



HAL
open science

Dualité fonctionnelle de LMP1 : implication dans l'apoptose et la transformation cellulaire

Guillaume Brocqueville

► **To cite this version:**

Guillaume Brocqueville. Dualité fonctionnelle de LMP1 : implication dans l'apoptose et la transformation cellulaire. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2011. Français. NNT : 2011LIL2S030 . tel-00769919

HAL Id: tel-00769919

<https://theses.hal.science/tel-00769919>

Submitted on 4 Jan 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE LILLE 2 – DROIT ET SANTE

Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille – Nord de France

**THESE pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2**
Discipline : ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement par

Guillaume BROCQUEVILLE

Le 28 Septembre 2011

***Dualité fonctionnelle de LMP1 : implication dans l'apoptose et la
transformation cellulaire***

Directeur de thèse : **Pr Eric ADRIAENSSENS**

Jury :

Président

Professeur Yvan de LAUNOIT, DR1 CNRS, CNRS UMR8161, Institut de Biologie de Lille

Rapporteurs

Docteur Henri GRUFFAT, CR1 INSERM, INSERM U758, ENS de Lyon

Professeur Henri AGUT, PU-PH, UPMC ER1, Université de Paris 6

Examineur

Professeur Eric ADRIAENSSENS, PU, CNRS UMR8161, Institut de Biologie de Lille

Je commencerai par remercier et rendre hommage à mon ancien directeur de thèse, le Docteur Jean Coll, qui nous a quittés il y a 3 ans. J'ai réalisé mon Master Recherche et j'ai débuté ma thèse sous sa direction. Je n'oublierai jamais ses longues discussions durant lesquelles il parlait de sciences avec passion. C'était un puits sans fond de connaissances qu'il partageait généreusement. Je tiens à lui adresser un grand merci pour la disponibilité dont il a fait preuve et ses encouragements malgré les difficultés de santé qu'il rencontrait. J'espère que les travaux que j'ai réalisés depuis son départ sont à la hauteur de ce qu'il espérait.

Je tiens à remercier vivement :

Le Professeur Yvan de Launoit pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, m'avoir permis de réaliser ces travaux, et d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Le Professeur Eric Adriaenssens pour avoir succédé à Jean et m'avoir encadré tout au long de ce travail, ainsi que pour sa disponibilité, le partage de ses compétences scientifiques et son soutien.

Le Docteur Henri Gruffat et le Professeur Henri Agut pour avoir accepté d'évaluer ces travaux de thèse.

Le Docteur Véronique Fafeur pour le temps qu'elle a consacré à mes travaux et pour l'intérêt qu'elle a porté aux expériences menées sur ses cellules préférées, ses « petites chéries ».

Tous les membres (actuels ou anciens) de mon équipe d'accueil, au 5^{ème} étage, pour leur gentillesse, leur disponibilité et leurs conseils techniques. Un grand merci à Alioune pour tous les moments partagés au laboratoire et en-dehors ainsi que pour son aide, son soutien et son amitié. Merci à Gautier, Alexandra, Arnaud, Jérôme, Bérénice, Fatima, Nathalie S., Nathalie B, Caroline, Myriam, Cateline et Roland.

Tous les membres de l'ancienne équipe de Jean Coll et de Véronique Pancré (UMR8161, équipe 9, Cancers Viro-induits de l'Institut de Biologie de Lille) : Tan, Anthony, Olivier, Céline, Véronique, Nadira, Arnaud, et les anciens de l'ex-UMR8527 : Isabelle, Claudie, Odile, Stéphanie, Anne, Laurence, et ceux que j'oublie, pour les beaux moments passés ensemble.

Audrey et Franck pour leur amitié et leur soutien.

Toute ma famille et tous mes amis pour leurs encouragements, leur soutien, leur affection et leur présence.

... à tous, un grand MERCI !

Dualité fonctionnelle de LMP1 : implication dans l'apoptose et la transformation cellulaire

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est un herpèsvirus humain qui infecte plus de 90% de la population généralement de façon bénigne et asymptomatique. Cependant, de nombreuses données démontrent que ce virus peut également contribuer à certains processus de cancérisation. En effet, l'EBV est associé à de nombreuses pathologies malignes telles que le lymphome de Burkitt, le lymphome hodgkinien et le carcinome du rhinopharynx. Dans la grande majorité de ces cancers associés à ce virus, l'EBV exprime un programme de latence de type II durant lequel la protéine LMP1 est exprimée. Elle est décrite comme l'oncogène majeur de l'EBV car son expression est nécessaire à la survie et à la prolifération des lignées transformées *in vitro*. Cette protéine membranaire est fonctionnellement apparentée aux membres de la famille des récepteurs du TNF. LMP1 est constitutivement active et son expression conduit à l'activation de voies de signalisation telles que les voies NF- κ B, PI3K/AKT et des MAPK. L'activation de ces voies de signalisation cellulaire confère à LMP1 des propriétés oncogéniques ; cependant, des effets toxiques liés à son expression ont également été décrits. Effectivement, LMP1 est capable d'induire l'apoptose dans différents types cellulaires.

Dans ce contexte, nous avons d'abord développé et caractérisé, des variants dérivés de LMP1 constitués de sa partie C-terminale signalisatrice, complète ou partielle, fusionnée à la protéine GFP. Nous montrons que ces variants sont capables de séquestrer les protéines adaptatrices se fixant à LMP1 ou au récepteur TNFR1, et d'inhiber le signal et les phénotypes induits par ces derniers. Ces protéines à effet dominant négatif peuvent ainsi contrecarrer les effets transformants de LMP1 dans des modèles de latence II et III. Ces dominants négatifs peuvent aussi inhiber l'activation du TNFR1 et les phénotypes qui en découlent.

Puis, nous avons étudié les propriétés de LMP1 en dehors d'un contexte infectieux et son rôle dans la transformation épithéliale. Nous démontrons que LMP1 induit la mort des cellules épithéliales MDCK mais certaines cellules outrepassent ses effets cytotoxiques générant des lignées qui expriment stablement LMP1 et dans lesquelles cet oncogène viral favorise la survie et exacerbe les phénotypes induits par le facteur de croissance HGF/SF. Le caractère ambivalent de LMP1 pourrait limiter le pouvoir oncogène de l'EBV mais en contrepartie favoriser l'émergence de cellules résistantes à l'apoptose et capables de répondre de façon accrue à des facteurs de croissance.

Nos travaux ont permis de mieux comprendre la dualité fonctionnelle de LMP1, d'une part ses effets oncogènes favorisant la survie cellulaire et d'autre part ses propriétés pro-apoptotiques, induites directement ou révélées suite à son inhibition, limitant la tumorigenèse. La caractérisation des mécanismes moléculaires impliquant LMP1 pourrait ainsi participer à la définition de potentielles stratégies thérapeutiques pour le traitement de cancers associés à l'EBV et où LMP1 est exprimée.

Mots clefs : EBV, LMP1, apoptose, survie, transformation, TNF, HGF/SF.

Functional duality of LMP1: involvement in apoptosis and cellular transformation

Epstein-Barr virus (EBV) is a human herpesvirus that infects more than 90% of worldwide population, generally asymptotically. However, numerous studies show that EBV promotes tumorigenesis. Indeed, EBV infection is associated with many human malignancies including Burkitt's lymphoma, Hodgkin's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. In most of these cancers associated with EBV, it expresses latency II program in which the latent membrane protein 1 (LMP1) is expressed. LMP1 is described as the major EBV oncogene because its expression is necessary *in vitro* for survival and proliferation of transformed cell lines. This membrane protein is functionally related to members of the TNF receptors superfamily. LMP1 is constitutively active and its expression leads to activation of NF- κ B, PI3K/AKT and MAPK signaling pathways. These activations confer oncogenic properties to LMP1; however, toxic effects associated with its expression are also described. Indeed, LMP1 can induce cell death in different cell types.

In this context, we first developed and characterized LMP1 derivative variants consisting of its C-terminal signal, complete or partial, fused to GFP. We show that these variants are able to sequester adaptors binding to LMP1 and TNFR1, and inhibit signal and phenotypes induced by them. These proteins have dominant negative effect and may counteract LMP1 transformant properties in latency II cellular models. In addition, these dominant negatives impair TNFR1 signaling and associated phenotypes.

Then, we studied LMP1 properties outside infectious context and its involvement in epithelial transformation. We show that LMP1 induces cell death in MDCK epithelial cells, but some go beyond its cytotoxic effects generating lines stably expressing LMP1 and in which this viral oncogene promotes survival and exacerbates HGF/SF-induced phenotypes. Ambivalent character of LMP1 could limit the oncogenic potential of EBV but in return support the emergence of cells resistant to apoptosis and able to enhance growth factor responses.

Our work allowed us to better understand the functional duality of LMP1 on the one hand its oncogenic effects favoring cell survival and other pro-apoptotic properties, induced directly or reveal by its inhibition, limiting tumorigenesis. Thus, characterization of molecular mechanisms involving LMP1 could participate in the definition of potential therapeutic strategies for treating cancers associated with EBV and where LMP1 is expressed.

Keywords : EBV, LMP1, apoptosis, survival, transformation, TNF, HGF/SF.

Publications dans des revues internationales

Brocqueville G, Ndour PA, Ouk T-S, Le Goff A, De Witte C, Mougel A, Coll J, Fafeur V & Adriaenssens E. The viral oncoprotein LMP1 regulates cell death and cooperates with HGF/SF-MET signaling to induce cell invasive growth. *Manuscrit en préparation*.

Brocqueville G, Ndour PA, Ouk T-S, Goormachtigh G, Morales O, Mougel A, Bertout J, Melnyk O, Fafeur V, Feuillard J, Coll J & Adriaenssens E. Inhibition of the latent membrane protein-1 impairs the growth and tumorigenesis of an EBV-latency II transformed T-cell. *Manuscrit soumis à Journal of Virology (JVI)*.

Ndour PA, Ouk T-S, **Brocqueville G**, Mougel A, Vanhecke E, Feuillard J, Coll J & Adriaenssens E. Inhibition of tumor necrosis factor-induced phenotypes by short intracellular versions of latent membrane protein-1. *Cellular Signalling*, 2010 Feb; 22(2):303-13.

Communications orales (présentées par le premier auteur cité)

Brocqueville G, Ndour PA, Ouk T-S, Goormachtigh G, Mougel A, Adriaenssens E & Coll J. Dualité fonctionnelle de LMP1: une oncoprotéine impliquée dans l'induction d'apoptose. Rencontres du Groupe Francophone des Herpès-virus (GFH), 25 Mars 2008, Institut Pasteur, Paris.

Ndour PA, Ouk T-S, **Brocqueville G**, Goormachtigh G, Mougel A, Adriaenssens E & Coll J. LMP1 et phénotypes associés à sa signalisation. Rencontres du Groupe Francophone des Herpès-Virus (GFH), 25 Mai 2007, Institut Pasteur, Paris.

Ndour PA, Ouk T-S, **Brocqueville G**, Goormachtigh G, Mougel A, Adriaenssens E & Coll J. Cross talk between the latent membrane protein LMP1 encoded by the Epstein-Barr Virus and TNFR in apoptosis signaling. 1er Rencontre Internationale du Réseau Herpès-Virus et Cancer, Mars 2007, Paris.

Coll J, Ouk T-S, Goormachtigh G, Mougel A, Ndour PA, Hurtrelle C, Legros V, **Brocqueville G**, Feuillard J, Fafeur V & Adriaenssens E. Etude croisée de la Signalisation et l'apoptose induites par le TNF et la protéine LMP1 du virus d'Epstein-Barr (EBV). 5^{ème} Rencontres du Groupe Francophone des Herpès-virus (GFH) 19 Avril 2006, Institut Jacques Monod, Paris.

Communications par affiches

Brocqueville G, Ndour PA, Ouk T-S, Feuillard J, Coll J, Fafeur V & Adriaenssens E. Voies de signalisation impliquées dans les effets pro- et anti-apoptotiques de la protéine LMP1 du virus d'Epstein-Barr : rôle dans la transformation et la morphogénèse épithéliale. 3^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, 6-7 Mai 2010, Deauville.

Ndour PA, **Brocqueville G**, Morales O, Mougel A, Bertout J, Coll J & Adriaenssens E. 13^{ème} édition de la Journée ARC Jeunes Chercheurs (JAJC). 22 octobre 2009, Cité Internationale Universitaire de Paris, Paris.

Brocqueville G, Ndour PA, Ouk T-S, Mougel A, Feuillard J, Fafeur V, Coll J & Adriaenssens E. Étude des voies de signalisation impliquées dans les effets pro- et anti-apoptotiques de la protéine LMP1 du virus d'Epstein-Barr. 9^{ème} journée André Verbert, 16 Septembre 2009, Lille.

Ndour PA, **Brocqueville G**, Morales O, Mougel A, Bertout J, Coll J & Adriaenssens E. Development of inhibiting peptides derived from the latent membrane protein 1 (LMP1) encoded by the Epstein-Barr Virus (EBV) presenting anti-proliferative and pro-apoptotic properties. 2nd European Congress of Immunology ECI. 13-16 Septembre 2009, Berlin, Allemagne.

Brocqueville G, Ndour PA, Ouk T-S, Mougel A, Feuillard J, Fafeur V, Coll J & Adriaenssens E. Étude de la mort cellulaire induite par l'oncoprotéine LMP1 du virus d'Epstein-Barr. 2^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, 5-6 Mai 2009, Le Touquet.

Ndour PA, **Brocqueville G**, Ouk T, Goormachtigh G, Mougel A, Feuillard J, Coll J & Adriaenssens E. Développement de peptides anti-tumoraux, inhibiteurs de la protéine LMP1 du Virus d'Epstein-Barr. 2^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, 5-6 Mai 2009, Le Touquet.

Ndour PA, Ouk T-S, **Brocqueville G**, Goormachtigh G, Mougel A, Morales O, Adriaenssens E & Coll J. Development of inhibiting peptides derived from the Latent Membrane Protein 1 (LMP1) encoded by the Epstein-Barr Virus (EBV) presenting anti-proliferative and pro-apoptotic properties. Keystone Symposia « Inflammation, Microenvironnement et Cancer ». 29 Mars - 4 Avril 2008, Snowbird, Utah, Etats-Unis.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
RESUME	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
ABSTRACT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
TRAVAUX SCIENTIFIQUES	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
SOMMAIRE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7
ABREVIATIONS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12
PREAMBULE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19
<u>Partie 1 : Le Virus d'Epstein-Barr</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
I. Historique, taxonomie et données épidémiologiques	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
<i>I.1. Historique</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
<i>I.2. Taxonomie</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21
<i>I.3. Données épidémiologiques</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22
II. Structure du virion et organisation du génome viral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22
<i>II.1. Structure du virion</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	22
<i>II.2. Organisation du génome viral</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23
II.2.1. Description du génome viral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	23
II.2.2. La carte de restriction du génome viral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24
II.2.3. Polymorphismes de l'EBV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24
III. Le cycle viral	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25
<i>III.1. La latence virale</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25
III.1.1. Les différents programmes de latence	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26
III.1.2. Les produits des gènes de latence	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27
<i>III.1.2.1. Les Antigènes Nucléaires du virus d'Epstein-Barr (EBNA)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	27
<u>III.1.2.1.1. EBNA1</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28
<u>III.1.2.1.2. EBNA2</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29
<u>III.1.2.1.3. EBNA3 (3A, 3B et 3C)</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30
<u>III.1.2.1.4. EBNA-LP</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31
<i>III.1.2.2. Les protéines membranaires de latence (LMP)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31
<u>III.1.2.2.1. LMP1</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	31
<u>III.1.2.2.2. LMP2 (2A et 2B)</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	32
<i>III.1.2.3. Les ARN viraux EBER et BART</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33
<i>III.2. Le cycle lytique</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	34

<u>Partie 2 : Physiopathologie de l'infection par le virus d'Epstein-Barr</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	36
I. Cellules cibles du virus d'Epstein-Barr	-	-	-	-	-	-	-	-	36
<i>I.1. Cellules cibles conventionnelles</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	36
I.1.1. Les lymphocytes B	-	-	-	-	-	-	-	-	36
I.1.2. Les cellules épithéliales	-	-	-	-	-	-	-	-	36
<i>I.2. Cellules cibles non conventionnelles</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	38
I.2.1. Les lymphocytes T	-	-	-	-	-	-	-	-	38
I.2.2. Les cellules NK (Natural Killer)	-	-	-	-	-	-	-	-	38
I.2.3. Les monocytes	-	-	-	-	-	-	-	-	39
II. Infection par l'EBV	-	-	-	-	-	-	-	-	39
<i>II.1. Infection in vitro</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	39
<i>II.2. Infection in vivo</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	40
II.2.1. Déroulement de l'infection dans l'organisme	-	-	-	-	-	-	-	-	40
II.2.2. Contrôle de l'infection virale	-	-	-	-	-	-	-	-	42
III. Pathologies associées au virus d'Epstein-Barr	-	-	-	-	-	-	-	-	42
<i>III.1. Pathologies chez l'individu immunocompétent</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	42
III.1.1. La Mononucléose Infectieuse (MNI)	-	-	-	-	-	-	-	-	42
III.1.2. Le Lymphome de Burkitt (LB)	-	-	-	-	-	-	-	-	43
III.1.3. Le Lymphome de Hodgkin (LH)	-	-	-	-	-	-	-	-	43
III.1.4. Le Carcinome indifférencié du Rhinopharynx (CRP)	-	-	-	-	-	-	-	-	43
III.1.5. Autres cancers	-	-	-	-	-	-	-	-	43
<i>III.2. Pathologies chez l'individu immunodéprimé</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	44
III.2.1. Désordres Lymphoprolifératifs Post-Transplantation (PTLD)	-	-	-	-	-	-	-	-	44
III.2.2. Pathologies chez les patients atteints du SIDA	-	-	-	-	-	-	-	-	44
<i>III.2.2.1. Leucoplasie chevelue de la langue</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	44
<i>III.2.2.2. Lymphomes associés à l'EBV</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	44
III.2.3. Leiomyosarcomes liés à l'immunodéficience	-	-	-	-	-	-	-	-	44
III.2.4. Le syndrome de Purtilo	-	-	-	-	-	-	-	-	45
<i>III.3. Pathologies auto-immunes</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	45
<u>Partie 3 : La protéine LMP1</u>	-	-	-	-	-	-	-	-	46
I. Régulation de l'expression de LMP1	-	-	-	-	-	-	-	-	46
<i>I.1. Promoteurs contrôlant l'expression de LMP1</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	46
<i>I.2. Transactivation du promoteur ED-L1 (pLMP1)</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	47
I.2.1. Transactivation par EBNA2	-	-	-	-	-	-	-	-	48
I.2.2. Autres transactivateurs du promoteur pLMP1	-	-	-	-	-	-	-	-	49
II. Structure, métabolisme et localisation subcellulaire	-	-	-	-	-	-	-	-	49
<i>II.1. Structure</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	49

II.2. Modifications post-traductionnelles	-	-	-	-	-	-	-	-	-	51
II.3. Dégradation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	51
II.4. Localisation subcellulaire	-	-	-	-	-	-	-	-	-	52
III. La forme lytique de la protéine LMP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	52
IV. Mécanisme d'action de la protéine LMP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	53
IV.1. Signalisation de LMP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	53
IV.1.1. Agrégation constitutive au niveau de la membrane plasmique	-	-	-	-	-	-	-	-	-	53
IV.1.2. Recrutement des adaptateurs proximaux	-	-	-	-	-	-	-	-	-	54
IV.1.2.1. Au niveau de CTAR1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	54
IV.1.2.2. Au niveau de CTAR2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	55
IV.1.2.3. Le cas de CTAR3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	56
IV.1.3. Les adaptateurs distaux : les médiateurs du signal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	56
IV.1.3.1. TRAF6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	57
IV.1.3.2. NIK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	57
IV.1.3.3. Le complexe TAK1-TAB1-TAB2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	57
IV.1.3.4. IRAK1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	57
IV.2. Voies de signalisation induites par LMP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	58
IV.2.1. La voie NF-κB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	58
IV.2.2. Les voies des MAP Kinases	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60
IV.2.2.1. La voie JNK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60
IV.2.2.2. La voie p38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	60
IV.2.2.3. La voie ERK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61
IV.2.3. La voie PI3 kinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	61
IV.2.4. La voie JAK/STAT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	62
IV.3. Propriétés de la protéine LMP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	62
IV.3.1. Régulation de la prolifération et la différenciation cellulaire	-	-	-	-	-	-	-	-	-	63
IV.3.2. Induction d'altérations phénotypiques	-	-	-	-	-	-	-	-	-	63
IV.3.3. Modulation de la production de cytokines	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64
IV.3.4. Contribution de LMP1 dans le pouvoir métastatique des cellules	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64
IV.3.5. Propriétés cytotostatiques et cytotoxiques de LMP1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	65
IV.3.6. Rôle de LMP1 dans des processus d'apoptose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	65
OBJECTIFS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	67
RESULTATS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70
Article 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	71
Présentation de l'article 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	72
Article 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	85

<i>Présentation de l'article 2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	86
Article 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	105
<i>Présentation de l'article 3</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	106
<i>Résultats complémentaires</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	128
I. Présentation des données supplémentaires	-	-	-	-	-	-	-	-	-	128
II. Matériels et méthodes supplémentaires	-	-	-	-	-	-	-	-	-	128
III. Résultats et discussion supplémentaires	-	-	-	-	-	-	-	-	-	133
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	-	-	-	-	-	-	-	-	-	144
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	-	-	-	-	-	-	-	-	-	152

ABBREVIATIONS

A

ADN (DNA) : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AML1 : Acute myeloid leukemia 1
AP : Activator protein
ARN (RNA) : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ATF : Activating transcription factor

B

BAFF-R : B cell-activation factor receptor
BART : BamHI A rightward transcripts
Bcl-2 : B cell lymphoma 2
BCR : B cell receptor

C

CAEBV : Chronic active Epstein-Barr virus infection
Caspase : Cysteinyll aspartate-specific protease
CBF1 : C promotor binding factor 1
CBP : CREB binding protein
CCC : Covalently closed circle
CD : Cluster of differentiation
cIAP : Cellular inhibitor of apoptosis
CK : Casein kinase
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CRP (NPC) : Carcinome du rhinopharynx
COX2 : Cyclooxygenase 2
CR : Complement component receptor
CRE : Cyclic AMP response element
CREB : CRE-binding protein
CT : C-terminal
CTAR : C-terminal activating region

D

DD : Death domain
DLBCL : Diffuse large B-cell lymphoma
DN : Dominant négatif

E

EG : Early gene
EBER : EBV-encoded RNA
EBNA : EBV nuclear antigen
EBV : Epstein-Barr virus
ED-L1 : EcoRI D fragment-located LMP1 promoter (pLMP1)
EGFR : Epidermal growth factor receptor
eIF : Eukaryotic initiation factor
EMT : Epithelial-mesenchymal transition
ERK : Extracellular regulated kinase

F

FADD : Fas-associated death domain protein
FGF : Fibroblast growth factor

G

GFP : Green fluorescent protein
gp : Glycoprotéine

H

HAT : Histone acetyltransferase
HCMV : Human Cytomegalovirus
HDAC : Histone deacetylase
HGF/SF : Hepatocyte growth factor/scatter factor
HHV : Human Herpesvirus
HIF1 α : Hypoxia-inducible factor 1 alpha
HSV : Human Simplex Virus

I

ICAM : Intercellular adhesion molecule
Id : Inhibitor of differentiation
IEG : Immediate early gene
IFN : Interferon
IFNAR : Interferon alpha receptor
IFNGR : Interferon gamma receptor

Ig : Immunoglobuline

IκB : Inhibitor of NF-κB

IKK : IκB kinase

IL : Interleukine

IR : Internal repeat

IRAK : IL-1 receptor-associated kinase

IRF : Interferon regulatory factor

ISRE : Interferon-stimulated response element

ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif

J

JAK : Janus kinase

JNK : c-Jun amino-terminal kinase

K

kpb : kilo-paire de bases

KSHV : Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus

L

L : Leftward

LB (BL) : Lymphome de Burkitt

LCL : Lignée cellulaire lymphoblastoïde

LEEP-CAM : Lymphocyte endothelial epithelial cell adhesion molecule

LFA : Lymphocyte function-associated antigen

LG : Late gene

LH : Lymphome de Hodgkin

LMP : Latent membrane protein

LNH : Lymphome non-hodgkinien

LR : Linking region

LSE : Lupus systémique érythémateux

LTβR : Lymphotoxin-beta receptor

LTC : Lymphocyte T cytotoxique

lyLMP1 : Lytic LMP1

M

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MDCK : Madin-Darby Canine Kidney

miARN : micro ARN

MMP : Matrix metalloproteinase

MNI : Mononucléose infectieuse

N

NEMO : NF- κB essential modulator

NF-κB : Nuclear factor kappa immunoglobulin enhancer binding protein

NIK : NF-κB inducing kinase

NK : Natural killer

NLS : Nuclear localization signal

NPC : Nasopharyngeal carcinoma

NT : N-terminal

O

ORF : Open reading frame

oriLyt : Lytic replication origin

oriP : Plasmidic replication origin

P

PARP : Poly(ADP-ribose) polymerase

PCAF : p300-CBP-associated factor

PCNSL : Primary central nervous system lymphoma

PEL : Primary effusion lymphoma

PERK : Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase

PI3K : Phosphatidylinositol 3 kinase

pRb : protéine du rétinoblastome

PTLD : Post-transplant lymphoproliferative disorder

PUMA : p53 up-regulated modulator of apoptosis

R

R : Rightward
RA : Rheumatoid Arthritis
RBP-Jκ : Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region
RECK : Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs
RIP : Receptor interacting protein
RON : Récepteur d'origine nantais
RS : Reed-Sternberg
Rta : R transactivator

S

SAP : SLAM-associated protein
SAPK : Stress-activated protein kinase
SIDA : Syndrome de l'immunodéficience acquise
SLAM : Signaling lymphocyte activation molecule
SSp : Syndrome de Sjögren primitif
STAT : Signal transducers and activators of transcription

T

TAB : TAK1-binding protein
TAD : Transcriptional activation domain
TAK : Transforming growth factor-activated kinase
TAP : Transporter-associated with antigen processing
TES : Transformation effector site
TGF : Tumor growth factor

TM : Transmembranaire
TNF : Tumor necrosis factor
TNFR : Tumor necrosis factor receptor
TR : Terminal repeat
TR-L1 : Terminal repeat-located LMP1 promoter (promoteur distal)
TRADD : TNF receptor-associated death domain protein
TRAF : TNF receptor-associated factor
TYK2 : Tyrosine kinase 2

U

U_L : Long unique region
uPA : Urokinase-type plasminogen activator
UPR : Unfolded protein response
U_S : Short unique region

V

VEGF : Vascular endothelial growth factor
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
VZV : Varicella-Zoster virus

X

XLP : X-linked lymphoproliferative syndrome

Z

Zta/ZEBRA : Z transactivator/Z Epstein-Barr replication activator

PREAMBULE

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est un gammaherpèsvirus humain qui infecte, généralement de façon asymptomatique, plus de 90% de la population. Cependant, ce virus est associé à de nombreuses pathologies malignes telles que des lymphomes T, les lymphomes hodgkiniens, des carcinomes gastriques et les carcinomes du rhinopharynx. Dans la majorité des cancers associés à ce virus, il exprime un programme de latence de type II durant lequel la protéine LMP1 (latent membrane protein 1) est exprimée. Elle est décrite comme l'oncogène majeur de l'EBV, et fait l'objet d'études pour le développement d'approches thérapeutiques. La plupart des connaissances actuelles sur le virus ont été mises en évidence dans des lymphocytes B infectés et immortalisés par l'EBV présentant un programme de latence virale de type III.

