terminal de la protéine LMP-1 mais peuvent être aussi observées dans le domaine amino-terminal et des domaines transmembranaires. Les variations dans la séquence nucléotidique peuvent être de différentes natures : les mutations ponctuelles, le nombre de répétitions d'une séquence de 33 pb (aa 250 à 298), la présence ou l'absence d'une région de 30 pb (del30) (aa 346 à 355) et la présence ou l'absence d'une insertion de 15 pb (del15) dans la troisième répétition de 33 pb (aa 276 à 280) (Walling et al. 1999). D'autres événements ont été retrouvés plus rarement comme une délétion de 69 pb (aa 333 à 355) (Larcher et al. 2003).

Le premier variant décrit en 1991 par l'équipe de Gösta Winberg est associé à un carcinome du rhinopharynx (CAO-LMP-1) (Hu et al. 1991). Le variant CAO, de 404 acides aminés, présente de nombreuses mutations ponctuelles, deux délétions de 30 pb et de 15 pb, et l'insertion de 3 répétitions de 33 pb. Les études fonctionnelles réalisées *in vitro* par transfection dans des cellules épithéliales ont montré que le variant CAO est plus oncogénique que la référence B95.8 (Hu et al. 1993, Trivedi et al. 1994). De plus, des expériences d'immunisation sur des souris ont montré que le variant CAO n'induit pas de rejet et seule la souche B95.8 de LMP-1 est fortement immunogénique. Depuis, plusieurs études ont porté sur des variants LMP-1 issus de carcinomes du rhinopharynx et de lymphoproliférations dans le but d'établir un lien entre le polymorphisme et la pathologie (Chiang et al. 1999, Jenkins and Farrell 1996, Kim et al. 2003, Wang et al. 2007b, Zhou et al. 2001).

Des analyses phylogénétiques sur le gène *BNLFI* ont suggéré l'existence d'une pression de sélection durant le processus d'oncogenèse dans le carcinome du rhinopharynx (Edwards et al. 2004). D'autres données ont été obtenues dans l'équipe de Georges Delsol à Toulouse sur des variants LMP-1 provenant des cellules tumorales de Reed-Sternberg et des lymphocytes B normaux environnants. Les résultats ont montré que les variants issus des cellules tumorales sont plus polymorphes que ceux issus des cellules normales mais que les deux types de variants sont reliés phylogénétiquement (Faumont et al. 2004).

Peu d'études fonctionnelles ont été menées sur les variants LMP-1. Parmi ces études nous pouvons citer celle du groupe de Nancy Raab-Traub qui porte sur une série de six variants LMP-1 associés au carcinome du rhinopharynx. Les propriétés biologiques des différents variants ont été analysées en termes de capacité à transformer les fibroblastes Rat-1, d'induction des voies de signalisation PI3K et NF- κ B et d'altération du cycle cellulaire. Par comparaison à la référence B95.8, tous les variants transforment les fibroblastes Rat-1 et régulent les marqueurs du cycle cellulaires de la même manière. Tous les variants induisent une activité transcriptionnelle NF- κ B et trois d'entre eux présentent une plus forte activité NF- κ B. Ces résultats montrent que les mutations observées chez ces variants LMP-1 n'altèrent pas leur potentiel oncogénique *in vitro*. Les propriétés biologiques des variants LMP-1 sont donc très proches ce qui suggère l'existence d'une pression de sélection (Mainou and Raab-Traub 2006).

3. NF- κ B et transformation par LMP-1

a) Voies d'activation NF- κ B et transformation

NF- κ B est constitutivement actif dans de nombreux cancers et LMP-1 joue un rôle majeur dans la transformation induite par l'activation constitutive de NF- κ B. Plusieurs éléments ont permis de mettre en évidence la relation étroite entre LMP-1 et NF- κ B aboutissant au phénomène de transformation cellulaire.

Des expériences ont été réalisées sur des fibroblastes Rat-1 exprimant soit un mutant LMP-1 empêchant la fixation de l'adaptateur TRADD, soit un dominant-négatif de l'inhibiteur I κ B α . Les résultats obtenus ont montré une perte de l'activité NF- κ B *in vitro* et une diminution des tumeurs NF- κ B dépendantes chez la souris nude. L'activité NF- κ B est donc nécessaire à la transformation cellulaire induite par la protéine LMP-1 (He et al. 2000).

De plus, l'équipe d'Eliott Kieff a montré que l'inhibition de la voie NF- κ B par l'inhibiteur chimique de la phosphorylation d'I κ B α , le BAY11, induit la mort des cellules issues de six LCL différentes par apoptose. La survie des LCL dépend donc de l'activité NF- κ B (Cahir-McFarland et al. 2000).

Comme nous l'avons décrit précédemment, il existe deux voies d'activation de NF- κ B. LMP-1 est capable d'induire les deux voies de signalisation aboutissant à l'activation des différents complexes NF- κ B. Différentes données ont été obtenues permettant de dire que les voies classique et alternative sont actives dans les cellules épithéliales et lymphoïdes, cependant les données concernant la voie alternative sont rares (Atkinson et al. 2003, Luftig et al. 2004, Saito et al. 2003). *In vitro*, l'expression de la protéine LMP-1 est corrélée à un niveau d'expression élevé de la sous-unité p52 dans la fraction nucléaire de cellules tumorales lymphomateuses dérivées de lymphomes de Burkitt. Cette corrélation est également observée par immunohistochimie sur des biopsies de cas de maladie de Hodgkin et de carcinomes du rhinopharynx (Eliopoulos et al. 2003a). Les expériences sur les fibroblastes MEF ont montré que l'inhibition de p52 n'est pas compensée par l'expression de p50. Ces résultats suggèrent donc que les deux voies d'activation de NF- κ B induites par LMP-1 soient impliquées dans des événements différents dans les cellules MEF (Eliopoulos et al. 2003a).

Si LMP-1 induit les deux voies d'activation NF- κ B, leur rôle respectif dans le développement de lymphomes reste cependant à éclaircir.

b) Gènes cibles de NF- κ B et transformation

LMP-1 intervient dans différentes fonctions cellulaires par l'intermédiaire de l'activation des complexes NF- κ B favorisant le processus de transformation en favorisant la protection contre l'apoptose, la prolifération, l'inflammation et l'instabilité génétique. Parmi ces fonctions, la dérégulation de l'apoptose est probablement un des mécanismes majeurs impliqués dans les proliférations lymphoïdes liées à l'EBV. LMP-1 induit l'expression des protéines antiapoptotiques telles que BCL2, A20, Bfl-1 et TRAF1 (D'Souza et al. 2004, Laherty et al. 1992, Rowe et al. 1994, Wang et al. 2003). LMP-1 dérégule la production de cytokines et favorise ainsi un environnement inflammatoire grâce à la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α , l'IL-8 et l'IL-6 (Lin et al., Ren et al. 2004) et à l'expression de chemokines comme CCL5 ou RANTES (Buettner et al. 2007). LMP1 participe également à l'instabilité génétique en induisant l'expression de la polymérase β grâce à l'activation d'hétérodimères NF- κ B c-Rel/p50 (Faumont et al. 2009c).

4. Les autres voies de transformation

a) La voie de signalisation des MAP kinases

ERK (Extracellular Regulated Kinase), JNK (c-Jun amino-terminal Kinase) et p38 sont les principales MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) induites par LMP-1. Ces phospho-sérines MAPK contrôlent un grand nombre de processus cellulaires tels que la croissance, la prolifération, la différenciation, la migration cellulaire et l'apoptose (Dhillon et al. 2007). L'activation des MAPK se déroule en cascade : une MAPKKK (MAP Kinase Kinase Kinase) phosphoryle et active une MAPKK, qui active une MAPK, qui active enfin différents facteurs de transcription (AP1 pour JNK, Elk1 pour ERK et STAT1 pour p38).

LMP-1 induit l'activation des kinases JNK and p38 majoritairement grâce au domaine CTAR2 dans les cellules épithéliales mais peut aussi être médiée par le CTAR1 dans les lymphocytes (Eliopoulos and Young 1998, Wan et al. 2004). Une délétion de CTAR2 inhibe l'activation de JNK par LMP-1 dans les cellules épithéliales (Eliopoulos and Young 1998). Dans les lymphocytes B, CTAR1 peut induire TRAF1 aboutissant à l'activation de JNK (Eliopoulos et al. 2003b).

Enfin, ERK est activée par le domaine CTAR1 probablement grâce aux adaptateurs TRAF2, TRAF3 et TRAF5 (Chuang et al. 2005, Dawson et al. 2008, Mainou et al. 2007, Roberts and Cooper 1998). L'activation par LMP-1 est requise dans la transformation des fibroblastes Rat-1 ce qui démontre l'importance de cette voie dans la pathogénèse médiée par LMP-1 (Roberts and Cooper 1998), bien que son rôle exact dans la cellule B reste à éclaircir.

b) La voie de signalisation de la PI3 kinase

La voie de signalisation PI3K (Phosphatidyl-Inositide 3 Kinase) est impliquée dans de nombreuses réponses cellulaires comme la croissance cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Les PI3K sont une famille de phospholipide 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 génère un second messager qui active en aval des protéines kinases comme la kinase Akt. L'activation de cette dernière induit l'inactivation de ses protéines cibles qui régulent négativement la survie et la croissance de la cellule comme la protéine GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3).

Cette voie de signalisation est détournée par LMP-1 et induit la prolifération des LCL (Brennan et al. 2002). Plusieurs études ont montré que l'activation de la voie PI3K est induite

par le domaine CTAR1 de la protéine LMP-1 (Dawson et al. 2003, Mainou et al. 2005, Shair et al. 2008).

c) La voie de signalisation JAK/STAT

Il existe quatre protéines JAK (Janus Activated Kinase) : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. La kinase JAK3 est exprimée seulement dans les lymphocytes B et T (Verbsky et al. 1996). La famille STAT (Signal Transducers Activators of Transcription) comporte sept membres : STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b et 6. Les protéines STAT sont cytoplasmiques et leur translocation nucléaire est activée par phosphorylation par les kinases JAK. Ces dernières sont activées en réponse aux interférons par autophosphorylation après fixation sur des récepteurs cellulaires (Rawlings et al. 2004). Les dimères STAT se fixent 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 (Bcl-xl) et de prolifération cellulaire (Cycline D1) (Bowman et al. 2000).

Comme nous l'avons vu précédemment, le domaine CTAR3 de LMP-1 serait associé à la signalisation JAK/STAT (Chen et al. 2001). Les données concernant l'induction de la signalisation JAK3/STAT3 sont contradictoires (Gires et al. 1999, Higuchi et al. 2002). L'activation constitutive de STAT1 est observée dans des cancers associés à l'EBV mais le mécanisme par lequel se fait cette activation reste controversé (Fagard et al. 2002, Gires et al. 1999, Higuchi et al. 2002, Nepomuceno et al. 2002, Vaysberg et al. 2009). En effet, quelques études montrent que STAT1 n'est pas constitutivement activée dans les lignées immortalisées par l'EBV mais est toutefois phosphorylée en réponse à l'INF α (Dupuis et al. 2001, Zhang et al. 2004). D'autres études montrent que STAT1 est phosphorylée constitutivement dans les LCL grâce à une boucle autocrine de sécrétion d'interféron (Fagard et al. 2002, Najjar et al. 2005, Nepomuceno et al. 2002).

OBJECTIFS

III. OBJECTIFS

L'EBV est associé à de nombreuses pathologies malignes. La majorité de ces cancers expriment une latence virale de type II, tel que le lymphome de Hodgkin, avec l'expression de l'oncoprotéine LMP-1. LMP-1 est essentielle à l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro*. LMP-1 est un homologue fonctionnel des récepteurs au TNF constitutivement activé et elle active de nombreuses voies de signalisation, majoritairement les voies d'activation de NF- κ B.

Comme la plupart des protéines virales, LMP-1 est très polymorphe, contribuant ainsi à la diversité génétique de l'EBV. Les données obtenues par Nathalie Faumont dans l'équipe de Georges Delsol à Toulouse ont déjà permis de montrer que des variants naturels de LMP-1 provenant des cellules tumorales de lymphomes de Hodgkin (cellules de Reed-Sternberg) sont plus polymorphes que ceux issus des lymphocytes B normaux. Les résultats ont mis en évidence une diversité intra-hôte pour les variants issus des cellules tumorales et des cellules normales qui sont reliés phylogénétiquement. Ces travaux suggèrent qu'il y a une sélection de variants LMP-1 hautement mutés dans les cellules tumorales par comparaison avec ceux issus de donneurs sains.

La plupart des données sur les variants LMP-1 concerne le carcinome du rhinopharynx et peu de données sont publiées sur les relations entre la diversité génétique de LMP-1 et ses propriétés oncogéniques. La question du rôle de la diversité génétique de LMP-1 dans l'émergence des cellules tumorales dans le lymphome de Hodgkin a donc été posée. Lors de mon arrivée au laboratoire de Jean Feuillard, Nathalie Faumont avait rapporté plusieurs variants naturels de LMP-1 clonés et transfectés stablement dans un modèle lymphocytaire, les lymphocytes pro-B Ba/F3. Plusieurs données avaient déjà été obtenues concernant le potentiel oncogénique de ces variants, c'est-à-dire sur le pouvoir prolifératif, la clonogénicité et les propriétés migratoires de chacun des clones Ba/F3-LMP-1. Le premier objectif de ma thèse a donc été de compléter l'analyse fonctionnelle en étudiant l'activation du facteur transcriptionnel NF- κ B ainsi que le pouvoir de protection contre l'apoptose dans les clones Ba/F3-LMP-1 ([Article 1](#); N. Faumont, A. Chanut *et al.*, *Haematologica* 2009).

A la suite de ces résultats, nous avons souhaité définir les complexes NF- κ B mis en jeu dans les clones Ba/F3-LMP-1 et nous avons élargi l'étude à d'autres modèles cellulaires tels que des LCL exprimant la protéine LMP-1 en latence III et des cellules dérivées de lymphome de Burkitt EBV négatives ou EBV positives. Les expériences ont d'abord été menées dans l'objectif de déterminer les parts respectives des voies d'activation classique et

alternative de NF- κ B dans le pouvoir transformant de la protéine LMP-1. Dans un deuxième temps, les sous-unités NF- κ B (p100, p50, RelB, RelA et c-Rel) ont été clonées dans un vecteur d'expression inductible à la doxycycline, le plasmide pRT-1. Les LCL PRI et EREB2-5 ont été transfectées stablement par les différentes sous-unités NF- κ B, le dominant négatif de l'inhibiteur I κ B α et la protéine LMP-1 (Résultats préliminaires à l'article 2).

A l'aide des modèles cellulaires établis, l'objectif a été de définir les rôles fonctionnels des complexes NF- κ B dans la prolifération et la survie des lymphocytes B. La majorité des analyses a été faite sur la LCL EREB2-5 inductible à l'estradiol. Les données *in vitro* ont été associées à des données sur des biopsies de cas de lymphomes B diffus à grandes cellules de type ABC (Activated B-Cell-like) qui présentent une activation constitutive de NF- κ B. Ces analyses nous ont permis de définir les rôles de RelB et RelA dans la survie et la prolifération, et de mettre en évidence laquelle des voies d'activation de NF- κ B prédomine dans les lymphocytes B transformés par l'EBV et dans les lymphomes B diffus à grandes cellules de type ABC (Article 2 : A. Chanut *et al.*, soumis).

RESULTATS

Publication n° 1

IV. RÉSULTATS

Publication n°1 : *Analyse comparative des propriétés oncogéniques et de l'activité du facteur nucléaire kappa B des variants naturels de la protéine membranaire de latence 1 isolés de cellules de Reed-Sternberg de lymphomes de Hodgkin et des lymphocytes B normaux.*

Introduction

Dans ce travail, nous souhaitons établir un lien entre la diversité génétique de la protéine LMP-1 de l'EBV et ses propriétés fonctionnelles dans la cellule B. L'étude a été faite sur douze variants naturels de LMP-1, isolés par microdissection *in situ*, soit de lymphocytes B tumoraux de lymphomes de Hodgkin (cellules de Reed-Sternberg) soit de lymphocytes B non tumoraux environnants aux cellules tumorales (cellules B « bystander ») ou issus de ganglions réactionnels (lymphocytes B normaux) (Fig. 1 et Table 1).

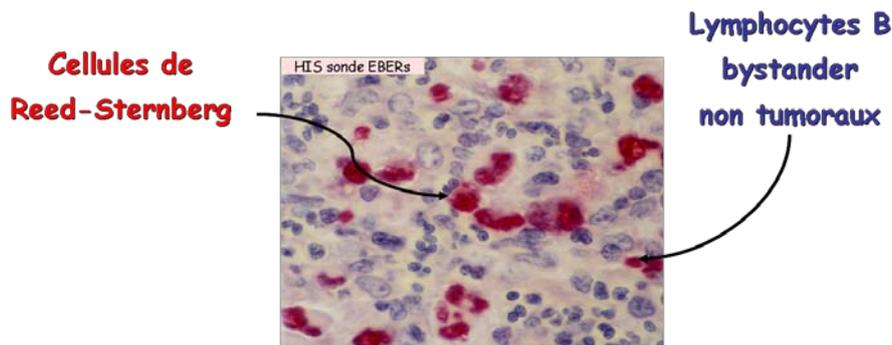


Fig. 1 : L'EBV dans le lymphome de Hodgkin

Hybridation in situ des ARN EBER sur une coupe de ganglion hodgkinien. L'EBV est présent dans les cellules de Reed-Sternberg en latence II où on retrouve l'expression de la protéine LMP-1 et également dans des lymphocytes environnants ou « bystanders » en latence 0. D'après (Faumont et al. 2004).

| | Patients | HL1 | HL2 | HL3 | HL4 | HL5 | HL6 | N1 | N2 | N3 | N4 |
|------------------------|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Origine variants LMP-1 | Cellules de Reed-Sternberg | RS1 | RS2 | RS3 | RS4 | RS5 | | | | | |
| | Cellules B de passage | NT1 | | | NT4 | | NT6 | | | | |
| | Cellules B normales | | | | | | | RN1 | RN2 | RN3 | RN4 |

Table 1 : Les variants naturels de LMP-1

Lors du travail de thèse de Nathalie Faumont, les différents variants ont été clonés dans le vecteur d'expression pCR3.1, séquencés puis transfectés stablement dans la lignée Ba/F3, lymphocytes pro B murins dépendants de l'IL-3 pour leur prolifération. Les propriétés oncogéniques des clones Ba/F3-LMP1 ont été définies grâce aux tests de prolifération en absence d'IL-3 et de formation de colonies en agar mou, reflet du pouvoir clonogénique des cellules.

Durant ma thèse, nous avons également étudié l'activité transcriptionnelle NF- κ B dans les clones Ba/F3-LMP-1 par transfection transitoire du plasmide p1242 ; gène rapporteur de la luciférase sous contrôle d'un promoteur contenant des sites de fixation aux complexes NF- κ B. En parallèle, nous avons analysé par cytométrie en flux le pourcentage de cellules en apoptose en absence d'IL-3, par double marquage à l'annexine V et à l'IP (Iodure de Propidium) ainsi que par mesure du contenu en ADN (sous-pic G1).

Ainsi, l'analyse des séquences nucléotidiques montre que les variants provenant des cellules de Reed-Sternberg sont plus mutés et présentent des évènements génétiques récurrents. Nous avons montré, d'une part, que 100 % des variants isolés des cellules tumorales sont oncogéniques contre seulement 30 % lorsque LMP-1 est isolé des lymphocytes B non tumoraux. D'autre part, nous avons montré que les variants LMP-1, quelle que soit leur origine cellulaire et leur pouvoir transformant, activent spécifiquement le facteur de transcription NF- κ B à des niveaux différents. Enfin, nous avons déterminé le pourcentage de cellules Ba/F3-LMP1 en apoptose après privation des cellules en IL-3. Nos résultats indiquent clairement une corrélation entre le niveau d'activation de NF- κ B et le niveau de protection contre l'apoptose induit par LMP-1.

Comparative analysis of oncogenic properties and nuclear factor- κ B activity of latent membrane protein 1 natural variants from Hodgkin's lymphoma's Reed-Sternberg cells and normal B-lymphocytes.

Faumont N, Chanut A, Benard A, Cogne N, Delsol G, Feuillard J, and Meggetto F.

Haematologica 2009; 94:355-363. doi:10.3324/haematol.13269

Commentaires

Les résultats obtenus lors de ce travail montrent que :

- ↳ Tous les variants LMP-1 activent le facteur de transcription NF- κ B et protègent les lymphocytes Ba/F3 de l'apoptose, nous disposons ainsi de variants LMP-1 faibles et forts activateurs de NF- κ B,
- ↳ Il n'y a pas de relation directe entre le pouvoir oncogénique des variants LMP-1 et le niveau d'activation de NF- κ B,
- ↳ Tous les variants LMP-1 issus des cellules de Reed-Sternberg sont transformants.

