

**UNIVERSITE DE LIMOGES**  
ECOLE DOCTORALE Bio-Santé N°524

FACULTE DE MEDECINE DE LIMOGES

UMR 7276 CNRS

« Contrôle de la réponse immune B et lymphoproliférations (CRIBL) »  
Equipe « Mécanismes moléculaires de la lymphomagenèse »

Thèse n°X-2013

**THESE**

Pour obtenir le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES**

Discipline : Biologie, Sciences, Santé  
Spécialité : Immunologie, oncologie et infectiologie

Présentée et soutenue publiquement par :

**Mona FARHAT-HAMZE**

Le 10 décembre 2013

*Ambivalence de la réponse à la mort cellulaire programmée  
des lymphocytes B immortalisés par l'EBV: exemple de la  
molécule B7-H1 et des MAP kinases*

Thèse co-dirigée par le Professeur Jean Feuillard et le Dr Chantal Jayat-Vignoles

**Jury :**

Président

M. Jean-Daniel BRION, Professeur des Universités, Paris.

Rapporteurs

M. Eric ADRIAENSSENS, Professeur des Universités, Lille.

Mme Joëlle WIELS, Directrice de Recherche (CNRS), Paris.

Examineurs

Mme Chantal JAYAT-VIGNOLES, MCU, Limoges.

M. Jean FEUILLARD, Professeur Universitaire-Praticien Hospitalier, Limoges.

M. Mouad ALAMI, Directeur de Recherche (CNRS), Paris.



A mes parents

A mon mari

A mon petit monstre !!

A toute ma famille et à mes amis

A l'humanité.

## REMERCIEMENTS

Je tiens dans un premier temps à remercier Monsieur Michel Cogné pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire pendant mes trois années de thèse.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse Monsieur Jean Feuillard pour m'avoir confié ce travail de recherche, ainsi que pour son aide et ses précieux conseils au cours de ces années.

Je remercie également Monsieur Jean-Daniel Brion d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse.

Je remercie Madame Joëlle Wiels et Monsieur Eric Adriaenssens qui ont bien voulu consacrer du temps afin d'évaluer cette thèse et d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Je remercie également Monsieur Mouad Alami d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse.

Je tiens à remercier également le Centre National de la Recherche Scientifique, la région du limousin et la ligue contre le cancer pour le soutien financier durant ma thèse.

Je voudrais exprimer ma gratitude envers Chantal-Vignoles, ma co-directrice de recherche pour son temps, sa contribution, sa patience et ses idées. Je suis ravie d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son appui scientifique, elle a toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse. C'est grâce à toi que j'ai appris comment être patiente et optimiste dans la vie.

Merci à tous les membres du deuxième, Nathalie, Ibtissam, Abdel, Cathy, Husnaa, Oussama, Stéphanie, Amandine, Magali Fradet, Aurore, Amanda, David, Nicolas et Magali pour votre bonne humeur et pour vos soutiens ainsi que toute l'équipe du troisième.

Enfin, ce travail de thèse ne voudrait rien dire sans remercier mes parents pour leur dévouement incommensurable, qui m'ont toujours soutenue et poussée à donner le meilleur de moi-même, malgré l'éloignement que cela a engendré, mes sœurs, mes frères que j'adore, mes amis, mes beaux-parents.

Merci à mes neveux et nièce Julia, Hadi et Karim, à travers vos yeux je vois la vie plus belle !!!!

Bien sûr, un grand merci à mon mari Alaa, pour son amour sans limite, qui a su être là à chaque instant, malgré la distance, pour me soutenir, me conseiller et me donner confiance en moi.





## ABBREVIATIONS

### A

**ADCC** : Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity  
**AIF**: Apoptosis Inducing Factor  
**AMD** : Age-related Macular Degeneration  
**AML**: Acute Myeloid Leukemia  
**AP-1** : Activator protein 1 Apoptosis signal-regulating  
**APC** : Antigen-presenting cell  
**APO1** : Apolipoprotein A1  
**AR**: Androgen receptor  
**ASK1** : Apoptose signal régulation kinase-1  
**ATF2/3** : Activating transcription factor 2/3

### B

**BAD** : Bcl-associated death  
**Bak** : Bcl-2 antagonist or killer  
**BARF0** : BamHI-A rightward frame 0  
**BARTs** : BamHI-A rightward transcripts  
**Bax** : Bcl-2- associated X protein  
**BBC3** : BCL2 Binding Component 3  
**Bcl2** : B-cell lymphoma 2  
**Bcl3** : B-Cell CLL/Lymphoma 3  
**BCR** : B Cell Receptor  
**Bcl-w** : B cell lymphoma-w  
**Bcl-xl** : B-cell lymphoma-extra large  
**BH3** : Bcl2 Homology domain 3  
**BID** : BH3 Interacting Domain Death Agonist  
**Bik** : BCL2-interacting killer  
**BIM** : Bcl-2 interacting mediator of cell death  
**BMF** : Bcl2 Modifying Factor  
**Bok** : BCL2-Related Ovarian Killer

### C

**CARD** : Caspase recrutement domain  
**CA-4P** : Phosphate dissodique combretastatine A-4  
**CBF1** : C-promoter Binding Factor1  
**CCC** : Covalently Closed Circule.

**CCR7** : Chemokine receptor type 7  
**CD28** : Cluster of differentiation 28  
**Cdc7** : Cell division cycle  
**CDC42** : Cell Division Cycle-42  
**CDK1** : Cyclin-dépendent kinase 1  
**C-FLIP** : Cellular FLICE-like inhibitory Protein  
**CHOP** : Cyclophosphamides, adriamycine, vincristine, prednisone  
**Ciaps** : Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein  
**CMH** : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
**COX-2** : Cyclo-oxygenase2  
**CPA** : Cellule presentatrice de l'antigene  
**CPT** : Amptothécine  
**CRE** : C-AMP Response Element  
**CREB** : C-AMP Response Element-binding protein  
**C-SMAC** : Central supramolecular cluster  
**CTAR** : C-terminal activation région  
**CTLA-4** : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

### D

**DC** : Dendritic cells  
**DD** : Death Domain  
**DED** : Death effector Domain  
**DBD** : DNA Binding Domain  
**DIABLO** : Diablo, IAP-binding mitochondrial protein  
**DISC** : Death Inducing Signaling Complex  
**DLBCL** : Diffuse Large B Cell Lymphoma  
**DLK1** : Dual Leucine-zipper-bearing Kinase 1  
**DP5** : Death protein 5  
**DR** : Death Receptor  
**DS** : Dyad symmetry  
**D-SMAC** : Distal supramolecular cluster

### E

**EBERs** : Epstein-Barr Encoded small RNAs  
**EBNA** : Epstein-Barr Nuclear Antigen  
**EBV** : Epstein-Barr virus  
**EDAR** : EctoDysplasin A1 Receptor  
**EGFR** : Epidermal growth factor receptor  
**Eif3m** : Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit M  
**ELK1** : ETS-like gene 1  
**ERK** : Extracellular signal-regulated kinases

### F

**FADD** : Fas Associated Death Domain  
**FasL** : Fas ligand  
**FDXR** : Ferredoxin reductase  
**FOXO3** : Forhead-box O3  
**FR** : Family of repeat  
**FRET** : Fluorescence Resonance Energy Transfer

### G

**GADD45 $\alpha$**  : Growth Arrest and Division Delay protein  
**GSH** : Glutathion  
**GSK3 $\beta$**  : Glycogen Synhtase Kinase 3  $\beta$   
**GTP** : Guanosine triphosphate

### H

**H2AX** : H2A Histone Family, Member X  
**HCV** : hepatitis C virus  
**HDAC1/2** : Histones Deacetylases 1 et 2  
**HL** : Hodgkin lymphoma  
**HRK** : Harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)  
**HSF-1** : Heat Shock Transcription Factor 1  
**HSP** : Heat Shock Protein  
**HSV** : *Herpes simplex virus*  
**HTLV** : Human T-cell Lymphotropic Virus

### I

**IAPs** : Inhibitor of Apoptosis Protein  
**ICAD** : Inhibitor of Caspase-Activated DNase

**ICAM-1** : Intercellular Adhesion Molecule-1  
**ICOS** : Inducible T-cell costimulator  
**ICOSL** : Inducible Costimulator Ligand  
**IFN $\alpha$**  : Interferon alpha  
**IFN $\gamma$**  : Interferon gamma  
**IL** : Interleukin  
**IPA ingenuity** : Interactive Pathway Analysis  
**IR1** : Internal repeat  
**IRF** : Encodes Interferon Regulatory Factor  
**IRF-1** : Interferon Response Factor 1  
**isoCA-4** : Isocombrestatine  
**isoFCA-4** : Isofluorocombrestatine  
**isoNH<sub>2</sub>CA-4** : Isoaminocombrestatine  
**ITAM** : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif  
**ITGalpha-6** : Intégrine alpha-6  
**ITSM** : Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motifs

## J

**JAK3** : Tyrosine-protein kinase  
**JIP** : JNK-interacting protein  
**JNK** : C-Jun N-terminal kinases  
**JSAP1** : (JNK)/stress-activated protein kinase-associated protein 1  
**Jun D** : Jun D Proto-Oncogene

## K

**KO** : Knock-out  
**KSHV** : *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*

## L

**LCLs** : Lymphoblastoid cell lines  
**LCMV** : Lymphocytic Choriomeningitis Virus  
**LFA-1** : Leucocyte Function-associated Antigen-1  
**LLC** : Leucémie lymphoïde chronique  
**LPS** : Lipopolysaccharides  
**LMP** : Latent Membrane Protein

## M

**MAPKs** : Mitogen-Activated Protein Kinases  
**Mcl-1** : Induced Myeloid leukemia cell differentiation protein  
**MEF** : Mouse Embryonic Fibroblast  
**MEKK** : Mitogen-activated protein kinase kinase  
**MLK3** : Mixed Lineage Kinase 3  
**MMP-9** : Métalloprotéinase matricielle 9  
**MPT** : Mitochondrial Pore Transition

## N

**NEDD4** : Neural Precursor Cell  
**NFAT4** : Nuclear Factor Of Activated T-Cells  
**NF-ATC1** : Nuclear Factor Of Activated T-Cells 1  
**NF- $\kappa$ B** : Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells  
**NK** : Natural Killer  
**NO** : Nitric Oxide  
**NOXA1** : NADPH Oxidase Activator 1  
**NPC** : Nasopharynx Carcinoma  
**NSCLC** : Non-Small Cell Lung Cancer

## O

**ORF** : Open Reading Frame  
**OripLyt** : Origine de replication de la phase lytique  
**Orip** : Origine de replication de la phase de latence

## P

**PARP** : Poly (ADP-ribose) polymerase  
**PCD** : Program Cell Death  
**PD1** : Programmed cell death protein 1  
**PD-L1** : Programmed cell death 1 ligand 1  
**PDK1** : Phosphoinositide-dependent kinase-1  
**PHAPI** : Putatif HLADR-Associated Protein I  
**PI3K** : Phosphatidylinositide 3-kinases  
**PIDD** : P53-Induced Death Domain Protein

**Pig** : P53 inducing genes  
**PIP2** : Phosphatidylinositol-4, 5-diphosphate  
**PIP3** : Pphosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate  
**PMP22** : Peripheral Myelin Protein 22  
**PKc** : Protein kinase  
**PKC $\delta$**  : Protein Kinase C de type  $\delta$   
**P-SMAC** : Peripheral-Supramolecular Cluster  
**PTPC** : Permeability Transition Pore Complex  
**PUMA** : P53 Upregulated Modulator of Apoptosis

## R

**RACK1** : Receptor for Activated C Kinase  
**RAR $\alpha$**  : Retinoic Acid Receptor alpha  
**RBP-Jk** : Recombination-Binding Protein JKappa  
**RE** : Reticulum Endoplasmique  
**RHD** : Rel Homology Domain  
**RIP** : Receptor-Interacting Protein  
**ROS** : Reactive Oxygen Species  
**RXR** : Retinoid X receptor

## S

**SAPK** : Stress-Activated Protein Kinase  
**Shp2** : Src homology 2-containing tyrosine phosphatase  
**SLP** : Syndrome Lymphoprolifératif de la Post-transplantation  
**STAT3** : Signal Transducer and Activator of Transcription 3  
**Syk** : Spleen Tyrosine Kinase

## T

**TAB1** : TAK1 binding protein  
**TAD** : Transactivation domain  
**TAK1** : TGF- $\beta$  Activated Kinase 1  
**TAO1** : TAO Kinase 1  
**TBid** : Truncated BH3 interacting-domain  
**TCR** : T Cell Receptor



**TEM** : Tetraspanin-Enriched  
Microdomains  
**TGY** : Thréonine-Glycine-Tyrosine  
**TIL** : Tumor-Infiltrating Lymphocytes  
**TGFβ** : Transforming growth factor beta  
**TMP** : Triméthoxyphényl  
**TNF** : Tumor Necrosis Factor  
**TR** : Terminal Repeat  
**TRADD** : TNF Receptor Associated Death  
**TRAF** : TNF Receptor Associated Factor  
**TRAIL** : Tumor necrosis factor Related  
Apoptosis Inducing Ligand  
**Tp73** : Tumor protein P73  
**TPL2** : Tumor Progression Locus 2

#### **U**

**UTR** : Untranslated region

#### **V**

**VDAC** : Voltage Dependent Anion Channel  
**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor  
**VP-16** : Etoposide  
**VZV** : *Varicella zoster virus*

#### **W**

**WOX1** : WW domain-containing oxidoreductase

#### **Z**

**ZAP70**: Zeta-chain-associated protein kinase 70



## Liste des figures

Figure 1 : structure du virion de l'EBV.....	17
Figure 2 : Représentation schématique du génome de l'EBV sous forme linéaire. ....	18
Figure 3 : Représentation schématique du génome de l'EBV sous forme épisomique.....	19
Figure 4 : Profil d'expression des gènes de latence de l'EBV en fonction de différentes phases de latence.....	20
Figure 5 : Structure de la protéine EBNA1. ....	25
Figure 6 : Structure de la protéine EBNA-2 de l'EBV.....	25
Figure 7 : Structure de la protéine transmembranaire LMP1. ....	30
Figure 8 : Activation de la voie NFκB canonique et non canonique par la protéine de latence LMP1. ....	33
Figure 9 : Schéma représentatif de la voie PI3Kinase-AKT. ....	34
Figure 10 : Cascade d'activation des voies des MAPKineses.....	36
Figure 11 : Implication de la protéine LMP1 dans l'induction de la voie des JNK et P38 MAPkinase. ....	42
Figure 12 : Activation de STAT1 par la protéine de latence LMP1.....	44
Figure 13 : Différentes voies de signalisation induite par LMP1.....	44
Figure 14 : Principales voies de signalisation induite par la protéine de latence LMP2a. ....	46
Figure 15 : Les différentes étapes de l'infection primaire par l'EBV. ....	48
Figure 16 : Réactivation et infection latente par l'EBV. ....	48
Figure 17 : Réponse des cellules TCD8 <sup>+</sup> et TCD4 <sup>+</sup> au cours de l'infection par l'EBV.....	49
Figure 18 : Acteurs de l'immunité innée et adaptative.....	56
Figure 19 : Processus de transformation des cellules T naïves en cellules T activées ..... 57	57
Figure 20 : Mécanismes d'interaction entre une cellule T CD8 <sup>+</sup> cytotoxique et sa cellule cible. ....	58
Figure 21 : Structure de la synapse immunologique.....	59
Figure 22 : Synapse immunologique.....	60
Figure 23 : Structure de la famille de B7 et de leurs récepteurs d'interaction.....	62
Figure 24 : Arbre phylogénétique des molécules de la famille B7.....	63
Figure 25 : Représentation schématique de la structure du gène codant B7-H1 et de la protéine B7-H1. ....	67
Figure 26 : Structure du récepteur PD-1 avec les motifs ITIM et ITSM.....	69
Figure 27 : Voie de signalisation du récepteur PD-1 activé par B7-H1 (PD-L1) ou B7-DC (PD-L2)..	70
Figure 28 : Différenciation de lymphocytes T lors du développement de la tolérance centrale. ....	72
Figure 29 : Différenciation des lymphocytes en type Th1 ou Th2. ....	76
Figure 30 : Signalisation d'IFN γ et expression de B7-H1.....	77
Figure 31 : Voie apoptotique caspase-indépendante. ....	84
Figure 32 : Récepteurs de mort. ....	86
Figure 33 : Structure des molécules de la famille Bcl2.....	88
Figure 34 : Assemblage des dimères de Bak au sein de la membrane externe mitochondriale. ....	90
Figure 35 : Formation des pores lipidiques dans la membrane mitochondriale par association de Bax et bak. ....	91
Figure 36 : Formation d'apoptosome. ....	93
Figure 37 : Structure générale des caspases. ....	95
Figure 38 : Principe de l'activation des caspases initiatrices et effectrices. ....	96
Figure 39 : Implication de la protéine p53 dans l'apoptose ..... 100	100

Figure 40 : Différents mécanismes induits par JNK kinase dans l'induction de l'apoptose (intrinsèque). .....	104
Figure 41 : Les mécanismes impliqués dans l'apoptose induite par p38 $\alpha$ . ....	107
Figure 42 : Schéma représentatif de la polymérisation des microtubules de la tubuline. ....	146
Figure 43 : Structure chimique des agents stabilisants. ....	147
Figure 44 : Position relative des agents stabilisants et destabilisants sur un hétérodimère de tubuline. .....	147
Figure 45 : Structure chimique des combretastatines, Isocombretastatines et de leurs isomères. ....	150
Figure 46 : Isomérisation de la Z-CA4 en E-CA4 par l'action de la température et de la lumière. ...	151

### **Liste des tableaux**

Tableau 1 : Répartition géographique des types EBV 1 et EBV2 pour diverses pathologies et chez des individus sains. ....	16
Tableau 2 : Lymphomes associés à l'EB chez les sujets immuno-déprimés. ....	52
Tableau 3 : Les différents membres de la famille B7. ....	61
Tableau 4 : Expression de B7-H1, B7-H3 et B7-H4 dans différents types de cancer et conséquences cliniques. ....	75
Tableau 5 : Les trois groupes des caspases initiatrices, effectrices et inflammatoires. ....	94
Tableau 6 : Principaux agents stabilisants de la tubuline, utilisation thérapeutique et développement clinique. ....	146
Tableau 7 : Principaux inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline, utilisation thérapeutique et développement clinique. ....	148

# Sommaire

AVANT-PROPOS .....	7
CHAPITRE1 : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	13
I.Le virus d'Epstein Barr (EBV).....	15
I.1 Les Herpesvirus .....	15
I.2 Epidémiologie .....	15
I.3 Structure de virion.....	17
I.4 Structure du génome .....	18
I.5 Types de latence.....	19
I.5.1 Latence 0 .....	20
I.5.2 Latence I.....	20
I.5.3 Latence II.....	21
I.5.4 Latence III .....	21
I.5.5 Latence atypique .....	21
I.6 Les ARNs viraux de latence.....	21
I.6.1 Les EBERs .....	21
I.6.2 Les BARTs.....	22
I.7 Les protéines virales de latence .....	23
I.7.1 Protéines nucléaires.....	23
I.7.1.1 EBNA1 .....	23
I.7.1.2 EBNA2 .....	25
I.7.1.3 EBNA3A, 3B et 3C .....	27
I.7.1.4 EBNA-LP .....	28
I.7.2 Les protéines membranaires.....	29
I.7.2.1 LMP1 .....	29
I.7.2.1.1 Voie de signalisation induite par LMP1 .....	32
I.7.2.1.1.1 La voie NF- $\kappa$ B.....	32
I.7.2.1.1.2 La voie Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K-Akt).....	33
I.7.2.1.1.3 La voie des MAP kinases .....	35
I.7.2.1.1.3.1 Les MAP kinases JNK.....	36
I.7.2.1.1.3.2 Les MAP kinases P38.....	37
I.7.2.1.1.3.3 MAP kinases JNK/p38 et EBV .....	40
I.7.2.1.1.4 Autres voies induite par LMP1, les voies STATs.....	42

I.7.2.2 LMP2A et LMP2B .....	45
I.8 Réponse immunitaire anti-EBV .....	47
I.8.1 L'infection par l'EBV in vivo : infection primaire et infection latente .....	47
I.8.2 Immunité à médiation cellulaire.....	49
I.9 EBV et lymphomes B associés .....	51
I.9.1 EBV et lymphomes des immunodéprimés .....	51
I.10.2 EBV et lymphomes de Burkitt.....	53
I.10.3 EBV et lymphome de Hodgkin .....	54
I.10.4 EBV et DLBCL.....	54
II Molécule de la famille B7 associée aux cancers : B7-H1.....	56
II.1 Immunité innée, immunité adaptative .....	56
II.2 Synapse immunologique.....	58
II.3 Les membres de la famille B7 .....	60
II.3.1 Groupe I : B7-1/CD80, B7-2/CD86 et B7-H2/CD275 .....	63
II.3.2 Groupe II : B7-H1 (PD-L1/CD274) et B7-DC (PDL2/CD273) .....	64
II.3.3 Groupe III : B7-H3/CD276, B7-H4/VTCN1 et B7-H7/HLA2.....	65
II.4 La molécule B7-H1 .....	66
II.4.1 B7-H1.....	66
II.4.2 PD-1/CD279, récepteur de B7-H1 .....	68
II.4.3 Fonctions physiologiques et pathologiques des interactions PD-1/B7-H1.....	71
II.4.3.1 Fonction physiologique .....	71
II.4.3.2 Fonctions pathologiques.....	73
II.4.4 B7-H1 et cancer .....	74
II.4.4.1 Expression de B7-H1 par les cellules tumorales.....	74
II.4.4.2 B7-H1 et micro-environnement tumoral .....	77
II.4.4.3 Relevance de l'expression de B7-H1 dans les tumeurs.....	78
II.4.5 PD-1 et B7-H1, des molécules cibles de la thérapie anticancéreuse .....	80
III Apoptose et voies des MAP Kinase .....	83
III.1 Généralités.....	83
III.2 Apoptose indépendante des caspases .....	84
III.3.1 Apoptose extrinsèque .....	85
III.3.2 Apoptose intrinsèque mitochondriale.....	86
III.3.2.1 Les protéines de la famille Bcl2.....	87

III.3.2.2 Bax, Bak et perméabilisation mitochondriale .....	89
III.3.2.3 Apoptosome et activation de la procaspase 9 .....	91
III.3.2.4 Contribution du RE à l'apoptose intrinsèque .....	93
III.4 Les caspases, effectrices majeurs de l'apoptose.....	94
III.5 Apoptose et facteur de transcription P53 .....	96
III.5.1 Apoptose P53 dépendante .....	96
III.5.2 Mutation P53 et apoptose .....	98
III.6 JNK, p38 et apoptose .....	100
III.6.1 JNK et apoptose.....	100
III.6.1.2 JNK : acteur principal de l'apoptose intrinsèque.....	102
III.6.2 P38 et apoptose.....	104
CHAPITRE 2 : OBJECTIFS .....	109
CHAPITRE 3 : RESULTATS, CONCLUSIONS DISCUSSIONS & PERSPECTIVES .....	113
Publication 1 .....	115
I.1 Introduction.....	117
I.2 Article .....	119
I.3 Conclusion et discussion.....	132
I.4 Perspectives.....	137
Publication 2.....	143
II.1 Introduction .....	145
II.2 Article 2 .....	153
II.3 Conclusion et discussion .....	188
II.4 Perspectives .....	192
CHAPITRE 4 : CONCLUSION GENERALE .....	195
I.1 Conclusion générale et faits marquants .....	197
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	200





# **AVANT-PROPOS**



L'être humain est constitué d'environ 60 milliards de cellules. Ces dernières proviennent d'une cellule œuf unique, qui subit des divisions successives par un processus de multiplication pour aboutir à un nombre élevé des cellules possédant la même information génétique.

La division et la prolifération cellulaires sont des processus fondamentaux pour les organismes vivants. Chez les mammifères, la prolifération cellulaire, les facteurs de croissance et les cytokines qui régulent la prolifération sont essentiels durant le développement embryonnaire, la croissance des tissus et des organes, ainsi que pour plusieurs processus physiologiques chez l'adulte comme l'hématopoïèse, la cicatrisation des plaies, la grossesse...

Les cellules différenciées de nombreux tissus de mammifères adultes existent dans un état viable, mais non prolifératif. Cependant, beaucoup d'entre elles conservent leur capacité à proliférer et à le faire si nécessaire pour la réparation de tissus endommagés. Lorsqu'elles sont stimulées par des facteurs de croissance, elles peuvent relancer leur synthèse d'ADN et la division cellulaire. La multiplication hyperplasique et néoplasique anormale des cellules adultes non prolifératives, joue un rôle central dans la tumorigénèse et dans d'autres processus pathologiques. Par conséquent, les techniques d'évaluation précises, fiables et rapides de la prolifération cellulaire sont parmi les plus répandus et sont importantes dans la recherche biologique fondamentale et clinique.

L'équilibre entre la survie cellulaire et la mort cellulaire programmée ou apoptose est aussi important que la prolifération cellulaire dans la détermination du nombre de cellules. Il est donc important de faire la distinction entre les changements dans le nombre de cellules résultants de la prolifération et ceux dus à l'augmentation de la survie ou de l'apoptose

Les processus de régulation de la survie cellulaire et de l'apoptose sont de nature très complexe. Ils impliquent de nombreux acteurs et de nombreuses voies de signalisation. De plus, la survie cellulaire et l'apoptose comportent des différences mécanistiques supplémentaires qui sont en fonction des tissus et des types cellulaires spécifiquement concernés.

La mort cellulaire programmée est un système très efficace et très sophistiqué. Il s'agit d'un mécanisme nécessaire, complémentaire de la prolifération, permettant d'assurer l'homéostasie de tous les tissus. Dans le système nerveux des vertébrés en développement, par exemple, jusqu'à la moitié ou plus des cellules nerveuses meurent normalement peu de temps après leur formation. Chez l'adulte, Il a été estimé que 50 à 70 milliards de cellules périssent et se

suicident chaque jour par mort cellulaire programmée. Dans une année, chaque individu produit et élimine un ensemble de cellules égal au poids de son corps.

Suite à des stimulations par des cytokines pro-inflammatoires, ainsi que par diverses agressions causées par les toxines, les radiations ou les agents susceptibles d'endommager l'ADN, l'apoptose se met en route. Plusieurs acteurs, en particulier les caspases et la mitochondrie, interviennent pour finaliser ce processus. Après le déclenchement de l'apoptose, la cellule subit des changements morphologiques tels que le bourgeonnement membranaire, la condensation nucléaire, la dégradation de l'ADN et de ses organites. Cela aboutit à la formation de corps apoptotiques qui sont éliminés par phagocytose.

L'apoptose est un processus actif et physiologique. Il est mis en place pour éliminer les cellules en excès, endommagées ou infectées, et qui sont potentiellement dangereuses pour l'organisme. Ce processus doit être fortement régulé et protégé car des défauts dans le mécanisme apoptotique qui mènent à la survie cellulaire prolongée peuvent contribuer à l'expansion de cellules néoplasiques. La survie cellulaire prolongée crée également un environnement permissif pour l'instabilité génétique et l'accumulation de mutations. Des défauts dans les voies apoptotiques confèrent de plus une résistance à la chimiothérapie, et à la radiothérapie.

A l'opposé, la survie cellulaire est un processus qui est impliqué dans la survie des cellules normales, mais également tumorales. Les stratégies de survie cellulaire impliquent une myriade de changements physiologiques et génétiques coordonnés et systématiques qui servent à s'opposer à la mort. Elle permet l'inhibition de l'apoptose active, suite à l'inhibition de l'expression de facteurs pro-apoptotiques et par l'expression de facteurs anti-apoptotiques.

L'apoptose, la survie et la prolifération cellulaires sont régulées par des voies de signalisation parallèles et parfois chevauchantes qui nécessitent une harmonie et une compatibilité mutuelle afin d'éviter le déséquilibre dans la balance de ces voies opposées pouvant être à l'origine de différentes pathologies tel que le cancer, qui peut être appelé la maladie du XXI<sup>ème</sup> siècle.

Il est important de préciser que l'homéostasie cellulaire est également régulée par d'autres processus comme l'autophagie et la sénescence. L'autophagie est un processus de dégradation et de recyclage intracellulaire de protéines et/ou d'organites altérés ou surnuméraires. Elle peut être augmentée dans les cellules soumises à un stress métabolique ou oxydatif afin d'assurer leur survie. Cependant, cette voie d'adaptation et de survie peut également conduire à la mort, lorsque le stress est important. La sénescence cellulaire fait appel au nombre limité de doublings que peut réaliser une cellule. La principale conséquence moléculaire est un blocage du cycle cellulaire entre les phases G1 et S. On distingue la sénescence répllicative et

la sénescence prématurée induite par des stress de nature génétiques (activation d'oncogène), métaboliques (stress oxydant) ou environnementaux (drogues cytotoxiques).

Dans mon travail de thèse je me suis intéressée au virus de l'EBV et à son ambivalence dans les processus de la réponse à la mort cellulaire programmée des lymphocytes B qu'il immortalise. Ce virus infecte environ 95% de la population adulte au niveau mondiale, ce qui nécessite la mise en place d'un équilibre hôte/virus, permettant l'élimination des cellules immortalisées par apoptose. Il est de plus associé à différents cancers dont certains types de lymphomes, ce qui montre également la possibilité des cellules infectées à échapper à la surveillance du système immunitaire et à proliférer. L'EBV intervient en détournant de nombreuses voies de signalisation cellulaires qui lui permettent à la fois de générer des signaux de type apoptotique, de survie et de prolifération, pouvant jouer un rôle dans l'immuno-modulation de la réponse anti-EBV. Par ailleurs, la modification des voies de signalisation intracellulaires peuvent également conduire le virus à jouer un rôle de pharmacorégulateur lors du traitement de cancers associés au virus.

Après une introduction bibliographique portant sur le virus de l'EBV, la molécule B7-H1 et les processus d'apoptose, nous présenterons nos résultats sous formes de deux publications relatives au rôle immunomodulateur et au rôle pharmaco-modulateur de l'EBV



**CHAPITRE1 : INTRODUCTION**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**





# **I. Le virus d'Epstein Barr (EBV)**

## **I.1 Les Herpesvirus**

Le virus d'Epstein Barr (également appelé EBV, Human Herpesvirus type 4 ou HHV-4) a été découvert en 1964 par MA Epstein, BG Achong et YM Barr, suite à l'établissement de lignées cellulaires dérivant de tumeurs de Burkitt (identifiées par DP Burkitt en 1958) et détection par microscopie électronique de particules virales morphologiquement apparentées aux herpesvirus.

Les Herpesvirus ou herpesviridae humains comportent 8 membres, classés en 3 sous familles, qui dépendent de l'organisation de leur génome, de leurs caractéristiques de croissance et de leur tropisme cellulaire. La sous-famille des *Alpha-Herpesvirinae* comprend HHV-1 (HSV1, *Herpes simplex virus 1*), HHV2 (HSV2, *Herpes simplex virus 2*) et HHV-3 (VZV, *Varicella zoster virus*). La sous-famille des *Beta-Herpesvirinae* comprend HHV-5 (CMV, *Cytomegalovirus*), HHV-6 (*Roseolovirus*) et HHV-7 (proche de HHV-6). Enfin, la sous-famille des *Gamma-Herpesvirinae* est constituée de HHV4 (EBV) et HHV-8 (KSHV, *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*) (Crough and Khanna, 2009). HHV8 a été découvert le plus récemment, en 1994.

## **I.2 Epidémiologie**

L'EBV est un virus phylogénétiquement ancien (dont l'origine remonte à plus de 100 millions d'années) (McGeoch et al., 2005) qui infecte près de 95% de la population mondiale. L'infection primaire intervient classiquement durant l'enfance et est généralement asymptomatique, même si dans certains cas des symptômes cliniques apparaissent avec une lymphoprolifération bénigne (mononucléose infectieuse). L'EBV est détecté dans tous les types de populations et dans toutes les régions du monde (Hjalgrim et al., 2007). Il existe cependant une variation géographique en ce qui concerne les géotypes EBV1 (ou A) et EBV2 (ou B). Ces derniers diffèrent dans l'organisation des gènes codants pour certaines protéines de latence virales (EBNA-2, -3A, -3B et -3C). L'EBV1 est le plus répandu et l'EBV2 est plus fréquent en Afrique centrale, en Papouasie-Nouvelle-Guinée et en Alaska (tableau 1) (Zimmer et al., 1986; Gratama and Ernberg, 1995). Il semble n'y avoir aucune relation entre un type donné d'EBV et les maladies spécifiques associées au virus.

Pays	Patients	N	Type 1 ou A (%)	Type 2 ou B (%)	2 types (%)
<a href="#">China (Hu et al., 1991)</a>	carcinome du nasopharynx	37	86	14	0
<a href="#">Taiwan (Shu et al., 1992)</a>	carcinome du nasopharynx	53	94	4	2
<a href="#">Korea (Kim et al., 2002)</a>	sains	26	81	15	4
<a href="#">Japan (Kunimoto et al., 1992)</a>	sains	21	95	5	0
<a href="#">USA (Frank et al., 1995)</a>	Post-transplant lymphoproliferative disease	24	100	0	0
<a href="#">USA (Goldschmidts et al., 1992)</a>	HIV-positive	22	55	45	0
<a href="#">Alaska (Abdel-Hamid et al., 1992)</a>	carcinome du nasopharynx	3	0	100	0
<a href="#">Argentina (Correa et al., 2004)</a>	sains	183	78	15	7
<a href="#">Brasil (Klumb et al., 2004)</a>	lymphome de Burkitt	21	86	14	0
<a href="#">Central Africa (Goldschmidts et al., 1992)</a>	lymphome de Burkitt	16	50	50	0
<a href="#">Papua New Guinée (Aitken et al., 1994)</a>	lymphome de Burkitt	56	42	53	5
<a href="#">Western Europe (Sandvej et al., 1994)</a>	Lymphome de Hodgkin	55	93	5	1
<a href="#">Australia (Kyaw et al., 1992)</a>	HIV-positive	56	27	30	43
<a href="#">Australia (Kyaw et al., 1992)</a>	transplantation cardiaque	18	39	33	28

**Tableau 1** : Répartition géographique des types EBV 1 et EBV2 pour diverses pathologies et chez des individus sains.  
D'après (Hjalgrim et al., 2007).

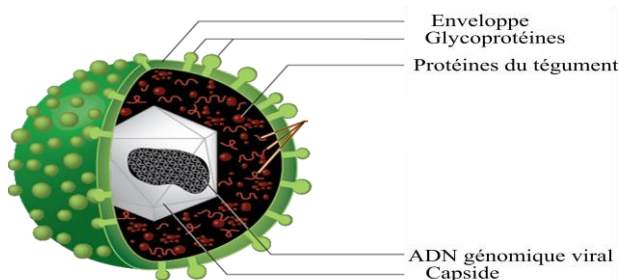
Dans les pays développés, l'infection touche en particulier les enfants entre 1 et 6 ans, ainsi que les adolescents et les jeunes adultes âgés de 14 à 20 ans (80 à 90% de la population adulte est infectée). Dans les pays en cours de développement, l'infection a lieu plus précocement : 90% des enfants de plus de 2 ans sont séropositifs.

Il n'existe pas de différence liée au sexe ( Sumaya et al., 1975; Lang et al., 1977). Par contre, les facteurs socio-économiques jouent un rôle important. Un niveau économique bas et de mauvaises conditions de vie sont associés à une infection précoce. Une étude menée par Henle en 1969 (Henle et al., 1969) a montré une séroprévalence de 60% chez des écoliers américains âgés de 5 à 10 ans et de statut socio-économique bas, alors qu'elle est seulement de 20% chez ceux ayant un niveau socio-économique élevé. Des études ultérieures menées au Ghana (Biggar et al., 1978), au Danemark (Hesse et al., 1983), et en Thaïlande (Mekmullica et al., 2003) vont dans ce même sens. Une transmission transplacentaire ou par le lait maternel a été rapportée dans de rares cas, mais n'est pas considérée comme significative (Meyohas et al., 1996). La transmission du virus a généralement lieu par l'intermédiaire des sécrétions oropharyngées (jouets et doigts chez les jeunes enfants, baiser intime chez les adolescents et les adultes). L'EBV peut également être transmis par transfusion sanguine ou lors de la transplantation d'organes (Alfieri et al., 1996; Scheenstra et al., 2004). Dans ce dernier cas, il

s'agit d'un facteur de risque majeur du syndrome lymphoprolifératif de la post-transplantation (SLP) (Aguilar et al., 1999; Scheenstra et al., 2004).

### I.3 Structure de virion

L'EBV possède une structure commune aux différents membres de la famille des herpesvirus : un nucléoïde ou core (long brin d'ADN double brin linéaire pouvant aller de 125 Kpb pour HHV-3 à 229 Kpb pour HHV-5), une capsid, un tégument et une enveloppe. Concernant l'EBV ( Figure1), le nucléoïde est composé d'un ADN génomique linéaire double brin de 172 Kpb codant pour 100 gènes environ. Cet ADN est entouré d'une capsid icosaédrique (20 faces et 12 sommets) de 110 à 120 nm de diamètre, formée de 162 capsomères (150 hexamères et 12 pentamères). Chaque capsomère a une dimension d'environ 9,5 x 12,5 nm. La capsid se présente sous forme d'une membrane asymétrique. Le tégument est situé entre la capsid et l'enveloppe extérieure, il est composé de protéines virales et cellulaires. La structure la plus externe est l'enveloppe. Elle est constituée d'un double feuillet lipidique provenant des membranes nucléaire et plasmique de la cellule hôte. Elle comprend également les glycoprotéines virales gp350 et gp220, qui permettent au virus de se fixer sur la cellule hôte lors de l'infection, en interagissant avec le CR2/CD21 (récepteur d'un composant du complément)(Fingerroth et al., 1984; Szakonyi et al., 2006). D'autres glycoprotéines virales sont également présentes au niveau de l'enveloppe, mais de manière moins importante: gp42, gp38, gp85 (gH, glycoprotein heavy) et gp25 (gL, glycoprotein light). Leur rôle principal est de se fixer aux molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe II, et de se comporter comme des co-récepteurs, conduisant à l'internalisation du virus (Molesworth et al., 2000; Mullen et al., 2002).

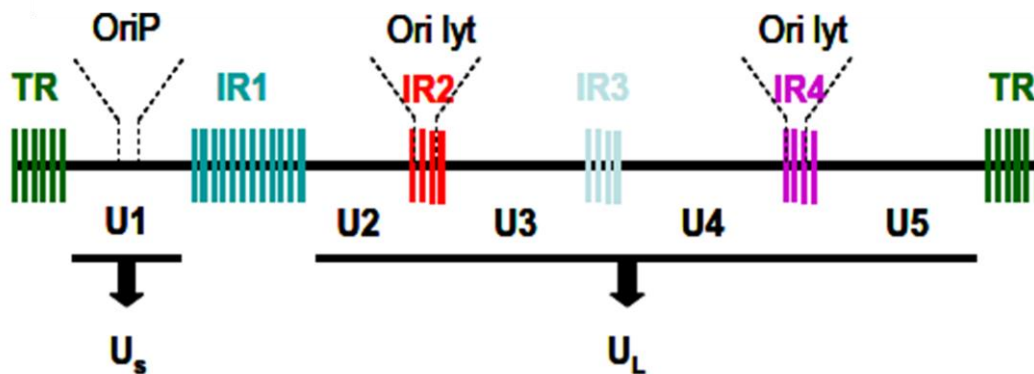


**Figure 1** : structure du virion de l'EBV.

D'après: <http://www.helmholtz-muenchen.de/en/agv/research/research-groups/prevention-and-immunomodulation/projects/index.html>

## I.4 Structure du génome

L'ADN génomique de l'EBV est constitué d'un double brin d'ADN linéaire de 172 Kpb, composé à 60% de guanine et de cytosine (Dambaugh et al., 1980). Il comprend des séquences terminales répétées (TR) de 500 pb, ainsi que des séquences internes répétées (IR1 à IR4, Internal Repeat). Une importante zone de répétition interne, IR1 (3 Kpb), divise le génome en une séquence unique courte (Short Unique region ou  $U_S$  de 15 Kpb) comprenant la région U1 et une séquence unique longue (Long Unique region ou  $U_L$  de 150 Kpb) comprenant les régions U2 à U5. Il existe des origines de réplication distinctes : OriP (fonctionnelle durant la phase latente) et deux origines OriLyt (fonctionnelle durant la phase lytique) (Figure 2)



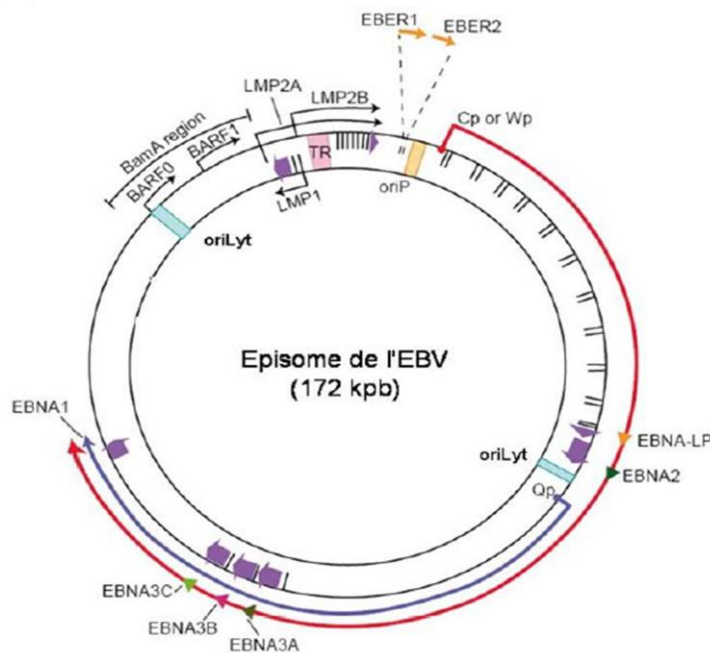
**Figure 2** : Représentation schématique du génome de l'EBV sous forme linéaire.

TR : terminal repeat, IR : internal repeat, U : unique region, OriP : origine de réplication latente, OriLyt : origine de réplication lytique.

L'EBV est le premier Herpesvirus dont le génome a totalement été cloné chez *Escherichia coli* (Dambaugh et al., 1980) et le premier virus dont le génome a été séquencé en totalité. Le séquençage a permis d'identifier plus de 108 cadres ouverts de lecture (ORF, Open Reading Frame). Le génome de l'EBV ayant été séquencé à partir d'ADN digéré par l'enzyme de restriction BamHI, les ORFs, les gènes, les sites de régulation et les sites de transcription font toujours référence à des fragments d'ADN digérés par cette enzyme (préfixe BamH1), correspondant à des régions nommées A à Z.

Lors de l'infection de la cellule hôte par l'EBV, le génome du virus se circularise grâce aux séquences terminales TR. L'ADN viral forme alors le CCC (covalently Closed Circle) ou épisode qui peut se lier fortement à la chromatine de la cellule hôte, sans s'intégrer au génome cellulaire.

Le virus peut ensuite persister sous forme épisomique dans la cellule hôte de façon stable (phase de latence), ou entrer en phase lytique lors de réactivations périodiques (avec production de particules virales). On retrouve les origines de replication Orip et Orip Lyt. Il existe également trois promoteurs particulièrement décrits : Cp, Wp et Qp, situés dans les fragments BamHI C, W et Q. Dans la suite de notre travail, nous nous limiterons à décrire l'état de latence ainsi que les gènes exprimés dans chaque type de latence (Figure3)

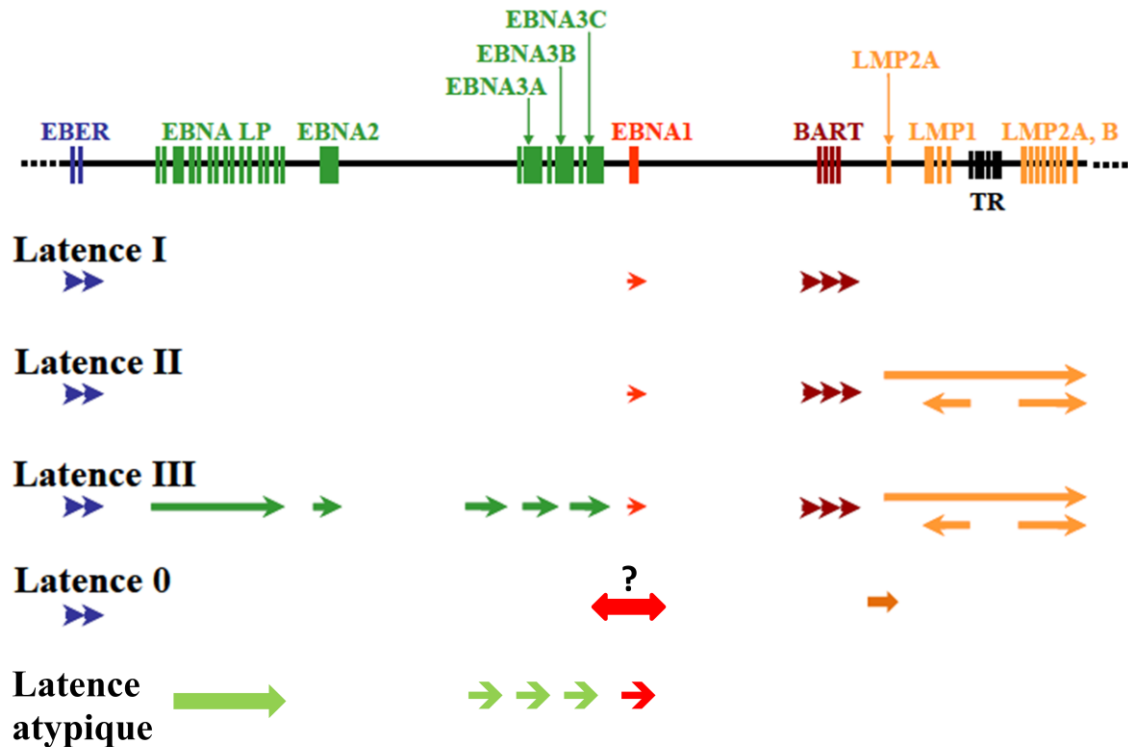


**Figure 3** : Représentation schématique du génome de l'EBV sous forme épisomique.

Les flèches violettes correspondent aux régions codantes des protéines de latence EBNA: (Epstein-Barr nuclear antigen, EBNA-LP, -1, -2, -3A, -3B et -3C) et les flèches oranges représentent les ARNs transcrits non-traduits (EBER-1 et EBER-2). LMP1, LMP2a et LMP2b sont les protéines membranaires de latence. BARF0: BamHI-A rightward frame 0 et BARF1: BamHI-A rightward frame 1. Cp, Wp et Qp sont les promoteurs du génome. OriP : origine de replication latent , oriLyt : origine de replication lytique. TR: terminal repeat. Modifié d'après (Murray and Young, 2001)

## I.5 Types de latence

Selon le type cellulaire infecté et les conditions physiologiques, l'EBV ne présente pas le même profil d'expression des gènes de latence. 5 types de latences ont été décrites (0, I, II et III, et la latence atypique) (Figure 4). Ces dernières diffèrent par la transcription ou non de certains gènes viraux appelés gènes de latence et comprenant : les ARN EBERs (Epstein-Barr Encoded small RNAs), les BARTs (BamH1-A rightward transcripts), les protéines EBNA (Epstein-Barr Nuclear Antigen, EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, LP) et les protéines LMP (Latent Membrane Protein, LMP1, 2A, 2B).



**Figure 4** : Profil d'expression des gènes de latence de l'EBV en fonction de différentes phases de latence. EBER: Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA. EBNA-LP, -1, -2, -3A, -3B et -3C: Epstein-Barr Nuclear Antigen. LMP1/2A/2B: Latent Membrane Protein. BART: micro ARN. TR: Terminal Repeat. Modifié d'après (Young et al., 2000)

### I.5.1 Latence 0

Ce type de latence, quasi silencieux, est retrouvé chez les lymphocytes B mémoires circulants, et est caractérisé par une expression transcriptionnelle de LMP2A, et des ARNs EBERs (Küppers, 2003). L'expression de la protéine nucléaire EBNA1 est controversée.

### I.5.2 Latence I

Ce type de latence est retrouvé dans les lymphomes de Burkitt. L'expression des EBERs, des BARTs est d'EBNA1 au lieu *via* le promoteur Qp. Les promoteurs Cp et Wp sont réprimés et les autres protéines ne sont pas exprimées. *In vitro*, les cellules de lymphome de Burkitt sont instables en latence I, elles changent de profil d'expression de gènes de latence et de phénotype, aboutissant à une latence de type III.

### **I.5.3 Latence II**

La latence II est observée dans le carcinome du rhinopharynx, le lymphome de Hodgkin et dans certains lymphomes T et NK. Ce type de latence est caractérisé par l'expression des EBERs et des BARTs, une répression des promoteurs Cp et Wp (absence d'expression de EBNA2, 3A, 3B, 3C et LP) et une activation du promoteur Qp (expression d'EBNA1) et des promoteurs des LMP (expression de LMP1, 2A et 2B).

### **I.5.4 Latence III**

Ce type de latence est caractéristique des lymphocytes B infectés et immortalisés *in vitro* (Lymphoblastoid cell lines ou LCLs), ainsi que lors des lymphoproliférations chez les sujets immunodéprimés. Dans ce type de latence, il y a expression des EBERs, des BARTs et de l'ensemble des protéines de latence (EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, LP et LMP1, 2A, 2B).

En fonction du type de latence, les gènes de latence conduisent à l'expression d'ARN viraux (EBERs et BARTs) ainsi que de protéines nucléaires (EBNAs) et membranaires (LMPs). Nous allons décrire par la suite plus en détail leur structure, leur régulation et leur fonction.

### **I.5.5 Latence atypique**

Ce type de latence est décrit, notamment dans des cas de lymphomes de Burkitt endémiques associés à l'EBV. Dans ce type de latence, les protéines EBNA-1, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C et une forme tronquée d'EBNA-LP sont exprimées. Par contre les protéines LMPs ne sont pas exprimées. Il est de même pour la protéine EBNA-2, suite à la délétion du gène correspondant (Kelly et al., 2002). Dans le cas des latences atypiques le promoteur Wp des EBNAs est dominant par rapport au promoteur cp (Hutchings et al., 2006).

## **I.6 Les ARNs viraux de latence**

### **I.6.1 Les EBERs**

La famille des EBERs (Epstein-Barr virus–encoded small RNA) comporte EBER1 (167 nucléotides) et EBER2 (172 nucléotides). Il s'agit de petits ARN non polyadénylés et ce sont les transcrits les plus abondants dans les cellules infectées par l'EBV. Les EBERs sont transcrits par l'ARN polymérase III (Rosa et al., 1981) et leur expression est plus importante durant la phase de latence que pendant la phase lytique (Greifenegger et al., 1998).

Les EBERs sont retrouvés au niveau du noyau et du cytoplasme. Au niveau nucléaire, ils s'associent avec des protéines pour former le complexe ribonucléoprotéique. Au niveau cytoplasmique, ils sont situés dans la région du réticulum endoplasmique rugueux et de l'appareil de golgi (Schwemmle et al., 1992).

Les EBERs induisent l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2, ainsi que celle de l'interleukine 10 (IL10), qui contribue à la malignité et à la maintenance de la croissance des lymphomes de Burkitt. Les EBERs agissent également comme des inhibiteurs de l'activité antivirale des interférons (IFN $\alpha$  et IFN $\gamma$ ). Ils induisent de plus une résistance aux agents chimiothérapeutiques et favorisent la migration des cellules cancéreuses. En favorisant la surexpression d'IL6, qui conduit à l'activation de STAT3, ils diminuent significativement l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire, tels que p21 et p27, conduisant les cellules à la prolifération (Banerjee et al., 2013).

### **I.6.2 Les BARTs**

Les ARN BARTs (Epstein-Barr virus (EBV) BamHI-A rightward transcripts, également connus sous le nom de BARF0 (BamHI-A rightward frame 0) ont été identifiés pour la première fois lors de l'analyse d'une banque d'ADNc établie à partir des lignées C15 de carcinome du rhinopharynx (NPC, nasopharynx carcinome) (Gilligan et al., 1990).

Les ARN BARTs constituent un groupe hétérogène d'épissage des ARN de l'EBV. Sur la carte génétique de la souche B95.8 de l'EBV, ces ARN correspondent à des transcrits situés entre les positions 138 352 et 160 531 (Sadler and Raab-Traub, 1995). Les BARTs ont été détectés dans le sang périphérique d'individus sains positifs pour l'EBV (Chen et al., 1999), ainsi que chez les patients atteints de maladies associées au virus. Cela concerne notamment le lymphome de Burkitt (Tao et al., 1998), le carcinome gastrique (Sugiura et al., 1996), le carcinome des glandes salivaires (Raab-Traub et al., 1991), la leucoplasie chevelue orale (Webster-Cyriaque and Raab-Traub, 1998), le lymphome NK nasal (Chiang et al., 1996), le lymphome de Hodgkin (Deacon et al., 1993) et le carcinome hépatocellulaire (Sugawara et al., 1999).

Plusieurs cadres de lecture ouverts (ORF) ont été identifiés dans la région BART, dont RPMS1 et A73. Ces séquences ont pu être traduites *in vitro* à partir de cellules de NPC (Smith et al., 2000). L'expression de ces protéines semble pertinente en ce qui concerne le rôle du virus dans les processus tumoraux (Smith et al., 2000). RPMS1 est un antagoniste de l'activité transcriptionnelle induite par Notch 1 ou par EBNA2, par compétition de fixation avec la protéine RBP-Jk (Smith et al., 2000). Quant à A73, elle se lie à la protéine RACK1 (Smith et



al., 2000), connue pour intervenir dans la signalisation des kinases de la famille des Src. Elle permet également de réguler la libération de calcium à partir des réserves intracellulaires (Patterson et al., 2004). Toutefois, les protéines RPMS1 et A73 n'ont pu être identifiées *in vivo*.

Dans les NPC, le génome de l'EBV est fortement méthylée. Cependant, une région non méthylée d'environ 1 kb (position 138 200 à 139 200) a été identifiée au niveau du promoteur BART. Ceci suggère qu'elle est protégée de la méthylation, et permet à des facteurs importants de jouer leur rôle dans l'activité du promoteur.

Par ailleurs, la plupart des micro-ARN viraux (mi-ARN) exprimés dans les infections latentes liées à l'EBV sont dérivés des ARN BARTs (Pfeffer et al., 2004; X. Cai et al., 2006). Les mi-ARN BART sont considérés comme provenant principalement d'introns, avant épissage des transcriptions primaires BARTs (Edwards et al., 2008). Même si peu de rôles fonctionnels ont été identifiées pour les mi-ARN EBV, il a été démontré évident que miR BART2 peut réguler le gène de l'ADN polymérase de l'EBV (Barth et al., 2008) et que miR BART 1-5p et 17-5p peuvent réguler l'expression de LMP1 (Lo et al., 2007).

## **I.7 Les protéines virales de latence**

### **I.7.1 Protéines nucléaires**

#### **I.7.1.1 EBNA1**

EBNA1 est exprimée en latences I, II et III, son expression étant toutefois controversée en latence 0. En latence I et II, Les promoteurs Wp et Cp sont réprimés par méthylation et le promoteur Qp est actif (Schaefer et al., 1995). Aux stades initiaux de la latence III, cette protéine est transcrite à partir du promoteur Wp puis après circularisation du génome le promoteur Cp prend le relais (Kieff, 1996)

EBNA1 est la seule protéine de l'EBV nécessaire à la réplication et à la maintenance de l'épisome viral. Elle intervient de plus dans la maintenance et l'entretien de l'ADN viral et agit comme un régulateur transcriptionnel. EBNA est indispensable pour le maintien du virus dans la cellule hôte en prolifération.

EBNA1 est une phosphoprotéine de 641 acides aminés, riche en proline, qui se lie à l'ADN. Elle est composée de 4 domaines (Figure5). Le domaine N-terminal, riche en acides aminés basiques et constitué de 89 acides aminés. Le second comprend 239 acides aminés, il est riche en glycine et en alanine et joue un rôle important dans les interactions intramoléculaires. Ce domaine inhibe la réponse T cytotoxique en empêchant la présentation des antigènes EBNA 1 aux molécules du CMH de classe 1 (Jelena Levitskaya et al., 1995). Sa suppression ne

semble pas affecter les différentes fonctions connues d'EBNA1. Le troisième domaine est court et riche en acides aminés basiques. Enfin, le quatrième domaine est situé dans la partie C-terminale. Il est riche en acides aminés hydrophiles, comprend les acides aminés 459 à 607 et contient une région responsable de sa dimérisation et de sa fixation à l'origine de réplication OriP. Ce domaine est responsable de la maintenance du génome viral et essentiel aux activités transcriptionnelles et réplcatives (Mackey and Sugden, 1999). OriP est composé de deux régions cis séparées par un fragment d'ADN d'environ 1 kb : la région FR (family of repeat) et la région DS (dyad symmetry). EBNA1 se fixe sur la région DS pour initier la synthèse de l'ADN, tandis que sa fixation sur le domaine FR permet une régulation de la transcription (Leight and Sugden, 2000). Le domaine FR d'OriP contient des éléments amplificateurs qui peuvent réguler positivement la transcription lorsqu'il est lié à EBNA1.

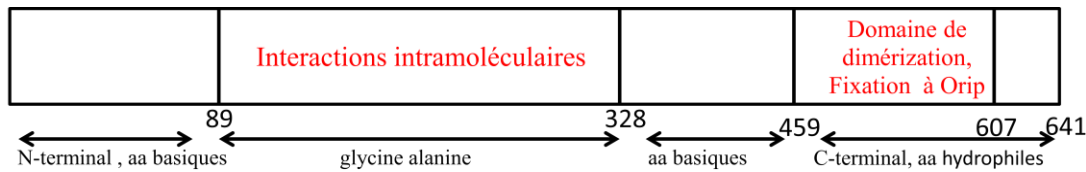
Le maintien du génome viral au sein de la cellule sous forme épisomale est un processus actif et contrôlé. Il est possible grâce à la fixation d'EBNA1 à OriP et aux chromosomes de la cellule hôte (Shire et al., 1999). L'épisome viral peut ainsi être synthétisé avec l'ADN chromosomique de la cellule au cours de la phase S, puis il peut être transmis à chaque cellule fille lors de la mitose.

EBNA1 se fixe également au promoteur du fragment BamHI C (Cp) permettant l'expression de tous les transcrits des protéines nucléaires EBNAs (Gahn and Sugden, 1995; Puglielli et al., 1996). Il peut de plus réguler sa propre expression en se liant au promoteur du fragment BamHI Q (Qp) (Nonkwelo et al., 1997). Cette régulation est observée, quelle que soit la phase de latence (Sample et al., 1992). EBNA1 peut également réguler positivement l'expression de facteurs de transcription cellulaires tels que TFIIC, ATF-2 et c-Myc, induisant l'expression des EBER 1 et 2 grâce à leur effet co-activateur.

Des modifications post-traductionnelles sont à l'origine de la régulation de la fonction et de la localisation nucléaire d'EBNA1. Il existe par ailleurs des répresseurs transcriptionnels d'EBNA1, tels que les facteurs cellulaires IRF2 et IRF7 (Zhang and Pagano, 1997; Zhang and Pagano, 1999).

EBNA1 ne semble pas jouer directement un rôle crucial pour la lymphomagenèse, cependant il s'agit de la seule protéine nucléaire virale exprimée dans l'ensemble des tumeurs associées à l'EBV (Giulino et al., 2011). EBNA1 peut par ailleurs favoriser l'instabilité génomique dans les cellules de lymphome de Burkitt *via* l'induction d'un stress oxydatif. Ce dernier a de plus été montré comme pouvant conduire à la dysfonction des télomères (longueurs hétérogènes, fusion,...) dans des lignées cellulaires de lymphomes (Kamranvar and Masucci, 2011).

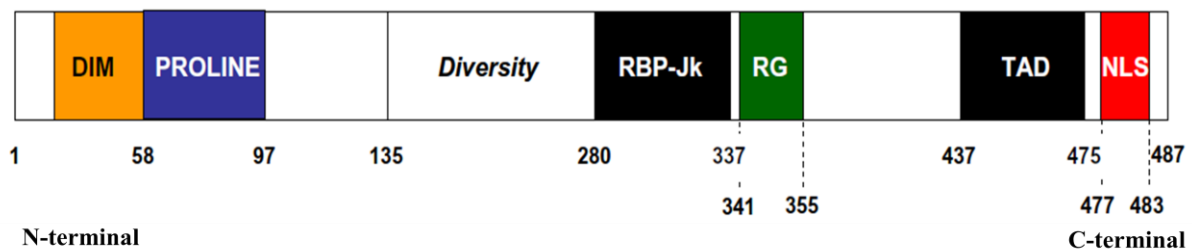
D'autres éléments suggèrent qu'EBNA-1 est nécessaire à la survie des cellules cancéreuses EBV positives par inhibition de l'apoptose (Saha and Robertson, 2011).



**Figure 5** : Structure de la protéine EBNA1.

### I.7.1.2 EBNA2

Il existe deux variants d'EBNA2 : EBNA2A et EBNA2B correspondant aux souches EBV1 et EBV2, qui diffèrent par leur taille : EBNA2A comprend 487 acides aminés, tandis qu'EBNA2B en comprend 443 (Ling et al., 1993).



**Figure 6** : Structure de la protéine EBNA-2 de l'EBV.

DIM: domaine d'homodimérisation. RG: résidus Arginine-Glycine. TAD: domaine de transactivation. NLS: séquence de translocation au noyau. RBP-Jk: C-promoter Binding Factor1 / Recombination-Binding Protein JKappa. Modifié d'après (Zimmer-Strobl and Strobl, 2001)

La partie N-terminale de cette protéine comprend un domaine d'homo-dimérisation, DIM (aa 1 à 58) (Zimmer-Strobl and Strobl, 2001), suivi d'une région riche en proline (aa 58 à 97) et d'une région de taille variable, en fonction du type de variant (aa 135-280 pour la forme la plus longue EBNA2A). C'est grâce à cette extrémité N-terminale que cette protéine se trouve sous forme d'homodimères, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (Figure 6)

La partie C terminale est caractérisée par 4 régions: une région d'interaction avec le facteur CBF1/RBP-JKappa (C-promoter Binding Factor1 / Recombination-Binding Protein JKappa), une seconde région riche en résidus Arginine-Glycine (RG, aa 341 à 355), une troisième région contenant le domaine de transactivation (TAD, aa 437 à 475) et une quatrième région contenant la séquence de translocation au noyau (NLS, aa 477 à 483).

Les protéines EBNA2A et 2B ont des rôles similaires. EBNA2 est essentielle pour l'immortalisation des lymphocytes B par l'EBV : Hammerschmidt (Hammerschmidt and Sugden, 1989), a montré que l'incapacité d'immortalisation de la souche P3HR1 de l'EBV (mutant dépourvu de la région U2 codante pour EBNA2 et d'une partie d'EBNA-LP), peut être restaurée par la réintroduction du gène d'EBNA2 par recombinaison homologue. De plus l'inhibition de l'expression d'EBNA2 empêche la transformation des lymphocytes B (Dosch et al., 1990 ; Cheung et al., 1993).

EBNA2 contribue à l'immortalisation des cellules B par sa capacité à agir comme modulateur transcriptionnel de l'expression des gènes viraux et cellulaires de la latence III. Cette protéine augmente la transcription des deux marqueurs d'activation lymphocytaires B, CD21 et CD23 (Cordier et al., 1990), de la tyrosine kinase *c-fgr* (Knutson, 1990), et du proto-oncogène *c-myc* (Kaiser et al., 1999). C-fgr et c-myc contribuent à la régulation de la croissance. EBNA2 agit également positivement sur l'expression de CCR7 (récepteur de la chimiokine MIP-3 $\beta$ , responsable d'interactions entre les lymphocytes B et T), AML2 et BAFT. BAFT est un membre de la famille AP-1/ATF, qui régule négativement l'expression de la protéine Zta, ce qui inhibe l'entrée des cellules en cycle lytique (Johansen et al., 2003)

EBNA2 est l'antigène nucléaire le plus précocément détecté après l'infection primaire par l'EBV. Il agit comme un facteur de transcription primaire et régule l'expression d'autres gènes de latence par transactivation de leurs promoteurs viraux : le promoteur de LMP2A, le promoteur bidirectionnel de LMP1 et de LMP2B, ainsi que le promoteur Cp qui régule la transcription des EBNAs (Abbot et al., 1990; Zimmer-Strobl et al., 1991).

Le domaine puissant de transactivation d'EBNA2 lui permet d'interagir avec des composants multiples du complexe de transcription cellulaire, tel que l'ARN polymérase II (Tong et al., 1995). EBNA2 n'interagit pas directement avec l'ADN, mais par l'intermédiaire de protéines de liaison comme CBF1/RBP-JK (C-promoter Binding Factor1 / Recombination-Binding Protein JK (Henkel et al., 1994). CBF1 est une protéine hautement conservée, qui joue le rôle de répresseur de la transcription lorsqu'elle est fixée au complexe co-répresseur HDAC 1/2 (Histones Deacetylases 1 et 2), au niveau du promoteur. Sa présence conduit au remodelage de la chromatine et empêche l'accessibilité des facteurs de transcription. Par interaction avec CBF1, EBNA2 conduit au déplacement du complexe HDAC et lève cette répression (Hsieh and Hayward, 1995).

Il existe d'autres protéines qui interagissent avec le complexe EBNA2/CBF1, permettant d'activer de manière efficace la transcription. Il s'agit notamment du facteur de transcription

PU.1/Spi-1 (Johannsen et al., 1995), de hSNF5/Ini qui est impliqué dans le positionnement des nucléosomes au niveau des gènes cibles, et permettant l'accès de régions régulatrices aux facteurs de transcription (Wu et al., 1996).

Les connaissances majeures sur le rôle d'EBNA2 dans la transformation des lymphocytes B résultent d'études sur la drosophile, qui ont montré que CBF1 est également une cible de la voie Notch, connue pour contrôler différents processus cellulaires tel que la différenciation, la prolifération et l'apoptose. L'activation de Notch conduit au clivage de son domaine intracellulaire (NotchIC), ce qui permet sa translocation dans le noyau et la levée de l'inhibition de la transcription par le complexe HDAC1/2. D'une manière similaire à EBNA2, NotchIC masque le domaine répresseur de CBF1, et active la transcription via son domaine endogène (Osborne and Miele, 1999). Notch et EBNA2 ont ainsi des effets similaires (Strobl et al., 2000).