Notre groupe s'est spécialisé depuis quelques années dans l'étude du mécanisme d'action de la protéine LMP1 et son rôle dans la pathogénèse liée à l'EBV. Notre laboratoire est d'ailleurs le premier à avoir établi *in vitro*, des lignées cellulaires lymphocytaires et monocytaires, infectées et transformées par l'EBV et dans lesquelles il exprime un programme de latence de type II. De plus, nous avons développé des variants de LMP1 constitués de sa partie C-terminale, complète ou partielle, fusionnée à la GFP. Le premier variant caractérisé au laboratoire est le LMP1-CT. Il a un effet dominant négatif sur la signalisation de LMP1 et du TNFR1 grâce à sa capacité de dépléter spécifiquement le set d'adaptateur nécessaire à la transduction de leur signal (Adriaenssens *et al.*, 2004). Par la suite il a également permis de montrer l'existence d'une boucle d'auto-régulation de LMP1 dans les latences de type II à travers les voies de signalisation NF- κ B et JNK (Goormachtigh *et al.*, 2006).

Ma thèse porte sur LMP1, l'oncogène majeur de l'EBV. Cette protéine membranaire est fonctionnellement mais non structurellement apparentée aux membres de la superfamille des récepteurs au tumor necrosis factor (TNF). Contrairement à ces derniers, LMP1 est constitutivement active. L'expression du gène codant LMP1 conduit au détournement des adaptateurs cellulaires TRADD, RIP et des TRAF, suivi par l'activation de nombreuses voies de signalisation cellulaire telles que la voie NF- κ B, la voie PI3K/AKT et la voie des MAPK.

Dans la première partie de ma thèse, j'ai participé à la caractérisation de différents outils développés au laboratoire. Nous avons montré que les variants dérivés de LMP1, constitués de la GFP et d'une région C-terminale cytoplasmique de LMP1, ont des effets inhibiteurs sur la signalisation de LMP1 et du TNFR1 ainsi que sur les phénotypes qui leur sont associés. Nous

démonstrons également que l'expression de ces protéines à effet dominant négatif (DN) dans nos modèles de latence de type II induit l'apoptose. De plus, l'utilisation de peptides synthétiques, également dérivés de la région C-terminale de LMP1, mais capables de pénétrer dans les cellules de façon autonome, nous ont donné les mêmes résultats que ceux obtenus avec nos protéines de fusion dans nos modèles de latence II.

Dans la deuxième partie de ma thèse, je me suis intéressé au caractère ambivalent de LMP1 dans un modèle de cellule épithéliale. Bien que la protéine LMP1 soit classiquement considérée comme l'oncogène majeur de l'EBV de par ses propriétés prolifératives et anti-apoptotiques, différentes études confèrent des propriétés cytotoxiques à LMP1. En effet, LMP1 est capable de sensibiliser des cellules épithéliales à l'apoptose induite par des drogues de chimiothérapies mais également d'induire directement l'apoptose dans des lymphocytes B infectés et transformés par l'EBV. Dans notre modèle cellulaire, la lignée épithéliale MDCK, nous montrons que la surexpression transitoire de LMP1 se traduit par une mort cellulaire. Par contre, l'expression stable de LMP1 dans ces mêmes cellules les protège d'une apoptose induite par des stress et accentue les phénotypes induits par le facteur de croissance HGF.

Dans la partie introductive de ce mémoire, je réaliserai une présentation du virus d'Epstein-Barr et de sa physiopathologie, puis je présenterai la protéine LMP1, décrite comme l'oncogène majeur de ce virus.

La présentation des résultats obtenus au cours de la thèse et leur discussion se fera en deux parties. La première partie concerne la caractérisation et l'utilisation d'outils développés au laboratoire permettant d'inhiber spécifiquement la signalisation de LMP1 et celle du TNFR1. Cette partie correspond à l'article publié dans *Cellular Signalling* en 2010 par Ndour *et al.* et l'article soumis dans *Journal of Virology* par Brocqueville *et al.* La seconde partie regroupe les résultats sur le caractère ambivalent de LMP1 dans la lignée cellulaire épithéliale MDCK présents dans un manuscrit en préparation et quelques travaux supplémentaires non retenus pour la version finale de l'article. Enfin, une conclusion générale et quelques perspectives terminent ce mémoire.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Partie 1 : Le Virus d'Epstein-Barr

I. Historique, taxonomie et données épidémiologiques

I.1. Historique

En 1958, Denis Burkitt, un chirurgien britannique travaillant en Ouganda, décrit les caractéristiques cliniques et épidémiologiques d'une tumeur du maxillaire supérieur survenant chez des enfants d'Afrique de l'Est et en rapport avec une prolifération de lymphocytes B (Burkitt, 1958). La distribution géographique de ce lymphome, appelé lymphome de Burkitt (LB) et les conditions climatiques associées suggèrent qu'un agent infectieux pourrait en être responsable (Burkitt, 1962).

En 1961, suite à une conférence de Denis Burkitt à Londres, Michael Anthony Epstein décida de rechercher cet agent infectieux sur des biopsies de tumeurs issues de ce lymphome. Après 3 ans de recherches infructueuses, M.A. Epstein et Yvonne M. Barr établirent des lignées cellulaires *in vitro* issues de tumeurs de Burkitt (Epstein & Barr, 1964). En observant par microscopie électronique ces lignées, M.A. Epstein, Y.M. Barr et Bert G. Achong identifièrent des particules virales morphologiquement apparentées aux herpèsvirus (**figure 1** ; Epstein *et al.*, 1964) et nommées virus d'Epstein-Barr (EBV).

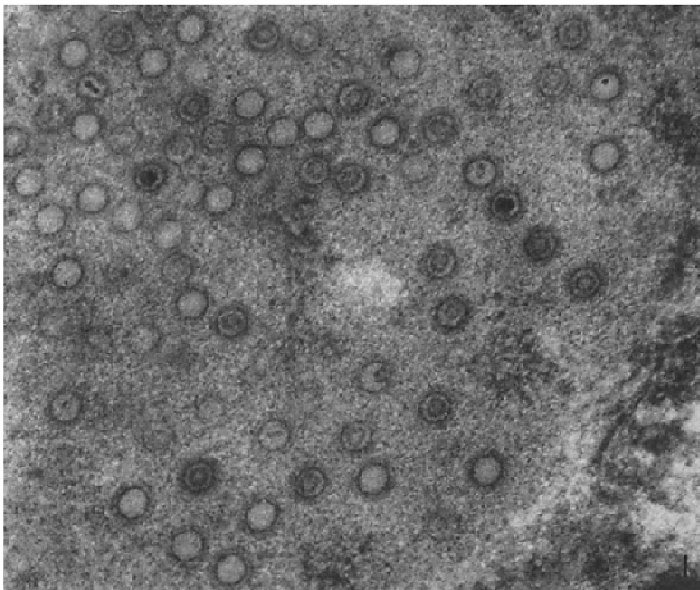


Figure 1 : Particules virales trouvées dans des lignées dérivées de lymphome de Burkitt.
(D'après Epstein *et al.*, 1965)

Afin d'identifier les patients risquant de développer un lymphome de Burkitt, Gertrude et Werner Henle élaborèrent un test sérologique. En 1968, des études séro-épidémiologiques montrèrent que la grande majorité de la population adulte possède des anticorps dirigés contre l'EBV et que ce virus est l'agent étiologique de la mononucléose infectieuse (MNI) (Henle *et al.*, 1968). A la même période, le génome viral est détecté dans les cellules malignes de LB et de carcinomes du rhinopharynx (CRP), confirmant l'association de ce virus à des cancers chez

l'homme (Henle & Henle, 1970 ; zur Hausen *et al.*, 1970). Les capacités de l'EBV de transformer *in vitro* des lymphocytes B (Pope *et al.*, 1968) et d'induire des lymphomes chez les primates non humains (Miller *et al.*, 1977) sont alors démontrées et confortent l'hypothèse selon laquelle l'EBV est un agent oncogène chez l'homme. En 1975, l'équipe de Tomas Lindahl est la première à décrire la présence de l'EBV dans les lymphocytes B sous forme d'épisome et sa liaison à la chromatine (Adams & Lindahl, 1975).

Durant les années 80, l'implication de l'EBV est prouvée dans de nombreuses pathologies malignes, outre le LB et le CRP, telles que le lymphome de Hodgkin (LH), des lymphomes T, des lymphoproliférations suite à une immunodéficience et des cancers gastriques. En 1984, l'EBV est le premier herpèsvirus humain dont le génome est entièrement séquencé (Baer *et al.*, 1984).

1.2. Taxonomie

L'EBV appartient à la famille des *Herpesviridae*. Cette famille est divisée en trois sous-familles : les *Alphaherpesvirinae*, les *Betaherpesvirinae* et les *Gammapherpesvirinae* (**figure 2**). A ce jour, 8 membres de cette famille sont connus pour infecter l'homme. Ces herpèsvirus humains ou HHV (Human Herpesvirus) présentent une étroite communauté de structure qui porte sur quatre éléments : un génome à ADN double brin linéaire, une capsidie icosaédrique à 162 capsomères, une structure protéique fibrillaire formant le tégument et une enveloppe dérivée des membranes nucléaires et plasmiques portant des glycoprotéines virales.

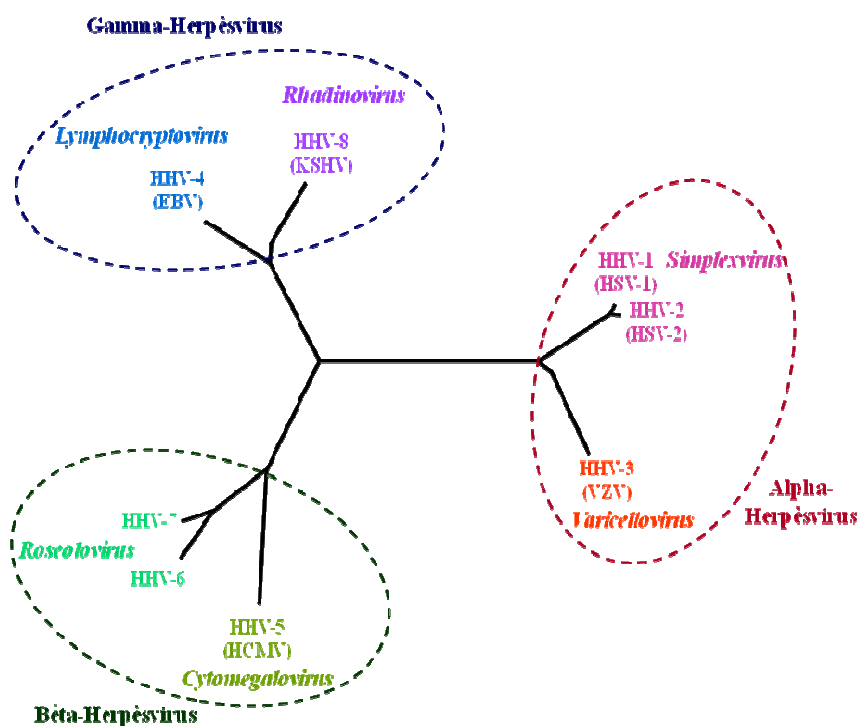


Figure 2 : Arbre phylogénétique des Herpèsvirus humain. Chaque virus possède un nom standard (HHV-n) et un nom usuel. HHV : Human Herpesvirus ; HSV : Herpes Simplex Virus ; VZV : Varicella-Zoster Virus, HCMV : Human Cytomegalovirus ; EBV : Epstein-Barr Virus ; KSHV : Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus. (D'après Longnecker & Neipel, 2007).

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

I.3. Données épidémiologiques

L'infection par l'EBV est ubiquitaire. Plus de 90% de la population mondiale possèdent des anticorps dirigés contre ce virus. La primo-infection survient généralement tôt dans l'enfance et est asymptomatique. L'EBV est l'agent étiologique de la MNI (Niederman *et al.*, 1968), maladie bénigne qui peut se manifester lors d'une primo-infection chez l'adolescent ou le jeune adulte. Le virus persiste à vie dans les lymphocytes B de l'hôte sous une forme latente et n'est responsable d'aucun signe clinique chez la grande majorité des individus infectés. Cependant, l'EBV est associé à de nombreuses pathologies tumorales comme le CRP, des syndromes lymphoprolifératifs suite à un déficit immunitaire ainsi qu'à des lymphomes, dont le LB, le LH et le lymphome T/NK nasal (Rickinson & Kieff, 2007).

La transmission de l'EBV se fait généralement par contact avec les sécrétions oropharyngées contenant les particules infectieuses. Elle peut également avoir lieu, chez les sujets transplantés, par les lymphocytes B infectés par l'EBV présents dans le sang du donneur. Cette infection constitue un facteur de risque pour les maladies lymphoprolifératives des sujets immunodéprimés.

II. Structure du virion et organisation du génome viral

II.1. Structure du virion

Tous les virions des membres de la famille des Herpèsvirus possèdent une structure commune et sont composés de (**figure 3**):

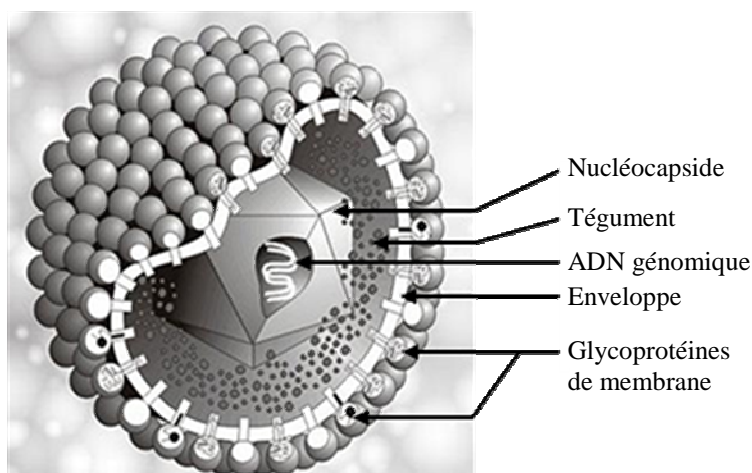


Figure 3 : Structure du virion de l'EBV.
(Adapté de <http://www.oliphant.org.au/april2008/images/morgan/Slide5.JPG>)

- un **nucléïde**, ou core, comprenant le génome viral sous forme d'un ADN double brin, linéaire, enroulé autour de protéines basiques.
- une **capside** icosaédrique (20 faces et 12 sommets) constituée de 162 capsomères (150 hexamères et 12 pentamères) et d'environ 125 nm de diamètre.
- un **tégument** formé de nombreuses protéines virales et cellulaires, sans structures particulières, réparti entre la nucléocapside et l'enveloppe.
- une **enveloppe** lipidique dérivée des membranes de la cellule infectée. L'enveloppe de l'EBV contient notamment des glycoprotéines virales (gp) dont la gp350, la plus abondante, qui sert à l'attachement du virion à la surface des cellules par interaction avec le récepteur du complément CR2/CD21 (Cluster of Differentiation ; Nemerow *et al.*, 1987).

II.2. Organisation du génome viral

II.2.1. Description du génome viral

Le génome de l'EBV est constitué d'un ADN double brin linéaire d'environ 172 kpb. Il est organisé de la même façon que celui des autres lymphocryptovirus. En effet, il comporte des séquences terminales répétées (TR, Terminal Repeat) d'environ 0,5 kpb à ses deux extrémités ainsi que des régions de séquences internes répétées (IR1 à IR4, Internal Repeat). L'IR1 est constituée de 6 à 12 répétitions de séquences mesurant environ 3 kpb chacune et divise le génome en deux régions uniques, une région courte U_S (Short Unique region), et une région longue U_L (Long Unique region) comprenant les IR2, 3 et 4 (**figure 4** ; Rickinson & Kieff, 2007).

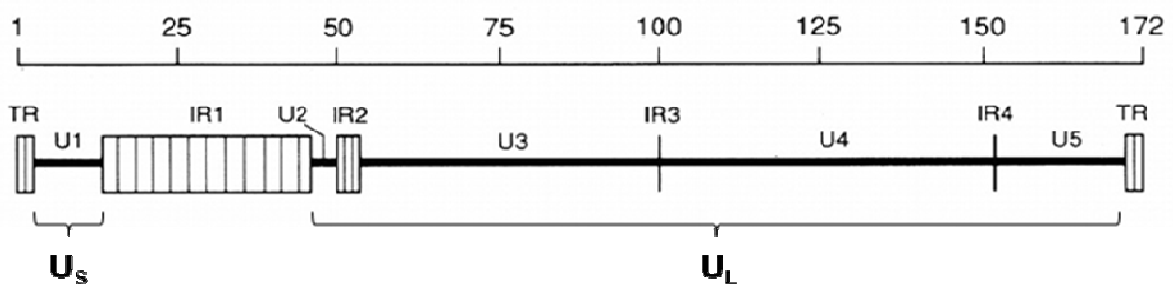


Figure 4 : Organisation du génome de l'EBV sous forme linéaire. Le génome est sous cette forme dans les particules virales. TR : Terminal Repeat ; $U_{S/L}$: Short/Long Unique Region ; IR : Internal Repeat. (D'après Strauss *et al.*, 1993)

Le nombre de TR varie de 4 à 12. Lorsque l'EBV infecte une cellule, ces séquences terminales permettent la circularisation du génome. Ainsi, l'ADN viral forme un épisome, ou CCC (Covalently Closed Circle ; Adams & Lindhal, 1975), étroitement lié à la chromatine, qui

peut se maintenir de façon stable dans les cellules sans avoir à s'intégrer à leur génome. Cependant, l'ADN de l'EBV semble pouvoir s'intégrer au génome de la cellule hôte dans certains cas (Takakuwa *et al.*, 2005).

Deux types d'origines de réplication sont décrits, l'origine de réplication latente oriP qui permet au virus de se maintenir sous forme épisomique et les deux origines de réplication lytique oriLyt, fonctionnelles durant la phase productive.

II.2.2. La carte de restriction du génome viral

L'EBV a été le premier herpèsvirus dont le génome a été complètement cloné et séquencé (Baer *et al.*, 1984). Ce séquençage a été fait à partir d'une banque de fragments d'ADN provenant de la digestion par l'enzyme de restriction BamHI du génome viral entier. La plupart de ces fragments participent à la transcription des divers gènes viraux et ce, en fonction des cadres ouverts de lecture (ORF, ou Open Reading Frame), et du sens de lecture. Les gènes et les sites de régulation ou de transcription sont fréquemment référencés par rapport aux fragments spécifiques du génome obtenus après digestion par BamHI. Il a été défini une nomenclature proposant que tous les segments génomiques obtenus après digestion de l'ADN viral par BamHI, soient repérés par une lettre sur la carte de restriction du génome viral (**figure 5**). Deux sens de lecture sont possibles et ont été arbitrairement choisis et fixés. Ainsi, le génome linéaire de gauche à droite, c'est-à-dire d'U1 à U5, est le sens R (Rightward), et de droite à gauche, c'est-à-dire d'U5 à U1, est le sens L (Leftward). Par conséquent, le gène codant la protéine LMP1 (Latent Membrane Protein 1) a été baptisé BNFL1, signifiant séquence N dans la cartographie BamHI (BN), transcrite dans le sens L (de droite à gauche), dans le premier ORF (F1).

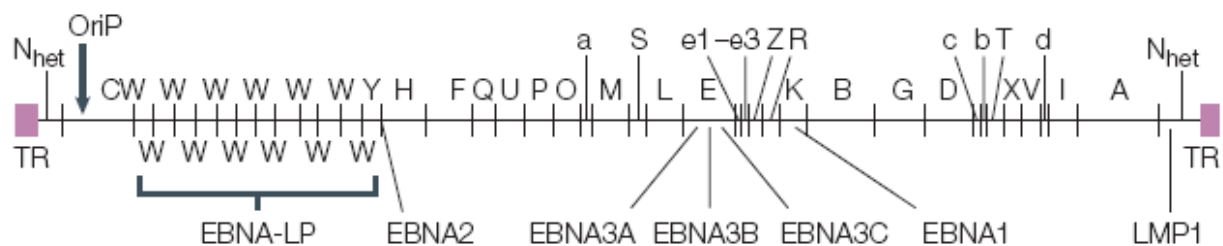


Figure 5 : Organisation des cadres ouverts de lecture codant les protéines de latence. Les fragments BamHI sont nommés en fonction de leur taille, A étant le plus grand. (D'après Young & Rickinson, 2004)

II.2.3. Polymorphismes de l'EBV

Il a été décrit différentes souches virales d'EBV. Elles peuvent être classées en 2 types (EBV-1 et EBV-2 ou EBV-A et EBV-B) sur la base d'un polymorphisme au niveau des

séquences de leurs gènes de latence codant pour EBNA2 (EBV Nuclear Antigen 2), EBNA3A, 3B et 3C. Des études de séroprévalence ont montré que la souche EBV-1 est majoritaire en Occident, alors que les souches EBV-1 et EBV-2 ont la même prévalence en Afrique et en Nouvelle-Guinée (Macswen & Crawford, 2003). De plus, il existe d'autres polymorphismes au sein de ces 2 souches, notamment dans les régions répétées du génome viral, donnant ainsi de nombreux isolats différents et également au niveau de plusieurs gènes dont BYRF1 (codant EBNA2), BZLF1 (codant Zta) et BNLF1.

III. Le cycle viral

Comme tous les autres membres de la famille des *Herpesviridae*, l'EBV a un cycle en deux étapes : la phase de latence et la phase lytique. La phase de latence permet le maintien du génome viral dans le noyau des cellules infectées, et ainsi la persistance à long terme du virus dans l'hôte. La phase lytique permet la production et la diffusion de nouvelles particules virales. Chez l'hôte, l'EBV est majoritairement retrouvé à l'état latent.

III.1. La latence virale

Le statut de latence virale repose sur deux phénomènes interdépendants. Le premier est la répression du cycle lytique, ainsi que le maintien du génome viral sous forme épisomique dans le noyau des cellules infectées. Pour cela, chaque copie de l'épisome viral est répliquée une fois durant le cycle cellulaire et ségrège dans les cellules filles. L'origine de réplication de l'épisome est appelée oriP. C'est l'ADN polymérase de la cellule hôte qui assure la réplication de l'épisome viral. Le deuxième phénomène, essentiel au maintien de la latence virale, est l'expression d'un nombre restreint de gènes viraux dits « de latence ».

On compte 11 gènes de latence (**figure 6**), regroupés en 3 familles :

- les gènes qui codent les antigènes nucléaires de l'EBV (EBNA),
- les gènes qui codent les protéines membranaires de latence (LMP),
- les gènes qui codent les ARN viraux EBER (EBV-encoded RNA) et BART (BamHI A Rightward Transcripts).

L'expression des gènes de latence contribue aux propriétés d'immortalisation et/ou de transformation d'EBV en détournant la machinerie cellulaire afin de contrôler la croissance et/ou la survie des cellules infectées.

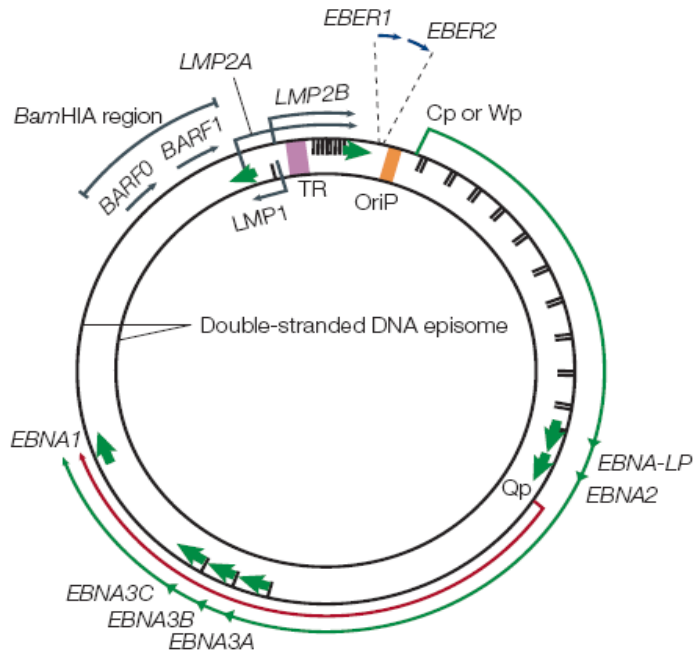


Figure 6 : Episome de l'EBV. Seuls les gènes exprimés durant les différents programmes de latence sont représentés. TR : Terminal Repeat ; oriP : Plasmidic replication origin (en phase latente) ; Cp, Wp, Qp : promoteurs situés respectivement dans les fragments BamHI C,W et Q. (D'après Young & Rickinson, 2004)

III.1.1. Les différents programmes de latence

Le profil d'expression des gènes de latence diffère selon le contexte cellulaire d'infection par l'EBV. Ainsi, on distingue 4 types de latence virale en fonction des gènes exprimés (**figure 7**). Dans chacune d'elle, les ARN EBER sont exprimés. Quant aux ARN BART, ils sont exprimés au moins en partie durant les latences de type I, II et III.

La **latence de type I** est caractéristique du lymphome de Burkitt. Durant cette latence, les ARN EBER et BART sont exprimés et seule la protéine EBNA1 est détectée.

La **latence de type II**, appelée aussi programme par défaut, est caractéristique du carcinome du rhinopharynx (CRP), de la maladie de Hodgkin et de certains lymphomes T/NK. En plus d'EBNA1 et des ARN EBER et BART, les protéines LMP sont exprimées.

La **latence de type III**, appelée aussi programme de croissance, est retrouvée dans les lymphocytes B infectés et transformés *in vitro* par l'EBV (LCL) et dans les syndromes lymphoprolifératifs des sujets immunodéprimés. Elle est caractérisée par l'expression de l'ensemble des gènes de latence.

Ces trois programmes de latence sont typiquement retrouvés dans certaines pathologies malignes associées à l'EBV. Cependant, en dehors de toute pathologie tumorale, ces trois programmes de latence semblent être caractéristiques des différentes étapes franchies par le virus lors d'une infection asymptomatique. Ainsi, chez les personnes infectées de façon persistante et asymptomatique, le réservoir viral majeur est une partie des lymphocytes B mémoires de l'hôte,

dans lesquels l'EBV se maintient en **latence de type 0**, aussi appelée programme latent. Durant cette latence, seuls les EBER sont transcrits (Hochberg *et al.*, 2004).