Nos données suggèrent donc que le potentiel d'activation de NF- κ B et la protection contre l'apoptose sont des propriétés fonctionnelles de LMP-1 conservées au cours du processus d'accumulation d'événements génétiques, cela quel que soit le contexte cellulaire (*i.e.* cellules tumorales ou normales). Nos observations indiquent que l'activation de NF- κ B n'explique pas à elle seule le pouvoir transformant des variants LMP-1, apparaissant donc nécessaire mais pas suffisante pour induire la transformation lymphocytaire par LMP-1.

Depuis la découverte du variant naturel LMP-1 CAO décrit en 1991, plusieurs études ont été menées sur les propriétés fonctionnelles de ce variant (Hu et al. 1991). Le variant CAO est plus oncogénique dans la lignée de kératinocytes Rhek-1 et moins immunogénique chez la souris que la référence B95.8 (Hu et al. 1993, Knecht et al. 1993, Trivedi et al. 1994). L'analyse des séquences de variants issus de cas de carcinomes de rhinopharynx ou de lymphomes de Hodgkin n'ont pas montré de corrélation directe entre les variations génétiques et le pouvoir oncogénique de LMP-1 (Knecht et al. 1993, Sandvej et al. 1997, Zhou et al. 2001). En 2006, le groupe de Nancy Raab-Traub a publié des travaux sur l'analyse des propriétés biologiques et signalisatrices de six variants naturels de la protéine LMP-1. Ces variants ont été isolés des cellules tumorales de cas de carcinome du rhinopharynx. Les résultats présentés montrent que tous les variants LMP-1 étudiés transforment les fibroblastes Rat-1 et qu'ils activent le facteur transcriptionnel NF- κ B à des niveaux d'intensité différente ainsi que la voie de signalisation PI3K/Akt (Mainou and Raab-Traub 2006). Nos travaux ont été réalisés sur des variants naturels LMP-1 issus de cellules de tumorales de Reed-Sternberg de lymphomes de Hodgkin mais aussi isolés des lymphocytes B « bystander » et normaux. Nous avons donc apporté de nouvelles données sur les propriétés oncogéniques des variants naturels de la protéine LMP-1, obtenues dans un modèle lymphocytaire, en montrant notamment que l'activation NF- κ B ne conduit pas nécessairement à l'oncogénicité.

Résultats intermédiaires

LMP-1 active la voie classique de NF-κB dans les clones Ba/F3-LMP-1 et dans les lignées infectées par l'EBV

Introduction

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre de l'introduction, la protéine LMP-1 a la capacité particulière de détourner les molécules de signalisation TRAF/TRADD des TNF-R induisant ainsi principalement l'activation des complexes NF-κB selon deux voies dites classique et alternative. Le facteur de transcription NF-κB est impliqué dans de nombreux processus cellulaires comme la prolifération et l'apoptose. Cette propriété particulière, pose la question de la dynamique de l'activation des complexes transcriptionnels NF-κB par l'oncoprotéine virale LMP-1. A la suite de nos résultats présentés dans la publication précédente, nous nous sommes donc posés la question de l'activité de liaison à l'ADN et de la nature des complexes NF-κB impliqués dans les clones BaF/3-LMP-1 ainsi que dans différentes LCL dont nous disposons au laboratoire et dans la lignée dérivée d'un lymphome de Burkitt BL2. L'objectif de ces travaux a été de déterminer si l'une ou l'autre des deux voies classique et alternative d'activation de NF-κB sont associées à l'oncogénicité de la protéine LMP-1 et ceci dans un contexte lymphocytaire.

Matériels et Méthodes

Modèles cellulaires : les modèles cellulaires utilisés dans le cadre de ces travaux sont :

- Les modèles cellulaires de souris Ba/F3, transfectés stablement par le vecteur PCR3.1 permettant l'expression des variants LMP-1 (Table 1).
- Nous avons choisi de travailler avec certains clones Ba/F3-LMP-1 représentant des faibles et forts activateurs de NF-κB (Fig. 2).
 - **RS1 / 2 / 4**, provenant des cellules de Reed-Sternberg,
 - **NT1 / 4 / 6**, provenant des lymphocytes B « bystander »,
 - **RN2**, provenant de lymphocytes B normaux,
 - et **neo**, vecteur contrôle conférant seulement la résistance à la néomycine ;

Les variants **RS1**, **RS4**, **NT1**, **NT4** et **RN2** sont les forts activateurs de NF-κB et les variants **RS2** et **NT6** sont les faibles activateurs de NF-κB.

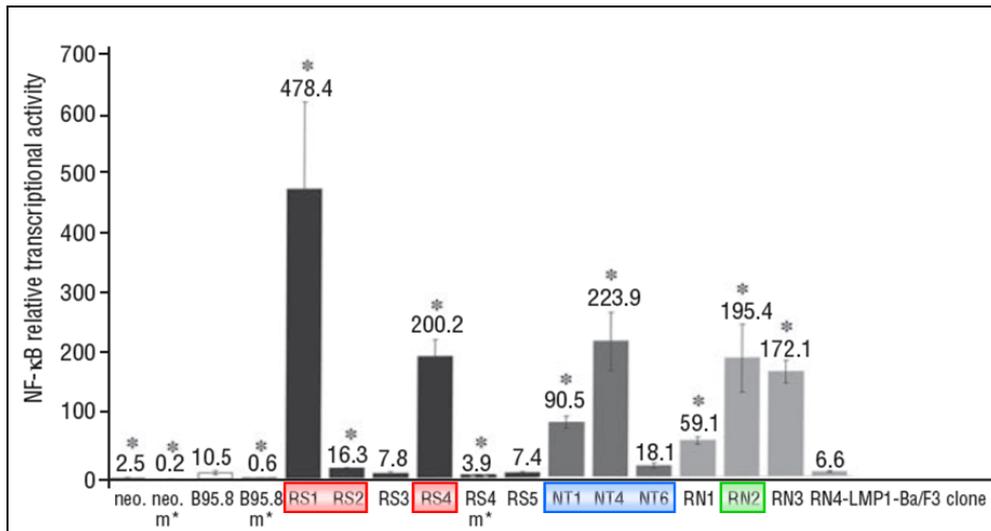


Fig. 2 : Variants LMP-1 pour l'étude des complexes NF-κB

Sept clones Ba/F3-LMP-1 ont été choisis pour déterminer les complexes NF-κB responsables de l'activité transcriptionnelle NF-κB déterminée dans la publication n°1 : RS1, RS2, RS4, NT1, NT4, NT6 et RN2.

- Les LCL « classiques » **PRI**, **1602**, **TSOC**, **LCL.4** et **LCL.6**,
- La LCL particulière **EREB2-5**, EBV inducible par l'estradiol (Fig. 3),
- Et la lignée de lymphomes de Burkitt EBV positive (**BL2+**) ou négative (**BL2-**).

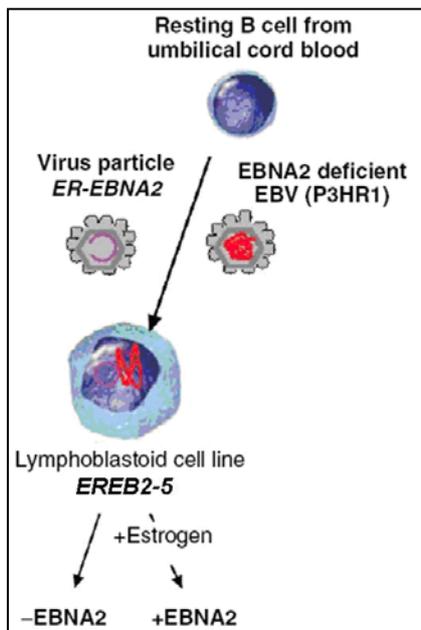


Fig. 3 : Le modèle des cellules inductibles EREB2-5

Les cellules EREB sont des lymphocytes B issus de sang de cordon ombilical co-infectés par une souche de l'EBV déficiente en EBNA-2 (P3HR1) et par une particule virale contenant un mini génome d'EBV exprimant une protéine EBNA-2 fusionnée au récepteur aux estrogènes (ER-EBNA-2). En présence d'estradiol, la protéine EBNA-2 est fonctionnellement active, restaurant ainsi la latence virale de type III. D'après (Schlee et al. 2007).

Vecteurs inductibles et transfection des cellules : le vecteur inductible pRT-1 a été développé dans le laboratoire du Pr Bornkamm (Bornkamm et al. 2005). Le système d'induction des protéines est de type « Tet-On » (induites en présence de tétracycline). Ce vecteur possède une résistance à l'hygromycine permettant la sélection des cellules transfectées. Le vecteur se maintient dans la cellule sous forme épisomale grâce à l'expression constitutive de la protéine EBNA-1 qui se fixe à l'origine de réplication OriP. Le promoteur bidirectionnel permet la transcription du marqueur d'induction NGFR (Nerve Growth Factor Receptor) tronqué (NGFRt) et de la protéine d'intérêt (Fig. 4).

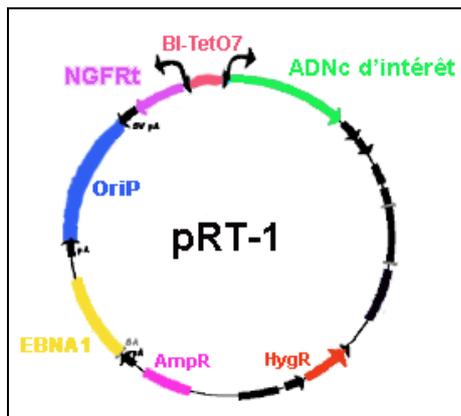


Fig. 4 : Structure schématique du vecteur inductible pRT-1

Le vecteur **pRT-1** se maintient sous forme d'épisome dans la cellule transfectée grâce à l'origine de réplication OriP et à l'expression de la protéine EBNA-1. Il permet l'expression simultanée de la protéine **NGFRt** et de la **protéine d'intérêt** grâce au promoteur bidirectionnel **Tet-O7**. D'après, (Bornkamm et al. 2005).

Le NGFRt est localisé à la membrane plasmique et est complètement délété de la partie cytoplasmique signalisatrice. L'expression du NGFRt permet de trier les cellules induites, ou le cas échéant de connaître le pourcentage d'inductibilité par cytométrie en flux. Au laboratoire, nous disposons des vecteurs pRT-1 permettant l'expression du dominant négatif de la protéine I κ B α (I κ B α _{S32,36A}), de la sous-unité NF- κ B RelA, de la protéine LMP-1 (B95.8 et RS4) ainsi que de la protéine contrôle luciférase (LUC).

Les ADNc des sous-unités NF- κ B RelB et p100 ont été clonés dans le vecteur pRT-1. 10.10⁶ cellules PRI et EREB2-5 ont été transfectées avec 10 μ g de vecteur. Après sélection à l'hygromycine, l'inductibilité des cellules a été vérifiée après l'ajout de doxycycline dans le milieu de culture, par cytométrie en flux (marquage NGFR-FITC) et par immunodétection de la protéine d'intérêt ou par mesure de la luminescence (LUC).

Immunodétection des protéines : les extraits totaux sont réalisés dans le tampon de lyse contenant du β -Mercaptoéthanol (Biorad). Le lysat est soniqué puis l'équivalent d'un million de cellules est déposé sur gel polyacrylamide 8 %. Les extraits nucléaires et cytosoliques sont préparés comme décrits ci-dessous et 30 μ g sont déposés sur gel. Après

migration en tampon Tris Glycine (54 Mm Tris, 150 Mm Glycine, SDS 10 %), les protéines sont transférées sur une membrane de nylon par électrotransfert. La membrane est ensuite saturée avec du lait 5 % dans du TTBS (TBS 1X + 0,1 % Tween (Biorad)) pendant 1h à température ambiante puis incubée 16h à 4°C avec l'anticorps primaire d'intérêt (Tableau des anticorps utilisés en annexe). Après lavage au TTBS, la membrane est incubée 1h avec l'anticorps secondaire couplé HRP (Horse Radish Peroxydase). La révélation se fait par réaction de chimioluminescence (ECL, Amersham). La quantité de protéines déposées est vérifiée grâce aux protéines α Tubuline (extraits totaux et cytosoliques) et Sam68 (extraits nucléaires).

Retard sur gel : les extraits protéiques nucléaires et cytosoliques sont préparés à partir de 30 millions de cellules. Les cellules sont centrifugées et lavées deux fois en PBS. Les culots de cellules sont placés à - 80°C 2h. Les cellules sont ensuite lavées dans le tampon A (5 mM Hepes pH7.9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂) puis centrifugées 2 min à 4°C à 1000 g. Le culot est resuspendu doucement dans 120 μ l de tampon A afin d'achever la lyse des membranes plasmiques par choc hypotonique. Les cellules sont incubées 5 min (Ba/F3) ou 6 min (LCL et BL) dans la glace puis centrifugées à 1500 g 5 min. La fraction cytosolique est réservée. Le culot de noyaux est lavé avec le tampon B isotonique (20 mM Hepes pH7.9, 25 % Glycerol, 0,14 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂) et centrifugé à 1500 g 5 min, puis repris dans 45 μ l de tampon C hypertonique (20 mM Hepes pH7.9, 25 % Glycerol, 0,42 M NaCl, 1,5 mM MgCl₂), puis incubés 1h dans la glace. La fraction nucléaire soluble est récupérée après ultracentrifugation des noyaux 30 min à 40000 g. Les sondes CMH-I et PRE (100 ng) sont marquées avec 100 mCi d'ATP- γ P³² par la T4 polynucleotide kinase (Promega) et purifiées sur colonne (Sephadex G25) (Tableau des sondes en annexe). 30 μ g d'extraits nucléaires sont incubés avec la mélange réactionnel (Tampon E Hepes 0,1 M pH7.9, KCl 0,1 M, 20 % glycérol + ADN de sperme de saumon à 0,7 μ g/ μ l) dans un volume final de 20 μ l. Pour les « supershifts », 2 μ g d'anticorps (Santa Cruz Biotechnology) sont ajoutés au mélange réactionnel. Le mélange réactionnel est pré-incubé 20 min dans la glace et 2 ng de sonde radiomarquée sont ajoutés. Après 20 min à température ambiante, le mélange réactionnel est déposé sur gel polyacrylamide 6 % non dénaturant. La migration des extraits se fait dans du TBE 0.25X à 150 V 2h après une pré-migration de 1h. Le gel est démoulé sur un papier buvard Whatman 3M et séché sous vide à 80°C pendant 30 min. Le signal radioactif est révélé grâce au phosphoimageur Cyclone (Perkin Elmer).

Résultats

1- Expression de la protéine LMP-1 dans nos modèles cellulaires

Les extraits protéiques totaux des lignées LCL et BL ont été analysés par immunodétection de la protéine LMP-1 (Fig. 5), le niveau d'expression des clones Ba/F3-LMP-1 étant présenté dans la figure 1 de la publication n°1. L'expression de la protéine LMP-1 est bien retrouvée dans les lignées immortalisées par l'EBV. Les LCL PRI, EREB2-5, 1602, TSOC et LCL.6 avec la lignée BL2+ présentent un fort niveau d'expression de LMP-1, tandis que peu de protéine LMP-1 est exprimée dans la LCL.4 relativement aux précédentes.

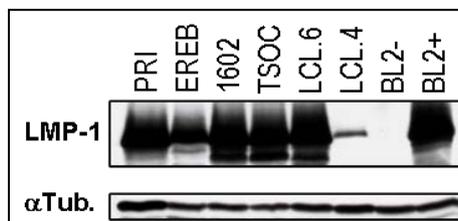


Fig. 5 : Immunodétection de la protéine LMP-1 dans LCL et les BL2

Immunodétection de la protéine LMP-1 dans les extraits protéiques totaux des lignées LCL et BL2. Le contrôle des dépôts est donné grâce à l' α Tubuline (α Tub.).

2- Expression des sous-unités NF- κ B dans les Ba/F3-LMP-1

Les extraits protéiques totaux, cytosoliques et nucléaires des clones Ba/F3-LMP-1 ont été analysés par immunodétection dans le but de déterminer le niveau d'expression des cinq sous-unités NF- κ B (RelA, p105/p50, p100/p52, RelB et c-Rel) (Fig. 6).

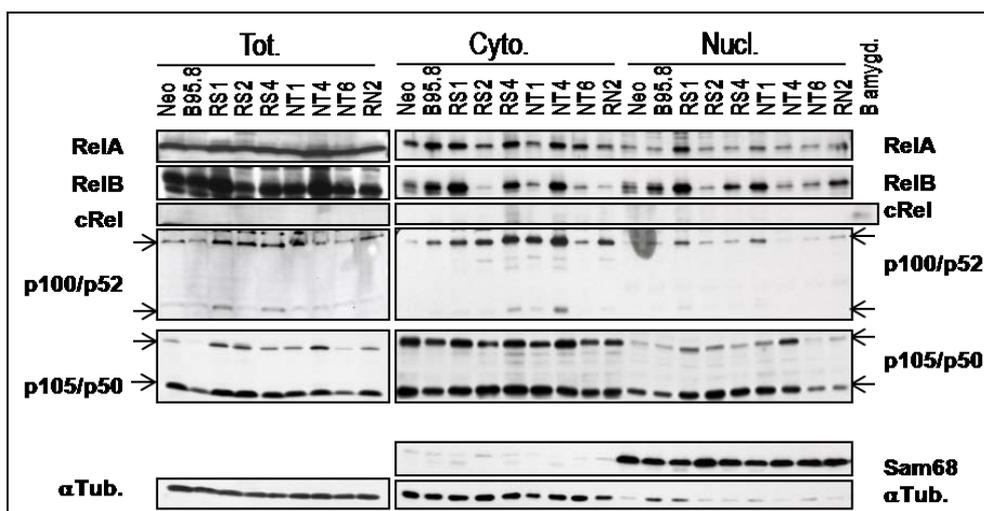


Fig. 6 : Expression des sous-unités NF- κ B dans les clones Ba/F3-LMP-1

Immunodétection des sous-unités NF- κ B dans les extraits totaux (Tot.), cytosoliques (Cyto.) et nucléaires (Nucl.) des clones Ba/F3-neo et LMP-1. L'extrait protéique total de cellules B d'amygdales sert de contrôle pour l'expression de c-Rel. Le contrôle des dépôts est donné grâce à l' α Tubuline (α Tub.) et le contrôle de la pureté des extraits cytosoliques et nucléaires est donné grâce à l' α Tubuline et la protéine Sam68.

Les résultats obtenus sur les extraits protéiques totaux montrent que tous les clones Ba/F3, dont Ba/F3-neo, expriment les sous-unités RelA, RelB et p50 à des niveaux comparables. La sous-unité c-Rel n'est pas retrouvée dans les cellules Ba/F3 alors qu'elle est bien retrouvée dans les extraits totaux de lymphocytes B d'amygdales purifiés. Le clivage de la sous-unité p100 en p52 est très faible mais toutefois plus important dans les clones RS1 et RS4, forts activateurs de NF- κ B (Fig. 2). Le faible clivage de p100 observé ne suffit pas à la translocation de p52 puisqu'elle n'est pas retrouvée dans la fraction nucléaire des Ba/F3. L'immunodétection sur les extraits cytosoliques et nucléaires montrent que la translocation de p50 est similaire entre les clones rapportée à l'expression cytosolique. La présence des pro facteurs p100 et p105 dans les fractions nucléaires est certainement le résultat d'une contamination du cytosol vers les noyaux. La translocation nucléaire de la protéine RelA est similaire entre les clones sauf pour RS1. Dans ce cas, l'augmentation observée peut être liée à une contamination du cytosol dans la fraction nucléaire (α Tubuline dans le noyau). L'expression et la translocation de la protéine RelB est retrouvée dans tous les clones avec une augmentation observée pour RS1, RS4, NT1, NT4 et RN2, tous forts activateurs de NF- κ B (Fig. 2).

Les immunodétections montrent la présence des sous-unités RelA et p50 à niveau constant dans les clones Ba/F3, alors que RelB suit l'activité NF- κ B dans certains clones

Ba/F3-LMP-1 et que p52 semble être très faiblement produite et séquestrée dans le cytosol. Pour conclure, dans les Ba/F3-LMP-1, on observe la translocation nucléaire des sous unités RelA, p50 et RelB mais pas des sous-unités p52 et c-Rel. Cette dernière n'est pas exprimée dans les Ba/F3-LMP-1.

3- Retard sur gel sur les Ba/F3-LMP-1

L'activité de liaison à l'ADN a été observée par retard sur gel à partir des extraits protéiques nucléaires et de la sonde CMH-I qui contient un site de fixation κB retrouvé au niveau du promoteur du gène de la molécule de CMH de classe I (Fig. 7A).