### **I.7.1.3 EBNA3A, 3B et 3C**

EBNA3A, 3B et 3C (également connues respectivement sous les noms d'EBNA3, 4 et 6) sont codées par trois gènes du fragment BamHI et transcrits à partir du promoteur Cp ou Wp (Hennessy et al., 1985; Dillner et al., 1986; Hennessy et al., 1986).

En ce qui concerne l'EBV de type EBV1, les séquences protéiques d'EBNA 3A, 3B et 3C comportent respectivement 944, 938 et 992 acides aminés. Pour le type EBV2, elles comportent 925, 946 et 1069 acides aminés. Une comparaison entre les types EBV1 et EBV2 montre que les allèles d'EBNA 3A, 3B et 3C présentent respectivement une similitude de 84, 80 et 72 %.

Les protéines EBNA3 sont fortement hydrophiles : plus de 20% des acides aminés sont chargés. La fréquence élevée d'arginine et de lysine est responsable de leur localisation au niveau nucléaire. De plus, la présence de résidus leucine, isoleucine ou valine facilite leur homo ou hétéro-dimérisation.

Bien qu'elles possèdent de très fortes similitudes et qu'elles soient issues du même fragment BamHI, ces 3 protéines ne jouent pas le même rôle. EBNA3A et 3C sont nécessaires à l'immortalisation des lymphocytes B lors de l'obtention de LCLs (Tomkinson et al., 1993). De nombreuses données sont disponibles concernant EBNA3C. Cette protéine conduit à l'expression de CD21 (permettant la fixation de virus) dans les cellules de type Raji, ainsi qu'à celle de LMP1 et LMP2-B (Jiménez-Ramírez et al., 2006)

EBNA3C contribue à la transformation des cellules B en perturbant la régulation du cycle cellulaire (Parker et al., 1996). L'expression transitoire d'EBNA3C active le promoteur B-

myb, inactif durant la phase G1, mais actif durant la phase S de synthèse d'ADN. Elle agit de plus sur l'inhibiteur du cycle cellulaire, P27KIP, en empêchant son accumulation (Parker et al., 2000), ou en favorisant sa dégradation (Knight et al., 2005).

EBNA3-C augmente également l'expression transcriptionnelle du facteur de transcription c-Myc, avec lequel elle interagit et qu'elle stabilise *via* le recrutement du co-activateur *skp2* (Bajaj et al., 2008). Elle pourrait de plus coopérer avec Ras, pour immortaliser et transformer les fibroblastes primaires.

EBNA3C joue un rôle dans la migration et les processus de métastase des cellules tumorales. Son domaine C-terminal interagit avec la protéine humaine Nm23-H1, connue pour avoir des effets suppresseurs de l'activité métastatique dans de nombreux cancers humains. L'interaction entre EBNA3C et Nm23-H1 a été confirmée dans des LCL par co-immunoprécipitation. Cette interaction permet d'inhiber Nm23-H1 et de conduire à l'expression de MMP-9 (Métalloprotéinase matricielle 9) et de la cyclo-oxygénase COX-2, impliquées dans les processus de métastase (Kaul et al., 2006)

EBNA3B joue un rôle de suppresseur de tumeur et son inactivation favorise l'échappement au système immunitaire et la lymphomagenèse (White et al., 2012)

Les protéines EBNA3 peuvent agir comme répresseur de l'activité transcriptionnelle. Elles possèdent un site de liaison à CBF1. La fixation sur ce site rompt la liaison entre CBF1, l'ADN et la protéine EBNA2 (qui joue un rôle d'activateur de la transcription par interaction avec CBF1) (Robertson et al., 1996). Les protéines EBNA3 peuvent également jouer un rôle de répresseur en recrutant les HDAC1 et 2 ainsi que des co-répresseurs, tels que CtBP, mSin3A ou NCoR, par interaction avec la ProThymosin alpha (Touitou et al., 2001). EBNA3A et 3C en particulier peuvent réprimer de manière dose-dépendante l'activation de la transcription liée à EBNA2. Il a été montré qu'EBNA3C peut réprimer spécifiquement le promoteur Cp, indépendamment d'EBNA2 (Radkov et al., 1999)

#### **I.7.1.4 EBNA-LP**

EBNA-LP (Leader Protein), également appelée EBNA5, est une protéine transcrite à partir du promoteur Wp. La partie N-terminale de cette protéine est composée de tandems répétés de 66 acides aminés codés par les exons W1 et W2 (22 et 44 acides aminés, respectivement). La partie C-terminale (C-term) comporte 45 acides aminés et est codée par les deux exons Y1 et Y2

EBNA-LP joue un rôle important dans la croissance des LCLs (Allan et al., 1992). Elle permet également d'améliorer la fonction de transactivation d'EBNA2, ce qui suggère qu'elle joue un rôle crucial dans la transformation des lymphocytes B (Harada and Kieff, 1997; Nitsche et al., 1997). EBNA-LP coopère avec EBNA2, grâce à ses domaines W1 et W2, qui sont eux-mêmes régulés par phosphorylation au niveau des résidus sérine S35 et S63, (Yokoyama et al., 2001). L'expression par transfection transitoire d'EBNA-LP et d'EBNA2 dans des cellules B primaires a montré une induction de la transition de la phase G0 (quiescence) à la phase G1 (entrée dans le cycle de division). Par ailleurs, il a été observé dans des LCLs la surexpression et l'activation de la cycline D2, impliquée dans la transition G0/G1 (Jiang et al., 1991).

Des analyses biochimiques *in vitro* ont également mis en évidence des interférences entre EBNA-LP, pRb et la protéine p53. Ceci a été confirmé lors d'une étude réalisée sur des lignées lymphoblastoïdes, montrant la co-localisation par microscopie confocale d'EBNA-LP, pRb et p14<sup>ARF</sup> (qui empêche la dégradation de p53), au niveau nucléaire. L'interaction d'EBNA-LP avec p14<sup>ARF</sup> neutralise son effet, ce qui conduit à une diminution du niveau d'expression de p53. La protéine p53 est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire et la mort des cellules par apoptose. EBNA-LP contribue donc à favoriser les processus de prolifération et à inhiber ceux associés à l'apoptose. L'expression de la forme tronquée d'EBNA-LP (isoforme tronquée Y1Y2) protège contre l'apoptose dépendante des caspases (Garibal et al., 2007).

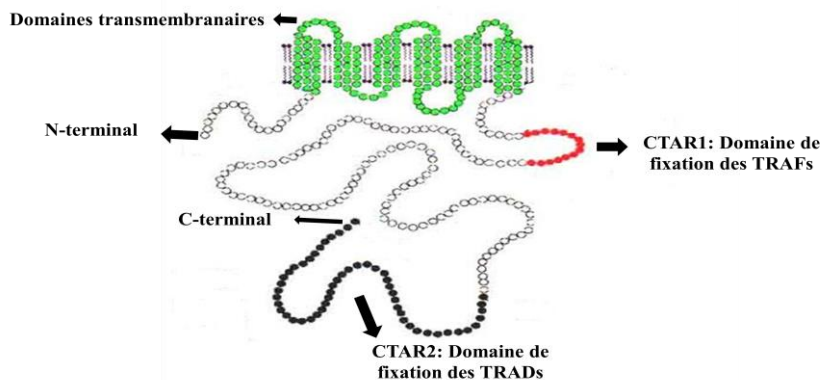
## **I.7.2 Les protéines membranaires**

### **I.7.2.1 LMP1**

LMP1 est considérée comme l'oncoprotéine majeure de l'EBV. Son important potentiel de transformation est notamment attribué à sa capacité à engager un ensemble de voies de signalisation cellulaire indépendamment d'un ligand.

Il s'agit d'une protéine membranaire de 62 KDa, dont la séquence primaire comporte 386 acides aminés. Elle est constituée de six domaines transmembranaires, d'une courte région cytoplasmique N-terminale (24 acides aminés), et d'une longue queue C-terminale (200 acides aminés) cytosolique (Soni et al., 2007) (Figure 7). Une région de la queue cytoplasmique N-terminale a également été montrée comme étant nécessaire à la bonne orientation de LMP1 dans la membrane (Izumi et al., 1994). Les régions transmembranaires sont importantes pour l'oligomérisation de la protéine (Olivier Gires et al., 1997; Higuchi et

al., 2001). Leur analyse mutationnelle montre leur importance pour la localisation de LMP1 dans les rafts lipidiques, ainsi que pour sa signalisation (Yasui et al., 2004).



**Figure 7** : Structure de la protéine transmembranaire LMP1.  
D'après : <http://www.frontbiosci.org/1999/v4/d/rowe/fulltext.html>

Par contre la signalisation de LMP1 est largement médiée par le long domaine cytoplasmique C-terminal, qui permet l'engagement de molécules effectrices grâce aux domaines CTAR1 et CTAR2 (C-terminal activation région 1 and 2)(Mainou et al., 2007). Les protéines se liant à CTAR1 et CTAR2 sont différentes, comme cela a été mis en évidence lors d'études d'hybridation réalisées chez la levure (Mosialos et al., 1995; O Gires et al., 1997). CTAR1 interagit directement avec les adaptateurs de type TRAFs (TNF Receptor Associated Factor) tandis que CTAR2 interagit avec eux d'une manière indirecte via les TRADD (TNF receptor Associated Death), RIP (receptor-interacting protein) et BS69. Les TRAFs (TNF Receptor Associated Factor) sont également impliquées dans la signalisation du récepteur CD40, considéré comme l'équivalent cellulaire de LMP1 (Mosialos et al., 1995; Devergne et al., 1996). LMP1 peut se substituer partiellement à CD40 chez des souris transgéniques dépourvues de CD40 (Uchida et al., 1999; Hömig-Hölzel et al., 2008).

Les molécules TRAFs participent à la transduction du signal en formant des complexes d'hétéromères et en recrutant en aval des molécules de signalisation. Elles peuvent par exemple intervenir dans l'induction de la croissance cellulaire, l'apoptose, ou l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Xie et al., 2008). CTAR1 contient un site de liaison entre les acides aminés 204 et 208 (PQQAT) qui peut interagir avec les TRAFs 1, 2, 3 et 5 (Devergne et al., 1996). CTAR2 recrute les protéines adaptatrices TRADD, RIP ou BS69, qui s'associent avec les TRAFs 2 et 6 (Izumi et al., 1999) Des études génétiques ont montré que TRAF6 est essentiel dans la signalisation médiée par CTAR2 chez les MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) (Arcipowski et al., 2011). Il est important de noter que les complexes de signalisation engagés



par LMP1 peuvent dépendre du type cellulaire, ce qu'il est nécessaire de prendre en compte lors de l'étude des pathogenèses associées à l'EBV.

LMP1 s'associe également directement ou indirectement avec de nombreuses protéines impliquées dans différents processus cellulaires, tels que le trafic des protéines, la migration ou la modulation de la réponse immunitaire.

LMP1 est co-localisée avec la vimentine, une protéine du cytosquelette appartenant à famille des filaments intermédiaires, impliquée dans la migration cellulaire, le trafic vésiculaire, et dans des processus de signalisation complexes (Liebowitz et al., 1987). Il semble que LMP1 et la vimentine soient associées dans un même complexe, car suite à des traitements par des agents chimiques tel-que l'IDPN ( $\beta,\beta'$ -Iminoditropionitrile), LMP1 et la vimentine se relocalisent selon la structure réorganisée du cytosquelette. Il est probable que TRAF3 participe au complexe LMP1/vimentine. TRAF3 s'associe au cytosquelette par interaction avec MIP-T3 (Ling and Goeddel, 2000), et une mutation dans le site de liaison entre MIP-T3 et le cytosquelette conduit à la perte de la présence de LMP1 dans la fraction du cytosquelette (Higuchi et al., 2001). Par ailleurs, la surexpression de LMP1 augmente le recrutement de TRAF3 au cytosquelette.

Il semble que LMP1 soit de plus associée au complexe CD44/Ezrin/Actine. L'Ezrin est une protéine qui assure la liaison entre le CD44 (molécule de la membrane plasmique) et le cytosquelette d'actine. Il a également été démontré que LMP1 peut se lier au CD44 (Endo et al., 2009 ; Tsukita et al., 1994; Walter et al., 1995), ce qui pourrait être mis en lien avec l'activation de la F-actin par LMP1 *via* la voie des PKc (Endo et al., 2009). L'absence d'Ezrin conduit par ailleurs à l'inhibition de la migration cellulaire médié par LMP1 (Endo et al., 2009).

LMP1 se trouve également associée à une molécule de la famille des tétraspanines, CD63. Les tétraspanines sont connues pour former des microdomaines membranaires ou TEM (Tetraspanin-Enriched Microdomains), importants dans l'organisation des complexes de signalisation au sein des membranes. Les protéines présentes au niveau des TEM sont en général impliquées dans la migration cellulaire, l'adhésion, l'inflammation, l'activation des lymphocytes, ainsi que dans le trafic et la signalisation vésiculaire (Yáñez-Mó et al., 2009).

LMP1 est de plus localisée dans les domaines membranaires riches en cholestérol appelés rafts lipidiques (Higuchi et al., 2001), ce qui est important pour sa fonction ; une mutation de LMP1 empêchant sa localisation au niveau des rafts lipidiques, et rend incapable d'induire NF- $\kappa$ B (Yasui et al., 2004). L'analyse par protéomique des protéines d'interaction avec LMP1 au niveau des rafts lipidiques de tumeurs de NPC, a permis d'identifier TRAF3, la galectine-9

ou la  $\beta$ -galactoside binding protein. Les deux dernières présentent des propriétés immuno-modulatrices (Ardila-Osorio et al., 2005). L'interaction entre LMP1 et la galectine-9 est par ailleurs indépendante de TRAF3 : il a été montré qu'un mutant de LMP1 ne possédant pas de site de liaison avec TRAF3 pouvait toujours interagir avec la galectine-9.

LMP1 est la principale protéine transformante de l'EBV et peut agir comme un oncogène. Cette protéine est capable d'induire des lymphomes B chez les souris transgéniques (Kulwichit et al., 1998). Son domaine C-Terminal a de nombreuses homologues de fonction avec le CD40. Des analyses génétiques ont montré que CTAR1 est essentiel pour la transformation des lymphocytes B et que CTAR2 semble important dans le maintien de la transformation cellulaire (Izumi et al., 1994). Par ailleurs, CTAR1 est nécessaire à la transformation des fibroblastes de rat (Mainou et al., 2005). LMP1 peut également déclencher la prolifération des cellules B par la stimulation de cytokines comme l'IL-10 (Kulwichit et al., 1998; Saha and Robertson, 2011). Elle régule par ailleurs négativement BLIMP1 $\alpha$  et empêche la différenciation finale des cellules B en plasmocytes, ce qui peut contribuer à la lymphomagenèse (Vrzalikova et al., 2011).

D'après l'ensemble de ces données, il est évident que la localisation de LMP1 est essentielle pour sa fonction. LMP1 permet le recrutement de nombreux adaptateurs (TRAFs, TRADD, RIP,...) au niveau des régions CTAR, ce qui lui permet d'interagir avec de nombreuses protéines, et d'activer différentes voies de signalisation cellulaire. Il s'agit essentiellement de l'activation des voies NF- $\kappa$ B, PI3K/Akt et p38/JNK.

### **I.7.2.1.1 Voie de signalisation induite par LMP1**

#### **I.7.2.1.1.1 La voie NF- $\kappa$ B**

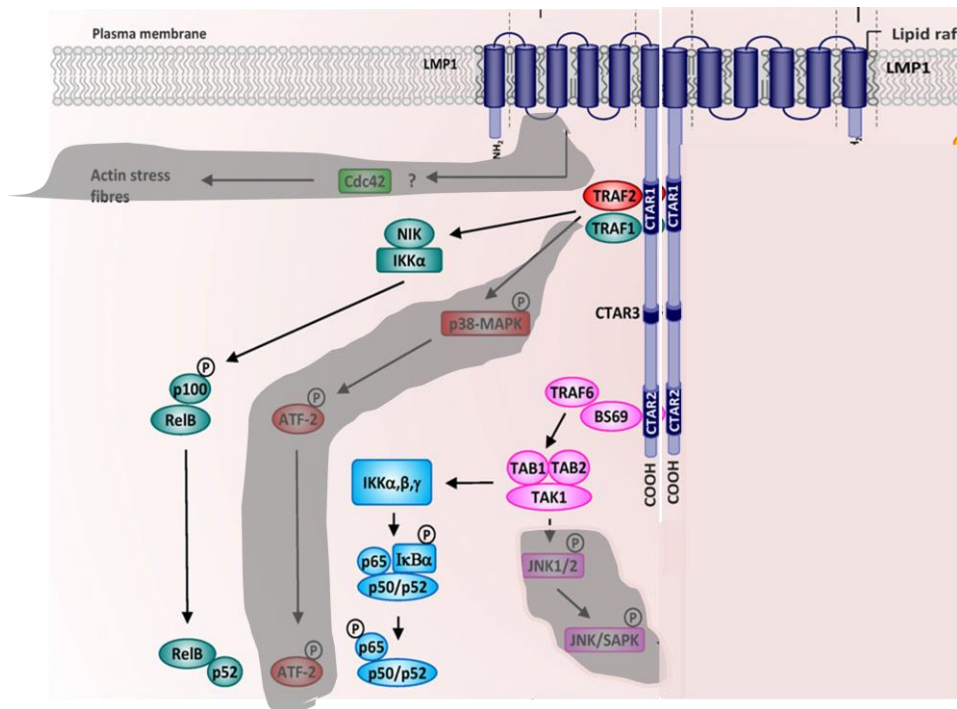
L'ensemble de ces voies est illustré dans les figures 8 et 13. Nous détaillerons les voies NF $\kappa$ B, PI3k/Akt, ainsi que les voies des MAPkinases et des STATs.

La famille des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B comprend un ensemble de protéines dimériques formées à partir des cinq sous-unités : p50, p52, RelA/p65, RelB et c-Rel. Chaque sous-unité est caractérisée par un domaine N-terminal RHD (Rel Homology Domain) comprenant un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de dimérisation, et un domaine d'interaction avec la protéine inhibitrice I $\kappa$ B.

Après activation et dimérisation, les sous-unités recrutent la machinerie transcriptionnelle par leurs domaines de transactivation. L'activation des complexes NF- $\kappa$ B est étroitement régulée par les inhibiteurs de la famille I $\kappa$ B qui séquestrent les différentes sous-unités de NF- $\kappa$ B dans le cytosol et inhibe ainsi leur activité transcriptionnelle. Cet inhibiteur peut être ubiquitiné et

dégradé par le protéasome suite à une activation des kinases, ce qui va libérer le facteur NF- $\kappa$ B et permettre sa translocation au noyau, puis l'induction de ses gènes cibles. Les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B régulent une large gamme de processus biologiques en réponse à de nombreux stimuli cellulaires, cruciaux pour la tumorigénèse.

Les deux domaines CTAR1 et CTAR2 de LMP1 permettent l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Figure 8). Celle induite par CTAR2 est majoritaire (Huen et al., 1995) et celle induite par CTAR1 plus complexe (Miller et al., 1998). La voie classique d'activation de NF- $\kappa$ B (dite canonique et dont l'hétérodimère représentatif est RelA/p50) est essentielle pour CTAR2. Par contre, CTAR1 active la voie alternative (dite non canonique dont 1 hétérodimère représentatif est RelB/p52) (Luftig et al., 2004). L'activation de NF- $\kappa$ B est largement associée à la région CTAR2, cependant celle assurée par CTAR1 est essentielle pour l'immortalisation des lymphocytes B médiée par LMP1 ( Izumi et al., 1994; Kaye et al., 1999 ).

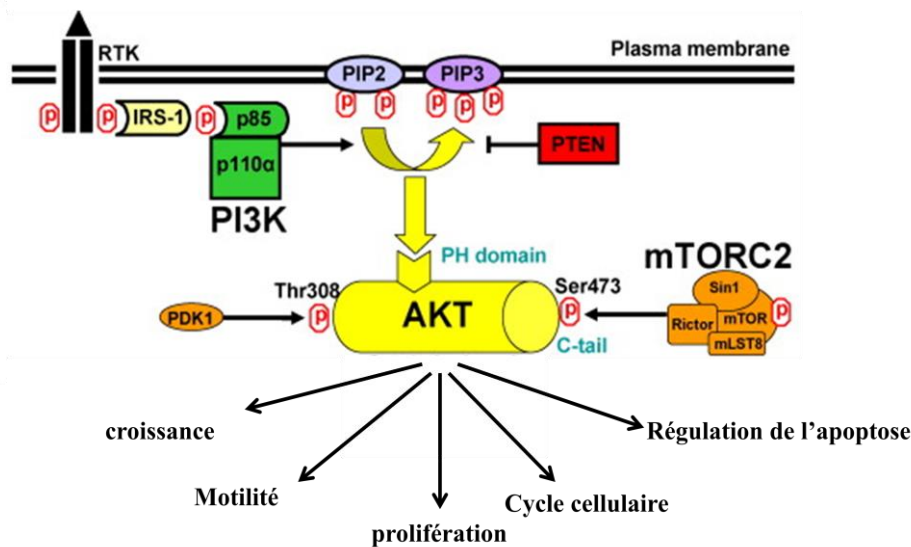


**Figure 8** : Activation de la voie NF $\kappa$ B canonique et non canonique par la protéine de latence LMP1. Modifié d'après (Dawson et al., 2012).

#### I.7.2.1.1.2 La voie Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K-Akt)

PI3K est une famille de kinases lipidiques hétérodimériques constituées d'un domaine catalytique et d'un domaine régulateur (qui sont respectivement p110 et p85 $\alpha$  pour les molécules représentatives des PI3K de classe 1A). L'activation de la PI3K conduit à la phosphorylation de PIP2 (phosphatidylinositol-4, 5-diphosphate), permettant de générer PIP3

phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate) (Castaneda et al., 2010) (Figure 9 + Figure 13). PIP3 intervient comme second messenger en recrutant des protéines effectrices, telle que Akt, à la membrane cellulaire. Akt est alors phosphorylée par mTORC2 (mTOR Complex 2) au niveau de sa sérine 473 et par PDK1 (Phosphoinositide-dependent kinase-1) au niveau de sa thréonine 308 (Fayard et al., 2010). Une fois activée par phosphorylation, Akt est relocalisée au noyau, où elle phosphoryle et active plusieurs molécules impliquées dans la croissance cellulaire, la prolifération, la progression dans le cycle cellulaire, la motilité ou la régulation de l'apoptose (Fayard et al., 2010).



**Figure 9** : Schéma représentatif de la voie PI3Kinase-AKT. Modifié d'après (Yap et al., 2008).

Les différents membres de la famille du TNF (Tumor Necrosis Factor), sont capables d'activer PI3K par recrutement de la sous-unité régulatrice p85 au complexe de signalisation, suite à l'interaction ligand/récepteur au niveau membranaire (Wong et al., 1999; Arron et al., 2001). Une première observation a montré que LMP1 pouvait être co-immunoprécipité avec p85, suggérant sa capacité à activer également cette voie (Dawson et al., 2003). Il a par la suite été montré une interaction avec le domaine CTAR1, sans pouvoir préciser si elle est directe ou se fait par l'intermédiaire des protéines TRAFs (Deregibus et al., 2003). TRAF6 est considérée comme une protéine potentielle de liaison entre p85 et LMP1, car elle est déjà connue pour conduire à l'activation d'Akt, *via* le complexe CD40/p85 (Deregibus et al., 2003). TRAF6 interagit par ailleurs avec CTAR2, par l'intermédiaire de différents adaptateurs TRAF2, TRADD, RIP ou BS69) (Schultheiss et al., 2001), cependant, CTAR2 n'est pas indispensable à l'activation de la voie PI3K/AKT (Mainou et al., 2005). TRAF6 a pu être co-immunoprécipité avec une molécule chimère CD40-CTAR1 (contenant les acides aminés 187-241 de CTAR1 fusionnés à CD40) chez les lymphocytes B, suggérant que TRAF6 peut

également s'associer à LMP1 par l'intermédiaire d'une autre région que CTAR2, en l'occurrence CTAR1 (Arcipowski et al., 2011).

Il est important d'identifier les protéines de liaison potentielles en amont de p85, mais également de rechercher les cibles que peut influencer LMP1 en aval. Une analyse bio-informatique basée sur la technique IPA ingenuity (Interactive Pathway Analysis), a permis d'identifier différentes protéines associées à p85 et impliquées dans différents effets associés à LMP1. Il s'agit d'Akt, mais également d'EGFR, de CDC2 et de JAK3.

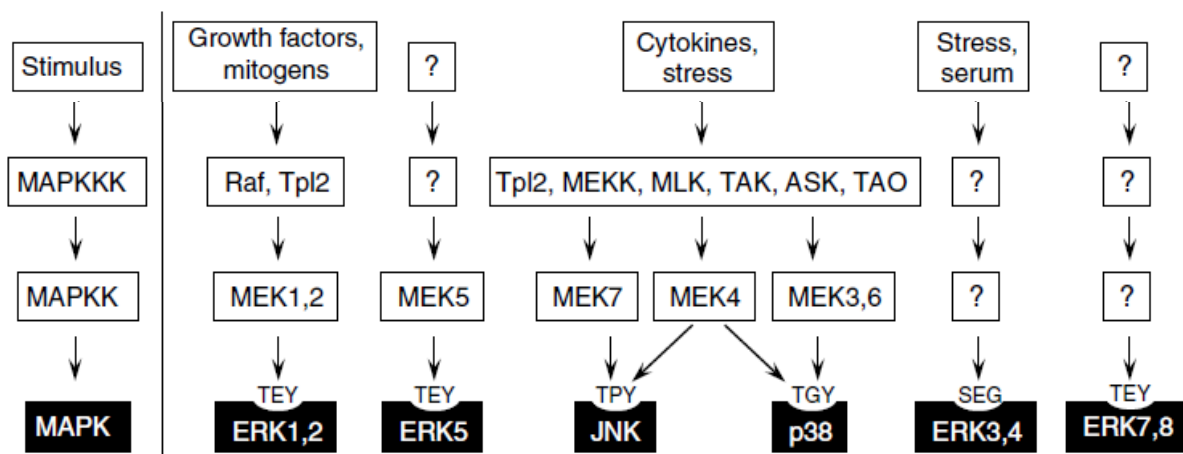
L'activation d'Akt en aval de p85 est absolument requise pour la transformation des fibroblastes de rongeur par l'EBV. Cependant, l'inhibition de la voie ERK empêche ce processus, sans bloquer l'activation d'Akt. Cette dernière est donc indispensable à la transformation médiée par LMP1, mais ne suffit pas à elle seule (Meckes et al., 2010). Par ailleurs, seul un nombre limité de cibles d'Akt a actuellement été décrit chez les cellules exprimant LMP1, dont CDC42 (permettant la polymérisation de l'actine et impliquée dans la régulation du cycle, la migration cellulaire,...) et GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3  $\beta$ , kinase impliquée en particulier dans la régulation de la prolifération) (Dawson et al., 2003). L'identification d'autres cibles d'Akt et de facteurs activés par CTAR1 est important pour comprendre la tumorigénèse associée à l'EBV. Il a été montré que l'inhibition de l'activité Pi3K par traitement chimique conduit à l'inactivation de cette dernière chez les fibroblastes (Hawkins et al., 1995), les cellules épithéliales (Nakagawa et al., 2001) et les neutrophiles (Benard et al., 1999). CDC42 régule positivement la polymérisation de l'actine et conduit à la formation de fibres de stress chez les cellules en latence III de l'EBV (Dawson et al. 2003). De plus une kinase spécifique de l'EBV BGLF4 induit la condensation et le réarrangement des filaments d'actine et des fibres de stress. La modification de la structure du cytosquelette d'actine via l'activation de la voie PI3K peut ainsi affecter de nombreux processus cellulaires : motilité, adhésion, endocytose, transport vésiculaire intracellulaire, trafic sécrétoire, exocytose.

#### **I.7.2.1.1.3 La voie des MAP kinases**

Les MAP kinases (MAPKs, Mitogen-Activated Protein Kinases) sont des kinases sérine/thréonine spécifiques qui participent à la régulation de nombreuses réponses cellulaires, suite à des stimulations comme celles induites par les facteurs de croissance ou le stress. Cette cascade permet d'activer les kinases ERK1/2, p38, et JNK. ERK1/2 répond à des stimuli tel que les facteurs de croissance et permet de réguler la croissance et la différenciation cellulaires. JNK et p38 sont activés par les facteurs de stress et sont impliqués dans l'apoptose

et la différenciation. L'altération de la voie des MAPK est fréquemment associée au développement de cancers.

La voie des MAPK est constituée d'une cascade de kinases à trois niveaux dans laquelle une MAPK est phosphorylée et activée par une MAPKK (protéine kinase kinase), elle-même activée par une MAPKKK (protéine kinase kinase kinase) (Figure 10). À ce jour, six groupes de MAPK ont été caractérisés chez les mammifères : ERK1/2, ERK3/4, ERK5, ERK7/8, JNK1/2/3 (Jun N-terminal Kinase) et p38 $\alpha/\beta/\gamma$ (ERK6)/ $\delta$ .



**Figure 10 :** Cascade d'activation des voies des MAPKineses.  
Modifié d'après (Dhillon et al., 2007)

Dans notre cas, nous nous intéresserons aux MAPK JNK et p38, généralement associées aux processus apoptotiques, et non à celles de la famille ERK, impliquées dans les processus de prolifération.

#### 1.7.2.1.1.3.1 Les MAP kinases JNK

La famille des JNK est codée par trois gènes JNK1 (*SAPK- $\gamma$* ), JNK2 (*SAPK- $\alpha$* ) et JNK3 (*SAPK- $\beta$* ). JNK1 et 2 sont exprimés d'une façon ubiquitaire, alors que l'expression de JNK3 est restreinte au cerveau, au cœur et aux testicules. L'épissage alternatif de ces gènes crée un total de dix isoformes de JNK. L'épissage donne des protéines de 46 KDa, ou de 54/55 KDa et a lieu à deux niveaux : au niveau de l'extension C-terminale pour tous les gènes, et sur l'exon du domaine kinase pour JNK1 et JNK2. (Barr and Bogoyevitch, 2001) L'activation des JNK exige une double phosphorylation sur des résidus tyrosine et thréonine présents sur des motifs TPY distincts. Cette phosphorylation est catalysée par la MEK4 (nommé aussi SEK1, MAPKK4, JNKK1, SKK1) de 42 KDa (Dérjard et al., 1995a) et par MEK7 (nommé aussi MAPKK7, JNKK2, SKK4) de 47 kDa (Tournier et al., 1997). Il semble que MEK7 phosphoryle préférentiellement la thréonine alors que MEK4 phosphoryle

principalement les résidus tyrosines. MEK4 et MEK7 sont elles-mêmes phosphorylées et activées par plusieurs MAPKKKs, dont MEKK1-4, YTpl-2, DLK, TAO1 et 2, TAK1 et ASK1 et 2. L'activation de JNK est également régulée par des protéines telles que JIP,  $\beta$ -arrestine et JSAP1 (Whitmarsh et al., 1998; Ito et al., 1999; McDonald et al., 2000). Après son activation, JNK est transloqué du cytoplasme vers le noyau. Son substrat principal est le facteur de transcription c-Jun.

JNK joue un rôle important dans la régulation transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes pro-apoptotiques. La phosphorylation de JNK par les MAP kinases permet sa translocation au noyau puis la phosphorylation et la transactivation de c-Jun. Ce dernier, une fois phosphorylé au niveau des sérines 63 et 73 du domaine N-terminal de transactivation, active le facteur de transcription AP-1 (Adler et al., 1992). Le complexe AP-1/ADN peut être impliqué dans la transcription d'une grande variété de protéines. Certaines sont connues comme ayant un rôle pro-apoptotique, tel que TNF- $\alpha$ , Fas-L ou Bak (Fan and Chambers, 2001; Dhanasekaran and Johnson, 2007; Raman et al., 2007). JNK permet également la phosphorylation d'un grand nombre d'autres facteurs de transcription, dont JunD, ATF2, ATF3, Elk-1, Elk-3, p53, RXR, RAR $\alpha$ , AR, NFAT4, HSF-1, NF-ATC1, STAT3 ou c-Myc (Johnson and Nakamura, 2007). Ainsi, l'activité nucléaire de JNK peut conduire à l'augmentation de l'expression de gènes pro-apoptotiques et/ou à la diminution de l'expression des gènes de survie.

La voie JNK-c-Jun/AP-1 médie l'expression d'un grand nombre de molécules pro-apoptotiques. Le rôle transcriptionnel de JNK est particulièrement important dans le cas des neurones. L'apoptose des neurones de l'hippocampe, des neurones granuleux du cervelet (Mei et al., 2008) ou des neurones en développement (Barone et al., 2008) exigent un mécanisme impliquant l'activation de c-Jun par JNK.

#### **I.7.2.1.1.3.2 Les MAP kinases P38**

La seconde famille des MAPK impliquée dans l'apoptose est celle des MAP kinases p38. Elle regroupe 4 membres : p38 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ . P38 $\alpha$  a été identifié en 1994 comme premier membre de cette famille. Il s'agit d'une tyrosine kinase de 38 kDa pouvant être phosphorylée par réaction à des cytokines inflammatoires, telle que les endotoxines de type LPS (lipopolysaccharide) (Han et al., 1994). Cette protéine est ubiquitaire et exprimée dans l'ensemble des tissus, avec un niveau maximum dans le muscle squelettique. La kinase p38 $\alpha$  possède un motif Thréonine-Glycine-Tyrosine (TGY) au sein de sa boucle d'activation et elle est à son maximum d'activité lorsqu'elle est doublement phosphorylée au niveau des résidus T (Thr180) et Y (Tyr182). Des études biochimiques ont montré que p38 $\alpha$  est 10 à 20 fois

moins actif lorsqu'elle est seulement phosphorylée sur Thr180 et inactive si le seul site de phosphorylation est Tyr 182 (Zhang et al., 2008). Il a été montré que la Thr180 est nécessaire pour l'activité catalytique, alors que la Tyr182 est nécessaire à l'activité catalytique mais également pour la reconnaissance du substrat (Askari et al., 2009).

P38 $\beta$  ou p38-2 est une protéine de 38 kDa présentant 74% d'homologie avec p38 $\alpha$ . Elle possède le motif de phosphorylation TGY et est exprimée de manière ubiquitaire avec une forte expression dans les tissus squelettique et cardiaque (Stein et al., 1997).

p38 $\gamma$ , également appelée SAPK3 ou ERK6 a été identifiée en 1996 (Li et al., 1996) Cette protéine de 42-45 kDa possède une homologie de séquence avec p38 $\alpha$  et p38 $\beta$  de 63% et 62% respectivement, ainsi que le motif TGY. Son expression est limitée au muscle squelettique (Z. Li et al. 1996).

La quatrième kinase identifiée à ce jour est p38 $\delta$  (Jiang et al., 1997) ou SAPK4 (Kumar et al., 1997). Cette protéine de 38-42 kDa présente une homologie de séquence avec p38 $\alpha$ , p38 $\beta$  et p38  $\gamma$ , de 61%, 59% et 65% respectivement (Jiang et al., 1997). L'expression de p38 $\delta$  est limitée aux poumons, aux reins et aux testicules (Hu et al., 1999). Sa boucle d'activation contient le motif TGY et elle peut être activée par des cytokines et des signaux de stress environnementaux.

Deux modes d'activation de la kinase p38 ont été décrites, le premier met en jeu les MAP3K et MAP2K, et est appelé voie canonique. La seconde dite voie non canonique est indépendante de ces dernières.

Ils sont décrits ci-après.

- Activation par les MAP3K/MAP2K (voie canonique) :

De même que les JNK, la voie des MAPK p38 est constituée d'une cascade de kinases à trois niveaux (MAPK p38, MAP2K et MAP3K)(Kyriakis and Avruch, 2001) (Figure 10). De nombreux stimuli extracellulaires sont capables d'activer les MAPK p38, comme le choc thermique, les irradiations, les cytokines (IL-1 par exemple) ou les conditions de stress.

Plusieurs MAP3K sont à l'origine de la voie d'activation de MAPK p38, comme ASK1 (Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1), DLK1 (Dual Leucine-zipper-bearing Kinase 1), TAK1 (TGF- $\beta$  Activated Kinase 1), TPL2 (Tumour Progression Locus 2), MLK3 (Mixed Lineage Kinase 3) ou MEKK1/4 (Mitogen-activated protein kinase kinase 1/4). Il est important de noter que certaines MAP3K qui déclenchent la voie JNK peuvent également activer les MAPK p38. Ceci est le cas de MEKK1, TAK1 ou ASK1 dont la régulation de l'activation a déjà été discutée dans la partie concernant la voie JNK.



Concernant les MAP2K, quatre molécules ont été décrites : MKK3, MKK4, MKK6 et MKK7. MKK4 (Dérijard et al., 1995) et MKK7 (Hu et al., 1999) sont actives *in vitro* et sont également des activateurs de la voie JNK, alors que MKK3 et MKK6 (Alonso et al., 2000) (Jiang et al., 1997) sont hautement spécifiques et les principales concernées dans les cellules. Des analyses chez la souris ont montré que selon le stimulus de stress MKK6 et MKK7 présentent des différences fonctionnelles (Zhang et al., 2007) et contribuent à des degrés divers à l'activation des différentes isoformes de p38 (Remy et al., 2010). MKK3 est une kinase de 39 kDa qui s'exprime dans de nombreux tissus, avec un niveau élevé dans le muscle squelettique. MKK6 fait 37 kDa, possède 80% d'homologie avec MKK3 et s'exprime seulement dans le muscle squelettique, le thymus, l'intestin grêle et le pancréas (Han et al., 1996; Moriguchi et al., 1996; Raingeaud et al., 1996; Stein et al., 1996). Ces deux molécules possèdent une sérine et une thréonine au sein de leur boucle d'activation, qui doivent être toutes deux phosphorylées pour qu'elles puissent jouer leur rôle de kinase.

Les MAP2K phosphorylent les différentes isoformes de p38. MKK3 cible les isoformes  $\alpha$ ,  $\gamma$  et  $\delta$ , tandis que MKK6 cible l'ensemble des quatre isoformes (Y. Jiang et al., 1997; Enslin et al., 1998). La double phosphorylation a lieu au niveau d'un motif TGY. Les MAPK p38 activées ont de nombreuses cibles (protéines du cytosquelette et cytosoliques, facteurs de transcription, protéines kinases,...).

- Activation indépendante des MAPK/MAP2K (voie non canonique) :

Il existe 3 mécanismes d'activation de p38 $\alpha$  (et probablement p38 $\beta$ ), indépendants des MAP3K et MAP2K.

Le premier mécanisme semble spécifique au TCR (T-Cell Receptor). Il conduit à la phosphorylation de p38 $\alpha$  sur la Tyr323 par ZAP70 (zeta chain associated protéine kinase de 70 kDa) associé à p56lck, ce qui conduit de plus à l'autophosphorylation de p38 $\alpha$  au niveau de sa boucle d'activation. P38 peut ainsi avoir une activité kinase envers ses substrats (Salvador et al., 2005). GADD45 $\alpha$  (Growth Arrest and Division Delay protein) semble agir comme un inhibiteur endogène de l'activation de la voie p38 $\alpha$  dans les lymphocytes T en se liant à p38 $\alpha$  et en empêchant sa phosphorylation au niveau de la Tyr323 (Salvador et al., 2005). L'importance de l'activation de la voie non canonique médiée par le TCR a été étudiée en générant des souris knock-in, où la Tyr323 de la p38 $\alpha$  a été remplacée par la phénylalanine. Ces souris sont viables et fertiles, ce qui suggère que cette voie est limitée et restreinte dans l'activation de p38. Cependant, la stimulation du TCR ne permet pas l'activation de p38 $\alpha$ , ce qui confirme que la voie alternative est bien basée sur la phosphorylation de la Tyr323 (Jirmanova et al., 2009).

Le deuxième mécanisme d'activation de p38 $\alpha$  implique TAB1 (TAK1 binding protein), qui peut se lier à p38 $\alpha$  (contrairement aux autres membres de la famille des MAPK p38) et induire une autophosphorylation de sa boucle d'activation (Ge et al., 2002).

Enfin, le dernier mécanisme a été décrit chez les cellules Hela et implique une diminution de l'expression de la protéine kinase Cdc7, ce qui conduit au blocage du cycle cellulaire en phase S et à l'apoptose. Mais le mécanisme d'activation sous-jacent n'est pas connu (Im and Lee, 2008).

#### **I.7.2.1.1.3.3 MAP kinases JNK/p38 et EBV**

L'EBV permet d'activer les MAPkinases p38 et JNK (figure 11 + Figure 13). Nous décrivons successivement l'implication de l'EBV dans l'activation de JNK puis dans celle de P38.

##### **- EBV et JNK :**

Les régions cytosoliques C-terminale CTAR1 et CTRA2 de LMP1 sont impliquées dans le déclenchement de la voie JNK, bien que CTAR2 soit considéré comme le principal domaine concerné. CTAR1 et CTAR2 sont connus pour permettre le recrutement des protéines adaptatrices TRAFs (TRAF1, 2, 3 et 5 pour CTAR1 et TRAF2 et 6 pour CTAR2), à la base du déclenchement des voies de signalisation.

La signalisation de JNK est généralement considérée pour être médiée par le domaine CTAR2 (Eliopoulos and Young, 1998). Les acides aminés situés entre la Proline 379 et la Tyrosine 384 de la souche sauvage B95.8 (B95.8-LMP1) sont essentiels pour l'activation de JNK1 (Kieser et al., 1999). Cette séquence chevauche avec celle de la liaison de LMP1 à TRADD. D'autres variantes de LMP1, tels que CAO-LMP1 (caractérisé par l'addition de 10 acide aminés et des points de mutation additionnels) permettent également l'engagement de la voie JNK/AP-1, suggérant l'importance de cette voie de signalisation associée à LMP1 (Blake et al., 2001). TRAF6 joue un rôle important dans la voie JNK, son absence conduisant à l'abolition de la voie JNK1 (Wan et al., 2004). L'activation et l'autophosphorylation de TRAF6 par K63 (chaîne de polyubiquitine engageant les résidus lysine63) permet sa liaison à TAB2 qui va médier le recrutement et l'activation de la MAP3 kinase TAK1 (Xia et al., 2009). Une fois activée TAK1 phosphoryle MKK6 qui va déclencher à son tour la voie JNK. (Shkoda et al., 2012)

Par ailleurs, ASK1 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5, MAP3K5), également un membre de la famille des MAP3 kinase, est surexprimé chez les cellules infectées par

l'EBV. Elle interagit fortement avec TRAF6, permettant l'activation de JNK par LMP1 (Song, 2012).

Des hypothèses ont été émises concernant le rôle de TRADD comme médiateur du recrutement de TRAF2 et l'activation de JNK1 au niveau de CTAR2. Eliopoulos et al ont proposé que l'activation de JNK1 par LMP1 ait lieu *via* une coopération entre TRADD et TRAF2 (Eliopoulos et al., 1999), car la co-surexpression de LMP1 et de TRADD a un effet synergique sur l'activation de JNK tandis qu'un dominant négatif de TRAF2 régule négativement cette voie. L'inactivation partielle de JNK suggère par ailleurs le rôle complémentaire d'une autre voie (en l'occurrence celle mettant en jeu TRAF6). Par contre, des travaux réalisés en 2004 ont montré à l'aide d'approches génétiques permettant d'interférer avec l'expression TRADD et TRAF2 que la signalisation de JNK1 par LMP1 semble indépendante de ces deux molécules (Xie et al., 2004) (Figure 11).

TRAF3 joue également un rôle essentiel dans la voie JNK (Xie et al., 2004), mais le mécanisme moléculaire d'interaction entre TRAF3, TRAF6, le complexe de signalisation et CTAR2 demeure encore inconnu.

TRAF1 est considéré comme un régulateur critique de la signalisation de JNK *via* le domaine C-terminal CTAR1 de LMP1. TRAF1 interagit physiquement avec diverses kinases de la famille des MAPK kinase (MAPKKK), tel que NIK, ASK1 et MEKK1, sans parvenir à les activer. Cependant, TRAF1 peut fonctionner comme un modulateur des signaux transduits par d'autres TRAFs, comme TRAF2, TRAF5 et TRAF6, qui interagissent avec ces MAPKKKs et favorisent leur activation (Eliopoulos et al., 2003)

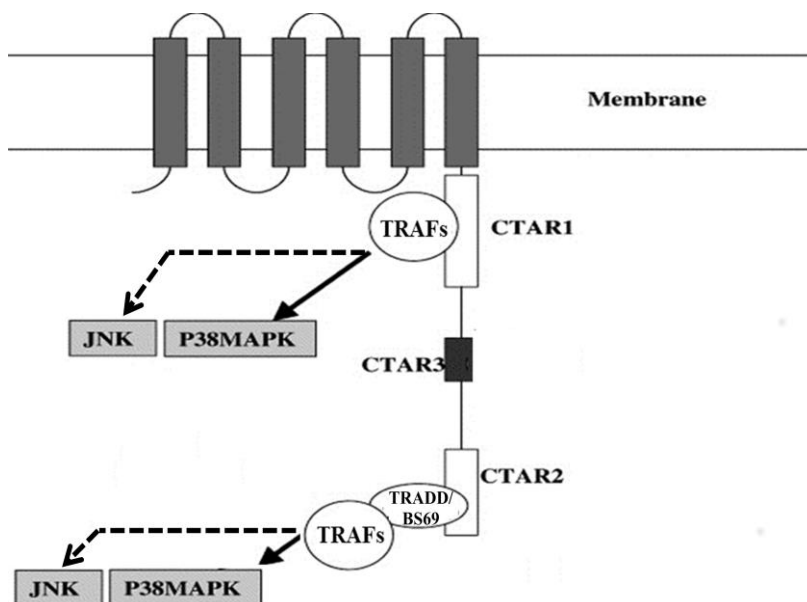
La protéine LMP2A joue aussi un rôle dans l'activation de la voie JNK. Par l'intermédiaire de la kinase ERK, LMP2A augmente la stabilité de c-jun, qui est le substrat de JNK (Chen et al., 2002).

- **EBV et P38 :**

La protéine LMP1 est à l'origine de l'activation de la MAPK p38. Cette activation implique le motif PxQxT de CTAR1 et la Tyrosine 384 de CTAR2. Une mutation de la séquence PxQxT en AxAxA conduit à une diminution de l'activation de la MAPK p38 d'environ de 50%, et une mutation de Tyr 384 abolit presque complètement l'induction de cette voie (Eliopoulos et al., 1999; Schultheiss et al., 2001). TRAF6 est indispensable à l'induction de la voie p38 par LMP1 (Schultheiss et al., 2001). IRAK1, un partenaire d'interaction directe de TRAF6, est un autre composant essentiel (Song et al., 2006).

TRAF2 semble également impliqué. LMP1 peut induire l'activation de p38 et conduire à la phosphorylation du facteur de transcription ATF-2 (cible de p38) dans les cellules HEK 293 et les cellules Rat-1. Il a été montré que ce processus est médié à la fois par les domaines CTAR1 et CTAR2 de LMP1 et par TRAF2. *In vitro*, La délétion de la partie N-terminale de TRAF2 empêche l'activation de p38 par LMP1 (Figure 11).

Il existe de plus une boucle d'autorégulation entre LMP1 et p38 : LMP1 active la voie P38, et l'activation de p38 permet la surexpression de LMP1 chez les cellules lymphoblastoïdes. Ceci est dû à un renforcement de la fixation des facteurs de transcription CREB/ATF1 (C-AMP Response Element-binding protein) sur l'élément de réponse CRE (C-AMP Response Element) présent sur le promoteur de LMP1 (Johansson et al., 2010).



**Figure 11** : Implication de la protéine LMP1 dans l'induction de la voie des JNK et P38 MAPkinase.

#### I.7.2.1.1.4 Autres voies induite par LMP1, les voies STATs

D'autres voies de signalisation que celles classiquement associées à LMP1 sont également activées, comme la voie des JAK/STATs (Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription)

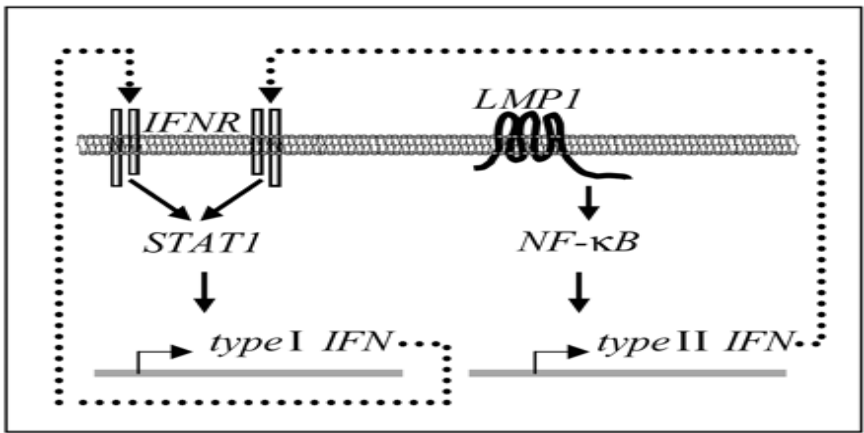
LMP1 médie la transcription d'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), qui est un membre de la famille des récepteurs des tyrosines kinases ErbB (W. E. Miller et al., 1995). EGFR est le récepteur d'un facteur de croissance, l'EGF, qui permet d'activer différentes voies de signalisation associées notamment à la croissance et à la prolifération cellulaire. Ce

récepteur est surexprimé ou muté dans la plupart des cancers (dont les NPC), ce qui met en évidence son rôle dans les processus de cancérisation (X. Zheng et al., 1994).

L'expression de l'EGFR peut être régulée par des facteurs oncogéniques viraux dont, v-ErbB (*Avian Erythroblastosis Virus*), E5 (de l'HPV, *Human Papilloma Virus*), HBVx (*Hepatitis B Virus*) ou LMP1 (EBV) (W. E. Miller et al., 1995). LMP1 induit l'expression de Bcl-3 (proto-oncogène) suite à l'activation par phosphorylation sur la tyrosine 705 et la sérine 727 du facteur de transcription STAT3, ce qui permet sa fixation sur le promoteur de Bcl-3 (Kung and Raab-Traub, 2008). Le complexe p50/Bcl3 régule ensuite l'expression de l'EGFR. EGFR a été la première protéine décrite pour être induite uniquement par CTAR1. STAT3 est en effet activé par cette région de LMP1.

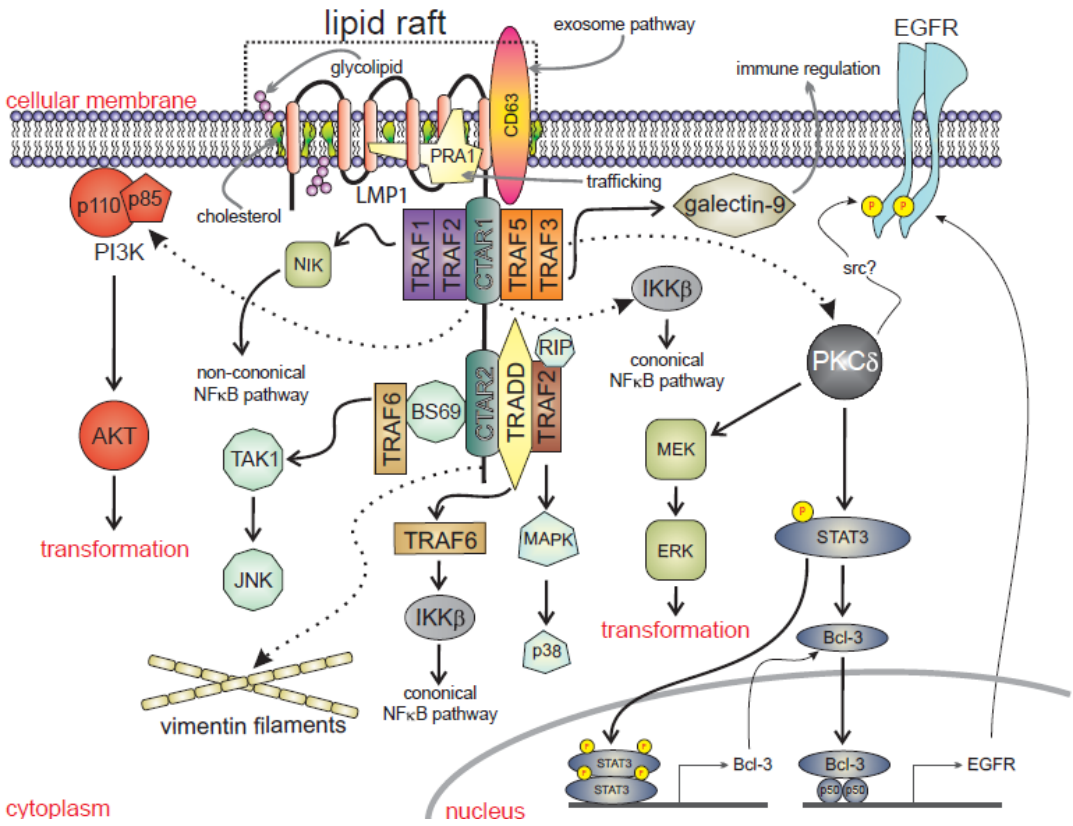
L'activation de STAT3 a été rapportée dans des NPC et un lymphome provenant de souris transgéniques exprimant LMP1 (Buettner et al., 2006; Shair et al., 2007). Par ailleurs, l'inhibition de STAT3, empêche la croissance des cellules cancéreuses *in vitro* (Buettner et al., 2006), d'où son rôle évident dans les processus de cancérisation. PKC $\delta$  (Protein Kinase C de type  $\delta$ ) est la kinase responsable de l'activation de STAT3 par phosphorylation sur sa sérine (Meckes et al., 2010). Elle semble de plus être impliquée dans les processus de transformation induits par LMP1 dans les cellules de Rat- 1, via son influence sur la voie ERK (Extracellular signal Regulated Kinase). PKC $\delta$  joue donc un rôle clé dans la signalisation de LMP1, cependant la manière dont LMP1 l'active demeure inconnue. Une hypothèse peut toutefois être émise. Nous avons vu précédemment qu'il existait un complexe LMP1/vimentine/TRAF3 (TRAF3 étant associé à CTAR1) et il a été montré que PKC $\delta$  s'associe à la vimentine (Owen et al., 1996). Par conséquent, le complexe de signalisation PKC $\delta$ -LMP1 pourrait se former par association à la vimentine.

LMP1 active de plus STAT1, un facteur de transcription associé à l'expression des molécules d'interféron (IFN). Cette activation a lieu de manière indirecte (Zhang et al., 2004; Najjar et al., 2005a). LMP1 induit l'expression et la sécrétion autocrine d'IFN $\alpha$  et d'IFN $\gamma$  via les domaines CTAR1 et CTAR2 et la voie NF- $\kappa$ B. L'IFN $\alpha$  et l'IFN $\gamma$  en se fixant à leurs récepteurs (IFNAR1/2, IFN $\alpha$  Receptor 1/2 ; IFNGR1/2, IFN $\gamma$  Receptor 1/2) induisent alors l'activation de STAT1 (Figure 12).



**Figure 12 :** Activation de STAT1 par la protéine de latence LMP1. IFNR: interféron receptor. NFκB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells. D'après (Najjar et al., 2005)

LMP1 agit sur une multitude de voies cellulaires qui contribuent vraisemblablement aux maladies associées à l'EBV. Cependant, une meilleure compréhension des mécanismes de signalisation et de cancérisation médiés par LMP1, en particulier dans le cas de la lymphomagénèse, demande encore de nombreuses explorations.



**Figure 13 :** Différentes voies de signalisation induite par LMP1. D'après : (Meckes Jr and Raab-Traub, 2011)

### **I.7.2.2 LMP2A et LMP2B**

LMP2A et LMP2B ont pour origine le même gène de transcription. Par contre, ils diffèrent par leur premier exon qui code pour un domaine N-terminal cytoplasmique de 119 acides aminés dans le cas de LMP2A et qui est non codant pour LMP2B. Ces deux gènes sont transcrits à partir de promoteurs différents situés proche de la région de fusion des extrémités du génome lorsqu'il est sous forme linéaire (Laux et al., 1988). Leur localisation explique que les protéines issues de ces gènes portent également le nom de protéines terminales TR1 et TR2.

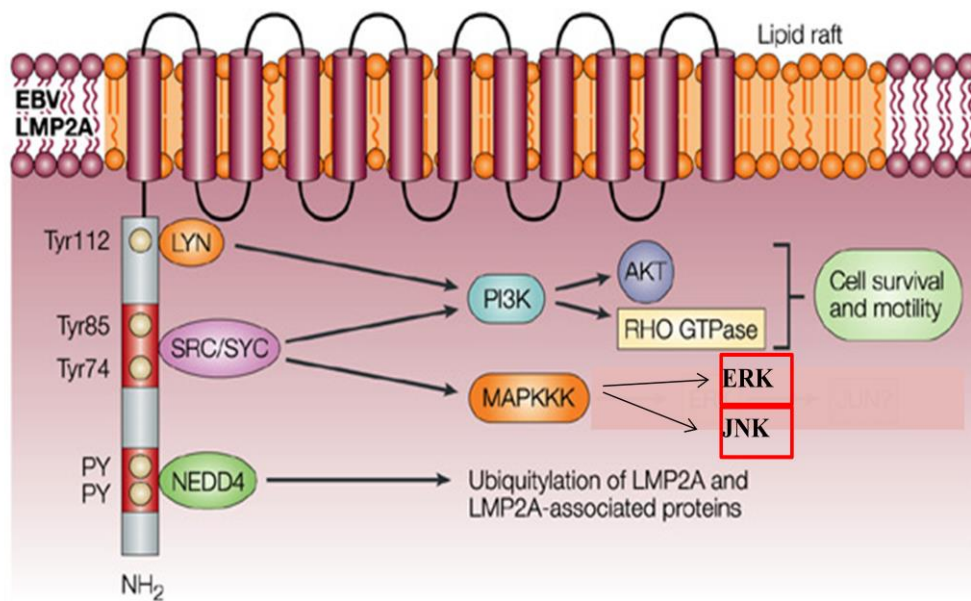
LMP2A et LMP2B sont des protéines membranaires (de 54 et 40 kDa respectivement), possédant un domaine N-terminal (qui est délété de 119 acides aminés dans le cas de LMP2B), un domaine carboxy-terminal de 27 acides aminés et 12 domaines transmembranaires (contre 6 pour LMP1). Ces protéines s'associent sous forme d'agrégats, au sein de la membrane plasmique des lymphocytes B infectés par l'EBV.

La région signalisatrice importante de LMP2A est l'extrémité N-terminale, qui possède une variété de motifs permettant des interactions protéine-protéine (Figure 14). Cette région comprend 8 résidus tyrosine, dont 2 (Tyr 74 et Tyr 85) forment un motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) (Young et al., 2000). Ce motif est également retrouvé chez le BCR (B Cell Receptor) et le TCR. Il joue un rôle pivot dans la prolifération et la différenciation lymphocytaire. Dans les cellules B, la phosphorylation de ce motif conduit au recrutement et à l'activation des membres de la famille des SRC kinases (telle que Fyn ou Lyn) et de Syk, un membre de la famille de ZAP-70. Syk est ainsi constitutivement associé à LMP2A (Fruehling and Longnecker, 1997). La kinase Lyn peut par ailleurs se fixer au résidu Tyr 112 (Fruehling et al., 1998). L'association de LMP2A avec Syk et Lyn conduit au blocage de la voie d'activation du BCR. LMP2A agit comme un dominant négatif de ce dernier en recrutant les mêmes molécules de signalisation (C. L. Miller et al., 1995). Il permet aux cellules B de survivre indépendamment de la signalisation de BCR dans la mesure où il active des voies de signalisation mimant l'engagement de ce dernier. Dans les cellules B transformées par l'EBV, LMP2A est constitutivement dans les rafts lipidiques (Dykstra et al., 2001), y empêchant la relocalisation et la signalisation du BCR.

LMP2A possède aussi dans son domaine N-terminal cytoplasmique deux régions riches en proline (domaines PY) qui interagissent avec Nedd4 et l'E3 ubiquitine ligase. Ceci conduit à l'ubiquitination de la partie N-terminale de molécules impliquées dans sa signalisation (Ikeda

et al., 2003) et à leur dégradation *via* le protéasome. LMP2A assure ainsi un rétrocontrôle négatif de sa propre signalisation. (Lawrence S. Young and Rickinson 2004)

Par son domaine N-terminal, LMP2A active les MAP kinases ERK et JNK, par l'intermédiaire d'une MAP kinase d'ordre 3 (MAPKKK) encore non identifiée (Chen et al., 2002b). ERK et JNK sont impliquées dans les processus d'invasion cellulaire. LMP2A active également de manière constitutive les voies Pi3K/Akt et Pi3K/Ras associés à la survie cellulaire. La voie de signalisation Pi3K/Akt contribue à inhiber l'apoptose induite par TGF- $\beta$  (Fukuda and Longnecker, 2007) (Figure 14)



**Figure 14** : Principales voies de signalisation induite par la protéine de latence LMP2a. Modifié d'après (Young and Rickinson, 2004).

LMP2A conduit également à la surexpression de différentes molécules impliquées dans les processus de cancérisation. Elle potentialise notamment les capacités métastatiques des cellules NPC par la surexpression de l'intégrine alpha-6 (ITGalpha-6) (Pegtel et al., 2005) Cette dernière augmente l'expression de la  $\beta$ -cathénine, principale composante de la voie Wnt, qui est impliquée dans 90 % des cancers du colon (Morrison et al., 2003).

LMP2A interagit par ailleurs physiquement avec WOX1 par ses domaines riches en proline, ce qui conduit à l'activation d'ERK1/2 et à la surexpression de MM9 (Matrix Metalloprotease), favorisant les processus d'invasion cellulaire. L'activation de la voie Pi3K conduit de plus à l'expression d'IL10, une cytokine favorisant la prolifération cellulaire (Incrocci et al., 2013; Lan et al., 2013).

Les fonctions de LMP2B dans l'immortalisation par l'EBV ainsi que ses interactions avec la signalisation de LMP2A ne sont pas bien définies. LMP2B semble toutefois inhiber la



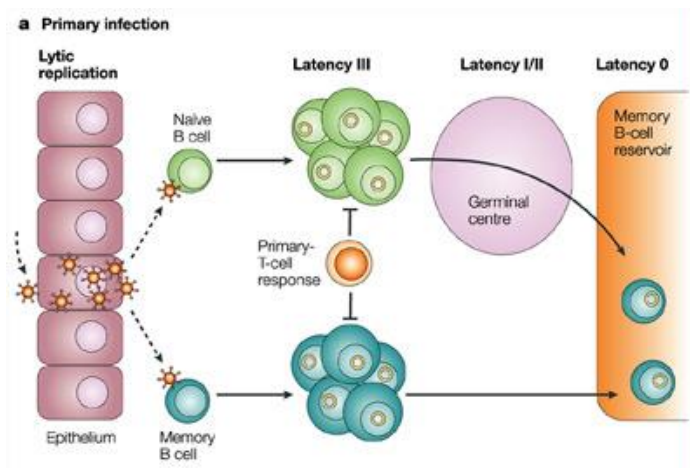
phosphorylation de LMP2A, et restaurer ainsi la signalisation du BCR (Rovedo and Longnecker, 2007).

Malgré les nombreuses voies de signalisation induite par LMP2A et LMP2B, ces deux protéines ne sont pas essentielles dans les processus de transformation et d'immortalisation des lymphocytes B (Longnecker, 2000). Par contre, LMP2A permet le maintien de l'épisome viral et prévient la réactivation des cellules infectées par l'EBV par blocage de la réponse au cross-link des immunoglobulines de surface, en agissant comme un dominant négatif des tyrosine kinases Lyn et Syk (Cohen, 2000; Saha and Robertson, 2011)

## **I.8 Réponse immune anti-EBV**

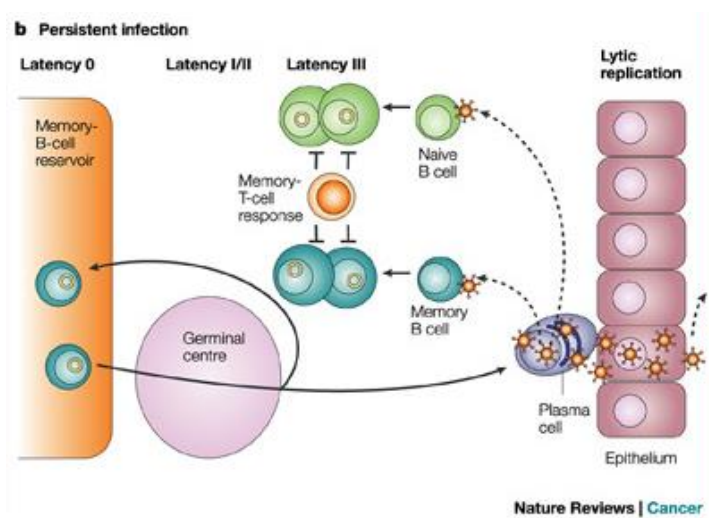
### **I.8.1 L'infection par l'EBV in vivo : infection primaire et infection latente**

La primo-infection par l'EBV survient généralement durant l'enfance, de manière asymptomatique. Le virus est transmis par la salive et il semble que les lymphocytes B soient infectés indirectement par l'intermédiaire des cellules épithéliales oropharyngées qui sont la première ligne de défense contre les infections microbiennes (Figure 15). Les lymphocytes B infectés (cellule B naïve ou cellule B mémoire selon les modèles) prolifèrent et produisent des virions qui infectent d'autres cellules (Young and Rickinson, 2004). Certaines cellules infectées entrent ensuite en latence III. Lorsque le virus est en phase de latence, les cellules expriment les protéines EBNA et LMPs, contre lesquelles une réponse immunitaire humorale est dirigée. De plus, il se met en place une réponse primaire T anti-EBV vigoureuse, dirigée vers les antigènes de latence. Elle contribue au contrôle de la prolifération cellulaire par élimination de la plupart des cellules en phase de latence III (Falk et al., 1992). Les cellules ayant échappé à la réponse immunitaire peuvent survivre par induction des latences I/II (avec baisse de l'expression de certains antigènes viraux) puis vont se retrouver dans le réservoir lymphocytaire B mémoire. Ces cellules en latence 0, n'expriment aucune protéine de latence, ce qui leur permet de passer inaperçu au système immunitaire. Elles vont donc persister tout au long de la vie de l'individu, malgré les réponses immunitaires humorales et cellulaires spécifiques des composants viraux et des cellules infectées.