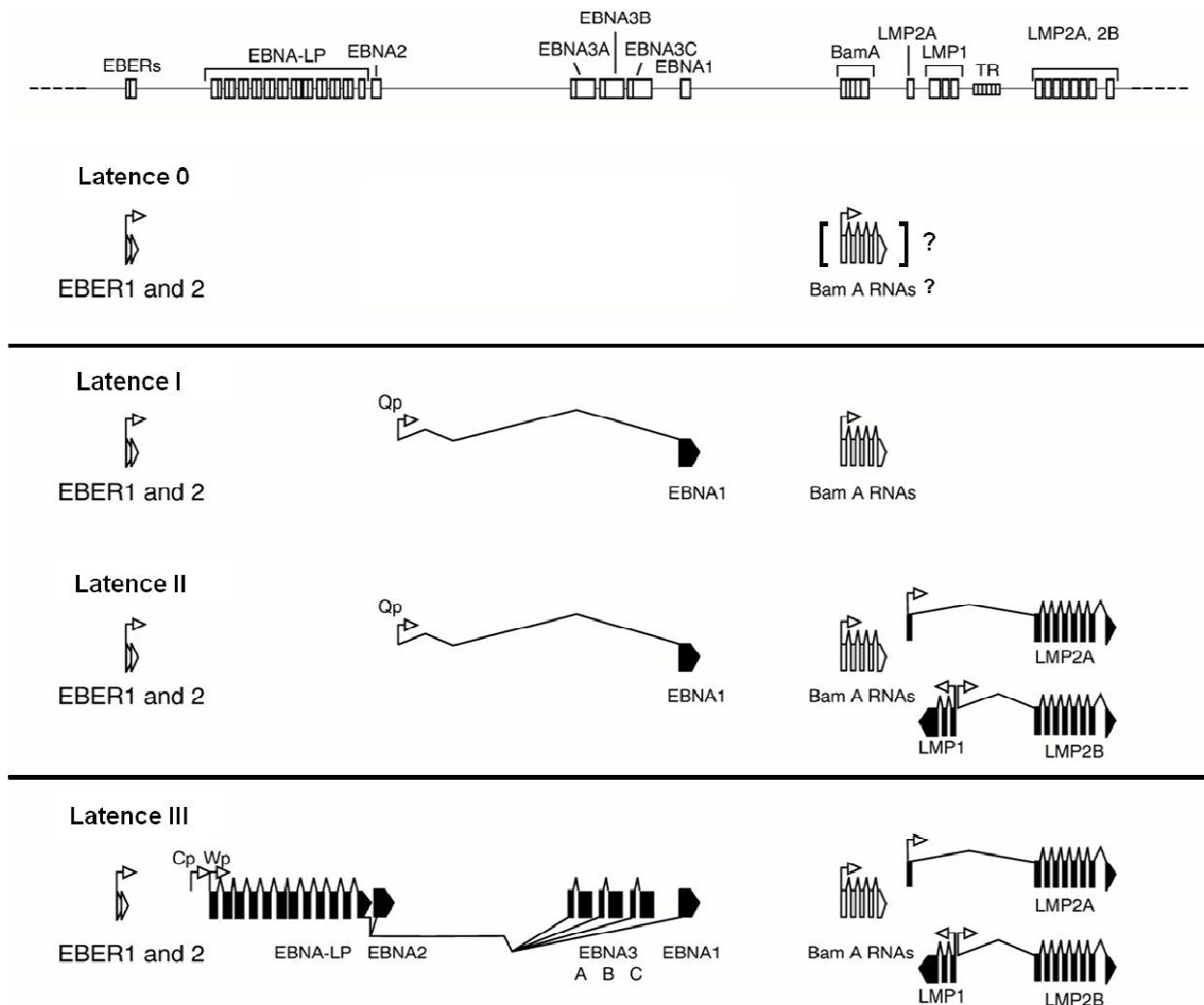


Figure 7 : Profils d'expression des gènes viraux durant les différents types de latence. La position des exons est indiquée sur la carte linéaire du génome viral. Il faut noter que ce génome est circularisé dans les cellules infectées de manière latente grâce à la fusion des séquences terminales répétées (TR) et que les transcrits LMP2 sont épissés de part et d'autre de cette région fusionnée. Les dessins des transcrits montrent l'orientation de leur transcription à partir de leur promoteur (flèches), ainsi que leur profil d'épissage. Les exons des ARN non codant (en blanc, incluant les BART dont la capacité codante n'est toujours pas élucidée) et des ARN messagers (en noir) sont représentés. (Adapté de <http://mp.bmj.com/content/53/5/238/F3.large.jpg> et Rickinson & Kieff, 2007)

III.1.2. Les produits des gènes de latence

III.1.2.1. Les Antigènes Nucléaires du virus d'Epstein-Barr (EBNA)

L'expression de ces gènes est sous le contrôle de 3 promoteurs: Cp, Qp, Wp. Au début de l'infection par l'EBV, le promoteur Wp initie l'expression des gènes codant les protéines EBNA puis, lorsque la transformation cellulaire est établie, le promoteur Cp prend le relais (en latence III). Le promoteur Qp, quant à lui, est utilisé lors des latences I et II.

III.1.2.1.1. EBNA1

La protéine EBNA1 est codée par le gène BKRF1. Les transcrits codant EBNA1 sont initiés à partir du promoteur Wp en début d'infection. Une fois la transformation cellulaire établie, la transcription est initiée au niveau du promoteur Cp. Lors des latences virales de type I et II, où EBNA1 est la seule protéine de latence à être produite, les promoteurs Cp et Wp sont réprimés par méthylation et la transcription est initiée à partir du promoteur Qp (Schaefer *et al.*, 1997).

EBNA1 est retrouvée durant toutes les latences, en dehors de la latence 0, et de ce fait, dans toutes les pathologies associées à l'EBV. La protéine EBNA1 est essentielle pour la persistance de l'épisome viral dans les cellules en division. Elle se fixe sur une région de répétition au niveau de l'origine de réplication latente oriP et sur les chromosomes de la cellule hôte lors de la mitose (Wu *et al.*, 2002). Ainsi, EBNA1 permet la réplication et le maintien du génome viral dans les cellules en prolifération (Hebner *et al.*, 2003). Cette protéine peut également jouer un rôle d'activateur transcriptionnel sur des promoteurs viraux et cellulaires (Wood *et al.*, 2007 ; Canaan *et al.*, 2009).

EBNA1 est une protéine nucléaire de 641 acides aminés (aa), elle est constituée d'une partie N-terminale de 89 aa riche en arginine, d'une région comprenant des répétitions glycine-alanine (résidus 90 à 327), d'une autre région riche en arginine (résidus 328 à 386) incluant le signal de localisation nucléaire ou NLS (résidus 379 à 386 ; Ambinder *et al.*, 1991) et d'une partie C-terminale (résidus 387 à 641) constituée d'un domaine de dimérisation et de fixation à l'ADN (résidus 450 à 609 ; Chen *et al.*, 1993). En outre, EBNA1 possède 2 domaines capables de lier l'ADN appelés Linking Region 1 et 2 (LR1, résidus 40 à 89 et LR2, résidus 329 à 378 ; Lindner & Sudgen, 2007). Ces motifs sont impliqués dans la maintenance de l'épisome, la réplication virale et l'activation transcriptionnelle (Kanda *et al.*, 2001 ; Marechal *et al.*, 1999 ; Wu *et al.*, 2002).

De par son rôle dans le maintien des épisomes dans la cellule, EBNA1 semble essentielle à l'immortalisation des cellules B mais également à la transformation cellulaire. En effet, l'expression d'EBNA1 dans les cellules B de souris transgéniques provoque l'apparition de lymphomes suggérant son rôle oncogénique (Wilson *et al.*, 1996). Cependant, des expériences similaires utilisant d'autres souches de souris ne confèrent pas de pouvoir tumorigène à EBNA1 (Kang *et al.*, 2005).

Enfin, indépendamment de sa fonction de maintien du génome viral, EBNA1 semble impliquée dans l'inhibition de l'apoptose des cellules B infectées par l'EBV (Kennedy *et al.*, 2003 ; Saridakis *et al.*, 2005).

III.1.2.1.2. EBNA2

EBNA2 est une protéine nucléaire codée par le gène BYRF1. Les transcrits codant EBNA2 sont initiés à partir des promoteurs Wp et Cp. Associée à la latence de type III, EBNA2 est la première protéine virale exprimée, avec EBNA-LP, après l'infection d'un lymphocyte B par l'EBV. Le séquençage de la protéine EBNA2 provenant de différentes souches d'EBV a montré l'existence de deux variants, EBNA2A et EBNA2B qui diffèrent selon leur taille, respectivement de 487 aa et 443 aas (Ling *et al.*, 1993).

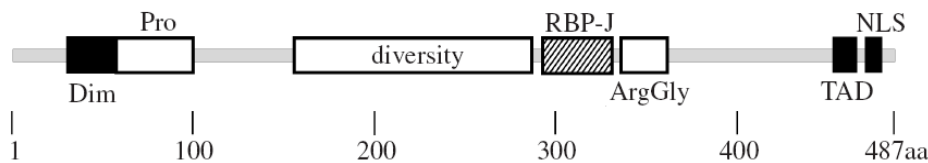


Figure 8 : Structure de la protéine EBNA2. EBNA2 est constituée d'un domaine d'homodimérisation (Dim), d'une région riche en proline (Pro), d'une région variable selon les variants (diversity), D'un domaine d'interaction avec la protéine RBP-Jκ (RBP-J), d'une région riche en arginine et en glycine (ArgGly), d'un domaine de transactivation (TAD) et d'un signal de localisation nucléaire (NLS). (D'après Zimmer-Strobl & Strobl, 2001)

La région N-terminale de la protéine EBNA2 comprend un domaine de dimérisation et une région riche en proline. Sa partie C-terminale renferme un domaine d'interaction avec la protéine RBP-Jκ/CBF1 (Recombination signal-binding protein for immunoglobulin κJ region/C-Promoter-Binding Factor 1, résidus 280 à 337), une région riche en Arginine-Glycine (RG, résidus 341 à 355), un domaine de transactivation (TAD, résidus 437 à 475) et une région contenant la séquence de translocation nucléaire (NLS, résidus 477 à 483).

La protéine EBNA2 est essentielle à l'immortalisation et à la transformation des lymphocytes B (Cohen *et al.*, 1989 ; Hammerschmidt & Sugden, 1989). En effet, EBNA2 est un puissant transactivateur grâce à sa capacité de recruter les histone acétyltransférases (HAT) p300, CBP et PCAF, ainsi que la machinerie basale de la transcription (Bark-Jones *et al.*, 2006 ; Tong *et al.*, 1995a ; Tong *et al.*, 1995b ; Tong *et al.*, 1995c ; Wang *et al.*, 2000 ; Cohen & Kieff, 1991). Il est le principal transactivateur des gènes viraux codant les protéines EBNA par l'intermédiaire du promoteur Cp (Sung *et al.*, 1991 ; Woisetschlaeger *et al.*, 1990 ; Jin & Speck, 1992) et des promoteurs des gènes codant les protéines LMP. EBNA2 est également le transactivateur de gènes cellulaires tels que c-Myc, CD23, c-fgr et CD21 (Kaiser *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 1987 ; Knutson, 1990 ; Cordier *et al.*, 1990 ; Zimmer-Strobl *et al.*, 1993). EBNA2 ne fixe pas directement l'ADN, mais par l'intermédiaire de RBP-Jκ, une protéine effectrice de la voie Notch (Waltzer *et al.*, 1994). La protéine EBNA2 peut également interagir avec d'autres facteurs de transcription comme ATF2 (Activating Transcription Factor 2), Spi1/PU1 ou SpiB

(Sjöblom *et al.*, 1998 ; Henkel *et al.*, 1994 ; Laux *et al.*, 1994). Il a été également montré qu'EBNA2 recrute les molécules Swi/Snf, impliquées dans le remodelage de la chromatine favorisant la transcription (Wu *et al.*, 1996 ; Wu *et al.*, 2000). Associée à EBNA2, EBNA-LP joue le rôle de co-activateur (Nitsche *et al.*, 1997 ; Bandobashi *et al.*, 2001).

L'activité transcriptionnelle d'EBNA2 peut être inhibée. En effet, les protéines EBNA3 entrent en compétition avec EBNA2 pour la fixation de RBP-Jκ en étant mutuellement exclusives (Johannsen *et al.*, 1996 ; Waltzer *et al.*, 1996 ; Robertson *et al.*, 1996). Outre ce phénomène, EBNA3A et EBNA3C peuvent recruter HDAC1 (Histone deacetylase 1) et empêcher la transcription (Bourillot *et al.*, 1998 ; Radkov *et al.*, 1999).

III.1.2.1.3. EBNA3 (3A, 3B et 3C)

Les protéines EBNA3A, EBNA3B et EBNA3C (ou EBNA3, EBNA4 et EBNA6) sont codées respectivement par les cadres de lectures BLRF3/BERF1, BERF2a/BERF2b et BERF3/BERF4 localisés en tandem sur le génome viral. De même que pour EBNA1 et EBNA2, la transcription des gènes codant les protéines EBNA3A, 3B et 3C est sous le contrôle des promoteurs Wp et Cp. Avec EBNA2, les protéines EBNA3 sont à l'origine du polymorphisme entre les souches EBV-1 et EBV-2 (Rowe *et al.*, 1989 ; Sample *et al.*, 1990).

Les protéines EBNA3A et EBNA3C sont essentielles pour l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro* contrairement à EBNA3B qui ne semble pas nécessaire (Tomkinson & Kieff, 1992). La délétion complète de l'exon codant EBNA3B ne perturbe ni l'immortalisation ni la croissance des lymphocytes B *in vitro* (Chen *et al.*, 2005).

Les EBNA3 sont des protéines nucléaires grâce à leurs séquences NLS (Burgess *et al.*, 2006 ; Buck *et al.*, 2006) qui se fixent, comme EBNA2, indirectement à l'ADN via RBP-Jκ (Robertson *et al.*, 1996). En se fixant à RBP-Jκ, EBNA3A et EBNA3C déplacent la liaison de ce facteur à l'ADN et régulent négativement la transactivation des gènes par EBNA2 (Waltzer *et al.*, 1996), dont la protéine LMP1 (Le Roux *et al.*, 1994). Par ce même mécanisme, EBNA3C est capable de réguler l'expression de tous les gènes codant les protéines EBNA en réprimant le promoteur viral Cp (Radkov *et al.*, 1999).

EBNA3C est essentiel à la pathogenèse associée à l'EBV en régulant la prolifération, le cycle cellulaire et les capacités métastatiques des cellules infectées par ce virus. EBNA3C interagit avec c-Myc grâce au recrutement de son co-activateur Skp2, augmentant ainsi la transcription des gènes cibles de c-Myc (Bajaj *et al.*, 2008). EBNA3C peut aussi perturber des points de contrôle du cycle cellulaire en agissant sur des protéines régulatrices telles que pRb,

p27^{KIP1}, et p53 afin de permettre la progression du cycle et favoriser la prolifération cellulaire (Parker *et al.*, 2000 ; Saha *et al.*, 2009).

III.1.2.1.4. EBNA-LP

La protéine EBNA-LP (ou EBNA5) est codée par le gène BWRF1. Elle est la première protéine, avec EBNA2, à être exprimée à partir du promoteur Wp. Elle est composée d'une partie N-terminale constituée de répétitions en tandem codée par deux exons W1 (22 aa) et W2 (44 aa) dérivés de la région IR1 (**figure 4**) et d'une partie C-terminale de 45 aa codée par deux exons Y1 et Y2 (Ling *et al.*, 2005).

EBNA-LP possède des séquences NLS (Peng *et al.*, 2000 ; McCann *et al.*, 2001) qui lui confèrent une localisation nucléaire. Néanmoins, certaines études ont révélé une colocalisation d'EBNA-LP avec des protéines cytoplasmiques (Kawaguchi *et al.*, 2000 ; Forsman *et al.*, 2008).

Cette protéine n'est pas indispensable au processus d'immortalisation des lymphocytes B par l'EBV mais elle en augmente l'efficacité (Mannick *et al.*, 1991). EBNA-LP est impliquée dans la régulation du promoteur Cp, dans l'expression des protéines membranaires de latence, dont LMP1 (Peng *et al.*, 2000). Elle est capable de se fixer aux protéines pRb, p53, p14^{ARF}, HA95, Sp100 ou CBP suggérant un rôle dans la régulation de la transcription, le cycle cellulaire et la mort cellulaire (Szekely *et al.*, 1993 ; Kashuba *et al.*, 2003 ; Han *et al.*, 2001 ; Ling *et al.*, 2005 ; Bandobashi *et al.*, 2001). En effet, en coopération avec EBNA2, EBNA-LP est capable d'induire la transition de la phase G0 à la phase G1 du cycle cellulaire dans les lymphocytes B quiescents. Ainsi, EBNA-LP permet à ces lymphocytes B primaires d'entrer dans le cycle cellulaire grâce à l'activation de la cycline D2 (Sinclair *et al.*, 1994 ; Sinclair & Farrell, 1995).

III.1.2.2. Les protéines membranaires de latence (LMP)

III.1.2.2.1. LMP1

La Partie 3 sera entièrement consacrée à la description de la protéine LMP1.

La protéine LMP1 est codée par le gène BNLF1 qui est transcrit dans le sens L (de U5 à U1, **figure 4**). LMP1 est considérée comme l'oncogène majeur du virus (Eliopoulos & Young, 2001). LMP1 est fonctionnellement apparentée aux membres de la famille des récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor). *In vivo*, LMP1 peut se substituer à CD40 en induisant l'expression d'un grand nombre de gènes cellulaires impliqués dans les processus d'activation et de prolifération cellulaire des lymphocytes B (Uchida *et al.*, 1999). L'expression de LMP1 conduit au détournement et à la dérégulation chronique de voies de signalisation cellulaire et de leurs gènes cibles impliqués notamment dans des processus prolifératifs (Gires *et al.*, 1997).

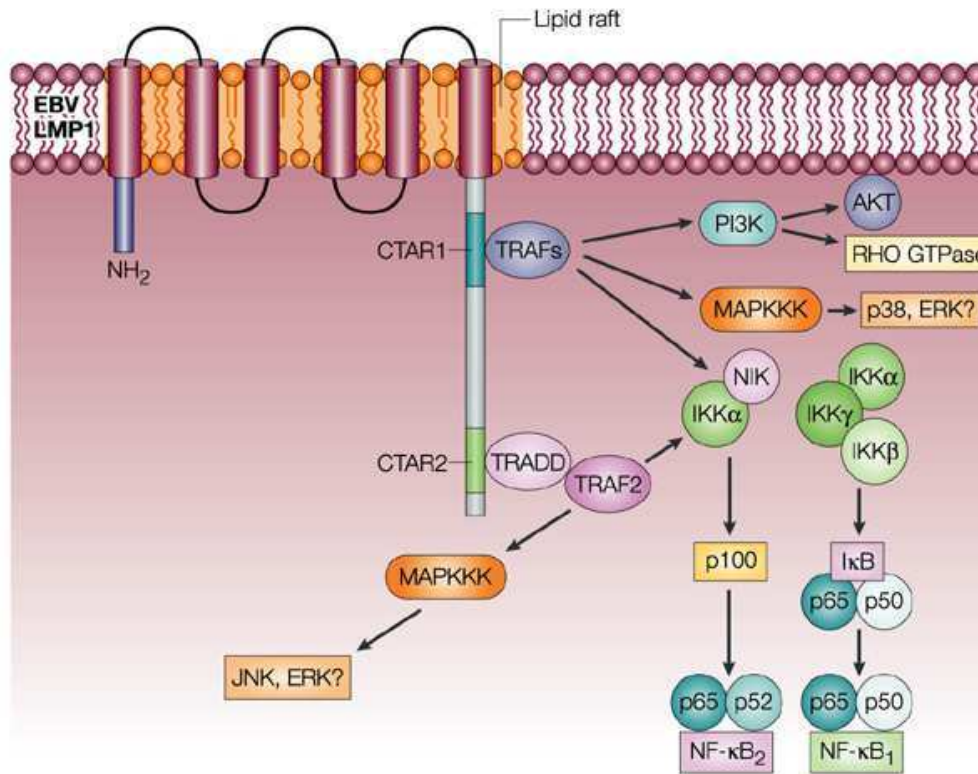


Figure 9 : Structure de la protéine LMP1. LMP1 est constituée d'une région N-terminale cytoplasmique, de 6 domaines transmembranaires et d'une partie C-terminale cytoplasmique comportant 2 régions CTAR (C Terminal Activating Region) responsables du recrutement de protéines cellulaires telles que les TRAF et TRADD. Ces recrutements permettent l'activation de voies PI3K, MAPK et NFκB. (D'après Young & Rickinson, 2004)

III.1.2.2.2. LMP2 (2A et 2B)

Les deux protéines LMP2 (LMP2A et LMP2B) sont codées par le même gène mais par deux exons différents après circularisation du génome viral et fusion des séquences terminales répétées. Ces deux protéines sont constituées de 12 domaines transmembranaires et d'une partie N-terminale cytoplasmique. LMP2A possède en plus 119 aa dans sa région N-terminale cytoplasmique, responsable de sa signalisation.

LMP2A et LMP2B ne sont pas essentielles à l'infection et à l'immortalisation *in vitro* des lymphocytes B par l'EBV (Longnecker, 2000), mais LMP2A semble toutefois contribuer à l'efficacité de l'immortalisation (Brielmeier *et al.*, 1996). *In vivo*, LMP2A joue un rôle important dans le maintien du virus à l'état latent (Miller *et al.*, 1994 ; Fukuda & Longnecker, 2005).

Une des principales propriétés de LMP2A est de moduler le signal induit par le BCR (B Cell Receptor). En effet, LMP2A recrute les molécules de la signalisation du BCR et agit comme un dominant négatif. Ainsi, LMP2A peut se substituer au BCR et induire des réponses calciques puis la production de cytokines (Beaufils *et al.*, 1993). La protéine LMP2A possède un motif

ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) lui permettant d'interagir avec les tyrosines kinases Lyn et Syk de la signalisation du BCR (Burkhardt *et al.*, 1992). LMP2A augmente la dégradation de ces kinases induisant le blocage de la signalisation du BCR (Winberg *et al.*, 2000). De plus, LMP2A, localisée dans les radeaux lipidiques, bloque la translocation du BCR dans ces micro-domaines lipidiques et l'internalisation du complexe BCR/antigène (Dykstra *et al.*, 2001). Des données sur des souris transgéniques LMP2A montrent que la protéine LMP2A ne présente pas de propriétés oncogéniques mais donne aux lymphocytes B un signal de survie leur permettant d'échapper à l'apoptose en l'absence de sélection *in vivo* dans les centres germinatifs (Caldwell *et al.*, 1998 ; Caldwell *et al.*, 2000 ; Mancao & Hammerschmidt, 2007).

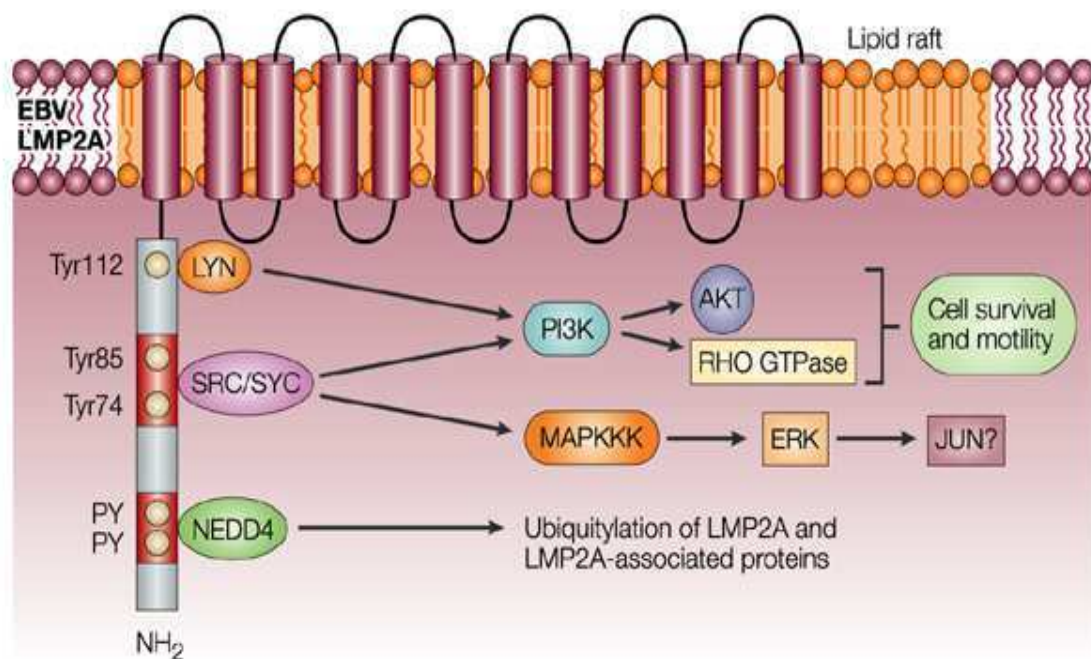


Figure 10 : Structure de la protéine LMP2A. LMP2A est constituée de 12 domaines transmembranaires et d'un domaine cytoplasmique N-terminal. Les 119 acides aminés du domaine N-terminal, représentant la partie signalisatrice, sont déléétés chez LMP2B. LMP2A est phosphorylée au niveau de tyrosines (Tyr) et recrute des tyrosine kinases (Lyn et Syk). Ce recrutement permet l'activation des voies PI3K et MAPK permettant la survie et l'invasion cellulaire. Les motifs riches en résidus Proline (motifs PY) permettent le recrutement de l'ubiquitine ligase Nedd4. (D'après Young & Rickinson, 2004)

III.1.2.3. Les ARN viraux EBER et BART

Les **EBER** (Epstein-Barr Encoded RNA), composés d'EBER1 et EBER2, sont les transcrits viraux les plus abondants dans les cellules infectées par l'EBV (Rym, 1979). EBER1 et EBER2 sont de petits ARN non-polyadénylés de 167 et 172 nucléotides.

Les EBER sont transcrits par l'ARN polymérase III et sont essentiellement retrouvés dans le noyau au sein de complexes ribonucléoprotéiques. Ces ARN joueraient un rôle essentiel dans la persistance de l'EBV dans l'hôte. En effet, les EBER sont capables d'induire l'expression de Bcl-2, une molécule anti-apoptotique (Komano *et al.*, 1999 ; Ruf *et al.*, 2000 ; Yamamoto *et al.*, 2000) et de l'IL10, une cytokine immunosuppressive (Kitagawa *et al.*, 2000). De plus, les EBER inhiberaient l'effet antiviral des interférons α et γ (Sharp *et al.*, 1993).

Les transcrits **BART** (BamHI A Rightward Transcrits) ont été découverts dans des coupes de tissus de carcinomes du rhinopharynx (Hitt *et al.*, 1989) mais sont également retrouvés dans les autres cancers associés à l'EBV comme le lymphome de Burkitt (Tao *et al.*, 1998) et le lymphome hodgkinien (Deacon *et al.*, 1993).

Plusieurs cadres de lecture ouverts (ORF) ont été identifiés dans la région BART : BARF0, RK-BARF0, A73, RPMS1 et BARF1 (Smith *et al.*, 1993 ; Sadler *et al.*, 1995, Wei & Ooka, 1989). RK-BARF0, une des protéines BARF0, est exprimée dans les cellules infectées par l'EBV *in vitro* (Fries *et al.*, 1997) mais semble difficilement détectable *in vivo* (van Beek *et al.*, 2003). Un autre transcrit de la région BART code pour RPMS1 qui aurait un rôle de répresseur de l'activité transactivatrice de Notch et d'EBNA2 (Zhang *et al.*, 2001). Quant à la protéine BARF1, elle est retrouvée dans des tumeurs d'origine épithéliale (zur Hausen *et al.*, 2000) et est considérée comme un oncogène (Wiech *et al.*, 2008).

Enfin, c'est dans la région BART, au sein des introns, qu'ont été découverts les premiers micro ARN (miARN) de l'EBV (Pfeffer *et al.*, 2004). Plusieurs miARN ont été identifiés, ils sont produits pendant la phase de latence à partir d'un même transcrit avant son épissage. Le rôle exact de ces miARN n'est pas encore élucidé, mais certaines études montrent qu'ils sont capables de réguler l'expression de protéines de latence, comme LMP1 et LMP2A (Lo *et al.*, 2007 ; Lung *et al.*, 2009), mais également l'expression de la protéine cellulaire PUMA (p53 Up-regulated Modulator of Apoptosis ; Choy *et al.*, 2008).

III.2. Le cycle lytique

Le cycle lytique aboutit à l'amplification du génome viral, la production de nouveaux virions et la diffusion de l'EBV. L'activation de ce cycle répliatif intervient occasionnellement après la différenciation en plasmocytes de lymphocytes B mémoires infectés par l'EBV. Spontanément, 2 à 10% des LCL deviennent permissives à la répliation virale. Ce taux peut être augmenté par le traitement des cellules avec divers agents chimiques (esters de phorbol, butyrate

de sodium ou 5-azacytidine) ou biologiques (anti-immunoglobulines de surface, TGF- β ou vecteur exprimant la protéine EB1/BZLF1/Zta/ZEBRA).