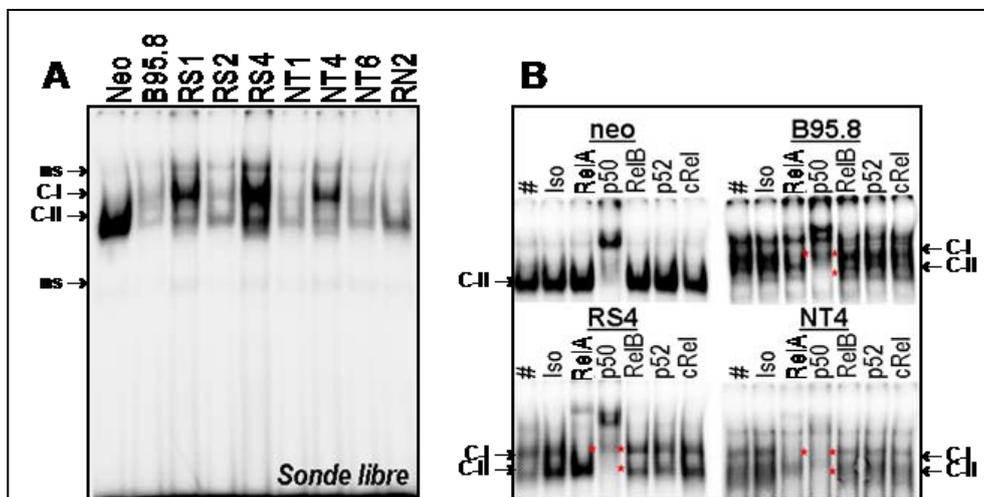


Fig. 7 : Activation de NF- κB par les variants naturels de LMP1

A, Retard sur gel sur les extraits nucléaires des clones Ba/F3 avec la sonde CMH-I. C-I et C-II, bandes spécifiques et ns, bandes non spécifiques. **B**, Retard sur gel et « supershifts » sur les clones Ba/F3-neo, B95.8, RS4 et NT4. #: sans anticorps, Iso : anticorps irrelevant et anticorps spécifiques des sous-unités NF- κB , *: bande « supershiftée » ou réduite.

Le clone contrôle Ba/F3-neo présente une bande intense spécifique, la bande C-II. Une bande supplémentaire, C-I est retardée pour tous les clones Ba/F3-LMP1. L'activité de liaison à l'ADN varie d'un clone à l'autre et C-I est plus intense dans les extraits des clones Ba/F3-RS1, RS4 et NT4, clones ayant les niveaux d'activité transcriptionnelle NF- κB les plus élevés (Fig. 2). La composition des complexes NF- κB se fixant au site κB a été déterminée par « supershift » avec les anticorps spécifiques des sous-unités NF- κB (Fig. 7B). Le retard observé pour le clone Ba/F3-neo correspond aux homodimères p50. Pour les clones Ba/F3-B95.8, RS4

et NT4, représentatifs de tous les clones Ba/F3-LMP-1, la bande C-II est, comme pour Ba/F3-neo, le résultat de la fixation de complexes p50/p50 et la bande C-I est retardée avec l'anticorps RelA et son intensité diminue avec l'anticorps p50. C-II correspond donc à des homodimères p50 et C-I à des complexes RelA/RelA et RelA/p50. Dans tous les cas, nous n'avons pas mis en évidence de complexes contenant RelB et p52, ceci même en utilisant d'autres sondes (*i.e.* PRE : κ B du VIH, et BLC- κ : κ B d'une chemokine) (non présenté). Nous n'observons pas non plus de complexes contenant c-Rel, résultats attendus puisque la sous-unité c-Rel n'est pas exprimée dans les clones Ba/F3-LMP-1. Les variants LMP-1 induisent la formation de complexes contenant la sous-unité RelA dans les cellules Ba/F3, reflet de la voie d'activation classique de NF- κ B. En conclusion de ces retards sur gel : C-I = RelA/RelA et RelA/p50 et C-II = p50/p50.

4- Expression des sous-unités NF- κ B dans les cellules B transformées par l'EBV

Les extraits protéiques totaux, cytosoliques et nucléaires des lignées LCL et BL ont été analysés par immunodétection des sous-unités NF- κ B (Fig. 8).

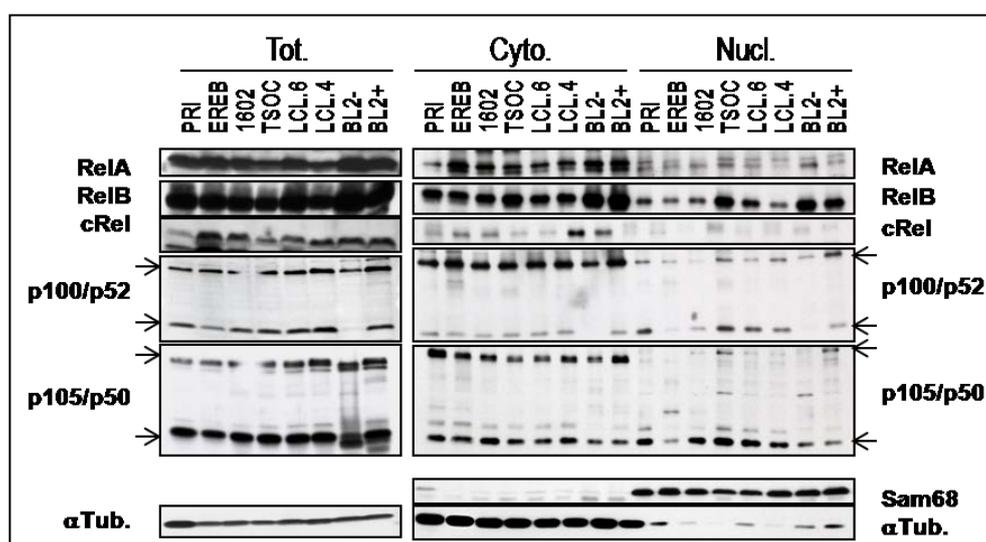


Fig. 8 : Expression des sous-unités NF- κ B dans les LCL et les BL

Immunodétection des sous-unités NF- κ B dans les extraits totaux (Tot.), cytosoliques (Cyto.) et nucléaires (Nucl.) des LCL et BL. Le contrôle des dépôts est donné grâce à l' α Tubuline (α Tub.) et le contrôle de la pureté des extraits cytosoliques et nucléaires est donné grâce à l' α Tubuline et la protéine Sam68.

L'immunodétection sur les extraits protéiques totaux met en évidence que les protéines RelA, RelB, c-Rel et p50 sont exprimées dans les LCL, les BL2 EBV+ mais également dans les BL2 EBV-. Toutefois, le clivage du pro facteur p100 est observé seulement dans les lignées EBV positives. Cette observation est confirmée par les résultats obtenus pour les fractions cytosoliques et nucléaires, où la sous-unité p52 est transloquée dans les noyaux. De plus, c-Rel et RelA sont faiblement transloquées. La protéine p50 est retrouvée à niveau équivalent entre le cytosol et les noyaux, sauf pour la LCL EREB2-5 pour laquelle une faible proportion seulement est transloquée. Enfin, l'expression de RelB semble être partagée entre les deux compartiments. Au total, les résultats montrent que, dans les cellules EBV positives, toutes les sous-unités NF- κ B sont transloquées dans le noyau.

5- Retard sur gel sur les LCL et les BL

L'activité de liaison à l'ADN a été analysée par retard sur gel. Les résultats obtenus grâce à la sonde PRE sont les plus résolutifs (Fig. 9A).

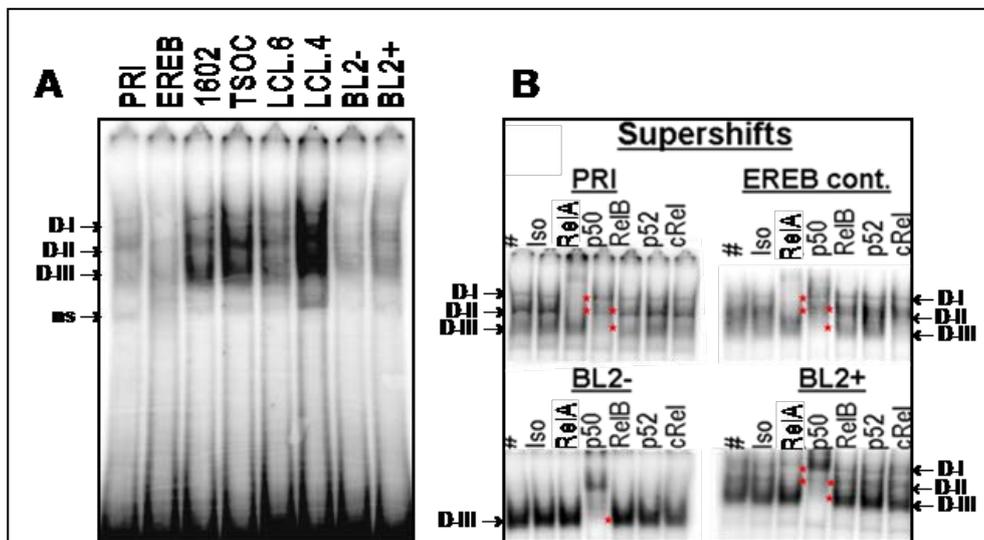


Fig. 9 : Activation de NF- κ B dans les LCL et les BL2

A, Retard sur gel sur les extraits nucléaires des LCL et BL avec la sonde PRE. D-I, D-II et D-III, bandes spécifiques et ns, bande non spécifique. **B**, Retard sur gel et « supershifts » sur les LCL PRI, EREB cont (+ estradiol) et BL2-/+ . # : sans anticorps, Iso : anticorps irrelevant et anticorps spécifiques des sous-unités NF- κ B, * : bande « supershiftée » ou réduite.

Trois bandes spécifiques au maximum sont retardées D-I, D-II et D-III. La plus forte intensité de liaison à la sonde PRE est retrouvée pour les LCL 1602, TSOC, LCL.6 et LCL.4,

alors que cette dernière est la LCL qui exprime le moins la protéine LMP-1 (Fig. 5). Les complexes NF- κ B fixés sur la sonde ont été déterminés à l'aide des anticorps NF- κ B (Fig. 9B). Les bandes D-I et D-II sont retardées en présence de l'anticorps RelA et D-II semble également diminuer en intensité lorsque l'anticorps p50 est ajouté à la réaction. D-I correspondrait donc à des homodimères RelA et D-II à des hétérodimères RelA/p50. D-III est retardée en présence seulement de l'anticorps p50, s'agissant donc d'homodimères p50 fixés sur la sonde PRE. La lignée BL2- ne présente que la bande D-III alors que toutes les autres lignées présentent les trois bandes spécifiques. En conclusion de ces retards sur gel : D-I = RelA/RelA, D-II = RelA/p50 et D-III = p50/p50.

6- Effet de la surexpression de LMP-1 et de RelB dans la lignée PRI

La lignée LCL PRI a été transfectée stablement par le vecteur d'expression pRT-1 permettant l'expression inducible de LMP-1/B95.8 d'une part et de RelB d'autre part. L'induction des protéines a été testée par immunodétection (Fig. 10A).

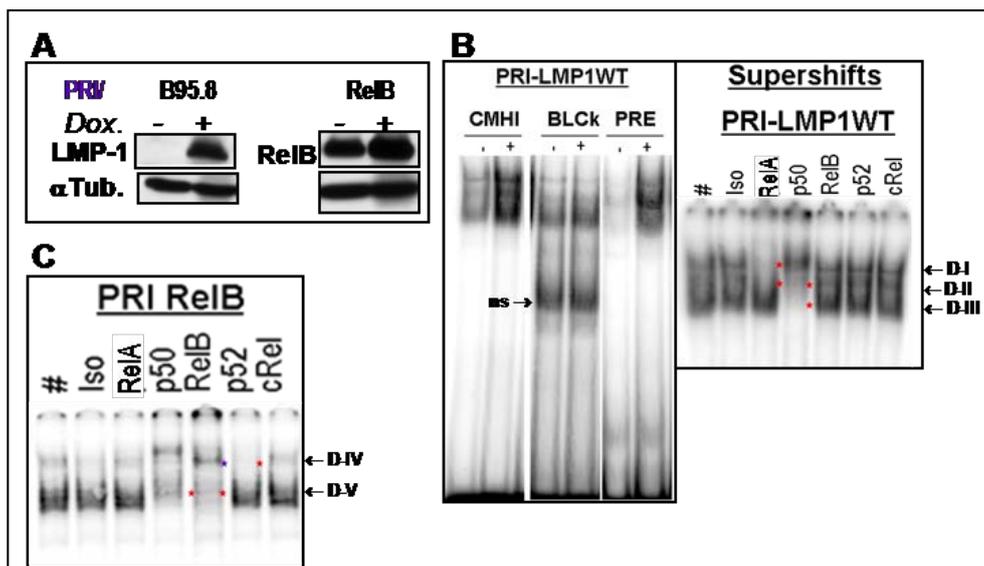


Fig. 10 : Activité NF- κ B dans les PRI transfectées stablement par pRT-1-LMP-1 et RelB

A, Immunodétection des protéines surexprimées LMP-1 et RelB dans les extraits totaux des cellules PRI transfectées avant (- Dox) et après (+ Dox) induction à la doxycycline. **B**, Retard sur gel sur les extraits nucléaires des PRI-LMP-1 non induites (-) et induites à la doxycycline (+) avec les sondes CMH-I, BLC κ B et PRE, et « supershifts » à l'aide des anticorps spécifiques des sous-unités NF- κ B sur les extraits nucléaires des PRI-LMP-1 + Dox.. D-I à D-V, bandes spécifiques et ns, bande non spécifique. **C**, « supershifts » sur les extraits nucléaires des PRI-RelB + Dox # : sans anticorps, Iso : anticorps irrelevant, * : bande « supershiftée » ou réduite, * : bande probablement réduite.

La protéine LMP-1 est très largement surexprimée dans la LCL PRI par rapport aux cellules non induites. La sous-unité RelB est environ deux fois plus exprimée dans les cellules induites à la doxycycline. Les extraits protéiques nucléaires des PRI-LMP-1/B95.8 ont été testés par retard sur gel à l'aide des trois sondes spécifiques à NF- κ B, pour tenter de mettre en évidence des complexes contenant la sous-unité RelB (Fig. 10B). L'intensité de liaison à l'ADN augmente lorsque les cellules sur-expriment la protéine LMP-1. Les trois sondes permettent d'obtenir le même nombre de bandes spécifiques retardées. Les résultats obtenus avec la sonde PRE sont les plus résolutifs. Le profil de retard des bandes obtenu est le même que dans les cellules PRI non transfectées, c'est-à-dire, uniquement des complexes contenant les sous-unités RelA et p50. La simple surexpression de LMP-1 dans la lignée PRI n'induirait donc pas la formation de complexes de la voie alternative. Les cellules PRI transfectées par pRT-1-RelB ont montré qu'au moins deux bandes sont retardées avec la sonde PRE, appelées D-IV et D-V. D-V est retardée avec les anticorps p50 et RelB et D-IV semble retardée avec les anticorps p52. On suppose également que cette dernière est diminuée avec l'anticorps RelB car la bande est masquée par le « supershift » de la bande D-V. Après surexpression de RelB dans la lignée PRI, on observe donc la formation de complexes contenant p50, RelB et p52.

Discussion / Conclusion

Dans le modèle murin Ba/F3, nous avons montré que la protéine LMP-1 active la voie classique de NF- κ B avec la formation de complexes NF- κ B contenant RelA et p50. Nous avons montré en même temps que RelB est retrouvée dans les noyaux et p52 uniquement dans les cytoplasmes. Cependant, nous n'avons pas retrouvé de complexes contenant RelB par retard sur gel avec la technique décrite dans cette partie.

De la même manière, nous avons montré que dans les cellules B infectées par l'EBV, seuls des complexes de la voie classique sont activés en retard sur gel. Comme dans les cellules Ba/F3, nous retrouvons la sous-unité RelB dans le noyau de ces cellules. De plus, nous trouvons p52 et c-Rel transloquées dans les noyaux. Cependant, nous ne mettons pas en évidence de complexes contenant ces trois sous-unités en retard sur gel.

Les données sur les immunodétections montrent l'expression et la translocation de RelB et de p52 notamment dans les lignées EBV positives, ce qui pose la question du pourquoi de la non fixation et/ou détection de complexes de la voie alternative contenant

RelB et p52 en retard sur gel. L'utilisation de trois sondes avec des sites κ B différents (CMH-I, PRE et BLC- κ B), supposés fixer des complexes différents, ne nous a pas permis de révéler des complexes autres que RelA/RelA, RelA/p50 et p50/p50. Cette technique de retard sur gel a permis de mettre en évidence des complexes p50/RelB et probablement p52/RelB lorsque la sous-unité RelB est surexprimée dans la lignée PRI. Ces résultats signifient donc probablement que, dans la situation normale, c'est-à-dire dans les cellules non transfectées, la technique de retard sur gel utilisée dans les conditions sus-décrites, ne nous permet pas de détecter la présence des protéines RelB, p52 et c-Rel.

A la vue de ces résultats, nous avons donc entrepris de définir des nouvelles conditions de retard sur gel en termes de quantité de protéines nucléaires (5 μ g au lieu de 30 μ g), de tampon de réaction de liaison (poly(dI:dC) au lieu du ssDNA) et de pourcentage en acrylamide dans le gel de migration (4 % au lieu de 6 %) (*cf.* Discussion). Nous avons également pris le parti de ne plus travailler que sur les LCL et particulièrement sur la lignée EREB2-5 EBV modulable.

Publication n°2

Publication n°2 : Différence de fonction des complexes NF- κ B contenant RelB et RelA dans les lymphocytes B transformés par le virus d'Epstein-Barr et dans les lymphocytes B activées des lymphomes B diffus à grandes cellules.

Introduction

Ce papier fait la synthèse des résultats obtenus dans la partie précédente et présente les résultats fonctionnels ainsi que l'analyse de tumeurs.

Comme dit précédemment, peu de données sont disponibles concernant la composition des dimères NF- κ B ainsi que leurs fonctions dans la transformation des lymphocytes B. Nous nous sommes proposés de déterminer les complexes induits par la protéine LMP-1. Nous avons dans un premier temps utilisé des lignées LCL comme modèles de cellules B transformées. L'analyse des complexes a été étendue à l'étude de biopsies de cas de lymphomes B diffus à grandes cellules de type ABC (« Activated B-Cell like »). Nous avons également menées des études fonctionnelles à l'aide de la lignée EREB2-5 transfectée par les sous-unités RelA (RelA), RelB, p100 et I κ B α _{S32,36A} dans le but de déterminer leur effet sur la survie et la prolifération des cellules. L'induction à la doxycycline des EREB2-5 transfectées utilisées pour la publication est présentée dans la Fig.11.

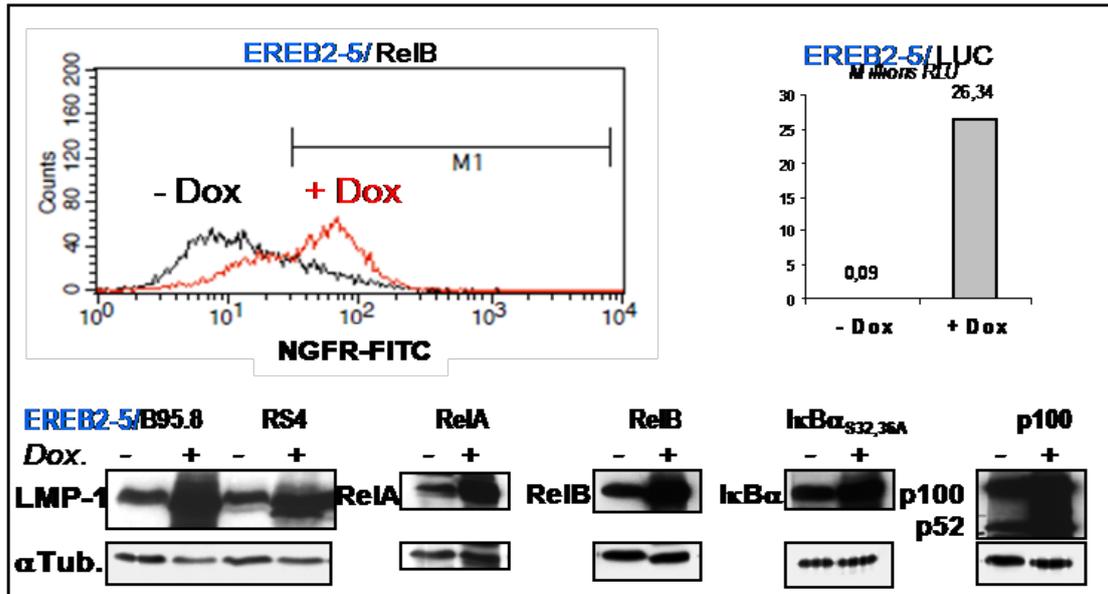


Fig. 11 : Inductibilité des cellules transfectées EREB2-5 : exemple d'une série de transfections

Le pourcentage d'inductibilité d'une série de transfections est évalué par marquage NGFR-FITC, par immunodétection et par mesure de la luminescence (ERE2-5-LUC) avant (- Dox) et après (+ Dox) induction à la doxycycline (en condition + estradiol).