**Figure 15 :** Les différentes étapes de l’infection primaire par l’EBV.  
D’après : (Young and Rickinson, 2004)

Les cellules B infectées peuvent répondre au contrôle physiologique associé aux cellules B mémoires assurant leur migration et leur différenciation. Cependant, occasionnellement, certaines d’entre elles peuvent être recrutées au niveau des centres germinatifs, où les programmes de latence I/II peuvent être activés (Figure 16). Elles peuvent à nouveau entrer dans le réservoir B mémoire, mais elles peuvent également aller au niveau de l’oropharynx où peut avoir lieu la réactivation virale et entrée des cellules en latence III qui se trouvent alors sous le contrôle de la réponse immunitaire T mémoire.



**Figure 16 :** Réactivation et infection latente par l’EBV.  
D’après : (Young and Rickinson, 2004)

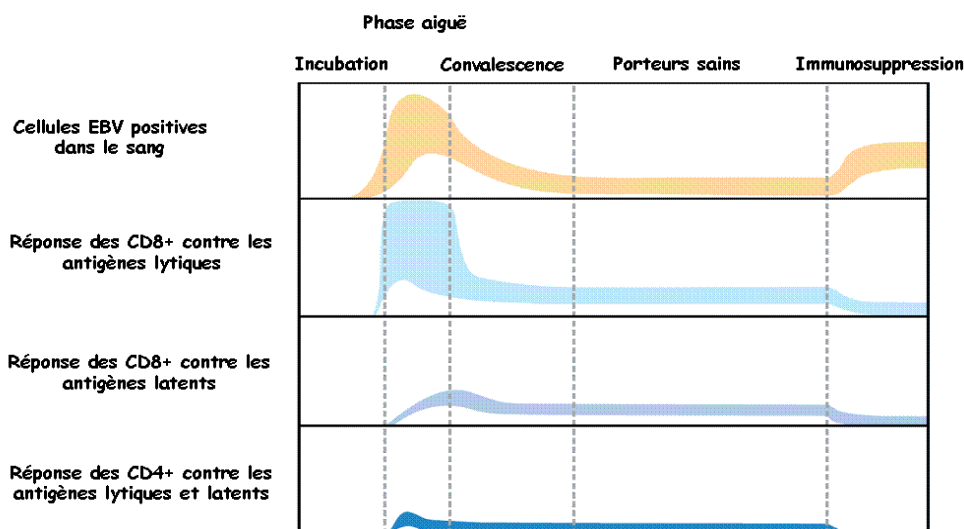
Les protéines virales possèdent des mécanismes transcriptionnels et transformants qui rendent ce virus potentiellement oncogénique (Cohen et al., 1991; Bain et al., 1996). Chez les sujets immunodéprimés, suite à un traitement médicamenteux ou à une infection par le HIV (Human immunodeficiency virus), il existe une augmentation de l’incidence des lymphomes

B avec expression des antigènes de latence III, identiques aux cellules B infectées *in vitro* (lignées lymphoblastoïdes ou LCLs) (Thomas et al., 1991). Ces observations indiquent qu'il existe *in vivo* des mécanismes actifs qui empêchent l'expansion des cellules B infectées par l'EBV.

## I.8.2 Immunité à médiation cellulaire

Les cellules NK sont impliquées dans le contrôle de l'infection et peuvent entraîner la lyse des cellules infectées sans qu'il y ait besoin de reconnaissance spécifique d'antigènes. Elles peuvent limiter l'infection par l'EBV grâce au relargage d'IFN $\gamma$  qui inhibe la réplication virale (Strowig et al., 2008). Des souris transgéniques exprimant LMP1 ne développent pas de tumeurs grâce à la surveillance des cellules NK (Zhang et al., 2012).

Chez les sujets immunocompétents, le contrôle de la croissance des lymphocytes B infectés par l'EBV est toutefois majoritairement médiée par le CMH de classe I (Figure 17). Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques reconnaissent les épitopes des protéines de latence telles qu'EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, LMP1 et LMP2 (Khanna et al., 1995; Rickinson and Moss, 1997). Par contre, EBNA-1 est invisible aux lymphocytes TCD8+, grâce à son domaine de répétition Gly/Ala, qui empêche le processus de présentation aux molécules du CMH de classe I (J Levitskaya et al., 1995). Les lymphocytes T CD8+ reconnaissent également les antigènes lytiques ainsi que les antigènes structuraux.



**Figure 17** : Réponse des cellules TCD8+ et TCD4+ au cours de l'infection par l'EBV. Infection primaire et phase lytique (incubation, convalescence), infection latente (porteurs sains) et sujets immunodéprimés. D'après : (Hislop et al., 2007).

Les cellules CD4<sup>+</sup> sont capables de reconnaître certaines protéines de latence telles qu'EBNA1, EBNA2 et EBNA3C. Cette reconnaissance existe mais est plus faible pour les protéines EBNA3A et LMPs. Les CD4<sup>+</sup> répondent également de manière spécifique aux antigènes lytiques tels que BZLF1 (Adhikary et al., 2006), à la protéine précoce BHRF1 (Landais et al., 2004) et à deux glycoprotéines virales gp350 et 110 (Adhikary et al., 2006). Les cellules T CD4<sup>+</sup> sont plus actives lors de la phase lytique (Figure 17).

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ou CD4<sup>+</sup> peuvent également limiter la croissance des cellules en latence III grâce à l'interaction CD95 de la cellule B infectée par l'EBV/CD95 ligand des cellules T (Le Clorennec et al., 2006). L'importance de l'interaction entre le CD95 et son ligand (CD95L) dans l'homéostasie immunitaire a été soulignée par des études faites chez la souris. Les souches de souris ayant des mutations au niveau du CD95 ou du CD95L présentent une forte incidence des tumeurs lymphoïdes et des maladies lymphoprolifératives auto-immunes (Nagata and Suda, 1995). Le CD95L est principalement associée aux cellules de type Th1, qui sont les T auxiliaires activant et stimulant les lymphocytes T cytotoxiques et les macrophages dans la réponse immunitaire cellulaire de défense contre les bactéries et les virus (Ramsdell et al., 1994; Suda et al., 1995; Yagita et al., 1995). Une évolution vers un phénotype Th2 est associée à une diminution de la mort médiée par CD95. Ces cellules ont en effet un rôle dans la réponse aux allergènes et aux parasites et la balance Th1/Th2 oriente la réponse immunitaire. Dans le cas de l'EBV, ceci pourrait expliquer pourquoi les nourrissons, chez qui le système immunitaire est orienté Th2, développent rarement une mononucléose infectieuse contrairement aux adultes lors de l'infection primaire. La mononucléose infectieuse est caractérisée par un nombre élevé de cellules B infectées par l'EBV dans la circulation (Anagnostopoulos et al., 1995) qui à leur tour stimulent une expansion excessive de des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, dont certaines sont spécifiques des protéines de latence de l'EBV et des peptides antigéniques précoces (Callan et al., 1996; Steven et al., 1996) Les cellules T CD4<sup>+</sup> exprimant CD95L pourraient ainsi influencer ces événements en limitant la croissance des cellules B infectées par l'EBV et en régulant négativement la réponse T CD8<sup>+</sup>.

Les cellules T CD4<sup>+</sup> contribuent également à l'immunosurveillance et au contrôle des lymphoproliférations par la voie perforine/granzyme. Suite à la reconnaissance du CMH de classe II des lymphocytes B, ce système permet la lyse des cellules infectées par l'EBV. La cellule T CD4<sup>+</sup> libère par exocytose des granules portant la perforine, qui va ensuite former des pores au niveau de la membrane de la cellule cible. Ces pores permettent l'entrée des

granzymes (sérine protéases) libérées par les cellules T CD4+ dans les cellules B, ce qui va induire l'activation des caspases, la fragmentation de l'ADN et la mort des cellules B en latence III de l'EBV par apoptose.

Certaines cellules T CD4+ n'expriment pas la perforine, mais utilisent un autre moyen de défense permettant de lyser les cellules B infectées par l'EBV. Ces cellules libèrent par exocytose des granules contenant la granulysine. Cette dernière est une molécule cytolytique et pro inflammatoire, généralement coexprimée avec la perforine et possédant des effets antimicrobiens, contre les cellules infectées par les virus et contre certaines tumeurs. La granulysine agit au niveau de la cellule cible en endommageant les membranes cellulaires et en perturbant le potentiel transmembranaire mitochondrial ce qui conduit à une apoptose de type intrinsèque.

## **I.9 EBV et lymphomes B associés**

L'EBV a été défini par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) comme «agent cancérogène» en 1997. Son rôle primordial dans la lymphomagenèse chez les patients immunodéprimés (latence de type III) est bien établi. Son rôle oncogénique chez les patients immunocompétents est très vraisemblable, au moins comme co-facteur.

L'EBV est associé à différentes maladies auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde, sclérose en plaque, syndrome de Sjörger ou lupus érythémateux), ainsi qu'à de nombreux cancers de type hématopoïétique (lymphomes B, T ou NK) ou non (cancer du rhinopharynx). Nous nous intéresserons aux lymphomes hématopoïétiques de type B, associés à l'EBV.

### **I.9.1 EBV et lymphomes des immunodéprimés**

Les individus atteints d'une déficience congénitale, acquise (individus HIV positifs en particulier) ou suite à un traitement médicamenteux sont sujets aux lymphomes associés à l'EBV (Tableau 2).

<b>Lymphoma</b>	<b>EBV frequency</b>	<b>Latency Program</b>
Post-transplantation LPD, B-cell	>90%	Type 3
Post-transplantation LPD, NK/T-cell	>70%	Type 3
Burkitt's lymphoma (HIV)	25–35%	Type 1
Hodgkin's lymphoma (HIV)	>80%	Type 2
Primary effusion lymphoma	>80%	Type 1
Plasmablastic lymphoma	~70%	Type 1 or Type 2
Plasmablastic lymphoma, oral type (HIV)	100%	Type 1
Primary CNS lymphoma (HIV)	100%	Type 3
NHLs with primary immune disorders	>90%	Type 3
Iatrogenic immunodeficiency lymphoma	40–50%	Type 3

**Tableau 2** : Lymphomes associés à l'EB chez les sujets immuno-déprimés  
D'après : (Roschewski and Wilson, 2012)

Les maladies lymphoprolifératives post-transplantations (PTLD, Post Transplantation Lymphoproliferative Disorders), sont associées dans 60 à 70 % des cas à une réactivation de l'EBV, et vont d'hyperplasie bénigne à des lymphomes agressifs (Evens et al., 2010). Le risque pour les individus séro-négatifs est la greffe d'un organe provenant d'un individu séro-positif (Paya et al., 1999). Ces pathologies ont généralement pour origine les cellules B et peuvent être physiologiquement subdivisée en monomorphe, polymorphe, plasmocytaire ou comme variant du lymphome de Hodgkin (Draoua et al., 2004). Elles résultent de la transformation des cellules B par l'EBV associée à une détérioration de la réponse immunitaire anti-EBV.

Les lymphomes primaires du système nerveux central (PCNSL, Primary Central Nervous System Lymphoma) sont particulièrement agressifs, peuvent se développer chez les patients HIV positifs ou suite à une transplantation et sont caractérisés par l'expression de LMP1 et d'EBNA2 (Camilleri-Broët et al., 1995). L'infection par l'EBV chez les patients atteints du HIV est corrélée au risque de développer un PCNLS au cours du développement de la maladie (Cingolani et al., 2000).

Les lymphomes primitifs des séreuses (PEL, Primary Effusion Lymphoma) sont des lymphomes à grandes cellules B qui interviennent généralement chez les patients HIV positifs (Fassone et al., 2000). Le rôle oncogénique exact de l'EBV n'est cependant pas clair. Il s'agit d'une latence de type I (expression d'EBNA1 et absence d'expression de LMP1 et d'EBNA2) (Fassone et al., 2000).

Les lymphomes à plasmablastes (PBL, Plasmablastic Lymphoma) constituent un groupe hétérogène de lymphomes B très agressifs survenant le plus souvent chez les patients immunodéprimés atteints du HIV et dont le nombre de CD4 est extrêmement faible (Colomo et al., 2004). LMP1 et EBNA2 sont rarement exprimés (latence de type I).

Les lymphomes de Hodgkin associés au HIV (HIV-HL, HIV-related Hodgkin's lymphoma) ne sont pas considérés comme une pathologie permettant de définir un syndrome d'immunodéficience acquise, mais leur fréquence est plus élevée chez ces patients que pour l'ensemble de la population (Mounier et al., 2010). Contrairement aux HL classiques, plus de 50% des individus montrent une atteinte de la moelle osseuse et les cellules de Reed Stenberg (caractéristiques de HL) tendent à être plus nombreuses (Dolcetti et al., 2001). L'oncogène LMP1 est normalement toujours exprimé, contrairement au CD40 ligand (Dolcetti et al., 2001). Malgré la nature plus agressive des HIV-HL, la plupart des patients sont traités de la même manière que pour les patients qui ne sont pas atteints d'immunodéficience.

Les patients atteints de maladies auto-immunes traités par des immunodépresseurs présentent également un risque élevé d'être atteints de lymphomes associés à l'EBV (Baecklund et al., 2003).

### **I.10.2 EBV et lymphomes de burkitt**

Le Lymphome de Burkitt (BL) est un lymphome très agressif associé à la surexpression de l'oncogène c-Myc. Cette surexpression est due à une translocation entre le chromosome 8 et l'un des gènes d'immunoglobulines situé sur les chromosomes 2 (chaîne légère kappa), 14 (chaîne lourde), ou 22 (chaîne légère lambda). Il s'agit en général d'une translocation t(8;14). Le BL est subdivisé en trois variantes cliniques : BL endémique, BL sporadique et BL associés aux immunodéficiences. Ces trois variants diffèrent dans leur épidémiologie, leur manifestation clinique et par leur biologie. Le BL endémique, est retrouvé dans les pays en développement comme l'Afrique équatoriale et la Nouvelle-Guinée et associé dans 100 % des cas à l'EBV (Gulley et al., 1992). Par contre, l'EBV n'est retrouvé que dans 20 à 30 % des cas de BL sporadiques (Thorley-Lawson and Gross, 2004).

Dans les BL, l'EBV est en latence I. EBNA1 et les EBER seuls sont exprimés (Saha and Robertson, 2011). Des études ont mis en évidence le rôle oncogénique joué par l'EBV, en montrant que des lignées cellulaires BL dépourvues de l'EBV n'induisent pas de tumeurs chez les souris, alors que leur infection par l'EBV y conduit (Shimizu et al., 1994). Dans les BL endémiques, l'EBV protège de l'apoptose les cellules B surexprimant c-Myc. Il contribue

également à un dysfonctionnement des télomères et à une instabilité génomique (Kelly et al., 2006; Kamranvar et al., 2007).

Le traitement des BL, associés ou non à l'EBV, est très efficace et de courte durée. La chimiothérapie peut être associée ou non au rituximab (anticorps thérapeutique monoclonal anti-CD20). Ce traitement aboutit à une rémission chez 85 % des patients, avec une toxicité myélosuppressive significative (Magrath et al., 1996). La présence de l'EBV dans les BL n'a pas d'influence sur le pronostic, ni sur le traitement.

### **I.10.3 EBV et lymphome de Hodgkin**

Le lymphome de Hodgkin (HL) représente 30 % de l'ensemble des lymphomes, et les 2/3 sont associés à l'EBV. Ce type de lymphome est divisé en 2 grands groupes : le HL classique et le HL nodulaire. L'EBV est associé avec le type classique. Les patients ayant des antécédents de mononucléose infectieuse ont un risque 4 fois plus élevé de développer un HL et les patients présentant des taux sérologiques élevés d'EBV ont un risque accru de développer un HL au cours de leur vie (Muñoz et al., 1978). La cellule maligne du HL, cellule de Reed-Sternberg (RS), est une cellule EBV positive dans 40 % des cas (Weiss et al., 1989). Il s'agit de cellules en latence II qui expriment les EBER, les BARTs, la protéine nucléaire EBNA1 et les protéines membranaires LMP1 et LMP2. Compte-tenu de l'expression de LMP1, les voies classique et alternative de NF- $\kappa$ B sont constitutivement activées chez ces cellules (Weiss et al., 1989).

La thérapie pour les HL est actuellement identique, qu'il y ait infection ou non par l'EBV ; elle se traduit par des rémissions à long terme. Cependant, chez la plupart des patients atteints de HL/EBV+ il est observé des rechutes suite au traitement. Le pronostic est donc moins bon et des thérapies ciblant les voies de signalisation NF- $\kappa$ B ou l'utilisation de cellules T cytotoxiques spécifiques à l'EBV pourraient fournir de nouvelles pistes thérapeutiques.

### **I.10.4 EBV et DLBCL**

Le lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL) est le lymphome le plus fréquent. L'infection par l'EBV est associée aux DLBCL chez 10 % des patients immunocompétents. Cependant, dans des situations cliniques spécifiques les DLBCL peuvent y être beaucoup plus fréquemment associées.

Les DLBCL/EBV+ des sujets âgés constituent une pathologie très agressive qui survient chez des patients sans véritable immunodéficiência (Thorley-Lawson and Gross, 2004). LMP-1 peut être détectée dans la majorité des cas, alors qu'EBNA-2 n'est retrouvé que dans 25 à



35% des cas (Oyama et al., 2003). Morphologiquement, le nombre de cellules géantes est variable et elles ressemblent à des cellules RS (cellules de Reed-Sternberg de lymphomes de Hodgkin ou HL), ce qui peut conduire à une erreur de diagnostic entre un DLBCL/EBV+ et un HL/EBV+. Les DLBCL/EBV+ des sujets âgés sont cependant en général caractérisées par un plus grand nombre de cellules de grande taille, positives pour les marqueurs B de surface CD20 et CD79a. Chez les personnes âgées, le pronostic d'un DLBCL/EBV+ est moins bon que celui d'un DLBCL/EBV-. Compte-tenu que la plupart des personnes qui en sont atteintes sont des personnes âgées, souvent incapables de tolérer une chimiothérapie agressive, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, ainsi que d'une immunothérapie adaptée dirigée contre les protéines de latence de l'EBV, est très prometteur

## II Molécule de la famille B7 associé aux cancers : B7-

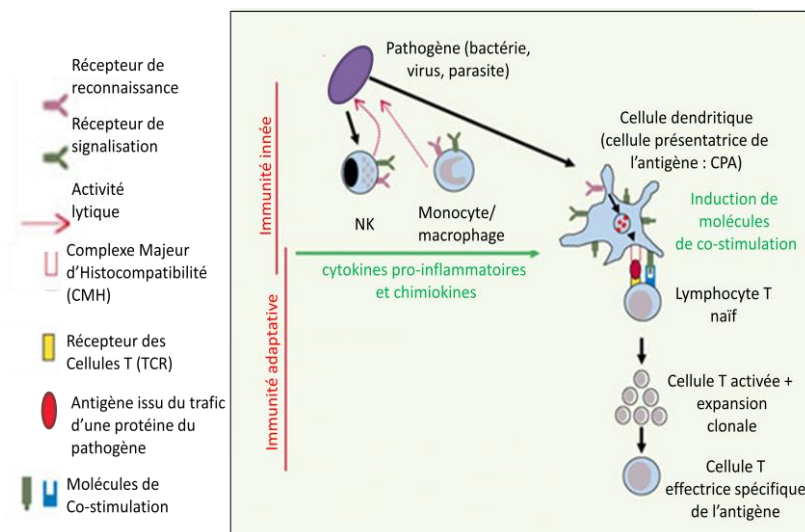
### H1

Après avoir resitué le contexte immunologique, nous décrivons les molécules de la famille B7 et B7-H1 en particulier.

### **II.1 Immunité innée, immunité adaptative**

L'immunité innée est la première barrière de défense contre les agents pathogènes. Elle assure également une surveillance vis-à-vis de l'apparition de tumeurs. Il s'agit d'une réponse immunitaire immédiate assurée en grande partie par les cellules phagocytaires (monocytes et macrophages) et les lymphocytes NK (Natural Killer).

Suite à la réponse innée, il y a activation de la réponse immunitaire adaptative, qui permet d'amplifier la réponse immunitaire et met en place une réponse particulièrement adaptée, spécifique d'un antigène donné. Elle se met en place par l'intermédiaire de cellules présentatrices de l'antigène (CPA), en particulier les cellules dendritiques (DC), les lymphocytes B ou les macrophages (Figure 18).

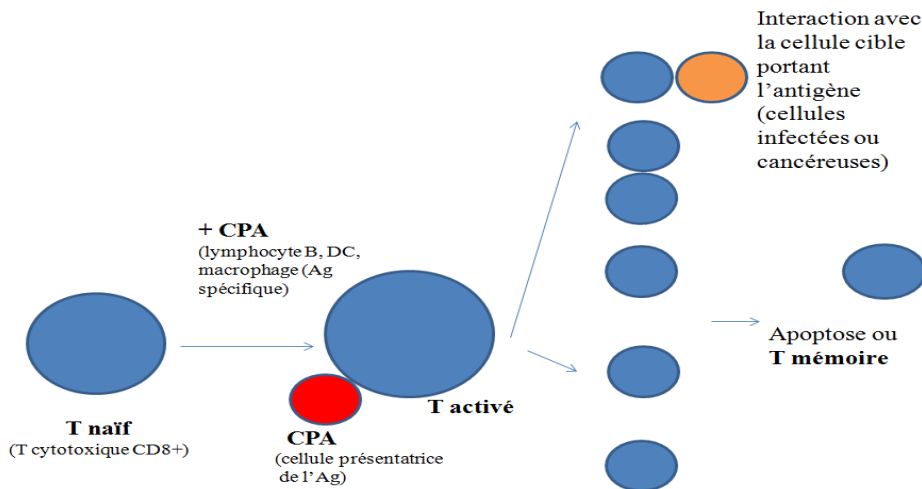


**Figure 18** : Acteurs de l'immunité innée et adaptative

Modifié d'après : [http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/immunité-et-vaccination/reponse-immunitaire/comprendre/immunité-innée/photos-immunité-innée/ConnexioII\\_IA.jpg/image\\_view\\_fullscreen](http://acces.ens-lyon.fr/acces/ressources/immunité-et-vaccination/reponse-immunitaire/comprendre/immunité-innée/photos-immunité-innée/ConnexioII_IA.jpg/image_view_fullscreen)

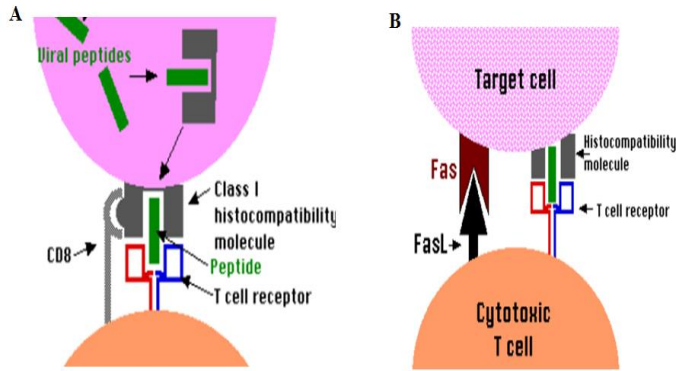
On distingue l'immunité adaptative à médiation humorale, assurée par les lymphocytes B (production d'anticorps), de celle à médiation cellulaire mettant en jeu les lymphocytes T, qui est celle concernant B7-H1. Les lymphocytes T sont dits naïfs s'ils n'ont pas encore rencontré leur antigène spécifique. Ils sont dits activés/effecteurs lorsqu'ils ont été activés par leur

antigène spécifique présenté par les CPA et sont entrés dans le processus d'élimination des cellules cibles, suite à leur multiplication clonale. Enfin, Une fois l'infection endiguée, les T cytotoxiques effecteurs meurent généralement par apoptose, tandis qu'un petit nombre deviennent des cellules mémoires. Lors d'une nouvelle infection ces dernières proliféreront plus rapidement, conduisant à une réponse immunitaire plus efficace (Figure 19).



**Figure 19** : Processus de transformation des cellules T naïves en cellules T activées

Les lymphocytes T cytotoxiques CD8+ sont un sous-groupe des lymphocytes T intervenant lors de la réponse adaptative. Ils sont capables d'induire la mort par apoptose de cellules infectées ou cancéreuses. Les T cytotoxiques CD8+ naïfs sont ainsi tout d'abord activés suite à la reconnaissance (grâce à leur TCR), du complexe peptide/CMH de la CPA (Figure 20). Le peptide provient d'un antigène spécifique issu du trafic intracellulaire d'une protéine virale, bactérienne ou spécifique de cellules cancéreuses. L'interaction est stabilisée grâce au CD8. Une fois activés, les T cytotoxiques prolifèrent, ce qui permet d'amplifier la réponse immunitaire spécifique dirigée contre cet antigène. Lors de la reconnaissance de la cellule cible portant l'antigène (également présentée au niveau d'un complexe TCR/peptide-CMH) les T cytotoxiques activés l'éliminent, en provoquant sa mort par lyse ou par apoptose. Ce processus peut être associé à l'effet apoptotique de la voie de signalisation Fas/Fas ligand (Figure 20)



**Figure 20** : Mécanismes d'interaction entre une cellule T CD8<sup>+</sup> cytotoxique et sa cellule cible.  
D'après: [http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/H/HLA.html#class\\_II](http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/H/HLA.html#class_II).

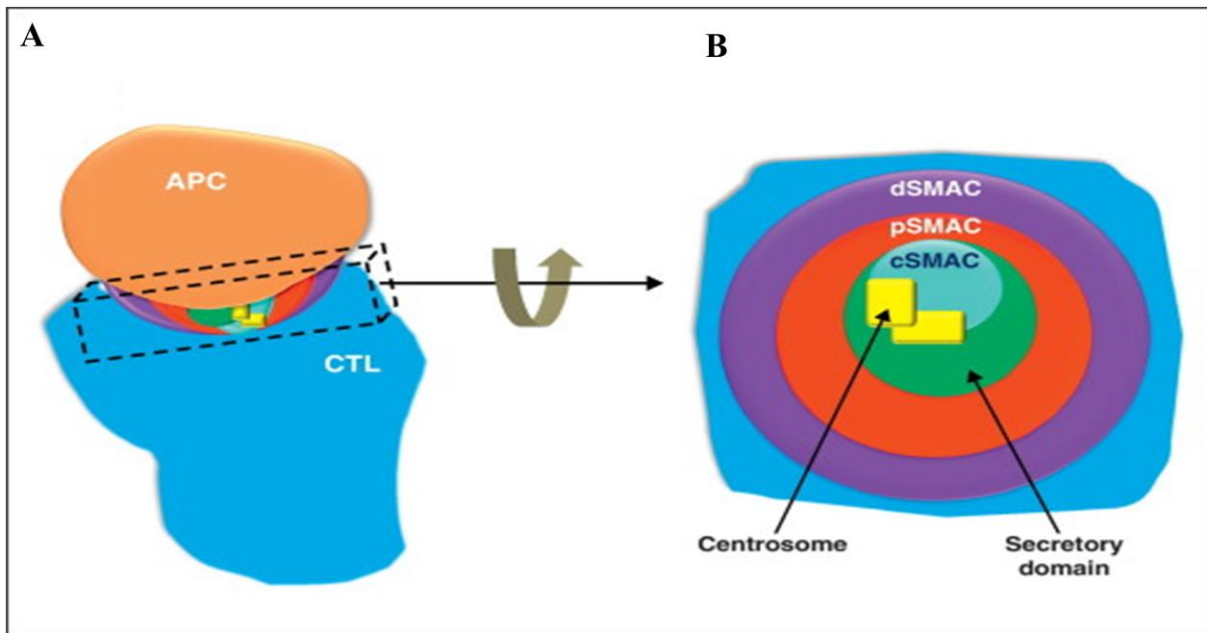
Dans le cas des lymphocytes B immortalisés par l'EBV, ces derniers jouent simultanément le rôle de CPA (fonction assurée par les lymphocytes B, les macrophages et les cellules dendritiques) et de cellule cible (cellule cancéreuse).

Lors de l'infection primaire par l'EBV, une réponse immunitaire innée et adaptative vigoureuse se met en place. Par la suite, le virus persiste de manière latente tout au long de la vie de l'individu au sein du compartiment B mémoire avec des phases de réactivation. Le contrôle de l'émergence de cellules immortalisées en latence III de l'EBV est alors placé sous le contrôle des lymphocytes T cytotoxiques anti-EBV, dans un équilibre hôte/virus.

## II.2 Synapse immunologique

Lors de la mise en place de la réponse immunitaire adaptative il existe des zones de contact entre la cellule T cytotoxique CD8<sup>+</sup> effectrice et la CPA ou la cellule cible (lymphocytes B immortalisés en latence III de l'EBV en particulier). Il s'agit d'une zone d'interaction directe et de dialogue appelée synapse immunologique, faisant notamment intervenir le complexe TCR/peptide-CMH (Dustin et al., 2010)

La synapse immunologique est une structure hautement organisée (Figure 21+Figure 22).



**Figure 21** : Structure de la synapse immunologique.  
Modifié d'après (Angus and Griffiths, 2013)

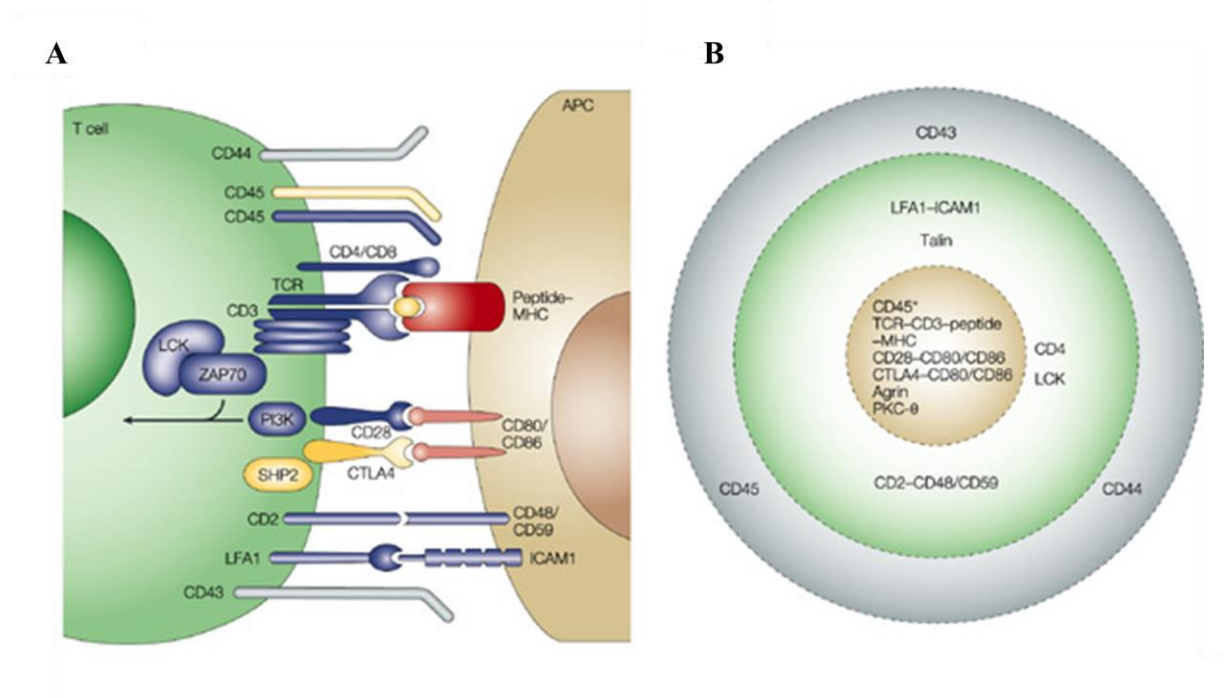
Elle comporte au niveau central la zone c-SMAC (central supramolecular cluster) avec comme acteur principal le TCR, portant la spécificité de reconnaissance de l'antigène présenté par le CMH). Le complexe peptide-CMH/TCR constitue le « premier signal ».

Proche du complexe peptide-CMH/TCR, et toujours dans la zone c-SMAC, se trouvent les molécules dites de co-stimulation qui jouent un rôle majeur dans la modulation de la réponse T. Il s'agit du « second signal ». Cette interaction transmet des signaux activateurs ou inhibiteurs à la cellule T, en fonction du couple ligand (présent sur la CPA ou la cellule cible)/récepteur (de la cellule T) formé. Par exemple, les ligands B7-1/CD80 ou B7-2/CD86 de la cellule cible conduisent à des effets co-activateurs par interaction avec le récepteur CD28 et co-inhibiteurs avec le récepteur CTLA-4. Lors de l'interaction de la cellule T avec une cellule cancéreuse cible, une prédominance de signaux positifs va activer dans la cellule T des programmes de transcription induisant la sécrétion de cytokines et de granules cytolytiques qui seront relargués au niveau de la zone d'interaction, de manière à tuer la cellule cible sans endommager les cellules environnantes. A l'inverse, une prédominance de signaux de type négatifs (comme en fin de réponse immunitaire) va conduire les cellules T à l'apoptose. Les molécules de co-stimulation peuvent ainsi être considérées comme les régulateurs de la réponse T. Cette dernière peut être modulée de manière fine et dynamique en réponse à des modifications physiologiques, voire pathologiques (Greenwald et al., 2005). Les cellules cancéreuses ou infectées par des virus ou des bactéries peuvent présenter à leur

surface une surexpression des molécules de co-stimulation intervenant dans l'inhibition de la réponse T, ce qui peut aboutir à leur échappement au système immunitaire.

De manière plus périphérique à la synapse immunologique se trouve la zone p-SMAC (peripheral-SMAC), avec les molécules d'adhésion, indispensables à la stabilisation de l'interaction. Il s'agit pour la cellule T d'intégrines, tel que LFA-1 (Leucocyte Function-associated Antigen-1) dont le partenaire sur la cellule cible est ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1, CD54).

Les molécules de grosse taille ou glycosylées (telle que CD43 ou CD45) sont repoussées dans la zone la plus externe appelée d-SMAC (distal SMAC) (Figure 22)



**Figure 22** : Synapse immunologique. (A) La synapse immunologique et les molécules la composant, (ligands de la cellule présentatrice de l'antigène (APC) et récepteurs de la cellule T (vue de profil). (B) Vue de face. D'après (Huppa and Davis, 2003)

### II.3 Les membres de la famille B7

Les molécules de co-stimulation présentes au niveau des CPA et des cellules cibles appartiennent à la famille B7. Elles sont considérées comme des ligands. Les récepteurs se trouvent sur la cellule T et appartiennent à la famille CD28. Les molécules de type B7 ont des effets immunologiques régulateurs de la réponse T en fournissant comme nous l'avons vu des signaux de co-stimulation de type co-activateur ou co-inhibiteur. Le même ligand peut de plus

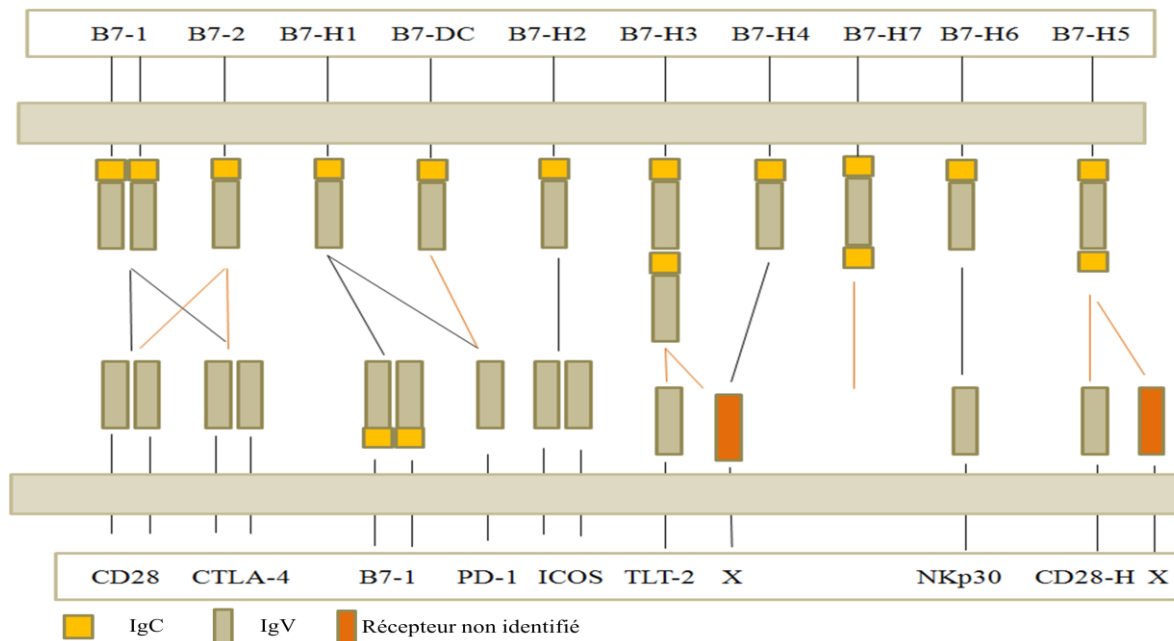
avoir des effets co-activateurs ou co-inhibiteurs, selon le récepteur avec lequel il va interagir sur la cellule T (Tableau 3).

Groupe	Molécules/ ou ligands de la famille B7	Récepteur correspondant ou récepteur de la famille CD28	Fonction
I	B7.1 (CD 80)	CD-28	Stimulation
		CTLA-4	Inhibition
	B7-2 (CD 86)	CD-28	Stimulation
		CTLA-4	Inhibition
	B7-H2 (CD275, L-ICOS)	ICOS	Stimulation
II	B7-H1 (PD-L1/CD274)	PD-1	Inhibition
		B7.1	Tolérance cellulaire
	B7-DC (PD-L2/CD273)	PD-1	Inhibition
III	B7-H3 (CD276)	Non identifié	Inhibition
		TLT2	Stimulation
	B7-H4 (VTCN1)	Non identifié	Inhibition
	B7-H7 (HHLA2)	?	?
Membres non classifiés	B7-H5	Non identifié	Inhibition
		CD28H	Stimulation
	B7-H6	NKp30	Stimulation

**Tableau 3** : Les différents membres de la famille B7.

Classification, récepteurs correspondants sur la cellule T (famille CD28) et fonction dans réponse immunitaire

D'un point de vue structural, ces molécules sont des protéines transmembranaires. Elles comportent un domaine extra membranaire, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire. La partie extracellulaire est constituée d'un domaine constant (IgC) et d'un domaine variable (IgV) des immunoglobulines (Carreno et al., 2005) (Figure 23)

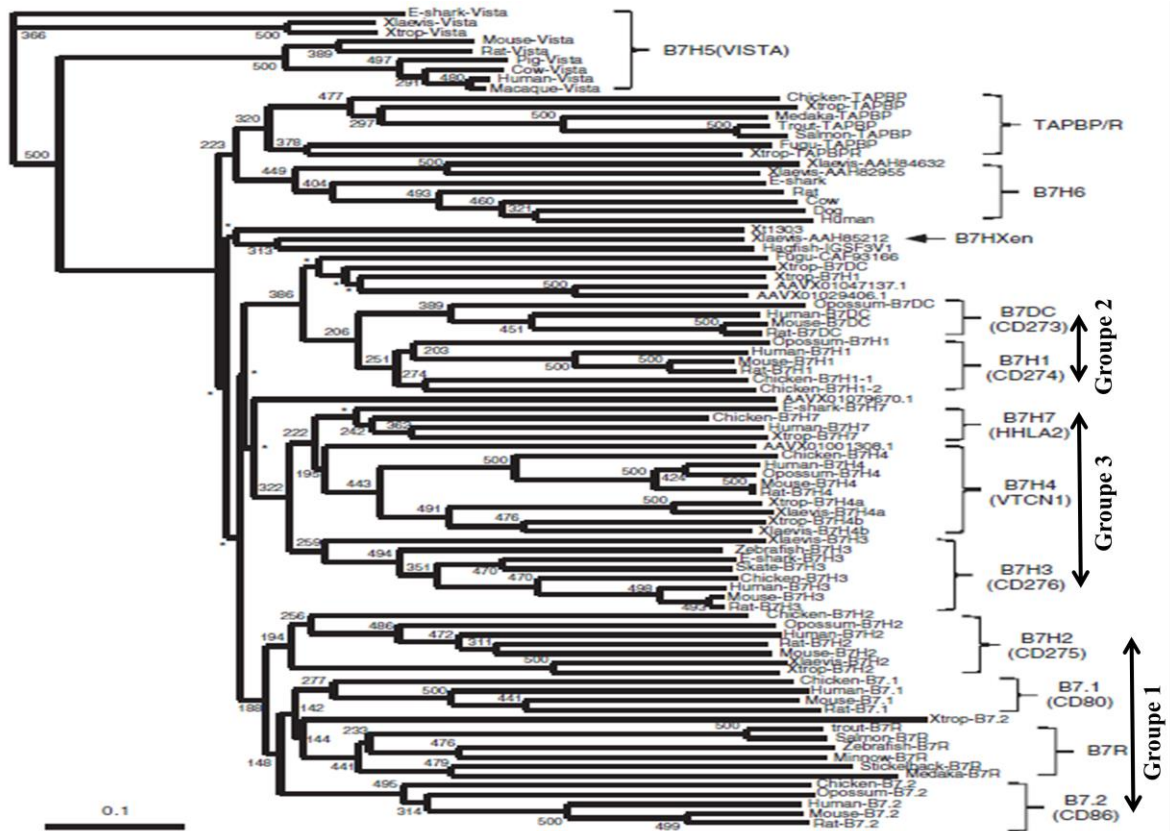


**Figure 23** : Structure de la famille de B7 et de leurs récepteurs d'interaction.

B7.1 (CD 80), B7-2 (CD 86), B7-H2 (CD275, L-ICOS), B7-H1 (PD-L1/CD274), B7-DC (PD-L2/CD273), B7-H3 (CD276), B7-H4 (VTCN1), B7-H7 (HHLA2).

La famille B7 est classiquement divisée en 3 groupes, qui sont fonction des molécules réceptrices présentes sur le lymphocyte T. Ils sont identifiables par classification phylogénétique (Flajnik et al., 2012; Hansen et al., 2009) (Figure 24). B7.H5 et B7.H6 s'ajoutent à ces 3 groupes.





**Figure 24** : Arbre phylogénétique des molécules de la famille B7. D'après (Flajnik et al., 2012)

### II.3.1 Groupe I : B7-1/CD80, B7-2/CD86 et B7-H2/CD275

Les molécules B7-1 et B7-2 sont exprimées au niveau des CPA, tels que les lymphocytes B, les macrophages ou les cellules dendritiques. Elles se lient à leurs récepteurs co-activateurs, le CD28 ou co-inhibiteur, le CTLA4. La fixation de B7-1 ou de B7-2 sur le CD28 des lymphocytes T fournit des signaux stimulateurs qui sont nécessaires à l'activation des cellules T. Cela a pu être montré lors d'études indiquant que la réponse des cellules T est fortement inhibée chez des souris CD28 knock-out (KO) (Borriello et al., 1997; Schweitzer and Sharpe, 1998). L'interaction de CTLA-4 avec ces mêmes ligands agit comme un régulateur négatif de l'activation des lymphocytes T dépendant de CD28 (Sharpe and Freeman, 2002; Chen et al., 2004). La perte de CTLA-4 peut aboutir à une grave prolifération des cellules cibles (apparition de lymphoproliférations en particulier) et à une destruction multiviscérale mortelle suite une réponse auto-immune (Waterhouse et al., 1995). La voie B7-1/B7-2-CD28/CTLA-4 représente un signal co-stimulateur ou co-inhibiteur dans la modulation de la réponse des cellules T selon le récepteur impliqué

B7-H2 (ou ICOSL, Inducible Costimulator Ligand) est quant à lui exprimé par les lymphocytes B, les macrophages et par des cellules de type non lymphoïdes (cellules du trophoblaste, cellules épithéliales,...). Il induit un signal de co-activation en se fixant sur un autre membre de la famille CD28, ICOS (Hutloff et al., 1999; Mak et al., 2003). L'étude de souris déficientes en B7-H2 ou en ICOS montre que cette voie est nécessaire à l'activation des cellules T de type CD4 et la mise en place de leurs fonctions effectrices (Dong et al., 2001; Nurieva et al., 2003).

### **II.3.2 Groupe II : B7-H1 (PD-L1/CD274) et B7-DC (PDL2/CD273)**

Au niveau ARNm, B7-H1 est exprimée de manière abondante et constitutive par de nombreux types cellulaires (hématopoïétiques ou non), mais peu d'entre eux expriment cette protéine immuno-inhibitrice à leur surface. Sa sur-expression membranaire a par contre été reportée dans de nombreux types de cancers. Les données concernant B7-H1 seront développées ultérieurement.

B7-DC est structurellement similaire à B7-H1, mais contrairement à cette dernière, son expression est plus restreinte. Elle est constitutivement trouvée au niveau cellules B péritonéales quiescentes. Elle peut de plus être induite à la surface des cellules dendritiques, des macrophages et des mastocytes de la moelle osseuse.

B7-H1 et B7-DC ont un récepteur commun, PD-1 (Dong et al., 1999; Latchman et al., 2001), qui est exprimé à la surface des lymphocytes T activés (Agata et al., 1996; Nishimura et al., 2000), et leur confère un rôle co-inhibiteur. L'interaction de B7-H1 et B7-DC avec PD-1 contrôle en particulier l'induction et la maintenance de la tolérance immunitaire périphérique (Carter et al., 2002). Il a également été démontré que l'interaction de B7-H1 avec B7-1/CD80 est nécessaire pour l'induction et le maintien des fonctions de tolérance des cellules T, au niveau périphérique (Park et al., 2010). Le rôle clé de B7-H1 dans la médiation de la tolérance immunitaire est souligné par le fait que les souris qui sont dépourvues de B7-H1 développent lentement des maladies auto-immunes (Keir et al., 2006). Ce type d'interaction est également responsable de la déficience fonctionnelle de la réponse T CD8+ spécifique, au cours des infections virales chroniques et des transformations malignes (H. Dong et al., 1999 ; Latchman et al., 2001 ; Keir et al., 2006). Les données concernant les interactions de B7-H1 et de son récepteur PD-1 seront développées ultérieurement.

Bien que B7-H1 et B7-DC jouent un rôle majeur dans l'inhibition de la réponse T par interaction avec PD-1, il s'avère que d'autres récepteurs, encore non identifiés, jouent à

l'inverse le rôle de médiateurs dans une régulation positive de la réponse T (Butte et al., 2008). Ceci est notamment le cas lors des processus d'activation des cellules T naïves par les CPA, que ce soit pour B7H1 (Tamura et al., 2003) ou B7-DC (Tseng et al., 2001). En absence de l'expression du récepteur PD-1, B7-H1 peut également augmenter la réponse cytotoxique des lymphocytes T (Saudemont et al., 2005), ce qui peut être inhibée à l'aide d'anticorps bloquant B7-H1. Ceci a été montré dans un modèle murin d'inflammation intestinal chronique (Kanai et al., 2003) et indique des interactions possibles avec un récepteur de type activateur. La fonction activatrice de B7-DC dans la réponse T cytotoxique a également été montrée *in vivo* (Shin et al., 2005).

En condition physiologique, on peut dire que ces récepteurs ont un rôle de co-stimulation positive en présence des CPA (récepteur inconnu), et négative en présence des cellules cibles infectées ou cancéreuses (avec comme récepteur PD-1, en conduisant les cellules T à l'anergie ou à l'apoptose).

La voie (B7-H1/B7-DC)-(PD-1/récepteur X), pourrait fonctionner sur un modèle similaire à la voie (B7-1/B7-2)-(CD28/CTLA-4), qui induit un signal co-stimulateur ou co-inhibiteur dans la modulation de la réponse des cellules T, selon le récepteur mis en jeu.

### **II.3.3 Groupe III : B7-H3/CD276, B7-H4/VTCN1 et B7-H7/HHLA2**

L'expression des ARNm et des protéines de B7-H3 et B7-H4 a été identifiée dans des cellules de type lymphoïde ou non, ainsi que dans différents organes périphériques (Chapoval et al., 2001). Ces molécules sont fortement exprimées lors de l'activation des cellules dendritiques par les lipopolysaccharides LPS (Sun et al., 2002). Bien que la transcription de B7-H4 soit très active dans les tissus périphériques et dans les cellules stromales ou hématopoïétique, la protéine est absente dans la plupart des tissus somatiques et seulement détectée au niveau des cellules épithéliales du rein, du poumon et du pancréas. B7-H3 et B7-H4 sont classiquement associés à des fonctions co-inhibitrices, mais les récepteurs correspondants n'ont pas encore été identifiés, ce qui rend difficile les analyses fonctionnelles et l'étude de leur rôle dans la régulation des cellules T. B7-H3 permet l'inhibition des réponses induites par les CD4<sup>+</sup> et la lyse médiée par les NK. B7-H4 conduit au blocage de la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et de la production de cytokines (Prasad et al., 2003). Un récepteur à activité co-activatrice, le TREM-like transcript 2 (Triggering receptor expressed on myeloid cells) a également été décrit pour B7-H3 (Hashiguchi et al., 2008) B7-

H3 peut permettre de stimuler la prolifération des cellules T, la sécrétion de cytokines et l'activité cytotolytique (Suh et al., 2003).

Deux autres membres de la famille B7 ont été décrits récemment : B7-H5 et B7-H6. B7-H5 (PD-L3/VISTA) est phylogénétiquement dérivé d'un précurseur différent de l'ensemble des autres membres de la famille B7 (Flajnik et al., 2012). Cette molécule, constitutivement exprimée chez les macrophages et inductible chez les cellules dendritiques, a initialement été décrite comme possédant des fonctions co-inhibitrices (Wang et al., 2011). Cependant, un récepteur de co-activation vient très récemment d'être découvert (CD28H, CD28 homologue) (Zhu et al., 2013). Il permet l'activation des cellules T et la production de cytokines par l'intermédiaire d'une cascade Akt dépendante.

B7-H6 est l'un des premiers précurseurs de la famille B7 (Flajnik et al., 2012). Cette molécule, indétectable dans les tissus normaux est exprimée par les cellules cancéreuses (Brandt et al., 2009). Elle se lie à NKp30, un récepteur d'activation des cellules NK, ce qui permet leur élimination (Baratin and Vivier, 2010).

B7-H7 a été découverte récemment. Sa séquence est très proche de B7-H4. Il a été identifié chez l'homme dans différents tissus (colon, rein, poumon) ainsi que chez les lymphocytes. Sa fonction reste à définir (Flajnik et al., 2012).

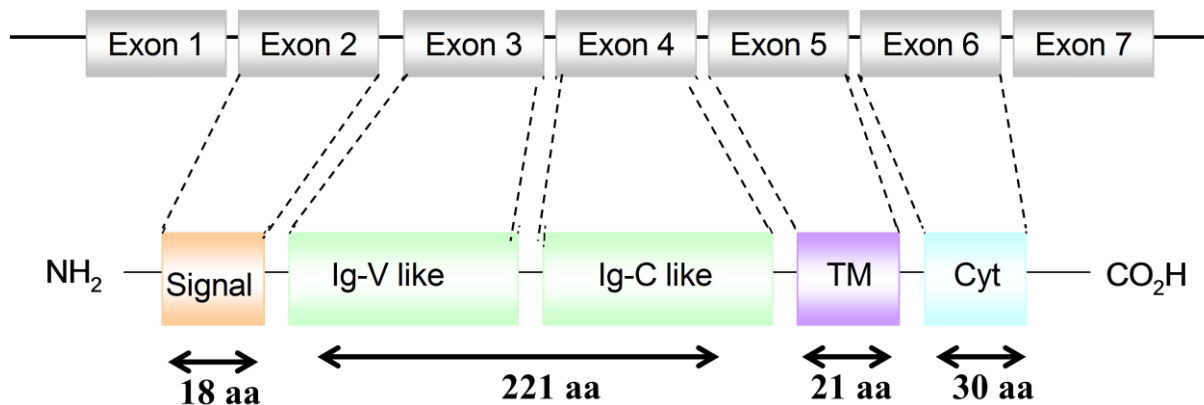
De part leur rôle co-activateur ou co-inhibiteur au niveau des synapses immunologiques, les molécules de la famille B7 sont des acteurs clés de la régulation de la réponse immunitaire. B7-H1 est particulièrement étudiée car elle a fréquemment été montrée comme jouant un rôle inhibiteur de la réponse T cytotoxique, suite à sa surexpression à la surface de cellules cibles infectées par des virus, des bactéries ou de cellules cancéreuses.

## **II.4 La molécule B7-H1**

### **II.4.1 B7-H1**

Comme indiqué précédemment, la protéine B7-H1 appartient au groupe II de la famille B7. Elle est codée chez l'homme par le gène *CD274* situé sur le bras court du chromosome 9 (9p24.1). Le gène comprend 7 exons dont le premier est non codant et comprend la partie 5'UTR. Les trois exons suivants codent pour la séquence signal, le domaine extracellulaire IgV et IgC-like. Les exons 5 et 6 codent pour les domaines transmembranaire et intracellulaire. Le dernier exon comprend la séquence 3'UTR et la partie terminale du domaine intracellulaire (Keir et al., 2008).

Au niveau transcriptomique, B7-H1 est exprimé par une large gamme de cellules de type hématopoïétique dont les APC (lymphocytes B, macrophages, DC), les lymphocytes T, les monocytes, les NK, ainsi que par de nombreux types de cellules non-hématopoïétiques (cellules épithéliales, endothéliales, cardiaques, pulmonaires,...). Cinq variants d'épissage ont été recensés, mais pour trois d'entre eux, aucun produit protéique n'a été identifié ([http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000120217;r=9:5450503-5470566](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000120217;r=9:5450503-5470566)). La protéine B7-H1 (PD-L1, Programmed Death 1 Ligand ou CD274) est une protéine transmembranaire de type I de 290 acides aminés (40kDa). Elle comporte une séquence signal de 18 aa, un domaine extracellulaire comprenant les séquences Ig-V like et Ig-C like de 221 aa, un domaine transmembranaire de 21 aa et un domaine intracellulaire de 30 aa (Figure 25).



**Figure 25** : Représentation schématique de la structure du gène codant B7-H1 et de la protéine B7-H1. Cyt: domaine cytosolique. TM: domaine transmembranaire.

B7-H1 est un ligand d'immunosuppression majeur de PD-1, important pour la modulation de la réponse T (Bour-Jordan et al., 2011). Bien qu'étant retrouvé au niveau transcriptionnel dans de nombreux types cellulaires, peu d'entre eux l'expriment au niveau protéique en conditions physiologiques normales. B7-H1 est exprimée de manière constitutive à la surface des macrophages (Dong and Chen, 2006). Elle peut également être exprimée à la membrane des cellules de tissus lymphoïdes ou non lymphoïdes de type périphérique, après activation (notamment pour contribuer à l'arrêt de la réponse immunitaire). Une surexpression membranaire aberrante a par contre été fréquemment rapportée lors de situations pathologiques. Ceci est le cas de nombreux cancers (mélanomes, myélomes, lymphoproliférations, cancers du sein, du poumon, des ovaires, du colon,...) ( Dong et al., 2002; Wang and Chen, 2011; ) ou lors d'infections virales chroniques, comme pour le HIV, de l'hépatite C ou d'une infection par le rhinovirus (Dong et al., 2002; Wang and Chen, 2011). De même, l'expression de B7-H1 est fortement augmentée à la surface des cellules B

infectées par l'EBV et en programme de prolifération (latence III) (Y. S. Kim et al., 2008). La signalisation PD-1/B7-H1 est considérée comme contribuant à l'échappement au système immunitaire des cellules tumorales ou lors d'infections chroniques.

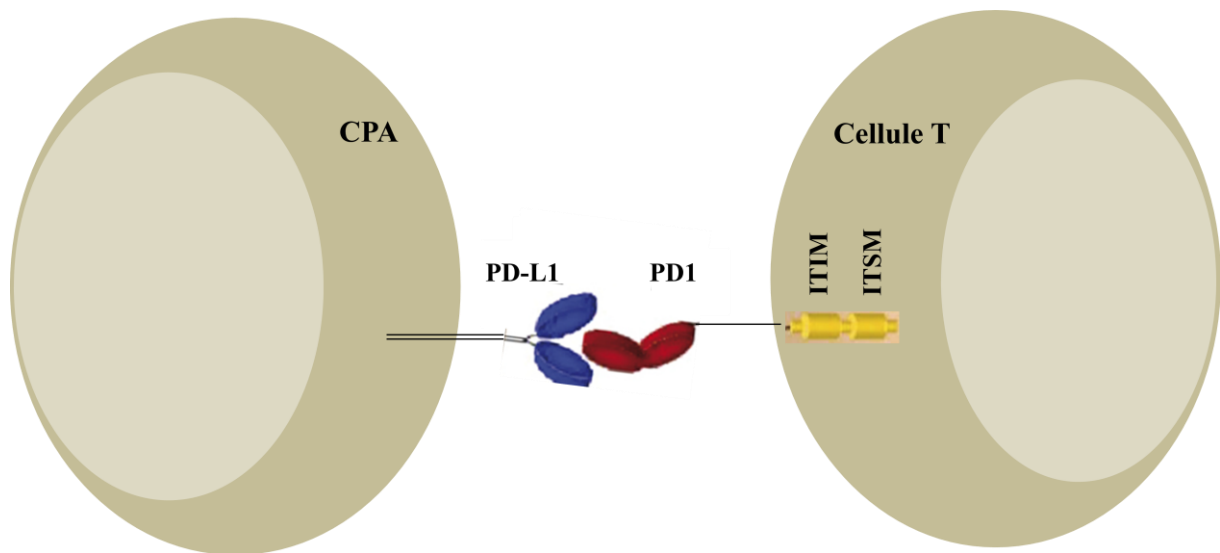
Chez l'homme, il existe un seul variant, qui ne comprend pas le domaine IgV like codé par l'exon 3 (délétion des acides aminés 17 à 130). Il est décrit comme étant localisé au niveau des membranes intracellulaire et incapable de se lier au récepteur PD-1 (X. He et al., 2005). Il a par contre été décrit récemment une forme soluble de B7-H1 (sB7-H1), produite par des cellules cancéreuses et pour laquelle le domaine de fixation au récepteur est maintenu. Elle est capable de jouer un rôle dans l'inhibition de la réponse T *in vivo* (par induction de signaux pro-apoptotiques), avec une valeur pronostic défavorable (Frigola et al., 2011). Cette forme soluble est également produite par les DC matures activés suite à la réponse immunitaire innée (et non par les DC immatures, les macrophages, les monocytes ou les cellules T). Elle a un effet pro-apoptotique sur les cellules CD8<sup>+</sup> (Frigola et al., 2012)

Par ailleurs, la protéine B7-H1 ne semble pas activer de voie de signalisation que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Cependant, il a été suggéré que dans des conditions particulières, elle puisse le faire en induisant des processus pro-apoptotiques chez les cellules cibles lors de sa fixation sur PD-1. En effet, il a été montré que des cellules infectées par l'EBV et surexprimant B7-H1 peuvent entrer en apoptose, avec perte de leur potentiel transmembranaire mitochondrial, suite à leur incubation avec un anticorps anti-B7-H1 spécifique. Ces cellules surexpriment de plus le Fas-ligand, ce qui les sensibilise à l'apoptose *via* la voie Fas/Fas ligand (Y. S. Kim et al., 2008). L'ensemble de ces données suggèrent que l'immunobiologie de B7-H1 est sans doute très complexe, avec des effets activateurs ou inhibiteurs selon le(s) récepteur(s) mis en jeu, en fonction des situations physiologiques ou pathologiques. Il est probable que cette protéine joue un rôle majeur encore non pris en compte lors des traitements anti-cancéreux. Il est donc important d'étudier son mode de régulation notamment dans le cas de cellules B en latence III de l'EBV.

#### **II.4.2 PD-1/CD279, récepteur de B7-H1**

Il est important de tenir compte des interactions B7-H1/PD-1 et de leur conséquence sur la réponse T dans la mesure où ce sont-elles qui vont définir le rôle de B7-H1 dans le processus de tumorigenèse et d'échappement des cellules tumorales au système immunitaire. PD-1 est exprimé par les lymphocytes T cytotoxiques. Il est le récepteur des ligands du groupe II de la famille B7 comprenant B7-H1 et B7-DC, présents sur les CPA d'une part et sur les cellules cibles d'autre part. Il s'agit d'un régulateur négatif majeur de la réponse T.

PD-1 est une protéine de 55 kDa appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Cette protéine est composée d'un domaine extracellulaire IgV, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire avec des motifs à tyrosine impliqués dans sa signalisation (Figure 26)

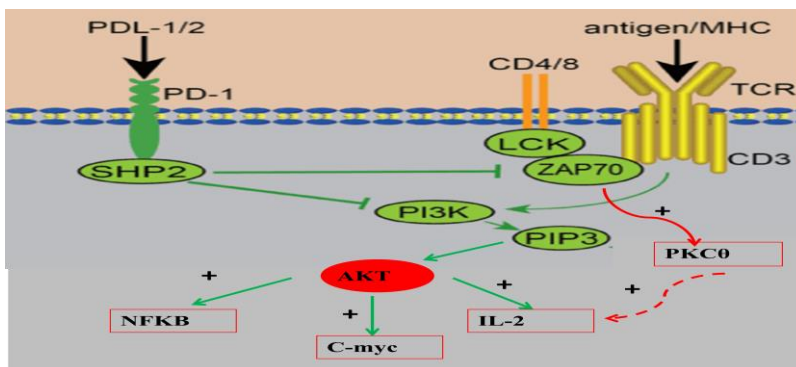


**Figure 26** : Structure du récepteur PD-1 avec les motifs ITIM et ITSM.  
ITIM: Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif. ITSM: Immunoreceptor tyrosine-based switch motif.

PD-1 est exprimé de manière constitutive et à un faible niveau sur les lymphocytes T naïfs, afin de moduler les signaux d'activation qui pourraient être à l'origine de phénomènes d'auto-réactivité (Fife and Bluestone, 2008). Lors de l'interaction CPA/T naïfs, PD-1 interagit préférentiellement avec B7-DC, mais si les CPA sont peu actives et peu nombreuses, comme dans le cas d'une infection chronique, PD-1 interagit également avec B7-H1, ce qui va induire une augmentation de l'expression de PD-1. Cette surexpression va conduire à une signalisation inhibitrice au niveau des lymphocytes T, contribuant au maintien de l'infection chronique (Pentcheva-Hoang et al., 2007). Toutefois, comme déjà indiqué, durant l'interaction CPA/T naïf, les ligands B7-H1 et B7-DC des CPA interagissent plus particulièrement avec un récepteur autre que PD-1, encore non identifié, impliqué dans un signal co-activateur.

L'activation des cellules T naïves conduit à une expression plus importante de PD-1 à leur surface. Par ailleurs, PD-1 est retrouvé en particulier à proximité de la membrane plasmique, de l'appareil de Golgi et du trans-Golgi, impliqués dans les processus de sécrétion (Pentcheva-Hoang et al., 2007).

Lorsque des cellules cibles exprimant à leur surface les ligands inhibiteurs B7-H1 et/ou B7-DC (cellules infectées ou cancéreuses) interagissent avec les T cytotoxiques activés il s'en suit une réponse inhibitrice, conduisant les cellules T à l'anergie ou à l'apoptose. D'un point de vue moléculaire (Figure 27), l'interaction PD-1/B7-H1 (ou PD-1/B7-DC) conduit à la phosphorylation des motifs à tyrosine ITIM « Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs » et ITSM « Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motifs » situés au niveau de la queue cytoplasmique. Ceci conduit au recrutement de la phosphatase Shp2 (Src homology 2-containing tyrosine phosphatase) qui va déphosphoryler la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). Cette dernière devient alors incapable d'activer Akt, (protéine kinase à sérine/thréonine) responsable de l'activation, de la prolifération et de la survie des lymphocytes T (New et al., 2007). Akt sous sa forme phosphorylée est en effet responsable de l'activation de NF- $\kappa$ B et de C-myc, qui sont des facteurs promoteurs de la prolifération et de la survie cellulaire et répresseurs de l'apoptose (Jones et al., 2005). L'activation d'Akt favorise également la production d'IL-2 (molécule stimulant la prolifération cellulaire). La signalisation de PD-1 conduit de plus à l'abolition de la signalisation du TCR en bloquant la phosphorylation de CD3, de ZAP70 et de PKC $\theta$  (Sheppard et al., 2004).



**Figure 27** : Voie de signalisation du récepteur PD-1 activé par B7-H1 (PD-L1) ou B7-DC (PD-L2). PDL1/2: Programmed cell death 1 ligand ½. PD-1: Programmed cell death 1. PIP3: Phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate. PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase. ZAP70: Zeta-chain-associated protein kinase 70. LCK: lymphocyte-specific protein tyrosine kinase. MHC: major histocompatibility complex. TCR: T cell receptor. CD3: cluster of differentiation 3. IL-2: Interleukine 2. Modifié d'après (Li et al., 2013)

L'expression de PD-1 à la surface des T activés est également impliquée dans la limitation de la durée et de l'ampleur de la réponse immunitaire adaptative. Elle permet, grâce à sa fonction inhibitrice d'éteindre la réponse immunitaire lorsque l'infection est endiguée ou les cellules tumorales éliminées.

Lorsque l'expression de PD-1 est importante à la surface des lymphocytes T CD8+, de même que celle de B7-H1 sur les cellules cibles, et que les interactions sont prolongées il se met en



place ce que l'on appelle un épuisement lymphocytaire T. Ce phénotype est défini par une perte des fonctions effectrices et une persistance d'expression des récepteurs inhibiteurs (Wherry, 2011). Les lymphocytes T épuisés perdent peu à peu leurs fonctions effectrices, y compris leur capacité à proliférer et à exprimer certaines cytokines. Elles perdent également l'expression de molécules cytotoxiques effectrices telles que la perforine, pour finalement entrer en apoptose (Wherry, 2011). Les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas totalement élucidés. Dans certaines situations pathologiques, la surexpression de PD-1 peut conduire à l'anergie ou à la mort par apoptose des cellules T cytotoxiques, et perturber la réponse immunitaire adaptative. Des lymphocytes T CD8 + sur-exprimant à leur surface PD-1 ont été identifiés parmi les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TIL) dans le cas de cancers ou d'infections virales chroniques (Wherry, 2011).