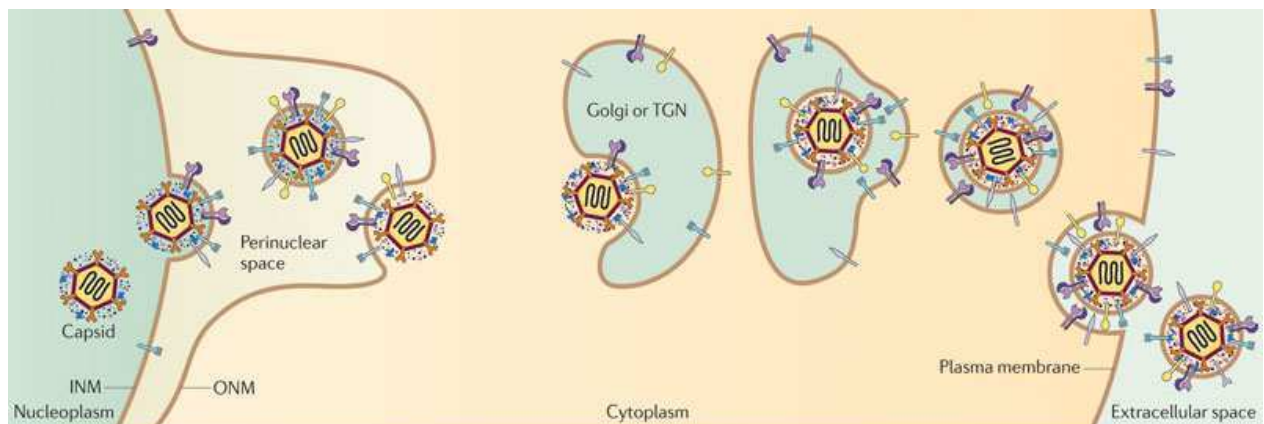


Figure 11 : Enveloppement et sortie des virions. Après assemblage des capsides et empaquetage de l'ADN viral linéaire, les nucléocapsides sortent du noyau par enveloppement à la membrane nucléaire interne (INM) et désenveloppement à la membrane nucléaire externe (ONM). Dans le cytoplasme, l'enveloppement secondaire est déclenché par l'interaction de protéines du tégument (qui enveloppent les nucléocapsides) avec les membranes du réseau trans-golgiens (TGN). Les virions sont ensuite véhiculés dans des vésicules post-Golgi puis relargués dans l'espace extracellulaire par fusion de la membrane externe de la vésicule avec la membrane plasmique. (D'après Johnson & Baines, 2011)

L'expression des gènes du cycle lytique se déroule de manière séquentielle. Après l'induction du cycle lytique, les gènes dits « très précoces » ou Immediate Early genes (IEG), BZFL1 et BRLF1, sont exprimés. Ces gènes codent deux protéines transactivatrices qui contrôlent le passage de la latence vers le cycle lytique. BZLF1 et BRLF1 codent respectivement la protéine ZEBRA (Z Epstein-Barr virus Replication Activator) également appelée Zta et la protéine Rta (R transactivator). Elles ont pour rôle d'activer certains promoteurs viraux permettant l'expression des gènes dits « précoces » ou Early genes (EG) (Chavrier *et al.*, 1989 ; Chevallier-Greco *et al.*, 1989) puis l'expression des gènes dits « tardifs » ou Late genes (LG) codant les protéines de la capsidie et des glycoprotéines de l'enveloppe (Tsurumi *et al.*, 2005).

Pendant le cycle lytique, les cellules permissives subissent un changement cytotologique qui se traduit par la formation d'une inclusion intranucléaire, une "margination" de la chromatine nucléaire, l'assemblage des capsides à l'intérieur du noyau près de la membrane nucléaire, le bourgeonnement du virus au travers de la membrane nucléaire et la formation de vésicules cytoplasmiques (**figure 11**). En culture, le cycle lytique se déroule sur une période de 16 à 24 heures (Marechal & Piolot, 2000).

Partie 2 : Physiopathologie de l'infection par le virus d'Epstein-Barr

I. Cellules cibles du virus d'Epstein-Barr

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

I.1. Cellules cibles conventionnelles

I.1.1. Les lymphocytes B

L'EBV a un tropisme privilégié pour le lymphocyte B. En effet, ce type cellulaire peut facilement être infecté par l'EBV *in vitro* (Kieff & Rickinson, 2007). De plus, il exprime fortement le principal récepteur du virus, CD21, ainsi que le corécepteur, CMH de classe II. *In vitro*, l'infection par l'EBV de lymphocyte B va conduire à leur immortalisation et à l'établissement de LCL (lignée cellulaire lymphoblastoïde). Ces cellules présentent une latence de type III et expriment un certain nombre de marqueurs d'adhérence (CD54/ICAM1, CD58/LFA3, CD11a/LFA1) et d'activation (CD23, CD39 et CD40). *In vivo*, les cellules B mémoires forment le réservoir viral chez les individus sains séropositifs (Babcock *et al.*, 1998).

I.1.2. Les cellules épithéliales

Outre les pathologies malignes lymphoïdes, l'EBV est associé à des cancers épithéliaux, comme le carcinome du rhinopharynx (CRP) ou le carcinome gastrique (Dolcetti & Menezes, 2003), suggérant son tropisme pour ce type cellulaire.

In vivo, l'EBV infecte les cellules épithéliales de l'oropharynx et/ou des amygdales. Néanmoins, le fait que leur infection ait lieu précédemment ou subséquent à celle des lymphocytes B est une question encore débattue dans la littérature (Chang *et al.*, 1999 ; Pegtel *et al.*, 2004 ; Shannon-Lowe *et al.*, 2006 ; Hadinoto *et al.*, 2009). Par contre, lorsque l'infection a lieu, l'EBV y effectue un cycle réplicatif qui induit à la destruction de ces cellules. L'infection de ce type cellulaire est moins bien comprise que celle des lymphocytes B car, contrairement aux lymphocytes B, les cellules épithéliales n'expriment pas le récepteur CD21 (Speck *et al.*, 2000). Cependant, différentes équipes ont réussi à infecter efficacement des cellules épithéliales en les co-cultivant avec des LCL suggérant que des contacts directs entre ces deux types cellulaires

pourraient permettre l'entrée du virus dans des cellules malgré l'absence du CD21 (Yoshiyama *et al.*, 1997 ; Imai *et al.*, 1998 ; Chang *et al.*, 1999 ; Speck & Longnecker, 2000). Trois voies d'entrée du virus ont été décrites.

Une étude *in vitro* a montré que des immunoglobulines A (IgA) dirigées contre la gp350/220 de l'EBV favorisent l'infection des cellules épithéliales par un mécanisme d'endocytose du complexe IgA-EBV (Sixbey & Yao, 1992). En absence du CD21, L'EBV peut s'attacher aux cellules épithéliales grâce à ses protéines gH et gL et aux intégrines présentes à la surface des cellules (Borza *et al.*, 2004 ; Chesnokova *et al.*, 2009). Les virions produits par des LCL possèdent peu de gp42 à leur surface, augmentant leur tropisme pour les cellules épithéliales. A l'inverse, les virions produits par les cellules épithéliales possèdent un plus grand nombre de gp42 qui interagiront avec le CMH de classe II des lymphocytes B (**figure 12**).

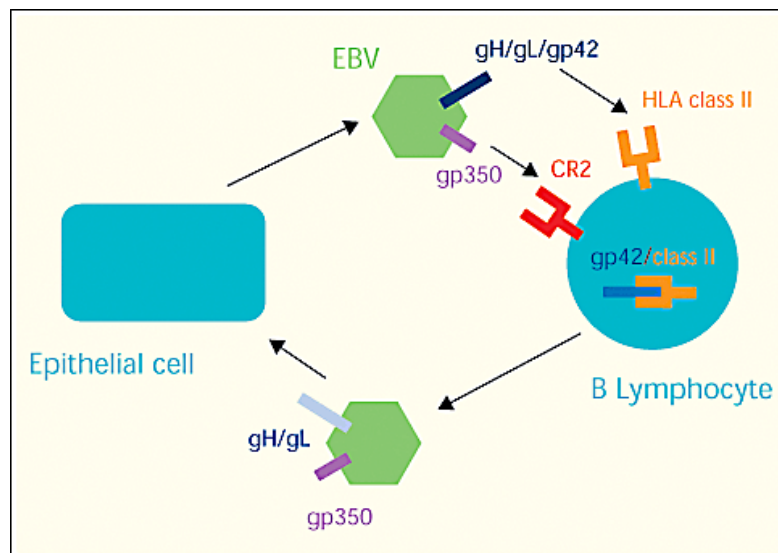


Figure 12 : Modèle de l'infection des lymphocytes B et des cellules épithéliales par l'EBV. L'EBV infecte les lymphocytes B par interaction entre la gp350 et le CD21 (CR2) puis entre le complexe gH/gL/gp42 et le CMH de classe II. Les virions produits par la LCL sont dépourvus de la gp42 qui est séquestrée par le CMH II et peuvent infecter les cellules épithéliales grâce à l'interaction du complexe gH/gL et de son récepteur. Les virions produits par la réplication virale dans les cellules épithéliales expriment de hauts niveaux de gp42 et peuvent donc infecter d'autres lymphocytes B. (D'après Farrell, 2002)

Par ailleurs, une autre glycoprotéine virale, BMRF2, a été décrite lors de l'infection des cellules épithéliales polarisées. BMRF2 possède un motif RGD (ArgGlyAsp) par lequel elle interagit avec les intégrines $\beta 1$ exprimées du côté basolatéral des cellules épithéliales (Tugizov *et al.*, 2003). Cette interaction permet l'infection des cellules épithéliales par des virus libres. De plus, le virus peut être transmis aux cellules adjacentes au niveau des membranes latérales par les jonctions serrées et les desmosomes (Tugizov *et al.*, 2003).

Enfin, plus récemment, il a été décrit un processus par lequel l'EBV utilise les lymphocytes B comme transporteur pour ensuite infecter les cellules épithéliales. Ce processus se déroule en 3 étapes : (i) fixation de virions de l'EBV à la surface des lymphocytes B grâce à l'interaction gp350/CD21, (ii) formation d'une synapse intercellulaire entre lymphocytes B et cellules épithéliales, (iii) fusion et absorption du virus par les cellules épithéliales (Shannon-Lowe *et al.*, 2006). Ce mécanisme d'infection se déroule au niveau des surfaces basolatérales des cellules épithéliales et nécessite CD11b à la surface des lymphocytes B et CD44v3 (CD44 variant 3) ainsi que LEEP-CAM (Lymphocyte-Endothelial-Epithelial Cell Adhesion Molecule) à la surface basolatérale des cellules épithéliales (Shannon-Lowe & Rowe, 2011).

1.2. Cellules cibles non conventionnelles

D'autres types cellulaires sont décrits comme pouvant être infectés par l'EBV, ils sont principalement représentés par les lymphocytes T, les cellules Natural Killer (NK) et les monocytes. Contrairement aux lymphocytes T et aux cellules NK, aucune tumeur monocyttaire associée à l'EBV n'a été décrite. D'autres cellules cibles ont été rapportées comme les granulocytes neutrophiles (Larochelle *et al.*, 1998), les cellules dendritiques folliculaires (Lindhout *et al.*, 1994) et les astrocytes (Menet *et al.*, 1999).

1.2.1. Les lymphocytes T

Différentes études démontrent que l'EBV peut infecter des lymphocytes T *in vitro* (Watry *et al.*, 1991 ; Groux *et al.*, 1997). Bien que certains lymphocytes T possèdent le récepteur CD21 (Fischer *et al.*, 1991 ; Tsoukas & Lambris, 1993), le mécanisme d'entrée du virus n'est pas encore défini. Dans les cellules T infectées, l'EBV exprime un programme de latence de type II (EBNA1, LMP1 et LMP2) (Fujiwara & Ono, 1995 ; Imai *et al.*, 1996 ; Groux *et al.*, 1997).

Des membres de notre équipe ont démontré qu'il était possible d'infecter et de transformer *in vitro* des lymphocytes T périphériques par l'EBV. Les lignées obtenues présentent un phénotype immunologique de lymphocytes T naïfs et sécrètent de l'IL2 après une stimulation antigénique. Ces cellules présentent une latence de type II et sont tumorigènes chez la souris *nude* (Groux *et al.*, 1997 ; Montpellier *et al.*, 1998).

1.2.2. Les cellules NK (Natural Killer)

Différentes études démontrent que l'EBV peut infecter des cellules NK (Kanegane *et al.*, 1996 ; Kanegane *et al.*, 1996 ; Trempat *et al.*, 2002). La modalité d'infection de ces cellules est encore mal connue. Les cellules NK n'expriment pas de CD21, mais des travaux ont montré

qu'un transfert du CD21 peut avoir lieu entre des lymphocytes B infectés et des cellules NK via des synapses immunologiques. Ceci aboutirait à l'acquisition transitoire du récepteur CD21 par les cellules NK permettant ainsi leur infection par le virus (Tabiasco *et al.*, 2003).

I.2.3. Les monocytes

Les monocytes jouent un rôle actif dans la défense de l'organisme contre l'invasion virale. Le recrutement rapide de ces monocytes/macrophages au site d'infection permet de limiter la propagation du virus durant les phases précoces de l'infection. L'inhibition des capacités de phagocytose de ces cellules permet aux virus d'échapper à la réponse immunitaire.

Le tropisme de l'EBV pour ce type cellulaire est peu décrit. Cependant, la présence du génome de l'EBV dans des monocytes a été rapportée dans différentes études (Revoltella *et al.*, 1989 ; Shimakage *et al.*, 1999). *In vitro*, l'EBV peut infecter ce type cellulaire sans pour autant induire leur immortalisation (Savard *et al.*, 2000). Il induit une modulation de la production cytokinique des monocytes infectés, notamment une diminution de la production de TNF, d'IL1 et d'IL6 (Gosselin *et al.*, 1991 ; Gosselin *et al.*, 1992).

Outre les lymphocytes T périphériques, notre équipe a également démontré qu'il était possible d'infecter et d'immortaliser des monocytes *in vitro*. Les lignées obtenues ont gardé leurs propriétés de phagocytose et de production de cytokines (TNF, IL1 et IL6) et présentent une latence virale de type II (Masy *et al.*, 2002).

II. Infection par l'EBV

II.1. Infection *in vitro*

Les différentes étapes de l'infection des lymphocytes B par l'EBV ont été mises en évidence dans des modèles de culture cellulaire *in vitro*. La première étape de l'infection est la fixation de l'EBV à la surface du lymphocyte B. Cette fixation résulte de l'interaction entre la glycoprotéine virale gp350 et le récepteur CD21 présent à la surface des cellules B. La pénétration du virus dans la cellule requiert un complexe, constitué des glycoprotéines virales gH, gL et gp42, qui se fixe au CMH de classe II (Molesworth *et al.*, 2000).

Après pénétration du virus dans la cellule, la nucléocapside transite jusqu'à l'enveloppe nucléaire et libère l'ADN viral linéaire dans le noyau. Grâce au promoteur viral Wp, les protéines de latence EBNA2 et EBNA-LP sont exprimées. Après 12h d'infection, les protéines LMP1, EBNA3A, 3B et 3C sont exprimées à partir du promoteur viral Cp. Progressivement au cours de l'infection, le génome viral se circularise pour former un épisome. Cet épisome viral

sera répliqué en même temps que les chromosomes cellulaires au cours de la phase S. A ce stade, le processus d'immortalisation est accompli.

L'expression des gènes de latence codant les protéines membranaires LMP2 et les ARN EBER et BART finalise l'établissement de la latence de type III, caractéristique des lymphocytes B infectés par l'EBV *in vitro*. Au terme de l'infection, le nombre d'épisomes au sein de chaque cellule est en moyenne de 10 à 100 copies et reste stable. Ces lymphocytes B infectés obtenus sont alors capables de proliférer indéfiniment, de transmettre à leurs cellules-filles les copies de l'épisome viral et de générer ainsi des LCL (Middeldorp *et al.*, 2003). Dans de rares cas, l'ADN de l'EBV semble pouvoir s'intégrer au génome de la cellule hôte (Takakuwa *et al.*, 2005).

II.2. Infection *in vivo*

II.2.1. Déroulement de l'infection dans l'organisme

Généralement, la contamination par l'EBV se fait par voie salivaire. Le virus se retrouve alors dans l'oropharynx de l'hôte et peut se loger à l'intérieur des cryptes amygdaliennes. Le virus doit alors franchir la barrière de cellules épithéliales avant d'infecter des lymphocytes B. Cependant, on ne sait pas si ces cellules épithéliales sont effectivement la "porte d'entrée" du virus dans l'organisme. En effet, les muqueuses, qui peuvent être en contact avec la salive contaminée, sont très infiltrées de lymphocytes, ce qui pourrait permettre un contact direct entre l'EBV et des lymphocytes B à ce niveau. Ainsi plusieurs hypothèses sont possibles pour expliquer l'entrée du virus dans l'organisme :

- L'EBV infecte directement les lymphocytes B sans infecter les cellules épithéliales. Des expériences d'hybridations *in situ* sur des biopsies d'amygdales de patients atteints de MNI ont révélé que l'EBV n'est présent que dans les lymphocytes B. Le modèle proposé suggère un contact direct des virions avec les cellules B au niveau des cryptes (Anagnostopoulos *et al.*, 1995). En effet, des cellules lymphoïdes peuvent infiltrer l'épithélium formant ainsi un « lymphoépithélium ». Cette structure pourrait permettre à l'EBV d'être directement en contact avec des lymphocytes B.

- L'EBV infecte des cellules épithéliales puis les lymphocytes B. Des expériences de co-culture de cellules épithéliales issues d'amygdales et de lymphocytes B infectées par l'EBV ont révélé que les cellules épithéliales peuvent être infectées par l'EBV (Pegtel *et al.*, 2004). L'interaction entre l'EBV et les cellules épithéliales fait intervenir les glycoprotéines gH et gL de l'enveloppe virale et des intégrines présentes à la surface des cellules épithéliales (Borza *et al.*, 2004 ; Chesnokova *et al.*, 2009).

Suite à la primo-infection, les lymphocytes B infectés expriment un programme de latence de type III et prolifèrent (Kurth *et al.*, 2000). Cette première phase d'infection virale induit une forte réponse immunitaire des lymphocytes T spécifiques des antigènes de latence III qui aboutit à la lyse de nombreuses cellules infectées. Ceci se traduit parfois, lors de la MNI, par une hyperlymphocytose qui reflète une expansion des lymphocytes T CD8+ activés. Cependant, certaines cellules échappent à cette réponse immunitaire en diminuant l'expression de leurs gènes de latence et forment le réservoir de lymphocytes B mémoires dans lesquelles aucune des protéines de latence n'est exprimée (latence virale de type 0). Lors des divisions cellulaires, ces lymphocytes B mémoires expriment EBNA1 et occasionnellement LMP2A (Qu & Rowe, 1992 ; Babcock *et al.*, 2000). Ces lymphocytes B mémoires infectés gagnent ensuite la circulation périphérique.

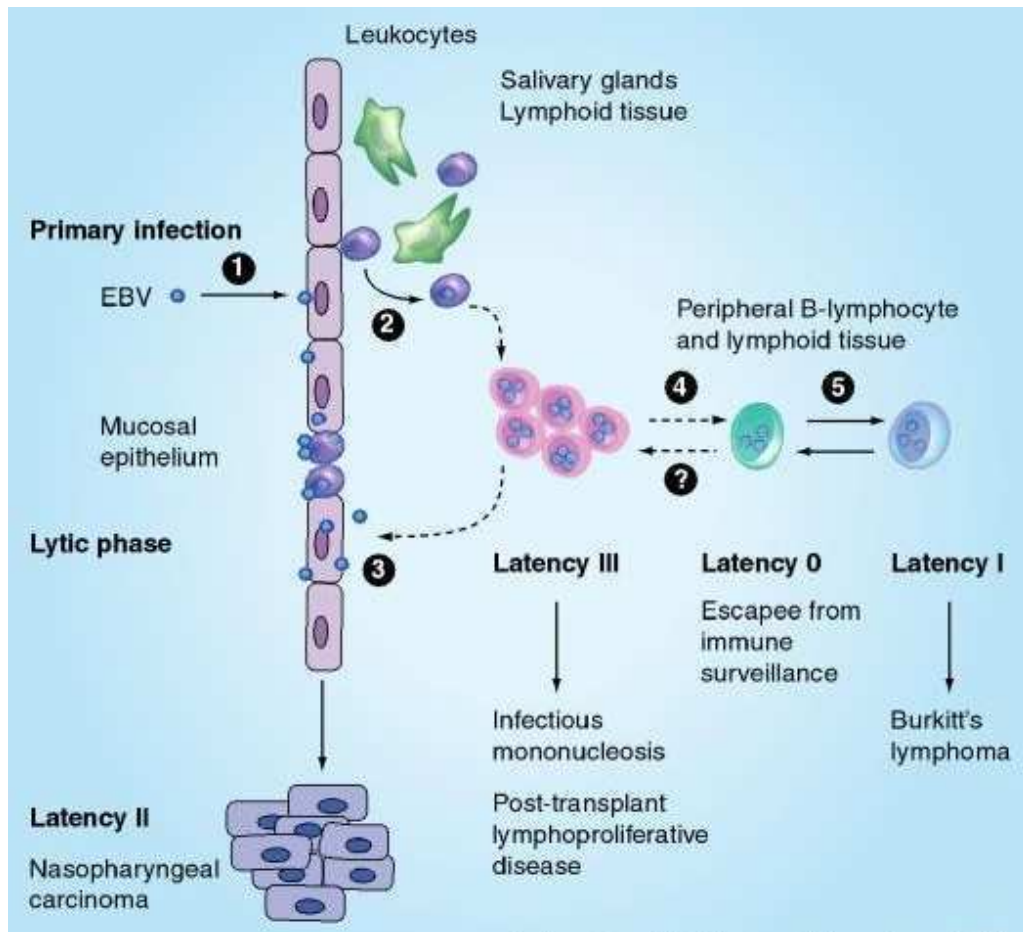


Figure 13 : Modèle de l'infection *in vivo* par l'EBV. (1, 2) Primo-infection au niveau des muqueuses de l'oropharynx. Les lymphocytes B peuvent être infectés soit directement soit indirectement. (3) Cycle répliatif . (4) Limitation de l'expansion des cellules B infectées en latence III par le système immunitaire. (5) Echappement à la réponse immunitaire par les cellules infectées n'exprimant pas de gènes de latence (latence 0). (D'après http://www.medscape.com/viewarticle/711824_2)

Parfois, l'EBV peut déclencher une phase lytique dans les lymphocytes B différenciés en plasmocytes afin de produire de nouveaux virions. Cette différenciation plasmocytaire serait à l'origine de l'induction du cycle lytique de l'EBV (Laichalk & Thorley-Lawson, 2005). Les virions produits peuvent infecter de nouveaux lymphocytes B ou des cellules épithéliales de l'oropharynx, assurant ainsi, la persistance de l'EBV dans l'organisme, ainsi que sa transmission (**figure 13**).

II.2.2. Contrôle de l'infection virale

Le système immunitaire joue un rôle capital dans la limitation de l'infection primaire par l'EBV. Lors de la primo-infection, l'infection des cellules épithéliales et/ou des lymphocytes B entraîne une réponse immunitaire cellulaire. Les cellules NK sont les premières cellules impliquées dans le contrôle de l'infection par le système immunitaire. Elles entraînent la lyse des cellules infectées et permettent de limiter la transformation des lymphocytes B par l'EBV en sécrétant de l'IFN γ (Strowig *et al.*, 2008).

Les lymphocytes T interviennent également dans ce contrôle de l'infection. Les CD8+ reconnaissent les antigènes provenant des protéines de latence (EBNA3A, 3B, 3C, LMP1 et LMP2A) et des protéines du cycle lytique (ZEBRA et Rta), et les CD4+ sont capables de reconnaître certains antigènes de protéines du cycle lytique (ZEBRA et BMLF1) et de latence (EBNA3C et EBNA1) (Hislop *et al.*, 2007).

III. Pathologies associées au virus d'Epstein-Barr

L'EBV est le premier virus tumoral humain décrit et est impliqué dans un large spectre de pathologies bénignes et malignes.

III.1. Pathologies chez l'individu immunocompétent

III.1.1. La Mononucléose Infectieuse (MNI)

La mononucléose infectieuse (MNI) est une infection bénigne généralement spontanément résolutive. C'est la forme clinique symptomatique de la primo-infection à EBV. Elle se caractérise par une amygdalite, de la fièvre, des adénopathies, une splénomégalie et une asthénie sévère. Cette affection se caractérise par une hyperleucocytose et la présence de lymphocytes T CD8+ atypiques de grande taille.

Dans de rares cas, la MNI peut évoluer vers une infection chronique active (CAEBV ou Chronic Active Epstein-Barr Virus infection). Dans sa forme sévère, elle est associée à une mortalité élevée et peut évoluer vers un lymphome (Kimura *et al.*, 2001).

III.1.2. Le Lymphome de Burkitt (LB)

L'EBV a été découvert dans des cultures de cellules tumorales issues de patients atteints de lymphomes de Burkitt (LB). Il s'agit d'un lymphome malin non hodgkinien de haut grade. La cellule lymphomateuse a pour origine un lymphocyte B et est caractérisée par la présence d'une translocation du gène *c-myc* (chromosome 8) au niveau du locus de gènes codant des immunoglobulines (chaîne lourde ou chaîne légère, sur les chromosomes 2, 14 et 22). Ces translocations chromosomiques conduisent à la surexpression de c-Myc. Ces cellules présentent une latence de type I restreinte à l'expression d'EBNA1.

III.1.3. Le Lymphome de Hodgkin (LH)

Les lymphomes hodgkiniens (LH) représentent environ 30% des lymphomes et les 2/3 sont associés à l'EBV. Le LH est une pathologie néoplasique caractérisée par la présence de cellules géantes appelées cellules de Reed-Sternberg (RS) et la désorganisation de l'architecture ganglionnaire (Kapatai & Murray, 2007). Les cellules RS sont de grandes cellules binucléées, elles constituent 2% de la masse tumorale qui est surtout constituée de cellules infiltrées non cancéreuses. De plus, ces cellules présentent une latence virale de type II avec l'expression d'EBNA1, LMP1 et LMP2 ainsi que l'expression des ARN EBER et BART.

III.1.4. Le Carcinome indifférencié du Rhinopharynx (CRP)

Le carcinome du rhinopharynx est une tumeur maligne d'origine épithéliale. Ce type de cancer est relativement peu présent dans la population caucasienne mais est très fréquent dans certains pays du Sud-est de l'Asie (Chine, Indonésie, Viêt-Nam) et d'Afrique du Nord (Tunisie,...). Son incidence dans ces régions peut être influencée par des facteurs environnementaux comme des habitudes alimentaires ou culturelles (méthodes de conservation des aliments,...). Ce carcinome est caractérisé par des cellules carcinomateuses indifférenciées associées à un important infiltrat lymphocytaire. Ces cellules présentent une latence virale de type II (EBER, BART, EBNA1, LMP1 et LMP2).

III.1.5. Autres cancers

D'autres pathologies malignes sont associées à l'EBV, notamment : des carcinomes de type lymphoépithéliome, certains carcinomes gastriques, des désordres lymphoprolifératifs des cellules T, des tumeurs associées aux cellules dendritiques folliculaires, et quelques carcinomes hépatiques et mammaires. Ces pathologies ont en commun le fait que la présence de l'EBV n'y représente qu'un événement rare, mais si l'infection a lieu, l'expression des gènes viraux peut

conduire à la tumorigenèse via de nombreuses voies de signalisation que l'on rencontre dans les lymphomes B.

III.2. Pathologies chez l'individu immunodéprimé

L'immunodépression observée notamment chez les sujets atteints du SIDA (Syndrome d'Immunodéficience Acquise) ou chez les patients transplantés est un facteur de risque dans le développement de lymphomes ou de lymphoproliférations B induits par l'EBV.

III.2.1. Désordres Lymphoprolifératifs Post-Transplantation (PTLD)

L'EBV est associé à plus de 80% des désordres lymphoprolifératifs survenant après transplantation. Il s'agit, quasi exclusivement, de proliférations qui ont pour origine des lymphocytes B des centres germinatifs. Le contexte d'immunosuppression, chez les patients transplantés, conduit à une diminution des lymphocytes T cytotoxiques spécifiques d'EBV et à une augmentation de la charge virale, ce qui favorise ainsi leur développement.

III.2.2. Pathologies chez les patients atteints du SIDA

III.2.2.1. Leucoplasie chevelue de la langue

Au cours de l'infection par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine), la leucoplasie chevelue de la langue est fréquente. Cette pathologie est rencontrée lors d'immunodéficiences et est due à la réplication de l'EBV au niveau des cellules épithéliales de la langue. Il s'agit de la seule pathologie associée à une infection lytique par l'EBV (Greenspan & Greenspan, 1989).