Nous montrons que la protéine LMP-1 active la voie classique de signalisation de NF- κ B avec l'induction de complexes contenant les sous-unités c-Rel et RelA. L'expression de la sous-unité RelA dans la lignée EREB2-5 induit une augmentation de la prolifération des cellules associée à leur survie. Enfin, les expériences de retard sur gel réalisées sur les extraits nucléaires de biopsie de cas de lymphomes B diffus à grandes cellules de type ABC ont montré que la sous-unité RelA est retrouvée dans 100 % des tumeurs, et la sous-unité RelB seulement dans 22 % des cas.

Differential Weight and Function of RelA and RelB NF- κ B complexes in both EBV-Transformed B-cells and Activated B-cell-like Diffuse Large B-Cell Lymphomas

A Chanut, S Durand-Panteix, N Weinbreck, I Youlyouz-Marfak, D Bordessoule, J Feuillard*, and N Faumont*

*JF and NF are co-senior authors

Soumis à Oncogene

Commentaires

Avec les nouvelles conditions de retards sur gel, les complexes p52/RelB et p50/RelB sont clairement détectés lorsqu'ils existent.

Les résultats obtenus lors de ce travail démontrent le rôle de la voie d'activation classique de NF- κ B induite par la protéine LMP-1 dans la prolifération et la survie des lymphocytes B. De plus, la technique de retard sur gel réalisée sur les extraits nucléaires des tumeurs congelées a permis de montrer pour la première fois que la voie classique d'activation de NF- κ B est prédominante par rapport à la voie alternative dans les lymphomes B diffus à grandes cellules de type ABC, suggérant son rôle majeur dans l'oncogenèse associée ou non à l'EBV.

DISCUSSION

CONCLUSION

V. DISCUSSION

Les différentes données obtenues lors de ma thèse ont permis de fournir des éléments de réponse sur l'oncogénicité de la protéine LMP-1 dans le contexte du lymphocyte B, réservoir naturel du virus d'Epstein-Barr, et sur les rôles des voies d'activation NF- κ B dans la transformation lymphocytaire. Cette discussion tente de replacer nos résultats par rapport à la littérature sur la protéine LMP-1, l'activation de NF- κ B dans les lymphomes et myélomes et les complexes NF- κ B. Les difficultés liées à la technique de retard sur gel seront également évoqués au début de cette partie. Enfin, quelques perspectives à ce travail seront abordées à la fin de cette discussion.

A. Les retards sur gel : principe et problèmes

Durant mes travaux de thèse, nous avons été confrontés à des problèmes de sensibilité et de reproductibilité des résultats avec la technique du retard sur gel. Depuis son établissement en 1981, cette technique est classiquement utilisée pour mettre en évidence la liaison à l'ADN des facteurs de transcription tels que NF- κ B, STAT ou p53. Toutes les techniques d'extraction des protéines nucléaires ont pour principe une lyse hypotonique des cellules et une lyse hypertonique des noyaux (Dignam et al. 1983). Cependant, il existe de nombreuses variantes techniques pouvant modifier la nature des résultats. Ces aspects techniques sont d'ailleurs en partie évoqués dans un article tout juste publié et dédié à ce sujet (Holden and Tacon 2010).

Préparation des extraits protéiques nucléaires : nous avons été initialement confrontés à la contamination importante de la fraction nucléaire par la fraction cytosolique, mise en évidence par l'immunodétection de l' α Tubuline. La vérification par coloration au bleu trypan montrait que les cellules n'étaient pas suffisamment lysées lors de la première étape de lyse hypotonique. Nous avons constaté de façon empirique que l'incubation des culots cellulaires à - 80°C au moins deux heures avant de réaliser la lyse hypotonique, permet de diminuer très fortement le degré de contamination des noyaux par les cytosols. Cette étape de congélation permet sans doute de fragiliser les membranes cellulaires favorisant la première étape de fractionnement. Enfin, nous avons amélioré la pureté des noyaux en lavant ces derniers avec

un tampon isotonique dans le but de conserver leur intégrité et d'éliminer toute trace de cytosol avant leur lyse.

Choix des sites de fixation : dans un premier temps, nous avons réalisé les retards sur gel avec une sonde contenant un site de fixation κ B 5'-AATGGGGATTCCCAGCT-3' retrouvé au niveau du promoteur du gène codant le CMH-I (Israel et al. 1989). Ne mettant en évidence que des complexes de la voie classique d'activation de NF- κ B, nous avons également utilisé deux autres sondes connues pour fixer les complexes de la voie alternative, les sites κ B PRE du VIH 5'-ACAAGGGACTTCCGCTGGGGACTTCCAGG-3' (Feuillard et al. 1991) et BLC- κ B de la chémokine BLC 5'-ATTTTGGGAGATTGAAAAC-3' (Bonizzi et al. 2004). Les complexes mis en évidence ont été les mêmes quelle que soit la sonde utilisée, avec seulement des variations au niveau de la définition et de la qualité du résultat obtenu. Ainsi, pour les retards sur gel réalisés sur le modèle murin Ba/F3 nous avons retenu la sonde CMH-I et pour les retards sur gel avec les LCL et BL, nous avons retenu la sonde PRE.

La réaction de « binding » : les retards sur gel présentés dans la deuxième partie des résultats ont été réalisés avec 30 μ g d'extraits nucléaires, le tampon de réaction Hepes 0,1 M pH7.9, KCl 0,1 M, 20 % glycérol et 0,7 μ g/ μ l ssDNA (ADN de sperme de saumon) et 2 μ g d'anticorps pour les « supershifts ». Dans ces conditions, nous n'avons pas mis en évidence de complexes contenant c-Rel, et les sous-unités RelB et p52 sont difficilement détectables. Pour mettre en évidence des complexes contenant RelB, les retards sur gel présentés dans la publication n°2 ont été réalisés avec 5 μ g de protéines nucléaires, le nouveau tampon de « binding » 50 mM Tris pH7.5, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM dTT, 1 μ g **poly(dI:dC)** (Vogel et al. 2007) et 3 μ g d'anticorps. Ainsi, grâce à ces nouvelles conditions de « binding » en présence du compétiteur poly(dI:dC), nous avons obtenu une meilleure définition de gel avec moins de protéines nucléaires.

La migration : le pourcentage du gel natif de polyacrylamide dépend de la taille de la sonde ainsi que de la taille et de la charge des protéines se liant à la sonde. Les premières migrations ont été effectuées dans un gel de polyacrylamide 6 %. Les résultats présentés dans la publication n°2 ont été réalisés avec un gel de polyacrylamide 4 % permettant de mieux séparer les bandes retardées par les différents complexes.

Nous n'avons pas vraiment fait l'étude technique comparant les différents protocoles de retard sur gel, mais nous avons plutôt procédé par ajustements progressifs. C'est

uniquement dans les conditions de retard sur gel exposées dans la publication n°2 que nous mettons en évidence les complexes c-Rel/p50 et RelB/p50, dans les cellules B immortalisées par l'EBV. Cependant, hormis pour les cellules transfectées par RelB, nous n'avons pas retrouvé les complexes RelB/p52, classiquement rapportés comme étant ceux de la voie alternative. Néanmoins, ces nouvelles conditions de retard sur gel ainsi définies permettent d'obtenir des résultats de meilleure qualité, beaucoup plus reproductibles et plus fiables, cela avec beaucoup moins de protéines.

La différence principale entre les « anciennes » et les « nouvelles » conditions de retards sur gel est sans doute la nature et la concentration du compétiteur dans le tampon de « binding ». Il est vraisemblable que le ssDNA « accroche » les complexes NF- κ B, probablement du fait de l'existence de « pseudo sites » NF- κ B dans le génome du saumon. Tel n'est pas le cas pour le poly(dI:dC), compétiteur chimique composé de deux macromolécules, le poly-deoxyinosinic et le poly-deoxycytidylic, lesquelles s'hybrident et miment la structure double brin de l'ADN. Au total, il semble que le poly(dI:dC), compétiteur utilisé dès le début des retards sur gel pour l'analyse des complexes NF- κ B, permette de révéler avec beaucoup plus de sensibilité des activités de liaison des protéines nucléaires aux sites κ B.

B. Polymorphisme de LMP-1 et conservation de l'activité NF- κ B

Dans notre étude, nous avons utilisé le modèle lymphocytaire Ba/F3. Les Ba/F3 sont des lymphocytes proB murins dont la prolifération dépend directement de l'IL-3. Ainsi, l'effet oncogénique de la protéine d'intérêt peut être observé en absence d'IL-3 dans le milieu de culture. Ce modèle a déjà été utilisé pour mettre en évidence le pouvoir transformant d'une protéine oncogénique comme BCR-Abl (Daley and Baltimore 1988). Comme tout modèle cellulaire, le modèle Ba/F3 a ses limites. En effet, il s'agit d'un modèle murin qui n'est pas cible de l'EBV, virus strictement humain. De plus, les Ba/F3 sont des lymphocytes proB qui ne sont pas les cibles de l'infection par l'EBV *in vivo*. Ce modèle est donc assez éloigné de la physiologie de l'EBV. Néanmoins, du fait de sa facilité d'emploi, de sa bonne transfectabilité et de sa bonne clonabilité, nous avons utilisé le modèle Ba/F3 pour mettre en évidence les propriétés transformantes de variants naturels de la protéine LMP-1.

Depuis la découverte du premier variant naturel LMP-1, de nombreuses études ont porté sur l'analyse des mutations dans le gène *BNLFI* codant LMP-1. Les mutations sont plus fréquemment retrouvées au niveau de l'exon 3 du gène codant le domaine carboxy-terminal de LMP-1 et peuvent être de différentes natures : mutations ponctuelles, variation du nombre de répétitions et délétions. La délétion de 30 pb (del30) dans le domaine CTAR2 (aa 346 à 355) est une des mutations récurrentes souvent étudiées. Les travaux publiés suggèrent que les variations génétiques présentes sur le gène *BNLFI* confèrent une augmentation du pouvoir oncogénique à la protéine LMP-1 (Guiretti et al. 2007, Knecht et al. 1993, Larcher et al. 2003, Li et al. 1996). Les données de la littérature montrent que les variants naturels ont conservé leur potentiel d'activation de NF- κ B malgré la présence de mutations (Blake et al. 2001, Mainou and Raab-Traub 2006, Rothenberger et al. 1997). L'activation de NF- κ B serait donc une caractéristique importante de la fonction de LMP-1 et les acides aminés cruciaux pour cette fonction restent conservés au cours de l'évolution. Cependant, ces travaux ont été réalisés à partir de variants LMP-1 issus de cas de carcinomes du rhinopharynx. Qu'en est-il pour les variants LMP-1 issus des lymphocytes B normaux et des lymphocytes B tumoraux comme les cellules de Reed-Sternberg (RS) dans le lymphome de Hodgkin ? C'est à cette question que nous avons voulu répondre dans la publication n°1. Dans cette publication, pour la première fois, des variants naturels LMP-1 issus de cas de lymphomes de Hodgkin, provenant du compartiment tumoral vs la contrepartie non tumorale, ont été analysés dans le but d'établir un lien entre leur origine et leurs propriétés oncogéniques. Les variants LMP-1 provenant des cellules RS sont plus mutés que les variants issus de lymphocytes B normaux de sujets atteints d'affections non tumorales, et certaines des mutations retrouvées avaient déjà été observées dans la littérature. De plus, les variants LMP-1 isolés des cellules RS sont phylogénétiquement reliés aux variants isolés des B normaux de l'hôte (Faumont et al. 2004). Nous avons démontré que les variants LMP-1 provenant des cellules RS présentent un pouvoir oncogénique dans la lignée Ba/F3. En effet, 100 % des variants RS contre 30 % des variants NT et RN sont oncogéniques : prolifération en l'absence d'IL-3 et formation de colonies en agar mou. Nous n'avons pas mis en évidence d'anomalies génétiques récurrentes associées à l'oncogénicité, peut-être parce que notre série de variants est trop petite (12 variants testés). Cependant, nous avons montré que, quelle que soit leur origine cellulaire, leur polymorphisme et leur pouvoir transformant, les variants LMP-1 activent tous spécifiquement le facteur de transcription NF- κ B et protègent les cellules de l'apoptose (Faumont et al. 2009a). Nos résultats associés à ceux de la littérature, sont donc en faveur du rôle clé attribué

au facteur NF- κ B dans la protection contre l'apoptose induite par la protéine LMP-1. Toutefois, d'après nos résultats, l'activation de NF- κ B n'explique pas à elle seule le pouvoir oncogénique de LMP-1. En effet, les variants des cellules tumorales RS2, RS3 et RS5, issus des cellules RS, ainsi que le variant RN4, issu d'un ganglion normal, présentent un pouvoir oncogénique supérieur à la référence B95.8. Pourtant, ces variants activent le facteur de transcription NF- κ B autant que B95.8. A l'inverse, nous observons des variants LMP-1 non transformants et sont pourtant des forts activateurs de NF- κ B (NT1, NT4, RN1 et RN2). Il est donc envisageable que d'autres voies de signalisation viennent s'associer à la voie de signalisation NF- κ B.

C. La nature des complexes NF- κ B

La protéine LMP-1 est suffisante à elle-seule pour induire la lymphomagenèse dans les cellules B de souris transgéniques exprimant LMP-1 (Kulwichit et al. 1998, Thornburg et al. 2006). Cependant, aucune donnée publiée ne permet de savoir si l'une ou l'autre des voies d'activation de NF- κ B est essentielle au développement de lymphomes associés à l'EBV.

L'étude des complexes NF- κ B a été initiée sur les clones Ba/F3-LMP-1 sur lesquels toutes les analyses fonctionnelles de la publication n°1 avaient été menées. Globalement, les résultats obtenus ont montré que tous les variants LMP-1, quelle que soit leur origine cellulaire, induisent des complexes de la voie classique contenant les sous-unités RelA et p50. Cependant, nous avons montré que la sous-unité c-Rel n'est pas exprimée dans ce modèle cellulaire contrairement aux cellules B EBV+. Ces résultats montrant les limites du modèle Ba/F3 nous ont donc amenés à « abandonner » les clones Ba/F3-LMP-1 au profit du modèle LCL et BL, et en particulier le modèle EBV inductible EREB2-5 dans lequel ont été transfectés les variants RS4 et NT4.

Dans la publication n°2, nous montrons que la protéine LMP-1 induit la formation et la fixation de complexes contenant la sous-unité NF- κ B RelA dans la lignée EREB2-5. Dans le même modèle, les analyses fonctionnelles ont montré que la sur-expression de RelA augmente la prolifération des cellules et les protège de l'apoptose, alors que la sur-expression de RelB n'a pas d'effet sur la prolifération des cellules mais les protège de l'apoptose.

Les données de la littérature ont permis de mettre en évidence certains gènes cibles des dimères NF- κ B permettant d'expliquer les rôles respectifs de RelA et RelB dans les mécanismes cellulaires fondamentaux tels que la prolifération et l'apoptose. Une étude

récente sur le transcriptome des cellules MEF stimulées par le TNF- β (ou lymphotoxin- β), inducteur de NF- κ B, a montré que la majorité des gènes répondant à la stimulation sont co-régulés par RelA et RelB montrant les interactions entre les deux voies (Lovas et al. 2008). Plus précisément, les complexes contenant RelA peuvent participer à l'établissement de la tumorigénèse grâce à l'induction de l'expression de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-xl et Bcl-2 (Catz and Johnson 2001, Sethi et al. 2008a, Starlets et al. 2006). Tanja Grimm *et al.* ont montré que la protéine LMP-1, par l'intermédiaire des complexes RelA/p50, inhibe l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax (Bcl2-associated protein X) (Grimm et al. 2005). De plus, RelA a la capacité d'induire la prolifération en augmentant notamment l'expression des protéines c-Myc et cycline D1 (Barre and Perkins 2007, Toualbi-Abed et al. 2008). RelA participerait également à l'établissement d'un environnement inflammatoire par l'intermédiaire de différentes cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 α/β , l'IL-6 et l'IL-8 (Kunsch et al. 1994, Wang et al. 2007a). Par comparaison à la sous-unité RelA, moins de gènes sont répertoriés comme étant les cibles directes des complexes NF- κ B contenant RelB. Nora D. Mineva *et al.* ont montré que la surexpression de la protéine RelB dans la lignée lymphomateuse WEHI 231 protège les cellules de l'apoptose induite par une stimulation IgM. Ils ont montré que l'augmentation de RelB induit l'augmentation de l'expression des protéines antiapoptotiques MnSOD (Manganese Superoxide Dismutase) et survivine mais pas les protéines Bcl-2, Bcl-xl et Bax (Mineva et al. 2007). Globalement, les résultats publiés attribuent donc un rôle anti-apoptotique aux protéines RelB et RelA et également prolifératif à la sous-unité RelA.

Les résultats obtenus dans la publication n°2 sont donc concordants avec les données publiées sur les fonctions des deux sous-unités NF- κ B, RelB et RelA et précisent le rôle des différentes voies. Nous montrons que l'effet de LMP-1 est en rapport avec l'induction de la voie classique. De plus, nos résultats démontrent que l'induction de la voie alternative est dépendante de la voie classique, notamment avec l'induction de l'expression de RelB par la voie classique. D'autre part, l'induction de la voie alternative dans les cellules B EBV+ est certainement en rapport avec la présence d'un cofacteur (autre protéine ou effet autocrine ?).

L'analyse des résultats obtenus dans un contexte de surexpression de la protéine RelB a montré une certaine dynamique des complexes. En effet, la surexpression de RelB dans les lignées PRI et EREB2-5 induit plutôt la formation de dimères RelB/p50 au dépend des dimères RelA/p50, et à moindre niveau la formation de dimères RelB/p52. Ainsi, dans la cellule, les sous-unités RelB et RelA sont en compétition pour la sous-unité p50 et les

complexes RelB/p52 ne se formeraient que lorsque la sous-unité p50 aurait été titrée par la sous-unité RelB elle-même. De plus, dans les lymphocytes B infectés par l'EBV en latence III, dans lesquels NIK est constitutivement activée, contrairement à ce qu'on aurait pu imaginer, la surexpression du pro facteur p100 n'induit pas l'activation de la voie alternative, c'est-à-dire la fixation des complexes RelB/p50 ou RelB/p52 au niveau du site κ B, cela malgré l'augmentation du clivage de p100. Ceci est en accord avec un rôle prédominant de p100 dans l'inhibition de la translocation des complexes contenant RelB.

D. NF- κ B dans les lymphomes et myélomes

L'activation aberrante de l'une ou l'autre des deux voies d'activation de NF- κ B conduit à la dérégulation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans les processus déjà cités comme la prolifération et la survie des cellules. Il n'est donc pas surprenant de voir le facteur de transcription NF- κ B impliqué dans de nombreuses hémopathies malignes. Dans ces pathologies, l'activation constitutive de NF- κ B peut être induite par différents stimuli exogènes (LMP-1 de l'EBV, TAX de HTLV ou vFLIP de HHV-8) ou propres à la cellule (CD40, CD30, RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor κ B)), ou elle peut être la conséquence de diverses mutations activatrices ou invalidantes (Fig. 12).

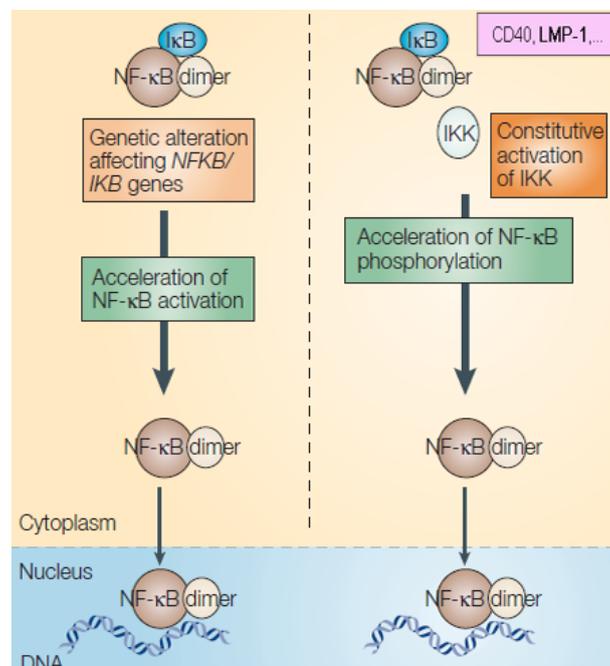


Fig. 12 : L'activation constitutive de NF- κ B dans la cellule cancéreuse

D'après (Nakanishi and Toi 2005).

Dans le lymphome de Hodgkin (LH), les cellules RS présentent une activité constitutive du facteur de transcription NF- κ B qui est probablement un des principaux éléments dans l'apparition de ce lymphome. Les cellules tumorales contiennent principalement des complexes de la voie classique d'activation de NF- κ B contenant les sous-unités RelA et c-Rel ainsi que le complexe p50/p50 associé au co-activateur BCL3 (Bargou et al. 1997, Mathas et al. 2005). L'activation constitutive de NF- κ B semble être principalement régulée par le TNF- α , le CD30, le CD40, la protéine virale LMP-1 et par une dérégulation de l'inhibiteur I κ B α (Cabannes et al. 1999, Horie et al. 2002, Kuppers et al. 2005), pour revues, (Khan 2006, Kuppers 2009a, Kuppers 2009b).