### **II.4.3 Fonctions physiologiques et pathologiques des interactions PD-1/B7-H1**

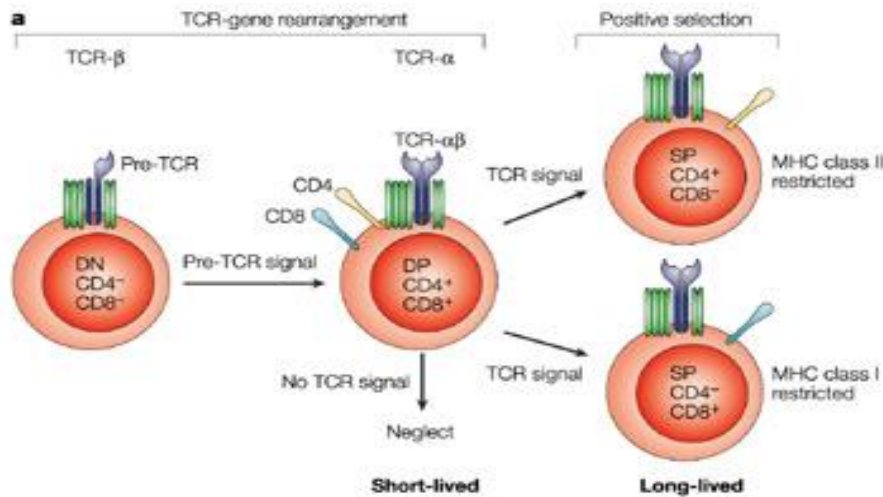
Un intérêt particulier a été porté récemment aux interactions entre B7-H1 et PD-1, compte-tenu de leur rôle dans de nombreux processus pathologiques, tels que les maladies auto-immunes, les néoplasies, ou les infections virales chroniques HIV ou HCV (hepatitis C virus).

#### **II.4.3.1 Fonction physiologique**

D'un point de vue physiologique, la voie PD-1/B7-H1 est importante dans différents processus, en particulier dans le développement de la tolérance centrale (sélection des cellules T non auto-réactives) et périphérique (intervenant dans la finalisation des réponses non autoréactives ou la tolérance de certains antigènes exogènes). Elle intervient également pour limiter durée et l'ampleur de la réponse immunitaire adaptative.

Le développement de la tolérance centrale des cellules T a lieu dans le thymus. Au cours de la différenciation thymique, les cellules se différencient tout d'abord en lymphocytes T exprimant CD4, CD8 et le récepteur T à l'antigène mature (TCR). Il y a ensuite une sélection positive au niveau du cortex thymique où ils entrent en contact avec les antigènes peptidiques présentés par les molécules du CMH des cellules épithéliales. Ceux se liant avec forte affinité vont survivre et perdre le marqueur CD4 s'il s'agit du CMH de classe I (T CD8+) ou le marqueur CD8 s'il s'agit du CMH de classe II (T CD4+) (Figure 8). En résumé, les lymphocytes T qui reconnaissent le CMH du soi présentant un peptide sont gardés, les autres meurent par apoptose. Ces cellules CD4+ ou CD8+ migrent ensuite au niveau de la médulla

thymique où elles sont à nouveau mises en contact avec des peptides du soi (auto-antigènes) présentés par les cellules dendritiques ou épithéliales médullaire, complexés avec les molécules du CMH. Celles formant une interaction vont alors être activées et mourir par apoptose (sélection dite négative). On élimine ainsi les lymphocytes auto-réactifs reconnaissant les peptides du soi.



**Figure 28** : Différenciation de lymphocytes T lors du développement de la tolérance centrale. DN: double négatif, DP: double positif, SP: simple positif. CMH: major d'histocompatibility complex. TCR: T cell receptor. D'après (Bosselut, 2004)

Même si de nombreux points restent à élucider, différents éléments suggèrent que les interactions PD-1/B7-H1 sont importantes pour le développement des cellules T. PD-1 et B7-H1 sont exprimés par les cellules T (Nishimura et al., 1996; Keir et al., 2005). PD-1 est également surexprimé sur les cellules du thymus impliquées dans la sélection des lymphocytes T (Keir et al. 2005). De plus, L'absence de PD-1 au niveau des cellules du thymus conduit à l'émergence accrue de cellules T double négatifs pour CD4 et CD8 (Blank et al., 2003). Il semble donc que les interactions PD1/B7-contribuent à sélectionner les cellules se liant avec le plus d'affinité lors de la sélection positive.

Le rôle crucial des interactions PD-1/B7-H1 a été clairement établi dans le développement de la tolérance périphérique (contrôle des réactions auto-immunes résiduelles et tolérance d'antigènes exogènes). La qualité des interactions PD-1/B7-H1 contribue à éviter les réactions auto-réactives des T périphériques. Chez l'homme, les polymorphismes de PD-1 ont été épidémiologiquement liés à des maladies auto-immunes comme le lupus érythémateux

systémique (Nielsen et al., 2004), la polyarthrite rhumatoïde (Prokunina et al., 2004), la sclérose en plaques (Kroner et al., 2005) ou le diabète de type I (Nielsen et al., 2003). Par ailleurs, une carence génétique de PD-1 peut entraîner des maladies auto-immunes spontanées comme la cardiomyopathie (Nishimura et al., 2001) De plus, l'administration d'anticorps bloquant PD-1 ou B7-H1 conduisent à l'aggravation de différentes maladies auto-immunes chez des modèles murins, tels que le diabète de type I, les encéphalomyélites allergiques ou les entérites auto-immunes (Ansari et al., 2003; Salama et al., 2003; Reynoso et al., 2009). Les interactions PD-1/B7-H1 contribuent également à la suppression des réponses inflammatoires aux antigènes exogènes (Usui et al., 2008), en particulier au niveau du système nerveux central (ce compartiment est isolé du système hématopoïétique ce qui rend difficile la mise en place d'une tolérance centrale suffisante) ou du placenta (tolérance du fœtus).

De plus, afin de limiter la réponse immunitaire adaptative, l'activation des cellules T, des cellules B, des monocytes et des DC induit l'expression de PD-1 à leur surface, tandis que B7-H1 devient positivement régulé à la surface des T activés. Ceci conduit à l'inhibition de la réponse T et permet de limiter l'ampleur et la durée de la réponse immunitaire adaptative (Keir et al., 2008).

#### **II.4.3.2 Fonctions pathologiques**

D'un point de vue pathologique, les fonctions de la voie PD-1/B7-H1 sont fréquemment altérées, comme il est souvent observé dans les cancers, les infections chroniques ou les maladies auto-immunes (Keir et al., 2008).

La sur-expression de B7-H1 est reconnue comme un des mécanismes interférant avec l'immunité anti-tumorale dans un nombre croissant de tumeurs solides et hématopoïétique (Zhang and Strome, 2004; Thompson et al., 2007). Les cellules cancéreuses sur-expriment B7-H1 à leur surface, ce qui provoque l'anergie des cellules T effectrices par liaison à leur récepteur PD-1 et empêche leur élimination. Dans le cas de nombreuses tumeurs, l'expression de B7-H1 est corrélé avec un mauvais pronostic (Thompson et al., 2007; Keir et al., 2008).

Une dérégulation de la voie PD-1/B7-H1 est également fréquemment retrouvée lors d'infections bactériennes ou virales chroniques. Le fait d'interférer avec cette voie inhibitrice permet alors d'améliorer le contrôle de l'agent infectieux par les lymphocytes T. PD-1 est par exemple fortement exprimé sur les lymphocytes T de patients atteints de tuberculose mycobactérienne (infection chronique par *Mycobacterium tuberculosis*) et l'utilisation d'anticorps bloquants dirigés contre PD-1, B7-H1, ou ces deux molécules, permet de restaurer

l'activité antibactérienne des lymphocytes T cytotoxiques CD8 + (Jurado et al., 2008). La surexpression de PD-1 est également observée dans différentes infections chroniques associées à des virus comme le HTLV (Human T-cell Lymphotropic Virus), le LCMV (Lymphocytic Choriomeningitis Virus), l'HCV (Hépatite C Virus), ou le HIV (Barber et al., 2006 ; Day et al., 2006; Golden-Mason et al., 2007).

Des défauts de la voie PD-1/B7-H1 ont été observés dans de nombreuses pathologies auto-immunes. Des souris déficientes dans cette voie présentent un phénotype auto réactif au niveau des tissus périphériques. Par ailleurs, des souris knock out (KO) pour PD-1, développent des pathologies auto-immunes (arthrite du lupus, glomérulonéphrite, cardiomyopathie,...). Par contre, une absence de B7-H1 conduit seulement à une accumulation de lymphocytes T CD8+ non fonctionnels dans les organes périphériques sans manifestation auto-immune (Greenwald et al., 2005; Keir et al., 2008). Cela est possiblement dû au fait que PD-1 possède un second ligand inhibiteur, B7-DC, qui peut se substituer à B7-H1.

Les fonctions de la voie PD/B7-H1 sont perturbées dans de nombreuses affections néoplasiques, infectieuses ou auto-immunes. Les études relatives à cette voie et la compréhension de son fonctionnement ont déjà permis d'en tenir compte dans de nombreuses applications cliniques.

## **II.4.4 B7-H1 et cancer**

### **II.4.4.1 Expression de B7-H1 par les cellules tumorales**

L'expression des membres de la famille B7 tels que B7-H1, B7-H3 ou B7H4 est retrouvée chez un grand nombre de tumeurs malignes de type hématopoïétique ou solide (Tableau 4). La sur-expression de l'immuno-inhibiteur B7-H1 a en particulier été identifiée pour de nombreuses hémopathies malignes (leucémies, tumeurs thymiques, myélomes multiples,...) ou pour différents cancers solides (sein, côlon, œsophage, estomac, rein, foie, poumon, ovaire, pancréas, cancer urothélial, glioblastome, mélanome,...) (Tamura et al., 2005; Boorjian et al., 2008). Une expression aberrante de B7-H1 a également été observée lors de différentes infections virales chroniques (HIV, hépatite C, rhinovirus, EBV) (Dong et al., 2002 ; Kim et al., 2008 ; Wang and Chen, 2011). Il est à noter que B7-H1 peut ne pas être exprimé ou l'être à de faibles niveaux chez certaines lignées tumorales murines ou humaines correspondant à ces différents types cellulaires, probablement compte-tenu de la modification du microenvironnement cellulaire.

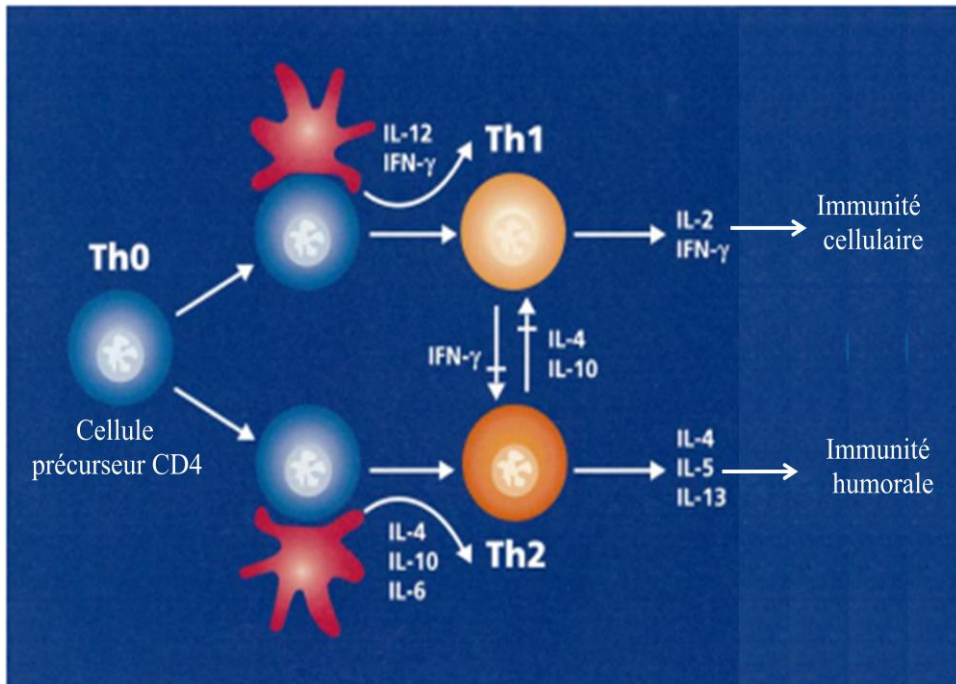
Molecule	Cancer type	Specimen analyzed	Samples analyzed (n)	Frequency (%)	Clinical association	Refs
B7-H1	Acute myeloid leukemia (AML)	Blood	58	2.8	Poor survival	[34]
	Bladder urothelial carcinoma	Lesions	65	100	High frequency of relapse and poor survival	[61]
		Lesions	280	36.1	Grading and infiltration with mononuclear cells	[38]
	Breast cancer	Lesions	69	60	High risk grading, Ki-67 expression	[37]
		Lesions	44	50	Grading and hormone receptors	[99]
	NSCLC	TIL	44	34	Tumor size, grading, HER-2/neu (ERBB2) status	
		Lesions	52	100	Not associated with metastasis, focal expression, reciprocal correlation with TIL	[46]
	Pancreatic cancer	Lesions	40	38.2	Associated with poor tumor differentiation, advanced tumor stage	[41]
	RCC	Lesions	306	23.9	Disease progression, increased overall mortality	[100,101]
		Lesions	298	23.5	Increased risk of death	[102]
		Lesions	196	37.2	Threefold increased risk of death	[103]
		TIL	267	56.6	Advanced disease, increased risk of death	[58]
Vasculature		259	18.2	Threefold increased risk of death	[62]	
B7-H3	Gastric carcinoma	Lesions	102	85.8	Tissue infiltration depth and survival time	[60]
	NSCLC	Lesions	70	37	High levels of expression associated with metastasis, reduced numbers of TILs associated with lymph node metastasis	[51]
Prostate cancer	Lesions	823	93	Metastatic spread, increased risk of recurrence and death, poor outcome	[52]	
	Lesions	338	100	Disease progression and clinical outcome, variable staining pattern associated with Gleason score	[50]	
B7-H4	Breast	Primary	173	95.4	Increased staining intensity in invasive carcinomas associated with negative hormone receptor status, independent of tumor grade and stage	[104]
		Metastases	246	97.6		
	NSCLC	Lesions	70	43	Reduced number of TILs associated with lymph node metastasis	[51]
		Lesions	90	100	Inverse correlation with the number of tumor-associated lymphocytes	[105]
	Endometrioid adenocarcinomas	Cells	12	<5	-	[77]
		Macrophages	12	70		
	Primary endometrioid	Serous	32	100	Poor prognostic factor for survival, potential diagnostic marker	[106]
		Endometrioid	12	100		
	Pancreatic cancer	Metastases	30	100	Poor survival, inversely associated with TILs	[107]
		Lesions	51	27.5		
	Prostate cancer	Lesions	36	92	None	[52]
		Lesions	823	99	Metastatic spread, increased risk of recurrence and death, poor outcome	
	RCC	Vasculature	259	59.1 <sup>a</sup>	Threefold increase in risk of death	[62]
			81.5 <sup>b</sup>			
			6.5 <sup>c</sup>			
	Serum	101	53	Correlation with advanced tumor stage	[108]	

**Tableau 4** : Expression de B7-H1, B7-H3 et B7-H4 dans différents types de cancer et conséquences cliniques. D'après (Seliger et al., 2008).

L'expression de B7-H1 peut être augmentée à la surface de nombreux types cellulaires suite à un traitement par l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ), comme c'est le cas pour les lymphocytes T, les cellules NK, les macrophages, les cellules dendritiques myéloïdes, les lymphocytes B, les cellules épithéliales ou les cellules endothéliales vasculaires (Flies and Chen, 2007). Cette cytokine est un puissant régulateur positif de l'expression de B7-H1 pathologique (Greenwald et al., 2005; Keir et al., 2008). D'une manière générale, l'expression de B7-H1 est inducible par les interférons de type 1 (IFN- $\alpha$  et IFN- $\beta$ ) ou 2 (IFN- $\gamma$ ) (Schreiner et al., 2004; Mühlbauer et al., 2006). L'étude du promoteur de B7-H1 a montré qu'il existe deux sites de fixation pour IRF-1 (Interferon Response Factor 1) et qu'ils sont responsables de l'expression constitutive et inducible de cette molécule par les interférons, en particulier l'IFN- $\gamma$  (Freeman et al., 2000)

Lors de la réponse immunitaire, les lymphocytes T auxiliaires CD4<sup>+</sup> sont activés, et participent indirectement à la réponse immune cellulaire (Figure 29) ; ils se différencient en cellules de type Th1 ou Th2 qui sont caractérisées par les cytokines qu'elles produisent. Les Th1 sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, dont l'IFN- $\gamma$ . Ajouté à celui produit par les

cellules NK lors de la réponse immunitaire innée et par les lymphocytes CD8+ activés, il contribue à l'activation et à l'expansion des T cytotoxiques.



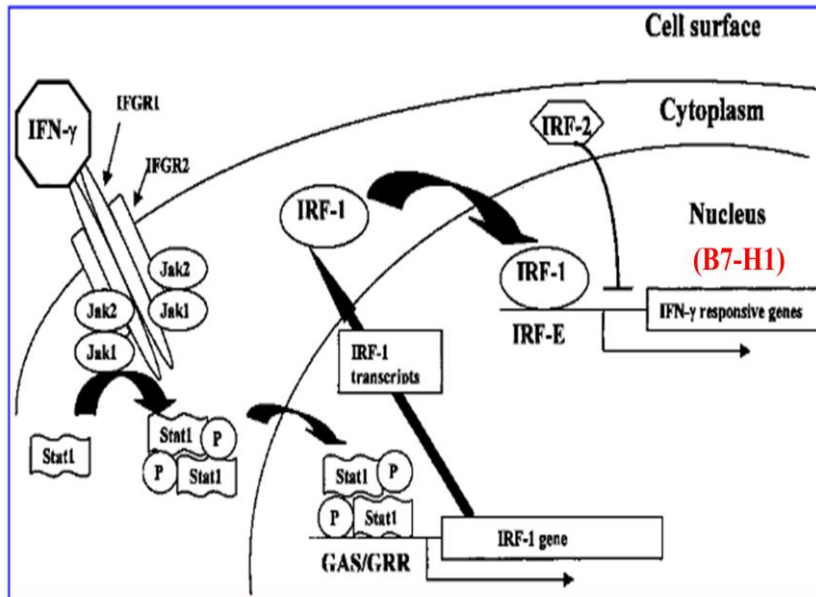
**Figure 29** : Différenciation des lymphocytes en type Th1 ou Th2.

Implication dans la sécrétion de l'IFN $\gamma$  au cours de la réponse immunitaire

Modifié d'après :

[http://www.google.fr/imgres?start=131&biw=1366&bih=628&tbnid=qxkHvZ9W7ZHfYM:&imgrefurl=http://www.longecity.org/forum/topic/23454-misminnis-regimen-for-curing-eczema/page\\_\\_st\\_\\_30&docid=V1](http://www.google.fr/imgres?start=131&biw=1366&bih=628&tbnid=qxkHvZ9W7ZHfYM:&imgrefurl=http://www.longecity.org/forum/topic/23454-misminnis-regimen-for-curing-eczema/page__st__30&docid=V1)

En condition physiologique, L'IFN- $\gamma$  produit permet de plus l'expression d'acteurs co-inhibiteurs, tel que B7-H1, ce qui permet entre autre de contenir la réponse immunitaire. En conditions pathologiques, la surexpression de B7-H1, suite à la production d'IFN- $\gamma$  dans le microenvironnement tumoral, peut contribuer à réprimer la réponse immunitaire anti-tumorale. La persistance de faibles niveaux d'IFN  $\gamma$  dans des conditions inflammatoires chroniques peut également entraîner une surexpression de B7H1, et favoriser le développement de tumeurs (Curiel et al., 2003). Dans le cas des cellules B infectées par l'EBV, l'activation constitutive de NF-kB est à l'origine de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  qui conduit à l'activation de STAT1 et de IRF-1, qui sont deux médiateurs de l'expression des gènes inductible par l'IFN- $\gamma$ , tel que B7-H1 (Figure 30) (Najjar et al., 2005)



**Figure 30** : Signalisation d'IFN  $\gamma$  et expression de B7-H1.

La fixation d'IFN- $\gamma$  sur son récepteur (IFGR1 et IFGR2) va induire sa dimérisation. La voie JAK va ensuite s'activer, ce qui va permettre la phosphorylation de Stat1, qui a son tour va se dimériser et se transloquer au niveau du noyau, se fixer sur le domaine GAS/GRR et permet la transcription du facteur de transcription IRF1. IRF1 à son tour se fixe au niveau du domaine IRF-E et va induire par la suite l'expression des différents gènes, dont B7-H1. D'après (Connett et al., 2003)

D'autres médiateurs inflammatoires, tels que le facteur de la nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ou le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), ont également été caractérisés comme des régulateurs positifs de l'expression de B7-H1.

#### II.4.4.2 B7-H1 et micro-environnement tumoral

La présence de l'IFN  $\gamma$  comme médiateur pro-inflammatoire dans le microenvironnement tumoral conduit à l'expression de B7-H1 par les cellules cancéreuses, mais également chez d'autres cellules associées à la tumeur. Cette molécule joue ainsi un rôle général dans la répression de l'immunité tumorale. Dans le cas des tumeurs myéloïdes, B7-H1 est par exemple exprimée à la surface des cellules infiltrant la tumeur tels que les lymphocytes T infiltrants (TILs), les macrophages, les fibroblastes ou les cellules dendritiques environnantes (Curiel et al., 2003).

L'expression de B7-H1 par les cellules cibles aboutit à l'anergie ou à l'apoptose des lymphocytes T CD8+ effecteurs, par interaction avec PD-1. De plus, l'expression de B7-H1 par les cellules NK et les macrophages contribue également à l'inhibition de l'activité antitumorale (Thompson et al., 2007). Son expression par les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TILs) est généralement associée à un mauvais pronostic. Les interactions PD-1/B7-H1 conduisent globalement à la diminution de la production d'IL-2 et IL-12, deux cytokines

clés de l'activité antitumorale à médiation cellulaire (Figure 29). Elle induit aussi une augmentation de la production d'IL-10 qui est un répresseur de cette dernière (Figure 29). Il a été montré que l'utilisation d'anticorps bloquant B7-H1 conduit à une augmentation de la production des cytokines antitumorales IL-2 et IL-12 et à une baisse de la production d'IL10 (Brown et al., 2003; Blank et al., 2006).

L'expression de B7-H1 à la surface des cellules tumorales, des CPA, ainsi que sur des cellules du micro-environnement de la tumeur, en particulier du stroma, constitue une base d'interactions dynamiques entre les tumeurs et le système immunitaire de l'hôte. Associée aux autres molécules de la famille B7 (générant des signaux co-activateurs et co-inhibiteurs), elle contribue à orchestrer la réponse immunitaire.

#### **II.4.4.3 Relevance de l'expression de B7-H1 dans les tumeurs**

Différentes molécules de la famille B7, telle que B7-H1, B7-H3 ou B7-H4 ont une activité immunosuppressive. Leur l'expression aberrante peut interférer négativement avec la réponse immunitaire de l'hôte par inhibition de la réponse T et conduire à la progression de la maladie. Leur expression est souvent associée à un mauvais pronostic et à des tumeurs de type agressif.

B7-H1 a été identifié pour la première fois dans le carcinome de l'ovaire. Cette molécule en se liant au PD-1 des cellules T activées, favorise la suppression immunitaire, ce qui maintient la croissance tumorale (Freeman et al., 2000). Dans le cas du cancer du sein, l'expression de B7-H1 est associée à des formes évolutives et de haut grade avec expression du marqueur de prolifération Ki-67 (Ghebeh et al., 2007). Le taux de survie des patients atteints d'un carcinome rénal est beaucoup plus faible lorsque la tumeur exprime B7-H1 que lorsqu'elle ne l'exprime pas (42% et 83%, respectivement) (Thompson et al., 2007). Des résultats similaires ont été rapportés dans le cas des cancers de la vessie, de l'œsophage, des carcinomes gastriques et pancréatiques (Boorjian et al., 2008; Loos et al., 2008; Nomi et al., 2007). L'expression de B7-H1 est associée à un stade avancé des tumeurs et à un risque augmenté de rechute. Elle peut être employée comme un marqueur pronostic pour identifier les patients à haut risque, qui peuvent ensuite bénéficier d'un traitement initial plus agressif.

Pour les carcinomes rénaux, l'expression combinée de B7-H1 et de B7-H4 a pu être associée à une survie réduite des patients par rapport à ceux dont les tumeurs sont négatives pour les deux protéines ou expriment seulement l'une des deux (Krambeck et al., 2006). B7-H1 et B7-H4 représentent des composantes suppressives du microenvironnement tumorales. Cependant,



la signification clinique de la co-expression de B7-H1 avec d'autres molécules de la famille B7 n'a pu être établie.

Par ailleurs, un ensemble de résultats très récents ont montré que les molécules de la famille B7, en particulier B7-H1, étaient largement liées au développement des leucémies et des lymphomes ( Li et al., 2012; Greaves and Gribben, 2013). Il a pu être mis en évidence un lien entre l'expression de B7-H1 et les myélomes multiples (Liu et al., 2007), ainsi qu'avec de nombreux lymphomes non hodgkiniens, tels que les lymphomes du manteau (L. Wang et al., 2013), les lymphomes anaplasiques à grandes cellules (ALCL) (Andorsky et al., 2011), les lymphomes B diffus à grandes cellules ou DLBCL (augmentation dans le sérum des patients de la forme soluble de B7-H1, sB7-H1) (Wilcox and Frigola Baro, 2010) ou encore les lymphomes T périphériques (Zou and Chen, 2008).

Les interactions PD-1/B7-H1 semblent jouer un rôle majeur dans le développement des lymphomes de Hodgkin (Yamamoto et al., 2008), en particulier dans les cas EBV positifs (70 000 cas diagnostiqués par an, dont la moitié environ est associée à l'EBV). PD-1 a été identifié comme surexprimé à la surface des cellules T CD8+ anti-EBV (Greenough et al., 2010). Par ailleurs, il a été montré une augmentation de l'expression de B7-H1 liée à l'activation constitutive du facteur de transcription AP-1 par les cellules de Reed-Sternberg (cellules malignes caractéristiques des lymphomes de Hodgkin), ainsi que par l'EBV (suite à l'activation constitutive de la voie JNK/AP-1 par LMP1) (Green et al., 2012). L'activation de la voie JAK/STAT par LMP1 conduit également à une augmentation de l'expression de B7-H1 (Dong et al., 2002 ; Green et al., 2012). Toute pathologie associant une augmentation de l'expression d'AP1, ou une infection par l'EBV (en particulier les lymphomes non hodgkiniens de Burkitt associés à l'EBV), est donc susceptible de mettre en jeu une inhibition de la réponse immunitaire T par expression de B7-H1.

Il est clairement établi que la surexpression de B7-H1 est associée à l'état tumoral et aux tumeurs de mauvais pronostic. La surexpression de cette protéine à la surface des cellules est donc susceptible de favoriser leur échappement à la surveillance du système immunitaire et de permettre l'émergence d'une tumeur, en particulier chez les sujets immuno déprimés, mais aussi éventuellement chez des sujets immunocompétents. L'EBV en favorisant l'expression de B7-H1 à la surface des cellules B en latence III est de même susceptible d'intervenir dans les processus de lymphomagenèse et de développement des tumeurs lymphocytes B associés au virus.

## II.4.5 PD-1 et B7-H1, des molécules cibles de la thérapie anticancéreuse

Les approches actuelles visent à la surexpression de molécules co-activatrices de la réponse immunitaire anti-tumorale, ou au blocage de molécules co-inhibitrices, qu'elles soient présentes au niveau des cellules tumorales, des lymphocytes T ou d'autres cellules de l'immunité. Ces tests sont en cours d'évaluation dans des modèles murins, et font également l'objet d'essais cliniques.

Les cellules cancéreuses expriment des antigènes spécifiques telles que des ligands inhibiteurs de la réponse T cytotoxiques, il est donc possible d'utiliser des immunothérapies ciblées à l'aide d'anticorps monoclonaux permettant de bloquer les récepteurs des cellules effectrices ou les ligands des CPA et des cellules tumorales.

Une voie particulièrement explorée est la voie PD1/B7-H1. De multiples études ont montré que B7-H1 est positivement régulé dans le cas de nombreuses tumeurs, et qu'il permet d'inhiber localement la réponse T anti-tumorale (Zou and Chen, 2008). Il a été montré d'autre part que PD-1 est surexprimé par les lymphocytes infiltrant des tumeurs ( Ahmadzadeh et al., 2009; Sfanos et al., 2009). Les interactions PD-1/B7-H1 constituent ainsi un mécanisme majeur de la réponse immune suppressive au sein du microenvironnement tumoral.

La validité de l'effet d'un traitement par immunothérapie, par utilisation d'anticorps bloquants dirigés contre B7-H1 ou PD-1, a déjà été démontrée à plusieurs reprises sur des cultures cellulaires *in vitro*, des modèles murins ( Blank et al., 2004; Iwai et al., 2002), ou plus récemment lors d'essais cliniques sur différents types de cancers (Flies et al., 2011; Sznol and Chen, 2013).

Il existe actuellement en test clinique trois anticorps monoclonaux dirigés contre PD-1 (BMS-936558/MDX-1106/ONO-4538, CT-011, MK-3475), ainsi qu'une protéine de fusion recombinante B7-DC/IgG1, l'AMP-224 (B7-DC étant également un ligand co-inhibiteur de PD-1).

Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le BMS-936558 (nivolumab) actuellement en phase II d'essai clinique. Il a particulièrement été employé dans le cas de tumeurs solides. Cet anticorps est d'isotype IgG4 (afin d'éviter la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC, ainsi que celle médiée par le complément ou CDC. Il est de haute affinité pour PD-1 et possède une durée de vie importante (effet au-delà de 12-20 jours). Il a été montré au cours de la phase I d'essai clinique des régressions tumorales partielles ou totales chez environ un tiers des patients atteints de mélanomes, de carcinome rénal, de cancer

colorectal ou de cancer du poumon « non à petites cellules » (non-small cell lung cancer, NSCLC). Les résultats dans le cas du cancer du poumon sont particulièrement intéressants car il est très difficile d'obtenir pour ce type de tumeurs des résultats par immunothérapie.

Le MK-3475 (isotype IgG4) est récemment entré en phase I d'évaluation clinique. Contrairement au MDX-1106 il s'agit d'un anticorps humanisé.

Le CT-011 est également un anticorps humanisé mais de classe IgG1 (ce qui peut également lui permettre de coordonner l'immunité antitumorale innée). Il a en particulier été employé dans le cas de tumeurs hématologiques. Des tests ont été menés sur 17 patients atteints de tumeurs malignes avancées (Berger et al., 2008). Une personne atteinte d'un lymphome folliculaire B a répondu de manière plus remarquable au traitement, tandis qu'une autre atteinte d'AML (Acute Myeloid Leukemia) a mal répondu. D'autres essais sont en cours et doivent être également poursuivis sur différents types de tumeurs solides. Le CT-011 a également donné des résultats encourageants chez des patients atteints de lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL) (Cultreza and Dalia, 2012). Des études *in vitro* ont montré que CT-011 peut activer les cellules NK dans le cas du myélome multiple, ce qui suggère son intervention au niveau du système immunitaire inné (Benson et al., 2010).

Des essais cliniques de phase I ont commencé en 2011 avec l'AMP-224 chez des patients atteints des cancers métastatiques. Ils semblent prometteurs.

Les monothérapies visant PD-1 ont donné des résultats certains. Cependant, différents tests (sur modèles murin ou cliniques) indiquent que des thérapies combinatoires pourraient avoir un meilleur impact. Par exemple, dans le cas du mélanome, il a été montré une régression tumorale plus importante lorsque le BMS-936558 est employé en combinaison avec un anticorps monoclonal (ipilimumab, MTX-010) dirigé vers un autre inhibiteur de la réponse immunitaire, le CTLA4 (récepteur de B7-1 et B7-2). L'ipilimumab est déjà employé dans le traitement des mélanomes et le BMS-936558 en phase II d'essai clinique, aussi, suite à des tests réalisés sur des modèles murins (Korman et al., 2007), cette combinaison d'anticorps a été employée chez des patients atteints de mélanomes (Jedd et al., 2013). Ce test est actuellement en phase I d'essai clinique.

Par ailleurs, plusieurs essais cliniques sont déjà prévues ou en cours, en combinant des anticorps monoclonaux anti-PD-1 avec d'autres traitements (Melero et al., 2013). Des tests sont réalisés en combinaison avec des vaccins contre le cancer dans le cas du mélanome, du cancer de la prostate, du cancer du rein, et des AML ; l'anti PD1 CT-011 est actuellement en phase II d'essai clinique dans le traitement des lymphomes folliculaires, en combinaison l'anti CD20 (rituximab, molécule visant l'élimination des lymphocytes B) (Westin et al.,

2010). Des tests sont également en cours en combinaison avec des chimiothérapies (cancer du pancréas, NSCLC). Ces stratégies de traitement synergiques doivent fournir une nouvelle d'investigation pour les essais cliniques à venir.

De plus, l'utilisation de récepteurs solubles partenaires des ligands de la famille B7, peut permettre de bloquer leur fonction inhibitrice en empêchant la liaison récepteur/ligand. L'inhibition de B7-H1 peut par exemple être médiée à l'aide du récepteur soluble PD-1 (sPD-1). Ceci a permis de réduire la progression tumorale dans un modèle murin de cancer du foie (L. He et al., 2005)

Les anticorps visant à neutraliser B7-H1 sont moins développé que ceux bloquant PD-1. Même si B7-H1 semble une cible privilégiée dans les traitements anticancéreux, il est possible que la réponse ne soit pas optimale dans la mesure où PD-1 possède également comme ligand immuno-inhibiteur (B7-DC). Concernant les anticorps monoclonaux visant à neutraliser le ligand B7-H1, on peut citer le MDX-1105/BMS-936559 (isotype IgG4). Il est actuellement en phase I d'essais cliniques et testé chez des patients atteints de tumeurs solides avancées. Des études préliminaires ont montré une activité sur les mélanomes, le cancer du rein et le NSCLC.

De plus, il est actuellement envisagé d'employer des anticorps permettant de bloquer simultanément B7-H1 et B7-H4. Ces molécules sont fréquemment co-exprimées dans le cas de tumeurs agressives, en comparaison avec des tumeurs n'exprimant qu'une seule ou aucune de ces deux molécules, en particulier dans le cas du carcinome rénal (Krambeck et al., 2006)

D'autres pistes sont également à l'étude. Les études les plus récentes s'intéressent aux interactions PD-1/B7-H1 mises en place non seulement entre la cellule cible et les lymphocytes T cytotoxiques, mais également par l'ensemble des cellules du microenvironnement tumoral, dans l'espoir d'identifier de nouveaux biomarqueurs et de mieux contrôler l'ensemble des interactions co-activatrices et co-inhibitrices mises en jeu.

Nous avons vu que certaines molécules de la famille B7 ont également une activité co-activatrice, comme B7-H3. Il est envisagé d'en augmenter l'expression pour le traitement des cancers. L'expression transgénique de B7-H3 a permis d'obtenir une réponse antitumorale importante dans un modèle murin de carcinome du foie (Ma et al., 2007). Bien que B7-H1 puisse dans certaines conditions avoir un effet positif sur la réponse T, aucun traitement de ce genre n'est envisagé, sa fonction au niveau des cellules cibles tumorales étant de nature co-inhibitrice. A l'heure actuelle le fait que la tumeur soit EBV négative ou EBV positive n'est pas prise en compte.

## **III Apoptose et voies des MAP Kinase**

Dans cette partie nous décrivons les processus d'apoptose, en particulier l'apoptose intrinsèque entière au niveau mitochondriale. Notre travail portant sur la résistance à l'apoptose de cellules mutées pour p53 ainsi que la sensibilisation par l'intermédiaire des différentes voies de signalisation telles que les MAPKinase, nous précisons également le rôle de p53 et des voies des MAPKinases dans ce processus.

### **III.1 Généralités**

Le mot «apoptose» dérive du mot grec "απόπτωσης" et signifie la chute des feuilles en automne. Ce mot décrit la mort cellulaire provoquée lors de stimulations physiologiques ou pathologiques. Les phénomènes d'apoptose ont été décrits dès 1842 par Vogt et ce terme a été utilisé dès 1972 par le groupe de Kerr concernant la mort cellulaire au sein de tissus.

L'apoptose, aussi connue sous le nom de mort cellulaire programmée (PCD), est un processus essentiel au fonctionnement normal d'un organisme. Chaque jour, des millions de cellules vont proliférer et d'autres mourir. La mort par apoptose est essentielle dans la régulation de la croissance et dans la maintenance de l'homéostasie tissulaire des organismes. Un déséquilibre entre la mort cellulaire et la prolifération peut être à l'origine de nombreuses pathologies aiguës (accident vasculaire cérébral, crise cardiaque, insuffisance hépatique), de cancers, de syndromes neurodégénératifs....

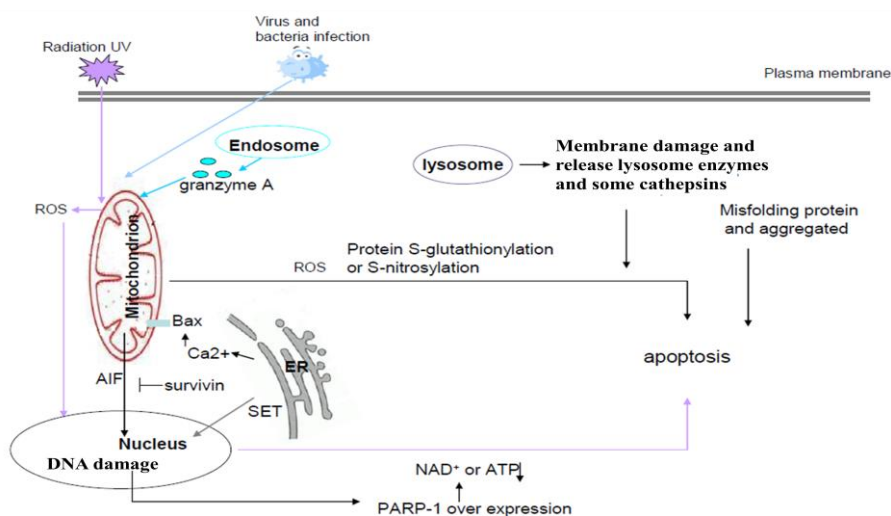
On distingue les processus d'apoptose n'impliquant pas les caspases (apoptose caspase-indépendante) de ceux les mettant en jeu (apoptose caspase-dépendante). Pour l'apoptose caspase-dépendante, on discrimine par ailleurs les processus initiés par la voie des récepteurs (voie dite extrinsèque) de ceux initiés au niveau mitochondrial (voie dite intrinsèque).

Après une brève description de l'apoptose caspase indépendante et de l'apoptose dépendante des caspases associée à la voie des récepteurs, nous décrivons plus longuement les processus d'apoptose caspase-dépendant mettant en jeu la mitochondrie. Nous parlerons ensuite des caspases, qui sont les effecteurs majeurs communs à l'apoptose extrinsèque et intrinsèque. Nous terminerons ce chapitre en présentant la protéine p53 en tant que facteur pro-apoptotique.

## III.2 Apoptose indépendante des caspases

Les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas clairement identifiés. Le facteur principal semble être l'augmentation de la production de ROS (Reactive Oxygen Species). Le granzyme A, des radiations UV ou une infection bactérienne peuvent induire des dommages mitochondriaux et la production de ROS, qui vont permettre la translocation au noyau du complexe SET associé au réticulum endoplasmique. Ce complexe comprend l'oncoprotéine SET, la protéine de liaison à l'ADN HMG-2, l'endonucléase Ape1 et la protéine suppresseur de tumeur pp32. Il conduit au clivage de l'ADN simple brin et contribue ainsi à une apoptose caspase indépendante (Martinvalet et al., 2005). Il a également été montré que la protéine mitochondriale AIF (Apoptosis Inducing Factor) peut déclencher l'apoptose indépendamment des caspases. Les ROS permettent l'activation de PARP-1 (Poly(ADP-ribose) polymérase 1) qui initie un signal nucléaire conduisant à la libération par la mitochondrie de la protéine AIF. Cette dernière est transloquée au noyau où elle induit le clivage de l'ADN et une mort cellulaire par apoptose caspase indépendante (Kang et al., 2004). Le GSH (glutathion) et le NO (oxyde nitrique), dont l'interaction peut être à l'origine de la production de ROS, peuvent également jouer un rôle dans ce même processus (Figure 31).

D'autres signaux moléculaires peuvent également agir comme facteurs apoptogènes impliquant une voie indépendante des caspases. Ils peuvent avoir pour origine la perméabilisation de la membrane lysosomale, certaines protéines virales ou certains médicaments.



**Figure 31** : Voie apoptotique caspase-indépendante.

PARP-1: Poly [ADP-ribose] polymérase 1. ER: réticulum endoplasmique. ROS: reactive oxygen species, AIF: Apoptosis inducing factor. D'après (Hongmei, 2012)

## III.3 Apoptose dépendante des caspases

### III.3.1 Apoptose extrinsèque

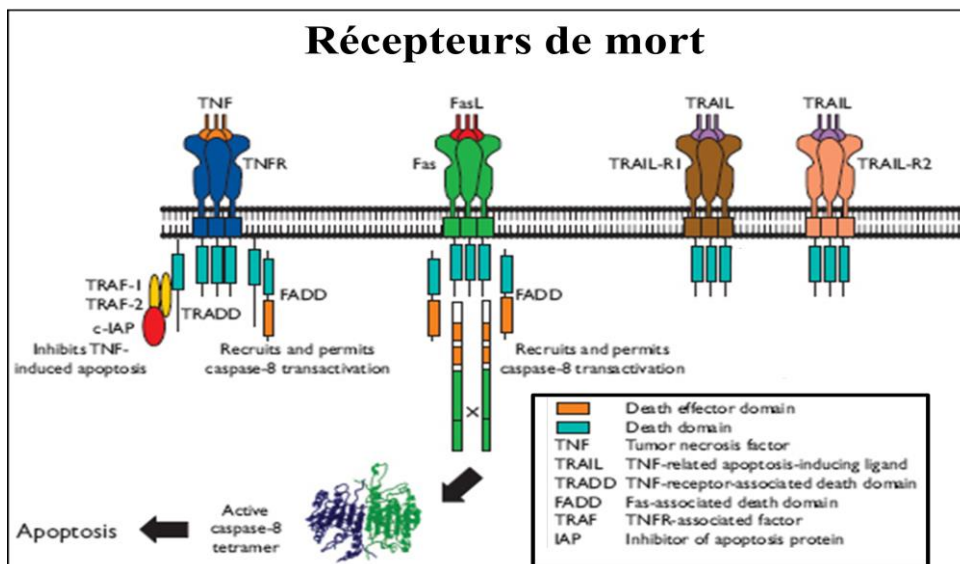
L'apoptose extrinsèque est initiée par la liaison de ligands spécifiques comme le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor), le FasL (Fas ligand) et le TRAIL (Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand) à leurs récepteurs correspondants (TNFR, Fas, DR4/DR5, respectivement), appelés «récepteurs de mort» ou DR (Death Receptor) (Mahmood and Shukla, 2010). Les DR font partie de la superfamille des récepteurs au TNF et possèdent un domaine de mort cytosolique conservé ou DD (Death Domain)(Mc Guire et al., 2011). Ils sont divisés en deux groupes, en fonction des protéines adaptatrices cytosoliques recrutées et des complexes intracellulaires formés (Mahmood and Shukla, 2010 ; French and Tschopp, 2003 ; Wajant, 2003).

Le premier groupe comprend le Fas/CD95, le DR4/TRAIL-R1 et le DR5/TRAIL-R2, qui permettent le recrutement au niveau intracellulaire du DISC (Death Inducing Signaling Complex), composé de la protéine adaptatrice FADD (Fas Associated Death Domain) et des procaspases initiateuses 8 et 10 (Kischkel et al., 1995) (Figure 32). La protéine FADD se lie par son domaine DD au domaine DD du récepteur et par son domaine DED au domaine DED des procaspases 8 et 10. Le DISC permet le clivage auto-protéolytique des procaspases 8 et 10, ce qui leur confère leur activité enzymatique et permet leur libération dans le cytoplasme (Tourneur and Chiocchia, 2010). Une fois activées les caspases 8 et 10 peuvent activer à leur tour par protéolyse les caspases effectrices 3, 6 et 7. Ces dernières clivent différents substrats intracellulaires tels que la lamine A, la PARP (poly (ADP-ribose) polymérase) ou l'ICAD (Inhibitor of Caspase-Activated DNase), conduisant entre autre à la diminution de taille des cellules, la fragmentation de l'ADN nucléaire et finalement à la mort par apoptose (Mahmood and Shukla, 2010).

Les événements décrits ci-dessus sont suffisants pour induire la mort des cellules dites de type I (lymphocytes, thymocytes,...) mais sont insuffisants pour les cellules de type II (hépatocytes, cellules pancréatiques  $\beta$ ,...), pour lesquelles il existe un faible recrutement du DISC (Scaffidi et al., 1998 ; Yin et al., 1999 ; Ozören and El-Deiry, 2002 ; Barnhart et al., 2003). Les cellules de type II nécessitent une voie d'amplification dépendante des mitochondries. La caspase-8 activée conduit au clivage de la protéine pro-apoptotique BID, générant tBid (truncated Bid), qui se lie aux protéines pro-apoptotiques mitochondriales Bax et Bak et conduit à une apoptose de type intrinsèque (décrite par la suite).

Le second groupe des récepteurs de mort comprend le TNFR, le DR3, le DR6, et EDAR (EctoDysplasine A1 Receptor). Ces récepteurs recrutent la protéine adaptatrice TRADD (TNF Receptor Associated Death Domain). Cette dernière peut s'associer à FADD et induire la voie d'activation des caspases 8 et 10 comme décrit pour Fas. TRADD fait également le lien avec les protéines TRAF2 et TRAF5 (TNF Receptor Associated Factors), la kinase RIP1 (ou RIPK1, Receptor-Interacting Protein Kinase 1) et les inhibiteurs cellulaires de l'apoptose (cIAPs), formant ainsi un autre complexe de signalisation appelé le complexe I (Mahmood and Shukla 2010; Lavrik et al., 2005).

Après la liaison du récepteur de mort avec son ligand spécifique, le complexe I s'assemble à proximité de la membrane plasmique, induit la voie des MAP kinases JNK impliquées notamment dans l'apoptose (Symons et al., 2006; Varfolomeev and Ashkenazi, 2004). Ce complexe stimule de plus le facteur de transcription (NF- $\kappa$ B), facilitant la survie des cellules (Wilson et al., 2009).



**Figure 32** : Récepteurs de mort.

Après activation par les ligands spécifiques, les récepteurs de mort se trimérisent, et permettent la formation du DISC au niveau intracellulaire, qui lui-même est formé de la procaspase 8 et de la protéine adaptatrice FADD (pour FAS, TRAIL1et2), et de la protéine adaptatrice FADD et TRADD (pour TNFR, DR6, DR3, et EDAR). Modifié d'après <http://www.abdserotec.com/cell-membrane-antibodies.html>

### III.3.2 Apoptose intrinsèque mitochondriale

Un très grand nombre de facteurs de stress, physique ou chimique, peuvent initier la voie apoptotique intrinsèque, tels que les rayons UV, un choc thermique, un choc osmotique, un stress oxydatif ou une hypoxie. L'apoptose intrinsèque peut également être initiée, en modifiant l'expression d'oncogènes cellulaires ou de gènes suppresseurs de tumeurs (c-Myc,



c-Fos, p53,...), en perturbant les structures du cytosquelette, en provoquant des lésions de l'ADN (à l'aide d'agents mutagènes ou cytostatiques, d'antimétabolites,...), en privant les cellules de cytokines, de facteurs de croissance, de nucléotides (ATP en particulier), ou encore par accumulation de protéines mal repliées.

D'un point de vue moléculaire, il existe un grand nombre d'initiateurs d'apoptose mitochondriale. Par exemple, les dommages à l'ADN provoquent une augmentation du niveau d'expression de la protéine pro-apoptotique Bax et/ou la diminution de celui de la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Ils peuvent également conduire à l'activation de caspase-2 initiateur (Guo et al., 2002).

### **III.3.2.1 Les protéines de la famille Bcl2**

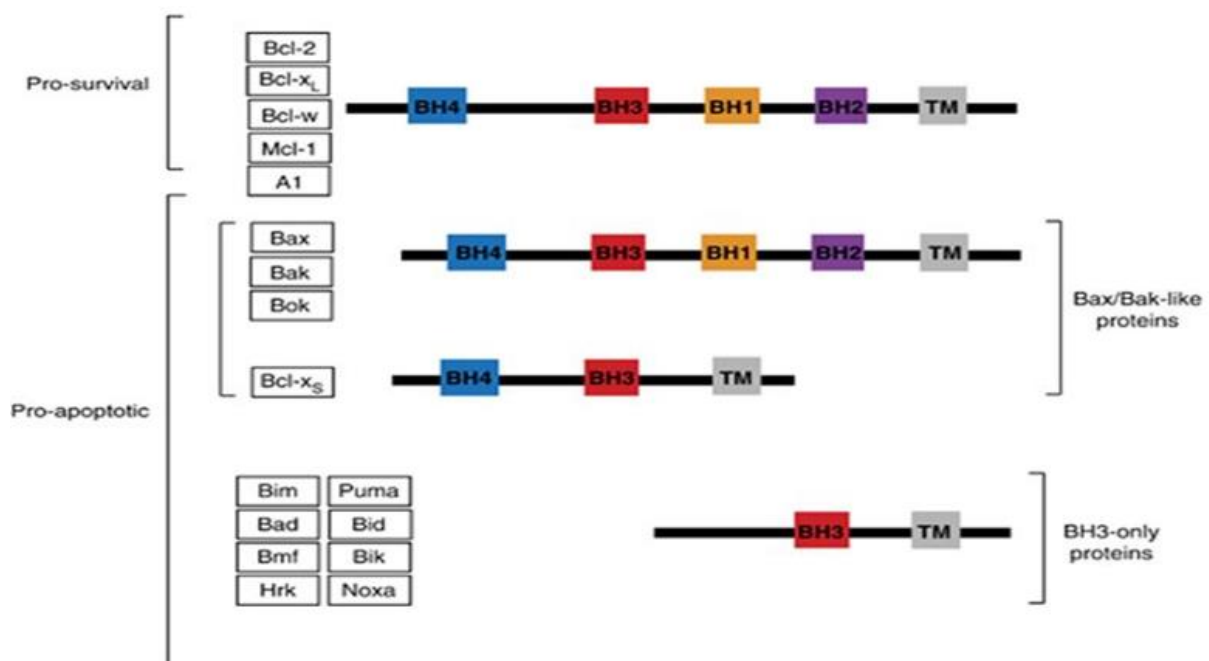
L'évènement central de l'apoptose intrinsèque est la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. Les principaux acteurs sont les protéines de la famille Bcl2. Chez les mammifères, cette famille est composée d'une vingtaine de membres et chaque membre comprend un ou plusieurs domaines BH (Bcl2 Homology domain 3) qui sont BH-1, BH-2, BH-3 et BH4 (Figure 33). Ces domaines possèdent entre eux des séquences homologues importantes pour les interactions hétérodimériques entre les différents membres. Des études de mutagenèse dirigée ont en particulier montré que les trois domaines BH-1, BH-2 et BH-3, influencent fortement les processus d'auto et d'hétéro-dimérisation. Les membres de cette famille sont divisés en deux sous classes selon leur fonction anti-apoptotique ou pro-apoptotique.

Les protéines anti-apoptotiques sont Bcl2, Bcl-w, Bcl-X<sub>L</sub>, A1 (aussi connue sous le nom de Bcl-2A1) et Mcl-1. Elles possèdent les 4 domaines BH, un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal hydrophobe. Ce dernier est responsable de leur localisation au niveau de la membrane externe mitochondriale. Leur localisation initiale est toutefois différente, Bcl2 est présente au niveau de la membrane mitochondriale de manière permanente, tandis que les autres protéines sont cytoplasmiques et ne se positionnent au niveau de la mitochondrie qu'après leur activation, suite à un stimulus apoptotique.

Les protéines pro-apoptotiques sont sous-divisées en deux sous-groupes. Celles de type Bax/Bak sont dites effectrices et responsables de la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (Bax, Bak, Bcl-X<sub>S</sub>, Bok). Ces protéines possèdent les 4 domaines BH, excepté Bcl-X<sub>S</sub> qui ne comporte que les domaines BH3 et BH4. L'expression de Bax et de Bak est ubiquitaire, alors que Bok n'est retrouvée que dans les tissus reproducteurs (S. Y. Hsu et al., 1997). Le second sous-groupe de protéines pro-apoptotiques est celui des protéines ne

possédant que le domaine BH3 : Bid, Bim, Bad, Bik, Bmf, Noxa, Puma/Bbc3 et Hrk/DP5. Ces protéines interviennent dans l'initiation de phénomène apoptotique ; leur rôle est de relier le signal apoptotique aux protéines effectrices (Bax et Bak en particulier).

Des observations réalisées à partir de tumeurs humaines ainsi que des études menées sur des souris génétiquement modifiés (transgéniques ou knock-out) ont montré que l'oncogénèse peut être associée à un gain de fonction des protéines anti-apoptotiques (surexpression de Bcl-2 par exemple) ou à une perte de fonction des activateurs de la mort cellulaire par apoptose (perte de Bim par exemple). Dans le cas des lymphomes folliculaires, Bcl2 est surexprimé chez les lymphocytes B, suite à une translocation chromosomique t(14; 18) (Tsujimoto et al., 1984; Tsujimoto et al., 1985). Des niveaux élevés de Bcl-2 sont également détectés dans les LLC (leucémie lymphoïde chronique) (Kitada et al., 1998). Ces taux élevés sont aussi retrouvés dans le cas de certaines tumeurs solides (cerveau, sein, poumon) (Castle et al., 1993). La surexpression de Bcl-2 dans la LLC ainsi que pour de nombreux cancers a été attribuée à l'hypo-méthylation du promoteur du gène (Kitada et al., 1998) ou à une perte des micro-ARN 15-a et 16-1, qui sont des régulateurs négatifs de son expression (Cimmino et al., 2005). D'autres protéines anti-apoptotiques ont également été retrouvées comme étant sur-exprimées dans différents types de cancer, comme Bcl-x<sub>L</sub> et Mcl-1 dans le myélome multiple, ou Mcl-1 dans la leucémie myéloïde aigue.



**Figure 33** : Structure des molécules de la famille Bcl2.

BH: Bcl2 Homology domain. TM: domaine transmembranaire. Modifié d'après (Kelly and Strasser, 2011).

### III.3.2.2 Bax, Bak et perméabilisation mitochondriale

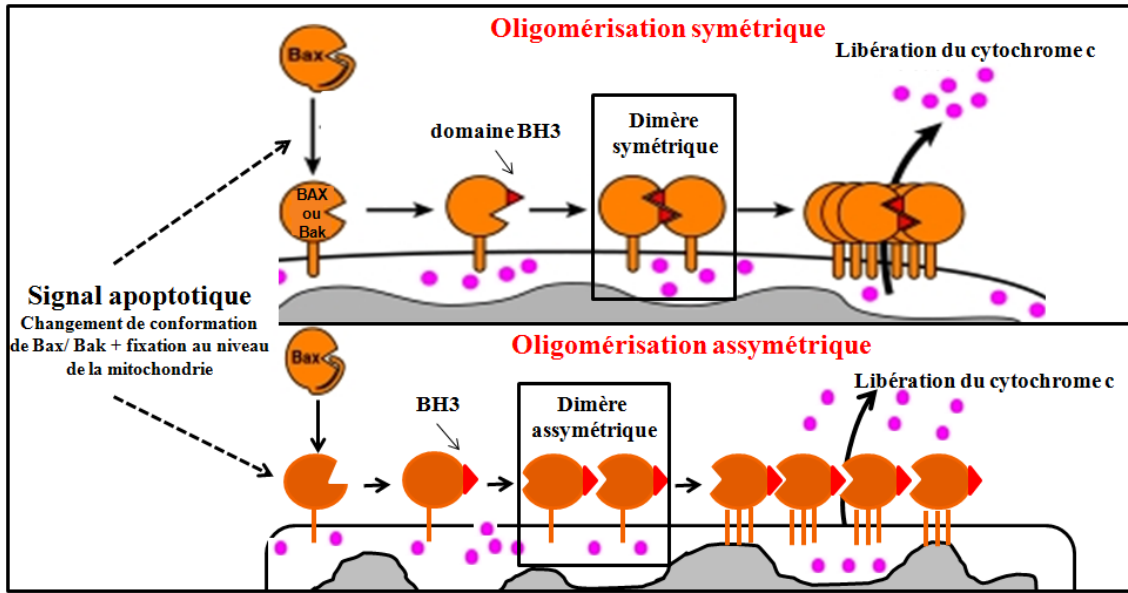
La perméabilisation de la membrane externe mitochondriale met en jeu des interactions entre protéines de type pro-apoptotique. A l'opposé, les interactions entre protéines anti-apoptotiques ou entre protéines anti et pro-apoptotiques (tel que le dimère Bcl2/Bax) empêchent la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale.

L'activation des protéines pro apoptotiques de la famille de Bcl-2 à domaine BH3 (Bcl2 Homology domain 3), telles que Bax (Bcl-2- associated X protein) ou Bak (Bcl-2 antagonist or killer) joue un rôle essentiel. En l'absence de ces deux protéines, l'apoptose ne peut avoir lieu, quel que soit le stimulus (Wei et al., 2001). Après activation, les protéines Bax et Bak subissent d'importants changements conformationnels, conduisant à leur oligomérisation au niveau de la membrane mitochondriale ( Y. T. Hsu et al., 1997; Eskes et al., 2000; Wei et al., 2000). Cette oligomérisation est considérée comme l'étape clé de la perméabilisation membranaire mitochondriale. Des mutations sur ces protéines empêchent la formation d'oligomères et cette perméabilisation (George et al., 2007; Dewson et al., 2008).

Il a été montré que les protéines effectrices Bax et Bak peuvent être activées par des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl2 (à domaine BH3), telles que Bim (Bcl-2-Interacting Mediator of cell death) ou Bid. Bim et Bid peuvent elles-même être activées en amont par la voie JNK (phosphorylation de Bim ou clivage de Bid). Des études basées sur la technique de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) ont montré que Bax interagit avec la protéine Bid tronquée et que cette interaction précède son insertion à la membrane mitochondriale (Lovell et al., 2008). Bax interagit également avec le domaine BH3 de Bim. Une mutation au niveau de ce site empêche les interactions Bim/Bax et atténue la perméabilisation mitochondriale induite par Bax, ce qui montre l'importance de cette interaction.

Le mécanisme d'oligomérisation des protéines Bax et Bak activées au sein de la membrane mitochondriale est connu. Ces protéines sont insérées au sein de la mitochondrie. Leur activation conduit à l'exposition de leur domaine BH3. Ce dernier va alors s'insérer dans la poche hydrophobe d'une molécule de Bax ou de Bak adjacente. Ces interactions étant réciproques entre deux monomères, il y a formation de dimères (Bax/Bax, Bak/Bak ou Bax/Bak), puis d'oligomères. Deux mécanismes ont été décrits (Figure 34). Le premier considère que les molécules vont s'associer pour former des dimères symétriques. Le second considère qu'ils vont s'associer les uns à la suite des autres pour former des dimères asymétriques.

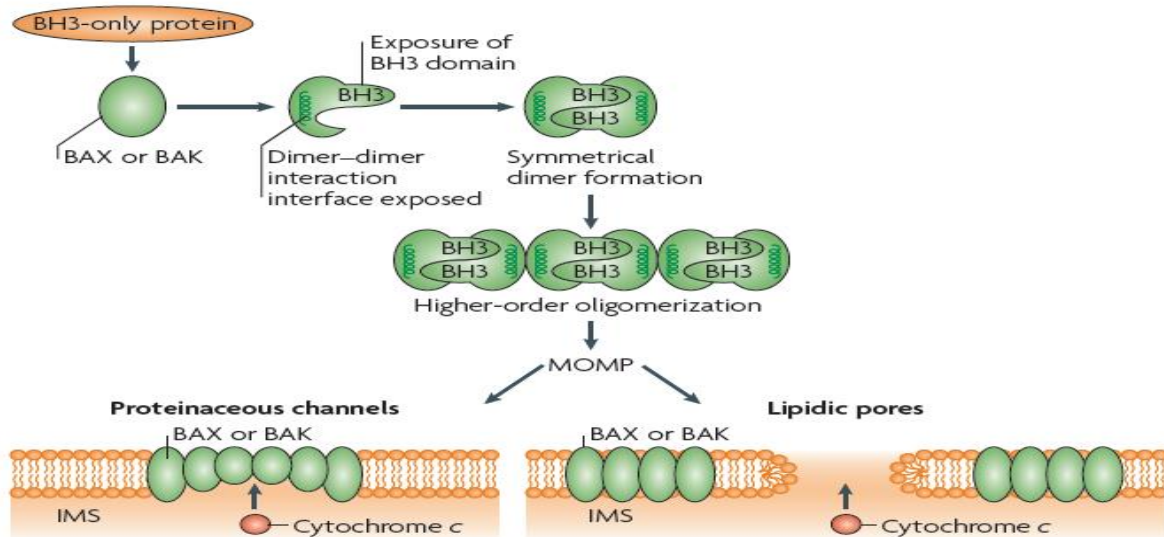
Le nombre exact de dimères qui déclenche le processus de perméabilisation n'est pas encore défini. Une étude a montré que 4 molécules de Bax sont suffisantes pour déclencher la perméabilisation sur la membrane artificielle. Par contre, une autre étude a montré que la perméabilisation nécessite la présence d'un nombre plus important d'oligomères de Bax que d'oligomères de Bak (Saito et al., 2000 ; Nechushtan et al., 2001).



**Figure 34** : Assemblage des dimères de Bak au sein de la membrane externe mitochondriale.

Les protéines Bax et Bak présentent des similitudes structurales avec des toxines bactériennes capables de former des pores membranaires. Ceci a conduit à l'hypothèse selon laquelle Bax et Bak sont directement à l'origine de la formation de pores dans la membrane mitochondriale externe (Suzuki et al., 2000). Il a été montré par la technique de patch clamp que les dimères de Bax ou de Bak forment tout d'abord des pores de petite taille qui s'associent avec d'autres dimères, pour aboutir à la formation de canaux de grande taille. Ces derniers sont nécessaires à la sortie du cytochrome c de l'espace inter-membranaire. L'inhibition de la formation de canaux de grande taille bloque le processus d'apoptose.

Le détail de l'organisation des dimères de Bax ou Bak pour la formation de pores lipidiques (appelées micelles inversées) permettant la sortie de protéines de la mitochondrie est décrit dans la (Figure 35) (Basañez et al., 2002)



**Figure 35** : Formation des pores lipidiques dans la membrane mitochondriale par association de Bax et bak. D'après (Tait and Green, 2010)

Il a été suggéré que le processus de perméabilisation de la membrane mitochondriale soit modulé par les pores de transition PTPC (permeability transition pore complex) qui sont des complexes protéiques constituant un site de contact entre la membrane interne et la membrane externe. Mais une étude a montré que les cellules dépourvues de cyclophiline D, une protéine essentielle des PTPC, ne sont pas affectée dans le processus d'apoptose, semble exclure leur rôle (Baines et al., 2005).

Il a également été suggéré que Bax et Bak agissent par l'intermédiaire des canaux ioniques voltages dépendant (VDAC, Voltage Dependent Anion Channel). Toutefois l'absence des trois isoformes de VDAC n'empêche pas la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Baines et al., 2007). De plus, il a été montré que l'interaction de VDAC2 avec Bax le maintien sous forme inactive, et joue un rôle anti-apoptotique, ce qui semble également exclure leur rôle.

### III.3.2.3 Apoptosome et activation de la procaspase 9

Suite à l'oligomérisation de Bax et de Bak, la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale conduit à la libération du cytochrome c (Willis and Adams, 2005; Johnstone et al., 2008). Le cytochrome c libéré s'associe dans le cytoplasme à la protéine adaptatrice Apaf-1, en présence d'ATP ou de dATP (Kim et al., 2005). L'hydrolyse de l'ATP/dATP en ADP/dADP et l'association au cytochrome c conduit au changement conformationnel et à l'oligomérisation d'Apaf-1 aboutissant à la formation d'un complexe heptamérique (en forme de roue), l'apoptosome (Figure 36). Ce dernier recrute la procaspase 9 et l'active par dimérisation. La caspase 9 activée va à son tour activer les caspase 3, 6 et 7

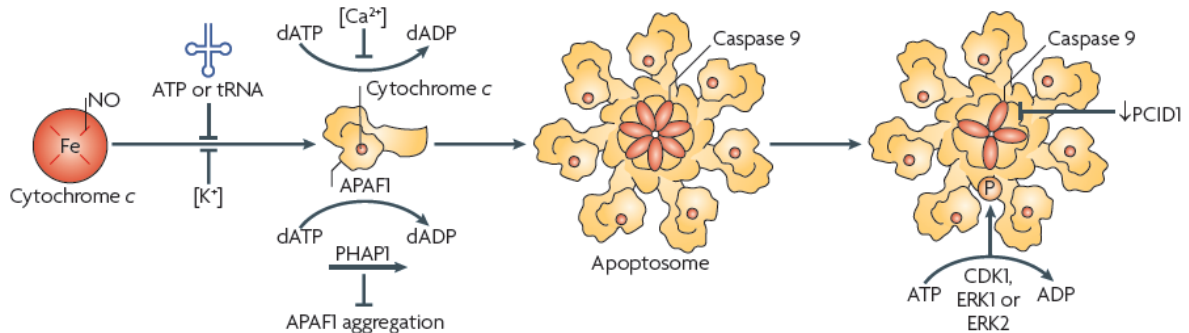
(Mahmood and Shukla, 2010). SMAC/DIABLO est également libéré de la mitochondrie et facilite l'apoptose en inhibant les IAPs (Inhibitor of Apoptosis Protein) (Du et al., 2000). L'AIF (Apoptosis Inducing Factor), qui conduit à la condensation de la chromatine et à la dégradation de l'ADN, ainsi que l'endonucléase G (DNase associée à l'apoptose) sont également libérés de la mitochondrie (Du et al. 2000; Li et al., 2001).