III.2.2.2. Lymphomes associés à l'EBV

Ces lymphomes sont principalement des lymphomes non-hodgkiniens (LNH) (lymphomes primaires du système nerveux central (PCNSL), lymphomes primitifs des séreuses (PEL), lymphomes diffus à grandes cellules B (DLBCL), lymphomes plasmablastiques et LB. L'EBV est retrouvé dans 60% des lymphomes de patients atteints du SIDA avec une très forte incidence pour les PCNSL (100%), les LH (100%), les PEL (90%), les DLBCL (80%), les lymphomes plasmablastiques (50%) et les LB (30%) (Tran *et al.*, 2008).

III.2.3. Leiomyosarcomes liés à l'immunodéficience

Dans de rares cas, les patients immunodéprimés (après transplantation ou atteints du SIDA) présentent des néoplasies de cellules musculaires lisses associées à l'EBV (McClain *et al.*, 1995). Dans ces cellules tumorales, l'EBV exprime un programme de latence de type III

(Rogatsch *et al.*, 2000). Les cellules musculaires lisses ne sont pas des cibles de l'EBV, cependant une expression variable de CD21, le récepteur de l'EBV, a été détecté dans ces cellules tumorales (Lee *et al.*, 1995 ; Rogatsch *et al.*, 2000). Aucune infection des cellules musculaires lisses normales adjacentes à la tumeur EBV+ n'a été détectée, et l'EBV n'a pas été trouvé associé aux leiomyosarcomes de patients immunocompétents.

III.2.4. Le syndrome de Purtilo

Le syndrome de Purtilo ou syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X (XLP) est une maladie génétique rare atteignant les garçons porteurs d'un déficit immunitaire sélectif vis-à-vis de l'EBV. En absence d'infection par l'EBV, ces garçons possèdent une immunité normale. La primo-infection par l'EBV peut se traduire par 4 phénotypes majeurs : une mononucléose infectieuse sévère ou fatale, un lymphome malin, une hypo ou agammaglobulinémie acquise et une anémie centrale ou pancytopenie. L'évolution est mortelle dans 70% des cas.

La cause génétique est liée à un gène localisé sur le chromosome X qui code une protéine impliquée dans l'activation des lymphocytes T. Cette protéine appelée SH2D1A ou SAP (SLAM-Associated Protein) interagit avec SLAM (Signaling Lymphocyte Activation Molecule). La mutation du gène codant SAP entraîne la perturbation de l'immunité à médiation cellulaire anti-EBV.

III.3. Pathologies auto-immunes

L'EBV est également incriminé dans certaines pathologies auto-immunes qui sont associées à un risque plus élevé de développer des lymphomes (Toussirot & Roudier, 2008). Le syndrome de Sjögren primaire (SSp), le lupus systémique érythémateux (LSE) et l'arthrite rhumatoïde (RA) sont des troubles auto-immuns complexes qui dépendent de facteurs génétiques et environnementaux, comme les virus. Dans ce contexte, l'EBV est un candidat plausible dans la physiopathologie de ces maladies. En effet, on détecte des titres élevés d'anticorps dirigés contre les protéines de latence et du cycle lytique dans les séras des patients atteints de ces pathologies autoimmunes (Balandraud *et al.*, 2004). Le mécanisme par lequel l'EBV contribue à la survenue de ces pathologies n'est pas encore élucidé.

Partie 3 : La protéine LMP1

La capacité de LMP1 à transformer différents types cellulaires, ainsi que sa présence dans les biopsies de tumeurs provenant de patients atteints de la maladie de Hodgkin ou du carcinome du rhinopharynx, suggèrent que LMP1 pourrait contribuer à la tumorigenèse et l'apparition des pathologies associées à l'EBV. Cette protéine est impliquée dans l'immortalisation des lymphocytes B par l'EBV *in vitro* (Kaye *et al.*, 1993). Différentes études montrent que LMP1 confère un phénotype malin aux cellules, induit une perte de l'inhibition de contact et favorise la croissance en l'absence de sérum (Baichwal & Sugden, 1988 ; Fahraeus *et al.*, 1990 ; Moorthy & Thorley-Lawson, 1993 ; Wang *et al.*, 1985). LMP1 est considérée comme l'oncogène majeur de l'EBV.

Bien qu'elle ne partage pas d'homologie de séquences, LMP1 est fonctionnellement apparentée aux membres de la famille du récepteur du TNF, dont le récepteur du TNF de type I (TNFR1 ; Mosialos *et al.*, 1995), le CD40 (Gires *et al.*, 1997 ; Uchida *et al.*, 1999) et le récepteur de l'IL1 (IL1-R ; Luftig *et al.*, 2003). En effet, LMP1 utilise les adaptateurs de la famille des TRAF et les médiateurs de la signalisation pour induire l'activation de voies de signalisation telles que la voie NF- κ B et les voies des MAPK.

I. Régulation de l'expression du gène codant LMP1

1.1. Promoteurs contrôlant l'expression de LMP1

Le gène BNLF1, situé dans la région U5, code pour la protéine LMP1, il peut être exprimé à partir de 2 promoteurs durant la phase de latence virale : le promoteur ED-L1 (EcoRI D fragment-located LMP1 promoter) et le promoteur TR-L1 (Terminal Repeat-located LMP1 promoter), générant respectivement des ARNm de 2,8 kb et 3,5 kb (**figure 14**).

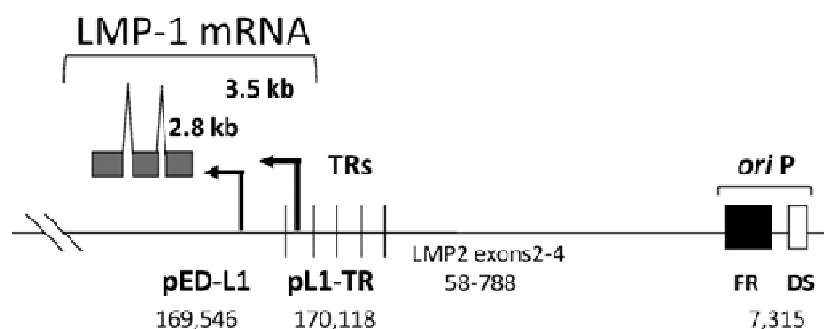


Figure 14 : Représentation schématique de l'expression du gène BNLF1. Représentation des TR (lignes verticales) fusionnés, après circularisation du génome viral, en relation avec les éléments régulateurs du gène BNLF1. Les 3 exons de ce gène sont représentés en gris. Les flèches représentent les 2 promoteurs ED-L1 et TR-L1, leur position sur le génome d'EBV (souche B95-8) est indiquée. (D'après Repic *et al.*, 2010)

Dans les lymphocytes B, LMP1 est traduit principalement à partir de l'ARNm de 2,8 kb initié au niveau du promoteur proximal ED-L1. Le transactivateur principal de ce promoteur est la protéine EBNA2 (Johannsen *et al.*, 1995) mais il peut également être activé par des facteurs de transcription cellulaire tels que les STAT ou IRF7 (Chen *et al.*, 2001 ; Ning *et al.*, 2003). Ce promoteur a la particularité d'être bidirectionnel en permettant la transcription de la protéine LMP2B (Laux *et al.*, 1994).

Dans les cellules épithéliales, dans lesquelles EBNA2 n'est pas exprimée, la transcription de l'ARNm de 3,5 kb codant LMP1 est initiée par le promoteur distal TR-L1, situé dans le premier TR du génome viral (Sadler & Raab-Traub, 1995). Cependant, il semblerait que l'activité de TR-L1 soit détectée dans certains lymphomes de Hodgkin et qu'il serait positivement régulé par les protéines STAT (Chen *et al.*, 2001 ; Chen *et al.*, 2003).

Un troisième promoteur, ED-L1A, situé dans le premier intron du gène BNLF1, est actif durant la phase lytique et est responsable de l'expression de la forme lytique de LMP1, lyLMP1 (Hudson *et al.*, 1985).

1.2. Transactivation du promoteur ED-L1 (pLMP1)

Le promoteur proximal ED-L1, également appelé pLMP1, dirige l'expression de LMP1 durant les phases de latence de type III. Différents sites de fixation pour des facteurs de transcription sont décrits (figure 15).

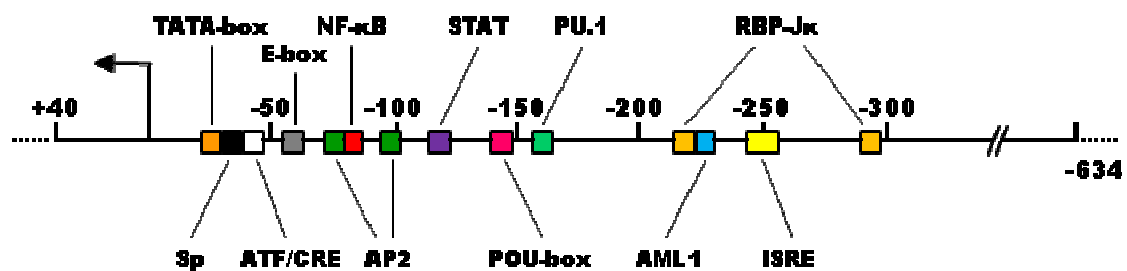


Figure 15 : Représentation schématique du promoteur proximal ED-L1. L'échelle se réfère à la position relative du site d'initiation de la transcription du promoteur ED-L1. Les sites de fixation de facteurs de transcription régulant l'activité de ce promoteur sont indiqués. RBP-Jκ (-223 à -217 et -298 à -292), ISRE (Interferon-Stimulated Response Element, -253 à -245), AML1 (Acute Myeloid Leukemia 1, -229 à -224), PU.1 (-166 à -160), POU-box (-147 à -140), STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription, -126 à -118), AP2 (-72 à -80 et -95 à -101), NF-κB (-78 à -87 et -486 à -495), E-box (-56 à -51), ATF/CRE (Activating Transcription Factor/cAMP Response Element, -38 à -44), Sp (-31 à -36) et TATA-box (-24 à -30). (D'après Sjöblom *et al.*, 1998 et Demetriades & Mosialos, 2009)

Les protéines EBNA2 et EBNA-LP jouent un rôle important dans la transactivation du promoteur ED-L1 par l'intermédiaire des sites de fixation pour RBP-Jκ, PU.1 (PU-box, pour Purine rich), les protéines POU et AP2 (Johansson *et al.*, 1995 ; Sjöblom *et al.*, 1995 ; Jansson *et*

al., 2007). L'activité promotrice de pLMP1 peut également être régulée par les protéines de latence EBNA3A et 3C (Robertson *et al.*, 1996). De plus, les éléments de réponse ATF/CRE (Activating Transcription Factor/Cyclic AMP Response Element), ISRE (Interferon-Stimulated Response Element) et le site de fixation aux STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) sont également impliqués dans la transactivation de ce promoteur (Sjöblom *et al.*, 1998 ; Ning *et al.*, 2003 ; Jansson *et al.*, 2007 ; Johansson *et al.*, 2009).

Notre laboratoire a également mis en évidence, dans des modèles cellulaires de latence de type II, la capacité de LMP1 à réguler l'activité de son propre promoteur par l'induction des voies JNK et NF- κ B (**figure 16** ; Goormachtigh *et al.*, 2006).

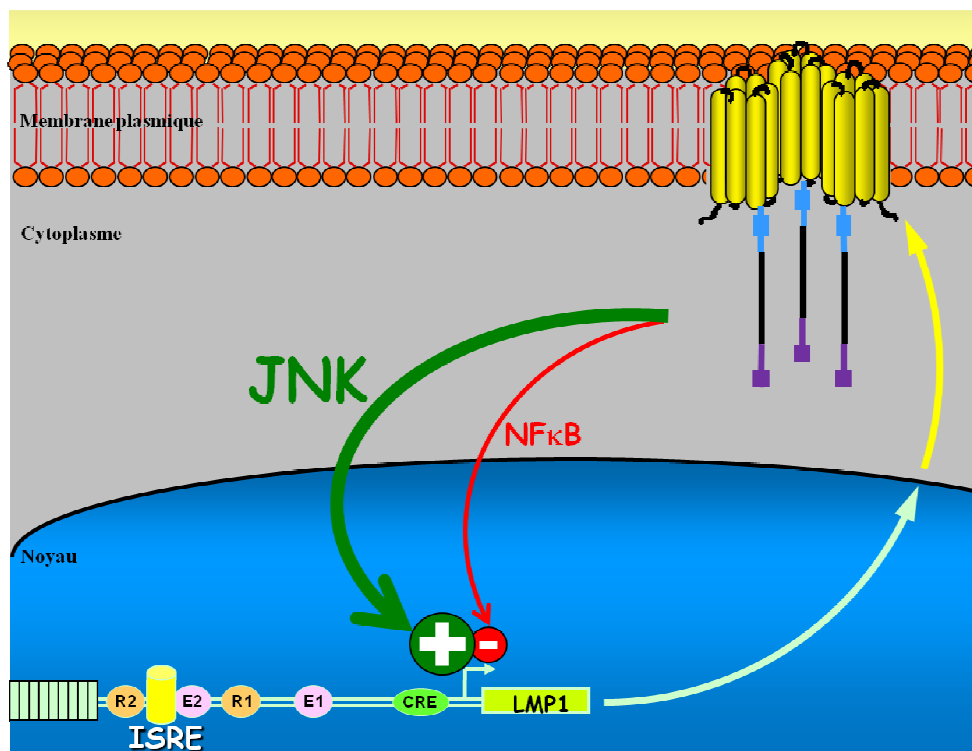


Figure 16 : Mécanisme d'autorégulation de la protéine LMP1. Représentation schématique de l'action des voies de signalisation JNK et NF- κ B, induites par LMP1, sur son propre promoteur.

I.2.1. Transactivation par EBNA2

EBNA2 se fixe à l'ADN de manière indirecte grâce à des interactions avec des protéines cellulaires, dont RBP-J κ , qui vont se fixer spécifiquement sur des séquences régulatrices. RBP-J κ est une protéine ubiquitaire qui interagit avec EBNA2 et se fixe aux séquences consensus GTGGGAA présentes sur les promoteurs des gènes viraux et cellulaires transactivés par EBNA2 (Zetterberg & Rymo, 2005). L'interaction entre EBNA2 et RBP-J κ est nécessaire mais pas suffisante pour activer l'expression de BNLF1 (Zimmer-Strobl *et al.*, 1994). En effet, EBNA2

doit aussi interagir avec PU.1, qui va permettre la fixation au promoteur au niveau de la PU-box (Laux *et al.*, 1994 ; Johannsen *et al.*, 1995). Grâce à son domaine de transactivation, EBNA2 recrute des facteurs de la machinerie de transcription et des Histone Acetyltransferases (HAT) permettant l'ouverture de la chromatine au site d'initiation de la transcription.

La protéine EBNA-LP peut également agir sur l'expression de BNLF1 en jouant le rôle de co-activateur avec EBNA2 (McCann *et al.*, 2001). De plus, EBNA2 peut interagir avec le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF, ce qui renforce l'accessibilité des facteurs à la chromatine (Wu *et al.*, 2000).

Les protéines EBNA3 (3A, 3B et 3C) peuvent quant à elles réguler négativement la transactivation du promoteur ED-L1 par EBNA2 en se liant à la protéine RBP-Jκ (Robertson *et al.*, 1996).

I.2.2. Autres transactivateurs du promoteur pLMP1

Le promoteur ED-L1 peut être transactivé par d'autres protéines virales. En l'absence d'EBNA2, la protéine RK-BARF0, issue de la région BamHI A, peut induire l'expression de BNLF1 grâce à son interaction avec Notch (Kusano & Raab-Traub, 2001). La protéine du cycle lytique Rta (BRLF1) peut induire l'expression du gène codant LMP1 à partir de ses deux promoteurs TR-L1 et ED-L1 (Chang *et al.*, 2004).

Le promoteur ED-L1 peut être activé de manière indépendante d'EBNA2 par différentes protéines cellulaires incluant IRF7 (Ning *et al.*, 2003), STAT (Chen *et al.*, 2001) et ATF1/CREB1 (Sjöblom *et al.*, 1998 ; Chen *et al.*, 2001).

II. Structure, métabolisme et localisation subcellulaire

II.1. Structure

LMP1 est une protéine membranaire de 63 kDa et dont la séquence primaire comporte 386 aa (**figure 17**). La structure de LMP1 peut être subdivisée en trois parties : un segment N-terminal (NT) cytosolique de 24 aa, une partie de 162 aa composée de 6 domaines transmembranaires (TM) et d'un domaine C-terminal (CT) cytosolique de 200 aa.

Le domaine NT, constitué de 24 aa, est riche en arginine et en proline. Il joue un rôle important dans l'orientation et l'ancrage de LMP1 à la membrane et dans son agrégation constitutive, participant ainsi au pouvoir transformant de LMP1 (Kaye *et al.*, 1993 ; Izumi *et al.*, 1994 ; Coffin *et al.*, 2001). La partie N-terminale possède un site d'ubiquitinylation permettant la dégradation de LMP1 par le protéasome (Aviel *et al.*, 2000), cette modification contribue au « turn-over » rapide de LMP1, dont la demi-vie est d'environ 5h.

d'adaptateurs cellulaires associés à la famille du récepteur au TNF, les TRAF (TNF Receptor Associated Factors ; Mosialos *et al.*, 1995). La région CTAR1 désigne les résidus d'acides aminés 187 à 231 et la région CTAR2 les résidus 351 à 386 (Huen *et al.*, 1995). Au sein des régions CTAR1 et CTAR2, il a été décrit les domaines fonctionnels TES1 et TES2 qui possèdent des motifs consensus nécessaires à la fixation des adaptateurs. La région CTAR1/TES1 comporte le motif consensus Pro₂₀₄-X-Gln₂₀₆-X-Thr₂₀₈ (P₂₀₄-X-Q₂₀₆-X-T₂₀₈) nécessaire à la fixation des adaptateurs TRAF. Une mutation des résidus de proline, glutamine et thréonine en résidus d'alanine réduit l'association de LMP1 avec les TRAF (Devergne *et al.*, 1996 ; Devergne *et al.*, 1998). Au sein de la région CTAR2/TES2, le motif Y₃₈₄-Y₃₈₅-D₃₈₆ est indispensable pour la fixation de l'adaptateur TRADD (TNF Receptor-Associated Death Domain). La mutation en I₃₈₄-D₃₈₅ réduit significativement la liaison de TRADD à LMP1 (Izumi *et al.*, 1997).

Il existe une troisième région, CTAR3, entre les résidus 232 et 350 qui n'est pas essentielle pour l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro* (Izumi *et al.*, 1999), cependant, la région CTAR3 pourrait activer la voie de signalisation JAK/STAT par la fixation de JAK3 au niveau de 2 motifs consensus (P₂₇₅-X-X-P₂₇₈-X-P₂₈₀ et P₃₀₂-X-X-P₃₀₅-X-P₃₀₇ ; Gires *et al.*, 1999). Cependant, la délétion de cette région ne semble pas perturber l'interaction de JAK3 avec LMP1 dans des LCL (Higuchi *et al.*, 2002).

II.2. Modifications post-traductionnelles

LMP1 peut subir différentes modifications post-traductionnelles (**figure 17**). En effet, LMP1 peut être palmitoylée sur sa Cystéine-78, même si cette modification ne semble pas être impliquée dans l'adressage de LMP1 aux radeaux lipidiques (Higuchi *et al.*, 2001). LMP1 peut également être phosphorylée sur plusieurs résidus (**figure 17** ; Moorthy & Thorley-Lawson, 1993 ; Chien *et al.*, 2006). Ces phosphorylations ne semblent pas essentielles au pouvoir transformant de LMP1. La kinase CK2 (Casein Kinase 2) a été identifiée comme étant majoritairement responsable de ces phosphorylations (Chi *et al.*, 2002).

La protéine LMP1 peut également être clivée après CTAR1 entre l'Asparagine-241 et la Leucine-242 générant un fragment p35 ancré à la membrane et un fragment soluble p25 (Moorthy-Lawson, 1990). Aucune donnée n'est disponible sur l'impact fonctionnel de ce clivage.

II.3. Dégradation

LMP1 est une protéine à demi-vie très courte, environ 5 heures. Cette propriété semble jouer un rôle important dans la fonctionnalité de la protéine (Martin & Sugden, 1991).

L'ubiquitinylation du domaine amino-terminal semble dépendre d'un domaine CTAR1 fonctionnel (Rothenberger *et al.*, 2003) et être impliquée dans la dégradation de LMP1 par le protéasome (Aviel *et al.*, 2000). En effet, l'utilisation d'inhibiteur du protéasome dans des cellules épithéliales infectées par l'EBV permet la stabilisation de cette protéine (Hau *et al.*, 2011).

II.4. Localisation subcellulaire

LMP1 est localisée aussi bien dans la membrane plasmique que dans les différentes membranes internes. Dans les LCL, elle est plus fréquemment localisée dans la membrane plasmique (Hennessy *et al.*, 1984 ; Liebowitz *et al.*, 1986). Elle s'y concentre sous forme d'oligomères constitutifs au niveau de zones enrichies en cholestérols et en sphingolipides appelées radeaux lipidiques ou rafts (Clausse *et al.*, 1997). Dans les cellules épithéliales ou les fibroblastes, la répartition de LMP1 est plus homogène dans les différentes membranes cellulaires (Wang *et al.*, 1985 ; Wang *et al.*, 1988). Dans tous les cas, LMP1 y possède une activité signalisatrice (Lam & Sugden, 2003).

La protéine LMP1 peut également être sécrétée par des exosomes dans le microenvironnement tumoral où, suite à son transfert intercellulaire, elle pourrait inhiber la croissance des lymphocytes T avoisinants (Flanagan *et al.*, 2003 ; Meckes *et al.*, 2010).

III. La forme lytique de la protéine LMP1

Un variant tronqué de la protéine LMP1 est décrit, il est exprimé à partir du promoteur ED-L1A situé dans le premier intron du gène BNLF1 et est traduit à partir du site d'initiation interne situé au niveau de la méthionine 129 (Met₁₂₉, **figure 17** ; Hudson *et al.*, 1985). Cette protéine est appelée LMP1 lytique ou lyLMP1, elle correspond à la délétion complète de la partie N-terminale et des 4 premiers domaines transmembranaires de LMP1. Cette forme tronquée de LMP1 est détectée lors des premières phases de l'infection par l'EBV et lors de la réactivation virale (Erickson & Martin, 1997). Dans les cellules épithéliales, lyLMP1 ne possède pas de propriétés oncogéniques et semble inhiber la voie de signalisation NF-κB induite par LMP1 (Erickson & Martin, 2000). De plus, lyLMP1 inhibe les propriétés transformantes de LMP1 et diminue sa demi-vie (Pandya & Walling, 2004 ; Pandya & Walling, 2006). LyLMP1 possède la partie C-terminale de LMP1, elle pourrait avoir un effet dominant négatif de LMP1 en fixant les adaptateurs cellulaires de LMP1 par ses domaines CTAR1/TES1 et CTAR2/TES2. Ceci entraînerait une modification de la signalisation de LMP1 et modulerait son expression,

expliquant l'alternance du niveau d'expression de ces 2 protéines entre les phases de latence et les phases lytiques.

IV. Mécanisme d'action de la protéine LMP1

IV.1. Signalisation de LMP1

Les propriétés de LMP1 sont associées à la transduction du signal émanant de la région CT et plus précisément de CTAR1 et de CTAR2. Cette signalisation n'a lieu qu'après l'ancrage et l'oligomérisation de LMP1 à la membrane.

IV.1.1. Agrégation constitutive au niveau de la membrane plasmique

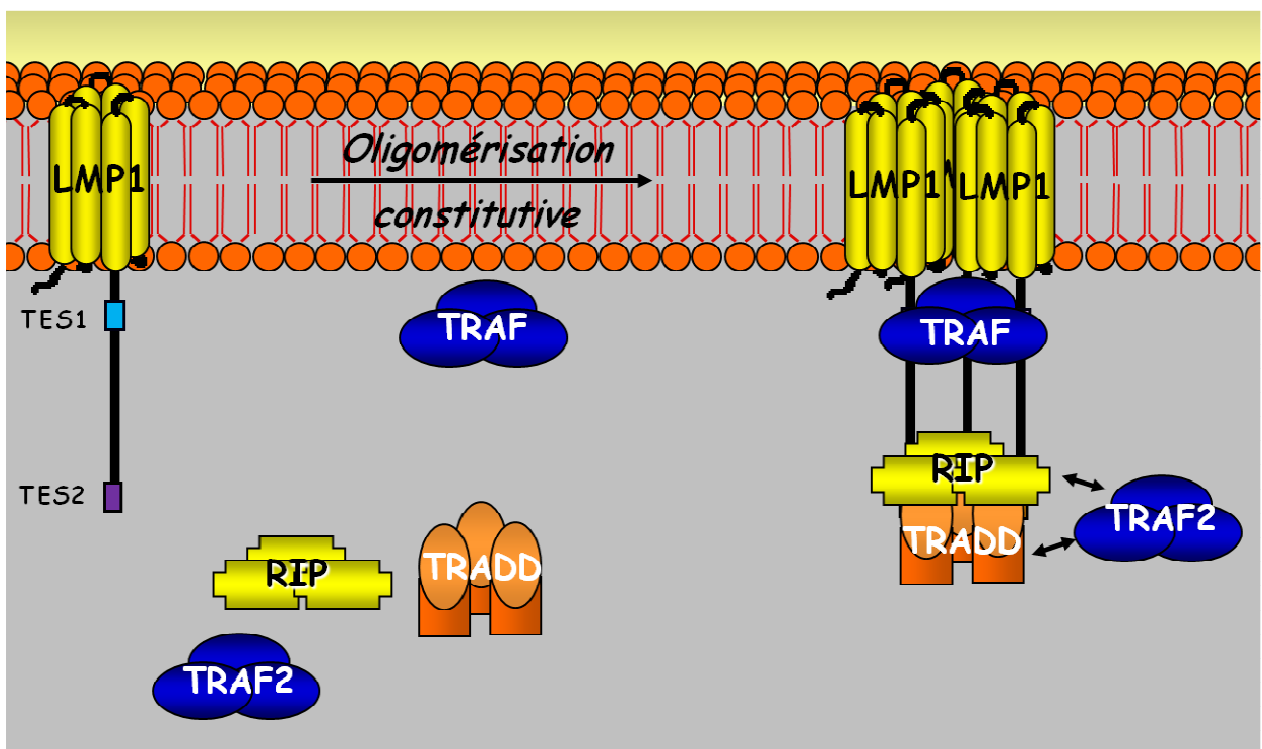


Figure 18 : Agrégation de la protéine LMP1. Représentation schématique de l'agrégation constitutive de la protéine LMP1 au niveau de la membrane permettant le recrutement d'adaptateurs cellulaires.

La protéine LMP1 est fonctionnellement apparentée à la famille des récepteurs du TNF, cependant, contrairement à ces récepteurs, LMP1 ne nécessite pas la fixation d'un ligand pour être active (Gires *et al.*, 1997, Kaykas *et al.*, 2001). Son activation dépend de sa multimérisation grâce à ses domaines NT et TM. En effet, ces deux domaines ne sont pas directement responsables de la signalisation mais sont indispensables pour les propriétés transformantes de LMP1. Le domaine NT participe au bon ancrage et à l'orientation correcte du domaine TM (Coffin *et al.*, 2001). Le domaine TM, par son association constitutive en agrégat dans la membrane plasmique, permet au domaine cytoplasmique CT d'interagir de façon constitutive

avec les facteurs qui interviennent normalement dans la signalisation des membres de la famille des récepteurs du TNF, et notamment les TRAF (**figure 18**). Le domaine TM favoriserait donc la transduction du signal à partir du domaine CT (Kaykas *et al.*, 2001 ; Uemura *et al.*, 2006). Cette agrégation à la membrane est donc essentielle pour la signalisation de LMP1.

IV.1.2. Recrutement des adaptateurs proximaux

L'utilisation de mutants de délétion a permis de montrer le rôle essentiel du domaine cytoplasmique C-terminal de LMP1, codé par l'exon 3 du gène BNLFI, dans les changements phénotypiques et l'immortalisation des lymphocytes B primaires (Kaye *et al.*, 1995).