Les lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL) sont les lymphomes les plus communs parmi tous les lymphomes non-hodgkiniens (LNH). Deux groupes majeurs ont été définis grâce aux profils d'expression des gènes : les lymphomes de type ABC (Activated B Cell like) et de type GCB (Germinal Center B cell like). Les ABC-DLBCL présentent une activation constitutive de NF- κ B avec la présence des complexes nucléaires RelA/p50 et p50/c-Rel (Davis et al. 2001). Les altérations des gènes codants les sous-unités p100 et c-Rel sont principalement retrouvées dans les cas de GCB-DLBCL (Pour revue, (Courtois and Gilmore 2006, Houldsworth et al. 2004)). L'inhibition de l'activité NF- κ B induit la mort des cellules par apoptose dans les lignées de type ABC mais pas dans les lignées de type GCB (Davis et al. 2001, Lam et al. 2005). Dans le cas des ABC-DLBCL, l'activation du complexe IKK par les protéines du complexe CBM (CARMA1-BCL10-MALT1) participe à l'activation constitutive de NF- κ B (Ngo et al. 2006). D'autres facteurs peuvent être à l'origine de l'activation constitutive de NF- κ B, comme des mutations au niveau de gènes régulateurs de NF- κ B (A20, TRAF2, TRAF5, TAK1...*etc.*) (Compagno et al. 2009, Honma et al. 2009, Novak et al. 2009) et/ou du BCR (mutations de CD79b) (Davis et al. 2010).

Des études récentes ont montré que dans environ 20 % des cas de myélomes multiples (MM), une activation aberrante de NF- κ B est observée due à des altérations génétiques (Annunziata et al. 2007, Keats et al. 2007). Différentes mutations des gènes régulateurs de NF- κ B (TRAF3, TRAF2, NIK...*etc.*) et des récepteurs activateurs de NF- κ B (CD40, BAFF-R...*etc.*) sont à l'origine de cette dérégulation. Des travaux publiés récemment à partir de lignées cellulaires issues de MM, représentatives des différentes mutations, ont montré l'implication des deux voies d'activation de NF- κ B dans le développement des myélomes (Demchenko et al. 2010).

L'étude de la nature des complexes NF- κ B activés constitutivement dans les ABC-DLBCL a fait l'objet d'une seule publication sur seulement trois cas de lymphomes (Davis et al. 2001). Nous montrons à nouveau que la voie classique d'activation de NF- κ B est prédominante dans les ABC-DLBCL, avec la présence de complexes contenant la sous-unité RelA suggérant le rôle prépondérant de cette voie par rapport à la voie alternative dans l'apparition de ces lymphomes. Il n'est cependant pas exclu que la voie alternative permette la lymphomagenèse. En effet, le groupe d'Ursula Zimmer-Strobl a démontré que l'activation constitutive de CD40 dans les souris transgéniques pour un gène codant une protéine chimérique LMP-1/CD40, constituée du domaine transmembranaire de LMP-1 et de la partie intracellulaire du CD40, induit l'apparition de lymphomes B avec l'induction de la voie alternative d'activation de NF- κ B (Homig-Holzel et al. 2008). Comme nos résultats, les données de ce papier montrent que CD40 est un plus fort inducteur de la voie alternative d'activation de NF- κ B que la protéine LMP-1. Dans ce modèle murin, la protéine de fusion LMP-1/CD40 induit l'activation des complexes de la voie alternative contenant les sous-unités RelB et p52. Toutefois, les résultats de cette publication n'écartent pas le rôle de la voie classique NF- κ B dans l'apparition des tumeurs, car les analyses de l'activation de NF- κ B ont été réalisées sur les cellules avant le développement des lymphomes. De plus, le morphotype de ces tumeurs n'a pas été étudié et il pourrait s'agir d'un type différent des ABC-DLBCL.

E. Et après ?...

Les résultats que nous avons obtenus jusqu'ici nous amènent aujourd'hui à envisager de nouvelles perspectives, certaines d'entre elles s'inscrivent dans un projet de recherche nouvellement développé au laboratoire.

Quels sont les rôles des domaines CTAR1 et CTAR2 dans la prolifération et la survie induites par l'activation NF- κ B observée dans la lignée EREB2-5 ?

D'après la littérature, on fait l'hypothèse que le domaine CTAR1 est à l'origine de 20 % de l'activité NF- κ B avec l'induction de RelB (voie alternative) alors que le domaine CTAR2 conduit à 80 % de l'activité NF- κ B grâce aux complexes contenant RelA (voie classique). Des mutants ponctuels ciblant les domaines CTAR1 et CTAR2 (*tes1- tes2+*, *tes1+ tes2-* et *tes1- tes2-*) de la protéine LMP-1 sont en cours de clonage dans le vecteur inducible p-RT1. Nous disposons également du dominant négatif de la protéine, LMP-1 CT, délétée des

domaines amino-terminal et transmembranaire empêchant ainsi sa localisation à la membrane. L'expression des différentes protéines mutées dans la lignée EREB2-5 nous permettra d'établir la part de chacun des CTAR dans la prolifération et la survie des cellules. Ces expériences nous permettront également de répondre à la problématique suivante : est-il possible que l'on observe l'activation de la voie alternative sans induction de la voie classique d'activation de NF- κ B ?

D'autres acteurs sont-ils impliqués dans l'effet transformant de la protéine LMP-1 ?

Plusieurs éléments de la littérature suggèrent que le facteur de transcription NF- κ B n'est pas suffisant pour induire la transformation. En effet, contrairement à l'activation constitutive des protéines oncogéniques comme c-Myc ou l'inactivation d'anti-oncogènes comme p53, l'activation constitutive de NF- κ B, comme dans les souris KO pour l'inhibiteur I κ B α , n'induit pas de tumeur mais provoque rapidement la mort des souris par réaction inflammatoire (Pour revue, (Gerondakis et al. 1999)). De plus, NF- κ B peut induire l'apoptose et inhiber la prolifération dans certaines conditions. L'activation de NF- κ B dans les lignées de lymphome de Burkitt EBV positives induit l'apoptose des cellules dont la prolifération est sous le contrôle de l'oncogène c-Myc (Klapproth et al. 2009). Au laboratoire, nous avons montré que la protéine LMP-1 induit la sur-expression de la protéine apoptotique CD95 *via* la sur-activation de NF- κ B (Le Clorennec et al. 2008). Comme nous l'avons indiqué précédemment, notre étude des variants naturels de LMP-1 a montré que NF- κ B ne suffit pas à expliquer l'oncogénicité de LMP-1. Ces éléments montrent que l'effet transformant de LMP-1 doit être associé à d'autres voies de signalisation ou d'autres facteurs, NF- κ B étant sans doute nécessaire mais pas suffisant. Grâce aux domaines CTAR1 et CTAR2, LMP-1 induit des voies de signalisation différentes. Il serait donc intéressant de tester dans nos modèles lymphocytaires, la synergie des autres voies de signalisation induites (MAP kinases, JAK/STAT, PI3K) avec NF- κ B. Par exemple, l'activation constitutive de certaines protéines STAT a été montrée dans le carcinome du rhinopharynx (STAT1, 3 et 5), dans les ABC-DLBCL (STAT3) et dans le lymphome de Hodgkin (STAT3) (Chen et al. 2001). La transformation des fibroblastes Rat-1 par la protéine LMP-1 est dépendante de la voie PI3K/AKT, ceci constituant un autre exemple de l'implication d'autres voies de signalisation dans les mécanismes de transformation (Mainou et al. 2005). Nous avons regardé la phosphorylation des protéines participantes à différentes voies de signalisation (AKT, JNK, p38) sur les clones Ba/F3-LMP-1. Ces résultats très préliminaires n'ont pas permis de mettre en évidence de différence entre les variants naturels de LMP-1.

Il serait également intéressant de déterminer le rôle d'autres oncogènes comme c-Myc dans la transformation lymphocytaire induite par LMP-1 dans nos différents modèles cellulaires, puisque au laboratoire, nous avons montré que les protéines c-Myc et NF- κ B sont les deux principaux facteurs transcriptionnels dans les cellules B EBV+ en latence III (Faumont et al. 2009b).

Quels sont les effets *in vivo* des variants naturels de LMP-1 responsables d'une forte activité transcriptionnelle de NF- κ B ?

Dans le but de mimer *in vivo* l'activation constitutive de NF- κ B, LMP-1 B95.8 et les variants forts activateurs de NF- κ B RS4 et RS1 vont être clonés pour l'établissement de souris transgéniques. Les souris transgéniques LMP-1 B95.8 développent des lymphomes en moyenne après 12 mois (Kulwichit et al. 1998). Ainsi, nous verrons si le développement des tumeurs est accéléré lorsque les variants forts activateurs de NF- κ B sont exprimés dans les lymphocytes B des souris transgéniques par rapport aux souris LMP-1 B95.8. De plus, ces expériences font l'objet d'un projet tout juste initié au laboratoire qui vise à montrer la coopération entre l'activité NF- κ B et l'oncogène c-Myc dans la transformation lymphocytaire B. Les souris transgéniques LMP-1 forts activateurs de NF- κ B seront croisées avec des souris transgéniques exprimant l'oncogène c-Myc. Les lignées de souris transgéniques qui seront obtenues permettront l'établissement de modèles murins mimant le sous-type ABC des lymphomes B diffus à grandes cellules.

VI. CONCLUSION

L'ensemble des travaux réalisés durant la première partie de ma thèse a montré que tous les variants naturels de LMP-1 isolés des cellules tumorales RS de lymphomes de Hodgkin sont oncogéniques. De plus, tous les variants LMP-1, quelle que soit leur origine cellulaire (tumorale / non tumorale) et leur pouvoir oncogénique, activent le facteur de transcription NF- κ B et protègent les cellules de l'apoptose. Le potentiel d'activation de NF- κ B et la protection contre l'apoptose sont donc des propriétés fonctionnelles requises. Nous avons montré que l'activation de NF- κ B n'explique pas à elle seule le pouvoir transformant des variants LMP-1, apparaissant donc nécessaire mais pas suffisante pour induire la transformation lymphocytaire B.

Durant la deuxième partie de ma thèse, nous avons montré, grâce à la technique de retard sur gel, que dans les cellules B infectées par l'EBV, seuls des complexes de la voie classique sont activés avec la liaison à l'ADN des complexes contenant les sous-unités c-Rel, p50 et RelA. De plus, les analyses fonctionnelles des sous-unités RelA et RelB ont permis de montrer que la sous-unité RelA induit à la fois une augmentation de la prolifération des cellules et leur survie, contrairement à la sous-unité RelB qui protège seulement les cellules de l'apoptose. Enfin, les expériences de retard sur gel réalisées à partir des extraits nucléaires de biopsies congelées de plusieurs cas de ABC-DLBCL, ont montré que la sous-unité RelA est retrouvée dans 100 % des tumeurs, et la sous-unité RelB est retrouvée dans seulement 22 % des cas et toujours associée à RelA. Nous avons ainsi montré que la voie classique d'activation de NF- κ B est prépondérante dans la lymphomagenèse B associée à l'EBV et dans les tumeurs de type ABC.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adams, A., and T. Lindahl. 1975. Epstein-Barr virus genomes with properties of circular DNA molecules in carrier cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72: 1477-81.
- Adldinger, H. K., H. Delius, U. K. Freese, J. Clarke, and G. W. Bornkamm. 1985. A putative transforming gene of Jijoye virus differs from that of Epstein-Barr virus prototypes. *Virology* 141: 221-34.
- Adriaenssens, E., A. Mougel, G. Goormachtigh, E. Loing, V. Fafeur, C. Auriault, and J. Coll. 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: 2681-93.
- Ambinder, R. F., M. A. Mullen, Y. N. Chang, G. S. Hayward, and S. D. Hayward. 1991. Functional domains of Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1. *J Virol* 65: 1466-78.
- Anagnostopoulos, I., M. Hummel, C. Kreschel, and H. Stein. 1995. Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood* 85: 744-50.
- Annunziata, C. M., R. E. Davis, Y. Demchenko, W. Bellamy, A. Gabrea, F. Zhan, G. Lenz, I. Hanamura, G. Wright, W. Xiao, S. Dave, E. M. Hurt, B. Tan, H. Zhao, O. Stephens, M. Santra, D. R. Williams, L. Dang, B. Barlogie, J. D. Shaughnessy, Jr., W. M. Kuehl, and L. M. Staudt. 2007. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* 12: 115-30.
- Ardila-Osorio, H., B. Clause, Z. Mishal, J. Wiels, T. Tursz, and P. Busson. 1999. Evidence of LMP1-TRAF3 interactions in glycosphingolipid-rich complexes of lymphoblastoid and nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Cancer* 81: 645-9.
- Atkinson, P. G., H. J. Coope, M. Rowe, and S. C. Ley. 2003. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus stimulates processing of NF-kappa B2 p100 to p52. *J Biol Chem* 278: 51134-42.
- Aviel, S., G. Winberg, M. Massucci, and A. Ciechanover. 2000. Degradation of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) by the ubiquitin-proteasome pathway. Targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *J Biol Chem* 275: 23491-9.
- Babcock, G. J., D. Hochberg, and A. D. Thorley-Lawson. 2000. The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity* 13: 497-506.
- Baer, R., A. T. Bankier, M. D. Biggin, P. L. Deininger, P. J. Farrell, T. J. Gibson, G. Hatfull, G. S. Hudson, S. C. Satchwell, C. Seguin, and et al. 1984. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 310: 207-11.
- Baichwal, V. R., and B. Sugden. 1988. Transformation of Balb 3T3 cells by the BNLF-1 gene of Epstein-Barr virus. *Oncogene* 2: 461-7.

- Bajaj, B. G., M. Murakami, Q. Cai, S. C. Verma, K. Lan, and E. S. Robertson. 2008. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with and enhances the stability of the c-Myc oncoprotein. *J Virol* 82: 4082-90.
- Bargou, R. C., F. Emmerich, D. Krappmann, K. Bommert, M. Y. Mapara, W. Arnold, H. D. Royer, E. Grinstein, A. Greiner, C. Scheidereit, and B. Dorken. 1997. Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 100: 2961-9.
- Barre, B., and N. D. Perkins. 2007. A cell cycle regulatory network controlling NF-kappaB subunit activity and function. *Embo J* 26: 4841-55.
- Barth, S., T. Pfuhl, A. Mamiani, C. Ehses, K. Roemer, E. Kremmer, C. Jaker, J. Hock, G. Meister, and F. A. Grasser. 2008. Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. *Nucleic Acids Res* 36: 666-75.
- Baud, V., and E. Jacque. 2008. [The alternative NF-kB activation pathway and cancer: friend or foe?]. *Med Sci (Paris)* 24: 1083-8.
- Berberich, I., G. L. Shu, and E. A. Clark. 1994. Cross-linking CD40 on B cells rapidly activates nuclear factor-kappa B. *J Immunol* 153: 4357-66.
- Blake, S. M., A. G. Eliopoulos, C. W. Dawson, and L. S. Young. 2001. The transmembrane domains of the EBV-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) variant CAO regulate enhanced signalling activity. *Virology* 282: 278-87.
- Bodescot, M., O. Brison, and M. Perricaudet. 1986. An Epstein-Barr virus transcription unit is at least 84 kilobases long. *Nucleic Acids Res* 14: 2611-20.
- Bonizzi, G., M. Bebien, D. C. Otero, K. E. Johnson-Vroom, Y. Cao, D. Vu, A. G. Jegga, B. J. Aronow, G. Ghosh, R. C. Rickert, and M. Karin. 2004. Activation of IKKalpha target genes depends on recognition of specific kappaB binding sites by RelB:p52 dimers. *Embo J* 23: 4202-10.
- Bornkamm, G. W., C. Berens, C. Kuklik-Roos, J. M. Bechet, G. Laux, J. Bachl, M. Korndoerfer, M. Schlee, M. Holzel, A. Malamoussi, R. D. Chapman, F. Nimmerjahn, J. Mautner, W. Hillen, H. Bujard, and J. Feuillard. 2005. Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res* 33: e137.
- Borza, C. M., A. J. Morgan, S. M. Turk, and L. M. Hutt-Fletcher. 2004. Use of gHgL for attachment of Epstein-Barr virus to epithelial cells compromises infection. *J Virol* 78: 5007-14.
- Bourillot, P. Y., L. Waltzer, A. Sergeant, and E. Manet. 1998. Transcriptional repression by the Epstein-Barr virus EBNA3A protein tethered to DNA does not require RBP-Jkappa. *J Gen Virol* 79 (Pt 2): 363-70.
- Bowman, T., R. Garcia, J. Turkson, and R. Jove. 2000. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19: 2474-88.
- Brennan, P., A. M. Mehl, M. Jones, and M. Rowe. 2002. Phosphatidylinositol 3-kinase is essential for the proliferation of lymphoblastoid cells. *Oncogene* 21: 1263-71.
- Brown, H. J., M. J. Song, H. Deng, T. T. Wu, G. Cheng, and R. Sun. 2003. NF-kappaB inhibits gammaherpesvirus lytic replication. *J Virol* 77: 8532-40.

- Buettner, M., B. Meyer, S. Schreck, and G. Niedobitek. 2007. Expression of RANTES and MCP-1 in epithelial cells is regulated via LMP1 and CD40. *Int J Cancer* 121: 2703-10.
- Burkhardt, A. L., J. B. Bolen, E. Kieff, and R. Longnecker. 1992. An Epstein-Barr virus transformation-associated membrane protein interacts with src family tyrosine kinases. *J Virol* 66: 5161-7.
- Cabannes, E., G. Khan, F. Aillet, R. F. Jarrett, and R. T. Hay. 1999. Mutations in the I κ B α gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for I κ B α . *Oncogene* 18: 3063-70.
- Cahir-McFarland, E. D., D. M. Davidson, S. L. Schauer, J. Duong, and E. Kieff. 2000. NF- κ B inhibition causes spontaneous apoptosis in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6055-60.
- Cahir McFarland, E. D., K. M. Izumi, and G. Mosialos. 1999. Epstein-barr virus transformation: involvement of latent membrane protein 1-mediated activation of NF- κ B. *Oncogene* 18: 6959-64.
- Caldwell, R. G., R. C. Brown, and R. Longnecker. 2000. Epstein-Barr virus LMP2A-induced B-cell survival in two unique classes of EmuLMP2A transgenic mice. *J Virol* 74: 1101-13.
- Caldwell, R. G., J. B. Wilson, S. J. Anderson, and R. Longnecker. 1998. Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* 9: 405-11.
- Canaan, A., I. Haviv, A. E. Urban, V. P. Schulz, S. Hartman, Z. Zhang, D. Palejev, A. B. Deisseroth, J. Lacy, M. Snyder, M. Gerstein, and S. M. Weissman. 2009. EBNA1 regulates cellular gene expression by binding cellular promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 22421-6.
- Catz, S. D., and J. L. Johnson. 2001. Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene* 20: 7342-51.
- Chang, Y., H. H. Lee, S. S. Chang, T. Y. Hsu, P. W. Wang, Y. S. Chang, K. Takada, and C. H. Tsai. 2004. Induction of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 by a lytic transactivator Rta. *J Virol* 78: 13028-36.
- Chen, A., M. Divisconte, X. Jiang, C. Quink, and F. Wang. 2005. Epstein-Barr virus with the latent infection nuclear antigen 3B completely deleted is still competent for B-cell growth transformation in vitro. *J Virol* 79: 4506-9.
- Chen, F. E., and G. Ghosh. 1999. Regulation of DNA binding by Rel/NF- κ B transcription factors: structural views. *Oncogene* 18: 6845-52.
- Chen, H., J. M. Lee, Y. Zong, M. Borowitz, M. H. Ng, R. F. Ambinder, and S. D. Hayward. 2001. Linkage between STAT regulation and Epstein-Barr virus gene expression in tumors. *J Virol* 75: 2929-37.
- Chen, Y. Q., L. L. Sengchanthalangsy, A. Hackett, and G. Ghosh. 2000. NF- κ B p65 (RelA) homodimer uses distinct mechanisms to recognize DNA targets. *Structure* 8: 419-28.
- Chesnokova, L. S., S. L. Nishimura, and L. M. Hutt-Fletcher. 2009. Fusion of epithelial cells by Epstein-Barr virus proteins is triggered by binding of viral glycoproteins gHgL to integrins α 6 β 1 or α 8 β 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 20464-9.