Différents facteurs sont connus pour jouer un rôle négatif sur la formation ou l'activité de l'apoptosome. Des nucléotides physiologiques, tels que certains ARNt, sont capables d'inhiber l'apoptose par interaction directe avec le cytochrome c, empêchant son interaction avec l'Apaf-1 et la formation de l'apoptosome (Mei et al., 2010). Par ailleurs, le niveau normal en potassium intracellulaire inhibe l'assemblage de l'apoptosome, cette inhibition pouvant être annulée par des taux élevés en cytochrome c. La concentration classique en calcium intracellulaire inhibe également l'activité de l'apoptosome en bloquant l'hydrolyse de d'ATP associé à l'Apaf-1 et la formation de l'apoptosome (Bao et al., 2007). Les protéines Hsp70 et Hsp90 (Heat Shock Protein), régulatrices du stress dû à la chaleur et aux produits chimiques toxiques, sont aussi connues pour influencer négativement la formation de l'apoptosome et le recrutement de la pro-caspase 9 (Beere et al., 2000; Pandey et al., 2000) .

A l'opposé, certains facteurs favorisent la mise en place de l'apoptosome et l'activation de la caspase 9. La protéine PHAPI (Putatif HLADR-Associated Protein I, également connu sous le nom pp32) empêche dans un premier temps l'agrégation d'Apaf-1, favorisant le processus d'échange de l'ATP/dATP en dADP/dADP (H.-E. Kim et al., 2008). Une baisse d'expression de PHAPI confère aux cellules une résistance à l'apoptose et peut contribuer à la tumorigénèse (Hoffarth et al., 2008).

Le niveau d'expression et la phosphorylation de la caspase 9 sont également des facteurs importants dans la fonctionnalité de l'apoptosome. Différentes kinases conduisent à la phosphorylation de la pro-caspase 9, ce qui inhibe son activité enzymatique et empêche son activation par dimérisation au sein de l'apoptosome (Allan and Clarke, 2009). La Thréonine 125 est le principal site de phosphorylation inhibiteur de la caspase 9 humaine. Cette phosphorylation peut mettre en jeu des kinases impliquées dans la survie et la prolifération, telles que Erk1 (également connu sous le nom MAPK3 ou Mitogen Activated Protein Kinase 3) et Erk2/MAPK1, ou dans la progression du cycle cellulaire, comme CDK1 (cyclin-dépendent kinase 1) (Allan et al., 2003; Allan and Clarke, 2007). A l'opposé, la PCID1 (PCI domain-containing protein 1), également connue sous le nom de tango7 ou Eif3m (Eukaryotic translation initiation factor 3, subunit M), régule positivement le niveau d'expression de la

procaspase 9, ce qui contribue à augmenter le niveau d'expression de la caspase 9 activée et par la suite le processus d'apoptose.



**Figure 36** : Formation d'apoptosome.

CDK1: Cyclin-dependent kinase 1. ATP: L'adénosine-5'-triphosphate. ADP: adénosine diphosphate. PHAP1: Putatif HLADR-Associated Protein I. PCID1: PCI domain-containing protein 1. D'après (Tait and Green, 2010)

### III.3.2.4 Contribution du RE à l'apoptose intrinsèque

Bax et Bak jouent un rôle essentiel dans l'initiation de l'apoptose mitochondriale. Ces molécules peuvent également se localiser au niveau du réticulum endoplasmique (RE). La réponse au stress du RE induit des changements conformationnels de Bax et Bak et leur oligomérisation, ce qui conduit à la perméabilisation de la membrane du RE et la libération de calcium. L'augmentation de la concentration calcique cytoplasmique induit une absorption accrue de  $Ca^{2+}$  par la mitochondrie (Scorrano et al., 2003; Zong et al., 2003). Ceci stimule la production de ROS, et conduit à l'ouverture des pores de transition mitochondriaux (MPT, Mitochondrial Pore Transition). La diminution dramatique du potentiel de la membrane interne mitochondriale ( $\Delta\Psi_m$ ) conduit à un gonflement de la matrice intermembranaire, et à la libération des médiateurs pro-apoptotiques (Brookes et al., 2004; Petrosillo et al., 2004)

Le stress du RE joue un rôle central dans la transmission de certains stimuli pro-apoptotiques. Il peut-être un événement important dans différentes pathologies, telles que les accidents vasculaires cérébraux ou les troubles neurodégénératifs (Rao and Bredesen, 2004; Verkhratsky and Toescu, 2003). Ces maladies présentent des phénomènes de perte d'homéostasie du réticulum endoplasmique associés à une augmentation du niveau de calcium intracellulaire et des ROS, ainsi qu'au dysfonctionnement mitochondrial pouvant conduire à une apoptose intrinsèque. Il est de plus observé la libération d'AIF, sa translocation vers le noyau et une apoptose indépendante des caspases.

### III.4 Les caspases, effectrices majeurs de l'apoptose

Les caspases initiatrices 8 et 10 interviennent dans le cas de l'apoptose extrinsèque et les caspases initiatrices 2 et 9 dans le cas de l'apoptose intrinsèque. Les caspases effectrices 3, 6 et 7 interviennent dans les deux types d'apoptose. Nous présenterons dans ce paragraphe l'ensemble des protéines de la famille des protéines de type caspase, ainsi que les mécanismes moléculaires permettant leur activation.

Les caspases sont des cystéines protéases qui clivent leurs substrat après le résidu aspartate (Caspase: capacité à cliver après l'acide aspartique). Ces molécules jouent un rôle important dans l'initiation et l'exécution du processus d'apoptose, ainsi que dans celui de l'inflammation. Des anomalies dans l'activité des caspases peuvent être à l'origine du développement de tumeurs ou du déclenchement des maladies auto-immunes (Ghavami et al., 2009; Green et al., 2009)

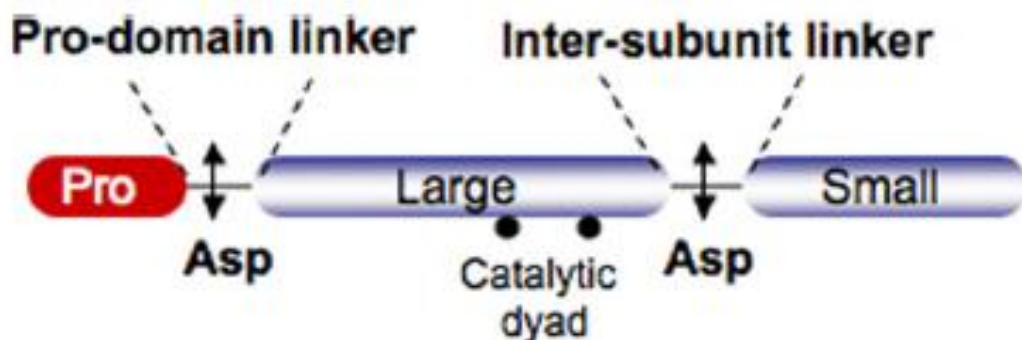
Chez les mammifères, il existe 14 caspases différentes, classées en trois groupes, selon leur fonction (Tableau 5). Le groupe I, dit initiateur de l'apoptose, comporte les caspases 2, 8, 9, et 10. Le groupe II, dit groupe effecteur de l'apoptose, comporte les caspases 3, 6 et 7. Le dernier groupe est impliqué dans l'activation des cytokines, et comporte les caspases inflammatoires 1, 4, 5, 11, 12, 13 et 14. Excepté la caspase 14, ces dernières induisent toutefois la pyroptosis, qui est une forme de mort programmée due à une activation massive des cellules inflammatoires (Labbé and Saleh, 2008) associée à une réponse antimicrobienne. Elles peuvent donc également être considérées comme ayant des effets de type apoptotique. La seule caspase sans aucun effet apoptotique est la caspase 14, qui intervient par ailleurs dans la différenciation kératinocytaire (Denecker et al., 2007).

CysteinyI aspartic acid-protease (caspase)		
Type	name	synonyms
Initiator (or Apical)	Caspase-2	ICH1, Nedd2
	Caspase-8	FLICE, MACH1, MCH5, FADD-like Ice
	Caspase-9	MCH6, ICELAP6
	Caspase-10	FLICE2, MCH4
Effectors (or executioner)	Caspase-3	CPP32, YAMA
	Caspase-6	MCH2
	Caspase-7	MCH3, CMH, ICELAP3
Inflammatory	Caspase-1	ICE
	Caspase-4	ICH2, TX, ICeII
	Caspase-5	ICeIII, TY
	Caspase-11	-
	Caspase-12	-
	Caspase-13	ERICE
	Caspase-14	MICE

**Tableau 5** : Les trois groupes des caspases initiatrices, effectrices et inflammatoires. D'après (P. Rastogi and P. Sinha, 2009)

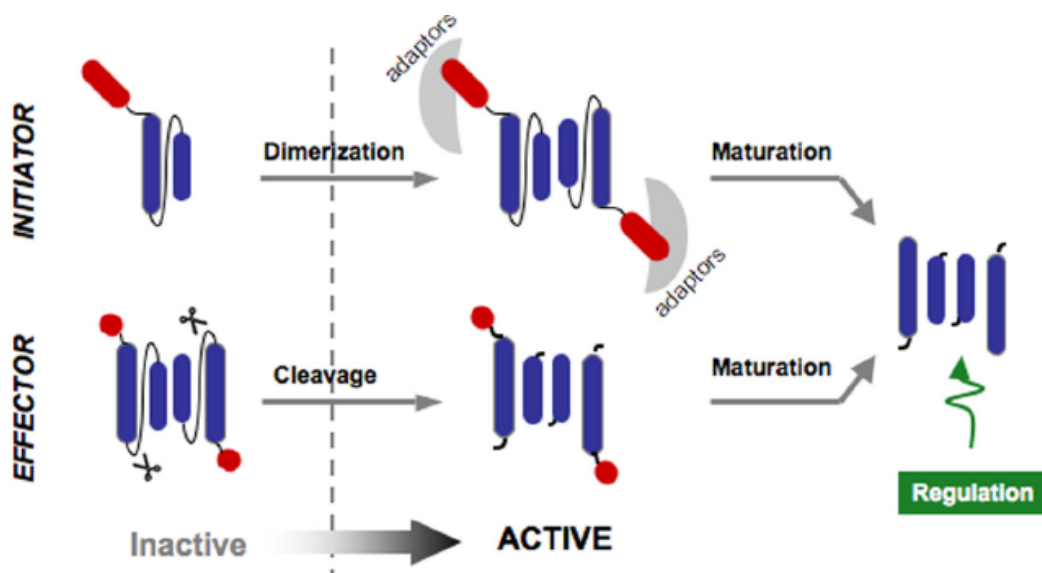


Les études structurales des différentes caspases ont montré qu'elles possèdent un prodomaine N-terminal qui précède le domaine fonctionnel, lui-même composé d'une grande sous unité de 17-21 kDa suivi d'une petite sous unité de 10-13 kDa (Tait and Green, 2008; Nicholson, 1999) (Figure 37). La grande sous-unité contient une paire (dyade) de résidus catalytiques Cystéine et Histidine, tandis que la petite sous-unité possède différents résidus permettant aux caspases de se fixer à leur substrat. Les régions non structurées qui relient le prodomaine au domaine catalytique ou les deux sous-unités du domaine fonctionnel, font souvent l'objet d'une auto-protéolyse au cours de la maturation de la protéine et contiennent des résidus aspartate (Figure 37)



**Figure 37** : Structure générale des caspases.  
Asp: asparagine. Pro: prodomaine. D'après (Pop and Salvesen, 2009)

Les caspases effectrices possèdent un court prodomaine, tandis que les caspases initiatrices possèdent un long prodomaine. Ces dernières possèdent de plus un motif qui leur permet d'interagir physiquement avec les protéines adaptatrices, telles que FADD pour l'apoptose extrinsèque et Apaf-1 pour l'apoptose intrinsèque. On peut citer le motif DED (Death effector Domain) pour les caspases 8 et 10 et le motif CARD (caspase recruitment domain) pour les caspases 1, 2, 4, et 9. Le rôle principal des caspases initiatrices est d'activer les caspases effectrices qui se trouvent en aval du processus apoptotique. Les caspases initiatrices sont inactives lorsqu'elles sont sous forme monomériques, et leur dimérisation conduit à leur autoactivation. Par contre, les caspases effectrices se dimérisent dans un premier temps avant d'être activées par les caspases initiatrices qui agissent en clivant les liaisons entre les différentes sous unités (Figure 32).



**Figure 38** : Principe de l'activation des caspases initiatrices et effectrices. D'après (Pop and Salvesen, 2009)

L'activité de certaines caspases peut être inhibée par les protéines appartenant à la famille des IAPs (Inhibitor Apoptosis Protein). Cette famille comprend notamment cIAP-1, cIAP-2, ILP-2, XIAP et les survivines. Les IAPs sont connues pour inhiber la fonction des caspases 9, 3 et 7 (Deveraux et al., 1998; Sun et al., 1999 ; Kasof and Gomes, 2001). Par contre, plusieurs caspases initiatrice ou effectrices y sont résistantes, telles que les caspases 1, 2, 6, 8, et 10. La caspase 8 est en particulier inhibée par la protéine Flip qui empêche son autoactivation par compétition au niveau du DISC.

### III.5 Apoptose et facteur de transcription P53

La protéine P53, en tant qu'elle agit comme suppresseur de tumeur joue un rôle important dans l'induction de l'apoptose même si certaines apoptoses sont P53 indépendantes.

#### III.5.1 Apoptose P53 dépendante

La protéine p53, identifiée en 1979 (Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine, 1979) comme un suppresseur de tumeurs, est codé par le gène *TP53*, localisé sur le chromosome 17. Cette protéine possède plusieurs domaines : un domaine de fixation à l'ADN, un domaine de transactivation, un domaine d'oligomérisation, un domaine riche en proline, et un domaine régulateur C-terminal (Martinez-Rivera and Siddik, 2012). P53 par sa fonction transcriptionnelle, intervient dans différentes fonctions, telles que la réparation de l'ADN, la sénescence ou l'arrêt du cycle cellulaire. P53 a également été identifiée en 1989 comme une protéine inductrice de l'apoptose. Elle peut agir comme un facteur de

transcription en permettant l'expression de gènes impliqués dans l'induction de l'apoptose. Elle peut également interagir directement et physiquement avec des protéines pro-apoptotiques et les activer, ou avec des protéines anti-apoptotiques, de manière à les inhiber.

P53, en tant que facteur de transcription (Figure 39), induit l'expression de plusieurs gènes impliqués directement ou indirectement dans l'apoptose. Elle permet notamment la surexpression de la protéine Pidd à l'origine de l'activation de la caspase 2 initiatrice, par l'intermédiaire de la protéine RAIID. RAIID joue le rôle d'adaptateur en interagissant d'une part avec le domaine CARD (CAspase Recruitment Domain) de la caspase 2 et d'autre part avec le domaine DD (Death Domain) de la protéine Pidd. (Tinel and Tschopp, 2004). P53 induit également l'expression de la protéine Pig (p53 inducing genes), conduisant à la production de ROS et à des dommages mitochondriaux. Elle induit l'expression d'autres protéines impliquées dans l'induction de l'apoptose tels que la scotine (localisée dans le réticulum endoplasmique et associée à l'apoptose intrinsèque) (Bourdon et al., 2002) et Perp (protéine membranaire de la famille PMP-22 associée à l'apoptose extrinsèque (Attardi et al., 2000). La FDXR (ferredoxin reductase), protéine sensibilisant les cellules à l'apoptose induite par le stress oxydatif est aussi positivement régulée par p53 (Liu and Chen, 2002), de même que de nombreuses protéines impliquées dans la voie apoptotique intrinsèque de la famille Bcl2, telles que Bax, Bok (Yakovlev et al., 2004) Puma (Nakano and Vousden, 2001) ou Noxa. P53 conduit de plus à la sur-expression de la protéine p53AIP qui se localise au niveau de la mitochondrie et conduit à la perte du potentiel membranaire de l'organite, ce qui favorise la libération du cytochrome c et par la suite l'activation des caspases (Schuler et al., 2000)

A l'opposé, P53 réprime l'expression des protéines anti apoptotiques Bcl2 (Miyashita et al., 1994), Bcl-XL et survivine, (une protéine de la famille des IAP, Inhibitor of Apoptosis Protein) (Hoffman et al., 2002).

La protéine p53 ne se localise pas seulement au niveau du noyau, où elle joue le rôle de facteur de transcription, mais elle se positionne également au niveau de la membrane externe mitochondriale. Ceci peut lui permettre d'interagir avec les protéines pro-apoptotique Bak et Bax, de les activer et d'induire l'apoptose mitochondriale (Chipuk et al., 2004; Leu et al., 2004). Il a également été proposé dans un autre modèle que p53 peut ainsi interagir au niveau de la membrane mitochondriale avec les protéines anti apoptotiques Bcl-2, et libérer les protéines pro-apoptotiques Bak pour qu'elles puissent interagir et conduire à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale (Mihara et al., 2003). P53 interagit

aussi avec la protéine anti-apoptotique Mcl-1 *via* ses domaines DBD (DNA Binding Domain, acides aminés 94-312) et TAD (TransActivation Domain, acides aminés 1-73), ce qui permet la dissociation du complexe Mcl-1/Bim et la libération de la protéine pro-apoptotique Bim. Il a été montré que p53 interagit avec BCL-XL *via* ces deux mêmes domaines. Toutefois, l'interaction est forte avec le domaine DBD et faible avec le domaine TAD pour BCL-XL, alors que les forces de liaisons sont inversées pour Mcl-1 (Yao et al., 2013) (Figure 39). L'ensemble des éléments précédents montre que p53 est un acteur majeur de l'activation de l'apoptose mitochondriale, et qu'elle intervient par différents mécanismes. Par ailleurs, cette protéine favorise l'apoptose extrinsèque en régulant positivement l'expression des récepteurs de mort Fas, DR4 et DR5, ainsi que du ligand FasL, ainsi qu'en favorisant le transport de Fas du réticulum endoplasmique vers la surface membranaire. P53 joue un rôle majeur dans l'induction de l'apoptose. Sa mutation entraîne des résistances à l'apoptose dans de nombreux modèles biologiques.

### **III.5.2 Mutation P53 et apoptose**

Des anomalies du gène TP53 (qui code pour la protéine p53) ont été retrouvées dans plus de la moitié des cancers humains. La protéine p53 est impliquée dans les processus d'apoptose et dans le contrôle du cycle cellulaire. Son inactivation altère le contrôle du cycle cellulaire, ce qui augmente le risque de cancers. Si le gène p53 ne fonctionne pas correctement, les cellules possédant un ADN endommagé vont continuer à croître et à se diviser, ce qui peut conduire dans le temps à l'émergence de cancers.

Généralement, les lignées cellulaires provenant de tumeurs de patients ayant une mutation pour p53 sont plus résistantes aux drogues, telles que les poisons du fuseau mitotique, par comparaison avec les cellules possédant le statut p53 sauvage (Lai et al., 2012). Les défauts de p53 ont été associés à plus de 60% des cancers primaires chez l'homme. Les mutations acquises pour ce gène sont retrouvées dans de nombreux types de cancers solides, tel que le cancer du poumon, du colon ou du sein. Ces mutations sont également retrouvées dans les cancers hématologiques et les leucémies. Ils représentent dans ce cadre une incidence relativement faible (<20%) car il s'agit d'évènements géniques secondaires, mais les études épidémiologiques montrent que le pronostic de ces patients est généralement défavorable, avec une résistance à la chimiothérapie (Cheung et al., 2009). Il est ainsi important de trouver des traitements autres permettant de sensibiliser ces cellules à l'apoptose.

Des études cellulaires et cliniques ont montré que le statut de p53 est associé aux cellules cancéreuses ainsi qu'à la sensibilité du patient dans sa réponse à divers agents

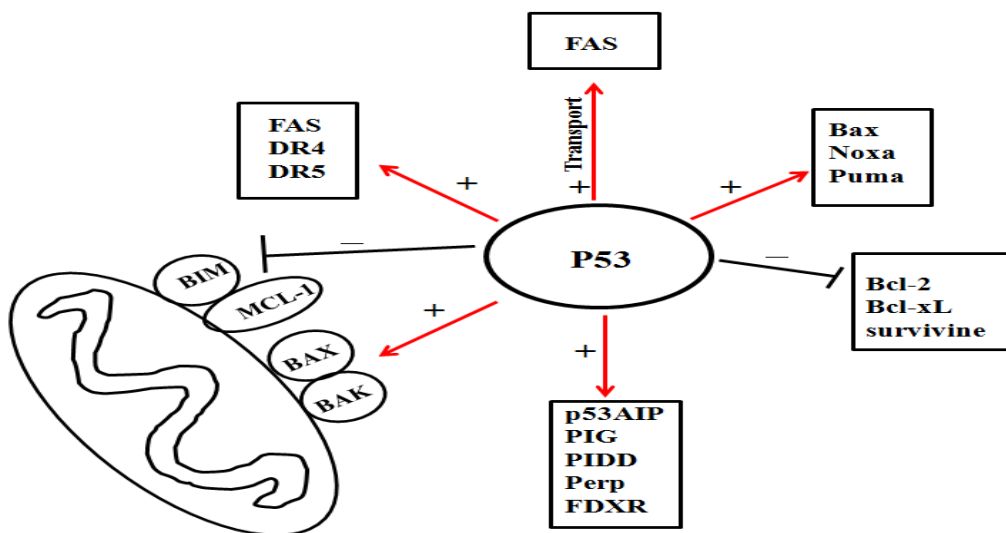
chimiothérapeutiques (Bertheau et al., 2008; Lu and El-Deiry, 2009). Les lignées cellulaires cancéreuses humaines pour lesquelles p53 est muté sont plus résistantes aux traitements par une grande variété de médicaments chimiothérapeutiques employés en clinique (Huang et al., 2011; O'Connor et al., 1997). L'inactivation de p53 est responsable de la diminution de l'expression de nombreux gènes proapoptotiques et conduit à une résistance aux médicaments (Sax and El-Deiry, 2003; Chipuk and Green, 2006).

Cependant, des études précliniques et cliniques suggèrent également que la contribution relative du statut de p53 à la réponse aux médicaments varie selon le contexte cellulaire et la classe de médicaments anticancéreux utilisés. Les cellules altérées pour p53 sont généralement résistantes aux agents génotoxiques (fludarabine, cisplatine, doxorubicine) comme dans le cas des LLC avec une délétion du chromosome p17 conduisant à la perte de p53 et à une résistance à la fludarabine (Turgut et al., 2007). Vasey et Jones (Vasey et al., 1996) ont montré que l'inactivation de p53 est associée à une diminution de la sensibilité des cellules cancéreuses de l'ovaire au cisplatine, ce qui n'est pas le cas pour le paclitaxel qui est un poison du fuseau mitotique. Par ailleurs, les cellules cancéreuses colorectales p53<sup>+/-</sup> sont résistantes à l'anti-métabolite 5-FU, mais sensibles à la doxorubicine (Bunz et al., 1999). Le mécanisme moléculaire sous-jacent du rôle de p53 dans la réponse des différents types de cellules tumorales à divers médicaments chimiothérapeutiques n'est toutefois pas entièrement compris. Des études suggèrent que l'implication de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire et dans l'apoptose, en réponse à différents médicaments, peuvent contribuer à cette variabilité. Par exemple, p53 déclenche généralement la cascade apoptotique plutôt que l'arrêt du cycle cellulaire en réponse à l'anthracycline, ce qui entraîne une régression tumorale après un traitement médicamenteux. Par ailleurs, p53 peut induire l'arrêt du cycle cellulaire dans les cancers de l'ovaire ou l'apoptose dans les autres types de cancers, après traitement par le paclitaxel. Par conséquent, le rôle de p53 dans la médiation à la réponse chimiothérapeutique est complexe et dépend à la fois du contexte cellulaire et de la classe des agents chimiothérapeutiques employés.

La protéine p53 est particulièrement intéressante pour le développement de nouvelles thérapies contre le cancer, dans la mesure où elle est fréquemment mutée. Pour cela plusieurs approches ont été réalisées dans le but de rétablir la fonction de p53 dans les tumeurs p53 muté. En principe, l'activité fonctionnelle des mutants de p53 pourrait être restaurée par l'introduction d'une copie du gène p53 de type sauvage par un vecteur viral adapté. Les principales stratégies pour la restauration de la fonction de p53 par des manières

thérapeutiques exogènes ont été largement étudiées à la fois *in vivo* et *in vitro*, en particulier pour le traitement du carcinome hépatocellulaire (HCC) où des vecteurs viraux contenant p53 ont été utilisés dans plusieurs essais cliniques (Tian et al., 2009). Néanmoins, la thérapie génique est actuellement limitée à l'administration locale, car les méthodes efficaces pour l'administration ciblée systémique de vecteurs viraux aux cellules tumorales ne sont pas encore au point. De plus, une amélioration significative de l'efficacité du transfert de gènes est souhaitable pour en améliorer l'application.

Compte-tenu de ces limitations, il peut également être important de s'intéresser à des traitements capables de potentialiser l'apoptose chez des cellules dont p53 est muté en induisant des voies de signalisation de remplacement.



**Figure 39** : Implication de la protéine p53 dans l'apoptose

## III.6 JNK, p38 et apoptose

La conversion des signaux extracellulaires en réponses intracellulaires conduit notamment à la mort par apoptose. Il s'agit d'un processus complexe impliquant souvent l'activité des MAPK (Mitogen Activated Protein kinases)

### III.6.1 JNK et apoptose

L'activation de JNK est généralement associée aux processus d'apoptose. Les JNK kinases ont été initialement identifiées comme des protéines kinases activées lors d'exposition aux UV. JNK peut également être activé par plusieurs stimuli, y compris les facteurs de croissance (Hibi et al., 1993), les facteurs de stress, les cytokines (Westwick et al., 1994) ou

les réactifs cytotoxiques et génotoxiques. Ces types d'activation déclenchent les voies apoptotiques (Sluss et al., 1994; Cano and Mahadevan, 1995). Il a de plus été montré que la privation en facteur de croissance (NGF) provoque une activation continue de JNK et induit l'apoptose chez les cellules de PC12 (Xia et al., 1995). Les études montrant l'induction de l'apoptose par les radiations  $\gamma$  ont mis en évidence une implication de JNK1 (Chen et al., 1996). Les radiations  $\gamma$  stimulent une activation tardive mais persistante de JNK1 chez les cellules Jurkat, et ce de manière concomitante avec une augmentation de la fragmentation de l'ADN (indicateur d'apoptose tardive). D'autres études ont clairement établi le rôle de JNK dans l'apoptose induite par TNF- $\alpha$ , Fas-ligand, les rayons X et UV (Verheij et al., 1996; Wilson et al., 1996; Zanke et al., 1996).

Il a ainsi été observé que JNK joue un rôle central dans les processus d'apoptose. Il peut être activé par la voie dite « extrinsèque », initiée par les récepteurs de mort tels que TNF $\alpha$ , TRAIL ou Fas. Il peut également l'être par la voie dite « intrinsèque », initié par des événements mitochondriaux, suite à un stress génotoxique. Ce dernier concerne l'exposition aux radiations ionisantes et aux UV, les agents oxydants (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), des médicaments anticancéreux tels que l'étoposide (VP-16) ou la camptothécine (CPT) (Seimiya et al., 1997), ou les poisons du fuseau mitotique (Matson and Stukenberg, 2011). Les voies apoptotiques intrinsèque et extrinsèque mettant en jeu JNK peuvent être activées toutes deux de manière indépendante chez certains types cellulaires, en fonction du stimulus appliqué : chez les lymphocytes T humains l'activation de JNK peut être induite par un stress génotoxique (voie intrinsèque) mais également par Fas (voie extrinsèque) (Latinis and Koretzky, 1996; Wilson et al. 1996). JNK agit, soit en régulant positivement les gènes pro-apoptotiques *via* la transactivation de facteurs de transcription spécifiques comprenant c-Jun, soit en modulant directement les activités des protéines pro- et anti-apoptotiques mitochondriales par l'intermédiaire d'événements de phosphorylation.

L'implication de JNK dans les processus d'apoptose a pu être mise en évidence en faisant varier l'expression de molécules de sa voie de signalisation. La surexpression de la protéine ASK1 (apoptose signal régulation kinase-1, MAPKKK activant MEK4 et MEK7) induit l'apoptose de cellules embryonnaires rénales humaines, des cellules du carcinome épidermique et des cellules Jurkat T (Ichijo et al., 1997). A l'opposé, la surexpression *in vitro* du dominant négatif de MEK4, *in vitro* peut bloquer l'induction de la mort des cellules induites par irradiation, par des médicaments anticancéreux génotoxiques (cisplatine, adriamycine et étoposide), ou par le peroxyde et la céramide (Cuvillier et al., 1996; Verheij et al., 1996; Zanke et al., 1996). Par ailleurs, la surexpression de la forme inactive de c-Jun ou

du dominant négatif de MEKK1 empêche l'induction de la mort cellulaire par irradiation, la céramide, ou par un choc thermique, chez les cellules U937 et BAE (Verheij et al., 1996)

L'apoptose en lien avec les voies d'activation de JNK, a également été largement étudiée à partir de modèles animaux souris. Les cellules spléniques CD4<sup>+</sup> ou les thymocytes déficients pour JNK1 présentent une résistance à l'apoptose lors de la stimulation par le CD3 (Sabapathy et al., 2001). Il en est de même pour les thymocytes déficients pour JNK2 (Sabapathy et al., 1999). Ces résultats montrent le rôle de JNK1 et JNK2 dans l'apoptose lymphocytaire. Les fibroblastes embryonnaires de souris knockout pour la JNK1 et JNK2 sont également plus résistants à l'apoptose par comparaison avec des cellules normales (Tournier et al., 2000). Un phénotype similaire a été retrouvé chez les souris c-Jun A63/73, dont c-Jun porte des mutations dans les sites de phosphorylation (Behrens et al., 1999) Des études faites sur des fibroblastes embryonnaires prélevés à partir de souris JNK1<sup>-/-</sup>JNK2<sup>-/-</sup> ont de plus montré leur résistance à l'apoptose, en réponse à une irradiation UV, au méthyl méthanesulfate (agent alkylant de l'ADN) et à l'anisomycine (inhibiteur de la traduction) (Tournier et al., 2000). Il a été suggéré que le défaut d'apoptose peut être corrélé à l'absence de dépoliarisation mitochondriale, de libération du cytochrome c, et d'activation des caspases. Le rôle de JNK3 dans l'apoptose a été étudié par Yang et al en 1997, à l'aide de souris KO pour JNK3 (JNK3 KO). Il est connu que les agents cytotoxiques comme la kainite ou le glutamate induisent l'apoptose des neurones de l'hippocampe chez les souris de type sauvage. Ces auteurs ont observé que les neurones de l'hippocampe de souris JNK3 KO présentent une très forte résistance à l'apoptose. Par ailleurs, l'inhibition de la phosphorylation de c-Jun chez des souris sauvages conduit à une résistance à l'apoptose similaire à celle des souris JNK3 KO. Ceci suggère le rôle essentiel de JNK3 et de la phosphorylation de c-Jun dans la mort cellulaire par apoptose (Yang et al., 1997).

### **III.6.1.2 JNK : acteur principal de l'apoptose intrinsèque**

En 2000, Tournier et al ont montré l'importance de JNK dans la libération du cytochrome c, sans identifier le lien direct avec l'activation de JNK (Tournier et al., 2000). Il a par la suite été montré que l'activation de JNK provoque la libération du cytochrome c et de SMAC/Diablo (molécule potentialisant l'apoptose) à partir de mitochondries isolées (Chauhan et al., 2003).

JNK est actuellement reconnu pour jouer un rôle essentiel dans la modulation des fonctions des protéines pro-et anti-apoptotiques présentes au niveau mitochondrial. Il permet d'activer



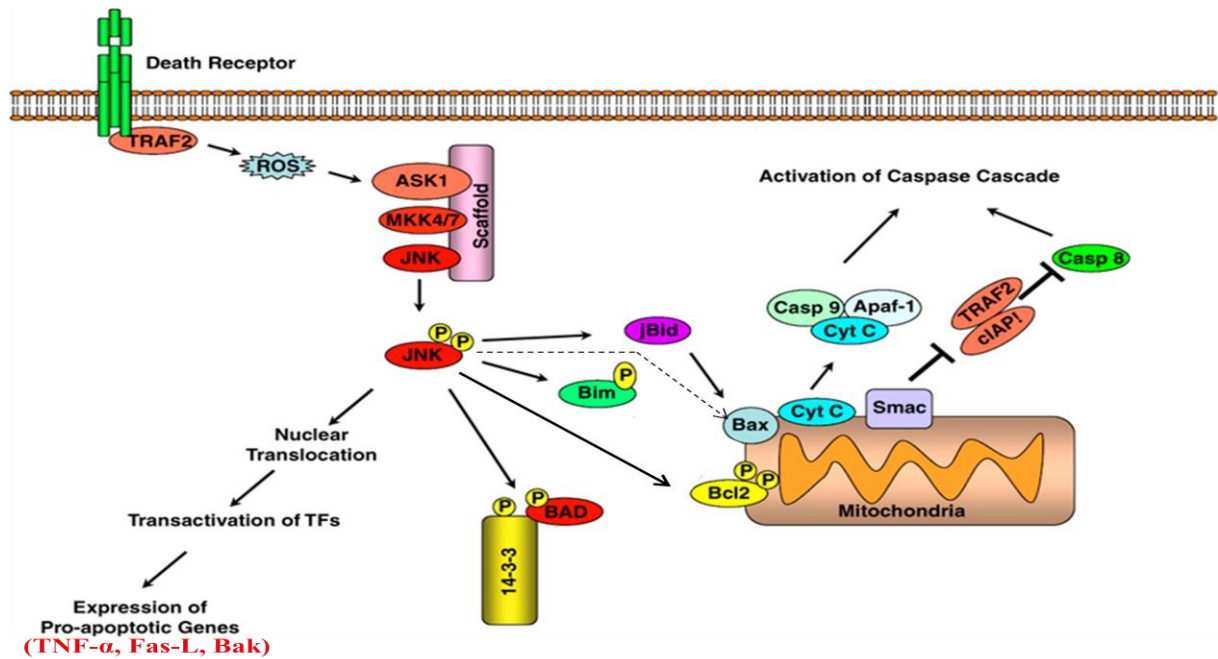
le clivage de Bid. Une fois clivé, Bid est relocalisé à la membrane mitochondriale, ce qui permet le déclenchement de l'apoptose (Madesh et al., 2002)

Il a également été observé que JNK peut moduler l'activité d'autres protéines pro-apoptotiques à domaine BH3, telles que Bim et Bmf (Lei and Davis, 2003). Après avoir été activées par phosphorylation, Bim et Bmf activent à leur tour Bax et Bak, permettant d'initier l'apoptose intrinsèque. Bim et Bmf contribuent également au processus d'apoptose en neutralisant par phosphorylation les protéines anti-apoptotiques Bcl2 et Bcl-xL (Puthalakath et al., 1999; Puthalakath and Strasser, 2002). L'étude de la phosphorylation de Bim par JNK a montré qu'elle a lieu sur trois sites (Ser100, Thr112 et Ser114), ce qui contribue à sa stabilité, à sa redistribution au niveau de membrane mitochondriale et à une meilleure interaction avec Bcl2 et Bcl-xl (Geissler et al., 2013)

Par ailleurs, JNK phosphoryle la protéine Bad au niveau de la sérine 128 (Donovan et al., 2002), ce qui favorise son effet apoptotique, comme démontré dans les neurones granulaires du cervelet primaires de rat. Les protéines kinases de pro-survie (Akt-1, PAK-1, PKA,...) inhibent généralement l'effet pro-apoptotique de Bad en le phosphorylant au niveau des sérines 112 et 136. Cette double phosphorylation conduit à sa séquestration par les protéines de la famille 14-3-3 (Gross et al., 1999). JNK agit à deux niveaux pour empêcher l'interaction entre Bad et les protéines 14-3-3 : par la phosphorylation de Bad sur la sérine 128 et par phosphorylation de la protéine 14-3-3 $\zeta$  au niveau de la sérine 184 (Tsuruta et al., 2004). Bad ainsi libéré peut s'associer à des molécules anti-apoptotiques telles que Bcl2 ou Bcl-XL et promouvoir l'apoptose (Wang et al., 2007).

JNK agit de plus de manière positive sur l'apoptose, par phosphorylation de Bax et de ses protéines de séquestration de la famille 14-3-3. D'une part, JNK phosphoryle la Ser184 de la protéine 14-3-3 $\zeta$  et la Ser186 de la protéine 14-3-3 $\sigma$ , conduisant à la dissociation du complexe Bax /protéine 14-3-3. D'autre part, la phosphorylation de Bax conduit à son changement de conformation, ce qui lui permet de passer d'une forme inactive à une forme active et sa relocalisation au niveau de la membrane mitochondriale. Bax peut ainsi contribuer au relargage du cytochrome c. ( Kim et al., 2006; Tsuruta et al., 2004)

En plus de son implication dans l'activation des protéines pro apoptotiques, JNK promeut l'apoptose en inhibant par phosphorylation la molécule anti-apoptotique Bcl2 (directement ou *via* Bim et Bmf). La phosphorylation de JNK permettant d'inactiver Bcl2 a lieu sur la sérine 70 (Yamamoto et al., 1999; Srivastava et al., 1999) (Figure 40).



**Figure 40** : Différents mécanismes induits par JNK kinase dans l'induction de l'apoptose (intrinsèque).  
Modifié d'après (Dhanasekaran and Reddy, 2008)

JNK intervient également dans le processus d'apoptose en régulant la phosphorylation de facteurs de transcription de la famille p53 (Fuchs et al., 1998). La phosphorylation de p53 sur la Ser6 inhibe sa dégradation ubiquitaire par le protéasome et conduit à la stabilisation de son niveau d'expression. Il a été montré que la phosphorylation de p53 sur le résidu Ser6 par JNK2 est nécessaire au processus d'apoptose (Oleinik et al., 2007). Il est ainsi probable que la voie apoptotique activée par JNK implique une surexpression des gènes pro-apoptotiques médiés par p53 comme Bax ou PUMA. JNK est également impliqué dans la régulation de l'apoptose par l'intermédiaire d'un autre facteur de la famille de p53 ; p73 (Jones et al., 2007) JNK permet la phosphorylation d'un résidu thréonine et d'un résidu sérine de p73, ce qui conduit à sa stabilisation et à sa protection contre la dégradation protéosomale. De même que p53, p73 induit l'apoptose en augmentant l'expression de gènes pro-apoptotiques, y compris Bax et PUMA.

### III.6.2 P38 et apoptose

Les MAPK p38 peuvent jouer un rôle pro ou anti apoptotique, en fonction du type cellulaire et du stimulus appliqué. La surexpression de l'activateur de p38 MKK6, protège par exemple les myocytes cardiaques de l'apoptose induite par les récepteurs  $\beta$ -adrénergique (Zechner et al., 1998) alors que p38 peut être un médiateur important de l'apoptose pour les neurones (De Zutter and Davis, 2001) ou les cellules cardiaques (Saurin et al., 2000). Dans notre cas nous nous intéresserons à l'activité pro-apoptotique de p38. Chez de nombreux

types cellulaires, p38 active l'apoptose lors de la stimulation par le TNF $\alpha$  (Valladares et al., 2000), le TGF  $\beta$ 31 (transforming growth factor- $\beta$ 31) ou en réponse au stress oxydatif (Zhuang et al., 2000). Les kinases p38 peuvent induire l'apoptose par différents mécanismes : en augmentant l'expression de protéines pro-apoptotiques ou en modulant leur activité.

La voie des MAPK p38 conduisant à l'apoptose peut être activée par les ROS. Le récepteur de mort TRAIL peut induire l'apoptose médiée par les ROS en activant les p38 dans les cellules HeLa (Lee et al., 2002). Lors du traitement par l'acide bétulinique, les cellules de mélanomes peuvent entrer en apoptose suite à la production de ROS et à l'activation des p38 (Tan et al., 2003). L'acide salvianolique B peut également induire l'apoptose chez les cellules de glioblastomes U87 *via* la génération des ROS et l'activation de la voie p38 (Z.-S. Wang et al., 2013)

Les MAPK p38 peuvent de plus déclencher les voies pro-apoptotiques en régulant l'expression et/ou l'activité de différents membres de la famille Bcl-2, telles que Bax, Bim ou Bcl2. Chez les cellules dérivées de cardiomyocytes, p38 induit sa surexpression de Bax aux niveaux transcriptionnel et protéique, ce qui les sensibilise à l'apoptose induite par différents stimuli (Porras et al., 2004). De plus, chez les cardiomyocytes néonataux primaires, p38 ( $\alpha/\beta$ ) induit la phosphorylation de Bax et sa translocation à la mitochondrie lors d'ischémie simulée (Capano and Crompton, 2006). Une translocation due à la phosphorylation de Bax par p38 ( $\alpha/\beta$ ) a également été observée chez une lignée d'hépatome humain (HepG2) après traitement par différents stimuli pro-apoptotiques (Kim et al., 2006), de même que chez les neurones traités par la cyanide ou l'oxyde nitrique (Shou et al., 2003). Il existe cependant des études contradictoires. Il a par exemple été montré que p38 pouvait s'associer à Bax et le sequestrer dans le cytoplasme empêchant sa relocalisation à la membrane mitochondriale (Garibal et al., 2010)

p38 $\alpha$  régule positivement l'expression (Cai and Xia, 2008), et l'activité (B. Cai et al., 2006) de Bim (molécule activatrice de Bax et Bak), ce qui contribue à l'induction de l'apoptose. Dans les cellules PC12 traitées par l'arsénite de sodium, il a été montré que p38 $\alpha$  stimule la transcription de Bim en induisant la translocation du facteur de transcription FOXO3 (Forhead-box O3) au noyau, conduisant également à une augmentation du niveau d'expression protéique de BimEL (une des 3 isoformes de Bim) (B. Cai and Xia 2008). P38 $\alpha$  contribue de plus à l'activation par phosphorylation au niveau de la Ser65 (B. Cai et al., 2006).

P38 $\alpha$  peut également phosphoryler la protéine Bcl-2, ce qui conduit à l'inhibition de son activité anti-apoptotique et à la libération du cytochrome-c mitochondrial (Torcia et al., 2001).

Une étude par spectrométrie de masse a montré que Bcl2 peut être phosphorylé par p38 au niveau de la Ser87 et de la Thr56 chez les B mémoires (De Chiara et al., 2006). Chez les myocytes cardiaques de rats adultes, un stress oxydatif par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> conduit également à la phosphorylation de la protéine Bcl-2 suite à l'activation de p38 $\alpha$ , contribuant à l'apoptose (Markou et al., 2009).

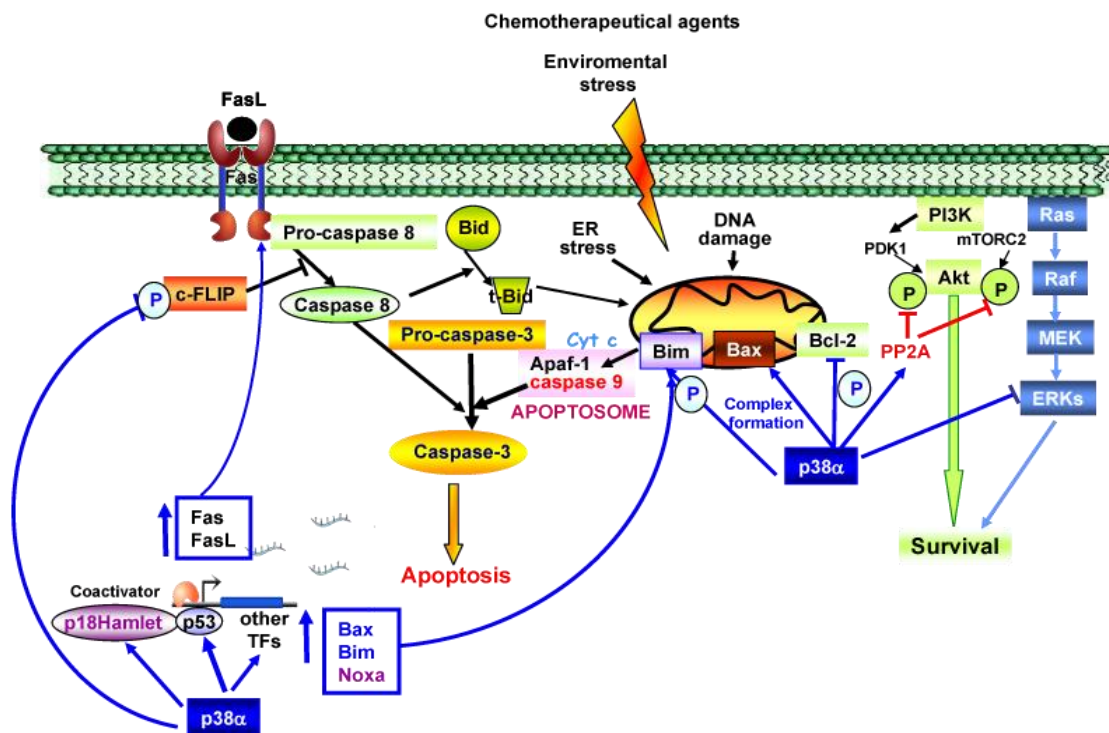
Outre la régulation des membres de la famille Bcl2, p38 $\alpha$  est également impliqué dans la régulation de l'expression du récepteur pro-apoptotique Fas et de son ligand FasL. Les fibroblastes et les cardiomyocytes déficients en p38 sont plus résistants à l'apoptose, en corrélation avec une diminution de l'expression de Fas (Porrás et al., 2004). Il a été montré par ailleurs que p38 participe à la surexpression de Fas et de FasL suite à une activation par l'anti-CD3 (Hsu et al., 1999). Chez les myocytes cardiaques exposés à une ischémie/reperfusion, p38 $\alpha$  augmente également l'expression de Fas par phosphorylation du facteur de transcription STAT1 (une cible de NF- $\kappa$ B) sur la Ser-727 (Stephanou et al., 2001). P38 $\alpha$  peut de plus médier directement l'activation de la caspase 8 initiatrice, recrutée par les récepteurs pro-apoptotiques, tel que Fas. La présence de la molécule c-FLIP (Cellular FLICE-like inhibitory Protein) au niveau du DISC (forme non phosphorylée) empêche l'activation de la caspase 8 (la caspase 8 en se combinant à c-FLIP à la place d'une autre caspase 8 ne peut s'autoactiver). P38 en phosphorylant c-FLIP provoque son départ du DISC (Tourian et al., 2004), ce qui permet l'activation de la caspase 8 et l'entrée des cellules en apoptose.

La protéine suppresseur de tumeur p53 est également une cible importante de p38 $\alpha$ . Cette dernière peut phosphoryler et/ou activer p53, en réponse à différents médicaments chimiothérapeutiques tels que la cisplatine et conduire les cellules à l'apoptose (Bragado et al., 2007). P38 $\alpha$  peut également induire l'apoptose *via* p53 en réponse à d'autres stimuli, tel que l'infection par le HIV-1 (Perfettini et al., 2005). Outre son rôle de régulateur direct de p53, p38 $\alpha$  peut également intervenir de manière indirecte par phosphorylation et stabilisation de p18hamlet, un coactivateur de p53 (Cuadrado et al., 2007). En réponse aux dommages de l'ADN, p18Hamlet phosphorylé s'accumule dans la cellule, et favorise le recrutement de p53 au niveau du promoteur de différents gènes impliqués dans l'apoptose intrinsèque, tels que Noxa, Bax ou Bim (Zuluaga et al., 2007)

Des mécanismes associés à la progression des cellules dans le cycle ou à leur survie, peuvent également être négativement régulés par p38 $\alpha$ . Par exemple, la phosphorylation de l'histone H2AX par p38 $\alpha$  conduit à la forme  $\gamma$ -H2AX lors de la privation de sérum.  $\gamma$ -H2AX intervient dans l'arrêt des cellules dans le cycle (en particulier lors des processus de réparation d'ADN)

et à leur apoptose si la forme phosphorylée est maintenue (Lu et al., 2008). P38 $\alpha$  est également un régulateur négatif des deux voies de survie : PI3K/Akt et ERK. Chez les cellules dérivées de cardiomyocytes, ou les MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) dont p38 $\alpha$  est déficient, les deux voies ERK et PI3K/Akt sont activées, ce qui contribue à leur survie (Porras et al., 2004 ; Zuluaga et al. 2007)

Des résultats obtenus sur des modèles physiologiques murins par invalidation de p38 montrent les fonctions antiprolifératives et suppresseur de tumeur de cette molécule, suggérant son rôle apoptotique. L'inactivation de p38 $\alpha$  conduit à une prolifération accrue de différents types cellulaires (cardiomyocytes, hépatocytes, cellules hématopoïétiques en particulier) (Engel et al., 2005), Des souris déficientes en p38 $\alpha$  et exprimant le transgène K-RasG12V développent des tumeurs au niveau des poumons (Ventura et al., 2007) ou du foie (Hui et al. 2007; Sakurai et al., 2008), ce qui montre la fonction de suppresseur de tumeur de p38 $\alpha$  *in vivo*. Par ailleurs, des souris déficientes en p38 $\delta$  présentent une sensibilité réduite à l'induction de cancers de la peau (Schindler et al., 2009) (Figure 41)



**Figure 41** : Les mécanismes impliqués dans l'apoptose induite par p38 $\alpha$ .  
D'après (<http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/MAPK14-p38ainCancerID20089.html>)



## **CHAPITRE 2 : OBJECTIFS**





Mes travaux de thèse avaient pour objectif l'étude du rôle paradoxal de l'EBV dans l'équilibre survie/apoptose des lymphocytes B en programme de latence III. Ils ont été réalisés en continuité de ceux déjà menés au laboratoire sur l'étude des cibles non conventionnelles du virus, qui ont mis en évidence son rôle dans les processus d'apoptose, bien que le programme de latence III soit considéré comme un programme de prolifération.

Deux aspects en lien avec le rôle modulateur de l'EBV sur la réponse des cellules B à l'apoptose ont été abordés. Ils concernent d'une part le rôle immuno-modulateur de l'EBV et d'autre part son rôle pharmaco-modulateur.

La première partie de mes travaux a porté sur l'immuno-inhibiteur B7-H1, connu pour être surexprimé à la surface des lymphocytes B infectés par l'EBV. Elle avait pour objectif de définir si ce déterminant immunogénique de la synapse immunologique pouvait jouer un rôle inhibiteur de la réponse T anti-EBV. Ceci en vue d'appréhender sa fonction dans l'inhibition de l'entrée en apoptose des lymphocytes B en latence III et leur échappement éventuel à la surveillance du système immunitaire et les processus de lymphomagenèse. Cette étude avait en particulier pour but de définir le rôle de NF- $\kappa$ B et c-Myc (les deux facteurs de transcription majeurs activés lors de l'infection), sur l'expression transcriptionnelle et sur l'expression protéique à la membrane de B7-H1, ainsi que les mécanismes moléculaires sous-jacents. Les résultats obtenus font l'objet de la partie « **Publication 1** ».

La seconde partie de mes travaux a été réalisée en collaboration avec le laboratoire BioCIS de chimie thérapeutique de la Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry (UMR CNRS 8076), qui s'intéresse aux combretastatines, une nouvelle famille des poisons du fuseau mitotique, et en particulier à l'isoNH<sub>2</sub>CA-4. Elle avait pour objectif d'étudier l'efficacité de cette dernière sur les cellules de type lymphome, infectées ou non par l'EBV et mutées ou non par p53, de manière à évaluer le rôle pharmaco-modulateur éventuel de l'EBV lors du traitement des cellules cancéreuses par les poisons du fuseau, sachant que ce virus conduit aussi bien à l'activation des voies de prolifération cellulaire que des voies associées à l'apoptose. Les résultats obtenus font l'objet de la partie « **Publication 2** ».



**CHAPITRE 3 : RESULTATS, CONCLUSIONS**  
**DISCUSSIONS & PERSPECTIVES**



## **Publication 1**



## I.1 Introduction

Le virus d'Epstein-Barr est un virus appartenant à la famille des gamma-herpes virus (Crough and Khanna, 2009), infectant plus que 90 % de la population mondiale. La primo-infection a lieu durant l'enfance, généralement de manière asymptomatique. Cela conduit à la prolifération des lymphocytes B infectés par l'EBV. Cette prolifération est contrôlée par une réponse immune T et NK. Cette réponse aboutit à un équilibre hôte/virus, tel que le virus persiste dans l'organisme durant toute la vie de l'individu infecté. A l'état latent, ce virus persiste dans les cellules B mémoires d'une façon silencieuse. Il peut être réactivé suite à une immunodéficience et il est associé à différents cancers tels que le lymphome de Hodgkin, le lymphome de Burkitt ou le carcinome du rhinopharynx (Young and Rickinson, 2004). Chez les individus immunocompétents le virus demeure de continuellement actif, bien que ce soit à des niveaux très faibles, ce qui permet la production continue de virions.

Lors de l'infection latente, l'équilibre hôte/virus est assuré par le système immunitaire, en particulier par la mise en place d'une réponse T anti-EBV. Cette dernière vise à contrôler les cellules B en programme de prolifération de l'EBV. L'interaction entre les cellules T cytotoxiques et les lymphocytes B infectés se fait par l'intermédiaire de la synapse immunologique. Au niveau de cette zone de contact, la réponse immune fait intervenir deux signaux. Le premier est délivré par l'interaction peptide-CMH/TCR et induit une réponse spécifique (Dustin et al., 2010). Par contre, les cellules présentatrices de l'antigène (telles que les lymphocytes B immortalisés par l'EBV) sont responsables d'un second signal dit de co-activation. Ce dernier est indépendant de l'antigène et peut être activateur ou inhibiteur de la réponse T. Les signaux activateurs permettent l'expansion clonale de la cellule T, la sécrétion de cytokines et la mise en place de ses fonctions effectrices. Ce signal peut être contrecarré par des signaux inhibiteurs qui ont comme rôle principal le maintien de la tolérance immunologique et la neutralisation des réactions d'auto-immunité. Les signaux co-stimulateurs et co-inhibiteurs sont délivrés par des molécules appartenant à la famille B7. Cette famille comporte 10 molécules dont les fonctions diffèrent en fonction de leur interaction avec leur récepteur correspondant sur le lymphocyte T. Certaines possèdent des fonctions co-activatrices, d'autres des fonction co-inhibitrices (Flajnik et al., 2012)

B7-H1 (PD-L1, Programme Death Ligand 1) est une molécule appartenant à la famille B7. L'interaction avec son récepteur, le PD1, délivre des signaux co-inhibiteurs. Au niveau d'ARNm, B7-H1 est exprimé de manière abondante et constitutive par de nombreux types cellulaires (hématopoïétiques ou non) (Dong et al., 1999), mais peu d'entre eux expriment la

protéine à leur surface. Sa sur-expression a par contre été rapportée dans de nombreux cancers (mélanomes, myélomes, lymphoproliférations, cancers du sein, du poumon, des ovaires, du colon,...) (Dong et al., 2002; Wang and Chen, 2011) ou lors d'infections virales chroniques, comme dans le cas du HIV, de l'hépatite C ou d'une infection par le rhinovirus (Dong et al., 2002; Wang and Chen, 2011). Cette surexpression permet aux cellules tumorales d'inhiber la réponse T cytotoxique et d'échapper à la surveillance du système immunitaire. De même, l'expression de B7-H1 est fortement augmentée à la surface des cellules B infectées par l'EBV et en programme de prolifération (latence III) (Y. S. Kim et al., 2008).

Les cellules B en latence III de l'EBV sont caractérisées par une forte activation des deux facteurs de transcription C-myc et NF- $\kappa$ B (Faumont et al., 2009). c-Myc peut contribuer à l'échappement au système immunitaire des cellules B tumorales en diminuant les réponses NF- $\kappa$ B et aux interférons (Schlee et al., 2007) Ainsi, d'un point de vue immunologique, ces deux facteurs majeurs de transcription peuvent jouer des rôles opposés, c-Myc ayant pour fonction de diminuer l'expression de molécules de surface induite par l'activation de NF- $\kappa$ B.

L'objectif principal de ce travail est de définir le rôle que peuvent jouer NF- $\kappa$ B et c-Myc dans la régulation de l'expression à la surface cellulaire de la molécule immuno-inhibitrice B7-H1 chez les cellules B en programme de prolifération de l'EBV, ainsi que d'étudier les mécanismes moléculaires mis en jeu. Ceci en vue d'appréhender le rôle de B7-H1 dans la réponse immunitaire T anti-EBV et dans l'échappement éventuel à la surveillance du système immunitaire.



## **I.2 Article**

**“B7-H1, which represses EBV-immortalized B cell killing by autologous T and NK cells, is oppositely regulated by c-Myc and EBV latency III program at both mRNA and secretory lysosome levels”**

Durand-Panteix S, Farhat M, Youlyouz-Marfak I, Rouaud P, Ouk-Martin C, David A, Faumont N, Feuillard J, Jayat-Vignoles C.

**Journal of Immunology Journal of Immunology 2012; 189:181-190**

## B7-H1, Which Represses EBV-Immortalized B Cell Killing by Autologous T and NK Cells, Is Oppositely Regulated by c-Myc and EBV Latency III Program at Both mRNA and Secretory Lysosome Levels

Stéphanie Durand-Panteix, Mona Farhat, Ibtissam Youlyouz-Marfak, Pauline Rouaud, Catherine Ouk-Martin, Amandine David, Nathalie Faumont, Jean Feuillard and Chantal Jayat-Vignoles

*J Immunol* 2012; 189:181-190; Prepublished online 1 June 2012;

doi: 10.4049/jimmunol.1102277

<http://www.jimmunol.org/content/189/1/181>

- 
- Supplementary Material** <http://www.jimmunol.org/content/suppl/2012/06/01/jimmunol.1102277.DCI.html>
- References** This article cites 60 articles, 23 of which you can access for free at: <http://www.jimmunol.org/content/189/1/181.full#ref-list-1>
- Subscriptions** Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at: <http://jimmunol.org/subscriptions>
- Permissions** Submit copyright permission requests at: <http://www.aai.org/ji/copyright.html>
- Email Alerts** Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at: <http://jimmunol.org/cgi/alerts/etoc>



### I.3 Conclusion et discussion

Nous avons pu montrer dans un premier temps que l'expression de l'immuno-inhibiteur B7-H1 est augmentée à la surface des cellules B en latence III de l'EBV, ce qui permet de réprimer la réponse T/NK anti-EBV. Cette inhibition, réalisée en bloquant la liaison B7-H1/PD1 à l'aide d'un anticorps bloquant (anti-B7-H1), suggère que cette molécule peut jouer un rôle *in vivo* dans la réponse T/NK anti-EBV et contribuer à l'échappement au système immunitaire des cellules B en latence III de l'EBV, ainsi qu'à des processus de lymphomagénèse.

Nous avons également montré que les cellules B infectées par l'EBV présentent une surexpression de B7-H1 au niveau transcriptionnel. Cette dernière est faiblement induite par NFκB (ce qui suggère qu'il existe au moins un autre acteur impliqué dans la transcription de B7-H1) et fortement réprimé par c-myc.

Nous avons également observé une augmentation de l'expression protéique de B7-H1 à la surface des cellules infectées par l'EBV. De même que pour l'expression transcriptionnelle, NF-κB n'assure pas la régulation de ce processus, mais c-Myc l'inhibe fortement.

L'étude de la séquence en acides aminés de B7H1 a montré qu'il existe dans la séquence signal un motif YWHL (Tyrosine-Tryptophane-Histidine-Leucine), qui est présent chez les molécules associées au compartiment lysosomal. Des études de co-localisation entre B7-H1 et les lysosomes (colocalisation avec une molécule constitutive de leur membrane : LAMP1 et une enzyme intravésiculaire : cathepsine D) ont montré la colocalisation entre B7-H1 et le compartiment lysosomal. Les lysosomes représentent majoritairement un compartiment de dégradation des protéines chez les cellules eucaryotes. Cependant, certains types cellulaires possèdent également des lysosomes dits sécrétoires. Ces derniers sont apparentés aux lysosomes de dégradation et possèdent des enzymes de dégradation, mais ils jouent également le rôle de granules sécrétoires (Stinchcombe et al., 2004). Ce type de lysosomes est retrouvé en particulier dans les cellules hématopoïétiques comme les lymphocytes T cytotoxiques (CTL), les plaquettes, les mastocytes, les cellules dendritiques et les cellules B. Chez les cellules T, la stimulation du TCR aboutit à la dégranulation des lysosomes sécrétoires, qui libèrent des composés bioactifs comme les granzymes et la perforine permettant l'élimination des cellules cibles (Gilfillan and Tkaczyk, 2006; Radoja et al., 2006; van der Sluijs et al., 2008) Chez les basophiles, la libération des histamines stockées dans les lysosomes sécrétoires permettent d'initier la réponse inflammatoire (Holt et al., 2006). Ce type de lysosomes est particulièrement associé au stockage (pour une mobilisation rapide) et au

transport des protéines vers les compartiments membranaires et extra-cellulaires. Les protéines transportées par les lysosomes sécrétoires sont protégées des enzymes de dégradation, soit parce qu'elles forment un corps dense au sein de la vésicule (pour celles qui seront sécrétées), soit par des N-glycosylations pour les protéines qui seront exprimées à la surface de la membrane cellulaire suite à la fusion de la vésicule avec la membrane plasmique, ce qui est le cas de B7-H1. Ces vésicules possèdent un marqueur vésiculaire propre, Rab27 permettant d'assurer à ces vésicules un trafic intracellulaire correct. Afin de savoir si B7-H1 est associé aux lysosomes sécrétoires, nous avons réalisé un co-marquage Rab27a/B7-H1. Nos résultats ont montré la colocalisation de ces protéines, suggérant la présence de B7-H1 au niveau de la membrane de ces organites. Nous avons également montré que la quantité de lysosomes sécrétoires est augmentée chez les lymphocytes B en latence III de l'EBV. Des analyses par cytométrie en flux ont de plus montré un niveau de fusion augmenté entre ces vésicules et la membrane plasmique (présence significativement augmentée de Rab27a à la surface des cellules infectées à l'EBV). L'ensemble de ces résultats peut expliquer l'augmentation du niveau d'expression de B7-H1 à la surface des cellules infectées.

Pour être exporté à la membrane, les lysosomes sécrétoires nécessitent un réseau de transport au sein de la cellule. Ce rôle est assuré par le cytosquelette, en particulier les micro-filaments d'actine. Ces derniers assurent les transports courts au sein des cellules (entre le RE et le golgi en particulier) ou au niveau péri-membranaire ainsi que les fonctions d'exocytose. De nombreuses études ont mis en évidence l'implication des microfilaments d'actine dans les processus de transport vésiculaire, en particulier par l'utilisation de toxines empêchant sa polymérisation. Par exemple, le transport de VSVG (vesicular stomatitis virus G protein) est inhibé lorsque les cellules sont traitées à la cytochalasine B (Hirschberg et al., 1998). Une autre étude, a montré que la latrunculine B et le botulinum C2 bloquent le transport entre l'appareil de golgi et le réticulum endoplasmique (Valderrama et al., 2001). La régulation de la dynamique de polymérisation de ce réseau est en grande partie assurée par les Rho GTPases. Cette famille de petites molécules comporte 23 membres dont 16 interviennent dans le processus de polymérisation (RhoA, Cdc42 et Rac1 en particulier).

Le programme de l'EBV dans sa globalité et C-Myc peuvent agir sur la polymérisation de l'actine, soit directement, soit en agissant sur les protéines G à fonctions GTPases (Rho GTPases). Concernant l'EBV, L'expression de LMP1 dans les NPC est toujours associée à une augmentation de la propagation métastatique. L'expression de LMP1 conduit également à

une augmentation de la motilité cellulaire des cellules épithéliales ainsi qu'à leur capacité invasive (Horikawa et al., 2001). La voie PI3K, activée *via* le domaine CTAR1 de LMP1, est associée à l'activation de nombreux processus cellulaires (croissance cellulaire, motilité, adhésion, survie..) (Vivanco and Sawyers, 2002) Elle est responsable de l'activation de la kinase Akt, qui favorise la survie cellulaire et la régulation de Rho GTPases jouant le rôle de régulateurs positifs de la polymérisation du cytosquelette d'actine. We et Zheng et al. (Y. Zheng et al., 1994) ont constaté par la technique de chromatographie sur colonne que la sous unité régulatrice (p85) et catalytique (P110) de la PI3K, se lie à Rac1 et Cdc42. Il a de plus été montré que l'activité de la PI3K est renforcée par leur liaison à Rac1 et Cdc42 (Y. Zheng et al., 1994). Par ailleurs, l'inhibition de l'activité PI3K par la wortmanine ou l'inhibiteur chimique LY294002 inhibe l'activation de ces deux Rho GTPases chez les fibroblastes (Hawkins et al., 1995), les cellules épithéliales (Nakagawa et al., 2001) ou les neutrophiles (Benard et al., 1999b), indiquant qu'il existe une boucle de rétrocontrôle positive entre la PI3K et les Rho Gtpases. Chez les cellules épithéliales, la formation des fibres de stress est médiée par l'activation de la MAP kinase ERK, elle-même activée par l'expression de LMP1 (Dawson et al., 2008). Ainsi, l'EBV, *via* LMP1 et les voies de signalisation activées par cette protéine de latence, induit la polymérisation de l'actine et la formation des fibres de stress. Il existe également une kinase spécifique de l'EBV, impliquée dans la polymérisation de l'actine : BGLF4. Cette dernière est la seule kinase Ser/Thr identifiée pour l'EBV et retrouvée chez tous les virus de type Herpès. BGLF4 peut phosphoryler EBNA-2, EBNA-LP, et BZLF1 ( Kato et al., 2003; Yue et al., 2005; Asai et al., 2006). Elle est co-localisée avec le compartiment de réplication de l'ADN viral et est emballé dans le virion mûr comme une protéine du tégument ( Wang et al., 2005; Asai et al., 2006) . Cette kinase induit la condensation et le réarrangement des fibres de stress et des filaments d'actine.