La délétion de CTAR1 ne permet plus les changements phénotypiques et l'immortalisation des lymphocytes B par l'EBV, alors que l'absence de CTAR2 empêche seulement leur croissance à long terme (Kaye *et al.*, 1995 ; Izumi *et al.*, 1997 ; Izumi & Kieff, 1997 ; Kaye *et al.*, 1999). Le domaine CTAR1/TES1 est donc essentiel à la transformation et CTAR2/TES2 joue un rôle primordial dans l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro*. A l'opposé, la région CTAR3 ne semble pas essentielle à la transformation et à l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro* (Izumi *et al.*, 1999 ; Dirmeier *et al.*, 2003 ; Li & Chang, 2003). LMP1 induit le recrutement de protéines adaptatrices ou adaptateurs cellulaires qui sont en grande majorité, les mêmes que ceux utilisés par les membres de la super famille des TNFR (**figure 18**).

IV.1.2.1. Au niveau de CTAR1

Le domaine CTAR1/TES1 est impliqué dans l'activation des voies de signalisation NF- κ B, MAPK et PI3K par l'intermédiaire des protéines TRAF (**figure 19**). En effet, il contient un motif consensus Pro₂₀₄-X-Gln₂₀₆-X-Thr₂₀₈ (P₂₀₄-X-Q₂₀₆-X-T₂₀₈, X étant un acide aminé quelconque) de fixation des TRAF. Il existe actuellement 7 membres des protéines TRAF (TRAF1 à TRAF7).

A l'exception de TRAF1, dont l'expression est restreinte à certains types tissulaires comme par exemple les lymphocytes B qui l'expriment très fortement (Eliopoulos *et al.*, 2003), les TRAF sont ubiquitaires. Les TRAF sont une famille de protéines cytoplasmiques adaptatrices qui ont été identifiées comme s'associant avec des membres de la superfamille des TNFR. Elles permettent l'induction de différentes voies de signalisation impliquées dans la survie cellulaire, la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire (Soni *et al.*, 2007).

Les TRAF possèdent dans leur extrémité C-terminale (CT) une région homologue très conservée entre les différents membres de cette famille dénommée domaine TRAF. Ce domaine contient une région conservée située en C-terminal, appelée TRAF-C, et une région coiled-coil située en N-terminal, TRAF-N (Häcker *et al.*, 2011). TRAF7, découvert plus récemment, ne

comporte que le domaine TRAF-N. A la place du domaine TRAF-C se trouve un domaine « WD40 repeats » (Bouwmeeste *et al.* 2004 ; Morita *et al.*, 2005).

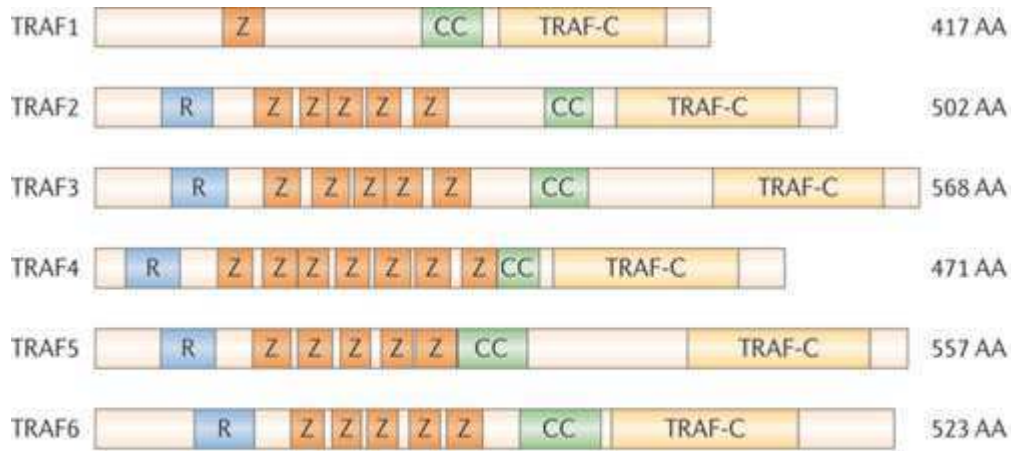


Figure 19 : Structure schématique des protéines TRAF. Les 6 protéines TRAF contenant un domaine TRAF-C sont représentées. Tous les TRAF, sauf TRAF1, possèdent un domaine RING finger (R) en N-term. Le domaine TRAF contient une région coiled-coil (CC) et un domaine TRAF-C en C-term (D'après Häcker *et al.*, 2011)

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

Le domaine fonctionnel CTAR1/TES1 de LMP1 interagit directement avec les protéines TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF5 (Mosialos *et al.*, 1995 ; Devergne *et al.*, 1996 ; Kaye *et al.*, 1996 ; Sandberg *et al.*, 1997 ; Xie & Bishop, 2004). Le motif P₂₀₄XQ₂₀₆XT₂₀₈ présent dans le domaine CTAR1 est un motif consensus essentiel à leur fixation, même si les séquences environnantes influencent aussi ces interactions (Devergne *et al.*, 1996 ; Franken *et al.*, 1996 ; Wu *et al.*, 2005). De plus, des expériences menées avec des variants de LMP1 délétés de la région CTAR1 montrent l'importance de ce domaine dans l'effet transformant de LMP1 dans les lymphocytes B, impliquant les protéines TRAF dans ce processus (Izumi *et al.*, 1997).

IV.1.2.2. Au niveau de CTAR2

Le domaine CTAR2/TES2 est impliqué dans l'activation des voies de signalisation NF-κB, MAPK et IRF7 par l'intermédiaire des protéines TRADD et RIP. LMP1 recrute TRADD par son

extrémité N-terminale contrairement à son recrutement *via* son domaine de mort ou DD (Death domain) par les membres de la famille du TNFR (Kieser *et al.*, 1999). TES2 possède le motif Tyr₃₈₄-Tyr-Asp₃₈₆ (YYD) indispensable pour la fixation de TRADD. En effet, une mutation au niveau de ce site réduit significativement la liaison de TRADD à LMP1 (Izumi *et al.*, 1997). La protéine adaptatrice TRADD permet le recrutement de la protéine TRAF2 au domaine CTAR2 (Kaye *et al.*, 1996). RIP interagit également avec LMP1 au niveau du motif critique de CTAR2, YYD. Elle est décrite comme non indispensable pour la signalisation de LMP1 (Wan *et al.*, 2004). Plus récemment, des travaux ont montré que la protéine BS69 permet l'interaction de TRAF6 avec LMP1 et qu'elle est impliquée dans l'activation de la voie JNK au niveau de CTAR2 (Wan *et al.*, 2006). TRAF6 ne se lie pas directement à LMP1 mais par l'intermédiaire de la protéine BS69, originellement décrite comme répresseur transcriptionnel (Wan *et al.*, 2004 ; Wan *et al.*, 2006).

IV.1.2.3. Le cas de CTAR3

Cette région CTAR3, comprise entre CTAR1 et CTAR2, comprend une séquence PPQLT des aa 320 à 324, ressemblant à un motif de fixation pour les TRAF, PXQXT/S, mais qui ne semble pas fonctionnel. Cette région possède un site de clivage par des protéases (entre les aa 241 et 242), ainsi que 19 sites potentiels de phosphorylation de sérine ou de thréonine. De plus, cette région contient des séquences qui sont variables en fonction des isolats humains, rapportées comme affectant la capacité de LMP1 à transformer des fibroblastes de rongeur (Hu *et al.*, 1991 ; Li *et al.*, 1996 ; Mehl *et al.*, 1998).

En outre, CTAR3 possède des sites consensus caractéristiques pour l'interaction avec des membres de la famille des JAK qui définissent deux motifs particuliers. Le premier motif nommé « motif box 1 » est une séquence riche en proline (PXXXPX), il est censé servir à la fixation des JAK (aa P₂₇₅HDPLP₂₈₀ et aa P₃₀₂HDPLP₃₀₇). Le deuxième motif nommé « motif box 2 » joue un rôle dans l'activation de kinases (aa P₃₂₀PQLTEEVENK₃₃₀) (Gires *et al.*, 1999). Cette région CTAR3 n'est pas essentielle pour la transformation des lymphocytes B par l'EBV (Izumi *et al.*, 1999). Une interaction directe a été rapportée entre LMP1 et JAK3 par l'intermédiaire des acides aminés 233 à 350. Cependant, l'activation de JAK3 et de STAT3 dans des lymphocytes B infectés par l'EBV, demeure très controversée (Gires *et al.*, 1999 ; Higuchi *et al.*, 2002).

IV.1.3. Les adaptateurs distaux : les médiateurs du signal

Le recrutement des adaptateurs proximaux au niveau des sites TES1 et TES2 permet l'interaction de LMP1 avec d'autres protéines cellulaires qui vont assurer la médiation du signal

grâce à leur capacité d'interagir et d'activer les protéines des cascades de signalisation (**figure 20**). Les principaux médiateurs du signal de LMP1 sont la protéine **TRAF6** (TNF Receptor Associated Factor 6), la protéine **NIK** (NF- κ B Inducing Kinase), **IRAK1** (IL-1 Receptor Associated Kinase1) et le complexe **TAB1/TAB2/TAK1** (TAB pour TAK1 Binding protein et TAK1 pour Transforming growth factor-beta-Activated Kinase).

IV.1.3.1. TRAF6

TRAF6 joue un rôle important dans l'activation par LMP1 des voies NF- κ B, JNK et p38 (Schultheiss *et al.*, 2001 ; Wan *et al.*, 2004 ; Wan *et al.*, 2006 ; Wu *et al.*, 2006). Elle est également indispensable pour la signalisation de l'IL1 et est impliquée dans celle du TNFR1. Dans le cas de la signalisation de LMP1, TRAF6 semble être recrutée par LMP1 *via* la protéine BS69 (Wan *et al.*, 2006) et se lie au complexe TAB1/TAB2/TAK1 (Wan *et al.*, 2004).

IV.1.3.2. NIK

La protéine kinase **NIK** (NF- κ B Inducing Kinase) est une protéine impliquée dans l'activation de l'isoforme α des IKK (I κ B Kinase). Cette induction de la voie NF- κ B est dite non canonique. Cette voie induite par NIK est utilisée par différents membres de la famille du TNFR, tels que CD40, LT β R et BAFF-R. La protéine majoritairement associée à NIK est l'adaptateur TRAF3. Le domaine TRAF-C de TRAF3 interagit avec le partie N-terminale de NIK (Liao *et al.*, 2004). Dans le cas de la signalisation de LMP1, l'activation de NIK *via* le domaine CTAR1 fait intervenir principalement TRAF2 et TRAF3 (Luftig *et al.*, 2004).

IV.1.3.3. Le complexe TAK1-TAB1-TAB2

Le complexe formé par les protéines **TAB** et **TAK1** est essentiel pour l'activation des voies de signalisation par LMP1. TAB1, qui recrute TAB2, est l'activateur principal de TAK1 (Shibuya *et al.*, 1996). TAB2 permet de réguler les interactions du complexe et se fixe préférentiellement aux chaînes de polyubiquitine en Lys63 (Akira *et al.*, 2006). TAK1 est une Mitogen Activated Protein Kinase d'ordre 3 (MAPKKK ou MAP3K) qui est impliquée dans l'induction d'au moins trois voies de signalisation (NF- κ B, JNK et p38) grâce à sa capacité d'activer les IKK et les MAP2K (Wan *et al.*, 2004 ; Wu *et al.*, 2006 ; Weston & Davis, 2007).

IV.1.3.4. IRAK1

La protéine kinase **IRAK1** (IL1 Receptor Associated Kinase 1) est une protéine impliquée dans la signalisation des IL1R/TLR. Dans cette signalisation, IRAK1 est recrutée au récepteur

via l'adaptateur Myd88 puis, après sa phosphorylation, elle se dissocie du récepteur et interagit avec TRAF6 et le complexe TAK1-TAB1-TAB2.

Dans le cas de la signalisation de LMP1, IRAK1 est située plutôt en aval de TRAF6. Elle est recrutée par TRAF6 et elle permettrait la phosphorylation de p65/RelA pour induire la voie NF- κ B et l'activation de la voie p38. Cependant, d'autres travaux semblent indiquer qu'elle ne serait pas indispensable à l'activation des voies NF- κ B et JNK par LMP1 (Wan *et al.*, 2004 ; Wu *et al.*, 2006).

IV.2. Voies de signalisation induites par LMP1

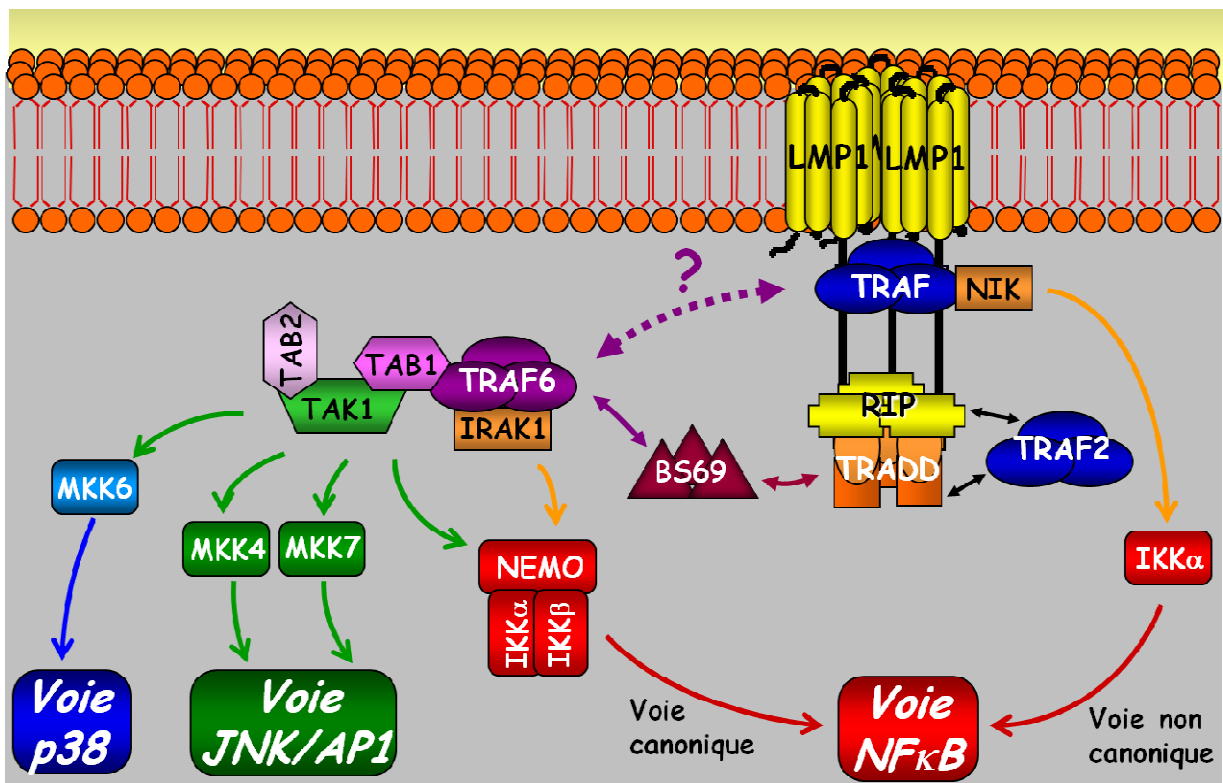


Figure 20 : Complexité de la signalisation induite par LMP1. Représentation schématique de l'activation des voies de signalisation cellulaire induites par la protéine LMP1. Les flèches représentent les interactions entre les différentes protéines.

IV.2.1. La voie NF- κ B

La voie NF- κ B est la principale voie de signalisation activée par LMP1. L'inhibition de NF- κ B diminue les capacités transformantes de LMP1 (Erickson & Martin, 2000) et sensibilise les cellules à l'induction de l'apoptose (Cahir-McFarland *et al.*, 1999 ; Feuillard *et al.*, 2000 ; He *et al.*, 2000). L'activation de la voie NF- κ B nécessite, au préalable, l'oligomérisation de LMP1 (Huen *et al.*, 1995).

A partir de ses deux domaines essentiels pour sa signalisation, CTAR1/TES1 et CTAR2/TES2, LMP1 est capable d'induire les 2 voies d'activation des facteurs NF- κ B (**figure**

21). Grâce à CTAR1/TES1, LMP1 induit la voie alternative ou non-canonique de NF- κ B (**figure 20**). CTAR1/TES1 interagit avec les adaptateurs TRAF1, TRAF2, TRAF3 et TRAF5 (Mosialos *et al.*, 1995 ; Devergne *et al.*, 1996). Parmi ces TRAF, seul TRAF3 semble indispensable à l'induction de la voie NF- κ B dans les lymphocytes B (Xie *et al.*, 2004 ; Xie *et al.*, 2008) et est la seule protéine TRAF associée à LMP1 dans les radeaux lipidiques (Ardila-Osorio *et al.*, 2005). TRAF3 recrute la kinase NIK, qui, après autophosphorylation, active la kinase IKK α par phosphorylation de résidus sérine. A son tour, IKK α phosphoryle p100 (NF κ B2) induisant la formation de la sous-unité active p52 qui va ensuite s'associer aux sous-unités RelA ou RelB puis être transloquée dans le noyau (Luftig *et al.*, 2004).

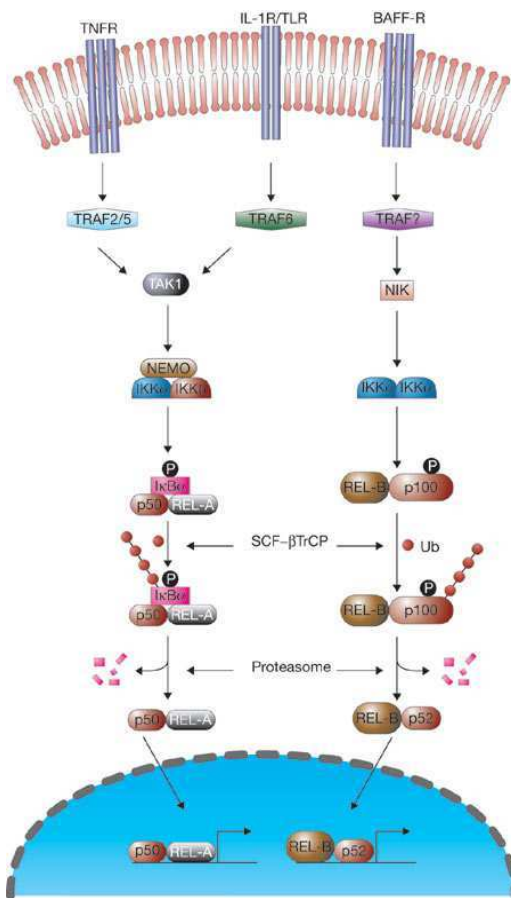


Figure 21 : Activation de la voie NF- κ B. Les 2 voies d'activation de la voie NF- κ B : la voie canonique (à gauche) et non canonique (à droite). NEMO (NF- κ B Essential Modulator) est l'autre nom d'IKK γ . (D'après Chen, 2005)

Le domaine CTAR2/TES2 interagit avec les adaptateurs TRADD et RIP (**figure 20**). TRADD est essentielle à l'activation de la voie NF- κ B (Schneider *et al.*, 2008). Puis TRAF6 est recrutée par l'intermédiaire de la protéine BS69 (Izumi *et al.*, 1997 ; Wan *et al.*, 2006 ; Wu *et al.*, 2006).. Ensuite, TRAF6 recrute et active le complexe TAK1-TAB1-TAB2. Ce complexe active par phosphorylation le complexe des kinases IKK (IKK α /IKK β /IKK γ). Cependant, TAK1 ne semblerait pas essentielle dans l'activation de la voie NF- κ B (Uemura *et al.*, 2006). Le complexe IKK phosphoryle la protéine I κ B α qui est dégradée par le protéasome après polyubiquitinylation

(Karin & Ben-Neriah, 2000). Les complexes NF- κ B, contenant majoritairement les sous-unités RelA, p50 et c-Rel sont alors transloqués dans le noyau.

IRAK1 peut également être recrutée en aval de TRAF6. Cette kinase semble capable d'induire la phosphorylation de la Sérine-536 de la sous-unité RelA/p65 (Song *et al.*, 2006) mais ne serait pas essentielle à l'activation de la voie NF- κ B par LMP1 (Wu *et al.*, 2006).

IV.2.2. Les voies des MAP Kinases

Les principales MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) induites par LMP1 sont les extracellular regulated kinases 1 et 2 (ERK1/2), les c-Jun amino-terminal kinases 1 à 3 (JNK1 à 3) et les isoformes de p38 (α , β , γ et δ). Ces protéines sérine/thréonine kinases contrôlent un grand nombre de processus cellulaires tels que la croissance, la prolifération, la différenciation, la migration cellulaire et l'apoptose (Dhillon *et al.*, 2007). L'activation des MAPK se déroule en cascade : une MAPKKK (MAP Kinase Kinase Kinase) phosphoryle et active une MAPKK, qui active une MAPK, qui active enfin différents facteurs de transcription.

IV.2.2.1. La voie JNK

Quel que soit le type de variant étudié, la voie JNK est dans tous les cas activée par LMP1, suggérant que cette voie est essentielle dans la pathogenèse associée à LMP1. La molécule-clé pour l'activation de la voie JNK par LMP1 est TRAF6 (Wan *et al.*, 2004). Comme pour la voie canonique de NF- κ B, TRAF6 recrute le complexe TAK1-TAB1-TAB2. TAK1 est une MAP kinase d'ordre 3 (MAPKKK) essentielle à l'activation de la voie JNK (Uemura *et al.*, 2006). Cette MAPKKK phosphoryle et active les MAP kinase d'ordre 2, MKK4 et MKK7, connues pour activer JNK (**figure 20** ; Weston & Davis, 2007).

Dans les lymphocytes B, LMP1 active la voie JNK par le domaine CTAR1/TES1 en recrutant principalement TRAF1 (Eliopoulos *et al.*, 2003). Au domaine CTAR2/TES2, TRAF6 est recrutée par l'intermédiaire de la protéine BS69 (Wan *et al.*, 2006). Le recrutement de BS69 nécessite son export nucléaire par LMP1 par un mécanisme encore inconnu. Cependant, parmi les protéines qui interagissent avec BS69, le facteur de transcription Ets2 est, à l'heure actuelle, le seul décrit comme exporté du noyau par LMP1 (Ohtani *et al.*, 2003).

IV.2.2.2. La voie p38

Il existe 4 isoformes de p38 : p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ , connues aussi respectivement sous le nom de SAPK2a, SAPK2b, SAPK3 et SAPK4 (Stress-Activated Protein Kinase). La voie p38 est impliquée dans différents processus cellulaires tels que la sénescence, l'inhibition de contact,

la réponse aux dommages de l'ADN et la suppression de tumeurs (Cuadrado & Nebreda, 2010). L'activation de p38 implique une cascade de phosphorylations activatrices initiée par une MAPKKK (MEKK1 à 3, MLK2/3, TAO1/2, ASK1, TAK1) et suivie par une MAPKK (MKK3, MKK4 et MKK6).

Les deux domaines CTAR1/TES1 et CTAR2/TES2 peuvent induire la voie p38 après recrutement de TRAF2 (Eliopoulos *et al.*, 1999). Ainsi, TRAF6 est recrutée par l'intermédiaire de TRAF2 au niveau du domaine CTAR1/TES1 et par l'intermédiaire de TRADD au niveau du domaine CTAR2/TES2 comme pour la voie NF- κ B (Schultheiss *et al.*, 2001). Après le recrutement de TRAF6, s'ensuivent l'activation d'IRAK1 et le recrutement du complexe protéique TAK1-TAB1-TAB2. TAK1 phosphoryle et active MKK6 qui active à son tour p38 (**figure 20** ; Schultheiss *et al.*, 2001 ; Ashwell, 2006). Enfin, IRAK1 a été décrite comme pouvant induire l'activation de p38 (Song *et al.*, 2006).

LMP1 induit *via* la voie p38 l'expression d'un certain nombre de cytokines, telles que l'IL6, l'IL8 et la chimiokine IP10 (Eliopoulos *et al.*, 1999 ; Vockerodt *et al.*, 2001), et l'activation de p53 (Li *et al.*, 2007).

IV.2.2.3. La voie ERK

La voie ERK (Extracellular Regulated Kinase) est impliquée dans des processus cellulaires variés comme la prolifération, la différenciation, la migration et la survie cellulaire. Une dérégulation de cette voie mène invariablement à une transformation pathologique (McCubrey *et al.*, 2007). ERK est activée par une cascade de phosphorylation classique : MAPKKK (Raf) puis MAPKK (MEK1/2).

LMP1 est capable de détourner la voie ERK (Roberts & Cooper, 1998). La voie ERK est induite par le domaine CTAR1/TES1, probablement suite au recrutement de TRAF2, TRAF3 et TRAF5 (Chuang *et al.*, 2005 ; Mainou *et al.*, 2007 ; Dawson *et al.*, 2008). L'activation de cette voie de signalisation par LMP1 semble requise pour la transformation des fibroblastes Rat-1 (Roberts & Cooper, 1998), et augmente la motilité cellulaire et les capacités invasives de cellules épithéliales (Dawson *et al.*, 2008).

IV.2.3. La voie PI3 kinase

La voie de signalisation PI3K (Phosphatidylinositol 3 kinase) est impliquée dans de nombreux processus biologiques comme la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Les PI3K sont des lipide kinases ayant la capacité de phosphoryler les phosphoinositides. Elles se présentent généralement sous forme d'hétérodimères constitués d'une sous-unité régulatrice p85

et d'une sous-unité catalytique p110. Après activation, les PI3K génèrent un second messenger qui induit, en aval, l'activation de protéines kinases comme AKT.

Cette voie de signalisation est détournée par LMP1 et induit la prolifération des LCL (Brennan *et al.*, 2002). L'activation de la voie PI3K serait induite par le domaine CTAR1/TES1 de LMP1 (Mainou *et al.*, 2005 ; Shair *et al.*, 2008). Des études ont montré que LMP1 peut contrôler la survie cellulaire (Dawson *et al.*, 2003), la migration des cellules épithéliales (Shair *et al.*, 2008), et la répression de la réparation des dommages à l'ADN (Chen *et al.*, 2008) *via* l'activation de la voie PI3K.

IV.2.4. La voie JAK/STAT

Il existe quatre protéines JAK (Janus Activated Kinase) : JAK1, JAK2, JAK 3 et TYK2. Ces protéines sont ubiquitaires sauf JAK3 qui est exprimée de manière plus spécifique dans les cellules hématopoïétiques. Les kinases JAK ont pour substrat les protéines STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription). Cette famille de protéines compte sept membres : STAT1, 2, 3, 4, 5A, 5B et 6. Elles sont cytoplasmiques et leur translocation dans le noyau est induite suite à leur phosphorylation par les protéines JAK.

Parmi les JAK, seuls JAK3 et TYK2 ont été décrites dans la signalisation de LMP1 (Gires *et al.*, 1999 ; Geiger & Martin, 2006). Le recrutement de JAK3 serait associé au domaine CTAR3 (Gires *et al.*, 1999). Cependant, la délétion de cette région de LMP1 ne semble pas perturber son recrutement (Higuchi *et al.*, 2002). Des expériences de coimmunoprécipitation avec différents mutants de LMP1 n'ont pas permis d'identifier le domaine CTAR responsable du recrutement de Tyk2 (Geiger & Martin, 2006).

STAT1, STAT2, STAT3 et STAT5A sont les 4 membres de la famille STAT associés à l'EBV dans les cellules infectées par ce virus (Chen *et al.*, 2003 ; Zhang *et al.*, 2004).

LMP1 active STAT1 de manière indirecte. En effet, LMP1 induit l'expression et la sécrétion autocrine de l'IFN α et de l'IFN γ *via* l'activation de la voie NF- κ B à partir de ses domaines CTAR1/TES1 et CTAR2/TES2 (Zhang *et al.*, 2004 ; Najjar *et al.*, 2005). L'IFN α et l'IFN γ se fixent aux récepteurs des IFN (IFNAR1/IFNAR2, IFN α Receptor 1/2 et IFNGR1/IFNGR2, IFN γ Receptor 1/2) et induisent l'activation de STAT1.