- Chiang, A. K., K. Y. Wong, A. C. Liang, and G. Srivastava. 1999. Comparative analysis of Epstein-Barr virus gene polymorphisms in nasal T/NK-cell lymphomas and normal nasal tissues: implications on virus strain selection in malignancy. *Int J Cancer* 80: 356-64.
- Chilov, D., E. Kukk, S. Taira, M. Jeltsch, J. Kaukonen, A. Palotie, V. Joukov, and K. Alitalo. 1997. Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C. *J Biol Chem* 272: 25176-83.
- Choy, E. Y., K. L. Siu, K. H. Kok, R. W. Lung, C. M. Tsang, K. F. To, D. L. Kwong, S. W. Tsao, and D. Y. Jin. 2008. An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. *J Exp Med* 205: 2551-60.
- Chuang, H. C., J. D. Lay, W. C. Hsieh, H. C. Wang, Y. Chang, S. E. Chuang, and I. J. Su. 2005. Epstein-Barr virus LMP1 inhibits the expression of SAP gene and upregulates Th1 cytokines in the pathogenesis of hemophagocytic syndrome. *Blood* 106: 3090-6.
- Claudio, E., K. Brown, S. Park, H. Wang, and U. Siebenlist. 2002. BAFF-induced NEMO-independent processing of NF-kappa B2 in maturing B cells. *Nat Immunol* 3: 958-65.
- Collart, M. A., P. Baeuerle, and P. Vassalli. 1990. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 10: 1498-506.
- Compagno, M., W. K. Lim, A. Grunn, S. V. Nandula, M. Brahmachary, Q. Shen, F. Bertoni, M. Ponzoni, M. Scandurra, A. Califano, G. Bhagat, A. Chadburn, R. Dalla-Favera, and L. Pasqualucci. 2009. Mutations of multiple genes cause deregulation of NF-kappaB in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 459: 717-21.
- Courtois, G., and T. D. Gilmore. 2006. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene* 25: 6831-43.
- D'Souza, B. N., L. C. Edelstein, P. M. Pegman, S. M. Smith, S. T. Loughran, A. Clarke, A. Mehl, M. Rowe, C. Gelinas, and D. Walls. 2004. Nuclear factor kappa B-dependent activation of the antiapoptotic bfl-1 gene by the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and activated CD40 receptor. *J Virol* 78: 1800-16.
- Daley, G. Q., and D. Baltimore. 1988. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 9312-6.
- Davenport, M. G., and J. S. Pagano. 1999. Expression of EBNA-1 mRNA is regulated by cell cycle during Epstein-Barr virus type I latency. *J Virol* 73: 3154-61.
- Davis, R. E., K. D. Brown, U. Siebenlist, and L. M. Staudt. 2001. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J Exp Med* 194: 1861-74.
- Davis, R. E., V. N. Ngo, G. Lenz, P. Tolar, R. M. Young, P. B. Romesser, H. Kohlhammer, L. Lamy, H. Zhao, Y. Yang, W. Xu, A. L. Shaffer, G. Wright, W. Xiao, J. Powell, J. K. Jiang, C. J. Thomas, A. Rosenwald, G. Ott, H. K. Muller-Hermelink, R. D. Gascoyne, J. M. Connors, N. A. Johnson, L. M. Rimsza, E. Campo, E. S. Jaffe, W. H. Wilson, J. Delabie, E. B. Smeland, R. I. Fisher, R.

- M. Brazier, R. R. Tubbs, J. R. Cook, D. D. Weisenburger, W. C. Chan, S. K. Pierce, and L. M. Staudt. 2010. Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 463: 88-92.
- Dawson, C. W., L. Laverick, M. A. Morris, G. Tramoutanis, and L. S. Young. 2008. Epstein-Barr virus-encoded LMP1 regulates epithelial cell motility and invasion via the ERK-MAPK pathway. *J Virol* 82: 3654-64.
- Dawson, C. W., G. Tramoutanis, A. G. Eliopoulos, and L. S. Young. 2003. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. *J Biol Chem* 278: 3694-704.
- de-The, G., A. Geser, N. E. Day, P. M. Tukei, E. H. Williams, D. P. Beri, P. G. Smith, A. G. Dean, G. W. Bronkamm, P. Feorino, and W. Henle. 1978. Epidemiological evidence for causal relationship between Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma from Ugandan prospective study. *Nature* 274: 756-61.
- Decker, L. L., L. D. Klamann, and D. A. Thorley-Lawson. 1996. Detection of the latent form of Epstein-Barr virus DNA in the peripheral blood of healthy individuals. *J Virol* 70: 3286-9.
- Demchenko, Y. N., O. K. Glebov, A. Zingone, J. J. Keats, P. L. Bergsagel, and W. M. Kuehl. 2010. Classical and/or alternative NF-kappaB pathway activation in multiple myeloma. *Blood* 115: 3541-52.
- Devergne, O., E. Hatzivassiliou, K. M. Izumi, K. M. Kaye, M. F. Kleijnen, E. Kieff, and G. Mosialos. 1996. Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 16: 7098-108.
- Dhillon, A. S., S. Hagan, O. Rath, and W. Kolch. 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26: 3279-90.
- Dignam, J. D., P. L. Martin, B. S. Shastry, and R. G. Roeder. 1983. Eukaryotic gene transcription with purified components. *Methods Enzymol* 101: 582-98.
- Drouin, R., N. Bastien, J. F. Millau, F. Vigneault, and I. Paradis. 2009. In cellulo DNA analysis (LMPCR footprinting). *Methods Mol Biol* 543: 293-336.
- Dupuis, S., C. Dargemont, C. Fieschi, N. Thomassin, S. Rosenzweig, J. Harris, S. M. Holland, R. D. Schreiber, and J. L. Casanova. 2001. Impairment of mycobacterial but not viral immunity by a germline human STAT1 mutation. *Science* 293: 300-3.
- Dykstra, M. L., R. Longnecker, and S. K. Pierce. 2001. Epstein-Barr virus coopts lipid rafts to block the signaling and antigen transport functions of the BCR. *Immunity* 14: 57-67.
- Ecker, D. J., R. Sampath, P. Willett, J. R. Wyatt, V. Samant, C. Massire, T. A. Hall, K. Hari, J. A. McNeil, C. Buchen-Osmond, and B. Budowle. 2005. The Microbial Rosetta Stone Database: a compilation of global and emerging infectious microorganisms and bioterrorist threat agents. *BMC Microbiol* 5: 19.
- Edwards, R. H., A. R. Marquitz, and N. Raab-Traub. 2008. Epstein-Barr virus BART microRNAs are produced from a large intron prior to splicing. *J Virol* 82: 9094-106.
- Edwards, R. H., D. Sitki-Green, D. T. Moore, and N. Raab-Traub. 2004. Potential selection of LMP1 variants in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* 78: 868-81.

- Eliopoulos, A. G., J. H. Caamano, J. Flavell, G. M. Reynolds, P. G. Murray, J. L. Poyet, and L. S. Young. 2003a. Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1 regulates the processing of p100 NF-kappaB2 to p52 via an IKKgamma/NEMO-independent signalling pathway. *Oncogene* 22: 7557-69.
- Eliopoulos, A. G., and A. B. Rickinson. 1998. Epstein-Barr virus: LMP1 masquerades as an active receptor. *Curr Biol* 8: R196-8.
- Eliopoulos, A. G., E. R. Waites, S. M. Blake, C. Davies, P. Murray, and L. S. Young. 2003b. TRAF1 is a critical regulator of JNK signaling by the TRAF-binding domain of the Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1 but not CD40. *J Virol* 77: 1316-28.
- Eliopoulos, A. G., and L. S. Young. 1998. Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *Oncogene* 16: 1731-42.
- . 2001. LMP1 structure and signal transduction. *Semin Cancer Biol* 11: 435-44.
- Epstein, M. A., B. G. Achong, and Y. M. Barr. 1964. Virus Particles In Cultured Lymphoblasts From Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 1: 702-3.
- Erickson, K. D., and J. M. Martin. 1997. Early detection of the lytic LMP-1 protein in EBV-infected B-cells suggests its presence in the virion. *Virology* 234: 1-13.
- . 2000. The late lytic LMP-1 protein of Epstein-Barr virus can negatively regulate LMP-1 signaling. *J Virol* 74: 1057-60.
- Fagard, R., H. Mouas, I. Dusanter-Fourt, C. Devillers, P. Bissieres, A. Martin, G. Lenoir, H. VanTan, J. Feuillard, and M. Raphael. 2002. Resistance to fludarabine-induced apoptosis in Epstein-Barr virus infected B cells. *Oncogene* 21: 4473-80.
- Fahraeus, R., L. Rymo, J. S. Rhim, and G. Klein. 1990. Morphological transformation of human keratinocytes expressing the LMP gene of Epstein-Barr virus. *Nature* 345: 447-9.
- Faumont, N., A. Chanut, A. Benard, N. Cogne, G. Delsol, J. Feuillard, and F. Meggetto. 2009a. Comparative analysis of oncogenic properties and nuclear factor-kappaB activity of latent membrane protein 1 natural variants from Hodgkin's lymphoma's Reed-Sternberg cells and normal B-lymphocytes. *Haematologica* 94: 355-63.
- Faumont, N., S. Durand-Panteix, M. Schlee, S. Gromminger, M. Schuhmacher, M. Holzel, G. Laux, R. Mailhammer, A. Rosenwald, L. M. Staudt, G. W. Bornkamm, and J. Feuillard. 2009b. c-Myc and Rel/NF-kappaB are the two master transcriptional systems activated in the latency III program of Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J Virol* 83: 5014-27.
- Faumont, N., C. Le Clorenec, P. Teira, G. Goormachtigh, J. Coll, Y. Canitrot, C. Cazaux, J. S. Hoffmann, P. Brousset, G. Delsol, J. Feuillard, and F. Meggetto. 2009c. Regulation of DNA polymerase beta by the LMP1 oncoprotein of EBV through the nuclear factor-kappaB pathway. *Cancer Res* 69: 5177-85.
- Faumont, N., P. Tremprat, P. Brousset, G. Delsol, and F. Meggetto. 2004. In Hodgkin's disease Reed-Sternberg cells and normal B-lymphocytes are infected by related Epstein-Barr virus strains. *Virus Res* 101: 163-73.
- Feuillard, J., H. Gouy, G. Bismuth, L. M. Lee, P. Debre, and M. Korner. 1991. NF-kappa B activation by tumor necrosis factor alpha in the Jurkat T cell line is

- independent of protein kinase A, protein kinase C, and Ca(2+)-regulated kinases. *Cytokine* 3: 257-65.
- Feuillard, J., M. Schuhmacher, S. Kohanna, M. Asso-Bonnet, F. Ledeur, R. Joubert-Caron, P. Bissieres, A. Polack, G. W. Bornkamm, and M. Raphael. 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: 2068-75.
- Gerondakis, S., M. Grossmann, Y. Nakamura, T. Pohl, and R. Grumont. 1999. Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knockouts. *Oncogene* 18: 6888-95.
- Ghosh, S., M. J. May, and E. B. Kopp. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16: 225-60.
- Gires, O., F. Kohlhuber, E. Kilger, M. Baumann, A. Kieser, C. Kaiser, R. Zeidler, B. Scheffer, M. Ueffing, and W. Hammerschmidt. 1999. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *Embo J* 18: 3064-73.
- Given, D., and E. Kieff. 1978. DNA of Epstein-Barr virus. IV. Linkage map of restriction enzyme fragments of the B95-8 and W91 strains of Epstein-Barr Virus. *J Virol* 28: 524-42.
- Goldsmith, K., L. Bendell, and L. Frappier. 1993. Identification of EBNA1 amino acid sequences required for the interaction of the functional elements of the Epstein-Barr virus latent origin of DNA replication. *J Virol* 67: 3418-26.
- Goormachtigh, G., T. S. Ouk, A. Mougel, D. Tranchand-Bunel, E. Masy, C. Le Cloennec, J. Feuillard, G. W. Bornkamm, C. Auriault, E. Manet, V. Fafeur, E. Adriaenssens, and J. Coll. 2006. Autoactivation of the Epstein-Barr virus oncogenic protein LMP1 during type II latency through opposite roles of the NF-kappaB and JNK signaling pathways. *J Virol* 80: 7382-93.
- Grimm, T., S. Schneider, E. Naschberger, J. Huber, E. Guenzi, A. Kieser, P. Reitmeir, T. F. Schulz, C. A. Morris, and M. Sturzl. 2005. EBV latent membrane protein-1 protects B cells from apoptosis by inhibition of BAX. *Blood* 105: 3263-9.
- Guiretti, D. M., P. A. Chabay, P. Valva, C. G. Stefanoff, M. H. Barros, E. De Matteo, I. Z. Renault, M. V. Preciado, and R. Hassan. 2007. Structural variability of the carboxy-terminus of Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 gene in Hodgkin's lymphomas. *J Med Virol* 79: 1730-22.
- Gulley, M. L., and W. Tang. 2008. Laboratory assays for Epstein-Barr virus-related disease. *J Mol Diagn* 10: 279-92.
- Gutensohn, N., and P. Cole. 1980. Epidemiology of Hodgkin's disease. *Semin Oncol* 7: 92-102.
- Hadinoto, V., M. Shapiro, T. C. Greenough, J. L. Sullivan, K. Luzuriaga, and D. A. Thorley-Lawson. 2008. On the dynamics of acute EBV infection and the pathogenesis of infectious mononucleosis. *Blood* 111: 1420-7.
- Hadinoto, V., M. Shapiro, C. C. Sun, and D. A. Thorley-Lawson. 2009. The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLoS Pathog* 5: e1000496.

- He, Z., B. Xin, X. Yang, C. Chan, and L. Cao. 2000. Nuclear factor-kappaB activation is involved in LMP1-mediated transformation and tumorigenesis of rat-1 fibroblasts. *Cancer Res* 60: 1845-8.
- He, Z. M., and Z. C. Chen. 2003. [Construction and function analysis of a CTAR-2 region mutant of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1]. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 35: 261-5.
- Hebner, C., J. Lasanen, S. Battle, and A. Aiyar. 2003. The spacing between adjacent binding sites in the family of repeats affects the functions of Epstein-Barr nuclear antigen 1 in transcription activation and stable plasmid maintenance. *Virology* 311: 263-74.
- Henle, G., W. Henle, and V. Diehl. 1968. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes- γ type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 59: 94-101.
- Herrero, J. A., P. Mathew, and C. V. Paya. 1995. LMP-1 activates NF-kappa B by targeting the inhibitory molecule I kappa B alpha. *J Virol* 69: 2168-74.
- Higuchi, M., K. M. Izumi, and E. Kieff. 2001. Epstein-Barr virus latent-infection membrane proteins are palmitoylated and raft-associated: protein 1 binds to the cytoskeleton through TNF receptor cytoplasmic factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4675-80.
- Higuchi, M., E. Kieff, and K. M. Izumi. 2002. The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 putative Janus kinase 3 (JAK3) binding domain does not mediate JAK3 association or activation in B-lymphoma or lymphoblastoid cell lines. *J Virol* 76: 455-9.
- Hjalgrim, H., K. E. Smedby, K. Rostgaard, D. Molin, S. Hamilton-Dutoit, E. T. Chang, E. Ralfkiaer, C. Sundstrom, H. O. Adami, B. Glimelius, and M. Melbye. 2007. Infectious mononucleosis, childhood social environment, and risk of Hodgkin lymphoma. *Cancer Res* 67: 2382-8.
- Hochberg, D., T. Souza, M. Catalina, J. L. Sullivan, K. Luzuriaga, and D. A. Thorley-Lawson. 2004. Acute infection with Epstein-Barr virus targets and overwhelms the peripheral memory B-cell compartment with resting, latently infected cells. *J Virol* 78: 5194-204.
- Holden, N. S., and C. E. Tacon. 2010. Principles and problems of the electrophoretic mobility shift assay. *J Pharmacol Toxicol Methods*.
- Homig-Holzel, C., C. Hojer, J. Rastelli, S. Casola, L. J. Strobl, W. Muller, L. Quintanilla-Martinez, A. Gewies, J. Ruland, K. Rajewsky, and U. Zimmer-Strobl. 2008. Constitutive CD40 signaling in B cells selectively activates the noncanonical NF-kappaB pathway and promotes lymphomagenesis. *J Exp Med* 205: 1317-29.
- Honma, K., S. Tsuzuki, M. Nakagawa, H. Tagawa, S. Nakamura, Y. Morishima, and M. Seto. 2009. TNFAIP3/A20 functions as a novel tumor suppressor gene in several subtypes of non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 114: 2467-75.
- Horie, R., T. Watanabe, Y. Morishita, K. Ito, T. Ishida, Y. Kanegae, I. Saito, M. Higashihara, S. Mori, M. E. Kadin, and T. Watanabe. 2002. Ligand-independent signaling by overexpressed CD30 drives NF-kappaB activation in Hodgkin-Reed-Sternberg cells. *Oncogene* 21: 2493-503.

- Horvath, G. C., and W. H. Schubach. 1993. Identification of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivation domain. *Biochem Biophys Res Commun* 191: 196-200.
- Houldsworth, J., A. B. Olshen, G. Cattoretti, G. B. Donnelly, J. Teruya-Feldstein, J. Qin, N. Palanisamy, Y. Shen, K. Dyomina, M. Petlakh, Q. Pan, A. D. Zelenetz, R. Dalla-Favera, and R. S. Chaganti. 2004. Relationship between REL amplification, REL function, and clinical and biologic features in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 103: 1862-8.
- Hsieh, J. J., T. Henkel, P. Salmon, E. Robey, M. G. Peterson, and S. D. Hayward. 1996. Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. *Mol Cell Biol* 16: 952-9.
- Hu, L. F., F. Chen, X. Zheng, I. Ernberg, S. L. Cao, B. Christensson, G. Klein, and G. Winberg. 1993. Clonability and tumorigenicity of human epithelial cells expressing the EBV encoded membrane protein LMP1. *Oncogene* 8: 1575-83.
- Hu, L. F., E. R. Zabarovsky, F. Chen, S. L. Cao, I. Ernberg, G. Klein, and G. Winberg. 1991. Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol* 72 (Pt 10): 2399-409.
- Huang, D. B., D. Vu, and G. Ghosh. 2005. NF-kappaB RelB forms an intertwined homodimer. *Structure* 13: 1365-73.
- Hudnall, S. D., Y. Ge, L. Wei, N. P. Yang, H. Q. Wang, and T. Chen. 2005. Distribution and phenotype of Epstein-Barr virus-infected cells in human pharyngeal tonsils. *Mod Pathol* 18: 519-27.
- Huen, D. S., S. A. Henderson, D. Croom-Carter, and M. Rowe. 1995. The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene* 10: 549-60.
- Iademarco, M. F., J. J. McQuillan, G. D. Rosen, and D. C. Dean. 1992. Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J Biol Chem* 267: 16323-9.
- Ikeda, O., Y. Miyasaka, R. Yoshida, A. Mizushima, K. Oritani, Y. Sekine, M. Kuroda, T. Yasui, M. Fujimuro, R. Muromoto, A. Nanbo, and T. Matsuda. 2010. BS69 cooperates with TRAF3 in the regulation of Epstein-Barr virus-derived LMP1/CTAR1-induced NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 584: 865-72.
- Imai, S., M. Kuroda, R. Yamashita, and Y. Ishiura. 2005. [Therapeutic inhibition of Epstein-Barr virus-associated tumor cell growth by dominant-negative EBNA1]. *Uirusu* 55: 239-49.
- Israel, A. 2000. The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends Cell Biol* 10: 129-33.
- Israel, A., O. Le Bail, D. Hatat, J. Piette, M. Kieran, F. Logeat, D. Wallach, M. Fellous, and P. Kourilsky. 1989. TNF stimulates expression of mouse MHC class I genes by inducing an NF kappa B-like enhancer binding activity which displaces constitutive factors. *Embo J* 8: 3793-800.
- Iwakiri, D., M. Samanta, and K. Takada. 2006. [Mechanisms of EBV-mediated oncogenesis]. *Uirusu* 56: 201-8.