Le facteur de transcription c-Myc régule également la polymérisation de l'actine. Des études de protéomiques ont montré que c-Myc régule l'activité de voies dépendantes de RhoA en baissant les niveaux d'expression de RhoA, de Cdc42 ou de rock, ainsi que d'un ensemble de protéines liées au cytosquelette (Shiio et al., 2002). La surexpression de c-Myc dans les lignées surexprimant RhoA conduit à la rupture de fibres de stress induite par RhoA. La formation de fibres de stress par RhoA est régulée par Rock (Amano et al., 1997; Riento and Ridley, 2003), qui a en particulier comme cibles la chaîne légère de la myosine (MLC) et la sous-unité de liaison de la myosine phosphatase MLC (MYPT1). RhoA active ces deux protéines par phosphorylation. C-myc affecte la voie de RhoA en inhibant la voie Rock et en empêchant leur phosphorylation. Par ailleurs, la surexpression de c-Myc déclenche la

transition des cellules épithéliales vers des cellules possédant des propriétés migratoires et invasives *via* une inactivation de la voie RhoA/Rock et une dépolymérisation du cytosquelette d'actine (Shi et al., 2013) C-myc peut également réguler au niveau transcriptionnel l'expression de RhoA (Chan et al., 2010)

Ces données montrent le rôle majeur du programme global de l'EBV, *via* LMP1, et c-Myc dans la régulation de la polymérisation du réseau d'actine : activateur pour le premier et inhibiteur pour le second. Sachant que cet élément du cytosquelette est également associé au transport vésiculaire, nous avons fait l'hypothèse que le programme de l'EBV et c-Myc étaient les régulateurs de l'expression de B7-H1 à la surface des cellules, *via* les lysosomes sécrétoires.

Des marquages à l'aide la phalloïdine, permettant de détecter l'actine sous sa forme polymérisée filamenteuse (F-actine), ont été réalisés chez des cellules infectées ou non par l'EBV et surexprimant ou non c-Myc. Nos résultats ont montré que les cellules infectées par l'EBV et sur-exprimant B7-H1 à leur surface possèdent plus de F-actine. Au contraire, la surexpression de c-Myc conduit à une diminution de la quantité de F-actine et de l'expression de B7-H1 à la surface cellulaire. C-Myc apparaît donc comme un régulateur négatif de l'expression membranaire de molécules associées aux lysosomes sécrétoires, dont le programme global de l'EBV favorise la fusion avec la membrane plasmique.

Ces rôles opposés de l'EBV et de c-Myc sur la polymérisation de l'actine, permettent de créer une boucle de régulation et d'équilibre dans l'expression de B7-H1, contribuant probablement à éviter l'échappement des cellules en latence III de l'EBV à la réponse immunitaire (maintien d'un niveau suffisamment bas) et les réactions d'auto-immunité avec une réponse T excessive (par un niveau d'expression suffisamment élevé). Il est probable que ces deux types de régulation aboutissent à un équilibre de la réponse immunitaire envers les cellules B en latence III de l'EBV.

En jouant sur le niveau de polymérisation de l'actine et en diminuant l'activité d'export des lysosomes sécrétoires, c-Myc pourrait jouer le rôle de régulateur de l'immunogénicité des cellules B transformées par l'EBV. Il pourrait contrôler le niveau d'expression de B7-H1, mais également d'autres molécules de la synapse immunologique transportées *via* les lysosomes sécrétoires. Ces modifications de sécrétions, en jouant sur le niveau d'expression des protéines membranaires des cellules infectées pourraient contribuer à contrôler et à moduler la réponse immune T anti-EBV. Une dérégulation de ce système (un niveau

d'expression augmenté en B7-H1 en particulier) pourrait contribuer à l'échappement du système immunitaire des cellules B en latence III de l'EBV et à l'initiation de processus de lymphogénèse.



## I.4 Perspectives

*In vitro*, l'EBV infecte et transforme les cellules B, conduisant à leur prolifération et à l'obtention de lignées cellulaires lymphoblastoïdes ou LCLs (latence III). *In vivo*, certains désordres lymphoprolifératifs de type B sont étroitement associés au programme de latence III de l'EBV, comme certains PTLD (post transplant lymphoproliferative disorder), la granulomatose lymphomatoïde, les lymphomes associés au pyothorax ou certaines lymphoproliférations du sujet âgé (Rezk and Weiss, 2007). Ceci pose la question de l'immunogénicité des lymphocytes B infectés par l'EBV et des mécanismes moléculaires sous-jacents pouvant conduire à l'apparition de ces tumeurs.

Le cytosquelette cellulaire, en association avec les processus d'exocytose, est susceptible de jouer un rôle majeur dans l'immunogénicité des cellules B et d'avoir un impact sur les processus de lymphomagénèse.

La tubuline et l'actine sont les éléments du cytosquelette associés aux processus sécrétoires. Les filaments de tubuline permettent aux vésicules sécrétoires, associées à des protéines motrices (dynéine et kinésines) assurant leur mouvement sur ce dernier, de circuler sur de longues distances au sein de la cellule. Les filaments d'actine, de plus faible diamètre et plus modulables, prennent ensuite le relais (avec comme protéines moteurs des myosines) pour assurer les mouvements péri membranaires de courte distance, ainsi que les processus d'exocytose (ils assurent également en parallèle les déplacements courts au sein des cellules comme ceux entre le golgi et le réticulum endoplasmique). L'organisation et la dynamique de polymérisation de la tubuline et de l'actine sont directement associées à la sécrétion et à l'expression des protéines membranaires. Toute modification intervenant chez une cellule proliférante est susceptible d'avoir pour conséquence une modification de son immunogénicité et d'entraîner des modifications dans la réponse T anti-tumorale (anti-EBV en particulier).

Il est connu que l'infection d'une cellule par un virus peut avoir des conséquences sur l'expression des molécules d'actine et de tubuline et/ou l'organisation de son cytosquelette, comme dans le cas du virus de l'hépatite C (Tsao et al., 2006) ou du HHV3 (*Varicella zoster virus*, qui est de même que l'EBV un Herpèsvirus) (Kuhn et al., 2005).

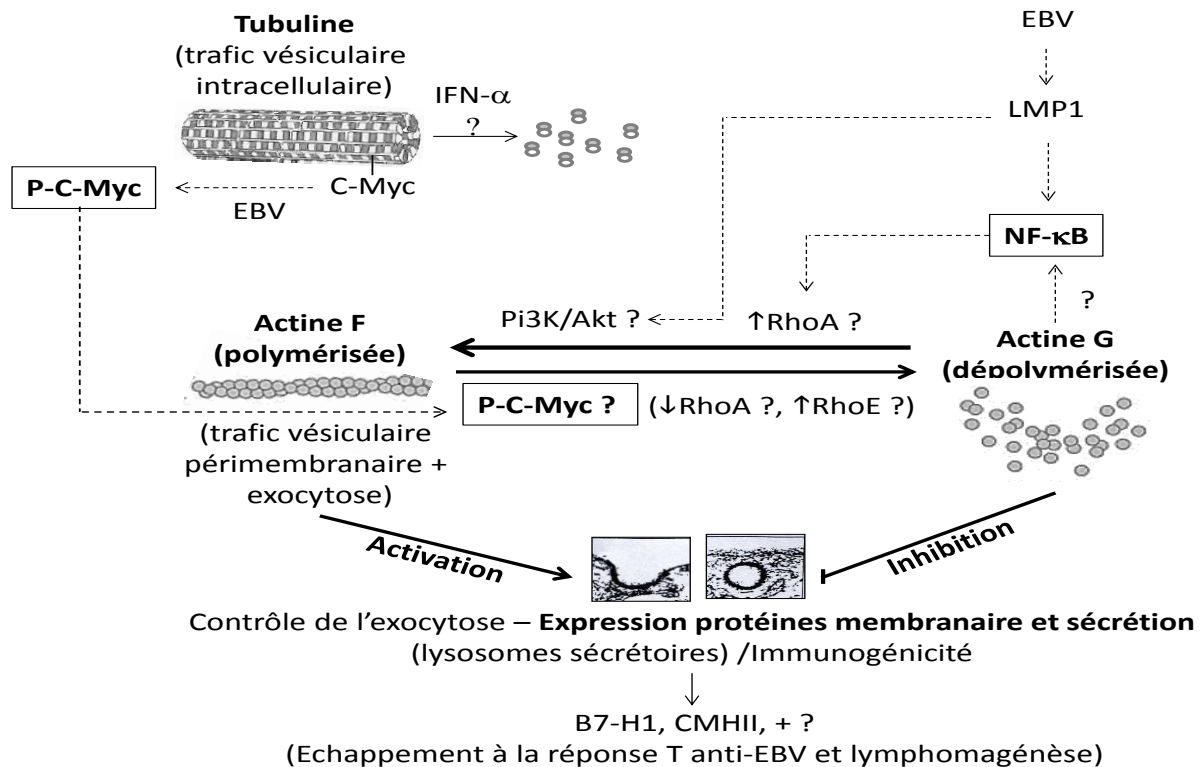
Le programme de latence III de l'EBV dans sa globalité a été décrit comme pouvant induire la polymérisation de l'actine chez les cellules B humaines (Melamed et al., 1994). Cette dernière a également été montrée comme pouvant être associée à une ré-organisation du réseau d'actine chez les cellules de type épithélial ou fibroblastique (suite à l'activation de la voie de

signalisation cellulaire Pi3K/Akt *via* l'oncoprotéine virale LMP1) (Dawson et al., 2003c) . LMP1 permet également d'activer chez les fibroblastes une Rho GTPase impliquée dans la polymérisation de l'actine, Cdc42 (Puls et al., 1999). Nous avons par ailleurs montré que c-Myc (un des facteurs de transcription majeur activé lors de l'infection par l'EBV avec NF- $\kappa$ B) est un régulateur négatif de la polymérisation de l'actine chez les lymphocytes B (Durand-Panteix et al., 2012), et la perturbation du réseau d'actine peut induire l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Kustermans et al., 2005), lui-même susceptible de réguler l'expression de protéines associées à la sécrétion vésiculaire. La dynamique du cytosquelette d'actine semble donc pouvoir être largement régulée (positivement et négativement) par le programme de latence III de l'EBV et susceptible de moduler les processus de sécrétion associés à l'immunogénicité cellulaire, et par voie de conséquence à la lymphomagénèse.

Il n'a pas été décrit de modification quantitative (expression identique par western blot chez les cellules infectées ou non par l'EBV) ou de réorganisation lors de l'infection des cellules B par l'EBV pour le réseau de tubuline. Toutefois, les interférons de type  $\alpha$  ou  $\beta$  peuvent activer sa transcription, comme décrit dans un modèle lymphoblastoïde (précurseurs des lymphocytes) (Fellous et al., 1982). Les cellules en latence III de l'EBV sécrétant de manière constitutive de l'interféron  $\alpha$ . Il est possible que le réseau de tubuline en soit affecté dans certains cas (même s'il n'y a pas de différence au niveau quantitatif il peut y en avoir une en terme de polymérisation). Par ailleurs, il est important d'étudier l'activation de c-Myc en lien avec le réseau de tubuline, dans la mesure où ce facteur intervient dans la dépolymérisation de l'actine. C-Myc est en effet séquestré dans le cytoplasme par association aux filaments de tubuline par son domaine N terminal (Alexandrova et al., 1995), et son hyperphosphorylation conduit à sa libération et à sa relocalisation nucléaire ou il peut jouer son rôle de facteur de transcription (comme c'est le cas lors de la mitose ou pour certains lymphomes de Burkitt mutés pour c-Myc) (Niklinski et al., 2000).

Pour donner suite aux travaux sur B7-H1, il est intéressant de préciser le rôle du programme de latence III de l'EBV (programmes majeurs de transcription NF- $\kappa$ B et c-Myc en particulier) sur l'organisation et l'expression des protéines du cytosquelette impliquées dans le trafic sécrétoire (actine et tubuline), ainsi que les mécanismes moléculaires sous-jacents. Ceci en vue d'étudier l'influence du cytosquelette sur la modulation de l'immunogénicité lymphocytaire B et les processus de lymphomagénèse associés.

Compte-tenu des éléments apportés dans l'introduction bibliographique, une hypothèse des voies de signalisation impliquées est la suivante :



Les deux programmes de transcription majeurs activés par l'EBV (c-myc et NF-κB) sont susceptibles de contrôler, *via* le cytosquelette (tubuline et actine), la régulation des processus de sécrétion vésiculaire et l'immunogénicité cellulaire dans un équilibre d'activation et d'inhibition : activation lorsque l'actine est polymérisée (Filament, F) et inhibition lorsqu'elle est sous forme dépolymérisée (globulaire, G), comme présenté dans le schéma ci-dessus. Différents acteurs moléculaires candidats sont de plus identifiés (la voie Pi3K, RhoA ou RhoE). Il est ainsi possible que le cytosquelette, en contrôlant la fusion des vésicules (lysosomes sécrétoires en particulier) avec la membrane, permette de définir quelles protéines seront exprimées à la surface cellulaire (B7-H1, CMHII,...) et/ou seront sécrétées. La cellule tumorale, en contrôlant ce processus, est ainsi susceptible d'échapper à la surveillance du système immunitaire de continuer à proliférer.

Nous avons pu montrer lors de nos travaux précédents qu'en programme de latence III, la polymérisation de l'actine et les fonctions sécrétrices étaient favorisées. Le virus pourrait, selon des situations physiologiques particulières, modifier ses interactions avec le système

immunitaire de l'hôte et favoriser la réponse anti-EBV (phase d'infection par exemple) ou l'inhiber (phase de latence par exemple).

Il est important de noter que l'inhibition ou l'activation de de la sécrétion vésiculaire, peuvent toute deux mettre en jeu des molécules conduisant à la lymphomagenèse (en favorisant l'expression de molécules immunoinhibitrices à la surface cellulaire, ou en empêchant celle de molécules immunoactivatrices). Ceci peut être le cas de cancers dont la prolifération est contrôlée soit par le programme NF-kB seul, soit par le programme c-Myc.

Les résultats des travaux précédemment réalisés montrent que le cytosquelette est un élément intervenant dans la régulation de l'immunogénicité des cellules B infectées par l'EBV en régulant l'activité sécrétoire des cellules. Il s'agit d'un facteur pouvant jouer un rôle important dans les processus de lymphomagenèse associés au virus.

Il sera intéressant de préciser dans un premier temps le rôle du cytosquelette et les acteurs moléculaires impliqués dans les processus de sécrétion des cellules B en latence III de l'EBV. Une étude plus précise des molécules associées au trafic sécrétoire et impliquées dans l'immunogénicité et les processus de lymphomagenèse pourra être réalisée par la suite (molécules membranaires de la synapse immunologique ou sécrétées).

Une partie des travaux portera sur le réseau de tubuline et la forme activée de c-Myc, (Phospho-Myc), par comparaison de lignées EBV négatives (BL2 et BL41) et de leur contrepartie EBV positive (BL2B958 et BL41.B95.8), disponibles au laboratoire. Après une analyse du contenu cellulaire en tubuline (par cytométrie en flux et western blot) ainsi que la réorganisation éventuelle du réseau (par microscopie confocale et imagerie en flux) sera importante. Les formes activées ou non de c-Myc (par immunofluorescence et cytométrie en flux), sont ensuite étudiés d'une manière quantitative dans le but d'évaluer l'impact de la forme phosphorylée sur la dépolymérisation de l'actine. Il sera possible d'employer des inhibiteurs chimiques de la polymérisation (colchicine, nocodazole, vinblastine....) ou de la dépolymérisation (taxol) pour étudier l'impact de la dynamique des microtubules sur la sécrétion cellulaire.

La seconde partie des travaux sera consacrée au réseau d'actine et aux acteurs moléculaires impliqués dans son équilibre polymérisation/dépolymérisation. Nous analyserons le contenu cellulaire en actine totale, et en actine F polymérisée (par cytométrie en flux et western blot,) ainsi que la réorganisation éventuelle du réseau (par microscopie confocale et imagerie en

flux), par comparaison de lignées EBV négatives et de leur contre-partie EBV positive, disponibles au laboratoire. Nous rechercherons par la suite les molécules susceptibles d'être impliquées dans la dynamique du système en utilisant comme marqueur de l'actine polymérisé la phalloïdine couplée à une molécule fluorescente, et comme contrôle physiologique du processus de sécrétion les marquages intracellulaire et membranaire en immunfluorescence de B7-H1 ou du CMHII.

Les données bibliographiques permettent de cibler comme molécules candidates jouant sur la polymérisation, des acteurs de la voie de signalisation de LMP1 : NF- $\kappa$ B (RhoA en particulier) et Pi3K/Akt. Il sera possible de réaliser des activations et des inhibitions à l'aide d'agents chimiques pour étudier leur rôle. Les protéines identifiées seront par la suite analysées au niveau transcriptionnel par Q-PCR.

Pour l'étude de la dépolymérisation nous utiliserons un modèle cellulaire disponible au laboratoire (P493-6) pour lequel il est possible d'induire ou non l'expression de c-Myc, nous utiliserons également comme témoin un agent chimique dépolymérisant, la latrunculine. Deux molécules candidates peuvent être ciblées : RhoA et RhoE (inhibiteur de RhoA). Nous attendons une diminution de l'expression de RhoA et une augmentation de celle de RhoE. Ceci sera vérifié par western blot et des analyses transcriptionnelles seront également réalisées. La dépolymérisation de l'actine a été décrite comme pouvant induire l'activation de NF- $\kappa$  B, nous vérifierons également si l'activité totale de NF- $\kappa$  B est en partie diminuée lors de la dépolymérisation de l'actine.

Nous pourrons également suivre l'effet de l'IFN- $\alpha$ , sur la dépolymérisation de la tubuline, son impact sur la dépolymérisation de l'actine et par voie de conséquence de l'activité sécrétoire de la cellule.

Parallèlement au suivi des processus de sécrétion liés au cytosquelette nous réaliserons une étude sur données bibliographiques permettant de cibler des molécules membranaires de la synapse immunologique ou sécrétées, empruntant les voies de sécrétion vésiculaires et associées à l'immunogénicité. Nous porterons une attention particulière aux molécules pouvant être associées au processus de lymphomagénèse.

Le but à plus long terme est de vérifier l'expression de ces molécules à la surface de lymphocytes B tumoraux, en particulier dans le cas de cellules B en latence III de l'EBV, et de vérifier leur rôle physiologique dans des modèles d'interaction avec des cellules T

cytotoxiques, normalement destinées à les détruire par apoptose. Pour ce travail, nous nous proposons de mettre au point un modèle d'étude rapide et standardisé où les lymphocytes T cytotoxiques autologues (prélevés et isolés à partir de l'individu duquel proviennent les cellules B transformées par l'EBV) seront remplacés par une lignée T cytotoxique ne présentant pas de restriction de CMH (lignée TALL104, déjà acquise par le laboratoire mais pour laquelle nous devons optimiser les conditions de croissance).

Le cytosquelette, par son influence sur de nombreuses fonctions cellulaires (phénotype, prolifération, invasion, trafic sécrétoire,...) est incontestablement un facteur majeur de la lymphomagenèse. En permettant de réguler les processus sécrétoires directement responsables de l'expression des protéines membranaires et des protéines sécrétées par la cellule, c'est toute l'immunogénicité de cette dernière qu'il est susceptible de contrôler. Par conséquent, il est fort probable que le cytosquelette puisse être impliqué dans la subversion de la réponse immune T anti-tumorale, en particulier T anti-EBV, et dans l'apparition de lymphomes. L'étude des mécanismes moléculaires associant le cytosquelette à l'immunogénicité est une ouverture sur la compréhension des mécanismes de lymphomagenèse, notamment dans le cas des lymphomes B associés à l'EBV.

## **Publication 2**



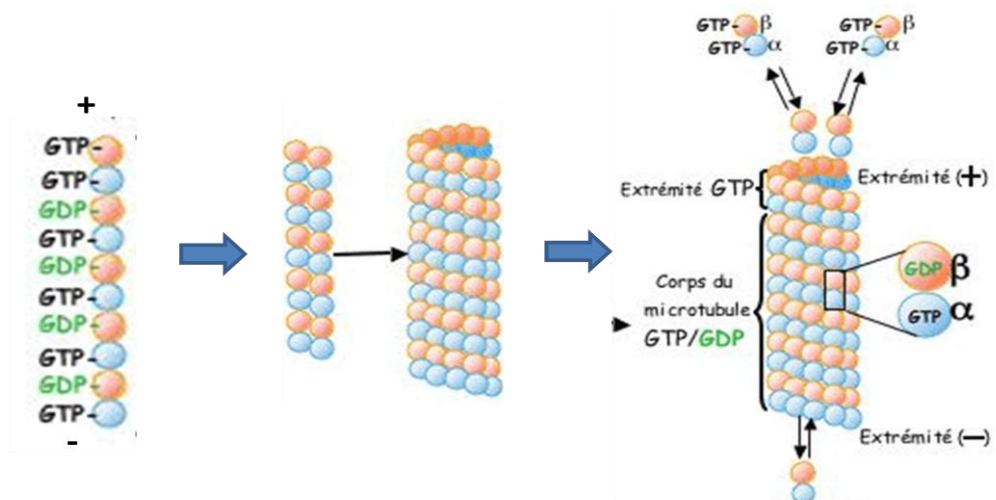


## II.1 Introduction

Le cancer est caractérisé par une multiplication anarchique des cellules, due à une dérégulation de leur prolifération ou à leur incapacité à entrer en apoptose. Le traitement de ces pathologies est généralement basé sur la destruction de ces cellules par apoptose, ce qui permet leur élimination par les cellules phagocytaires (après leur dissociation en corps apoptotiques), sans effet inflammatoire.

Il existe diverses molécules anticancéreuses utilisées en clinique. Ces molécules diffèrent entre elles par leur mécanisme d'action et par leurs cibles cellulaires. Elles peuvent être employées en monothérapie ou en polychimiothapie. Certaines agissent comme des inhibiteurs des tyrosines kinases (comme l'imatinib), d'autres possèdent des effets génotoxiques (tel que la doxorubicine). Il existe également un ensemble de composés antimitotiques appelés poisons du fuseau mitotique. Ils agissent sur la dynamique de polymérisation des microtubules de tubuline, ce qui induit un stress cellulaire conduisant généralement les cellules à la mort par apoptose intrinsèque.

Les microtubules sont un constituant majeur du cytosquelette et du fuseau mitotique. Ils sont composés de tubuline  $\alpha$  et de tubuline  $\beta$ . Lors de la polymérisation, des hétérodimères d' $\alpha$ -tubuline-GTP/ $\beta$ -tubuline-GTP s'associent pour former un protofilament par hydrolyse du GTP de la  $\beta$ -tubuline (Figure 42). Les protofilaments s'associent ensuite pour former le microtubule qui va s'allonger par addition d'hétérodimères supplémentaires. Les agents anti-mitotiques perturbent la dynamique de polymérisation/dépolymérisation de la tubuline et empêchent les processus de division cellulaire. Ils sont classés en fonction de leur mode d'action : certains ont un rôle de stabilisation, alors que d'autres provoquent la dépolymérisation des microtubules. Ceux provoquant la dépolymérisation sont de plus classés en fonction de leur site de liaison à la tubuline (site de liaison de la colchicine ou site de liaison de type vinca).



1: Assemblage du protofilament: polymérisation des dimères de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$

2: Association latérale du protofilament

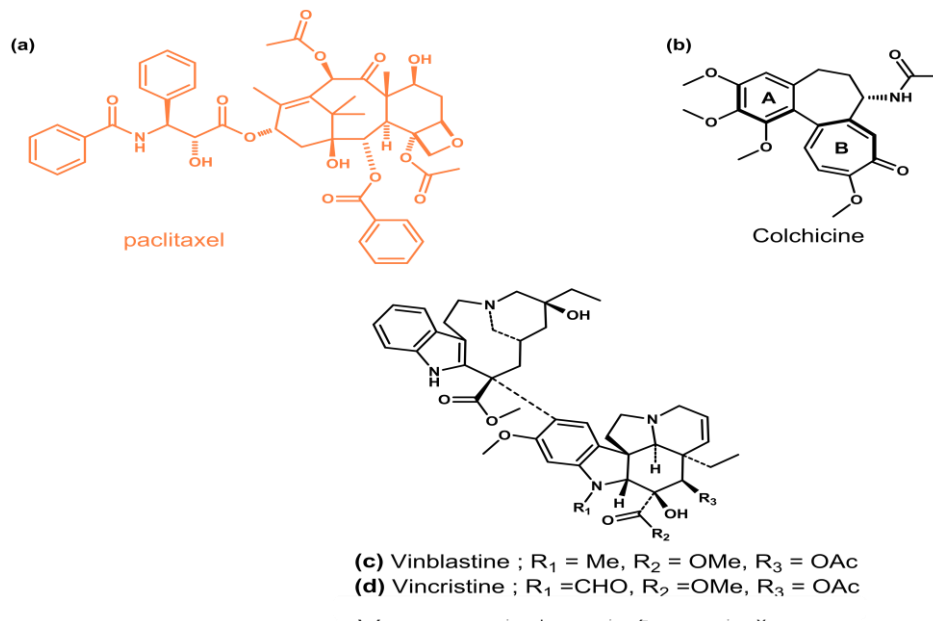
2: Elongation du microtubule

**Figure 42** : Schéma représentatif de la polymérisation des microtubules de la tubuline. D'après [http://www.facbio.com/content/index.php?option=com\\_content&task=view&id=29&Itemid=47](http://www.facbio.com/content/index.php?option=com_content&task=view&id=29&Itemid=47)

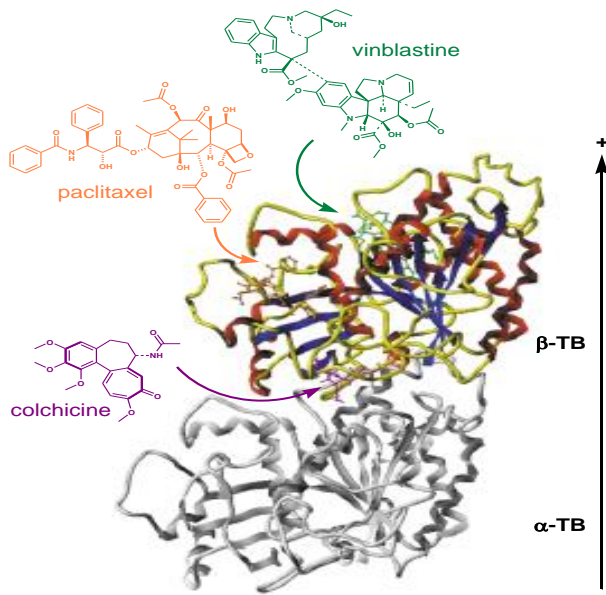
Les agents stabilisants sont des molécules qui vont bloquer la mitose en inhibant la dissociation des microtubules. Le taxol (paclitaxel) en est un représentant de référence (Schiff et al., 1979) (Figure 43). Plusieurs de ces molécules sont employées pour des traitements anticancéreux (Tableau 6). Elles ont un site d'interaction commun dit le site taxane (premier composé naturel de ce type extrait de *Taxus brevifolia*) qui se situe au niveau de la tubuline  $\beta$  (Figure 44).

Domaine de fixation	Molécule	Usage thérapeutique en cancérologie	Développement clinique
Site Taxane	Paclitaxel (Taxol)	Cancers de l'ovaire, du sein et du poumon. Sarcome de Kaposi	Utilisation clinique : 207 phases I-III
	Docetaxel (Taxotère)	Tumeurs de la prostate, du cerveau et du poumon	8 essais en phases I-III
	Epothilon	Tumeurs résistantes au Paclitaxel	Phases I-III
	Discodermolide	-	Phase I

**Tableau 6** : Principaux agents stabilisants de la tubuline, utilisation thérapeutique et développement clinique. D'après (Jordan and Wilson, 2004; Kuppens, 2006).



**Figure 43** : Structure chimique des agents stabilisants. Paclitaxel (a), colchicine (b), vinblastine (C) vincristine (D)



**Figure 44** : Position relative des agents stabilisants et destabilisants sur un hétérodimère de tubuline. Colchicine (en violet), paclitaxel (en orange) et vinblastine (en vert). D'après (Checchi et al., 2003)

D'autre part les agents dépolymérisant la tubuline, constituent une classe importante de molécules poisons du fuseau mitotique. Ils sont classés en deux groupes, en fonction de leur site d'interaction avec la tubuline : ceux se fixant au domaine de la colchicine et ceux se fixant dans le domaine des vinca-alcaloïdes (domaine vinca). Plusieurs sont déjà employés pour le traitement des cancers (Tableau 7). La colchicine est une molécule de référence, il s'agit d'un alcaloïde extrait à partir de l'espèce végétale *Colchicum autumnale* (Figure 43).

Cette molécule et ses analogues ont été largement étudiés pour le traitement des cancers, mais ils manquent d'efficacité *in vivo* à la dose maximale tolérée. Malgré son manque d'intérêt clinique, la colchicine a toutefois été largement étudiée en ce qui concerne son mode d'interaction avec la tubuline. De même que l'ensemble des molécules du même groupe, elle se lie au monomère  $\beta$  de l'hétérodimère  $\alpha/\beta$ , composant de base de la tubuline. Son site de fixation est situé proche de la région située entre les deux monomères (Figure 44). Le complexe tubuline/colchicine contribue à la polymérisation de l'extrémité terminale des microtubules mais sa conformation affaiblit les liaisons latérales entre les sous-unités de tubuline. L'instabilité de la structure provoque une dissociation des microtubules lors de la métaphase (Correia and Lobert, 2001).

Domaine de fixation	Molécule	Usage thérapeutique en oncologie	Développement clinique
<b>Domaine colchicine</b>	Colchicine	Pathologies non tumorales	Essais non concluants, forte toxicité
	Combretastatines	Anti-angiogénique	Phase I
	2-Méthoxy-Estradiol	-	Phase I
	E7010	Tumeurs solides	Phases I, II
<b>Domaine vinca</b>	Vinblastine	Maladie de Hodgkin Cancer des testicules	Utilisation clinique 22 combinaisons
	Vincristine	Leucémies, lymphomes	Utilisation clinique : 108 combinaisons
	Vinorelbine	Tumeurs solides, lymphomes, cancer du poumon	utilisation clinique : 29 phases I-III (seul ou combinaisons)
	Vinflunine	Cancers de la vessie, cancer du poumon non à petite cellules, cancer du sein	Phase III
	Cryptophycine 52	Tumeurs solides	Phase III terminée
	Halichondrins	-	Phase I
	Dolastatines	Anti-angiogénique	Phases I et II terminées
	Hemiasterlines	-	Phase I

**Tableau 7** : Principaux inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline, utilisation thérapeutique et développement clinique.

D'après (Jordan and Wilson, 2004; Kuppens, 2006)

Les vinca-alcaloïdes interagissent également avec la  $\beta$ -tubuline mais sur un site distinct de celui de la colchicine (Figure 44). Ces composés ont une fixation rapide et réversible. Ils sont extraits à partir de la plante *Catharanthus roseus* aussi appelée *Vinca rosea* Linn. Les premiers à être identifiés et qui sont restées des molécules de référence sont la vinblastine (Chou et al., 1998) et la vincristine (Giannakakou et al., 2000) qui ne diffèrent que par la

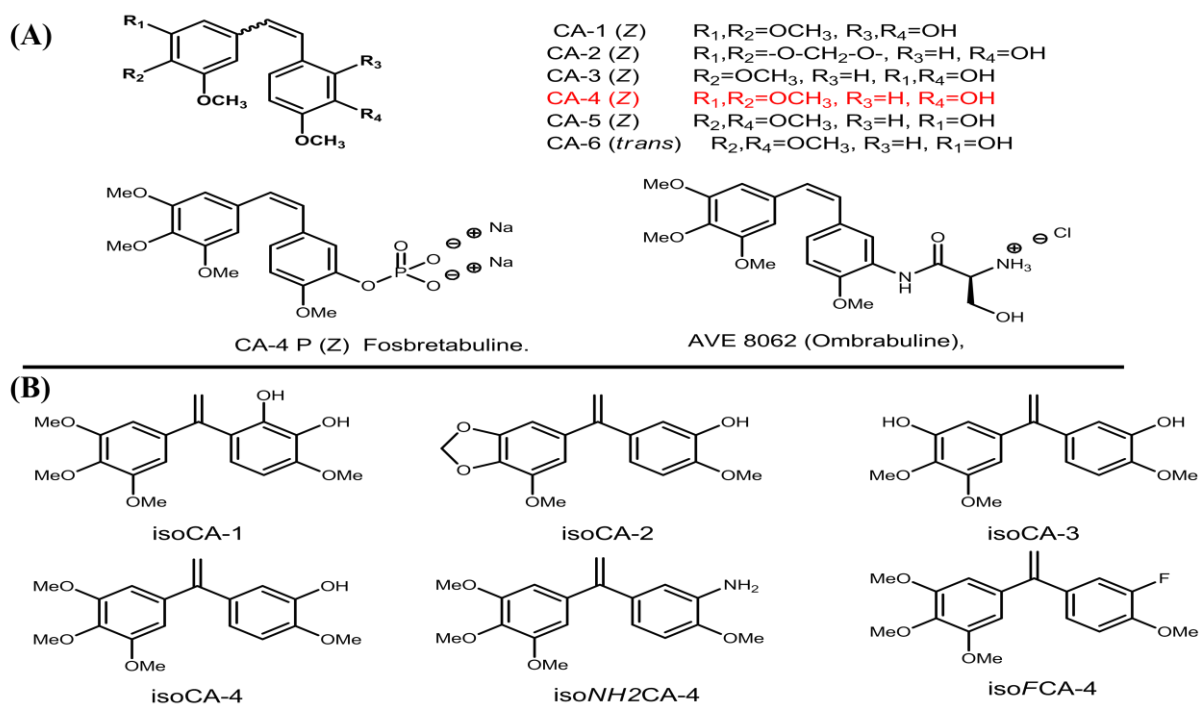
présence d'un groupe formyle pour la vincristine et méthyle pour la vinblastine (Figure 43). Des dérivés semi-synthétiques ont été développés à partir de ces molécules (vinorelbine, vinflunine). Les différences de structure ne modifient pas le mécanisme d'action des molécules mais leur spectre clinique et leur cytotoxicité. Les vinca-alcaloïdes sont généralement employés lors de polychimiothérapies de type CHOP (cyclophosphamides, adriamycine, vincristine, prednisone). Ils sont utilisés dans le traitement de nombreux cancers (cancers de l'ovaire, de la vessie, du rein, du sein, des testicules, sarcomes de Kaposi, lymphome de Burkitt, lymphomes malins non hodgkiniens, lymphome de Hodgkin,...).

Les poisons du fuseau mitotique actuellement employés dans le traitement des cancers présentent toutefois différents inconvénients : ils sont souvent difficiles à synthétiser, ont généralement des effets secondaires (fatigue, vomissement, crampes abdominales, neurotoxicité) (Freilich et al., 1996) et il existe de nombreuses résistances aux polychimiothérapies actuellement employées (multi drogue résistance) (Fojo and Menefee, 2005). Par conséquent, la recherche de nouvelles molécules est toujours d'actualité.

Le laboratoire BioCIS de chimie thérapeutique de la Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry (UMR CNRS 8076), avec lequel nous avons collaboré dans le cadre de ce travail, s'intéresse aux molécules de la nouvelle famille des combretastatines. Il s'agit de molécules d'origine naturelle isolées d'un arbre d'Afrique du Sud (*Combretum caffrum*), conduisant à la dépolymérisation de la tubuline et ayant pour site de fixation le domaine colchicine.

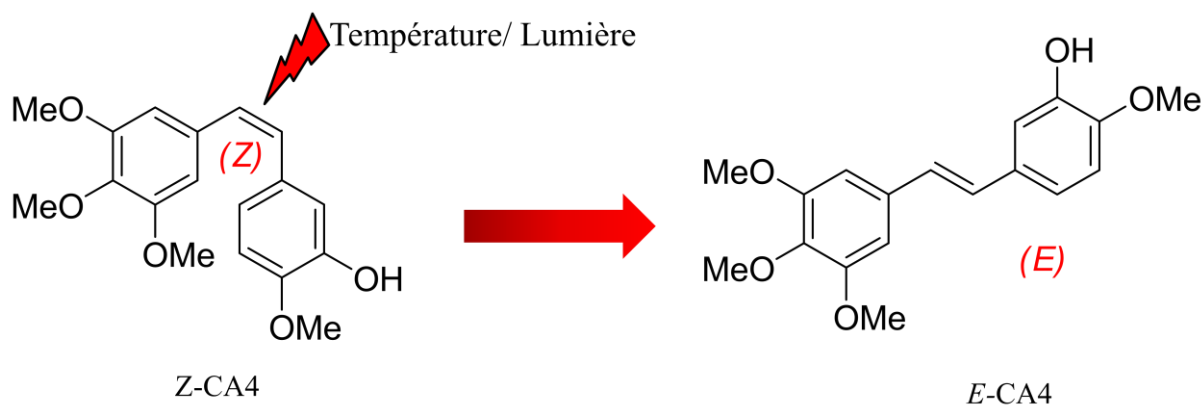
L'inhibition de la croissance cellulaire a été testée *in vitro* pour les combretastatines A 1-6 sur 60 lignées cellulaires tumorales humaines (Pettit et al., 1995). La combretastatine A-4 (CA-4) s'est montrée la plus efficace, avec un effet inhibiteur de l'assemblage de la tubuline particulièrement important. Par ailleurs, la CA-4 permet d'inhiber la croissance des différentes lignées à des concentrations de l'ordre du nanomolaire, y compris chez les lignées cancéreuses multi-résistantes (Pettit et al., 2005). Cependant, sa faible solubilité dans l'eau limite son efficacité *in vivo*. Plusieurs dérivés ont été étudiés afin d'améliorer sa solubilité et sa pharmacocinétique. Ceci a conduit au développement d'un analogue du CA-4, la phosphate dissodique combretastatine A-4 (CA-4P). Une pro-droque plus soluble de la CA-4P a par la suite été développée pour les études chez l'homme (Siemann et al., 2009). CA-4P, de même que son dérivé sytnhétique AVE-8062 (Ohsumi et al., 1998) ont été identifiés comme présentant des effets anti-angiogéniques *in vivo* (Tozer et al., 2002) (Figure 45). La CA-4P a

été employée dans le cadre de plusieurs essais cliniques en monothérapie ou en traitement combiné de l'AMD (Age-related Macular Degeneration) (Siemann et al., 2009) ou du cancer de la thyroïde anaplasique (Lippert, 2007). Malgré leur activité anticancéreuse remarquable, ces composés sont sujets à une isomérisation de la double liaison (Aprile et al., 2007) et les isomères E présentent une baisse très importante de leur effet anticancéreux (Cushman et al., 1991) (Figure 46).



**Figure 45** : Structure chimique des combretastatines, Isocombretastatines et de leurs isomères. (a) Structure chimique des combretastatines A1 à A6 (CA-1 à CA-6) et de la combretastatine A 4 phosphate (CA-4P) et de AVE 8062 (Ombrabuline). (b) Structure chimique des iso combretastatines A1 à A4 (*iso*CA-1 à *iso*CA-4) de l'*iso*AminoCA-4 (*iso*NH<sub>2</sub> CA-4) et de l'*iso* FCA-4.

Des études basées sur la relation structure-activité de ces molécules ont montré que pour les combretastatines le groupe 3,4,5-triméthoxyphényl (TMP) ainsi que l'orientation cis des deux cycles aromatiques sont des éléments majeurs pour que l'activité biologique soit importante (Tron et al., 2006).



**Figure 46** : Isomérisation de la Z-CA4 en E-CA4 par l'action de la température et de la lumière. La forme E est 100 fois moins active.

Il a ainsi été synthétisé des dérivés ou des analogues des combretastatines, plus solubles et présentant une conformation plus stable. L'*isoCA-4*, de même que 23 dérivés de cette molécule, ont été synthétisés et leur effet a été testé sur des lignées humaines cancéreuses du colon HCT-116. Parmi ces molécules, l'*isoCA-4*, l'*isoFCA-4* et l'*isoNH<sub>2</sub>CA-4* ont montré des effets cytotoxique et inhibiteur de la polymérisation de la tubuline, ainsi que des effets anti-angiogéniques plus puissants que les autres dérivés (Hamze et al., 2009) (Figure 45).

L'arrêt des cellules en mitose induit par les poisons du fuseau mitotique peut les conduire à une apoptose ou un arrêt dans le cycle dépendant de p53 (Lanni and Jacks, 1998; Quignon et al., 2006 ; Dalton et al., 2007). P53 est considérée comme une protéine suppresseur des tumeurs, gardienne du génome. Il s'agit d'un facteur de transcription activé lors de processus de stress, dont l'expression augmente suite à l'arrêt des cellules dans le cycle cellulaire. Lorsque les dommages sont trop importants, p53 conduit les cellules à leur mort par apoptose. Cet effet est recherché lors du traitement des cellules par les poisons du fuseau mitotique. Cependant, p53 est fréquemment muté chez les cellules cancéreuses, ce qui conduit à des défauts d'apoptose. Ceci est le cas dans plus de 60% des tumeurs et dans 10 à 20% des cancers de type hématologique.

Un moyen d'induire l'apoptose par les poisons du fuseau mitotique est de potentialiser ce processus par une autre voie de signalisation que celle de p53. Un grand nombre de voies de signalisation est détournée chez les lymphocytes B en latence III de l'EBV. LMP1, qui est l'oncogène majeur de l'EBV, joue un rôle dans la survie et la prolifération cellulaire par induction des voies NF- $\kappa$ B et Pi3K/Akt, mais il conduit également à l'activation de voies des MAP kinases p38 et JNK impliquées dans les processus d'apoptose. Par ailleurs LMP2A active également les voies Pi3K/Akt et JNK. L'EBV par son comportement ambivalent dans

les processus de mort et de survie cellulaire est ainsi susceptible de jouer un rôle pharmacomodulateur lors de traitements par les anti-tumoraux, tels que les poisons du fuseau mitotique.

Dans ce travail nous nous sommes en particulier intéressés au pouvoir antimitotique de la molécule nouvellement synthétisée d'isoNH<sub>2</sub>CA-4, dans la mesure où aucune étude n'avait été réalisée jusqu'à présent sur des cellules de type lymphome. Nous avons utilisé des lignées de lymphome de Burkitt (BL) mutées ou non pour p53 et infectées ou non par l'EBV. L'objectif est d'étudier le rôle de l'EBV en tant que pharmacomodulateur éventuel lors du traitement par les poisons du fuseau mitotique de cellules p53 mutées, sachant qu'il active aussi bien des voies de signalisations associées à la survie et la prolifération cellulaire que des voies associées à l'apoptose. Nous avons employé comme molécules de référence la colchicine et le CA4. Nous avons également élargi notre étude à des poisons du fuseau mitotique déstabilisant la tubuline de type Vinca (vincristine et vinblastine) et à un poison du fuseau stabilisant la tubuline et classiquement employé lors des traitements anticancéreux, le taxol



## **II.2 Article 2**

### **“Apoptosis can be induced with mitotic spindle poisons in p53 mutated Burkitt Lymphoma cells through potentiation of the MAPK pathway by EBV latency III program”**

Mona Farhat, Amanda Poissonier, Abdallah Hamze, Catherine Ouk, Jean-Daniel Brion,  
Mouad Alami, Jean Feuillard, Chantal Jayat-Vignoles

Soumis à Cell Death and Differentiation





## II.3 Conclusion et discussion

Dans La seconde partie de notre travail nous avons pu mettre en évidence l'effet sensibilisant à l'apoptose du programme de latence III de l'EBV, suite à l'activation des voies JNK et p38 MAP kinases, bien que le programme global du virus conduise à la survie et à la prolifération cellulaire.

Comme indiqué dans l'introduction, l'objectif initial de cette étude était de déterminer l'effet d'un poison du fuseau mitotique nouvellement synthétisé de la famille des combretastatines, l'*iso*NH<sub>2</sub>CA-4, sur des lignées de lymphomes de burkitt disponibles au laboratoire. Il s'agit de lignées possédant un statut sauvage pour p53 (BL2) ou muté (BL41) et de leur contre-parties infectées par l'EBV (BL2B95.8 et BL41B95.8).

Nous avons pu déterminer l'IC<sub>50</sub> de prolifération (concentration permettant 50% d'inhibition) avec l'*iso*NH<sub>2</sub>CA-4, en comparaison avec deux autres molécules de référence déstabilisant la tubuline et se fixant sur le site colchicine : la colchicine et la CA-4. Nos résultats ont montré que l'*iso*NH<sub>2</sub>CA-4 est plus efficace et que l'IC<sub>50</sub> plus faible que pour les autres drogues. De plus, les cellules infectées par l'EBV possèdent une IC<sub>50</sub> deux fois plus faibles que celles non infectée, montrant leur plus forte sensibilité aux poisons du fuseau. D'autres études ont montré que des cellules en latence III de l'EBV pouvaient être plus résistantes à l'apoptose induite par p53 (Renouf et al., 2009; Pujals et al., 2011) Cette contradiction peut toutefois s'expliquer par le fait que les traitements employés sont différents et ne s'adressent pas aux mêmes cibles cellulaires.

D'un point de vue pharmacologique, compte-tenu de sa faible cytotoxicité (en particulier au niveau hépatique) (Messaoudi et al., 2009) et de la plus faible concentration nécessaire pour inhiber la prolifération cellulaire, l'*iso*NH<sub>2</sub>CA-4, peut présenter des avantages lors de polychimiothérapie de longue durée associant des poisons du fuseau mitotique.

Afin d'étudier le mécanisme cellulaire conduisant à l'inhibition de prolifération, nous avons réalisé un test d'identification du processus d'apoptose (marquage par l'annexin-V). Nous avons mis en évidence que les trois poisons du fuseau mitotique induisent l'apoptose, à l'exception des BL41 mutées pour p53 et non infectées par l'EBV.

Afin de savoir si le processus d'apoptose observé est bien la conséquence de l'arrêt des cellules en mitose, en particulier pour le nouveau dérivé de la famille des combretastatines, l'*iso*NH<sub>2</sub>CA-4, nous avons étudié la répartition des cellules dans les différentes phases du

cycle cellulaire (par analyse du contenu total en ADN par cytométrie en flux) après traitement par les poisons du fuseau. Nous avons également réalisé des observations par microscopie en fluorescence pour confirmer l'arrêt en mitose, la cytométrie en flux ne permettant pas de discriminer les cellules en G2 et M dont le contenu total en ADN est identique). Dès 8h de traitement, nous observons bien un arrêt des cellules en mitose (arrêt des cellules en G2M par cytométrie en flux et image de cellules en métaphase par microscopie), quelle que soit la lignée et la drogue employée. Par contre, pour la lignée BL41 cet arrêt en mitose n'est pas suivi de l'entrée des cellules en apoptose, comme pour les autres lignées chez qui on observe après 24h de traitement l'apparition d'un pic sub-G1 par cytométrie en flux (traduisant la fragmentation de la chromatine caractéristique de la phase terminale de l'apoptose) ou la fragmentation nucléaire lors des observations en microscopie de fluorescence. L'apoptose observée, en particulier chez les cellules BL41B95.8 mutées pour p53 mais infectées par l'EBV, fait donc bien suite à l'arrêt des cellules en mitose, notamment pour l'*isoNH<sub>2</sub>CA-4*.

Nous avons montré que l'apoptose induite conduisait à l'activation des caspases 3, 8 et 9 avec une perte de l'intégrité mitochondriale, associée à la relocalisation de Bax à la mitochondrie. La caspase 8 est généralement considérée comme initiatrice de l'apoptose extrinsèque et comme pouvant induire secondairement la perméabilisation de la membrane mitochondriale et l'activation des caspases 9. Cependant, des analyses cinétiques complémentaires ont montré que les caspases 8 et 9 sont activées simultanément, ce qui suggère qu'il s'agit d'une activation de la caspase 8 indépendante des récepteurs et faisant suite à la perméabilisation de la membrane mitochondriale. Ceci a déjà décrit dans la littérature pour les antimétopiques (Jones et al., 2001). Différentes hypothèses sont avancées mais ce processus reste encore flou ; il est proposé un système de type apoptosome spécifique de la caspase 8 ou une activation induite directement par le cytochrome c.

Nos résultats montrent que l'infection par l'EBV de la lignée BL41 mutée pour p53 (lignée BL41B95.8) lui permet d'entrer en apoptose lors du traitement par les poisons du fuseau mitotique (apoptose intrinsèque), ceci de façon indépendante de p53.

Le contournement de la résistance à l'apoptose de cellules mutées pour p53 a déjà pu être observé, en particulier lors de l'utilisation des poisons du fuseau mitotique. Par exemple, une étude a montré que des CLL mutées pour p53 et résistantes à de nombreux traitements, comme les agents alkylants, la fludarabine, les irradiations de type  $\gamma$ , étaient sensibles à la vincristine (poison du fuseau) et la doxorubicine (agent génotoxique), cette sensibilisation étant due à une activation d'un programme de mort cellulaire indépendant de P53 (Sturm et

al., 2003) D'autres études suggèrent de plus que la voie des MAP kinase de stress (JNK et p38) puisse être impliquées. En effet, la réactivation de p53 lors de traitements par la molécule PRIMA-1 induit l'apoptose *via* la voie JNK (Li et al., 2005). La surexpression de la protéine PUMA (un substrat de JNK) peut conduire les cellules à l'apoptose en absence de p53 (Yu and Zhang, 2008) ou le fenretinide (qui conduit à l'augmentation du niveau intracellulaire en céramide et est un inducteur des voies p38 et JNK) peut induire l'apoptose intrinsèque chez des cellules mutées pour p53 (Corazzari et al., 2005).

La relocalisation de Bax à la mitochondrie lors de l'apoptose intrinsèque nécessite sa phosphorylation et son changement de conformation (Kim et al., 2006). Or nous avons vu que Bax n'est pas relocalisé à la mitochondrie chez les cellules BL41. Sachant que Bax est positivement régulé par p53 (Schuler and Green, 2001) et qu'il s'agit également d'un substrat des kinases p38 et JNK (Tsuruta et al., 2004; Kim et al., 2006), le processus mis en place par l'EBV pour contrecarrer la résistance à l'apoptose peut être une activation de la voie des MAP kinases de stress.

Afin de vérifier si les voies p38 et JNK étaient impliquées dans l'apoptose induite par l'EBV chez les cellules p53 mutée traitées par les poisons du fuseau mitotique, les cellules BL41B95.8 ont été prétraitées par l'inhibiteur SB203580 de p38, l'inhibiteur SP600125 de JNK ou les deux inhibiteurs simultanément. Il a été observé une baisse du pourcentage de cellules en apoptose, avec un effet cumulatif pour les deux drogues. Une observation identique a été faite pour les BL2B95.8. La diminution de l'apoptose est associée à une augmentation du nombre de cellules possédant des mitochondries intactes, ce qui indique une protection des cellules contre l'apoptose intrinsèque. Les voies p38 et JNK apparaissent donc impliquées dans l'apoptose induite par l'EBV.

De manière à confirmer ce résultat, les cellules BL41 ont été prétraitées par la dihydrosphingosine (molécule chimique activatrice des MAP kinases p38 et JNK), avant leur traitement par l'*iso*NH<sub>2</sub>CA-4. Ce prétraitement permet d'induire l'apoptose chez ces cellules mutées pour p53 et non infectées par l'EBV, ce qui suggère que ces deux voies sont bien celles activées par l'EBV pour induire une apoptose indépendante de p53. Les bases sphyngoïdes peuvent également inhiber faiblement la voie de survie Pi3K/Akt (Ahn and Schroeder, 2006). Afin de vérifier que l'apoptose observée est bien spécifique de p38 et JNK nous avons réalisé un prétraitement par les inhibiteurs chimiques de ces deux voies. Ce

traitement permet bien d'empêcher le processus d'apoptose, montrant l'implication spécifique de p38 et JNK.

Nous avons essayé de généraliser nos résultats aux différentes classes de poisons du fuseau mitotiques (stabilisants ou destabilisants). Nous avons pu mettre en évidence que, quel que soit le poison du fuseau employé, les cellules BL41 mutées pour p53 sont résistantes à l'apoptose, et que leur infection par l'EBV permet de contourner cette résistance. Nous avons également montré qu'il était possible de baisser le pourcentage de cellules en apoptose par un traitement par les inhibiteurs de p38 et de JNK et que cela s'accompagnait d'une baisse du pourcentage de cellules dont les mitochondries sont non intègres. Ces résultats suggèrent qu'il est possible de contourner la résistance à l'apoptose des cellules mutées pour p53 par induction des voies p38 et JNK lors d'un traitement par les poisons du fuseau, quelle que soit la classe de ce dernier.

Au total, nous avons pu montrer que l'*iso*NH<sub>2</sub>CA-4 présente un mode d'action comparable aux autres poisons du fuseau mitotique.

Nous avons aussi mis en évidence que l'EBV peut sensibiliser les cellules au traitement par les poisons du fuseau et contourner la résistance à l'apoptose chez les cellules p53 mutées, grâce à l'induction des voies des MAP kinases p38 et JNK et l'initiation d'une apoptose l'intrinsèque. Nous avons également pu montrer que l'induction des voies p38 et JNK peut être réalisée à l'aide d'un inducteur chimique, la D-erythro-dihydrosphingosine. Un agent chimique induisant les voies p38 et JNK, telle que la D-erythro-dihydrosphingosine, peut donc être proposé dans le cadre de nouvelles combinaison thérapeutiques dans le cas où p53 n'est pas fonctionnel.

## II.4 Perspectives

Afin de finaliser l'exploration du mécanisme moléculaire mis en jeu lors de l'induction de l'apoptose chez les cellules mutées pour p53 et infectées par l'EBV, il serait intéressant de voir si l'apoptose intrinsèque met en jeu de manière directe la mitochondrie ou si le reticulum endoplasmique (RE) est impliqué en amont. Il existe un stress du RE chez les cellules infectées par l'EBV (Lee and Sugden, 2008) et l'activation des MAP kinases p38 et JNK peut conduire à la libération de calcium par le RE, pouvant conduire à l'ouverture des pores mitochondriaux et déclencher l'apoptose. Pour ce faire, il est possible d'utiliser un inhibiteur du stress du RE, le salibrinal. L'utilisation de la N-acetylcystéine, un chélateur des ROS, et de BAPTA, un chélateur de  $Ca^{2+}$  peut permettre d'étudier l'implication des ROS.

Par ailleurs, les cellules BL constituent un modèle cellulaire particulier avec surexpression de c-Myc. Il est nécessaire de vérifier dans d'autres modèles de lignées cellulaires humaines qu'il est possible de contre carter la résistance à l'apoptose de cellules non fonctionnelles pour p53 lors du traitement par les poisons du fuseau, par induction chimiques des voies p38 et JNK. Cela pourrait être fait à l'aide de la lignée Jurkat (modèle d'étude des leucémies aiguës de type T) qui est mutée pour p53 ou de lignées leucémiques n'exprimant pas la protéine p53, telles que les lignées HL60 (cellules promyélocyaires), K562 (cellules myéloïde particulièrement résistantes à l'apoptose, ou U937 (cellules monocyaires). Les poisons du fuseau peuvent être de type stabilisant de la tubuline (taxol) ou déstabilisant à site de fixation colchicine (colchicine, *iso*NH<sub>2</sub>CA-4, CA-4) ou vinca (vinblastine, vincristine). Le traitement des cellules par la D-erythro-dihydrosphingosine peut être employé comme inducteur des voies p38 et JNK et l'apoptose peut être suivi par cytométrie en flux à l'aide d'un test annexine-V/iodure de propidium. La spécificité d'activation des voies p38 et JNK comme inducteur de l'apoptose peut par la suite être vérifié en pré-traitant les cellules par des inhibiteurs chimiques de ces MAP kinases avant le traitement par les poisons du fuseau.

Il est également possible de mener une étude sur des échantillons cliniques pour vérifier si l'infection par l'EBV (dans le cas de pathologies associées à des latences de type II ou III, où LMP1 et LMP2A sont exprimées) peut être un indicateur thérapeutique d'une meilleure réponse au traitement, en particulier dans le cas d'une mutation de p53, lors de polychimiothérapies incluant des poisons du fuseau mitotique. Il est possible de compléter cette étude en évaluant les niveaux d'expression de JNK et de p38 activés (Phospho JNK et phospho p38), qui sont les molécules que nous avons identifiées comme étant impliquées dans



la potentialisation de l'apoptose par les poisons du fuseau. Cette étude peut par exemple porter sur les lymphomes de Hodgkin qui sont associés à la latence II de l'EBV.



## **CHAPITRE 4 : CONCLUSION GENERALE**



## I.1 Conclusion générale et faits marquants

Mes travaux de thèse ont permis de confirmer le rôle paradoxal de l'EBV dans les lymphocytes B en programme de latence III. Ce programme de latence est caractérisé par l'expression de l'ensemble des protéines de latence (dont l'oncoprotéine majeur LMP1) et est considéré comme un programme de prolifération. Cependant, différentes études, menées notamment au laboratoire, montrent qu'il est associé à la survie et à la prolifération mais également à la mort des cellules par apoptose.

LMP1 induit comme programme de transcription majeur NF- $\kappa$ B, généralement associé à la transformation et à la prolifération cellulaire. LMP1 conduit également à la surexpression de molécules anti-apoptotiques (telles que Bcl-2 ou Mcl1). Cependant, des travaux menés au laboratoire ont pu montrer que le programme de latence III de l'EBV permet également la surexpression du récepteur pro-apoptotique Fas, suite à l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, STAT1 et p53. Les cellules immortalisées par le virus peuvent ainsi être sensibilisées à l'apoptose médiée par Fas et être éliminées par la réponse T anti-EBV, contribuant à la mise en place de l'équilibre hôte/virus lors de l'infection latente (Le Cloennec et al., 2006). De plus, il a été montré que chez les cellules exprimant le plus fortement LMP1, la surexpression du récepteur Fas conduit à son agrégation et à la mort des cellules par apoptose (Le Cloennec et al., 2008), permettant de réguler l'homéostasie du compartiment B en latence III de l'EBV. L'EBV peut ainsi conduire à l'élimination des cellules B infectées.

La première partie de mes travaux de thèse s'est également intéressée aux déterminants immunogéniques des lymphocytes B en latence III de l'EBV (Durand-Panteix et al., 2012, publication1). Des données bibliographique ont montré la surexpression d'une molécule de la synapse immunologique, B7-H1, qui à l'inverse de Fas, est connue pour jouer un rôle immuno-inhibiteur de la réponse T cytotoxique. J'ai pu mettre en évidence que B7-H1 réprime la réponse T/NK contre les cellules B infectées par l'EBV. J'ai également pu montrer que NF- $\kappa$ B est un faible inducteur de l'expression transcriptionnelle de B7-H1, alors que c-Myc (le second facteur de transcription majeur activé en latence III), en est un puissant répresseur. Par ailleurs, j'ai pu définir les mécanismes moléculaires conduisant à la surexpression de la protéine B7-H1 à la surface des cellules : la molécule est stockée dans les lysosomes sécrétoires dont le nombre et la fusion à la membrane plasmique sont augmentés par le programme de latence III, alors que c-Myc, en empêchant le trafic vésiculaire sécrétoire

par dépolymérisation des filaments d'actine, régule négativement son expression membranaire. c-Myc, *via* B7-H1, est susceptible de réguler l'immunogénicité des lymphocytes B infectés par l'EBV et de contribuer à l'inhibition de la réponse T anti-EBV ainsi qu'aux processus de lymphomagenèse.

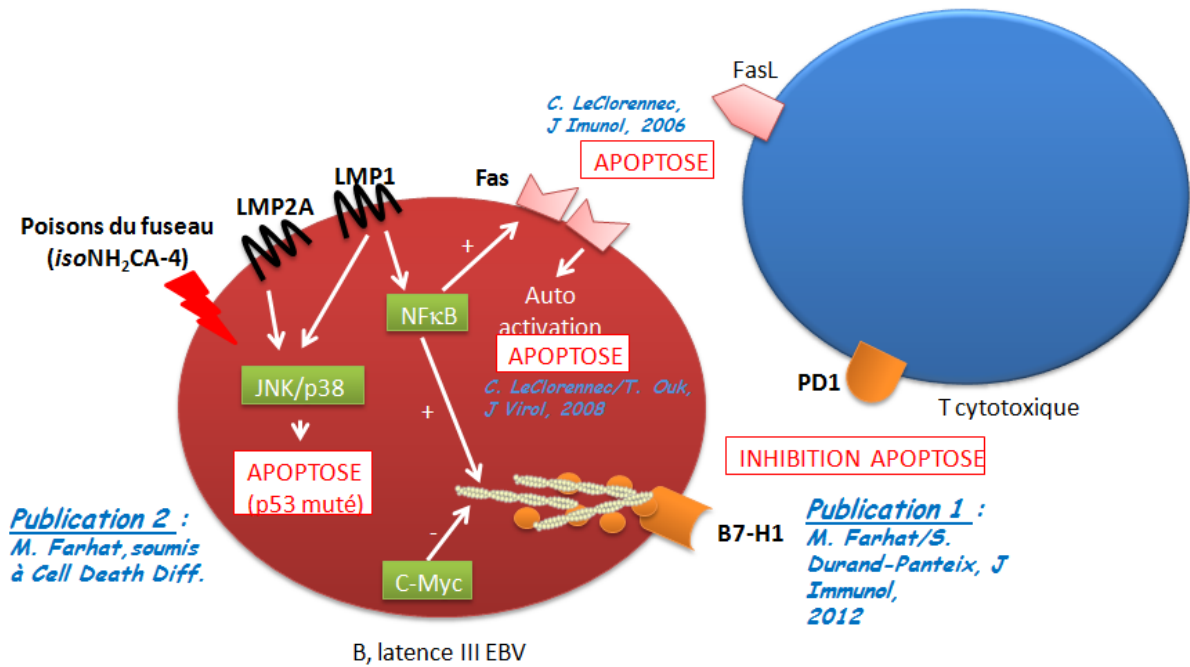
Les résultats obtenus mettent en évidence que l'EBV peut jouer un rôle immunomodulateur ambivalent lors de la réponse T cytotoxique anti-EBV. Les molécules de la synapse immunologique B7-H1 et Fas, peuvent jouer des rôles opposés : en faveur de la survie pour la première et de la mort par apoptose pour la seconde.

Par ailleurs, les protéines de latence virales exprimées lors du programme de latence III conduisent à l'activation constitutive de voies de signalisation impliquées aussi bien dans la transformation, la survie et la prolifération cellulaire (NF- $\kappa$ B, Pi3K/Akt, ERK) que dans les processus d'apoptose (p38, JNK). Le virus est donc susceptible de jouer un rôle pharmacomodulateur lors du traitement de lymphomes associés à l'EBV, tels que le lymphome de Burkitt ou le lymphome de Hodgkin.

Dans la seconde partie de mon travail, je me suis intéressée au rôle de l'EBV dans le cas du traitement de cellules de lymphome de Burkitt par les poisons du fuseau mitotique (Farhat et al, publication 2). L'étude a porté en particulier sur un nouveau dérivé de la famille des combretastatines, l'*iso*NH<sub>2</sub>CA-4 qui est peu toxique et présente un effet inhibiteur important sur la prolifération cellulaire. J'ai pu mettre en évidence que le virus sensibilise les cellules à l'apoptose et qu'il permet de plus de contourner la résistance à l'apoptose de cellules mutées pour p53, par activation des voies des MAP kinases p38 et JNK et le déclenchement de l'apoptose intrinsèque. L'étude a porté sur les poisons mitotiques des différentes classes : agent stabilisant les microfilaments de tubuline ou les déstabilisants en se fixant sur les sites de type colchicine (tel que *iso*NH<sub>2</sub>CA-4) ou Vinca. Les données obtenues grâce à la biologie de l'EBV m'ont également permis de montrer que la résistance à l'apoptose des cellules mutées pour p53 peut être induite par un agent chimique tel que la D-erythro-dihydrosphingosine, qui est un activateur des voies des voies p38 et JNK. Ces résultats permettent d'imaginer des nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des cellules mutées pour p53.

D'une manière générale, on peut dire que la biologie de l'EBV est très complexe dans son rôle sur la balance survie/apoptose des lymphocytes B en latence III. L'ensemble de mes résultats a permis de confirmer le rôle ambivalent du virus dans les processus d'apoptose. Ils

peuvent être inhibés (comme dans le cas de la réponse immune T anti-EBV, par expression de l'immuno-inhibiteur B7-H1) ou activés (comme lors du traitement des cellules infectées par les poisons du fuseau mitotique). Ces résultats sont illustrés dans le schéma ci-après.



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abbot, S.D., Rowe, M., Cadwallader, K., Ricksten, A., Gordon, J., Wang, F., Rymo, L., Rickinson, A.B., 1990. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus-encoded latent membrane protein. *J. Virol.* 64, 2126–2134.
- Adhikary, D., Behrends, U., Moosmann, A., Witter, K., Bornkamm, G.W., Mautner, J., 2006. Control of Epstein-Barr virus infection in vitro by T helper cells specific for virion glycoproteins. *J. Exp. Med.* 203, 995–1006.
- Adler, V., Franklin, C.C., Kraft, A.S., 1992. Phorbol esters stimulate the phosphorylation of c-Jun but not v-Jun: regulation by the N-terminal delta domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 5341–5345.
- Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., Honjo, T., 1996. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int. Immunol.* 8, 765–772.
- Aguilar, L.K., Rooney, C.M., Heslop, H.E., 1999. Lymphoproliferative disorders involving Epstein-Barr virus after hemopoietic stem cell transplantation. *Curr. Opin. Oncol.* 11, 96–101.
- Ahmadzadeh, M., Johnson, L.A., Heemskerk, B., Wunderlich, J.R., Dudley, M.E., White, D.E., Rosenberg, S.A., 2009. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 114, 1537–1544.
- Ahn, E.H., Schroeder, J.J., 2006. Sphinganine causes early activation of JNK and p38 MAPK and inhibition of AKT activation in HT-29 human colon cancer cells. *Anticancer Res.* 26, 121–127.
- Alexandrova, N., Niklinski, J., Bliskovsky, V., Otterson, G.A., Blake, M., Kaye, F.J., Zajac-Kaye, M., 1995. The N-terminal domain of c-Myc associates with alpha-tubulin and microtubules in vivo and in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5188–5195.
- Alfieri, C., Tanner, J., Carpentier, L., Perpête, C., Savoie, A., Paradis, K., Delage, G., Joncas, J., 1996. Epstein-Barr virus transmission from a blood donor to an organ transplant recipient with recovery of the same virus strain from the recipient's blood and oropharynx. *Blood* 87, 812–817.
- Allan, G.J., Inman, G.J., Parker, B.D., Rowe, D.T., Farrell, P.J., 1992. Cell growth effects of Epstein-Barr virus leader protein. *J. Gen. Virol.* 73 ( Pt 6), 1547–1551.
- Allan, L.A., Clarke, P.R., 2007. Phosphorylation of caspase-9 by CDK1/cyclin B1 protects mitotic cells against apoptosis. *Mol. Cell* 26, 301–310.
- Allan, L.A., Clarke, P.R., 2009. Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation. *FEBS J.* 276, 6063–6073.
- Allan, L.A., Morrice, N., Brady, S., Magee, G., Pathak, S., Clarke, P.R., 2003. Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nat. Cell Biol.* 5, 647–654.
- Alonso, G., Ambrosino, C., Jones, M., Nebreda, A.R., 2000. Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms depending on signal strength. *J. Biol. Chem.* 275, 40641–40648.
- Amano, M., Chihara, K., Kimura, K., Fukata, Y., Nakamura, N., Matsuura, Y., Kaibuchi, K., 1997. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. *Science* 275, 1308–1311.
- Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Kreschel, C., Stein, H., 1995. Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood* 85, 744–750.