IV.3. Propriétés de la protéine LMP1

Les voies de signalisation cellulaire activées par LMP1 lui confèrent de nombreuses propriétés intervenant dans différents processus biologiques comme la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire. Elles contribuent donc à son pouvoir oncogénique.

IV.3.1. Régulation de la prolifération et la différenciation cellulaire

De par l'induction des voies de signalisation cellulaire, LMP1 induit une altération de la différenciation et de la prolifération de plusieurs types cellulaires. En effet, l'induction de la voie PI3K/AKT par LMP1 provoque une diminution de l'expression de l'inhibiteur du cycle cellulaire p27^{Kip1}, ce qui permet une réactivation du cycle (Brennan *et al.*, 2002 ; Mainou *et al.*, 2005 ; Mainou *et al.*, 2007).

De plus, LMP1 est capable de bloquer la voie p16^{INK4a}-Rb. LMP1 induit l'export nucléaire du facteur Ets2 diminuant l'expression de p16^{INK4a} et celui des facteurs E2F4 et E2F5, en aval de p16^{INK4a}, levant ainsi le blocage du cycle cellulaire induit par la voie p16^{INK4a}-Rb (Ohtani *et al.*, 2003). Il a été également montré que les cellules infectées exprimant LMP1 sont réfractaires à l'arrêt du cycle cellulaire induit par le TGFβ. En effet, LMP1 inhibe la translocation nucléaire de la protéine Smad, connue pour induire l'expression de p21^{waf1}, p27^{Kip1} (Prokova *et al.*, 2002 ; Fukuda *et al.*, 2002 ; Mori *et al.*, 2003).

Enfin, LMP1 régule l'expression d'Id1 et d'Id3 (Inhibitor of Differentiation 1 and 3), protéines impliquées dans la régulation négative de p16^{INK4a} et de p27^{Kip1} (Li *et al.*, 2004 ; Everly *et al.*, 2004). De plus, l'induction de l'expression d'Id1 confère une résistance aux cellules vis-à-vis des effets cytostatiques induits par le TGFβ (Lo *et al.*, 2010). Ainsi, on peut constater que de nombreuses voies de signalisation sont exploitées pour aboutir au même objectif qui est la levée du blocage du cycle cellulaire.

IV.3.2. Induction d'altérations phénotypiques

L'activation des voies de signalisation cellulaire par LMP1 induit l'expression de marqueurs phénotypiques. Ainsi, LMP1 induit l'expression d'antigènes d'activation des lymphocytes B comme le CD21 (récepteur de l'élément C3d du complément), le CD23 (récepteur de basse affinité des IgE), le CD80 et le CD83 (molécules de co-stimulation des lymphocytes B ; Dudziak *et al.*, 2003), le CD40, et le CD39 (récepteurs de la famille des Ig, Wang *et al.*, 1990 ; Kieff & Rickinson, 2007). De plus, LMP1 induit l'expression du CMH de classe II (Zhang *et al.*, 1994) et de classe I (Rowe *et al.*, 1995) ainsi que l'expression des transporteurs d'antigènes TAP1 et TAP2 (Transporter-associated with Antigen Processing 1 and 2 ; Pai & Khanna, 2001), régulant l'immunogénicité des cellules infectées.

LMP1 est impliquée également dans la surexpression de molécules d'adhésion cellulaire comme LFA1, LFA3, ICAM1 et CD44 (Kieff & Rickinson, 2007). Bien que ces marqueurs soient impliqués dans la réponse immunitaire et la formation de la synapse immunologique B-T,

il semble que ces molécules interviennent dans l'interaction homotypique des LCL (Park & Faller, 2002).

Enfin, LMP1 induit l'expression de récepteur à activité tyrosine kinase tels que RON (Chou *et al.*, 2011) et l'EGFR (Kung & Raab-Traub, 2010) ainsi que des molécules anti-apoptotiques telles que Bcl-2 (Henderson *et al.*, 1991) et A20 (Laherty *et al.*, 1992). Le contrôle de l'expression de ces différentes molécules contribue au pouvoir transformant de LMP1.

IV.3.3. Modulation de la production de cytokines

Les cytokines sont des molécules solubles produites par les cellules du système immunitaire ou de différents tissus. Elles jouent le rôle de médiateur du système immunitaire pour permettre le recrutement, l'interaction et l'activation des cellules immunitaires.

LMP1 régule l'expression de chimiokines (CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, IP10). Les chimiokines sont des cytokines de petite taille (8 à 16 kDa). Ces chimiokines attirent les lymphocytes T et les cellules NK qui vont éliminer les cellules infectées (Nakayama *et al.*, 2004 ; Vockerodt *et al.*, 2005 ; Okudaira *et al.*, 2006). Cependant, LMP1 contrôle également l'expression de CCL17 et CCL22 qui attirent des lymphocytes T régulateurs impliqués dans le contrôle de la réponse immunitaire (Nakayama *et al.*, 2004), permettant aux cellules infectées d'échapper au système immunitaire.

LMP1 contrôle également l'expression de certaines interleukines (IL10, IL6, IL8, TNF). L'IL10 est une interleukine immunosuppressive impliquée dans l'expression de LMP1 (Kis *et al.*, 2006 ; Lambert & Martinez, 2007), alors que l'IL6, l'IL8 et le TNF sont des cytokines pro-inflammatoires qui maintiendraient un état d'inflammation chronique propice à la survie de la tumeur (Eliopoulos *et al.*, 1999 ; Chen *et al.*, 2003 ; Aggarwal *et al.*, 2006).

IV.3.4. Contribution de LMP1 dans le pouvoir métastatique des cellules

Les capacités métastatiques et invasives des cellules infectées par l'EBV, notamment les cellules de carcinome du rhinopharynx, sont accrues par l'expression de LMP1 (Dawson *et al.*, 2008 ; Morris *et al.*, 2008). L'action de LMP1 se situe à trois niveaux :

LMP1 est capable d'inhiber l'expression des suppresseurs de métastases RECK1 et l'E-cadhérine (Tsai *et al.*, 2002 ; Liu *et al.*, 2003). RECK1 (Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs 1) bloque l'activité des métalloprotéases MMP2 et MMP9 (Matrix metalloprotéinase ; Baker *et al.*, 2002). L'E-cadhérine est une protéine d'adhérence assurant le contact intercellulaire qui est réprimée dans de nombreux cancers agressifs. La répression de l'E-cadhérine augmente la capacité migratoire des cellules de CRP (Tsai *et al.*, 2002). Cette

répression de l'E-cadhérine peut résulter de l'induction d'une transition épithélium-mésenchyme (EMT) induite par LMP1. En effet, LMP1 est capable d'induire une EMT par l'intermédiaire des facteurs de transcription Twist (Horikawa *et al.*, 2007) ou Snail (Horikawa *et al.*, 2011), ou en coopérant avec le TGF- β 1 (Sides *et al.*, 2011).

LMP1 régule l'expression des métalloprotéases MMP1 (Lu *et al.*, 2003) et MMP9 (Yoshizaki *et al.*, 1998 ; Takeshita *et al.*, 1999 ; Murono *et al.*, 2000). Ces MMP sont nécessaires au remodelage et à la dégradation de la matrice extracellulaire et favorisent l'invasion cellulaire. L'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA, urokinase-type Plasminogen Activator) et la mucine MUC1 sont deux autres protéines régulées par LMP1 qui semblent jouer un rôle important dans ce processus (Kim *et al.*, 2000 ; Kondo *et al.*, 2007).

Certains facteurs angiogéniques sont induits par LMP1 (HIF1 α , VEGF, FGF2, COX2) et pourraient contribuer au processus de métastases (Murono *et al.*, 2001 ; Wakisaka *et al.*, 2002 ; Wakisaka *et al.*, 2004 ; Ceccarelli *et al.*, 2007).

IV.3.5. Propriétés cytostatiques et cytotoxiques de LMP1

Une étude a montré que LMP1 est essentielle à la prolifération cellulaire des lymphocytes B (Kilger *et al.*, 1998). Cependant, l'effet cytotoxique de LMP1 est montré lorsque cette protéine est fortement surexprimée (Hammerschmidt *et al.*, 1989). Par la suite, on décrit principalement des effets cytostatiques associés à LMP1. La cytotase est un phénomène associé à l'arrêt ou à l'inhibition de la division et de la croissance cellulaire. Ce phénomène est observé lorsque LMP1 est présente dans la cellule à de hauts niveaux d'expression (Floettmann *et al.*, 1996 ; Kaykas & Sugden, 2000). L'effet cytostatique est associé à la phosphorylation de eIF2 α (eukaryotic translation Initiation Factor 2 α ; Lam *et al.*, 2004), menant à l'arrêt de la traduction (Foufelle & Ferré, 2007). Un haut niveau d'expression de LMP1 peut induire la phosphorylation d'eIF2 α par l'intermédiaire de la kinase PERK (PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase ; Lee & Sugden, 2008). PERK est une kinase impliquée dans le contrôle de la bonne conformation des protéines, le système UPR (Unfolded Protein Response). La protéine eIF2 α phosphorylée active ATF4 (Activating Transcription Factor 4), un autre acteur de ce système UPR. ATF4 a la capacité de se fixer au promoteur pLMP1 et d'induire l'expression de LMP1 (Lee & Sugden, 2008).

IV.3.6. Rôle de LMP1 dans les processus d'apoptose

Une des propriétés principales de LMP1 est de protéger les cellules contre l'apoptose en induisant l'expression de molécules anti-apoptotiques (TRAF1, A20, cIAP2). L'expression de ces protéines est sous le contrôle du facteur NF- κ B (Siegler *et al.*, 2004 ; Laherty *et al.*, 1992 ;

Hong *et al.*, 2000). Les protéines mitochondriales de la famille Bcl-2 sont également la cible de la protéine LMP1. En effet, LMP1 augmente le niveau d'expression de Bcl-2, Mcl-1, Bfl-1 (Henderson *et al.*, 1991 ; Wang *et al.*, 1996 ; D'Souza *et al.*, 2004) et réprime l'expression de la molécule pro-apoptotique Bax (Grimm *et al.*, 2005).

A l'inverse, différentes études ont montré que LMP1 était impliquée dans le processus d'apoptose. LMP1 potentialise l'apoptose induite par le ligand de Fas/CD95 (FasL/CD95L) ou par des drogues chimiothérapeutiques telles que l'étoposide et la cisplatine dans les cellules épithéliales HeLa (Zhang *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2005). De plus, LMP1 est capable d'induire une perturbation de la mitochondrie (relargage du cytochrome c) et l'activation des caspases (Zhang *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2007). Cependant, LMP1 semble pouvoir induire directement l'apoptose dans des cellules épithéliales (Nitta *et al.*, 2003). Dans les LCL, LMP1 sensibilise les cellules à l'action cytotoxique des lymphocytes T (LTC) en surexprimant le récepteur pro-apoptotique Fas/CD95 (Le Clorenec *et al.*, 2006 ; Le Clorenec *et al.*, 2008). Les LTC, qui expriment FasL à leur surface, éliminent les cellules infectées et contrôlent ainsi la prolifération des LCL. Cette propriété est en apparence contradiction avec son statut d'oncogène majeur. Cependant, de telles propriétés ont déjà été mises en évidence pour les oncogènes cellulaires c-MYC (Albihn *et al.*, 2010) et RAS (Overmeyer *et al.*, 2011). De plus, en tant que membre fonctionnellement apparenté à la famille des TNFR, cette ambivalence "survie/apoptose" de LMP1 n'est pas très surprenante. En effet, elle est partagée par beaucoup de membres de cette famille. Le récepteur Fas/CD95, bien qu'il active la voie NF- κ B, induit préférentiellement l'apoptose (Peter *et al.*, 2007). A l'inverse, CD40 induit préférentiellement des signaux de survie cellulaire (Dallman *et al.*, 2003).

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Le virus d'Epstein-Barr est associé à de nombreuses pathologies malignes. La majorité de ces cancers exprime un programme de latence virale de type II (lymphome de Hodgkin, carcinome du rhinopharynx, carcinomes gastriques, lymphomes T,...) durant lequel LMP1 est exprimée. La protéine LMP1 est fonctionnellement apparentée aux membres de la superfamille des récepteurs du TNF de par les adaptateurs qu'elle recrute (TRADD, TRAF,...) et les voies de signalisation qu'elle active (NF- κ B, JNK,...). Contrairement au récepteur du TNF, LMP1 ne nécessite pas de ligand pour son activité, elle est constitutivement active et est décrite comme l'oncogène majeur de l'EBV. Malgré son statut d'oncogène, LMP1 possède des propriétés cytotoxiques et pro-apoptotiques.

Afin d'étudier le mécanisme d'action de LMP1 et son rôle dans les pathologies associées à l'EBV, notre équipe a généré deux modèles cellulaires infectés et transformés *in vitro* par l'EBV, l'une d'origine lymphocytaire (NC5 ; Groux *et al.*, 1997) et l'autre d'origine monocytaire (TE1 ; Masy *et al.*, 2002). Notre équipe a également développé des outils moléculaires permettant d'inhiber la signalisation de LMP1, appelés DN. Il s'agit de protéines de fusion dérivées de la région C-terminale de LMP1 et fusionnées à la GFP. Ces protéines chimériques ont une localisation cytoplasmique et exercent un effet dominant négatif de LMP1 en fixant et séquestrant les adaptateurs cellulaires nécessaires à la signalisation de LMP1.

Mes travaux de thèse avaient pour objectifs d'étudier d'une part les effets de l'inhibition de la signalisation de LMP1 dans un contexte de cellules infectées et transformées par l'EBV, et d'autre part le caractère ambivalent de LMP1 vis à vis de la survie et de la mort cellulaire dans un modèle de cellule épithéliale en dehors d'un contexte infectieux.

C'est pourquoi la partie des résultats de ce manuscrit commence par la caractérisation de certains DN (Article 1 : Ndour, Ouk, Brocqueville *et al.*, 2010). Dans cet article, nous démontrons que nos différents DN sont capables de recruter et séquestrer les adaptateurs cellulaires normalement utilisés par LMP1 pour sa signalisation. Ainsi, l'expression de ces DN conduit à l'inhibition de la signalisation et des phénotypes associés induits par LMP1 et le récepteur TNFR1.

Dans la seconde partie des résultats (Article 2 : Brocqueville, Ndour *et al.*, en soumission), nous rapportons l'effet dominant négatif de nos DN sur la signalisation de LMP1 dans nos modèles cellulaires de latence de type II. Cette approche d'inhibition de LMP1 nous a permis de démontrer que l'expression des DN dans ces cellules induit la formation d'un complexe pro-apoptotique similaire à celui retrouvé lors de l'apoptose induite par le TNF.

Enfin, dans la dernière partie des résultats (Article 3 : Brocqueville *et al.*, en préparation et résultats complémentaires), nous démontrons les propriétés cytotoxiques de LMP1 induites lors de son expression transitoire dans les cellules épithéliales MDCK. Malgré cet effet délétère, il est possible d'établir des cellules MDCK exprimant de façon stable la protéine LMP1. Dans ces dernières, LMP1 n'exerce plus ses propriétés cytotoxiques, au contraire LMP1 protège ces cellules d'une apoptose induite par un stress. De plus l'expression stable de LMP1 dans les cellules MDCK augmente leur capacité d'invasion et amplifie les phénotypes induits par le facteur de croissance HGF/SF suggérant une coopération entre LMP1 et le récepteur à l'HGF/SF, MET.

RESULTATS

Article 1

Inhibition of tumor necrosis factor-induced phenotypes by short intracellular versions of latent membrane protein-1

Papa Alioune Ndour, Tan-Sothéa Ouk, Guillaume Brocqueville, Alexandra Mougel, Elsa Vanhecke, Jean Feuillard, Jean Coll, Eric Adriaenssens.

Cell Signal., **2010** Feb; 22(2):303-13.

Présentation de l'article 1

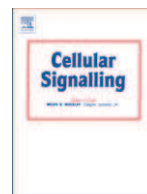
La majorité des cancers associés à l'EBV (lymphome de Hodgkin, lymphome T, carcinomes gastriques, carcinome du rhinopharynx (CRP),...) est caractérisée par une latence virale de type II. Durant cette latence, la protéine virale LMP1 est exprimée. Cette protéine comporte, dans sa partie C-terminale, deux domaines essentiels à sa signalisation qui sont responsables du recrutement d'adaptateurs cellulaires tels que les TRAF et de l'activation de nombreuses voies de signalisation cellulaire comme les voies NF- κ B, PI3K/AKT et JNK. LMP1 est considéré comme l'oncogène majeur de l'EBV et fait l'objet de la thématique de recherche de notre laboratoire. En effet, nous étudions le mode d'action de cette protéine et sa signalisation.

Dans ce but, notre équipe a développé des outils originaux à effet dominant négatif (appelés DN) dérivés de LMP1. Le premier que notre équipe a caractérisé est le LMP1-CT (Adriaenssens *et al.*, 2004), il s'agit d'une protéine de fusion constituée de la partie C-terminale signalisatrice de LMP1 fusionnée en aval de la GFP (Green Fluorescent Protein). Il a été montré que LMP1-CT n'est pas capable d'induire une signalisation cellulaire malgré la présence des domaines TES1 et TES2 fonctionnels, et qu'elle a une localisation cytoplasmique. Dans un contexte cellulaire où LMP1 est exprimée, LMP1-CT inhibe la signalisation de LMP1 et les phénotypes associés.

De part les adaptateurs qu'elle recrute et les voies de signalisation qu'elle active, LMP1 est fonctionnellement apparentée aux membres de la superfamille des récepteurs au TNF. Ainsi, l'effet dominant négatif de LMP1-CT s'étend aux autres membres de cette superfamille de récepteurs qui utilisent le même set d'adaptateurs tel que le TNFR1.

Afin d'étudier plus finement l'effet dominant négatif du LMP1-CT et de minimiser la taille de nos outils dans l'idée d'une éventuelle approche thérapeutique, nous avons élaboré d'autres versions de protéines de fusion (Fig. 1A). Ces DN sont constitués de la protéine GFP fusionnée à soit la séquence TES1 de CTAR1, soit la séquence TES2 de CTAR2, soit toute la partie CT de LMP1 avec un seul site fonctionnel sur les deux. Nous avons également utilisé des peptides synthétiques biotinylés, le peptide TES1 correspondant à la séquence du site TES1 de CTAR1 (DSLPHPQQATDDSHGE) comprenant la séquence consensus PXQXT de recrutement des protéines TRAF et sa version non fonctionnelle TES1mut (DSLPHAQAAADDSGHE) où la séquence PXQXT a été modifiée en AXAXA empêchant le recrutement des TRAF.

Dans ce premier article, j'ai participé à la caractérisation de ces nouveaux inhibiteurs de la protéine LMP1 et du TNFR1. Nous avons validé leurs effets sur les phénotypes associés à ces deux protéines fonctionnellement apparentées. En effet, la transfection transitoire de vecteurs d'expression codant ces DN n'a aucun effet cytotatique ou cytotoxique sur les cellules et ces DN semblent dépourvus d'activité signalisatrice. En revanche, nous montrons, par des expériences de transactivation, que leur co-expression avec LMP1 inhibe partiellement sa signalisation et leur expression lors d'une stimulation au TNF abolit l'activation de la voie de signalisation NF- κ B du TNFR1. Des expériences similaires ont été réalisées en stimulant les cellules avec de l'interleukine 1 (IL-1), les DN n'ont aucun effet sur l'activation de la voie NF- κ B par son récepteur, l'IL-1R, témoignant de leur spécificité de recrutement. Cette spécificité a d'ailleurs été vérifiée par des expériences de co-immunoprécipitation. Nous avons confirmé que les DN TES1-Short et TES1-Long recrutent les adaptateurs de CTAR1/TES1 et que les DN TES2-Short et TES2-Long fixent ceux de CTAR2/TES2. Nous confirmons également l'effet dominant négatif de nos protéines de fusion puisque, lorsqu'on stimule les cellules avec du TNF, les adaptateurs se fixent préférentiellement sur nos DN plutôt que sur le récepteur TNFR1. Enfin, les travaux réalisés dans cet article montrent aussi que ces molécules inhibent les différents phénotypes induits par l'activation de ce récepteur selon le contexte cellulaire. Ce résultat est d'ailleurs également obtenu avec le peptide synthétique TES1.



Inhibition of tumor necrosis factor-induced phenotypes by short intracellular versions of latent membrane protein-1

Papa Alioune Ndour^{a,1}, Tan-Sothéa Ouk^{a,b,1}, Guillaume Brocqueville^a, Alexandra Mougel^a, Elsa Vanhecke^c, Jean Feuillard^b, Jean Coll^a, Eric Adriaenssens^{a,*}

^a CNRS UMR8161, Institut de Biologie de Lille, IFR 142, Université Lille-Nord de France, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr Calmette, 59021 Lille Cedex, France

^b CNRS UMR6101, Faculté de Médecine de Limoges, Université de Limoges, CHU Dupuytren, Laboratoire d'Hématologie, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges Cedex, France

^c INSERM U908, IFR 147, Université Lille-Nord de France, Villeneuve d'Ascq, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 August 2009

Accepted 14 September 2009

Available online 29 September 2009

Keywords:

TNF
LMP1
Signalling
Apoptosis
Cell survival

ABSTRACT

Tumor necrosis factor (TNF) is a potent multi-functional cytokine with a homeostatic role in host defence. In case of deregulation, TNF is implicated in numerous pathologies. The latent membrane protein-1 (LMP1) is expressed by Epstein–Barr virus during viral latency and displaying properties of a constitutively activated member of the TNF receptor family. Both TNFR1 and LMP1 share a similar set of proximal adapters and signalling pathways although they display different biological responses. We previously demonstrated that the intracellular part of LMP1, LMP1-CT, a dominant-negative form of LMP1, inhibits LMP1 signalling.

Here, we developed shorter versions derived from C-terminal part of LMP1 to investigate their roles on LMP1 and TNF signalling. We constructed several mutants of LMP1 containing a part of cytoplasmic signalling region fused to the green fluorescent protein. These mutants selectively impair signalling by LMP1 and TNF but not by IL-1 β which uses other adapters. Dominant-negative effect was due to binding and sequestration of LMP1 adapters RIP, TRAF2 and TRADD as assessed by coimmunoprecipitation experiments and confocal analysis. Expression of these mutants impairs the recruitment of these adapters by TNFR1 and TNF-associated phenotypes. These mutants did not display cytostatic properties but were able to modulate TNF-induced phenotypes, apoptosis or cell survival, depending on the cell context. Interestingly, these mutants are able to inhibit a pro-inflammatory response in endothelial cells. These data demonstrate that LMP1 derived molecules can be used to design compounds with potential therapeutic roles in diseases due to TNF overactivation.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Tumor necrosis factor (TNF) is a potent multi-functional cytokine produced by many cells, including activated T cells, macrophages, natural killer cells or fibroblasts, in response to several processes such as inflammation, infection, tissue injury and other environmental challenges. TNF and some forms of lymphotoxin play a role in lymphoid tissue development and have a homeostatic role in host defence against bacterial infections. TNF mediates immunity or inflammation depending on its concentration in tissues. At low concentrations, TNF has beneficial effects on immunity but at high concentrations, TNF leads to inflammation and organ injury. Acute release of very large amounts of TNF during sepsis may result in septic shock (for review, see [1,2]). In a large number of cells, TNF elicits numerous biological activities including the control of cell prolifer-

ation or differentiation but especially survival or apoptosis [2–4]. TNF binds two membrane receptors, TNFR1 (p55) which is ubiquitously expressed and TNFR2 (p75) expressed in endothelial and hematopoietic cells only [5]. These receptors initiate signalling pathway leading to TNF-induced phenotypes [6,7].

After binding of TNF, TNFR1 recruits TNFR associated death domain (TRADD) as a platform adaptor and assembles alternative signalling complexes. One complex involves receptor interacting protein (RIP) and TNFR associated factor 2 (TRAF2) which allows the activation of the transcription factors NF- κ B and AP1. The second signalling complex is dependent on the internalization of TNF/TNFR1 complexes. After endocytosis, FADD and caspase 8 are recruited to form the death inducing signalling complex (DISC) resulting in TNF-induced apoptosis [1,3].

Latent membrane protein-1 (LMP1) is a 63 kDa plasma membrane protein with six transmembrane segments, which mimics a constitutively activated cell surface receptor of the TNF superfamily [8]. LMP1 is expressed from Epstein–Barr virus transformed cells. Epstein–Barr virus (EBV) is a human herpesvirus responsible for infectious mononucleosis and involved in the development of several human malignancies such as B and T lymphomas or numerous carcinomas [9].

* Corresponding author. CNRS UMR8161, Institut de Biologie de Lille, 1 rue du Pr Calmette, BP447, Lille Cedex, France. Tel.: +33 3 20 87 12 43; fax: +33 3 20 87 11 90.
E-mail address: eric.adriaenssens@ibl.fr (E. Adriaenssens).

¹ These authors contributed equally to this work.

Article 2

Inhibition of the latent membrane protein-1 impairs the growth and tumorigenesis of an EBV-latency II transformed T-cell

Guillaume Brocqueville^{*}, Papa Alioune Ndour^{*}, Tan-Sothéa Ouk, Gautier Goormachtigh, Olivier Morales, Alexandra Mougél, Julie Bertout, Oleg Melnyk, Véronique Fafeur, Jean Feuillard, Jean Coll and Eric Adriaenssens.

^{*} These authors contributed equally to this study.

Manuscrit soumis à Journal of Virology

Présentation de l'article 2

La majorité des cancers associés à l'EBV (lymphomes B chez les immunodéprimés, lymphome de Hodgkin, lymphomes T, carcinomes gastriques, carcinomes du rhinopharynx (CRP),...) est caractérisée par les latences virales de type II et III. Durant ces latences, la protéine virale LMP1 est exprimée. Cette protéine est considérée comme l'oncogène majeur du virus d'Epstein-Barr et joue un rôle crucial dans le développement des pathologies qui lui sont associées. Ceci en fait une cible de choix pour d'éventuelles thérapies. En effet, certaines stratégies d'immunothérapies sont à l'étude, l'une est fondée sur l'utilisation de peptides présentés par des molécules HLA de classe II stimulant l'expansion *in vitro* de lymphocytes CD4 spécifiques de LMP1. Une autre consiste à stimuler la production d'anticorps dirigés contre des épitopes conformationnels portés par les boucles externes de LMP1. Dans ce deuxième article, nous avons étudié les effets directs, sur des modèles cellulaires de latence II, des molécules inhibitrices de LMP1 caractérisées dans le premier article présenté. D'anciens travaux de notre équipe ont consisté à générer des modèles cellulaires lymphocytaires (NC5 ; Groux *et al.*, 1997) et monocytaires (TE1 ; Masy *et al.*, 2002), infectés et transformés par l'EBV. Ces 2 modèles cellulaires présentent une latence virale de type II.

Dans ce deuxième article, nous avons utilisé une stratégie de vecteurs inductibles permettant d'établir des lignées cellulaires stablement transfectées et dans lesquelles nous pouvons moduler l'expression de nos outils à effet dominant négatif de LMP1 (DN) caractérisés dans l'article 1. Cette approche a été complétée par l'utilisation de peptides synthétiques de fusion plus élaborés que ceux brièvement utilisés dans l'article 1. En effet, la séquence TES1 (DSLPHPPQQATDDSHGE) ou TES1mut (DSLPHAQAAADDSGHE) est fusionnée à une séquence riche en arginine (GRKKRRQRRR) pour faciliter leur entrée dans les cellules. Ces peptides sont également biotinylés pour permettre leur détection et leur précipitation.

Dans ce travail, nous montrons que l'expression de nos DN dans les modèles cellulaires de latence II conduit à l'inhibition des voies NF- κ B et AKT, classiquement induites par LMP1. Cette inhibition se traduit par un ralentissement de la croissance cellulaire et une mort cellulaire par apoptose. En effet, nous mettons en évidence la formation d'un complexe pro-apoptotique similaire à celui observé lors de l'apoptose induite par le TNF.