- Iwanaga, R., E. Ozono, J. Fujisawa, M. A. Ikeda, N. Okamura, Y. Huang, and K. Ohtani. 2008. Activation of the cyclin D2 and cdk6 genes through NF-kappaB is critical for cell-cycle progression induced by HTLV-I Tax. *Oncogene*.
- Izumi, K. M., E. D. Cahir McFarland, E. A. Riley, D. Rizzo, Y. Chen, and E. Kieff. 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. *J Virol* 73: 9908-16.
- Izumi, K. M., K. M. Kaye, and E. D. Kieff. 1994. Epstein-Barr virus recombinant molecular genetic analysis of the LMP1 amino-terminal cytoplasmic domain reveals a probable structural role, with no component essential for primary B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 68: 4369-76.
- . 1997. The Epstein-Barr virus LMP1 amino acid sequence that engages tumor necrosis factor receptor associated factors is critical for primary B lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1447-52.
- Jansson, A., P. Johansson, S. Li, and L. Rymo. 2007. Activity of the LMP1 gene promoter in Epstein-Barr virus-transformed cell lines is modulated by sequence variations in the promoter-proximal CRE site. *J Gen Virol* 88: 1887-94.
- Jenkins, P. J., and P. J. Farrell. 1996. Are particular Epstein-Barr virus strains linked to disease? *Semin Cancer Biol* 7: 209-15.
- Joab, I., D. T. Rowe, M. Bodescot, J. C. Nicolas, P. J. Farrell, and M. Perricaudet. 1987. Mapping of the gene coding for Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen EBNA3 and its transient overexpression in a human cell line by using an adenovirus expression vector. *J Virol* 61: 3340-4.
- Johannsen, E., E. Koh, G. Mosialos, X. Tong, E. Kieff, and S. R. Grossman. 1995. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivation of the latent membrane protein 1 promoter is mediated by J kappa and PU.1. *J Virol* 69: 253-62.
- Johannsen, E., C. L. Miller, S. R. Grossman, and E. Kieff. 1996. EBNA-2 and EBNA-3C extensively and mutually exclusively associate with RBPJkappa in Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes. *J Virol* 70: 4179-83.
- Johansson, P., A. Jansson, U. Ruetschi, and L. Rymo. 2009. Nuclear factor-kappaB binds to the Epstein-Barr Virus LMP1 promoter and upregulates its expression. *J Virol* 83: 1393-401.
- . 2010. The p38 signaling pathway upregulates expression of the Epstein-Barr virus LMP1 oncogene. *J Virol* 84: 2787-97.
- Kang, S. S., S. S. Woo, J. Im, J. S. Yang, C. H. Yun, H. R. Ju, C. G. Son, E. Y. Moon, and S. H. Han. 2007. Human placenta promotes IL-8 expression through activation of JNK/SAPK and transcription factors NF-kappaB and AP-1 in PMA-differentiated THP-1 cells. *Int Immunopharmacol* 7: 1488-95.
- Karin, M., and Y. Ben-Neriah. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18: 621-63.
- Kashuba, E., K. Mattsson, G. Klein, and L. Szekely. 2003. p14ARF induces the relocation of HDM2 and p53 to extranucleolar sites that are targeted by PML bodies and proteasomes. *Mol Cancer* 2: 18.
- Kaye, K. M., O. Devergne, J. N. Harada, K. M. Izumi, R. Yalamanchili, E. Kieff, and G. Mosialos. 1996. Tumor necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF-kappa B activation by latent infection membrane protein 1, the

- Epstein-Barr virus transforming protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11085-90.
- Kaye, K. M., K. M. Izumi, and E. Kieff. 1993. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 9150-4.
- Kaye, K. M., K. M. Izumi, G. Mosialos, and E. Kieff. 1995. The Epstein-Barr virus LMP1 cytoplasmic carboxy terminus is essential for B-lymphocyte transformation; fibroblast cocultivation complements a critical function within the terminal 155 residues. *J Virol* 69: 675-83.
- Keats, J. J., R. Fonseca, M. Chesi, R. Schop, A. Baker, W. J. Chng, S. Van Wier, R. Tiedemann, C. X. Shi, M. Sebag, E. Braggio, T. Henry, Y. X. Zhu, H. Fogle, T. Price-Troska, G. Ahmann, C. Mancini, L. A. Brents, S. Kumar, P. Greipp, A. Dispenzieri, B. Bryant, G. Mulligan, L. Bruhn, M. Barrett, R. Valdez, J. Trent, A. K. Stewart, J. Carpten, and P. L. Bergsagel. 2007. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* 12: 131-44.
- Kelly, G. L., A. Bell, A. Rickinson. 2002. Epstein-Barr virus-associated Burkitt lymphomagenesis selects for downregulation of the nuclear antigen EBNA2. *Nature Medicine* 8: 1098-1104.
- Kelly, G. L., A. E. Milner, G. S. Baldwin, A. I. Bell, and A. B. Rickinson. 2006. Three restricted forms of Epstein-Barr virus latency counteracting apoptosis in c-myc-expressing Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 14935-40.
- Kempkes, B., M. Pawlita, U. Zimmer-Strobl, G. Eissner, G. Laux, and G. W. Bornkamm. 1995. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-estrogen receptor fusion proteins transactivate viral and cellular genes and interact with RBP-J kappa in a conditional fashion. *Virology* 214: 675-9.
- Khan, G. 2006. Epstein-Barr virus, cytokines, and inflammation: a cocktail for the pathogenesis of Hodgkin's lymphoma? *Exp Hematol* 34: 399-406.
- Khanna, R., S. R. Burrows, P. M. Steigerwald-Mullen, D. J. Moss, M. G. Kurilla, and L. Cooper. 1997. Targeting Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) through the class II pathway restores immune recognition by EBNA1-specific cytotoxic T lymphocytes: evidence for HLA-DM-independent processing. *Int Immunol* 9: 1537-43.
- Kieff, E., and Rickinson, A. B. 2001. Epstein-Barr virus and its replication. Pages 2511-2627 in D. M. K. a. P. M. Howley, ed. *Virology*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Kim, J. E., Y. A. Kim, Y. K. Jeon, S. S. Park, D. S. Heo, and C. W. Kim. 2003. Comparative analysis of NK/T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma in Korea: Clinicopathological correlations and analysis of EBV strain type and 30-bp deletion variant LMP1. *Pathol Int* 53: 735-43.
- Kis, L. L., M. Takahara, N. Nagy, G. Klein, and E. Klein. 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: 2928-35.

- Klapproth, K., S. Sander, D. Marinkovic, B. Baumann, and T. Wirth. 2009. The IKK2/NF- κ B pathway suppresses MYC-induced lymphomagenesis. *Blood* 114: 2448-58.
- Klapproth, K., and T. Wirth. 2010. Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis. *Br J Haematol*.
- Knecht, H., E. Bachmann, P. Brousset, K. Sandvej, D. Nadal, F. Bachmann, B. F. Odermatt, G. Delsol, and G. Pallesen. 1993. Deletions within the LMP1 oncogene of Epstein-Barr virus are clustered in Hodgkin's disease and identical to those observed in nasopharyngeal carcinoma. *Blood* 82: 2937-42.
- Knowles, D. M. 1999. Immunodeficiency-associated lymphoproliferative disorders. *Mod Pathol* 12: 200-17.
- Krikos, A., C. D. Laherty, and V. M. Dixit. 1992. Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements. *J Biol Chem* 267: 17971-6.
- Kucharczak, J., M. J. Simmons, Y. Fan, and C. Gelinas. 2003. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* 22: 8961-82.
- Kulwichit, W., R. H. Edwards, E. M. Davenport, J. F. Baskar, V. Godfrey, and N. Raab-Traub. 1998. Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 11963-8.
- Kunsch, C., R. K. Lang, C. A. Rosen, and M. F. Shannon. 1994. Synergistic transcriptional activation of the IL-8 gene by NF-kappa B p65 (RelA) and NF-IL-6. *J Immunol* 153: 153-64.
- Kuppers, R. 2009a. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer* 9: 15-27.
- . 2009b. Molecular biology of Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 491-6.
- Kuppers, R., R. Schmitz, V. Distler, C. Renne, A. Brauninger, and M. L. Hansmann. 2005. Pathogenesis of Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol Suppl*: 26-33.
- Kurth, J., M. L. Hansmann, K. Rajewsky, and R. Kuppers. 2003. Epstein-Barr virus-infected B cells expanding in germinal centers of infectious mononucleosis patients do not participate in the germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4730-5.
- Kusano, S., and N. Raab-Traub. 2001. An Epstein-Barr virus protein interacts with Notch. *J Virol* 75: 384-95.
- Laherty, C. D., H. M. Hu, A. W. Opipari, F. Wang, and V. M. Dixit. 1992. The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J Biol Chem* 267: 24157-60.
- Laichalk, L. L., and D. A. Thorley-Lawson. 2005. Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J Virol* 79: 1296-307.
- Lam, L. T., R. E. Davis, J. Pierce, M. Hepperle, Y. Xu, M. Hottelet, Y. Nong, D. Wen, J. Adams, L. Dang, and L. M. Staudt. 2005. Small molecule inhibitors of IkappaB kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin Cancer Res* 11: 28-40.

- Larcher, C., D. Bernhard, E. Schaadt, B. Adler, M. J. Ausserlechner, M. Mitterer, and H. P. Huemer. 2003. Functional analysis of the mutated Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1(69del): implications for a new role of naturally occurring LMP1 variants. *Haematologica* 88: 1324-35.
- Laux, G., B. Adam, L. J. Strobl, and F. Moreau-Gachelin. 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. *Embo J* 13: 5624-32.
- Le Clorennec, C., T. S. Ouk, I. Youlyouz-Marfak, S. Panteix, C. C. Martin, J. Rastelli, E. Adriaenssens, U. Zimmer-Strobl, J. Coll, J. Feuillard, and C. Jayat-Vignoles. 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. *J Virol* 82: 6721-33.
- Lee, D. Y., and B. Sugden. 2008. The LMP1 oncogene of EBV activates PERK and the unfolded protein response to drive its own synthesis. Pages 2280-9. *Blood*.
- Leight, E. R., and B. Sugden. 2000. EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Rev Med Virol* 10: 83-100.
- Levitskaya, J., A. Sharipo, A. Leonchiks, A. Ciechanover, and M. G. Masucci. 1997. Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12616-21.
- Li, S. N., Y. S. Chang, and S. T. Liu. 1996. Effect of a 10-amino acid deletion on the oncogenic activity of latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *Oncogene* 12: 2129-35.
- Liang, C. L., C. N. Tsai, P. J. Chung, J. L. Chen, C. M. Sun, R. H. Chen, J. H. Hong, and Y. S. Chang. 2000. Transcription of Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1 promoter Qp is repressed by transforming growth factor-beta via Smad4 binding element in human BL cells. *Virology* 277: 184-92.
- Lin, S. S., D. C. Lee, A. H. Law, J. W. Fang, D. T. Chua, and A. S. Lau. A role for protein kinase PKR in the mediation of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1-induced IL-6 and IL-10 expression. *Cytokine* 50: 210-9.
- Lin, Y., L. Bai, W. Chen, and S. Xu. 2010. The NF-kappaB activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. *Expert Opin Ther Targets* 14: 45-55.
- Ling, P. D., R. S. Peng, A. Nakajima, J. H. Yu, J. Tan, S. M. Moses, W. H. Yang, B. Zhao, E. Kieff, K. D. Bloch, and D. B. Bloch. 2005. Mediation of Epstein-Barr virus EBNA-LP transcriptional coactivation by Sp100. *Embo J* 24: 3565-75.
- Lo, A. K., K. F. To, K. W. Lo, R. W. Lung, J. W. Hui, G. Liao, and S. D. Hayward. 2007. Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 16164-9.
- Longnecker, R. 2000. Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence? *Adv Cancer Res* 79: 175-200.
- Lovas, A., D. Radke, D. Albrecht, Z. B. Yilmaz, U. Moller, A. J. Habenicht, and F. Weih. 2008. Differential RelA- and RelB-dependent gene transcription in LTbetaR-stimulated mouse embryonic fibroblasts. *BMC Genomics* 9: 606.

- Luftig, M., T. Yasui, V. Soni, M. S. Kang, N. Jacobson, E. Cahir-McFarland, B. Seed, and E. Kieff. 2004. Epstein-Barr virus latent infection membrane protein 1 TRAF-binding site induces NIK/IKK alpha-dependent noncanonical NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 141-6.
- Lung, R. W., J. H. Tong, Y. M. Sung, P. S. Leung, D. C. Ng, S. L. Chau, A. W. Chan, E. K. Ng, K. W. Lo, and K. F. To. 2009. Modulation of LMP2A expression by a newly identified Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART22. *Neoplasia* 11: 1174-84.
- Mainou, B. A., D. N. Everly, Jr., and N. Raab-Traub. 2005. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 CTAR1 mediates rodent and human fibroblast transformation through activation of PI3K. *Oncogene* 24: 6917-24.
- . 2007. Unique signaling properties of CTAR1 in LMP1-mediated transformation. *J Virol* 81: 9680-92.
- Mainou, B. A., and N. Raab-Traub. 2006. LMP1 strain variants: biological and molecular properties. *J Virol* 80: 6458-68.
- Malek, S., T. Huxford, and G. Ghosh. 1998. Ikappa Balpha functions through direct contacts with the nuclear localization signals and the DNA binding sequences of NF-kappaB. *J Biol Chem* 273: 25427-35.
- Mancao, C., and W. Hammerschmidt. 2007. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival. *Blood* 110: 3715-21.
- Mannick, J. B., J. I. Cohen, M. Birkenbach, A. Marchini, and E. Kieff. 1991. The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation. *J Virol* 65: 6826-37.
- Mathas, S., K. Johrens, S. Joos, A. Lietz, F. Hummel, M. Janz, F. Jundt, I. Anagnostopoulos, K. Bommert, P. Lichter, H. Stein, C. Scheidereit, and B. Dorken. 2005. Elevated NF-kappaB p50 complex formation and Bcl-3 expression in classical Hodgkin, anaplastic large-cell, and other peripheral T-cell lymphomas. *Blood* 106: 4287-93.
- Mathes, E., E. L. O'Dea, A. Hoffmann, and G. Ghosh. 2008. NF-kappaB dictates the degradation pathway of IkappaBalpha. *Embo J* 27: 1357-67.
- McCann, E. M., G. L. Kelly, A. B. Rickinson, and A. I. Bell. 2001. Genetic analysis of the Epstein-Barr virus-coded leader protein EBNA-LP as a co-activator of EBNA2 function. *J Gen Virol* 82: 3067-79.
- Middeldorp, J. M., A. A. Brink, A. J. van den Brule, and C. J. Meijer. 2003. Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit Rev Oncol Hematol* 45: 1-36.
- Mineva, N. D., T. L. Rothstein, J. A. Meyers, A. Lerner, and G. E. Sonenshein. 2007. CD40 ligand-mediated activation of the de novo RelB NF-kappaB synthesis pathway in transformed B cells promotes rescue from apoptosis. *J Biol Chem* 282: 17475-85.
- Mitchell, T., and B. Sugden. 1995. Stimulation of NF-kappa B-mediated transcription by mutant derivatives of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus. *J Virol* 69: 2968-76.

- Moorthy, R. K., and D. A. Thorley-Lawson. 1993a. All three domains of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein LMP-1 are required for transformation of rat-1 fibroblasts. *J Virol* 67: 1638-46.
- . 1993b. Biochemical, genetic, and functional analyses of the phosphorylation sites on the Epstein-Barr virus-encoded oncogenic latent membrane protein LMP-1. *J Virol* 67: 2637-45.
- Mosialos, G., M. Birkenbach, R. Yalamanchili, T. VanArsdale, C. Ware, and E. Kieff. 1995. The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 80: 389-99.
- Najjar, I., F. Baran-Marszak, C. Le Clorenec, C. Laguillier, O. Schischmanoff, I. Youlyouz-Marfak, M. Schlee, G. W. Bornkamm, M. Raphael, J. Feuillard, and R. Fagard. 2005. Latent membrane protein 1 regulates STAT1 through NF-kappaB-dependent interferon secretion in Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J Virol* 79: 4936-43.
- Nakanishi, C., and M. Toi. 2005. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* 5: 297-309.
- Nepomuceno, R. R., A. L. Snow, P. Robert Beatty, S. M. Krams, and O. M. Martinez. 2002. Constitutive activation of Jak/STAT proteins in Epstein-Barr virus-infected B-cell lines from patients with posttransplant lymphoproliferative disorder. *Transplantation* 74: 396-402.
- Ngo, V. N., R. E. Davis, L. Lamy, X. Yu, H. Zhao, G. Lenz, L. T. Lam, S. Dave, L. Yang, J. Powell, and L. M. Staudt. 2006. A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. *Nature* 441: 106-10.
- Nilsson, K. 1992. Human B-lymphoid cell lines. *Hum Cell* 5: 25-41.
- Ning, S., A. M. Hahn, L. E. Huye, and J. S. Pagano. 2003. Interferon regulatory factor 7 regulates expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1: a regulatory circuit. *J Virol* 77: 9359-68.
- Novak, U., A. Rinaldi, I. Kwee, S. V. Nandula, P. M. Rancoita, M. Compagno, M. Cerri, D. Rossi, V. V. Murty, E. Zucca, G. Gaidano, R. Dalla-Favera, L. Pasqualucci, G. Bhagat, and F. Bertoni. 2009. The NF- κ B negative regulator TNFAIP3 (A20) is inactivated by somatic mutations and genomic deletions in marginal zone lymphomas. *Blood* 113: 4918-21.
- Osborn, L., S. Kunkel, and G. J. Nabel. 1989. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2336-40.
- Pahl, H. L. 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18: 6853-66.
- Pandya, J., and D. M. Walling. 2004. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP-1) half-life in epithelial cells is down-regulated by lytic LMP-1. *J Virol* 78: 8404-10.
- . 2006. Oncogenic activity of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP-1) is down-regulated by lytic LMP-1. *J Virol* 80: 8038-46.
- Parker, G. A., R. Touitou, and M. J. Allday. 2000. Epstein-Barr virus EBNA3C can disrupt multiple cell cycle checkpoints and induce nuclear division divorced from cytokinesis. *Oncogene* 19: 700-9.

- Pegtel, D. M., J. Middeldorp, and D. A. Thorley-Lawson. 2004. Epstein-Barr virus infection in ex vivo tonsil epithelial cell cultures of asymptomatic carriers. *J Virol* 78: 12613-24.
- Pfeffer, S., M. Zavolan, F. A. Grasser, M. Chien, J. J. Russo, J. Ju, B. John, A. J. Enright, D. Marks, C. Sander, and T. Tuschl. 2004. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 304: 734-6.
- Phelps, C. B., L. L. Sengchanthalangsy, T. Huxford, and G. Ghosh. 2000. Mechanism of I kappa B alpha binding to NF-kappa B dimers. *J Biol Chem* 275: 29840-6.
- Pope, J. H., M. K. Horne, and W. Scott. 1968. Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *Int J Cancer* 3: 857-66.
- Prasad, S., J. Ravindran, and B. B. Aggarwal. NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship. *Mol Cell Biochem* 336: 25-37.
- . 2010. NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship. *Mol Cell Biochem* 336: 25-37.
- Raab-Traub, N., and K. Flynn. 1986. The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell* 47: 883-9.
- Rastelli, J., C. Homig-Holzel, J. Seagal, W. Muller, A. C. Hermann, K. Rajewsky, and U. Zimmer-Strobl. 2008. LMP1 signaling can replace CD40 signaling in B cells in vivo and has unique features of inducing class-switch recombination to IgG1. *Blood* 111: 1448-55.
- Rawlings, J. S., K. M. Rosler, and D. A. Harrison. 2004. The JAK/STAT signaling pathway. *J Cell Sci* 117: 1281-3.
- Rea, D., H. J. Delecluse, S. J. Hamilton-Dutoit, L. Marelle, I. Joab, L. Edelman, J. F. Finet, and M. Raphael. 1994. Epstein-Barr virus latent and replicative gene expression in post-transplant lymphoproliferative disorders and AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas. French Study Group of Pathology for HIV-associated Tumors. *Ann Oncol* 5 Suppl 1: 113-6.
- Ren, Q., H. Sato, S. Muroto, M. Furukawa, and T. Yoshizaki. 2004. Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 induces interleukin-8 through the nuclear factor-kappa B signaling pathway in EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cell line. *Laryngoscope* 114: 855-9.
- Roberts, M. L., and N. R. Cooper. 1998. Activation of a ras-MAPK-dependent pathway by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for cellular transformation. *Virology* 240: 93-9.
- Robertson, E. S., S. Grossman, E. Johannsen, C. Miller, J. Lin, B. Tomkinson, and E. Kieff. 1995. Epstein-Barr virus nuclear protein 3C modulates transcription through interaction with the sequence-specific DNA-binding protein J kappa. *J Virol* 69: 3108-16.
- Robertson, E. S., J. Lin, and E. Kieff. 1996. The amino-terminal domains of Epstein-Barr virus nuclear proteins 3A, 3B, and 3C interact with RBPJ(kappa). *J Virol* 70: 3068-74.
- Rothenberger, S., E. Bachmann, C. Berger, C. McQuain, B. F. Odermatt, and H. Knecht. 1997. Natural 30 base pair and 69 base pair deletion variants of the LMP1 oncogene do stimulate NF-kappaB-mediated transcription. *Oncogene* 14: 2123-6.