- Andorsky, D.J., Yamada, R.E., Said, J., Pinkus, G.S., Betting, D.J., Timmerman, J.M., 2011. Programmed death ligand 1 is expressed by non-hodgkin lymphomas and inhibits the activity of tumor-associated T cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 4232–4244.
- Angus, K.L., Griffiths, G.M., 2013. Cell polarisation and the immunological synapse. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 85–91.
- Ansari, M.J.I., Salama, A.D., Chitnis, T., Smith, R.N., Yagita, H., Akiba, H., Yamazaki, T., Azuma, M., Iwai, H., Khoury, S.J., Auchincloss, H., Jr, Sayegh, M.H., 2003. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J. Exp. Med.* 198, 63–69.
- Aprile, S., Del Grosso, E., Tron, G.C., Grosa, G., 2007. In vitro metabolism study of combretastatin A-4 in rat and human liver microsomes. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 35, 2252–2261.
- Arcipowski, K.M., Stunz, L.L., Graham, J.P., Kraus, Z.J., Vanden Bush, T.J., Bishop, G.A., 2011. Molecular mechanisms of TNFR-associated factor 6 (TRAF6) utilization by the oncogenic viral mimic of CD40, latent membrane protein 1 (LMP1). *J. Biol. Chem.* 286, 9948–9955.
- Ardila-Osorio, H., Pioche-Durieu, C., Puvion-Dutilleul, F., Clause, B., Wiels, J., Miller, W., Raab-Traub, N., Busson, P., 2005. TRAF interactions with raft-like buoyant complexes, better than TRAF rates of degradation, differentiate signaling by CD40 and EBV latent membrane protein 1. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 113, 267–275.
- Arron, J.R., Vologodskaya, M., Wong, B.R., Naramura, M., Kim, N., Gu, H., Choi, Y., 2001. A positive regulatory role for Cbl family proteins in tumor necrosis factor-related activation-induced cytokine (trance) and CD40L-mediated Akt activation. *J. Biol. Chem.* 276, 30011–30017.
- Asai, R., Kato, A., Kato, K., Kanamori-Koyama, M., Sugimoto, K., Sairenji, T., Nishiyama, Y., Kawaguchi, Y., 2006. Epstein-Barr Virus Protein Kinase BGLF4 Is a Virion Tegument Protein That Dissociates from Virions in a Phosphorylation-Dependent Process and Phosphorylates the Viral Immediate-Early Protein BZLF1. *J. Virol.* 80, 5125–5134.
- Askari, N., Beenstock, J., Livnah, O., Engelberg, D., 2009. p38alpha is active in vitro and in vivo when monophosphorylated at threonine 180. *Biochemistry (Mosc.)* 48, 2497–2504.
- Attardi, L.D., Reczek, E.E., Cosmas, C., Demicco, E.G., McCurrach, M.E., Lowe, S.W., Jacks, T., 2000. PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family. *Genes Dev.* 14, 704–718.
- Baecklund, E., Sundström, C., Ekbom, A., Catrina, A.I., Biberfeld, P., Feltelius, N., Klareskog, L., 2003. Lymphoma subtypes in patients with rheumatoid arthritis: increased proportion of diffuse large B cell lymphoma. *Arthritis Rheum.* 48, 1543–1550.
- Bain, M., Watson, R.J., Farrell, P.J., Allday, M.J., 1996. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C is a powerful repressor of transcription when tethered to DNA. *J. Virol.* 70, 2481–2489.
- Baines, C.P., Kaiser, R.A., Purcell, N.H., Blair, N.S., Osinska, H., Hambleton, M.A., Brunskill, E.W., Sayen, M.R., Gottlieb, R.A., Dorn, G.W., Robbins, J., Molkentin, J.D., 2005. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 434, 658–662.
- Baines, C.P., Kaiser, R.A., Sheiko, T., Craigen, W.J., Molkentin, J.D., 2007. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat. Cell Biol.* 9, 550–555.

- Bajaj, B.G., Murakami, M., Cai, Q., Verma, S.C., Lan, K., Robertson, E.S., 2008. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with and enhances the stability of the c-Myc oncoprotein. *J. Virol.* 82, 4082–4090.
- Banerjee, A.S., Pal, A.D., Banerjee, S., 2013. Epstein-Barr virus-encoded small non-coding RNAs induce cancer cell chemoresistance and migration. *Virology* 443, 294–305.
- Bao, Q., Lu, W., Rabinowitz, J.D., Shi, Y., 2007. Calcium blocks formation of apoptosome by preventing nucleotide exchange in Apaf-1. *Mol. Cell* 25, 181–192.
- Baratin, M., Vivier, E., 2010. [B7-H6 : a novel alert signal for NK cells]. *Médecine Sci. MS* 26, 119–120.
- Barber, D.L., Wherry, E.J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J.P., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., Ahmed, R., 2006. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439, 682–687.
- Barnhart, B.C., Alappat, E.C., Peter, M.E., 2003. The CD95 type I/type II model. *Semin. Immunol.* 15, 185–193.
- Barone, M.C., Desouza, L.A., Freeman, R.S., 2008. Pin1 promotes cell death in NGF-dependent neurons through a mechanism requiring c-Jun activity. *J. Neurochem.* 106, 734–745.
- Barr, R.K., Bogoyevitch, M.A., 2001. The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 1047–1063.
- Barth, S., Pfuhl, T., Mamiani, A., Ehses, C., Roemer, K., Kremmer, E., Jäker, C., Höck, J., Meister, G., Grässer, F.A., 2008. Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. *Nucleic Acids Res.* 36, 666–675.
- Basañez, G., Sharpe, J.C., Galanis, J., Brandt, T.B., Hardwick, J.M., Zimmerberg, J., 2002. Bax-type apoptotic proteins porate pure lipid bilayers through a mechanism sensitive to intrinsic monolayer curvature. *J. Biol. Chem.* 277, 49360–49365.
- Beere, H.M., Wolf, B.B., Cain, K., Mosser, D.D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Tailor, P., Morimoto, R.I., Cohen, G.M., Green, D.R., 2000. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat. Cell Biol.* 2, 469–475.
- Behrens, A., Sibilias, M., Wagner, E.F., 1999. Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates stress-induced apoptosis and cellular proliferation. *Nat. Genet.* 21, 326–329.
- Benard, V., Bohl, B.P., Bokoch, G.M., 1999. Characterization of rac and cdc42 activation in chemoattractant-stimulated human neutrophils using a novel assay for active GTPases. *J. Biol. Chem.* 274, 13198–13204.
- Benson, D.M., Jr, Bakan, C.E., Mishra, A., Hofmeister, C.C., Efebera, Y., Becknell, B., Baiocchi, R.A., Zhang, J., Yu, J., Smith, M.K., Greenfield, C.N., Porcu, P., Devine, S.M., Rotem-Yehudar, R., Lozanski, G., Byrd, J.C., Caligiuri, M.A., 2010. The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood* 116, 2286–2294.
- Berger, R., Rotem-Yehudar, R., Slama, G., Landes, S., Kneller, A., Leiba, M., Koren-Michowitz, M., Shimoni, A., Nagler, A., 2008. Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 3044–3051.
- Bertheau, P., Espié, M., Turpin, E., Lehmann, J., Plassa, L.-F., Varna, M., Janin, A., de Thé, H., 2008. TP53 status and response to chemotherapy in breast cancer. *Pathobiol. J. Immunopathol. Mol. Cell. Biol.* 75, 132–139.

- Biggar, R.J., Henle, W., Fleisher, G., Böcker, J., Lennette, E.T., Henle, G., 1978. Primary Epstein-Barr virus infections in African infants. I. Decline of maternal antibodies and time of infection. *Int. J. Cancer* 22, 239–243.
- Blake, S.M., Eliopoulos, A.G., Dawson, C.W., Young, L.S., 2001. The transmembrane domains of the EBV-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) variant CAO regulate enhanced signalling activity. *Virology* 282, 278–287.
- Blank, C., Brown, I., Marks, R., Nishimura, H., Honjo, T., Gajewski, T.F., 2003. Absence of programmed death receptor 1 alters thymic development and enhances generation of CD4/CD8 double-negative TCR-transgenic T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 171, 4574–4581.
- Blank, C., Brown, I., Peterson, A.C., Spiotto, M., Iwai, Y., Honjo, T., Gajewski, T.F., 2004. PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. *Cancer Res.* 64, 1140–1145.
- Blank, C., Kuball, J., Voelkl, S., Wiendl, H., Becker, B., Walter, B., Majdic, O., Gajewski, T.F., Theobald, M., Andreesen, R., Mackensen, A., 2006. Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. *Int. J. Cancer* 119, 317–327.
- Boorjian, S.A., Sheinin, Y., Crispen, P.L., Farmer, S.A., Lohse, C.M., Kuntz, S.M., Leibovich, B.C., Kwon, E.D., Frank, I., 2008. T-cell coregulatory molecule expression in urothelial cell carcinoma: clinicopathologic correlations and association with survival. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14, 4800–4808.
- Borriello, F., Sethna, M.P., Boyd, S.D., Schweitzer, A.N., Tivol, E.A., Jacoby, D., Strom, T.B., Simpson, E.M., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., 1997. B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 6, 303–313.
- Bosselut, R., 2004. CD4/CD8-lineage differentiation in the thymus: from nuclear effectors to membrane signals. *Nat. Rev. Immunol.* 4, 529–540.
- Bourdon, J.-C., Renzing, J., Robertson, P.L., Fernandes, K.N., Lane, D.P., 2002. Scotin, a novel p53-inducible proapoptotic protein located in the ER and the nuclear membrane. *J. Cell Biol.* 158, 235–246.
- Bour-Jordan, H., Esensten, J.H., Martinez-Llordella, M., Penaranda, C., Stumpf, M., Bluestone, J.A., 2011. Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/B7 family. *Immunol. Rev.* 241, 180–205.
- Bragado, P., Armesilla, A., Silva, A., Porras, A., 2007. Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38alpha MAPK activation through ROS generation. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 12, 1733–1742.
- Brandt, C.S., Baratin, M., Yi, E.C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C.D., Kaifu, T., Chabannon, C., Moretta, A., West, R., Xu, W., Vivier, E., Levin, S.D., 2009. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J. Exp. Med.* 206, 1495–1503.
- Brookes, P.S., Yoon, Y., Robotham, J.L., Anders, M.W., Sheu, S.-S., 2004. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287, C817–833.
- Brown, J.A., Dorfman, D.M., Ma, F.-R., Sullivan, E.L., Munoz, O., Wood, C.R., Greenfield, E.A., Freeman, G.J., 2003. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 170, 1257–1266.
- Buettner, M., Heussinger, N., Niedobitek, G., 2006. Expression of Epstein-Barr virus (EBV)-encoded latent membrane proteins and STAT3 activation in nasopharyngeal carcinoma. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 449, 513–519.

- Bunz, F., Hwang, P.M., Torrance, C., Waldman, T., Zhang, Y., Dillehay, L., Williams, J., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1999. Disruption of p53 in human cancer cells alters the responses to therapeutic agents. *J. Clin. Invest.* 104, 263–269.
- Butte, M.J., Peña-Cruz, V., Kim, M.-J., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., 2008. Interaction of human PD-L1 and B7-1. *Mol. Immunol.* 45, 3567–3572.
- Cai, B., Chang, S.H., Becker, E.B.E., Bonni, A., Xia, Z., 2006. p38 MAP kinase mediates apoptosis through phosphorylation of BimEL at Ser-65. *J. Biol. Chem.* 281, 25215–25222.
- Cai, B., Xia, Z., 2008. p38 MAP kinase mediates arsenite-induced apoptosis through FOXO3a activation and induction of Bim transcription. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 13, 803–810.
- Cai, X., Schäfer, A., Lu, S., Bilello, J.P., Desrosiers, R.C., Edwards, R., Raab-Traub, N., Cullen, B.R., 2006. Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS Pathog.* 2, e23.
- Callan, M.F., Steven, N., Krausa, P., Wilson, J.D., Moss, P.A., Gillespie, G.M., Bell, J.I., Rickinson, A.B., McMichael, A.J., 1996. Large clonal expansions of CD8+ T cells in acute infectious mononucleosis. *Nat. Med.* 2, 906–911.
- Camilleri-Broët, S., Davi, F., Feuillard, J., Bourgeois, C., Seilhean, D., Hauw, J.J., Raphaël, M., 1995. High expression of latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus and BCL-2 oncoprotein in acquired immunodeficiency syndrome-related primary brain lymphomas. *Blood* 86, 432–435.
- Cano, E., Mahadevan, L.C., 1995. Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem. Sci.* 20, 117–122.
- Capano, M., Crompton, M., 2006. Bax translocates to mitochondria of heart cells during simulated ischaemia: involvement of AMP-activated and p38 mitogen-activated protein kinases. *Biochem. J.* 395, 57–64.
- Carreno, B.M., Carter, L.L., Collins, M., 2005. Therapeutic opportunities in the B7/CD28 family of ligands and receptors. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5, 424–430.
- Carter, L., Fouser, L.A., Jussif, J., Fitz, L., Deng, B., Wood, C.R., Collins, M., Honjo, T., Freeman, G.J., Carreno, B.M., 2002. PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur. J. Immunol.* 32, 634–643.
- Castaneda, C.A., Cortes-Funes, H., Gomez, H.L., Ciruelos, E.M., 2010. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling pathway in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 29, 751–759.
- Castle, V.P., Heidelberger, K.P., Bromberg, J., Ou, X., Dole, M., Nuñez, G., 1993. Expression of the apoptosis-suppressing protein bcl-2, in neuroblastoma is associated with unfavorable histology and N-myc amplification. *Am. J. Pathol.* 143, 1543–1550.
- Chan, C.-H., Lee, S.-W., Li, C.-F., Wang, J., Yang, W.-L., Wu, C.-Y., Wu, J., Nakayama, K.I., Kang, H.-Y., Huang, H.-Y., Hung, M.-C., Pandolfi, P.P., Lin, H.-K., 2010. Deciphering the transcriptional complex critical for RhoA gene expression and cancer metastasis. *Nat. Cell Biol.* 12, 457–467.
- Chapoval, A.I., Ni, J., Lau, J.S., Wilcox, R.A., Flies, D.B., Liu, D., Dong, H., Sica, G.L., Zhu, G., Tamada, K., Chen, L., 2001. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-gamma production. *Nat. Immunol.* 2, 269–274.
- Chauhan, D., Li, G., Hideshima, T., Podar, K., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Munshi, N., Kharbanda, S., Anderson, K.C., 2003. JNK-dependent release of mitochondrial protein, Smac, during apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *J. Biol. Chem.* 278, 17593–17596.
- Checchi, P.M., Nettles, J.H., Zhou, J., Snyder, J.P., Joshi, H.C., 2003. Microtubule-interacting drugs for cancer treatment. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 361–365.

- Chen, H., Smith, P., Ambinder, R.F., Hayward, S.D., 1999. Expression of Epstein-Barr virus BamHI-A rightward transcripts in latently infected B cells from peripheral blood. *Blood* 93, 3026–3032.
- Chen, J., He, Q., Zhang, R., Chu, Y., Wang, Y., Liu, Q., Xiong, S., 2004. Allogenic donor splenocytes pretreated with antisense peptide against B7 prolong cardiac allograft survival. *Clin. Exp. Immunol.* 138, 245–250.
- Chen, S.-Y., Lu, J., Shih, Y.-C., Tsai, C.-H., 2002. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A regulates c-Jun protein through extracellular signal-regulated kinase. *J. Virol.* 76, 9556–9561.
- Chen, Y.R., Meyer, C.F., Tan, T.H., 1996. Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in gamma radiation-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271, 631–634.
- Cheung, K.-J.J., Horsman, D.E., Gascoyne, R.D., 2009. The significance of TP53 in lymphoid malignancies: mutation prevalence, regulation, prognostic impact and potential as a therapeutic target. *Br. J. Haematol.* 146, 257–269.
- Cheung, R.K., Miyazaki, I., Dosch, H.M., 1993. Unexpected patterns of Epstein-Barr virus gene expression during early stages of B cell transformation. *Int. Immunol.* 5, 707–716.
- Chiang, A.K., Tao, Q., Srivastava, G., Ho, F.C., 1996. Nasal NK- and T-cell lymphomas share the same type of Epstein-Barr virus latency as nasopharyngeal carcinoma and Hodgkin's disease. *Int. J. Cancer* 68, 285–290.
- Chipuk, J.E., Green, D.R., 2006. Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ.* 13, 994–1002.
- Chou, T.-C., Zhang, X.-G., Balog, A., Su, D.-S., Meng, D., Savin, K., Bertino, J.R., Danishefsky, S.J., 1998. Desoxyepothilone B: An efficacious microtubule-targeted antitumor agent with a promising in vivo profile relative to epothilone B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9642–9647.
- Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.-G., Kipps, T.J., Negrini, M., Croce, C.M., 2005. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 13944–13949.
- Cingolani, A., Gastaldi, R., Fassone, L., Pierconti, F., Giancola, M.L., Martini, M., De Luca, A., Ammassari, A., Mazzone, C., Pescarmona, E., Gaidano, G., Larocca, L.M., Antinori, A., 2000. Epstein-Barr virus infection is predictive of CNS involvement in systemic AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 18, 3325–3330.
- Cohen, J.I., 2000. Epstein-Barr virus infection. *N. Engl. J. Med.* 343, 481–492.
- Cohen, J.I., Wang, F., Kieff, E., 1991. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 mutations define essential domains for transformation and transactivation. *J. Virol.* 65, 2545–2554.
- Colomo, L., Loong, F., Rives, S., Pittaluga, S., Martínez, A., López-Guillermo, A., Ojanguren, J., Romagosa, V., Jaffe, E.S., Campo, E., 2004. Diffuse large B-cell lymphomas with plasmablastic differentiation represent a heterogeneous group of disease entities. *Am. J. Surg. Pathol.* 28, 736–747.
- Connett, J.M., Hunt, S.R., Hickerson, S.M., Wu, S.J., Doherty, G.M., 2003. Localization of IFN-gamma-activated Stat1 and IFN regulatory factors 1 and 2 in breast cancer cells. *J. Interf. Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interf. Cytokine Res.* 23, 621–630.
- Corazzari, M., Lovat, P.E., Oliverio, S., Di Sano, F., Donnorso, R.P., Redfern, C.P.F., Piacentini, M., 2005. Fenretinide: a p53-independent way to kill cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 810–815.
- Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Zimber, U., Rousselet, G., Pavlish, O., Banchereau, J., Tursz, T., Bornkamm, G., Lenoir, G.M., 1990. Stable transfection of Epstein-Barr

- virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23. *J. Virol.* 64, 1002–1013.
- Correia, J.J., Lobert, S., 2001. Physicochemical aspects of tubulin-interacting antimetabolic drugs. *Curr. Pharm. Des.* 7, 1213–1228.
- Crough, T., Khanna, R., 2009. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 76–98, Table of Contents.
- Cuadrado, A., Lafarga, V., Cheung, P.C.F., Dolado, I., Llanos, S., Cohen, P., Nebreda, A.R., 2007. A new p38 MAP kinase-regulated transcriptional coactivator that stimulates p53-dependent apoptosis. *EMBO J.* 26, 2115–2126.
- Cultrera, J.L., Dalia, S.M., 2012. Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Current Strategies and Future Directions. *Cancer Control.*
- Curiel, T.J., Wei, S., Dong, H., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Krzysiek, R., Knutson, K.L., Daniel, B., Zimmermann, M.C., David, O., Burow, M., Gordon, A., Dhurandhar, N., Myers, L., Berggren, R., Hemminki, A., Alvarez, R.D., Emilie, D., Curiel, D.T., Chen, L., Zou, W., 2003. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat. Med.* 9, 562–567.
- Cushman, M., Nagarathnam, D., Gopal, D., Chakraborti, A.K., Lin, C.M., Hamel, E., 1991. Synthesis and evaluation of stilbene and dihydrostilbene derivatives as potential anticancer agents that inhibit tubulin polymerization. *J. Med. Chem.* 34, 2579–2588.
- Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P.G., Coso, O.A., Gutkind, S., Spiegel, S., 1996. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature* 381, 800–803.
- Dalton, W.B., Nandan, M.O., Moore, R.T., Yang, V.W., 2007. Human Cancer Cells Commonly Acquire DNA Damage during Mitotic Arrest. *Cancer Res.* 67, 11487–11492.
- Dambaugh, T., Beisel, C., Hummel, M., King, W., Fennewald, S., Cheung, A., Heller, M., Raab-Traub, N., Kieff, E., 1980. Epstein-Barr virus (B95-8) DNA VII: molecular cloning and detailed mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 2999–3003.
- Dawson, C.W., Laverick, L., Morris, M.A., Tramoutanis, G., Young, L.S., 2008. Epstein-Barr virus-encoded LMP1 regulates epithelial cell motility and invasion via the ERK-MAPK pathway. *J. Virol.* 82, 3654–3664.
- Dawson, C.W., Port, R.J., Young, L.S., 2012. The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Semin. Cancer Biol.* 22, 144–153.
- Dawson, C.W., Tramoutanis, G., Eliopoulos, A.G., Young, L.S., 2003a. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. *J. Biol. Chem.* 278, 3694–3704.
- Dawson, C.W., Tramoutanis, G., Eliopoulos, A.G., Young, L.S., 2003b. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. *J. Biol. Chem.* 278, 3694–3704.
- Dawson, C.W., Tramoutanis, G., Eliopoulos, A.G., Young, L.S., 2003c. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. *J. Biol. Chem.* 278, 3694–3704.
- De Chiara, G., Marcocci, M.E., Torcia, M., Lucibello, M., Rosini, P., Bonini, P., Higashimoto, Y., Damonte, G., Armirotti, A., Amodei, S., Palamara, A.T., Russo, T.,

- Garaci, E., Cozzolino, F., 2006. Bcl-2 Phosphorylation by p38 MAPK: identification of target sites and biologic consequences. *J. Biol. Chem.* 281, 21353–21361.
- De Zutter, G.S., Davis, R.J., 2001. Pro-apoptotic gene expression mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 6168–6173.
- Deacon, E.M., Pallesen, G., Niedobitek, G., Crocker, J., Brooks, L., Rickinson, A.B., Young, L.S., 1993. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. *J. Exp. Med.* 177, 339–349.
- Denecker, G., Hoste, E., Gilbert, B., Hochepped, T., Ovaere, P., Lippens, S., Van den Broecke, C., Van Damme, P., D'Herde, K., Hachem, J.-P., Borgonie, G., Presland, R.B., Schoonjans, L., Libert, C., Vandekerckhove, J., Gevaert, K., Vandenaabeele, P., Declercq, W., 2007. Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss. *Nat. Cell Biol.* 9, 666–674.
- Deregibus, M.C., Buttiglieri, S., Russo, S., Bussolati, B., Camussi, G., 2003. CD40-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway mediates endothelial cell survival and in vitro angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 278, 18008–18014.
- Dérijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.H., Han, J., Ulevitch, R.J., Davis, R.J., 1995a. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267, 682–685.
- Dérijard, B., Raingeaud, J., Barrett, T., Wu, I.H., Han, J., Ulevitch, R.J., Davis, R.J., 1995b. Independent human MAP-kinase signal transduction pathways defined by MEK and MKK isoforms. *Science* 267, 682–685.
- Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S., Reed, J.C., 1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 17, 2215–2223.
- Devergne, O., Hatzivassiliou, E., Izumi, K.M., Kaye, K.M., Kleijnen, M.F., Kieff, E., Mosialos, G., 1996. Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol. Cell. Biol.* 16, 7098–7108.
- Dewson, G., Kratina, T., Sim, H.W., Puthalakath, H., Adams, J.M., Colman, P.M., Kluck, R.M., 2008. To trigger apoptosis, Bak exposes its BH3 domain and homodimerizes via BH3:groove interactions. *Mol. Cell* 30, 369–380.
- Dhanasekaran, D.N., Johnson, G.L., 2007. MAPKs: function, regulation, role in cancer and therapeutic targeting. *Oncogene* 26, 3097–3099.
- Dhanasekaran, D.N., Reddy, E.P., 2008. JNK Signaling in Apoptosis. *Oncogene* 27, 6245–6251.
- Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., Kolch, W., 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 3279–3290.
- Dillner, J., Kallin, B., Ehlin-Henriksson, B., Rymo, L., Henle, W., Henle, G., Klein, G., 1986. The Epstein-Barr virus determined nuclear antigen is composed of at least three different antigens. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 37, 195–200.
- Dolcetti, R., Boiocchi, M., Ghoghini, A., Carbone, A., 2001. Pathogenetic and histogenetic features of HIV-associated Hodgkin's disease. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 37, 1276–1287.
- Dong, C., Juedes, A.E., Temann, U.A., Shresta, S., Allison, J.P., Ruddle, N.H., Flavell, R.A., 2001. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 409, 97–101.
- Dong, H., Chen, X., 2006. Immunoregulatory role of B7-H1 in chronicity of inflammatory responses. *Cell. Mol. Immunol.* 3, 179–187.

- Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V.A., Celis, E., Chen, L., 2002a. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* 8, 793–800.
- Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V.A., Celis, E., Chen, L., 2002b. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* 8, 793–800.
- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., Chen, L., 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.* 5, 1365–1369.
- Donovan, N., Becker, E.B.E., Konishi, Y., Bonni, A., 2002. JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery. *J. Biol. Chem.* 277, 40944–40949.
- Dosch, H.M., Lam, P., Hui, M.F., Hibi, T., Cheung, R.K., 1990. EBV utilizes a unique activation pathway for the transformation of human B cells. *Int. Immunol.* 2, 833–848.
- Draoua, H.Y., Tsao, L., Mancini, D.M., Addonizio, L.J., Bhagat, G., Alobeid, B., 2004. T-cell post-transplantation lymphoproliferative disorders after cardiac transplantation: a single institutional experience. *Br. J. Haematol.* 127, 429–432.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X., 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33–42.
- Durand-Panteix, S., Farhat, M., Youlyouz-Marfak, I., Rouaud, P., Ouk-Martin, C., David, A., Faumont, N., Feuillard, J., Jayat-Vignoles, C., 2012. B7-H1, which represses EBV-immortalized B cell killing by autologous T and NK cells, is oppositely regulated by c-Myc and EBV latency III program at both mRNA and secretory lysosome levels. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 189, 181–190.
- Dustin, M.L., Chakraborty, A.K., Shaw, A.S., 2010. Understanding the Structure and Function of the Immunological Synapse. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a002311.
- Dykstra, M.L., Longnecker, R., Pierce, S.K., 2001. Epstein-Barr virus coopts lipid rafts to block the signaling and antigen transport functions of the BCR. *Immunity* 14, 57–67.
- Edwards, R.H., Marquitz, A.R., Raab-Traub, N., 2008. Epstein-Barr Virus BART MicroRNAs Are Produced from a Large Intron prior to Splicing. *J. Virol.* 82, 9094–9106.
- Eliopoulos, A.G., Blake, S.M., Floettmann, J.E., Rowe, M., Young, L.S., 1999. Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 activates the JNK pathway through its extreme C terminus via a mechanism involving TRADD and TRAF2. *J. Virol.* 73, 1023–1035.
- Eliopoulos, A.G., Waites, E.R., Blake, S.M.S., Davies, C., Murray, P., Young, L.S., 2003. TRAF1 is a critical regulator of JNK signaling by the TRAF-binding domain of the Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1 but not CD40. *J. Virol.* 77, 1316–1328.
- Eliopoulos, A.G., Young, L.S., 1998. Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *Oncogene* 16, 1731–1742.
- Endo, K., Kondo, S., Shackelford, J., Horikawa, T., Kitagawa, N., Yoshizaki, T., Furukawa, M., Zen, Y., Pagano, J.S., 2009. Phosphorylated ezrin is associated with EBV latent membrane protein 1 in nasopharyngeal carcinoma and induces cell migration. *Oncogene* 28, 1725–1735.



- Engel, F.B., Schebesta, M., Duong, M.T., Lu, G., Ren, S., Madwed, J.B., Jiang, H., Wang, Y., Keating, M.T., 2005. p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev.* 19, 1175–1187.
- Enslin, H., Raingeaud, J., Davis, R.J., 1998. Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. *J. Biol. Chem.* 273, 1741–1748.
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., Martinou, J.C., 2000. Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell. Biol.* 20, 929–935.
- Evens, A.M., Roy, R., Sterrenberg, D., Moll, M.Z., Chadburn, A., Gordon, L.I., 2010. Post-transplantation lymphoproliferative disorders: diagnosis, prognosis, and current approaches to therapy. *Curr. Oncol. Rep.* 12, 383–394.
- Falk, M.H., Trauth, B.C., Debatin, K.M., Klas, C., Gregory, C.D., Rickinson, A.B., Calender, A., Lenoir, G.M., Ellwart, J.W., Krammer, P.H., 1992. Expression of the APO-1 antigen in Burkitt lymphoma cell lines correlates with a shift towards a lymphoblastoid phenotype. *Blood* 79, 3300–3306.
- Fan, M., Chambers, T.C., 2001. Role of mitogen-activated protein kinases in the response of tumor cells to chemotherapy. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* 4, 253–267.
- Fassone, L., Bhatia, K., Gutierrez, M., Capello, D., Gloghini, A., Dolcetti, R., Vivenza, D., Ascoli, V., Lo Coco, F., Pagani, L., Dotti, G., Rambaldi, A., Raphael, M., Tirelli, U., Saglio, G., Magrath, I.T., Carbone, A., Gaidano, G., 2000. Molecular profile of Epstein-Barr virus infection in HHV-8-positive primary effusion lymphoma. *Leukemia* 14, 271–277.
- Faumont, N., Durand-Panteix, S., Schlee, M., Grömminger, S., Schuhmacher, M., Hölzel, M., Laux, G., Mailhammer, R., Rosenwald, A., Staudt, L.M., Bornkamm, G.W., Feuillard, J., 2009. 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, 5014–5027.
- Fayard, E., Moncayo, G., Hemmings, B.A., Holländer, G.A., 2010. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling in thymocytes: the need for stringent control. *Sci. Signal.* 3, re5.
- Fellous, A., Ginzburg, I., Littauer, U.Z., 1982. Modulation of tubulin mRNA levels by interferon in human lymphoblastoid cells. *EMBO J.* 1, 835–839.
- Fife, B.T., Bluestone, J.A., 2008. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol. Rev.* 224, 166–182.
- Fingerroth, J.D., Weis, J.J., Tedder, T.F., Strominger, J.L., Biro, P.A., Fearon, D.T., 1984. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 4510–4514.
- Flajnik, M.F., Tlapakova, T., Criscitiello, M.F., Krylov, V., Ohta, Y., 2012. Evolution of the B7 family: co-evolution of B7H6 and NKp30, identification of a new B7 family member, B7H7, and of B7's historical relationship with the MHC. *Immunogenetics* 64, 571–590.
- Flies, D.B., Chen, L., 2007. The new B7s: playing a pivotal role in tumor immunity. *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997 30, 251–260.
- Flies, D.B., Sandler, B.J., Sznol, M., Chen, L., 2011. Blockade of the B7-H1/PD-1 pathway for cancer immunotherapy. *Yale J. Biol. Med.* 84, 409–421.
- Fojo, A.T., Menefee, M., 2005. Microtubule targeting agents: basic mechanisms of multidrug resistance (MDR). *Semin. Oncol.* 32, S3–8.
- Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., Horton, H.F., Fouser, L., Carter, L., Ling,

- V., Bowman, M.R., Carreno, B.M., Collins, M., Wood, C.R., Honjo, T., 2000b. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 192, 1027–1034.
- Freilich, R.J., Balmaceda, C., Seidman, A.D., Rubin, M., DeAngelis, L.M., 1996. Motor neuropathy due to docetaxel and paclitaxel. *Neurology* 47, 115–118.
- French, L.E., Tschopp, J., 2003. Protein-based therapeutic approaches targeting death receptors. *Cell Death Differ.* 10, 117–123.
- Frigola, X., Inman, B.A., Krco, C.J., Liu, X., Harrington, S.M., Bulur, P.A., Dietz, A.B., Dong, H., Kwon, E.D., 2012. Soluble B7-H1: differences in production between dendritic cells and T cells. *Immunol. Lett.* 142, 78–82.
- Frigola, X., Inman, B.A., Lohse, C.M., Krco, C.J., Cheville, J.C., Thompson, R.H., Leibovich, B., Blute, M.L., Dong, H., Kwon, E.D., 2011. Identification of a soluble form of B7-H1 that retains immunosuppressive activity and is associated with aggressive renal cell carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 1915–1923.
- Fruehling, S., Longnecker, R., 1997. The immunoreceptor tyrosine-based activation motif of Epstein-Barr virus LMP2A is essential for blocking BCR-mediated signal transduction. *Virology* 235, 241–251.
- Fruehling, S., Swart, R., Dolwick, K.M., Kremmer, E., Longnecker, R., 1998. Tyrosine 112 of latent membrane protein 2A is essential for protein tyrosine kinase loading and regulation of Epstein-Barr virus latency. *J. Virol.* 72, 7796–7806.
- Fuchs, S.Y., Adler, V., Pincus, M.R., Ronai, Z., 1998. MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 10541–10546.
- Fukuda, M., Longnecker, R., 2007. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A mediates transformation through constitutive activation of the Ras/PI3-K/Akt Pathway. *J. Virol.* 81, 9299–9306.
- Gahn, T.A., Sugden, B., 1995. An EBNA-1-dependent enhancer acts from a distance of 10 kilobase pairs to increase expression of the Epstein-Barr virus LMP gene. *J. Virol.* 69, 2633–2636.
- Garibal, J., Hollville, E., Bell, A.I., Kelly, G.L., Renouf, B., Kawaguchi, Y., Rickinson, A.B., Wiels, J., 2007. Truncated form of the Epstein-Barr virus protein EBNA-LP protects against caspase-dependent apoptosis by inhibiting protein phosphatase 2A. *J. Virol.* 81, 7598–7607.
- Garibal, J., Hollville, E., Renouf, B., Tétaud, C., Wiels, J., 2010. Caspase-8-mediated cleavage of Bid and protein phosphatase 2A-mediated activation of Bax are necessary for Verotoxin-1-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma cells. *Cell. Signal.* 22, 467–475.
- Ge, B., Gram, H., Di Padova, F., Huang, B., New, L., Ulevitch, R.J., Luo, Y., Han, J., 2002. MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science* 295, 1291–1294.
- Geissler, A., Haun, F., Frank, D.O., Wieland, K., Simon, M.M., Idzko, M., Davis, R.J., Maurer, U., Borner, C., 2013. Apoptosis induced by the fungal pathogen gliotoxin requires a triple phosphorylation of Bim by JNK. *Cell Death Differ.* 20, 1317–1329.
- George, N.M., Evans, J.J.D., Luo, X., 2007. A three-helix homo-oligomerization domain containing BH3 and BH1 is responsible for the apoptotic activity of Bax. *Genes Dev.* 21, 1937–1948.
- Ghavami, S., Hashemi, M., Ande, S.R., Yeganeh, B., Xiao, W., Eshraghi, M., Bus, C.J., Kadkhoda, K., Wiechec, E., Halayko, A.J., Los, M., 2009. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J. Med. Genet.* 46, 497–510.
- Ghebeh, H., Tulbah, A., Mohammed, S., Elkum, N., Bin Amer, S.M., Al-Tweigeri, T., Dermime, S., 2007. Expression of B7-H1 in breast cancer patients is strongly

- associated with high proliferative Ki-67-expressing tumor cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 121, 751–758.
- Giannakakou, P., Gussio, R., Nogales, E., Downing, K.H., Zaharevitz, D., Bollbuck, B., Poy, G., Sackett, D., Nicolaou, K.C., Fojo, T., 2000. A common pharmacophore for epothilone and taxanes: molecular basis for drug resistance conferred by tubulin mutations in human cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 2904–2909.
- Gilfillan, A.M., Tkaczyk, C., 2006. Integrated signalling pathways for mast-cell activation. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 218–230.
- Gilligan, K., Sato, H., Rajadurai, P., Busson, P., Young, L., Rickinson, A., Tursz, T., Raab-Traub, N., 1990. Novel transcription from the Epstein-Barr virus terminal EcoRI fragment, DJH<sub>1</sub>, in a nasopharyngeal carcinoma. *J. Virol.* 64, 4948–4956.
- Gires, O., Olivier, U., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D., Hammerschmidt, W., 1997. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J.* 16, 6131–6140.
- Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D., Hammerschmidt, W., 1997. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J.* 16, 6131–6140.
- Giulino, L., Mathew, S., Ballon, G., Chadburn, A., Barouk, S., Antonicelli, G., Leoncini, L., Liu, Y.F., Gogineni, S., Tam, W., Cesarman, E., 2011. A20 (TNFAIP3) genetic alterations in EBV-associated AIDS-related lymphoma. *Blood* 117, 4852–4854.
- Golden-Mason, L., Palmer, B., Klarquist, J., Mengshol, J.A., Castelblanco, N., Rosen, H.R., 2007. Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells associated with reversible immune dysfunction. *J. Virol.* 81, 9249–9258.
- Gratama, J.W., Ernberg, I., 1995. Molecular epidemiology of Epstein-Barr virus infection. *Adv. Cancer Res.* 67, 197–255.
- Greaves, P., Gribben, J.G., 2013. The role of B7 family molecules in hematologic malignancy. *Blood* 121, 734–744.
- Green, D.R., Ferguson, T., Zitvogel, L., Kroemer, G., 2009. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 353–363.
- Green, M.R., Rodig, S., Juszczynski, P., Ouyang, J., Sinha, P., O'Donnell, E., Neuberg, D., Shipp, M.A., 2012. Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-L1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: implications for targeted therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18, 1611–1618.
- Greenough, T.C., Campellone, S.C., Brody, R., Jain, S., Sanchez-Merino, V., Somasundaran, M., Luzuriaga, K., 2010. Programmed Death-1 expression on Epstein Barr virus specific CD8<sup>+</sup> T cells varies by stage of infection, epitope specificity, and T-cell receptor usage. *PLoS One* 5, e12926.
- Greenwald, R.J., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., 2005. The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 515–548.
- Greifenegger, N., Jäger, M., Kunz-Schughart, L.A., Wolf, H., Schwarzmann, F., 1998. Epstein-Barr virus small RNA (EBER) genes: differential regulation during lytic viral replication. *J. Virol.* 72, 9323–9328.
- Gross, A., McDonnell, J.M., Korsmeyer, S.J., 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13, 1899–1911.
- Gulley, M.L., Raphael, M., Lutz, C.T., Ross, D.W., Raab-Traub, N., 1992. Epstein-Barr virus integration in human lymphomas and lymphoid cell lines. *Cancer* 70, 185–191.
- Guo, Y., Srinivasula, S.M., Druilhe, A., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E.S., 2002. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J. Biol. Chem.* 277, 13430–13437.

- Hammerschmidt, W., Sugden, B., 1989. Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature* 340, 393–397.
- Hamze, A., Giraud, A., Messaoudi, S., Provot, O., Peyrat, J.-F., Bignon, J., Liu, J.-M., Wdzieczak-Bakala, J., Thoret, S., Dubois, J., Brion, J.-D., Alami, M., 2009. Synthesis, biological evaluation of 1,1-diarylethylenes as a novel class of antimetabolic agents. *ChemMedChem* 4, 1912–1924.
- Han, J., Lee, J.D., Bibbs, L., Ulevitch, R.J., 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265, 808–811.
- Han, J., Lee, J.D., Jiang, Y., Li, Z., Feng, L., Ulevitch, R.J., 1996. Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6). *J. Biol. Chem.* 271, 2886–2891.
- Hansen, J.D., Du Pasquier, L., Lefranc, M.-P., Lopez, V., Benmansour, A., Boudinot, P., 2009. The B7 family of immunoregulatory receptors: a comparative and evolutionary perspective. *Mol. Immunol.* 46, 457–472.
- Harada, S., Kieff, E., 1997. Epstein-Barr virus nuclear protein LP stimulates EBNA-2 acidic domain-mediated transcriptional activation. *J. Virol.* 71, 6611–6618.
- Hashiguchi, M., Kobori, H., Ritprajak, P., Kamimura, Y., Kozono, H., Azuma, M., 2008. Triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 (TLT-2) is a counter-receptor for B7-H3 and enhances T cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 10495–10500.
- Hawkins, P.T., Eguinoa, A., Qiu, R.G., Stokoe, D., Cooke, F.T., Walters, R., Wennström, S., Claesson-Welsh, L., Evans, T., Symons, M., 1995. PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. *Curr. Biol.* 5, 393–403.
- He, L., Zhang, G., He, Y., Zhu, H., Zhang, H., Feng, Z., 2005. Blockade of B7-H1 with sPD-1 improves immunity against murine hepatocarcinoma. *Anticancer Res.* 25, 3309–3313.
- He, X., Xu, L., Liu, Y., 2005. Identification of a novel splice variant of human PD-L1 mRNA encoding an isoform-lacking IgV-like domain. *Acta Pharmacol. Sin.* 26, 462–468.
- Henkel, T., Ling, P.D., Hayward, S.D., Peterson, M.G., 1994. Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science* 265, 92–95.
- Henle, G., Henle, W., Clifford, P., Diehl, V., Kafuko, G.W., Kirya, B.G., Klein, G., Morrow, R.H., Munube, G.M., Pike, P., Tukei, P.M., Ziegler, J.L., 1969. Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups. *J. Natl. Cancer Inst.* 43, 1147–1157.
- Hennessy, K., Fennewald, S., Kieff, E., 1985. A third viral nuclear protein in lymphoblasts immortalized by Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 5944–5948.
- Hennessy, K., Wang, F., Bushman, E.W., Kieff, E., 1986. Definitive identification of a member of the Epstein-Barr virus nuclear protein 3 family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 5693–5697.
- Hesse, J., Ibsen, K.K., Krabbe, S., Uldall, P., 1983. Prevalence of antibodies to Epstein-Barr virus (EBV) in childhood and adolescence in Denmark. *Scand. J. Infect. Dis.* 15, 335–338.
- Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., Karin, M., 1993. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* 7, 2135–2148.
- Higuchi, M., Izumi, K.M., Kieff, E., 2001. Epstein-Barr virus latent-infection membrane proteins are palmitoylated and raft-associated: protein 1 binds to the cytoskeleton through TNF receptor cytoplasmic factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 4675–4680.

- Hirschberg, K., Miller, C.M., Ellenberg, J., Presley, J.F., Siggia, E.D., Phair, R.D., Lippincott-Schwartz, J., 1998. Kinetic analysis of secretory protein traffic and characterization of golgi to plasma membrane transport intermediates in living cells. *J. Cell Biol.* 143, 1485–1503.
- Hislop, A.D., Taylor, G.S., Sauce, D., Rickinson, A.B., 2007. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 587–617.
- Hjalgrim, H., Friborg, J., Melbye, M., 2007. The epidemiology of EBV and its association with malignant disease, in: Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P.S., Roizman, B., Whitley, R., Yamanishi, K. (Eds.), *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hoffarth, S., Zitzer, A., Wiewrodt, R., Hähnel, P.S., Beyer, V., Kreft, A., Biesterfeld, S., Schuler, M., 2008. pp32/PHAPI determines the apoptosis response of non-small-cell lung cancer. *Cell Death Differ.* 15, 161–170.
- Hoffman, W.H., Biade, S., Zilfou, J.T., Chen, J., Murphy, M., 2002. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J. Biol. Chem.* 277, 3247–3257.
- Holt, O.J., Gallo, F., Griffiths, G.M., 2006. Regulating secretory lysosomes. *J. Biochem. (Tokyo)* 140, 7–12.
- Hömig-Hölzel, C., Hojer, C., Rastelli, J., Casola, S., Strobl, L.J., Müller, W., Quintanilla-Martinez, L., Gewies, A., Ruland, J., Rajewsky, K., Zimmer-Strobl, U., 2008. Constitutive CD40 signaling in B cells selectively activates the noncanonical NF-kappaB pathway and promotes lymphomagenesis. *J. Exp. Med.* 205, 1317–1329.
- Hongmei, Z., 2012. Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review, in: Ntuli, T. (Ed.), *Apoptosis and Medicine*. InTech.
- Horikawa, T., Sheen, T.-S., Takeshita, H., Sato, H., Furukawa, M., Yoshizaki, T., 2001. Induction of c-Met Proto-Oncogene by Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein-1 and the Correlation with Cervical Lymph Node Metastasis of Nasopharyngeal Carcinoma. *Am. J. Pathol.* 159, 27–33.
- Hsieh, J.J., Hayward, S.D., 1995. Masking of the CBF1/RBPJ kappa transcriptional repression domain by Epstein-Barr virus EBNA2. *Science* 268, 560–563.
- Hsu, S.C., Gavrilin, M.A., Tsai, M.H., Han, J., Lai, M.Z., 1999. p38 mitogen-activated protein kinase is involved in Fas ligand expression. *J. Biol. Chem.* 274, 25769–25776.
- Hsu, S.Y., Kaipia, A., McGee, E., Lomeli, M., Hsueh, A.J., 1997. Bok is a pro-apoptotic Bcl-2 protein with restricted expression in reproductive tissues and heterodimerizes with selective anti-apoptotic Bcl-2 family members. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12401–12406.
- Hsu, Y.T., Wolter, K.G., Youle, R.J., 1997. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3668–3672.
- Hu, M.C., Wang, Y.P., Mikhail, A., Qiu, W.R., Tan, T.H., 1999. Murine p38-delta mitogen-activated protein kinase, a developmentally regulated protein kinase that is activated by stress and proinflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* 274, 7095–7102.
- Huang, S., Benavente, S., Armstrong, E.A., Li, C., Wheeler, D.L., Harari, P.M., 2011. p53 modulates acquired resistance to EGFR inhibitors and radiation. *Cancer Res.* 71, 7071–7079.
- Huen, D.S., Henderson, S.A., Croom-Carter, D., Rowe, M., 1995. The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene* 10, 549–560.

- Huppa, J.B., Davis, M.M., 2003. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 973–983.
- Hutchings, I.A., Tierney, R.J., Kelly, G.L., Stylianou, J., Rickinson, A.B., Bell, A.I., 2006. Methylation status of the Epstein-Barr virus (EBV) BamHI W latent cycle promoter and promoter activity: analysis with novel EBV-positive Burkitt and lymphoblastoid cell lines. *J. Virol.* 80, 10700–10711.
- Hutloff, A., Dittrich, A.M., Beier, K.C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., Kroczyk, R.A., 1999. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, 263–266.
- Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., Gotoh, Y., 1997. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* 275, 90–94.
- Ikeda, A., Caldwell, R.G., Longnecker, R., Ikeda, M., 2003. Itchy, a Nedd4 ubiquitin ligase, downregulates latent membrane protein 2A activity in B-cell signaling. *J. Virol.* 77, 5529–5534.
- Im, J.-S., Lee, J.-K., 2008. ATR-dependent activation of p38 MAP kinase is responsible for apoptotic cell death in cells depleted of Cdc7. *J. Biol. Chem.* 283, 25171–25177.
- Incrocci, R., McCormack, M., Swanson-Mungerson, M., 2013. Epstein-Barr virus LMP2A increases IL-10 production in mitogen-stimulated primary B-cells and B-cell lymphomas. *J. Gen. Virol.* 94, 1127–1133.
- Ito, M., Yoshioka, K., Akechi, M., Yamashita, S., Takamatsu, N., Sugiyama, K., Hibi, M., Nakabeppu, Y., Shiba, T., Yamamoto, K.I., 1999. JSAP1, a novel jun N-terminal protein kinase (JNK)-binding protein that functions as a Scaffold factor in the JNK signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7539–7548.
- Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., Minato, N., 2002. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12293–12297.
- Izumi, K.M., Cahir McFarland, E.D., Riley, E.A., Rizzo, D., Chen, Y., Kieff, E., 1999. The residues between the two transformation effector sites of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 are not critical for B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.* 73, 9908–9916.
- Izumi, K.M., Kaye, K.M., Kieff, E.D., 1994. Epstein-Barr virus recombinant molecular genetic analysis of the LMP1 amino-terminal cytoplasmic domain reveals a probable structural role, with no component essential for primary B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.* 68, 4369–4376.
- Jedd, D., Wolchok, M., Ph, D., 2013. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *T H E N E W E N G N J O U R N O F M E C N E*.
- Jiang, W.Q., Szekely, L., Wendel-Hansen, V., Ringertz, N., Klein, G., Rosén, A., 1991. Co-localization of the retinoblastoma protein and the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-5. *Exp. Cell Res.* 197, 314–318.
- Jiang, Y., Gram, H., Zhao, M., New, L., Gu, J., Feng, L., Di Padova, F., Ulevitch, R.J., Han, J., 1997. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J. Biol. Chem.* 272, 30122–30128.
- Jiménez-Ramírez, C., Brooks, A.J., Forshell, L.P., Yakimchuk, K., Zhao, B., Fulgham, T.Z., Sample, C.E., 2006. Epstein-Barr virus EBNA-3C is targeted to and regulates expression from the bidirectional LMP-1/2B promoter. *J. Virol.* 80, 11200–11208.
- Jirmanova, L., Sarma, D.N., Jankovic, D., Mittelstadt, P.R., Ashwell, J.D., 2009. Genetic disruption of p38alpha Tyr323 phosphorylation prevents T-cell receptor-mediated p38alpha activation and impairs interferon-gamma production. *Blood* 113, 2229–2237.

- Johannsen, E., Koh, E., Mosialos, G., Tong, X., Kieff, E., Grossman, S.R., 1995. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivation of the latent membrane protein 1 promoter is mediated by J kappa and PU.1. *J. Virol.* 69, 253–262.
- Johansen, L.M., Deppmann, C.D., Erickson, K.D., Coffin, W.F., 3rd, Thornton, T.M., Humphrey, S.E., Martin, J.M., Taparowsky, E.J., 2003. EBNA2 and activated Notch induce expression of BATF. *J. Virol.* 77, 6029–6040.
- Johansson, P., Jansson, A., Rüetschi, U., Rymo, L., 2010. The p38 signaling pathway upregulates expression of the Epstein-Barr virus LMP1 oncogene. *J. Virol.* 84, 2787–2797.
- Johnson, G.L., Nakamura, K., 2007. The c-jun kinase/stress-activated pathway: regulation, function and role in human disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 1341–1348.
- Johnstone, R.W., Frew, A.J., Smyth, M.J., 2008. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat. Rev. Cancer* 8, 782–798.
- Jones, D.T., Ganeshaguru, K., Virchis, A.E., Folarin, N.I., Lowdell, M.W., Mehta, A.B., Prentice, H.G., Hoffbrand, A.V., Wickremasinghe, R.G., 2001. Caspase 8 activation independent of Fas (CD95/APO-1) signaling may mediate killing of B-chronic lymphocytic leukemia cells by cytotoxic drugs or gamma radiation. *Blood* 98, 2800–2807.
- Jones, E.V., Dickman, M.J., Whitmarsh, A.J., 2007. Regulation of p73-mediated apoptosis by c-Jun N-terminal kinase. *Biochem. J.* 405, 617–623.
- Jones, R.G., Saibil, S.D., Pun, J.M., Elford, A.R., Bonnard, M., Pellegrini, M., Arya, S., Parsons, M.E., Krawczyk, C.M., Gerondakis, S., Yeh, W.-C., Woodgett, J.R., Boothby, M.R., Ohashi, P.S., 2005. NF-kappaB couples protein kinase B/Akt signaling to distinct survival pathways and the regulation of lymphocyte homeostasis in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 175, 3790–3799.
- Jordan, M.A., Wilson, L., 2004. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer* 4, 253–265.
- Jurado, J.O., Alvarez, I.B., Pasquinelli, V., Martínez, G.J., Quiroga, M.F., Abbate, E., Musella, R.M., Chuluyan, H.E., García, V.E., 2008. Programmed death (PD)-1:PD-ligand 1/PD-ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 181, 116–125.
- Kaiser, C., Laux, G., Eick, D., Jochner, N., Bornkamm, G.W., Kempkes, B., 1999. The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J. Virol.* 73, 4481–4484.
- Kamranvar, S.A., Gruhne, B., Szeles, A., Masucci, M.G., 2007. Epstein-Barr virus promotes genomic instability in Burkitt's lymphoma. *Oncogene* 26, 5115–5123.
- Kamranvar, S.A., Masucci, M.G., 2011. The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes telomere dysfunction via induction of oxidative stress. *Leukemia* 25, 1017–1025.
- Kanai, T., Totsuka, T., Uraushihara, K., Makita, S., Nakamura, T., Koganei, K., Fukushima, T., Akiba, H., Yagita, H., Okumura, K., Machida, U., Iwai, H., Azuma, M., Chen, L., Watanabe, M., 2003. Blockade of B7-H1 suppresses the development of chronic intestinal inflammation. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 171, 4156–4163.
- Kang, Y.-H., Yi, M.-J., Kim, M.-J., Park, M.-T., Bae, S., Kang, C.-M., Cho, C.-K., Park, I.-C., Park, M.-J., Rhee, C.H., Hong, S.-I., Chung, H.Y., Lee, Y.-S., Lee, S.-J., 2004. Caspase-independent cell death by arsenic trioxide in human cervical cancer cells: reactive oxygen species-mediated poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation signals apoptosis-inducing factor release from mitochondria. *Cancer Res.* 64, 8960–8967.
- Kasof, G.M., Gomes, B.C., 2001. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member. *J. Biol. Chem.* 276, 3238–3246.

- Kato, K., Yokoyama, A., Tohya, Y., Akashi, H., Nishiyama, Y., Kawaguchi, Y., 2003. Identification of protein kinases responsible for phosphorylation of Epstein–Barr virus nuclear antigen leader protein at serine-35, which regulates its coactivator function. *J. Gen. Virol.* 84, 3381–3392.
- Kaul, R., Verma, S.C., Murakami, M., Lan, K., Choudhuri, T., Robertson, E.S., 2006. Epstein-Barr virus protein can upregulate cyclo-oxygenase-2 expression through association with the suppressor of metastasis Nm23-H1. *J. Virol.* 80, 1321–1331.
- Kaye, K.M., Izumi, K.M., Li, H., Johannsen, E., Davidson, D., Longnecker, R., Kieff, E., 1999. An Epstein-Barr virus that expresses only the first 231 LMP1 amino acids efficiently initiates primary B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.* 73, 10525–10530.
- Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., 2008. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 677–704.
- Keir, M.E., Latchman, Y.E., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., 2005. Programmed death-1 (PD-1):PD-ligand 1 interactions inhibit TCR-mediated positive selection of thymocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 7372–7379.
- Keir, M.E., Liang, S.C., Guleria, I., Latchman, Y.E., Qipo, A., Albacker, L.A., Koulmanda, M., Freeman, G.J., Sayegh, M.H., Sharpe, A.H., 2006. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J. Exp. Med.* 203, 883–895.
- Kelly, G., Bell, A., Rickinson, A., 2002. Epstein-Barr virus-associated Burkitt lymphomagenesis selects for downregulation of the nuclear antigen EBNA2. *Nat. Med.* 8, 1098–1104.
- Kelly, G.L., Milner, A.E., Baldwin, G.S., Bell, A.I., Rickinson, A.B., 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, 14935–14940.
- Kelly, P.N., Strasser, A., 2011. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumourigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ.* 18, 1414–1424.
- Khanna, R., Burrows, S.R., Moss, D.J., 1995. Immune regulation in Epstein-Barr virus-associated diseases. *Microbiol. Rev.* 59, 387–405.
- Kieff, E., 1996. Epstein-Barr virus and its replication, in: *Fields Virology*. pp. 2343–2396.
- Kieser, A., Kaiser, C., Hammerschmidt, W., 1999. LMP1 signal transduction differs substantially from TNF receptor 1 signaling in the molecular functions of TRADD and TRAF2. *EMBO J.* 18, 2511–2521.
- Kim, B.-J., Ryu, S.-W., Song, B.-J., 2006. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* 281, 21256–21265.
- Kim, H.-E., Du, F., Fang, M., Wang, X., 2005. Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17545–17550.
- Kim, H.-E., Jiang, X., Du, F., Wang, X., 2008. PHAPI, CAS, and Hsp70 promote apoptosome formation by preventing Apaf-1 aggregation and enhancing nucleotide exchange on Apaf-1. *Mol. Cell* 30, 239–247.
- Kim, Y.S., Park, G.B., Lee, H.-K., Song, H., Choi, I.-H., Lee, W.J., Hur, D.Y., 2008. Cross-linking of B7-H1 on EBV-transformed B cells induces apoptosis through reactive oxygen species production, JNK signaling activation, and fasL expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 181, 6158–6169.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H., Peter, M.E., 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14, 5579–5588.



- Kitada, S., Andersen, J., Akar, S., Zapata, J.M., Takayama, S., Krajewski, S., Wang, H.G., Zhang, X., Bullrich, F., Croce, C.M., Rai, K., Hines, J., Reed, J.C., 1998. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood* 91, 3379–3389.
- Knight, J.S., Sharma, N., Robertson, E.S., 2005. Epstein-Barr virus latent antigen 3C can mediate the degradation of the retinoblastoma protein through an SCF cellular ubiquitin ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 18562–18566.
- Knutson, J.C., 1990. The level of c-fgr RNA is increased by EBNA-2, an Epstein-Barr virus gene required for B-cell immortalization. *J. Virol.* 64, 2530–2536.
- Korman, A., Chen, B., Wang, C., Wu, L., Cardarelli, P., Selby, M., 2007. Activity of Anti-PD-1 in Murine Tumor Models: Role of “Host” PD-L1 and Synergistic Effect of Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4. *J. Immunol.*
- Krambeck, A.E., Thompson, R.H., Dong, H., Lohse, C.M., Park, E.S., Kuntz, S.M., Leibovich, B.C., Blute, M.L., Cheville, J.C., Kwon, E.D., 2006. B7-H4 expression in renal cell carcinoma and tumor vasculature: associations with cancer progression and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 10391–10396.
- Kroner, A., Mehling, M., Hemmer, B., Rieckmann, P., Toyka, K.V., Mäurer, M., Wiendl, H., 2005. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 58, 50–57.
- Küppers, R., 2003. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 801–812.
- Kuhn, M., Desloges, N., Rahaus, M., Wolff, M.H., 2005. Varicella-zoster virus infection influences expression and organization of actin and alpha-tubulin but does not affect lamin A and vimentin. *Intervirology* 48, 312–320.
- Kulwichit, W., Edwards, R.H., Davenport, E.M., Baskar, J.F., Godfrey, V., Raab-Traub, N., 1998. Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 11963–11968.
- Kumar, S., McDonnell, P.C., Gum, R.J., Hand, A.T., Lee, J.C., Young, P.R., 1997. Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 533–538.
- Kung, C.-P., Raab-Traub, N., 2008. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces expression of the epidermal growth factor receptor through effects on Bcl-3 and STAT3. *J. Virol.* 82, 5486–5493.
- Kuppens, I.E.L.M., 2006. Current state of the art of new tubulin inhibitors in the clinic. *Curr. Clin. Pharmacol.* 1, 57–70.
- Kustermans, G., El Benna, J., Piette, J., Legrand-Poels, S., 2005. Perturbation of actin dynamics induces NF-kappaB activation in myelomonocytic cells through an NADPH oxidase-dependent pathway. *Biochem. J.* 387, 531–540.
- Kyriakis, J.M., Avruch, J., 2001. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* 81, 807–869.
- Labbé, K., Saleh, M., 2008. Cell death in the host response to infection. *Cell Death Differ.* 15, 1339–1349.
- Lai, D., Visser-Grieve, S., Yang, X., 2012. Tumour suppressor genes in chemotherapeutic drug response. *Biosci. Rep.* 32, 361–374.
- Lan, Y.-Y., Wu, S.-Y., Lai, H.-C., Chang, N.-S., Chang, F.-H., Tsai, M.-H., Su, I.-J., Chang, Y., 2013. WW domain-containing oxidoreductase is involved in upregulation of matrix metalloproteinase 9 by Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 436, 672–676.

- Landais, E., Saulquin, X., Scotet, E., Trautmann, L., Peyrat, M.-A., Yates, J.L., Kwok, W.W., Bonneville, M., Houssaint, E., 2004. Direct killing of Epstein-Barr virus (EBV)-infected B cells by CD4 T cells directed against the EBV lytic protein BHRF1. *Blood* 103, 1408–1416.
- Lane, D.P., Crawford, L.V., 1979. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261–263.
- Lang, D.J., Garruto, R.M., Gajdusek, D.C., 1977. Early acquisition of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus antibody in several isolated Melanesian populations. *Am. J. Epidemiol.* 105, 480–487.
- Lanni, J.S., Jacks, T., 1998. Characterization of the p53-Dependent Postmitotic Checkpoint following Spindle Disruption. *Mol. Cell. Biol.* 18, 1055–1064.
- Latchman, Y., Wood, C.R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A.J., Brown, J.A., Nunes, R., Greenfield, E.A., Bourque, K., Boussiotis, V.A., Carter, L.L., Carreno, B.M., Malenkovich, N., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., 2001. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* 2, 261–268.
- Latinis, K.M., Koretzky, G.A., 1996. Fas ligation induces apoptosis and Jun kinase activation independently of CD45 and Lck in human T cells. *Blood* 87, 871–875.
- Laux, G., Perricaudet, M., Farrell, P.J., 1988. A spliced Epstein-Barr virus gene expressed in immortalized lymphocytes is created by circularization of the linear viral genome. *EMBO J.* 7, 769–774.
- Lavrik, I., Golks, A., Krammer, P.H., 2005. Death receptor signaling. *J. Cell Sci.* 118, 265–267.
- Le Clorenec, C., Ouk, T.-S., Youlyouz-Marfak, I., Panteix, S., Martin, C.-C., Rastelli, J., Adriaenssens, E., Zimmer-Strobl, U., Coll, J., Feuillard, J., Jayat-Vignoles, C., 2008. Molecular basis of cytotoxicity of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 (LMP1) in EBV latency III B cells: LMP1 induces type II ligand-independent autoactivation of CD95/Fas with caspase 8-mediated apoptosis. *J. Virol.* 82, 6721–6733.
- Le Clorenec, C., Youlyouz-Marfak, I., Adriaenssens, E., Coll, J., Bornkamm, G.W., Feuillard, J., 2006. EBV latency III immortalization program sensitizes B cells to induction of CD95-mediated apoptosis via LMP1: role of NF-kappaB, STAT1, and p53. *Blood* 107, 2070–2078.
- Lee, D.Y., Sugden, B., 2008. The LMP1 oncogene of EBV activates PERK and the unfolded protein response to drive its own synthesis. *Blood* 111, 2280–2289.
- Lee, M.W., Park, S.C., Yang, Y.G., Yim, S.O., Chae, H.S., Bach, J.H., Lee, H.J., Kim, K.Y., Lee, W.B., Kim, S.S., 2002. The involvement of reactive oxygen species (ROS) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase in TRAIL/Apo2L-induced apoptosis. *FEBS Lett.* 512, 313–318.
- Lei, K., Davis, R.J., 2003. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 2432–2437.
- Leight, E.R., Sugden, B., 2000. EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Rev. Med. Virol.* 10, 83–100.
- Leu, J.I.-J., Dumont, P., Hafey, M., Murphy, M.E., George, D.L., 2004. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat. Cell Biol.* 6, 443–450.
- Levitskaya, Jelena, Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P.M., Klein, G., Kurilla, M.G., Masucci, M.G., 1995. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* 375, 685–688.

- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P.M., Klein, G., Kurilla, M.G., Masucci, M.G., 1995. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* 375, 685–688.
- Li, C., 2013. PD-1 and CTLA-4 Mediated Inhibitory Signaling for T cell Exhaustion during Chronic Viral Infections. *J. Clin. Cell. Immunol.* 01.
- Li, L.Y., Luo, X., Wang, X., 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95–99.
- Li, Y., Mao, Y., Brandt-Rauf, P.W., Williams, A.C., Fine, R.L., 2005. Selective induction of apoptosis in mutant p53 premalignant and malignant cancer cells by PRIMA-1 through the c-Jun-NH2-kinase pathway. *Mol. Cancer Ther.* 4, 901–909.
- Li, Y., Wang, J., Li, C., Ke, X.-Y., 2012. Contribution of PD-L1 to oncogenesis of lymphoma and its RNAi-based targeting therapy. *Leuk. Lymphoma* 53, 2015–2023.
- Li, Z., Jiang, Y., Ulevitch, R.J., Han, J., 1996. The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228, 334–340.
- Liebowitz, D., Kopan, R., Fuchs, E., Sample, J., Kieff, E., 1987. An Epstein-Barr virus transforming protein associates with vimentin in lymphocytes. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2299–2308.
- Ling, L., Goeddel, D.V., 2000. MIP-T3, a novel protein linking tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 to the microtubule network. *J. Biol. Chem.* 275, 23852–23860.
- Ling, P.D., Ryon, J.J., Hayward, S.D., 1993. EBNA-2 of herpesvirus papio diverges significantly from the type A and type B EBNA-2 proteins of Epstein-Barr virus but retains an efficient transactivation domain with a conserved hydrophobic motif. *J. Virol.* 67, 2990–3003.
- Linzer, D.I., Levine, A.J., 1979. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43–52.
- Lippert, J.W., 3rd, 2007. Vascular disrupting agents. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 605–615.
- Liu, G., Chen, X., 2002. The ferredoxin reductase gene is regulated by the p53 family and sensitizes cells to oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene* 21, 7195–7204.
- Liu, J., Hamrouni, A., Wolowiec, D., Coiteux, V., Kuliczowski, K., Hetuin, D., Saudemont, A., Quesnel, B., 2007. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- $\gamma$  and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood* 110, 296–304.
- Lo, A.K.F., To, K.F., Lo, K.W., Lung, R.W.M., Hui, J.W.Y., Liao, G., Hayward, S.D., 2007. Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 16164–16169.
- Longnecker, R., 2000. Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence? *Adv. Cancer Res.* 79, 175–200.
- Loos, M., Giese, N.A., Kleeff, J., Giese, T., Gaida, M.M., Bergmann, F., Laschinger, M., W Böhler, M., Friess, H., 2008. Clinical significance and regulation of the costimulatory molecule B7-H1 in pancreatic cancer. *Cancer Lett.* 268, 98–109.
- Lovell, J.F., Billen, L.P., Bindner, S., Shamas-Din, A., Fradin, C., Leber, B., Andrews, D.W., 2008. Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell* 135, 1074–1084.
- Lu, C., El-Deiry, W.S., 2009. Targeting p53 for enhanced radio- and chemo-sensitivity. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 14, 597–606.

- Lu, C., Shi, Y., Wang, Z., Song, Z., Zhu, M., Cai, Q., Chen, T., 2008. Serum starvation induces H2AX phosphorylation to regulate apoptosis via p38 MAPK pathway. *FEBS Lett.* 582, 2703–2708.
- Luftig, M., Yasui, T., Soni, V., Kang, M.-S., Jacobson, N., Cahir-McFarland, E., Seed, B., Kieff, E., 2004. Epstein-Barr virus latent infection membrane protein 1 TRAF-binding site induces NIK/IKK alpha-dependent noncanonical NF-kappaB activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 141–146.
- Ma, L., Luo, L., Qiao, H., Dong, X., Pan, S., Jiang, H., Krissansen, G.W., Sun, X., 2007. Complete eradication of hepatocellular carcinomas by combined vasostatin gene therapy and B7H3-mediated immunotherapy. *J. Hepatol.* 46, 98–106.
- Mackey, D., Sugden, B., 1999. The linking regions of EBNA1 are essential for its support of replication and transcription. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3349–3359.
- Madesh, M., Antonsson, B., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Hajnóczky, G., 2002. Rapid kinetics of tBid-induced cytochrome c and Smac/DIABLO release and mitochondrial depolarization. *J. Biol. Chem.* 277, 5651–5659.
- Magrath, I., Adde, M., Shad, A., Venzon, D., Seibel, N., Gootenberg, J., Neely, J., Arndt, C., Nieder, M., Jaffe, E., Wittes, R.A., Horak, I.D., 1996. Adults and children with small non-cleaved-cell lymphoma have a similar excellent outcome when treated with the same chemotherapy regimen. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 14, 925–934.
- Mahmood, Z., Shukla, Y., 2010. Death receptors: targets for cancer therapy. *Exp. Cell Res.* 316, 887–899.
- Mainou, B.A., Everly, D.N., Jr, Raab-Traub, N., 2005. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 CTAR1 mediates rodent and human fibroblast transformation through activation of PI3K. *Oncogene* 24, 6917–6924.
- Mainou, B.A., Everly, D.N., Jr, Raab-Traub, N., 2007. Unique signaling properties of CTAR1 in LMP1-mediated transformation. *J. Virol.* 81, 9680–9692.
- Mak, T.W., Shahinian, A., Yoshinaga, S.K., Wakeham, A., Boucher, L.-M., Pintiie, M., Duncan, G., Gajewska, B.U., Gronski, M., Eriksson, U., Odermatt, B., Ho, A., Bouchard, D., Whorisky, J.S., Jordana, M., Ohashi, P.S., Pawson, T., Bladt, F., Tafuri, A., 2003. Costimulation through the inducible costimulator ligand is essential for both T helper and B cell functions in T cell-dependent B cell responses. *Nat. Immunol.* 4, 765–772.
- Markou, T., Dowling, A.A., Kelly, T., Lazou, A., 2009. Regulation of Bcl-2 phosphorylation in response to oxidative stress in cardiac myocytes. *Free Radic. Res.* 43, 809–816.
- Martinez-Rivera, M., Siddik, Z.H., 2012. Resistance and gain-of-resistance phenotypes in cancers harboring wild-type p53. *Biochem. Pharmacol.* 83, 1049–1062.
- Martinvalet, D., Zhu, P., Lieberman, J., 2005. Granzyme A Induces Caspase-Independent Mitochondrial Damage, a Required First Step for Apoptosis. *Immunity* 22, 355–370.
- Matson, D.R., Stukenberg, P.T., 2011. Spindle poisons and cell fate: a tale of two pathways. *Mol. Interv.* 11, 141–150.
- Mc Guire, C., Beyaert, R., van Loo, G., 2011. Death receptor signalling in central nervous system inflammation and demyelination. *Trends Neurosci.* 34, 619–628.
- McDonald, P.H., Chow, C.W., Miller, W.E., Laporte, S.A., Field, M.E., Lin, F.T., Davis, R.J., Lefkowitz, R.J., 2000. Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK3. *Science* 290, 1574–1577.
- McGeoch, D.J., Gatherer, D., Dolan, A., 2005. On phylogenetic relationships among major lineages of the Gammaherpesvirinae. *J. Gen. Virol.* 86, 307–316.

- Meckes, D.G., Jr, Shair, K.H.Y., Marquitz, A.R., Kung, C.-P., Edwards, R.H., Raab-Traub, N., 2010. Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 20370–20375.
- Meckes Jr, D.G., Raab-Traub, N., 2011. Mining Epstein-Barr Virus LMP1 Signaling Networks. *Carcinog. Mutagen.*
- Mei, Y., Yong, J., Liu, H., Shi, Y., Meinkoth, J., Dreyfuss, G., Yang, X., 2010. tRNA binds to cytochrome c and inhibits caspase activation. *Mol. Cell* 37, 668–678.
- Mei, Y., Yuan, Z., Song, B., Li, D., Ma, C., Hu, C., Ching, Y.-P., Li, M., 2008. Activating transcription factor 3 up-regulated by c-Jun NH(2)-terminal kinase/c-Jun contributes to apoptosis induced by potassium deprivation in cerebellar granule neurons. *Neuroscience* 151, 771–779.
- Mekmullica, J., Kritsaneepaiboon, S., Pancharoen, C., 2003. Risk factors for Epstein-Barr virus infection in Thai infants. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 34, 395–397.
- Melamed, I., Stein, L., Roifman, C.M., 1994. Epstein-Barr virus induces actin polymerization in human B cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 153, 1998–2003.
- Melero, I., Grimaldi, A.M., Perez-Gracia, J.L., Ascierto, P.A., 2013. Clinical development of immunostimulatory monoclonal antibodies and opportunities for combination. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 997–1008.
- Messaoudi, S., Tréguier, B., Hamze, A., Provot, O., Peyrat, J.-F., De Losada, J.R., Liu, J.-M., Bignon, J., Wdzieczak-Bakala, J., Thoret, S., Dubois, J., Brion, J.-D., Alami, M., 2009. Isocombretastatins a versus combretastatins a: the forgotten isoCA-4 isomer as a highly promising cytotoxic and antitubulin agent. *J. Med. Chem.* 52, 4538–4542.
- Meyohas, M.C., Maréchal, V., Desire, N., Bouillie, J., Frottier, J., Nicolas, J.C., 1996. Study of mother-to-child Epstein-Barr virus transmission by means of nested PCRs. *J. Virol.* 70, 6816–6819.
- Mihara, M., Erster, S., Zaika, A., Petrenko, O., Chittenden, T., Pancoska, P., Moll, U.M., 2003. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell* 11, 577–590.
- Miller, C.L., Burkhardt, A.L., Lee, J.H., Stealey, B., Longnecker, R., Bolen, J.B., Kieff, E., 1995. Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. *Immunity* 2, 155–166.
- Miller, W.E., Cheshire, J.L., Raab-Traub, N., 1998. Interaction of tumor necrosis factor receptor-associated factor signaling proteins with the latent membrane protein 1 PXQXT motif is essential for induction of epidermal growth factor receptor expression. *Mol. Cell. Biol.* 18, 2835–2844.
- Miller, W.E., Earp, H.S., Raab-Traub, N., 1995. The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces expression of the epidermal growth factor receptor. *J. Virol.* 69, 4390–4398.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., Reed, J.C., 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799–1805.
- Molesworth, S.J., Lake, C.M., Borza, C.M., Turk, S.M., Hutt-Fletcher, L.M., 2000. Epstein-Barr virus gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells. *J. Virol.* 74, 6324–6332.
- Moriguchi, T., Kuroyanagi, N., Yamaguchi, K., Gotoh, Y., Irie, K., Kano, T., Shirakabe, K., Muro, Y., Shibuya, H., Matsumoto, K., Nishida, E., Hagiwara, M., 1996. A novel kinase cascade mediated by mitogen-activated protein kinase kinase 6 and MKK3. *J. Biol. Chem.* 271, 13675–13679.

- Morrison, J.A., Klingelutz, A.J., Raab-Traub, N., 2003. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A activates beta-catenin signaling in epithelial cells. *J. Virol.* 77, 12276–12284.
- Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C., Kieff, E., 1995. The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 80, 389–399.
- Mounier, N., Spina, M., Spano, J.P., 2010. Hodgkin lymphoma in HIV positive patients. *Curr. HIV Res.* 8, 141–146.
- Mühlbauer, M., Fleck, M., Schütz, C., Weiss, T., Froh, M., Blank, C., Schölmerich, J., Hellerbrand, C., 2006. PD-L1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis. *J. Hepatol.* 45, 520–528.
- Mullen, M.M., Haan, K.M., Longnecker, R., Jardetzky, T.S., 2002. Structure of the Epstein-Barr virus gp42 protein bound to the MHC class II receptor HLA-DR1. *Mol. Cell* 9, 375–385.
- Muñoz, N., Davidson, R.J., Witthoff, B., Ericsson, J.E., De-Thé, G., 1978. Infectious mononucleosis and Hodgkin's disease. *Int. J. Cancer* 22, 10–13.
- Murray, P.G., Young, L.S., 2001. Epstein-Barr virus infection: basis of malignancy and potential for therapy. *Expert Rev. Mol. Med.* 3, 1–20.
- Nagata, S., Suda, T., 1995. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol. Today* 16, 39–43.
- Najjar, I., Baran-Marszak, F., Le Clorennec, C., Laguillier, C., Schischmanoff, O., Youlyouz-Marfak, I., Schlee, M., Bornkamm, G.W., Raphaël, M., Feuillard, J., Fagard, R., 2005a. Latent membrane protein 1 regulates STAT1 through NF-kappaB-dependent interferon secretion in Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J. Virol.* 79, 4936–4943.
- Najjar, I., Baran-Marszak, F., Le Clorennec, C., Laguillier, C., Schischmanoff, O., Youlyouz-Marfak, I., Schlee, M., Bornkamm, G.W., Raphaël, M., Feuillard, J., Fagard, R., 2005b. Latent membrane protein 1 regulates STAT1 through NF-kappaB-dependent interferon secretion in Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J. Virol.* 79, 4936–4943.
- Nakagawa, M., Fukata, M., Yamaga, M., Itoh, N., Kaibuchi, K., 2001a. Recruitment and activation of Rac1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites. *J. Cell Sci.* 114, 1829–1838.
- Nakagawa, M., Fukata, M., Yamaga, M., Itoh, N., Kaibuchi, K., 2001b. Recruitment and activation of Rac1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites. *J. Cell Sci.* 114, 1829–1838.
- Nakano, K., Vousden, K.H., 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol. Cell* 7, 683–694.
- Nechushtan, A., Smith, C.L., Lamensdorf, I., Yoon, S.H., Youle, R.J., 2001. Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis. *J. Cell Biol.* 153, 1265–1276.
- New, D.C., Wu, K., Kwok, A.W.S., Wong, Y.H., 2007. G protein-coupled receptor-induced Akt activity in cellular proliferation and apoptosis. *FEBS J.* 274, 6025–6036.
- Nicholson, D.W., 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ.* 6, 1028–1042.
- Nielsen, C., Hansen, D., Husby, S., Jacobsen, B.B., Lillevang, S.T., 2003. Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 62, 492–497.

- Nielsen, C., Lastrup, H., Voss, A., Junker, P., Husby, S., Lillevang, S.T., 2004. A putative regulatory polymorphism in PD-1 is associated with nephropathy in a population-based cohort of systemic lupus erythematosus patients. *Lupus* 13, 510–516.
- Niklinski, J., Claassen, G., Meyers, C., Gregory, M.A., Allegra, C.J., Kaye, F.J., Hann, S.R., Zajac-Kaye, M., 2000. Disruption of Myc-tubulin interaction by hyperphosphorylation of c-Myc during mitosis or by constitutive hyperphosphorylation of mutant c-Myc in Burkitt's lymphoma. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5276–5284.
- Nishimura, H., Agata, Y., Kawasaki, A., Sato, M., Imamura, S., Minato, N., Yagita, H., Nakano, T., Honjo, T., 1996. Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4-CD8-) thymocytes. *Int. Immunol.* 8, 773–780.
- Nishimura, H., Honjo, T., Minato, N., 2000. Facilitation of beta selection and modification of positive selection in the thymus of PD-1-deficient mice. *J. Exp. Med.* 191, 891–898.
- Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., Sasayama, S., Mizoguchi, A., Hiai, H., Minato, N., Honjo, T., 2001. Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science* 291, 319–322.
- Nitsche, F., Bell, A., Rickinson, A., 1997. Epstein-Barr virus leader protein enhances EBNA-2-mediated transactivation of latent membrane protein 1 expression: a role for the W1W2 repeat domain. *J. Virol.* 71, 6619–6628.
- Nomi, T., Sho, M., Akahori, T., Hamada, K., Kubo, A., Kanehiro, H., Nakamura, S., Enomoto, K., Yagita, H., Azuma, M., Nakajima, Y., 2007. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 2151–2157.
- Nonkwelo, C., Ruf, I.K., Sample, J., 1997. The Epstein-Barr virus EBNA-1 promoter Qp requires an initiator-like element. *J. Virol.* 71, 354–361.
- Nurieva, R.I., Duong, J., Kishikawa, H., Dيازاني, U., Rojo, J.M., Ho, I. cheng, Flavell, R.A., Dong, C., 2003. Transcriptional regulation of th2 differentiation by inducible costimulator. *Immunity* 18, 801–811.
- O'Connor, P.M., Jackman, J., Bae, I., Myers, T.G., Fan, S., Mutoh, M., Scudiero, D.A., Monks, A., Sausville, E.A., Weinstein, J.N., Friend, S., Fornace, A.J., Jr, Kohn, K.W., 1997. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res.* 57, 4285–4300.
- Ohsumi, K., Nakagawa, R., Fukuda, Y., Hatanaka, T., Morinaga, Y., Nihei, Y., Ohishi, K., Suga, Y., Akiyama, Y., Tsuji, T., 1998. Novel combretastatin analogues effective against murine solid tumors: design and structure-activity relationships. *J. Med. Chem.* 41, 3022–3032.
- Oleinik, N.V., Krupenko, N.I., Krupenko, S.A., 2007. Cooperation between JNK1 and JNK2 in activation of p53 apoptotic pathway. *Oncogene* 26, 7222–7230.
- Osborne, B., Miele, L., 1999. Notch and the immune system. *Immunity* 11, 653–663.
- Owen, P.J., Johnson, G.D., Lord, J.M., 1996. Protein kinase C-delta associates with vimentin intermediate filaments in differentiated HL60 cells. *Exp. Cell Res.* 225, 366–373.
- Oyama, T., Ichimura, K., Suzuki, R., Suzumiya, J., Ohshima, K., Yatabe, Y., Yokoi, T., Kojima, M., Kamiya, Y., Taji, H., Kagami, Y., Ogura, M., Saito, H., Morishima, Y., Nakamura, S., 2003. Senile EBV+ B-cell lymphoproliferative disorders: a clinicopathologic study of 22 patients. *Am. J. Surg. Pathol.* 27, 16–26.
- Ozören, N., El-Deiry, W.S., 2002. Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia New York N* 4, 551–557.

- P. Rastogi, R., P. Sinha, R. and R., 2009. APOPTOSIS: MOLECULAR MECHANISMS AND PATHOGENICITY. EXCLI J.
- Pandey, P., Saleh, A., Nakazawa, A., Kumar, S., Srinivasula, S.M., Kumar, V., Weichselbaum, R., Nalin, C., Alnemri, E.S., Kufe, D., Kharbanda, S., 2000. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J.* 19, 4310–4322.
- Park, J.-J., Omiya, R., Matsumura, Y., Sakoda, Y., Kuramasu, A., Augustine, M.M., Yao, S., Tsushima, F., Narazaki, H., Anand, S., Liu, Y., Strome, S.E., Chen, L., Tamada, K., 2010. B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance. *Blood* 116, 1291–1298.
- Parker, G.A., Crook, T., Bain, M., Sara, E.A., Farrell, P.J., Allday, M.J., 1996. Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA)3C is an immortalizing oncoprotein with similar properties to adenovirus E1A and papillomavirus E7. *Oncogene* 13, 2541–2549.
- Parker, G.A., Touitou, R., Allday, M.J., 2000. Epstein-Barr virus EBNA3C can disrupt multiple cell cycle checkpoints and induce nuclear division divorced from cytokinesis. *Oncogene* 19, 700–709.
- Patterson, R.L., van Rossum, D.B., Barrow, R.K., Snyder, S.H., 2004. RACK1 binds to inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and mediates Ca<sup>2+</sup> release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2328–2332.
- Paya, C.V., Fung, J.J., Nalesnik, M.A., Kieff, E., Green, M., Gores, G., Habermann, T.M., Wiesner, P.H., Swinnen, J.L., Woodle, E.S., Bromberg, J.S., 1999. Epstein-Barr virus-induced posttransplant lymphoproliferative disorders. ASTS/ASTP EBV-PTLD Task Force and The Mayo Clinic Organized International Consensus Development Meeting. *Transplantation* 68, 1517–1525.
- Pegtel, D.M., Subramanian, A., Sheen, T.-S., Tsai, C.-H., Golub, T.R., Thorley-Lawson, D.A., 2005. Epstein-Barr-virus-encoded LMP2A induces primary epithelial cell migration and invasion: possible role in nasopharyngeal carcinoma metastasis. *J. Virol.* 79, 15430–15442.
- Pentcheva-Hoang, T., Chen, L., Pardoll, D.M., Allison, J.P., 2007. Programmed death-1 concentration at the immunological synapse is determined by ligand affinity and availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 17765–17770.
- Perfettini, J.-L., Castedo, M., Nardacci, R., Ciccocanti, F., Boya, P., Roumier, T., Larochette, N., Piacentini, M., Kroemer, G., 2005. Essential role of p53 phosphorylation by p38 MAPK in apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *J. Exp. Med.* 201, 279–289.
- Petrosillo, G., Ruggiero, F.M., Pistolese, M., Paradies, G., 2004. Ca<sup>2+</sup>-induced reactive oxygen species production promotes cytochrome c release from rat liver mitochondria via mitochondrial permeability transition (MPT)-dependent and MPT-independent mechanisms: role of cardiolipin. *J. Biol. Chem.* 279, 53103–53108.
- Pettit, G.R., Rhodes, M.R., Herald, D.L., Hamel, E., Schmidt, J.M., Pettit, R.K., 2005. Antineoplastic agents. 445. Synthesis and evaluation of structural modifications of (Z)- and (E)-combretastatin A-41. *J. Med. Chem.* 48, 4087–4099.
- Pettit, G.R., Singh, S.B., Boyd, M.R., Hamel, E., Pettit, R.K., Schmidt, J.M., Hogan, F., 1995. Antineoplastic agents. 291. Isolation and synthesis of combretastatins A-4, A-5, and A-6(1a). *J. Med. Chem.* 38, 1666–1672.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grässer, F.A., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., John, B., Enright, A.J., Marks, D., Sander, C., Tuschl, T., 2004. Identification of Virus-Encoded MicroRNAs. *Science* 304, 734–736.
- Pop, C., Salvesen, G.S., 2009. Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J. Biol. Chem.* 284, 21777–21781.



- Porrás, A., Zuluaga, S., Black, E., Valladares, A., Alvarez, A.M., Ambrosino, C., Benito, M., Nebreda, A.R., 2004. p38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. *Mol. Biol. Cell* 15, 922–933.
- Prasad, D.V.R., Richards, S., Mai, X.M., Dong, C., 2003. B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation. *Immunity* 18, 863–873.
- Prokunina, L., Padyukov, L., Bennet, A., de Faire, U., Wiman, B., Prince, J., Alfredsson, L., Klareskog, L., Alarcón-Riquelme, M., 2004. Association of the PD-1.3A allele of the PDCD1 gene in patients with rheumatoid arthritis negative for rheumatoid factor and the shared epitope. *Arthritis Rheum.* 50, 1770–1773.
- Puglielli, M.T., Woisetschlaeger, M., Speck, S.H., 1996. oriP is essential for EBNA gene promoter activity in Epstein-Barr virus-immortalized lymphoblastoid cell lines. *J. Virol.* 70, 5758–5768.
- Pujals, A., Renouf, B., Robert, A., Chelouah, S., Hollville, E., Wiels, J., 2011. Treatment with a BH3 mimetic overcomes the resistance of latency III EBV (+) cells to p53-mediated apoptosis. *Cell Death Dis.* 2, e184.
- Puls, A., Eliopoulos, A.G., Nobes, C.D., Bridges, T., Young, L.S., Hall, A., 1999. Activation of the small GTPase Cdc42 by the inflammatory cytokines TNF(alpha) and IL-1, and by the Epstein-Barr virus transforming protein LMP1. *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 17), 2983–2992.
- Puthalakath, H., Huang, D.C., O'Reilly, L.A., King, S.M., Strasser, A., 1999. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol. Cell* 3, 287–296.
- Puthalakath, H., Strasser, A., 2002. Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ.* 9, 505–512.
- Quignon, F., Rozier, L., Lachages, A.-M., Bieth, A., Simili, M., Debatisse, M., 2006. Sustained mitotic block elicits DNA breaks: one-step alteration of ploidy and chromosome integrity in mammalian cells. *Oncogene* 26, 165–172.
- Raab-Traub, N., Rajadurai, P., Flynn, K., Lanier, A.P., 1991. Epstein-Barr virus infection in carcinoma of the salivary gland. *J. Virol.* 65, 7032–7036.
- Radkov, S.A., Touitou, R., Brehm, A., Rowe, M., West, M., Kouzarides, T., Allday, M.J., 1999. Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3C Interacts with Histone Deacetylase To Repress Transcription. *J. Virol.* 73, 5688–5697.
- Radoja, S., Frey, A.B., Vukmanovic, S., 2006. T-cell receptor signaling events triggering granule exocytosis. *Crit. Rev. Immunol.* 26, 265–290.
- Raingeaud, J., Whitmarsh, A.J., Barrett, T., Dérijard, B., Davis, R.J., 1996. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1247–1255.
- Raman, M., Chen, W., Cobb, M.H., 2007. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 26, 3100–3112.
- Ramsdell, F., Seaman, M.S., Miller, R.E., Picha, K.S., Kennedy, M.K., Lynch, D.H., 1994. Differential ability of Th1 and Th2 T cells to express Fas ligand and to undergo activation-induced cell death. *Int. Immunol.* 6, 1545–1553.
- Rao, R.V., Bredesen, D.E., 2004. Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 653–662.
- Remy, G., Risco, A.M., Iñesta-Vaquera, F.A., González-Terán, B., Sabio, G., Davis, R.J., Cuenda, A., 2010. Differential activation of p38MAPK isoforms by MKK6 and MKK3. *Cell. Signal.* 22, 660–667.

- Renouf, B., Hollville, E., Pujals, A., Tétaud, C., Garibal, J., Wiels, J., 2009. Activation of p53 by MDM2 antagonists has differential apoptotic effects on Epstein-Barr virus (EBV)-positive and EBV-negative Burkitt's lymphoma cells. *Leukemia* 23, 1557–1563.
- Reynoso, E.D., Elpek, K.G., Francisco, L., Bronson, R., Bellemare-Pelletier, A., Sharpe, A.H., Freeman, G.J., Turley, S.J., 2009. Intestinal tolerance is converted to autoimmune enteritis upon PD-1 ligand blockade. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 2102–2112.
- Rezk, S.A., Weiss, L.M., 2007. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Hum. Pathol.* 38, 1293–1304.
- Rickinson, A.B., Moss, D.J., 1997. Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 405–431.
- Riento, K., Ridley, A.J., 2003. ROCKs: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 446–456.
- Robertson, E.S., Lin, J., Kieff, E., 1996. The amino-terminal domains of Epstein-Barr virus nuclear proteins 3A, 3B, and 3C interact with RBPJ(kappa). *J. Virol.* 70, 3068–3074.
- Rosa, M.D., Gottlieb, E., Lerner, M.R., Steitz, J.A., 1981. Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII. *Mol. Cell. Biol.* 1, 785–796.
- Roschewski, M., Wilson, W.H., 2012. EBV-associated lymphomas in adults. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 25, 75–89.
- Rovedo, M., Longnecker, R., 2007. Epstein-barr virus latent membrane protein 2B (LMP2B) modulates LMP2A activity. *J. Virol.* 81, 84–94.
- Sabapathy, K., Hu, Y., Kallunki, T., Schreiber, M., David, J.P., Jochum, W., Wagner, E.F., Karin, M., 1999. JNK2 is required for efficient T-cell activation and apoptosis but not for normal lymphocyte development. *Curr. Biol. CB* 9, 116–125.
- Sabapathy, K., Kallunki, T., David, J.P., Graef, I., Karin, M., Wagner, E.F., 2001. c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)1 and JNK2 have similar and stage-dependent roles in regulating T cell apoptosis and proliferation. *J. Exp. Med.* 193, 317–328.
- Sadler, R.H., Raab-Traub, N., 1995. Structural analyses of the Epstein-Barr virus BamHI A transcripts. *J. Virol.* 69, 1132–1141.
- Saha, A., Robertson, E.S., 2011. Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphomas: pathogenesis and clinical outcomes. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 3056–3063.
- Saito, M., Korsmeyer, S.J., Schlesinger, P.H., 2000. BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat. Cell Biol.* 2, 553–555.
- Sakurai, T., He, G., Matsuzawa, A., Yu, G.-Y., Maeda, S., Hardiman, G., Karin, M., 2008. Hepatocyte necrosis induced by oxidative stress and IL-1 alpha release mediate carcinogen-induced compensatory proliferation and liver tumorigenesis. *Cancer Cell* 14, 156–165.
- Salama, A.D., Chitnis, T., Imitola, J., Ansari, M.J.I., Akiba, H., Tushima, F., Azuma, M., Yagita, H., Sayegh, M.H., Khoury, S.J., 2003. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 198, 71–78.
- Salvador, J.M., Mittelstadt, P.R., Guszczynski, T., Copeland, T.D., Yamaguchi, H., Appella, E., Fornace, A.J., Jr, Ashwell, J.D., 2005. Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. *Nat. Immunol.* 6, 390–395.
- Sample, J., Henson, E.B., Sample, C., 1992. The Epstein-Barr virus nuclear protein 1 promoter active in type I latency is autoregulated. *J. Virol.* 66, 4654–4661.

- Saudemont, A., Jouy, N., Hetuin, D., Quesnel, B., 2005. NK cells that are activated by CXCL10 can kill dormant tumor cells that resist CTL-mediated lysis and can express B7-H1 that stimulates T cells. *Blood* 105, 2428–2435.
- Saurin, A.T., Martin, J.L., Heads, R.J., Foley, C., Mockridge, J.W., Wright, M.J., Wang, Y., Marber, M.S., 2000. The role of differential activation of p38-mitogen-activated protein kinase in preconditioned ventricular myocytes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 14, 2237–2246.
- Sax, J.K., El-Deiry, W.S., 2003. p53 downstream targets and chemosensitivity. *Cell Death Differ.* 10, 413–417.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Peter, M.E., 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17, 1675–1687.
- Schaefer, B.C., Strominger, J.L., Speck, S.H., 1995. Redefining the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-1 gene promoter and transcription initiation site in group I Burkitt lymphoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 10565–10569.
- Scheenstra, R., Verschuuren, E.A.M., de Haan, A., Slooff, M.J.H., The, T.H., Bijleveld, C.M.A., Verkade, H.J., 2004b. The value of prospective monitoring of Epstein-Barr virus DNA in blood samples of pediatric liver transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* 6, 15–22.
- Schiff, P.B., Fant, J., Horwitz, S.B., 1979. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 277, 665–667.
- Schindler, E.M., Hinds, A., Gribben, E.L., Burns, C.J., Yin, Y., Lin, M.-H., Owen, R.J., Longmore, G.D., Kissling, G.E., Arthur, J.S.C., Efimova, T., 2009. p38delta Mitogen-activated protein kinase is essential for skin tumor development in mice. *Cancer Res.* 69, 4648–4655.
- Schinzel, A.C., Takeuchi, O., Huang, Z., Fisher, J.K., Zhou, Z., Rubens, J., Hetz, C., Danial, N.N., Moskowitz, M.A., Korsmeyer, S.J., 2005. Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 12005–12010.
- Schlee, M., Hölzel, M., Bernard, S., Mailhammer, R., Schuhmacher, M., Reschke, J., Eick, D., Marinkovic, D., Wirth, T., Rosenwald, A., Staudt, L.M., Eilers, M., Baran-Marszak, F., Fagard, R., Feuillard, J., Laux, G., Bornkamm, G.W., 2007. C-myc activation impairs the NF-kappaB and the interferon response: implications for the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 120, 1387–1395.
- Schreiner, B., Mitsdoerffer, M., Kieseier, B.C., Chen, L., Hartung, H.-P., Weller, M., Wiendl, H., 2004. Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 155, 172–182.
- Schuler, M., Bossy-Wetzell, E., Goldstein, J.C., Fitzgerald, P., Green, D.R., 2000. p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* 275, 7337–7342.
- Schultheiss, U., Püschner, S., Kremmer, E., Mak, T.W., Engelmann, H., Hammerschmidt, W., Kieser, A., 2001a. TRAF6 is a critical mediator of signal transduction by the viral oncogene latent membrane protein 1. *EMBO J.* 20, 5678–5691.
- Schultheiss, U., Püschner, S., Kremmer, E., Mak, T.W., Engelmann, H., Hammerschmidt, W., Kieser, A., 2001b. TRAF6 is a critical mediator of signal transduction by the viral oncogene latent membrane protein 1. *EMBO J.* 20, 5678–5691.
- Schweitzer, A.N., Sharpe, A.H., 1998. Studies using antigen-presenting cells lacking expression of both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) show distinct requirements for B7

- molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 161, 2762–2771.
- Schwemmle, M., Clemens, M.J., Hilse, K., Pfeifer, K., Tröster, H., Müller, W.E., Bachmann, M., 1992. Localization of Epstein-Barr virus-encoded RNAs EBER-1 and EBER-2 in interphase and mitotic Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10292–10296.
- Scorrano, L., Oakes, S.A., Opferman, J.T., Cheng, E.H., Sorcinelli, M.D., Pozzan, T., Korsmeyer, S.J., 2003. BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>: a control point for apoptosis. *Science* 300, 135–139.
- Seimiya, H., Mashima, T., Toho, M., Tsuruo, T., 1997. c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase-mediated activation of interleukin-1 $\beta$  converting enzyme/CED-3-like protease during anticancer drug-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 272, 4631–4636.
- Seliger, B., Marincola, F.M., Ferrone, S., Abken, H., 2008. The complex role of B7 molecules in tumor immunology. *Trends Mol. Med.* 14, 550–559.
- Sfanos, K.S., Bruno, T.C., Meeker, A.K., De Marzo, A.M., Isaacs, W.B., Drake, C.G., 2009. Human prostate-infiltrating CD8<sup>+</sup> T lymphocytes are oligoclonal and PD-1<sup>+</sup>. *Prostate* 69, 1694–1703.
- Shair, K.H.Y., Bendt, K.M., Edwards, R.H., Bedford, E.C., Nielsen, J.N., Raab-Traub, N., 2007. EBV latent membrane protein 1 activates Akt, NF $\kappa$ B, and Stat3 in B cell lymphomas. *PLoS Pathog.* 3, e166.
- Sharpe, A.H., Freeman, G.J., 2002. The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 116–126.
- Sheppard, K.-A., Fitz, L.J., Lee, J.M., Benander, C., George, J.A., Wooters, J., Qiu, Y., Jussif, J.M., Carter, L.L., Wood, C.R., Chaudhary, D., 2004. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3 $\zeta$  signalosome and downstream signaling to PKC $\theta$ . *FEBS Lett.* 574, 37–41.
- Shi, J.-W., Liu, W., Zhang, T.-T., Wang, S.-C., Lin, X.-L., Li, J., Jia, J.-S., Sheng, H.-F., Yao, Z.-F., Zhao, W.-T., Zhao, Z.-L., Xie, R.-Y., Yang, S., Gao, F., Fan, Q.-R., Zhang, M.-Y., Yue, M., Yuan, J., Gu, W.-W., Yao, K.-T., Xiao, D., 2013. The enforced expression of c-Myc in pig fibroblasts triggers mesenchymal-epithelial transition (MET) via F-actin reorganization and RhoA/Rock pathway inactivation. *Cell Cycle Georget. Tex* 12, 1119–1127.
- Shiio, Y., Donohoe, S., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Eisenman, R.N., 2002. Quantitative proteomic analysis of Myc oncoprotein function. *EMBO J.* 21, 5088–5096.
- Shimizu, N., Tanabe-Tochikura, A., Kuroiwa, Y., Takada, K., 1994. Isolation of Epstein-Barr virus (EBV)-negative cell clones from the EBV-positive Burkitt's lymphoma (BL) line Akata: malignant phenotypes of BL cells are dependent on EBV. *J. Virol.* 68, 6069–6073.
- Shin, Tahiro, Yoshimura, K., Shin, Takako, Crafton, E.B., Tsuchiya, H., Housseau, F., Koseki, H., Schulick, R.D., Chen, L., Pardoll, D.M., 2005. In vivo costimulatory role of B7-DC in tuning T helper cell 1 and cytotoxic T lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* 201, 1531–1541.
- Shire, K., Ceccarelli, D.F., Avolio-Hunter, T.M., Frappier, L., 1999. EBP2, a human protein that interacts with sequences of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 important for plasmid maintenance. *J. Virol.* 73, 2587–2595.
- Shkoda, A., Town, J.A., Griese, J., Romio, M., Sarioglu, H., Knöfel, T., Giehler, F., Kieser, A., 2012. The germinal center kinase TNK1 is required for canonical NF- $\kappa$ B and JNK signaling in B-cells by the EBV oncoprotein LMP1 and the CD40 receptor. *PLoS Biol.* 10, e1001376.

- Shou, Y., Li, L., Prabhakaran, K., Borowitz, J.L., Isom, G.E., 2003. p38 Mitogen-activated protein kinase regulates Bax translocation in cyanide-induced apoptosis. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 75, 99–107.
- Siemann, D.W., Chaplin, D.J., Walicke, P.A., 2009. A review and update of the current status of the vasculature-disabling agent combretastatin-A4 phosphate (CA4P). *Expert Opin. Investig. Drugs* 18, 189–197.
- Sluss, H.K., Barrett, T., Dérijard, B., Davis, R.J., 1994. Signal transduction by tumor necrosis factor mediated by JNK protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* 14, 8376–8384.
- Smith, P.R., de Jesus, O., Turner, D., Hollyoake, M., Karstegl, C.E., Griffin, B.E., Karran, L., Wang, Y., Hayward, S.D., Farrell, P.J., 2000. Structure and coding content of CST (BART) family RNAs of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 74, 3082–3092.
- Song, Y.-J., 2012. ASK1 is Involved in EBV LMP1-induced NF- $\kappa$ B Activation. *J. Bacteriol. Virol.* 2.
- Song, Y.-J., Jen, K.-Y., Soni, V., Kieff, E., Cahir-McFarland, E., 2006. IL-1 receptor-associated kinase 1 is critical for latent membrane protein 1-induced p65/RelA serine 536 phosphorylation and NF-kappaB activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2689–2694.
- Soni, V., Cahir-McFarland, E., Kieff, E., 2007. LMP1 TRAFficking activates growth and survival pathways. *Adv. Exp. Med. Biol.* 597, 173–187.
- Srivastava, R.K., Mi, Q.S., Hardwick, J.M., Longo, D.L., 1999. Deletion of the loop region of Bcl-2 completely blocks paclitaxel-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3775–3780.
- Stein, B., Brady, H., Yang, M.X., Young, D.B., Barbosa, M.S., 1996. Cloning and characterization of MEK6, a novel member of the mitogen-activated protein kinase kinase cascade. *J. Biol. Chem.* 271, 11427–11433.
- Stein, B., Yang, M.X., Young, D.B., Janknecht, R., Hunter, T., Murray, B.W., Barbosa, M.S., 1997. p38-2, a novel mitogen-activated protein kinase with distinct properties. *J. Biol. Chem.* 272, 19509–19517.
- Stephanou, A., Scarabelli, T.M., Brar, B.K., Nakanishi, Y., Matsumura, M., Knight, R.A., Latchman, D.S., 2001. Induction of apoptosis and Fas receptor/Fas ligand expression by ischemia/reperfusion in cardiac myocytes requires serine 727 of the STAT-1 transcription factor but not tyrosine 701. *J. Biol. Chem.* 276, 28340–28347.
- Steven, N.M., Leese, A.M., Annels, N.E., Lee, S.P., Rickinson, A.B., 1996. Epitope focusing in the primary cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus and its relationship to T cell memory. *J. Exp. Med.* 184, 1801–1813.
- Stinchcombe, J., Bossi, G., Griffiths, G.M., 2004. Linking albinism and immunity: the secrets of secretory lysosomes. *Science* 305, 55–59.
- Strobl, L.J., Höfelmayr, H., Marschall, G., Brielmeier, M., Bornkamm, G.W., Zimmer-Strobl, U., 2000. Activated Notch1 modulates gene expression in B cells similarly to Epstein-Barr viral nuclear antigen 2. *J. Virol.* 74, 1727–1735.
- Strowig, T., Brilot, F., Arrey, F., Bougras, G., Thomas, D., Muller, W.A., Münz, C., 2008. Tonsilar NK cells restrict B cell transformation by the Epstein-Barr virus via IFN-gamma. *PLoS Pathog.* 4, e27.
- Sturm, I., Bosanquet, A.G., Hermann, S., Güner, D., Dörken, B., Daniel, P.T., 2003. Mutation of p53 and consecutive selective drug resistance in B-CLL occurs as a consequence of prior DNA-damaging chemotherapy. *Cell Death Differ.* 10, 477–484.
- Suda, T., Okazaki, T., Naito, Y., Yokota, T., Arai, N., Ozaki, S., Nakao, K., Nagata, S., 1995. Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J. Immunol. Baltim. Md* 150, 3806–3813.

- Sugawara, Y., Mizugaki, Y., Uchida, T., Torii, T., Imai, S., Makuuchi, M., Takada, K., 1999. Detection of Epstein-Barr virus (EBV) in hepatocellular carcinoma tissue: a novel EBV latency characterized by the absence of EBV-encoded small RNA expression. *Virology* 256, 196–202.
- Sugiura, M., Imai, S., Tokunaga, M., Koizumi, S., Uchizawa, M., Okamoto, K., Osato, T., 1996. Transcriptional analysis of Epstein-Barr virus gene expression in EBV-positive gastric carcinoma: unique viral latency in the tumour cells. *Br. J. Cancer* 74, 625–631.
- Suh, W.-K., Gajewska, B.U., Okada, H., Gronski, M.A., Bertram, E.M., Dawicki, W., Duncan, G.S., Bukczynski, J., Plyte, S., Elia, A., Wakeham, A., Itie, A., Chung, S., Da Costa, J., Arya, S., Horan, T., Campbell, P., Gaida, K., Ohashi, P.S., Watts, T.H., Yoshinaga, S.K., Bray, M.R., Jordana, M., Mak, T.W., 2003. The B7 family member B7-H3 preferentially down-regulates T helper type 1-mediated immune responses. *Nat. Immunol.* 4, 899–906.
- Sumaya, C.V., Henle, W., Henle, G., Smith, M.H., LeBlanc, D., 1975. Seroepidemiologic study of Epstein-Barr virus infections in a rural community. *J. Infect. Dis.* 131, 403–408.
- Sun, C., Cai, M., Gunasekera, A.H., Meadows, R.P., Wang, H., Chen, J., Zhang, H., Wu, W., Xu, N., Ng, S.C., Fesik, S.W., 1999. NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP. *Nature* 401, 818–822.
- Sun, M., Richards, S., Prasad, D.V.R., Mai, X.M., Rudensky, A., Dong, C., 2002. Characterization of mouse and human B7-H3 genes. *J. Immunol. Baltim. Md* 168, 6294–6297.
- Suzuki, M., Youle, R.J., Tjandra, N., 2000. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 103, 645–654.
- Symons, A., Beinke, S., Ley, S.C., 2006. MAP kinase kinases and innate immunity. *Trends Immunol.* 27, 40–48.
- Szakonyi, G., Klein, M.G., Hannan, J.P., Young, K.A., Ma, R.Z., Asokan, R., Holers, V.M., Chen, X.S., 2006. Structure of the Epstein-Barr virus major envelope glycoprotein. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 996–1001.
- Sznol, M., Chen, L., 2013. Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19, 1021–1034.
- Tait, S.W.G., Green, D.R., 2008. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene* 27, 6452–6461.
- Tait, S.W.G., Green, D.R., 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 621–632.
- Tamura, H., Dan, K., Tamada, K., Nakamura, K., Shioi, Y., Hyodo, H., Wang, S.-D., Dong, H., Chen, L., Ogata, K., 2005. Expression of functional B7-H2 and B7.2 costimulatory molecules and their prognostic implications in de novo acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 5708–5717.
- Tamura, H., Ogata, K., Dong, H., Chen, L., 2003. Immunology of B7-H1 and its roles in human diseases. *Int. J. Hematol.* 78, 321–328.
- Tan, Y., Yu, R., Pezzuto, J.M., 2003. Betulinic acid-induced programmed cell death in human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 9, 2866–2875.
- Tao, Q., Robertson, K.D., Manns, A., Hildesheim, A., Ambinder, R.F., 1998. Epstein-Barr virus (EBV) in endemic Burkitt's lymphoma: molecular analysis of primary tumor tissue. *Blood* 91, 1373–1381.

- Thomas, J.A., Allday, M.J., Crawford, D.H., 1991. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders in immunocompromised individuals. *Adv. Cancer Res.* 57, 329–380.
- Thompson, R.H., Dong, H., Kwon, E.D., 2007. Implications of B7-H1 expression in clear cell carcinoma of the kidney for prognostication and therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 709s–715s.
- Thorley-Lawson, D.A., Gross, A., 2004. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 350, 1328–1337.
- Tian, G., Liu, J., Sui, J., 2009. A patient with huge hepatocellular carcinoma who had a complete clinical response to p53 gene combined with chemotherapy and transcatheter arterial chemoembolization. *Anticancer. Drugs* 20, 403–407.
- Tinel, A., Tschopp, J., 2004. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* 304, 843–846.
- Tomkinson, B., Robertson, E., Kieff, E., 1993. Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.* 67, 2014–2025.
- Tong, X., Drapkin, R., Reinberg, D., Kieff, E., 1995. The 62- and 80-kDa subunits of transcription factor IIIH mediate the interaction with Epstein-Barr virus nuclear protein 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 3259–3263.
- Torcia, M., De Chiara, G., Nencioni, L., Ammendola, S., Labardi, D., Lucibello, M., Rosini, P., Marlier, L.N., Bonini, P., Dello Sbarba, P., Palamara, A.T., Zambrano, N., Russo, T., Garaci, E., Cozzolino, F., 2001. Nerve growth factor inhibits apoptosis in memory B lymphocytes via inactivation of p38 MAPK, prevention of Bcl-2 phosphorylation, and cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* 276, 39027–39036.
- Toutou, R., Hickabottom, M., Parker, G., Crook, T., Allday, M.J., 2001. Physical and Functional Interactions between the Corepressor CtBP and the Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen EBNA3C. *J. Virol.* 75, 7749–7755.
- Tourian, L., Jr, Zhao, H., Srikant, C.B., 2004. p38alpha, but not p38beta, inhibits the phosphorylation and presence of c-FLIPS in DISC to potentiate Fas-mediated caspase-8 activation and type I apoptotic signaling. *J. Cell Sci.* 117, 6459–6471.
- Tourneur, L., Chiochia, G., 2010. FADD: a regulator of life and death. *Trends Immunol.* 31, 260–269.
- Tournier, C., Hess, P., Yang, D.D., Xu, J., Turner, T.K., Nimmual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S.N., Flavell, R.A., Davis, R.J., 2000. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science* 288, 870–874.
- Tournier, C., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Barrett, T., Davis, R.J., 1997. Mitogen-activated protein kinase kinase 7 is an activator of the c-Jun NH2-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 7337–7342.
- Tozer, G.M., Kanthou, C., Parkins, C.S., Hill, S.A., 2002. The biology of the combretastatins as tumour vascular targeting agents. *Int. J. Exp. Pathol.* 83, 21–38.
- Tron, G.C., Pirali, T., Sorba, G., Pagliai, F., Busacca, S., Genazzani, A.A., 2006. Medicinal chemistry of combretastatin A4: present and future directions. *J. Med. Chem.* 49, 3033–3044.
- Tsao, M.-L., Chao, C.-H., Yeh, C.-T., 2006. Interaction of hepatitis C virus F protein with prefoldin 2 perturbs tubulin cytoskeleton organization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348, 271–277.
- Tseng, S.Y., Otsuji, M., Gorski, K., Huang, X., Slansky, J.E., Pai, S.I., Shalabi, A., Shin, T., Pardoll, D.M., Tsuchiya, H., 2001. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J. Exp. Med.* 193, 839–846.

- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., Croce, C.M., 1985. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440–1443.
- Tsujimoto, Y., Yunis, J., Onorato-Showe, L., Erikson, J., Nowell, P.C., Croce, C.M., 1984. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science* 224, 1403–1406.
- Tsukita, S., Oishi, K., Sato, N., Sagara, J., Kawai, A., Tsukita, S., 1994. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J. Cell Biol.* 126, 391–401.
- Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Hattori, S., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Yoshioka, K., Masuyama, N., Gotoh, Y., 2004. JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J.* 23, 1889–1899.
- Turgut, B., Vural, O., Pala, F.S., Pamuk, G.E., Tabakcioğlu, K., Demir, M., Ongören, S., Soysal, T., Algüneş, C., 2007. 17p Deletion is associated with resistance of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells to in vitro fludarabine-induced apoptosis. *Leuk. Lymphoma* 48, 311–320.
- Uchida, J., Yasui, T., Takaoka-Shichijo, Y., Muraoka, M., Kulwichit, W., Raab-Traub, N., Kikutani, H., 1999. Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science* 286, 300–303.
- Usui, Y., Okunuki, Y., Hattori, T., Kezuka, T., Keino, H., Ebihara, N., Sugita, S., Usui, M., Goto, H., Takeuchi, M., 2008. Functional expression of B7H1 on retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 86, 52–59.
- Vakifahmetoglu, H., Olsson, M., Orrenius, S., Zhivotovsky, B., 2006. Functional connection between p53 and caspase-2 is essential for apoptosis induced by DNA damage. *Oncogene* 25, 5683–5692.
- Valderrama, F., Durán, J.M., Babià, T., Barth, H., Renau-Piqueras, J., Egea, G., 2001. Actin microfilaments facilitate the retrograde transport from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum in mammalian cells. *Traffic Cph. Den.* 2, 717–726.
- Valladares, A., Alvarez, A.M., Ventura, J.J., Roncero, C., Benito, M., Porras, A., 2000. p38 mitogen-activated protein kinase mediates tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in rat fetal brown adipocytes. *Endocrinology* 141, 4383–4395.
- Van der Sluijs, P., Neeft, M., van Vlijmen, T., Elstak, E., Wieffer, M., 2008. Methods for analysis of rab27a/Munc13-4 in secretory lysosome release in hematopoietic cells. *Methods Enzymol.* 438, 185–201.
- Varfolomeev, E.E., Ashkenazi, A., 2004. Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell* 116, 491–497.
- Vasey, P.A., Jones, N.A., Jenkins, S., Dive, C., Brown, R., 1996. Cisplatin, camptothecin, and taxol sensitivities of cells with p53-associated multidrug resistance. *Mol. Pharmacol.* 50, 1536–1540.
- Ventura, J.J., Tenbaum, S., Perdiguero, E., Huth, M., Guerra, C., Barbacid, M., Pasparakis, M., Nebreda, A.R., 2007. p38alpha MAP kinase is essential in lung stem and progenitor cell proliferation and differentiation. *Nat. Genet.* 39, 750–758.
- Verheij, M., Bose, R., Lin, X.H., Yao, B., Jarvis, W.D., Grant, S., Birrer, M.J., Szabo, E., Zon, L.I., Kyriakis, J.M., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., Kolesnick, R.N., 1996. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 380, 75–79.
- Verkhatsky, A., Toescu, E.C., 2003. Endoplasmic reticulum Ca(2+) homeostasis and neuronal death. *J. Cell. Mol. Med.* 7, 351–361.
- Vivanco, I., Sawyers, C.L., 2002. The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 489–501.



- Vrzalikova, K., Vockerodt, M., Leonard, S., Bell, A., Wei, W., Schrader, A., Wright, K.L., Kube, D., Rowe, M., Woodman, C.B., Murray, P.G., 2011. Down-regulation of BLIMP1 $\alpha$  by the EBV oncogene, LMP-1, disrupts the plasma cell differentiation program and prevents viral replication in B cells: implications for the pathogenesis of EBV-associated B-cell lymphomas. *Blood* 117, 5907–5917.
- Wajant, H., 2003. Death receptors. *Essays Biochem.* 39, 53–71.
- Walter, J., Schirmacher, V., Mosier, D., 1995. Induction of CD44 expression by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1 is associated with lymphoma dissemination. *Int. J. Cancer* 61, 363–369.
- Wan, J., Sun, L., Mendoza, J.W., Chui, Y.L., Huang, D.P., Chen, Z.J., Suzuki, N., Suzuki, S., Yeh, W.-C., Akira, S., Matsumoto, K., Liu, Z.-G., Wu, Z., 2004. Elucidation of the c-Jun N-terminal kinase pathway mediated by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1. *Mol. Cell. Biol.* 24, 192–199.
- Wang, J.-T., Yang, P.-W., Lee, C.-P., Han, C.-H., Tsai, C.-H., Chen, M.-R., 2005. Detection of Epstein-Barr virus BGLF4 protein kinase in virus replication compartments and virus particles. *J. Gen. Virol.* 86, 3215–3225.
- Wang, L., Qian, J., Lu, Y., Li, H., Bao, H., He, D., Liu, Z., Zheng, Y., He, J., Li, Y., Neelapu, S., Yang, J., Kwak, L.W., Yi, Q., Cai, Z., 2013. Immune evasion evasion of mantle cell lymphoma: expression of B7-H1 leads to inhibited T-cell response to and killing of tumor cells. *Haematologica*.
- Wang, S., Chen, L., 2011a. Immunobiology of cancer therapies targeting CD137 and B7-H1/PD-1 cosignal pathways. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 344, 245–267.
- Wang, S., Chen, L., 2011b. Immunobiology of cancer therapies targeting CD137 and B7-H1/PD-1 cosignal pathways. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 344, 245–267.
- Wang, X.-T., Pei, D.-S., Xu, J., Guan, Q.-H., Sun, Y.-F., Liu, X.-M., Zhang, G.-Y., 2007. Opposing effects of Bad phosphorylation at two distinct sites by Akt1 and JNK1/2 on ischemic brain injury. *Cell. Signal.* 19, 1844–1856.
- Wang, Z.-S., Luo, P., Dai, S.-H., Liu, Z.-B., Zheng, X.-R., Chen, T., 2013. Salvianolic Acid B Induces Apoptosis in Human Glioma U87 Cells Through p38-Mediated ROS Generation. *Cell. Mol. Neurobiol.* 33, 921–928.
- Waterhouse, P., Penninger, J.M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K.P., Thompson, C.B., Griesser, H., Mak, T.W., 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl $\alpha$ -4. *Science* 270, 985–988.
- Webster-Cyriaque, J., Raab-Traub, N., 1998. Transcription of Epstein-Barr virus latent cycle genes in oral hairy leukoplakia. *Virology* 248, 53–65.
- Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J., 2000. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev.* 14, 2060–2071.
- Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B., Korsmeyer, S.J., 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292, 727–730.
- Weiss, L.M., Movahed, L.A., Warnke, R.A., Sklar, J., 1989a. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N. Engl. J. Med.* 320, 502–506.
- Weiss, L.M., Movahed, L.A., Warnke, R.A., Sklar, J., 1989b. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N. Engl. J. Med.* 320, 502–506.

- Westin, J.R., Chu, F., Foglietta, M., 2010. Phase II safety and efficacy study of CT-011, a humanized anti-PD-1 monoclonal antibody, in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma.
- Westwick, J.K., Weitzel, C., Minden, A., Karin, M., Brenner, D.A., 1994. Tumor necrosis factor alpha stimulates AP-1 activity through prolonged activation of the c-Jun kinase. *J. Biol. Chem.* 269, 26396–26401.
- Wherry, E.J., 2011. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* 12, 492–499.
- White, R.E., Rämer, P.C., Naresh, K.N., Meixlsperger, S., Pinaud, L., Rooney, C., Savoldo, B., Coutinho, R., Bödör, C., Gribben, J., Ibrahim, H.A., Bower, M., Nourse, J.P., Gandhi, M.K., Middeldorp, J., Cader, F.Z., Murray, P., Münz, C., Allday, M.J., 2012. EBNA3B-deficient EBV promotes B cell lymphomagenesis in humanized mice and is found in human tumors. *J. Clin. Invest.* 122, 1487–1502.
- Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Tournier, C., Yasuda, J., Davis, R.J., 1998. A Mammalian Scaffold Complex That Selectively Mediates MAP Kinase Activation. *Science* 281, 1671–1674.
- Wilcox, R.A., Frigola Baro, X., 2010. Association of serum B7-H1 level and lymphopenia in diffuse large B-cell non-Hodgkin lymphoma.
- Willis, S.N., Adams, J.M., 2005. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 617–625.
- Wilson, D.J., Fortner, K.A., Lynch, D.H., Mattingly, R.R., Macara, I.G., Posada, J.A., Budd, R.C., 1996. JNK, but not MAPK, activation is associated with Fas-mediated apoptosis in human T cells. *Eur. J. Immunol.* 26, 989–994.
- Wilson, N.S., Dixit, V., Ashkenazi, A., 2009. Death receptor signal transducers: nodes of coordination in immune signaling networks. *Nat. Immunol.* 10, 348–355.
- Wong, B.R., Besser, D., Kim, N., Arron, J.R., Vologodskaya, M., Hanafusa, H., Choi, Y., 1999. TRANCE, a TNF family member, activates Akt/PKB through a signaling complex involving TRAF6 and c-Src. *Mol. Cell* 4, 1041–1049.
- Wu, D.Y., Kalpana, G.V., Goff, S.P., Schubach, W.H., 1996. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 (EBNA2) binds to a component of the human SNF-SWI complex, hSNF5/Ini1. *J. Virol.* 70, 6020–6028.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., Greenberg, M.E., 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270, 1326–1331.
- Xia, Z.-P., Sun, L., Chen, X., Pineda, G., Jiang, X., Adhikari, A., Zeng, W., Chen, Z.J., 2009. Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains. *Nature* 461, 114–119.
- Xie, P., Hostager, B.S., Bishop, G.A., 2004a. Requirement for TRAF3 in signaling by LMP1 but not CD40 in B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 199, 661–671.
- Xie, P., Hostager, B.S., Bishop, G.A., 2004b. Requirement for TRAF3 in signaling by LMP1 but not CD40 in B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 199, 661–671.
- Xie, P., Kraus, Z.J., Stunz, L.L., Bishop, G.A., 2008. Roles of TRAF molecules in B lymphocyte function. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19, 199–207.
- Yagita, H., Hanabuchi, S., Asano, Y., Tamura, T., Nariuchi, H., Okumura, K., 1995. Fas-mediated cytotoxicity--a new immunoregulatory and pathogenic function of Th1 CD4+ T cells. *Immunol. Rev.* 146, 223–239.
- Yakovlev, A.G., Di Giovanni, S., Wang, G., Liu, W., Stoica, B., Faden, A.I., 2004. BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 28367–28374.
- Yamamoto, K., Ichijo, H., Korsmeyer, S.J., 1999. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol. Cell. Biol.* 19, 8469–8478.

- Yamamoto, R., Nishikori, M., Kitawaki, T., Sakai, T., Hishizawa, M., Tashima, M., Kondo, T., Ohmori, K., Kurata, M., Hayashi, T., Uchiyama, T., 2008. PD-1-PD-1 ligand interaction contributes to immunosuppressive microenvironment of Hodgkin lymphoma. *Blood* 111, 3220–3224.
- Yáñez-Mó, M., Barreiro, O., Gordon-Alonso, M., Sala-Valdés, M., Sánchez-Madrid, F., 2009. Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes. *Trends Cell Biol.* 19, 434–446.
- Yang, D.D., Kuan, C.Y., Whitmarsh, A.J., Rincón, M., Zheng, T.S., Davis, R.J., Rakic, P., Flavell, R.A., 1997. Absence of excitotoxicity-induced apoptosis in the hippocampus of mice lacking the *Jnk3* gene. *Nature* 389, 865–870.
- Yao, H., Mi, S., Gong, W., Lin, J., Xu, N., Perrett, S., Xia, B., Wang, J., Feng, Y., 2013. Anti-apoptosis Proteins Mcl-1 and Bcl-xL Have Different p53-Binding Profiles. *Biochemistry (Mosc.)* 52, 6324–6334.
- Yap, T.A., Garrett, M.D., Walton, M.I., Raynaud, F., de Bono, J.S., Workman, P., 2008. Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Curr. Opin. Pharmacol.* 8, 393–412.
- Yasui, T., Luftig, M., Soni, V., Kieff, E., 2004. Latent infection membrane protein transmembrane FWLY is critical for intermolecular interaction, raft localization, and signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 278–283.
- Yin, X.M., Wang, K., Gross, A., Zhao, Y., Zinkel, S., Klocke, B., Roth, K.A., Korsmeyer, S.J., 1999. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 400, 886–891.
- Yokoyama, A., Tanaka, M., Matsuda, G., Kato, K., Kanamori, M., Kawasaki, H., Hirano, H., Kitabayashi, I., Ohki, M., Hirai, K., Kawaguchi, Y., 2001. Identification of major phosphorylation sites of Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein (EBNA-LP): ability of EBNA-LP to induce latent membrane protein 1 cooperatively with EBNA-2 is regulated by phosphorylation. *J. Virol.* 75, 5119–5128.
- Young, L.S., Dawson, C.W., Eliopoulos, A.G., 2000. The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. *Mol. Pathol. MP* 53, 238–247.
- Young, L.S., Rickinson, A.B., 2004. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer* 4, 757–768.
- Yu, J., Zhang, L., 2008. PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene* 27 Suppl 1, S71–83.
- Yue, W., Gershburg, E., Pagano, J.S., 2005. Hyperphosphorylation of EBNA2 by Epstein-Barr Virus Protein Kinase Suppresses Transactivation of the LMP1 Promoter. *J. Virol.* 79, 5880–5885.
- Zanke, B.W., Boudreau, K., Rubie, E., Winnett, E., Tibbles, L.A., Zon, L., Kyriakis, J., Liu, F.F., Woodgett, J.R., 1996. The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. *Curr. Biol. CB* 6, 606–613.
- Zechner, D., Craig, R., Hanford, D.S., McDonough, P.M., Sabbadini, R.A., Glembotski, C.C., 1998. MKK6 activates myocardial cell NF-kappaB and inhibits apoptosis in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 273, 8232–8239.
- Zhang, B., Kracker, S., Yasuda, T., Casola, S., Vanneman, M., Hömig-Hölzel, C., Wang, Z., Derudder, E., Li, S., Chakraborty, T., Cotter, S.E., Koyama, S., Currie, T., Freeman, G.J., Kutok, J.L., Rodig, S.J., Dranoff, G., Rajewsky, K., 2012. Immune surveillance and therapy of lymphomas driven by Epstein-Barr virus protein LMP1 in a mouse model. *Cell* 148, 739–751.
- Zhang, J., Shen, B., Lin, A., 2007. Novel strategies for inhibition of the p38 MAPK pathway. *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 286–295.

- Zhang, L., Hong, K., Zhang, J., Pagano, J.S., 2004. Multiple signal transducers and activators of transcription are induced by EBV LMP-1. *Virology* 323, 141–152.
- Zhang, L., Pagano, J.S., 1997. IRF-7, a new interferon regulatory factor associated with Epstein-Barr virus latency. *Mol. Cell. Biol.* 17, 5748–5757.
- Zhang, L., Pagano, J.S., 1999. Interferon regulatory factor 2 represses the Epstein-Barr virus BamHI Q latency promoter in type III latency. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3216–3223.
- Zhang, Y.-Y., Mei, Z.-Q., Wu, J.-W., Wang, Z.-X., 2008. Enzymatic activity and substrate specificity of mitogen-activated protein kinase p38alpha in different phosphorylation states. *J. Biol. Chem.* 283, 26591–26601.
- Zheng, X., Hu, L., Chen, F., Christensson, B., 1994. Expression of Ki67 antigen, epidermal growth factor receptor and Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein (LMP1) in nasopharyngeal carcinoma. *Eur. J. Cancer. B. Oral Oncol.* 30B, 290–295.
- Zheng, Y., Bagrodia, S., Cerione, R.A., 1994. Activation of phosphoinositide 3-kinase activity by Cdc42Hs binding to p85. *J. Biol. Chem.* 269, 18727–18730.
- Zhu, Y., Yao, S., Iliopoulou, B.P., Han, X., Augustine, M.M., Xu, H., Phennicie, R.T., Flies, S.J., Broadwater, M., Ruff, W., Taube, J.M., Zheng, L., Luo, L., Zhu, G., Chen, J., Chen, L., 2013. B7-H5 costimulates human T cells via CD28H. *Nat. Commun.* 4, 2043.
- Zhuang, S., Demirs, J.T., Kochevar, I.E., 2000. p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 275, 25939–25948.
- Zimber, U., Adldinger, H.K., Lenoir, G.M., Vuillaume, M., Knebel-Doeberitz, M.V., Laux, G., Desgranges, C., Wittmann, P., Freese, U.K., Schneider, U., 1986. Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus. *Virology* 154, 56–66.
- Zimber-Strobl, U., Strobl, L.J., 2001a. EBNA2 and Notch signalling in Epstein-Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes. *Semin. Cancer Biol.* 11, 423–434.
- Zimber-Strobl, U., Strobl, L.J., 2001b. EBNA2 and Notch signalling in Epstein-Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes. *Semin. Cancer Biol.* 11, 423–434.
- Zimber-Strobl, U., Suentzenich, K.O., Laux, G., Eick, D., Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Lenoir, G.M., Bornkamm, G.W., 1991. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 activates transcription of the terminal protein gene. *J. Virol.* 65, 415–423.
- Zong, W.-X., Li, C., Hatzivassiliou, G., Lindsten, T., Yu, Q.-C., Yuan, J., Thompson, C.B., 2003. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J. Cell Biol.* 162, 59–69.
- Zou, W., Chen, L., 2008. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 467–477.
- Zuluaga, S., Alvarez-Barrientos, A., Gutiérrez-Uzquiza, A., Benito, M., Nebreda, A.R., Porras, A., 2007. Negative regulation of Akt activity by p38alpha MAP kinase in cardiomyocytes involves membrane localization of PP2A through interaction with caveolin-1. *Cell. Signal.* 19, 62–74.



## Résumé

L'EBV est le premier virus transformant identifié chez l'homme. Il infecte environ 95% de la population adulte et persiste dans le compartiment B mémoire durant toute la vie de l'individu. Lors de phases de réactivation, les cellules B infectées peuvent entrer en prolifération (latence III). Le virus exprime alors ses propres gènes. Les protéines de latence exprimées conduisent à l'activation de voies de signalisation cellulaires impliquées dans des processus de transformation, de survie et de prolifération mais également d'apoptose. Compte-tenu de de l'ambivalence de voies de signalisation activées, le virus peut jouer sur l'équilibre survie/apoptose de la cellule.

Mon travail de thèse a porté sur deux aspects en lien avec le rôle modulateur de l'EBV sur la réponse des cellules B à l'apoptose : un rôle immuno-modulateur et un rôle pharmaco-modulateur.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la molécule immuno-inhibitrice de la synapse immunologique surexprimée chez les lymphocytes B en latence III de l'EBV, B7-H1. Nous avons pu montrer qu'elle réprime la réponse T/NK et que son expression transcriptionnelle est fortement réprimée par c-Myc (programme de transcription activé par l'EBV). Nous avons également mis en évidence que B7-H1 est stockée dans les lysosomes sécrétoires, dont le nombre et la fusion avec la membrane plasmiques sont augmentés par le programme de latence III de l'EBV, tandis que c-Myc réprime le trafic vésiculaire par dépolymérisation des filaments d'actine et empêche son expression membranaire. La surexpression membranaire de B7-H1 peut contribuer à l'inhibition de la réponse apoptotique T anti-EBV et aux processus de lymphomagenèse.

Dans la seconde partie du travail, nous nous sommes intéressés au traitement par les poisons du fuseau mitotique, en particulier du nouveau dérivé de la famille des combretastatines, l'*isoNH<sub>2</sub>CA-4*. Nous avons pu montrer que l'infection par l'EBV permet de contourner la résistance à l'apoptose de cellules B de lymphome de Burkitt mutées pour p53, lors du traitement par les poisons du fuseau. L'induction de l'apoptose intrinsèque est due à l'activation par l'EBV des voies MAP kinases p38 et JNK. Un inducteur chimique de ces voies, la sphingosine, conduit au même résultat, ce qui permet d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des cellules mutées pour p53.

L'ensemble de mon travail contribue à montrer le rôle complexe et ambivalent de l'EBV sur la balance survie/apoptose des cellules B en programme de latence III.

Mots clés : EBV, Apoptose, B7-H1, immuno-modulation, antimitotiques, MAP kinases, pharmaco-modulation