- Roughan, J. E., C. Torgbor, and D. A. Thorley-Lawson. 2010. Germinal center B cells latently infected with Epstein-Barr virus proliferate extensively but do not increase in number. *J Virol* 84: 1158-68.
- Rowe, M., M. Peng-Pilon, D. S. Huen, R. Hardy, D. Croom-Carter, E. Lundgren, and A. B. Rickinson. 1994. Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell-specific response that is delayed relative to NF-kappa B activation and to induction of cell surface markers. *J Virol* 68: 5602-12.
- Rowe, M., L. S. Young, K. Cadwallader, L. Petti, E. Kieff, and A. B. Rickinson. 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. *J Virol* 63: 1031-9.
- Saha, A., M. Murakami, P. Kumar, B. Bajaj, K. Sims, and E. S. Robertson. 2009. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C augments Mdm2-mediated p53 ubiquitination and degradation by deubiquitinating Mdm2. *J Virol* 83: 4652-69.
- Saito, N., G. Courtois, A. Chiba, N. Yamamoto, T. Nitta, N. Hironaka, M. Rowe, N. Yamamoto, and S. Yamaoka. 2003. Two carboxyl-terminal activation regions of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activate NF-kappaB through distinct signaling pathways in fibroblast cell lines. *J Biol Chem* 278: 46565-75.
- Sandberg, M., W. Hammerschmidt, and B. Sugden. 1997. Characterization of LMP-1's association with TRAF1, TRAF2, and TRAF3. *J Virol* 71: 4649-56.
- Sandvej, K., J. W. Gratama, M. Munch, X. G. Zhou, R. L. Bolhuis, B. S. Andresen, N. Gregersen, and S. Hamilton-Dutoit. 1997. Sequence analysis of the Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein-1 gene and promoter region: identification of four variants among wild-type EBV isolates. *Blood* 90: 323-30.
- Savinova, O. V., A. Hoffmann, and G. Ghosh. 2009. The Nfkb1 and Nfkb2 proteins p105 and p100 function as the core of high-molecular-weight heterogeneous complexes. *Mol Cell* 34: 591-602.
- Schaefer, B. C., J. L. Strominger, and S. H. Speck. 1995a. The Epstein-Barr virus BamHI F promoter is an early lytic promoter: lack of correlation with EBNA 1 gene transcription in group 1 Burkitt's lymphoma cell lines. *J Virol* 69: 5039-47.
- . 1995b. Redefining the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-1 gene promoter and transcription initiation site in group I Burkitt lymphoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10565-9.
- Schlee, M., M. Schuhmacher, M. Holzel, G. Laux, and G. W. Bornkamm. 2007. c-MYC Impairs Immunogenicity of Human B Cells. *Adv Cancer Res* 97: 167-88.
- Sen, R., and D. Baltimore. 1986. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46: 705-16.
- Senftleben, U., Y. Cao, G. Xiao, F. R. Greten, G. Krahn, G. Bonizzi, Y. Chen, Y. Hu, A. Fong, S. C. Sun, and M. Karin. 2001. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* 293: 1495-9.
- Sethi, G., K. S. Ahn, and B. B. Aggarwal. 2008a. Targeting nuclear factor-kappa B activation pathway by thymoquinone: role in suppression of antiapoptotic gene products and enhancement of apoptosis. *Mol Cancer Res* 6: 1059-70.

- Sethi, G., B. Sung, and B. B. Aggarwal. 2008b. Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside. *Exp Biol Med (Maywood)* 233: 21-31.
- Shair, K. H., K. M. Bendt, R. H. Edwards, E. C. Bedford, J. N. Nielsen, and N. Raab-Traub. 2007. EBV latent membrane protein 1 activates Akt, NFkappaB, and Stat3 in B cell lymphomas. *PLoS Pathog* 3: e166.
- Shair, K. H., C. I. Schnegg, and N. Raab-Traub. 2008. EBV latent membrane protein 1 effects on plakoglobin, cell growth, and migration. *Cancer Res* 68: 6997-7005.
- Sharp, T. V., M. Schwemmle, I. Jeffrey, K. Laing, H. Mellor, C. G. Proud, K. Hilse, and M. J. Clemens. 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 Res* 21: 4483-90.
- Sinclair, A. J., I. Palmero, G. Peters, and P. J. Farrell. 1994. EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *Embo J* 13: 3321-8.
- Sjoblom, A., W. Yang, L. Palmqvist, A. Jansson, and L. Rymo. 1998. An ATF/CRE element mediates both EBNA2-dependent and EBNA2-independent activation of the Epstein-Barr virus LMP1 gene promoter. *J Virol* 72: 1365-76.
- Son, Y. H., Y. T. Jeong, K. A. Lee, K. H. Choi, S. M. Kim, B. Y. Rhim, and K. Kim. 2008. Roles of MAPK and NF-kappaB in interleukin-6 induction by lipopolysaccharide in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 51: 71-7.
- Soni, V., E. Cahir-McFarland, and E. Kieff. 2007. LMP1 TRAFficking activates growth and survival pathways. *Adv Exp Med Biol* 597: 173-87.
- Soni, V., T. Yasui, E. Cahir-McFarland, and E. Kieff. 2006. LMP1 transmembrane domain 1 and 2 (TM1-2) FWLY mediates intermolecular interactions with TM3-6 to activate NF-kappaB. *J Virol* 80: 10787-93.
- Starlets, D., Y. Gore, I. Binsky, M. Haran, N. Harpaz, L. Shvidel, S. Becker-Herman, A. Berrebi, and I. Shachar. 2006. Cell-surface CD74 initiates a signaling cascade leading to cell proliferation and survival. *Blood* 107: 4807-16.
- Strockbine, L. D., J. I. Cohen, T. Farrah, S. D. Lyman, F. Wagener, R. F. DuBose, R. J. Armitage, and M. K. Spriggs. 1998. The Epstein-Barr virus BARP1 gene encodes a novel, soluble colony-stimulating factor-1 receptor. *J Virol* 72: 4015-21.
- Sun, S. C., and D. W. Ballard. 1999. Persistent activation of NF-kappaB by the tax transforming protein of HTLV-1: hijacking cellular IkappaB kinases. *Oncogene* 18: 6948-58.
- Tanner, J., J. Weis, D. Fearon, Y. Whang, and E. Kieff. 1987. Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* 50: 203-13.
- Thorley-Lawson, D. A. 2001. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol* 1: 75-82.
- Thorley-Lawson, D. A., and G. J. Babcock. 1999. A model for persistent infection with Epstein-Barr virus: the stealth virus of human B cells. *Life Sci* 65: 1433-53.

- Thornburg, N. J., W. Kulwichit, R. H. Edwards, K. H. Shair, K. M. Bendt, and N. Raab-Traub. 2006. LMP1 signaling and activation of NF-kappaB in LMP1 transgenic mice. *Oncogene* 25: 288-97.
- Thornburg, N. J., S. Kusano, and N. Raab-Traub. 2004. Identification of Epstein-Barr virus RK-BARF0-interacting proteins and characterization of expression pattern. *J Virol* 78: 12848-56.
- Timms, J. M., A. Bell, J. R. Flavell, P. G. Murray, A. B. Rickinson, A. Traverse-Glehen, F. Berger, and H. J. Delecluse. 2003. Target cells of Epstein-Barr-virus (EBV)-positive post-transplant lymphoproliferative disease: similarities to EBV-positive Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 361: 217-23.
- Tomkinson, B., and E. Kieff. 1992. Second-site homologous recombination in Epstein-Barr virus: insertion of type 1 EBNA 3 genes in place of type 2 has no effect on in vitro infection. *J Virol* 66: 780-9.
- Toualbi-Abed, K., F. Daniel, M. C. Guller, A. Legrand, J. L. Mauriz, A. Mauviel, and D. Bernuau. 2008. Jun D cooperates with p65 to activate the proximal kappaB site of the cyclin D1 promoter: role of PI3K/PDK-1. *Carcinogenesis* 29: 536-43.
- Trivedi, P., L. F. Hu, F. Chen, B. Christensson, M. G. Masucci, G. Klein, and G. Winberg. 1994. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded membrane protein LMP1 from a nasopharyngeal carcinoma is non-immunogenic in a murine model system, in contrast to a B cell-derived homologue. *Eur J Cancer* 30A: 84-8.
- Tsai, C. N., C. M. Lee, C. K. Chien, S. C. Kuo, and Y. S. Chang. 1999. Additive effect of Sp1 and Sp3 in regulation of the ED-L1E promoter of the EBV LMP 1 gene in human epithelial cells. *Virology* 261: 288-94.
- Tsurumi, T., M. Fujita, and A. Kudoh. 2005. Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Rev Med Virol* 15: 3-15.
- Uchida, J., T. Yasui, Y. Takaoka-Shichijo, M. Muraoka, W. Kulwichit, N. Raab-Traub, and H. Kikutani. 1999. Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science* 286: 300-3.
- Vallabhapurapu, S., and M. Karin. 2009. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 27: 693-733.
- van de Stolpe, A., and P. T. van der Saag. 1996. Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med* 74: 13-33.
- Vaysberg, M., S. L. Lambert, S. M. Krams, and O. M. Martinez. 2009. Activation of the JAK/STAT pathway in Epstein Barr virus+-associated posttransplant lymphoproliferative disease: role of interferon-gamma. *Am J Transplant* 9: 2292-302.
- Verbsky, J. W., E. A. Bach, Y. F. Fang, L. Yang, D. A. Randolph, and L. E. Fields. 1996. Expression of Janus kinase 3 in human endothelial and other non-lymphoid and non-myeloid cells. *J Biol Chem* 271: 13976-80.
- Verma, I. M., J. K. Stevenson, E. M. Schwarz, D. Van Antwerp, and S. Miyamoto. 1995. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 9: 2723-35.
- Vogel, C. F., E. Sciallo, and F. Matsumura. 2007. Involvement of RelB in aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of chemokines. *Biochem Biophys Res Commun* 363: 722-6.

- Walling, D. M., N. Shebib, S. C. Weaver, C. M. Nichols, C. M. Flaitz, and J. Webster-Cyriaque. 1999. The molecular epidemiology and evolution of Epstein-Barr virus: sequence variation and genetic recombination in the latent membrane protein-1 gene. *J Infect Dis* 179: 763-74.
- Waltzer, L., F. Logeat, C. Brou, A. Israel, A. Sergeant, and E. Manet. 1994. The human J kappa recombination signal sequence binding protein (RBP-J kappa) targets the Epstein-Barr virus EBNA2 protein to its DNA responsive elements. *Embo J* 13: 5633-8.
- Wan, J., L. Sun, J. W. Mendoza, Y. L. Chui, D. P. Huang, Z. J. Chen, N. Suzuki, S. Suzuki, W. C. Yeh, S. Akira, K. Matsumoto, Z. G. Liu, and Z. Wu. 2004. Elucidation of the c-Jun N-terminal kinase pathway mediated by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1. *Mol Cell Biol* 24: 192-9.
- Wan, J., W. Zhang, L. Wu, T. Bai, M. Zhang, K. W. Lo, Y. L. Chui, Y. Cui, Q. Tao, M. Yamamoto, S. Akira, and Z. Wu. 2006. BS69, a specific adaptor in the latent membrane protein 1-mediated c-Jun N-terminal kinase pathway. *Mol Cell Biol* 26: 448-56.
- Wang, C., M. Ai, W. Ren, H. Xiao, X. Li, F. Tang, H. Gu, W. Yi, X. Weng, X. Deng, and Y. Cao. 2003. Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 induces TRAF1 expression to promote anti-apoptosis activity via NF-kappaB signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 116: 1022-8.
- Wang, D., D. Liebowitz, and E. Kieff. 1985. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* 43: 831-40.
- Wang, F., S. F. Tsang, M. G. Kurilla, J. I. Cohen, and E. Kieff. 1990. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivates latent membrane protein LMP1. *J Virol* 64: 3407-16.
- Wang, J., X. Wang, S. Hussain, Y. Zheng, S. Sanjabi, F. Ouaz, and A. A. Beg. 2007a. Distinct roles of different NF-kappa B subunits in regulating inflammatory and T cell stimulatory gene expression in dendritic cells. *J Immunol* 178: 6777-88.
- Wang, Y., K. Kanai, Y. Satoh, B. Luo, and T. Sairenji. 2007b. Carboxyl-terminal sequence variation of latent membrane protein 1 gene in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas from Eastern China and Japan. *Intervirology* 50: 229-36.
- Watanabe, A., S. Maruo, T. Ito, M. Ito, K. R. Katsumura, and K. Takada. 2010. Epstein-Barr virus-encoded Bcl-2 homologue functions as a survival factor in Wp-restricted Burkitt lymphoma cell line P3HR-1. *J Virol* 84: 2893-901.
- Weil, R., S. T. Whiteside, and A. Israel. 1997. Control of NF-kappa B activity by the I kappa B beta inhibitor. *Immunobiology* 198: 14-23.
- Whiteside, S. T., J. C. Epinat, N. R. Rice, and A. Israel. 1997. I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *Embo J* 16: 1413-26.
- Wilson, J. B., J. L. Bell, and A. J. Levine. 1996. Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. *Embo J* 15: 3117-26.

- Wilson, J. B., and A. J. Levine. 1992. The oncogenic potential of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in transgenic mice. *Curr Top Microbiol Immunol* 182: 375-84.
- Wilson, J. B., W. Weinberg, R. Johnson, S. Yuspa, and A. J. Levine. 1990. Expression of the BNLF-1 oncogene of Epstein-Barr virus in the skin of transgenic mice induces hyperplasia and aberrant expression of keratin 6. *Cell* 61: 1315-27.
- Winberg, G., L. Matskova, F. Chen, P. Plant, D. Rotin, G. Gish, R. Ingham, I. Ernberg, and T. Pawson. 2000. Latent membrane protein 2A of Epstein-Barr virus binds WW domain E3 protein-ubiquitin ligases that ubiquitinate B-cell tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 20: 8526-35.
- Woisetschlaeger, M., C. N. Yandava, L. A. Furmanski, J. L. Strominger, and S. H. Speck. 1990. Promoter switching in Epstein-Barr virus during the initial stages of infection of B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 1725-9.
- Wroblewski, J. M., A. Copple, L. P. Batson, C. D. Landers, and J. R. Yannelli. 2002. Cell surface phenotyping and cytokine production of Epstein-Barr Virus (EBV)-transformed lymphoblastoid cell lines (LCLs). *J Immunol Methods* 264: 19-28.
- Wu, D. Y., A. Krumm, and W. H. Schubach. 2000. Promoter-specific targeting of human SWI-SNF complex by Epstein-Barr virus nuclear protein 2. *J Virol* 74: 8893-903.
- Wu, L., H. Nakano, and Z. Wu. 2006. The C-terminal activating region 2 of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 activates NF-kappaB through TRAF6 and TAK1. *J Biol Chem* 281: 2162-9.
- Wu, S., P. Xie, K. Welsh, C. Li, C. Z. Ni, X. Zhu, J. C. Reed, A. C. Satterthwait, G. A. Bishop, and K. R. Ely. 2005. LMP1 protein from the Epstein-Barr virus is a structural CD40 decoy in B lymphocytes for binding to TRAF3. *J Biol Chem* 280: 33620-6.
- Xie, P., and G. A. Bishop. 2004. Roles of TNF receptor-associated factor 3 in signaling to B lymphocytes by carboxyl-terminal activating regions 1 and 2 of the EBV-encoded oncoprotein latent membrane protein 1. *J Immunol* 173: 5546-55.
- Yamamoto, M., and K. Takeda. 2008. Role of nuclear IkappaB proteins in the regulation of host immune responses. *J Infect Chemother* 14: 265-9.
- Yamamoto, N., T. Takizawa, Y. Iwanaga, N. Shimizu, and N. Yamamoto. 2000. Malignant transformation of B lymphoma cell line BJAB by Epstein-Barr virus-encoded small RNAs. *FEBS Lett* 484: 153-8.
- Yamaoka, S., G. Courtois, C. Bessia, S. T. Whiteside, R. Weil, F. Agou, H. E. Kirk, R. J. Kay, and A. Israel. 1998. Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 93: 1231-40.
- Yan, C., H. Wang, B. Aggarwal, and D. D. Boyd. 2004. A novel homologous recombination system to study 92 kDa type IV collagenase transcription demonstrates that the NF-kappaB motif drives the transition from a repressed to an activated state of gene expression. *Faseb J* 18: 540-1.

- Yao, Q. Y., P. Ogan, M. Rowe, M. Wood, and A. B. Rickinson. 1989. Epstein-Barr virus-infected B cells persist in the circulation of acyclovir-treated virus carriers. *Int J Cancer* 43: 67-71.
- Young, L. S., and A. B. Rickinson. 2004. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 4: 757-68.
- Zetterberg, H., and L. Rymo. 2005. *Epstein-Barr Virus. Robertson Es. Caister Academic Press: Wymondham. pp 439-462.*
- Zhang, L., K. Hong, J. Zhang, and J. S. Pagano. 2004. Multiple signal transducers and activators of transcription are induced by EBV LMP-1. *Virology* 323: 141-52.
- Zhou, S., M. Fujimuro, J. J. Hsieh, L. Chen, and S. D. Hayward. 2000. A role for SKIP in EBNA2 activation of CBF1-repressed promoters. *J Virol* 74: 1939-47.
- Zhou, X. G., K. Sandvej, P. J. Li, X. L. Ji, Q. H. Yan, X. P. Zhang, J. P. Da, and S. J. Hamilton-Dutoit. 2001. Epstein--Barr virus gene polymorphisms in Chinese Hodgkin's disease cases and healthy donors: identification of three distinct virus variants. *J Gen Virol* 82: 1157-67.
- Zimber-Strobl, U., and L. J. Strobl. 2001. EBNA2 and Notch signalling in Epstein-Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes. *Semin Cancer Biol* 11: 423-34.
- Zimber-Strobl, U., L. J. Strobl, C. Meitingner, R. Hinrichs, T. Sakai, T. Furukawa, T. Honjo, and G. W. Bornkamm. 1994. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 exerts its transactivating function through interaction with recombination signal binding protein RBP-J kappa, the homologue of Drosophila Suppressor of Hairless. *Embo J* 13: 4973-82.

ANNEXES

VIII. ANNEXES

A. Liste des anticorps

| Protéine d'intérêt | Fournisseur et référence | Dilution WB Quantité EMSA | Espèce |
|---------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---------------|
| Lmp-1 | Hybridome clone S12 | 1/100 dans TTBS lait 3% | Souris |
| p65 | Santa Cruz Biotechnology sc-7151X | 1/2 000 dans TTBS lait 5% 2 µg | Lapin |
| p105/p50 | Santa Cruz Biotechnology sc-114X | 1/2 000 dans TTBS lait 5% 2 µg | Lapin |
| RelB | Santa Cruz Biotechnology sc-226X | 1/2 000 dans TTBS lait 5% 2µg | Lapin |
| p100/p52 | Cell Signaling Technology #4882 | 1/700 dans TTBS bsa 5% | Lapin |
| p52 | Santa Cruz Biotechnology sc-848X | 1/2 000 dans TTBS lait 5% 2µg | Lapin |
| c-Rel | Santa Cruz Biotechnology sc-70X | 1/2 000 dans TTBS lait 5% 2µg | Lapin |
| IκBα | Santa Cruz Biotechnology sc-847 | 1/200 dans TTBS lait 5% | Lapin |
| TRAF1 | Santa Cruz Biotechnology sc-874 | 1/100 dans TTBS lait 5% | Lapin |
| Sam-68 | Santa Cruz Biotechnology sc-333 | 1/1 000 dans TTBS lait 5% | Lapin |
| αTubuline | Sigma Aldrich B-5-1-2 | 1/10 000 dans TTBS lait 3% | Souris |
| Goat Anti Mouse | Biorad | 1/5 000 dans TTBS lait 5% | Chèvre |
| Goat Anti Rabbit | Biorad | 1/5 000 dans TTBS lait 5% | Chèvre |

B. Sondes utilisées pour les retards sur gel

| Sondes EMSA | Séquences nucléotidiques |
|---------------------------------|--|
| CMHI CMHI _{mut} | 5' - AAT <u>GGGGATTCCC</u> AGCT - 3' 5' - AAT <u>GCGGATTCCG</u> AGCT - 3' |
| PRE PRE _{mut} | 5' - ACAAG <u>GGGACTTTCC</u> GCTG <u>GGGACTTTCC</u> AGG - 3' 5' - ACAAA <u>CTCACTTTCC</u> GCTG <u>CTCACTTTCC</u> AGG - 3' |
| BLC-kB BLC-kB _{mut} | 5' - ATTTT <u>GGGAGATTTG</u> AAAAC - 3' 5' - ATTTT <u>GCCAGACCTG</u> AAAAC - 3' |
| AP1 | 5' CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA - 3' |

C. Communications scientifiques

Octobre 2009

Poster, 5^{èmes} Journées Cancéropole Grand Sud-Ouest

« Rôle des voies d'activation classique et alternative du facteur transcriptionnel NF- κ B dans la prolifération et la protection contre l'apoptose induites par l'oncoprotéine virale LMP1 du virus d'Epstein-Barr ».

Janvier 2009

Poster, 2^{ème} Journée scientifique de l'IFR 145 GEIST

« Etude de la dynamique de l'activation des complexes NF- κ B induits par des variants naturels de l'oncoprotéine LMP-1 du virus d'Epstein-Barr ».

Mai 2008

Poster, 2^{ème} colloque d'Oléron

« Etude fonctionnelle des variants naturels de LMP-1 de l'EBV dans le lymphome de Hodgkin : rôle et dynamique d'activation des complexes Rel/NF- κ B ».

Septembre 2007

Communication orale, Journée scientifique de l'IFR 145 GEIST

« Rôle des voies d'activation classique et alternative de NF- κ B dans la transformation lymphocytaire B induite par l'oncoprotéine virale LMP-1 du virus d'Epstein-Barr ».

Mars 2007

Communication orale en anglais, Herpes viruses and cancer

« Role of classical and alternative NF- κ B pathways in B lymphocytes transformation induced by LMP-1 oncoprotein of the Epstein-Barr Virus ».

Octobre 2006

Poster, 2^{èmes} journées Cancéropole Grand Sud-Ouest

« Rôle de NF- κ B dans la transformation lymphocytaire B induite par l'oncoprotéine virale LMP-1 de l'EBV ».