Enfin, une approche *in vivo* nous a permis de confirmer les effets inhibiteurs de nos DN sur la signalisation de LMP1 dans les cellules NC5. En effet, dans ces modèles de latence II, l'expression des DN atténue la capacité tumorigène de ces cellules après leur injection dans des souris SCID.

INHIBITION OF THE LATENT MEMBRANE PROTEIN-1 IMPAIRS THE GROWTH AND TUMORIGENESIS OF AN EBV-LATENCY II TRANSFORMED T-CELL

Guillaume Brocqueville^{1*}, Papa Alioune Ndour^{1*}, Tan-Sothéa Ouk^{1,2}, Gautier Goormachtigh¹, Olivier Morales¹, Alexandra Mougél¹, Julie Bertout¹, Oleg Melnyk¹, Véronique Fafeur¹, Jean Feuillard², Jean Coll^{1*} and Eric Adriaenssens^{1*}.

¹ CNRS UMR8161, Institut de Biologie de Lille, IFR 142, Université Lille-Nord de France, 1 rue du Pr Calmette, 59021 Lille Cedex

² CNRS UMR6101, Faculté de Médecine de Limoges, CHU Dupuytren, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges Cedex

* The first two authors contributed equally.

* The last two authors contributed equally.

Address correspondence to : Pr Eric Adriaenssens, CNRS UMR8161, Institut de Biologie de Lille, 1 rue du Pr Calmette, BP447, Lille Cedex. Tel: (+33) 3 20 87 12 43, Fax: (+33) 3 20 87 11 90, mail : eric.adriaenssens@ibl.fr

Running title: LMP1-DNs induce apoptosis of EBV transformed cell

Abstract

The Epstein-Barr virus (EBV) is a common human herpes virus. Its infection is associated with several human malignancies where it expresses a set of latent proteins among which is the latent membrane protein LMP1. LMP1 is able to transform numerous cell types and is considered the main oncogenic protein of EBV. The mechanism of action is based on mimicry to activated members of the TNF receptor superfamily, through its ability to bind similar adapters and to activate signaling pathways. We previously generated two unique models: a monocytic and lymphocytic (NC5) cell line immortalized by EBV which expresses the type II latency program.

Here, we generated LMP1 dominant negatives (DNs), based on fusion between green fluorescent protein (GFP) and TES1 or TES2 (Transformation Effectors Site) of LMP1. Then, we generated cell lines conditionally expressing these DNs. These DNs inhibit NF- κ B and Akt pathways resulting in impairment of survival processes and increased apoptosis in these cell lines. This pro-apoptotic effect is due to reduced interaction of LMP1 with specific adapters and the recruitment of these adapters to DNs which enable generation of an apoptotic complex involving TRADD, FADD and caspase 8. Similar results were obtained with cells

displaying latency III program. Using a xenograft model, we show that LMP1 DNs reduce SCID mouse mortality after intraperitoneal transfer of the NC5 cell line. Finally, we prove that synthetic peptides display similar inhibitory effects in EBV infected cells. DNs derived from LMP1 could be used to develop therapeutic approaches in malignant diseases associated with EBV.

Introduction

Epstein-Barr virus (EBV) is a human herpesvirus involved in infectious mononucleosis and the development of several human malignancies as B and T lymphomas and several carcinomas (35). EBV can infect B cells and transform them into lymphoblastoid cell lines (LCLs) (19). EBV may also infect T cells and monocytes (27) or epithelial cells (35). In transformed cells, EBV is found in a latent state and several viral genes are expressed. The latent membrane protein-1 (LMP1) is derived from one of these genes, and it has been shown to be essential for B-cell immortalization and proliferation of monocytes transformed by EBV (19, 27). LMP1 can be regarded as an oncogene product *per se* since it can transform rodent fibroblasts (46) and sensitize transgenic mice to lymphomas (22). LMP1 is a 63 kDa plasma membrane protein with six transmembrane

domains and can mimic a constitutively activated cell surface receptor of the Tumor Necrosis Factor Receptor (TNFR) super-family (6). By contrast with TNFR1, spontaneous oligomerization mediated by the transmembrane and cytoplasmic N-terminal domains of LMP1 induces activation of several signaling pathways (26). Several signaling domains have been identified so far in the cytoplasmic C-terminal region of the protein (8, 15, 16). These domains bind various adapters and induce specific signaling pathways. The critical residues responsible for adapter binding, as well as for some signaling and transforming properties, have been identified by mutational analysis. Two domains named transformation effector site (TES) 1 and TES2 have been implicated in LMP1 transforming effect (3, 5, 7, 16). Both TES1 and TES2 bind TNF receptor-associated factors (TRAFs), either directly in the case of TES1 (4, 5) or indirectly for TES2 through binding of the TNF receptor-associated death domain (TRADD) (15). TES2 was also shown to interact with RIP (14), another adapter of TNF receptors.

According to several studies, LMP1 has been shown to be essential for lymphocyte B immortalization, transformation and survival in latency III lymphoblastoid cell lines (LCLs). In our previous studies, we showed that LMP1 is also required for EBV type II latency monocyte (TE1) and T lymphocyte (NC5) survival (11, 27). We developed mutants derived from the C-terminal region of LMP1 and demonstrated that their expression inhibits signaling pathways induced both by LMP1 and TNF in the HEK cell line. These DN act by squelching adapters required for LMP1 signaling such as TRAFs, TRADD and RIP (1, 34). We showed as well that in several cellular contexts, DN can induce the formation of a complex containing FADD and Caspase 8 and lead to apoptosis (34). In this study, we generated stable EBV transformed cell lines with inducible vectors carrying LMP1-TES1S and LMP1-TES2S dominant negatives. We also investigated an alter-native approach by designing synthetic peptides containing TES1 sequence. The results indicate that these DN and peptides alter cell growth due to the inhibition of constitutive activation of NF- κ B by LMP1 and generation of an apoptotic complex involving FADD and Caspase 8. *In vivo* experiments reveal that expression of DN in EBV transformed cell lines in mice after intra-peritoneal transfer promotes mouse survival. These tools can be used

to develop therapeutic approaches in EBV associated malignant diseases.

Materials and methods

Cell culture

HEK 293, a human embryonic kidney cell line, was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (CRL 1573) and grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2mM glutamine and antibiotics. LCLs (lymphoblastoid cell lines) was obtained after B-cell infection by EBV. NC5 (a T lymphocytic cell line) and TE1 (a monocytic cell line) are both transformed by EBV after infection of PBMC by B95.8 supernatant (11, 27). LCLs, NC5 and TE1 cell lines were propagated in RPMI 1640 medium supplemented with 5% fetal calf serum, 2mM glutamine, 1mM sodium pyruvate, 1% non-essential amino acids and antibiotics. All cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

Constructs and antibodies

The pRT1 expression vectors were a generous gift of G. W. Bornkamm (2) and carry a doxycycline-inducible version of LMP1 dominant negative forms (LMP1-TES1S and LMP1-TES2S) and GFP. The pRT1-LMP1-TES1S and pRT1-LMP1-TES2S were derived from pGFP-LMP1-TES1S and pGFP-LMP1-TES2S (34) which expressed the TES1 (Transformation Effector Site 1) (DSLPHPQQATDDSGHE) or TES2 (DDDDPHGPVQLSYDD) site of the C-terminal region of LMP1 fused with GFP. LMP1-CT was previously described (1). All constructs were verified by sequencing. Plasmids were purified with Nucleobond-EF kits (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions. The reporter plasmids used in this study carry the firefly luciferase gene under the control of different regulating sequences. The NF- κ B luciferase reporter construct has five NF- κ B-responsive elements in tandem and was from Stratagene. The gal4-luc and Gal4-Jun vectors were a generous gift of B. Derijard and M. Ptashne. The normalizing vector pRLnull has no promoter sequence to drive expression of the *Renilla* luciferase gene and was from Promega.

The LMP1 monoclonal antibody was obtained from the S12 hybridoma culture supernatant (a generous gift of P. Busson). JNK1 (sc-474), TRAF2 (sc-876), TRAF3

(sc-1828), TRADD (sc-1163), GFP (sc-9996), RIP (sc-7881), FLIP (sc-7111), FADD (sc-5559),

P-Akt (sc-52940), Akt (sc-81435), caspase 3 (sc-1225), ICAM1 (sc-8439), P-JNK (sc-6254), P-I κ B- α (sc-8404), I κ B- α (sc-1643), and β -actin (sc-8432) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Caspase 8 (9746) and PARP antibodies (9542) were purchased from Cell Signaling Technologies.

Synthetic fused Peptides

Peptides were designed using the corresponding sequences of TES1 (DSLPHPQQATDDSHGE) and its mutated version TES1mut (DSLPHAQAAADDSGHE) fused with the poly-arginine HIV-TAT sequence (GRKKRRQRRR) to enable and facilitate their entry into cells. These peptides were biotinylated to allow their detection by immunofluorescence, immunoprecipitation and western blotting. In addition, these peptides were synthesized in retro-inverso form (using D-enantiomer amino acids and reversed peptide bonds) to increase their stability. Peptides were ordered at JPT Peptide Technologies GmbH, Berlin, Germany. Purity (>95%) was analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC, 220nm, C18, linear gradient) and mass spectrometry.

Generation of inducible cell lines

According to manufacturer's instructions, one and half million of NC5 and TE1 cells were nucleofected with 1 μ g of pRT1-LMP1-TES1S, pRT1-LMP1-TES2S or pRT1-GFP in Amaxa's solution T with the T-15 setting (NC5) and solution V with the V-01 setting (TE1) of an Amaxa Nucleofector (Amaxa Biosystems). After 3 days, hygromycin B was added at 50 μ g/ml. Hygromycin B concentration was progressively increased to 150 μ g/ml during the first 2 weeks of selection. Stable cell clones were cultured in the presence of hygromycin B (Euromedex) at 150 μ g/ml and 5% FCS (tetracycline free). After 4 weeks, induction of DN α s expression was performed with doxycycline (Sigma). Cells were washed once in RPMI 1640 medium and resuspended in standard medium without hygromycin, and doxycycline was then added at the dose indicated.

Immunoprecipitation and western blotting

Immunoprecipitations were performed using 10^7 cells that were incubated in medium with doxycycline 2 μ g/ml. At the indicated time, cells were washed twice with PBS, then lysed 15 min on ice in 500 μ l of lysis buffer PY (20mM Tris-HCL pH 7.4, 50mM NaCl, 5 mM EDTA, 1%

Triton X-100, 1 mM leupeptin, 1mM PMSF, 1 mM sodium orthovanadate and 5 IU/ml aprotinin). Lysates (500 μ g) were clarified by centrifugation (20,000xg for 15 min), and supernatants were incubated under gentle agitation with appropriate antibodies for 1 h at 4°C. Protein A-Sepharose beads (Amersham Pharmacia) were added and gently rotated for 1 h at 4°C. Beads were centrifuged 1 min at 20,000xg, washed four times in lysis buffer PY (with 0.1% Triton) and eluted by boiling (94°C) in 30 μ l of Laemmli buffer. Eluted samples were separated by SDS-PAGE and subjected to western blotting. For western blotting, cells were incubated with or without doxycycline at the dose and time indicated. Next, cells were washed twice with PBS, and then lysed 15 min on ice in 500 μ l of lysis buffer PY. The lysates were clarified by centrifugation and 100 μ g of total proteins were separated by SDS-PAGE. Proteins were transferred onto membranes (Immobilon-P, Millipore) by electroblotting. Membranes were saturated with 5% milk in Tris buffered saline (TBS) 0.1% Tween and incubated with appropriate primary antibodies described above. After several washings in TBS 0.2% Tween, membranes were incubated with specific horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (Jackson Immuno-research). HRP was detected with the ECL Plus reagent (Amersham) and the emitted light was detected by autoradio-graphic film (Hyperfilm, Amersham) and CCD camera (LAS3000, Fujifilm). Obtained digital images were directly analyzed with Multi-Gauge version 3.0 software (Fujifilm) and fold induction was indicated in corresponding figures.

Measurement of cell survival or cell death

Trypan blue and Growth assays:

To assess cell viability after induction of LMP1 DN α s expression, 5×10^4 cells were seeded in a 6-well plate and incubated at 37°C with standard medium for 24 h with or without 2 μ g/ml doxycycline. Cells were next counted after adding trypan blue (vol/vol). For growth assays 2×10^5 cells were incubated as previously described and counted every 24 h for 3 days.

Thymidine incorporation:

Measurement of cell proliferation was assessed by thymidine incorporation. In a 96-well plate, 5×10^4 /well of NC5 wt cell line or NC5 stably transfected with pRT1-LMP1-TES1S, pRT1-LMP1-TES2S or pRT1-GFP were incubated in their standard medium with the indicated dose of doxycycline (0-0.2-0.6-1-2 μ g/ml) for 24, 48 and

72 h. Incorporation of radioactive thymidine was performed as previously described (27). Each experiment was repeated at least twice and was carried out in triplicate. Proliferation was calculated in comparison with the NC5 wt cell line. A similar protocol was performed for LCLs. BAY 11-7082 (Calbiochem), an inhibitor of NF- κ B was used as control in LCLs .

Flow cytometry analysis:

Cell death was measured by flow-cytometry analysis. Total cell death was measured using 50 μ g/ml propidium iodide (PI) (Sigma) labeling and apoptotic cells were assessed by Annexin V-phycoerythrin (PE) (BD Pharmingen) and TOPRO[®]-3 iodide (642/661) (Invitrogen) labeling. Briefly, 24 hrs after induction of LMP1 DNs, GFP, or control vector, cells were washed and stained with Annexin V-PE according to the manufacturer's instructions. Cell viability was assessed by adding 1 mM TOPRO[®]-3 or 50 μ g/ml PI to samples just before flow-cytometry analysis. For Annexin V labeled cells, analyses were performed on GFP-positive cells.

In vivo experiments

SCID mice (CB17/lcr-Prkdc^{SCID}/lcrCrI) were purchased from the Pasteur Institute (Lille) and maintained in our animal facilities under pathogen-free conditions. Procedures involving animals and their care conformed to institutional guidelines that comply with national and international laws and policies. Two groups of 12-week-old SCID mice were used (7 mice per group). NC5-GFP and NC5-LMP1-TES2S cell lines were amplified, and then 1×10^6 cells of each cell line were transferred by intraperitoneal injection. At the same time, doxycycline was added to the drinking water for mice; at the concentration of 1.5 mg/ml throughout this experiment. For the monitoring of cell survival and inductions in mice, two mice from each group were euthanized for blood and spleen analyses by flow cytometry. Survival of the remaining mice was monitored.

Results

Inducible expression of LMP1 dominant negatives has a functional effect in EBV transformed lymphocytes and monocytes

In our previous study, we designed different versions of LMP1 C-terminus derived dominant negatives able to recruit the whole set of adapters shared by LMP1 and TNFR super family (34). We showed their ability to impair specific signaling pathways induced by TNF and LMP1 in epithelial

and endothelial cells and their induced phenotypes. Here, to investigate the potential role of our DNs in EBV infected cell lines, we analyzed a lymphocytic (NC5) (11) and monocytic (TE1) (27) cell line infected and transformed by EBV. We used doxycycline (Dox) inducible vectors (pRT1) (2) to conditionally express the short version of the dominant negative LMP1-TES1S and LMP1-TES2S. The resulting constructs pRT1-LMP1-TES1S, pRT1-LMP1-TES2S and control vector pRT1-GFP (Figure 1A) express proteins that are, in contrast to LMP1-wt, monomeric and cytoplasmic. These constructs were stably transfected into TE1 and NC5 cell lines. To check LMP1-DN construct inducibility with Dox, NC5 stable cells were incubated with or without 2 μ g/ml Dox for 24 hrs and then cell lysates were analyzed by western blotting as shown in figure 1B. To evaluate the dose responsiveness of LMP1-DN expression, we incubated NC5 cells containing LMP1-DNs or GFP with an increasing dose of Dox (0, 0.2, 0.4, 0.8, 1 and 2 μ g/ml). 24 hrs after Dox administration, cells were analyzed by flow-cytometry. The results in fold increase are reported in histograms (Figure 1C) as mean fluorescence intensity (m.f.i.) of each condition compared to control non transfected. Except at 0.2 μ g/ml Dox, inducibility of LMP1-TES1 and LMP1-TES2 was similar. To check LMP1-DN binding ability to LMP1 adapters in our models (NC5 and TE1), we performed DN immunoprecipitation (using an GFP antibody) followed by immunoblot analysis of adapters. The data indicate that LMP1-DNs bind adapters in both TE1 and NC5 in which LMP1 is constitutively expressed and activated (11, 27). LMP1-TES1S binds TRAF2, whereas LMP1-TES2 binds TRADD and to a lesser extent TRAF2 in NC5 and TE1 (Figure 1D, data not shown). In addition, immunoprecipitation of LMP1wt in the presence of LMP1-DNs showed that LMP1wt binds TRAF2 and TRADD (Figure 1E, row GFP), and LMP1-DNs are able to impair these interactions. LMP1-TES1S reduces TRAF2 binding to LMP1wt, whereas LMP1-TES2S reduces TRADD and TRAF2 binding (Figure 1E for NC5 and data not shown for TE1). These data demonstrate that LMP1 DNs can bind LMP1 adapters and impair their recruitment by LMP1.

Expression of LMP1 dominant negatives reduces the proliferation and viability of latency II EBV infected cells (NC5) by activating cell death

NC5 cell line is an EBV infected T-lymphocyte line. We demonstrated that this cell line expresses the virus latency II program (expression of LMP1, LMP2 and EBNA1) and that it is dependent on LMP1 for survival (11). Using the LMP1-TES1S and LMP1-TES2S inducible DN we examined NC5 cell survival 24 hrs after DN induction. Increased expression of LMP1-DNs reduced the viability of NC5 cells (Figure 2A) when 2 µg/ml of Dox was added (black bars) compared to control (gray bars). These results confirmed those obtained with the dominant negative LMP1-CT (10) which contains the whole C-terminus region of LMP1 fused with GFP. We then examined the DN effect on cell growth. To that end, we seeded 2×10^5 cells in 6-well plates and counted cells every day for 3 days (Figure 2B). The results show that the exponential growth of NC5 control cells was drastically reduced with LMP1-DN TES1S or TES2S expression. This experiment was repeated three times and each cell-time point was counted in triplicate. Similar results (growth curves and viability) were obtained with the TE1 cell line (data not shown). To decipher these phenotypes induced by LMP1-DNs in latency II cells (NC5), we performed a thymidine incorporation assay to assess the effect of DN on cell proliferation. NC5 cells (5×10^4) were seeded in 96-well plates with an increasing dose of Dox for 24, 48 and 72 hours and thymidine was added during the last 6 hrs before analyzing thymidine incorporation. LMP1-TES1S and LMP1-TES2S induced a significant reduction of cell proliferation. This effect increased with time and resulted in proliferation arrest at 72 hours with the DN LMP1-TES2S (Figure 2C). Interestingly, the dominant negative LMP1-TES2S is more potent in reducing cell growth and inducing cell death. Induction of cell death by expression of LMP1-DNs in TE1 (data not shown) and NC5 cell lines was assessed by flow cytometry (Figure 2D). Cells were incubated for 24 hrs with increasing doses of Dox and propidium iodide (PI) was added just before flow cytometry analysis. The data indicate that dead cell numbers (PI positive cells) increase in a dose dependent manner for NC5 cells expressing DN LMP1-TES1S and LMP1-TES2S. Photographs and histograms of cells treated with 2 µg/ml Dox show NC5-LMP1-DNs phenotypes compared to NC5 control. These results demonstrate that LMP1 DN expression decreases cell proliferation and increases apoptosis resulting in growth inhibition.

Inhibition of LMP1 in latency II cell line (NC5) induces apoptosis and impairs survival

The mechanism of action of LMP1-DNs hampering LMP1 signaling consists of squelching its adapters in the cytoplasm (34). As a consequence, a massive induction of cell death is shown in figure 2. To characterize this phenotype, we performed an Annexin V/TOPRO labeling after LMP1 DN induction. The results of flow cytometry analysis indicated an increase of Annexin V and TOPRO positive cells induced by DN LMP1-TES1S and LMP1-TES2S (Figure 3A). These data showed the induction of early and late apoptosis by LMP1-DNs. Apoptosis induction was confirmed by a western blotting of the poly ADP ribose polymerase proteolysis (cleaved PARP) (Figure 3B), a caspase 3, 6 and 7 substrate. In addition, western blotting analysis of whole cell lysates after Dox addition for 24 hrs indicated PARP cleavage, reduction in pro-caspase 3 levels and caspase 8 cleavage (Figure 3C). At the same time, the LMP1-DNs display a negative effect on survival signaling induced by LMP1. Indeed, expression of LMP1-DNs result in reduced phosphorylation of Akt and IκB (Figure 3C), survival pathways induced by LMP1. To extend our data in cell line expressing the virus latency III program, we performed transfection of LMP1-DNs or control vector in LCLs. Cell proliferation and cell viability were evaluated after thymidine incorporation (Figure 3D) and trypan blue labeling (Figure 3E) respectively. LMP1-TES1 and LMP1-TES2 decrease thymidine incorporation and cell viability as the NF-κB inhibitor, BAY 11-7082 used as control. The decrease of cell viability is due to an increase of apoptosis and a reduction of survival signaling pathway (NF-κB) as indicated in Figure 3F. LMP1-DNs and BAY 11-7082 favour cleavage of caspase 3 and PARP, and reduce IκB phosphorylation. Immunoprecipitation of LMP1wt in the presence of LMP1-DNs showed that in LCLs, LMP1wt binds TRAF2 and TRADD (Figure 3G, row GFP or empty vector), and LMP1-DNs are able to impair these interactions. LMP1-TES1S and LMP1-TES2S reduces TRAF2 and TRADD binding to LMP1wt respectively (Figure 3G). In cell line expressing the virus latency III program, LMP1-DNs impairs adapters recruitment by LMP1.

We then have investigated the role of LMP1-DNs on the two main signaling pathways induced by LMP1: NF-κB and c-Jun N-terminal Kinase (JNK) pathways. We performed a western blot experiment to detect IκB phosphorylation after

LMP1-DNs expression for 24, 48 and 72 hours. The results show an impairment of I- κ B phosphorylation by LMP1 in LMP1-TES1S and LMP1-TES2S samples (Figure 4A), indicating a reduced activation of the NF- κ B pathway. Moreover, concerning the JNK pathway, a weak decrease of phosphorylated JNK (P-JNK) detection was observed (Figure 4B) for LMP1-TES1 and more importantly for LMP1-TES2. Collectively, these data reveal a decrease in LMP1 activated NF- κ B and to a lesser extend JNK signaling after LMP1-DNs expression.

LMP1-DNs form apoptotic complex involving TRADD, FADD and Caspase 8 in EBV transformed cell line (NC5) expressing latency II program

To clarify the mechanism of action of these DNs inducing cell death in latency II cell lines, we performed co-immunoprecipitation experiments to detect proteins able to bind to LMP1-DNs. After immunoprecipitation of LMP1-DNs with an GFP antibody, we show that TRADD, a proximal adapter that binds to the TES2 domain of LMP1 and TRAF2, a proximal adapter that binds to the TES1 domain, are recruited by the LMP1-TES2S and LMP1-TES1S dominant negative form of LMP1 (Figure 5A).

Surprisingly, TRADD is shown to be detected with LMP1-TES1S dominant negative, probably through TRAF2 binding. Interestingly, caspase 8 and activated caspase 8, proteins that are not able to be precipitated by LMP1, are coimmunoprecipitated with each LMP1-DN without Dox induction (caspase 8) and with Dox induction (for caspase 8 and activated caspase 8). This result suggested the formation of an apoptotic complex involving activated caspase 8. To confirm these data and decipher this complex we performed another coimmunoprecipitation. The results indicated that in the presence of LMP1-DNs, TRADD binds to LMP1-DN, FADD, TRAF 2 and activated caspase 8 (Figure 5B). When caspase 8 is immunoprecipitated, TRADD and FADD are also found in the same complex in the presence of LMP1-DNs (Figure 5C). The specificity of these co-immunoprecipitations was confirmed by the absence of these proteins when immunoprecipitations were performed with NC5 or NC5-GFP cell lysates.

Synthetic peptides derived from LMP1 C-terminal sequences display phenotypes similar to LMP1 dominant negatives vectors

To confirm the effects of LMP1 DNs, we designed two small peptides of 9 amino acids (AA) from TES1 sequences (wt or mutated), that are fused with HIV-1TAT sequences to facilitate entry into cells. These peptides were biotinylated for immuno-fluorescence detection and immuno-precipitation experiments. Peptides were synthesized by retro inverso method (using D-enantiomers and reversed peptide bonds) to increase their stability.

After 5 min of incubation (5 μ M peptides) at 37°C in HEK cells, peptides TAT-TES1 and its mutated version TAT-TES1mut penetrate into cells and are distributed in all intracellular compartments (Figure 6A, B). Immunoprecipitation experiments were performed using streptavidin beads show that TAT-TES1 peptide interacts with TRAF2 but TAT-TES1mut does not. Moreover, TAT-TES1 does not recruit TRADD and RIP adapters (Figure 6C). Finally, TAT-TES1 peptide but not TAT-TES1mut is able to inhibit LMP1 phenotypes in EBV infected and transformed cells and lead to induction of NC5 cell death (data not shown) and dissociation in culture (Figure 6D).

LMP1 dominant negatives promote SCID mouse survival after intraperitoneal transfer of EBV transformed cells

NC5 and TE1 EBV transformed cells lines are tumorigenic and induced mice death after subcutaneous or intraperitoneal injection (11, 27 and data not shown). To clarify the role of LMP1-DNs on transformed cell growth and survival *in vivo*, we transferred NC5-LMP1-TES2S and NC5-GFP control cells in 9- to 12-week-old SCID mice. Doxycycline was then added to the drinking water and maintained throughout the experiment. Mice were euthanized 3 weeks post-transfer, and we analyzed fluorescent cells in blood and spleen by flow cytometry (Figure 7A). Data indicate that approximately 3.1% of blood cells and 3.5% of spleen cells are NC5-GFP cells while 0.5% of blood cells and 0.7% of spleen cells are NC5-LMP1-TES2S. After induction, NC5-GFP cells survive whereas NC5-LMP1-TES2S cells disappear. No detectable fluorescence was observed in other organs. Mice with NC5-GFP cells die between week 13 and 18. By contrast, more than 60% of mice with NC5-LMP1-TES2S cells are alive at week 30. These results show a substantial adverse effect of LMP1-DNs on EBV transformed cell growth or survival (Figure 7B).

Discussion

The latent membrane protein 1 (LMP1) is the major oncogen product of EBV and its role in malignant disease is well documented (43). We provide here new tools to inhibit LMP1 and its associated phenotypes. In most cases of EBV associated pathology, the latency II program of EBV expressing LMP1, LMP2 and EBNA1 is observed (35). In this work, we used our models of EBV infected and transformed cells displaying this latency II. These models are investigated to study the effects of our Dominant Negatives (DNs) and peptides derived from LMP1 C-terminal domain.

These DNs are able to inhibit signaling pathways induced by LMP1 and TNF receptors by squelching a set of adapters including TRAFs, TRADD and RIP (1, 34) required for these pathways.

We have developed mutants derived from two LMP1 signaling domains and have shown by immunoprecipitation that they act in the cytoplasm as dominant negatives (DNs) of LMP1 by recruiting TRAF2, TRAF3, RIP and TRADD (this work and (34)). This mode of action impairs TNF receptor and LMP1 downstream signal transduction. In this study, mutants LMP1-TES1 and LMP1-TES2 and other versions (data not shown) are investigated for their properties *in vitro* and *in vivo*. Using pRT1 doxycycline inducible vectors (2) we stably transfected these mutants into NC5 and TE1 cells. Importantly, the expression of LMP1-DNs can be modulated using different doses of doxycycline. By immunoprecipitation analysis, we have shown that LMP1-TES1S and LMP1-TES2S bind to TRAF2, TRADD and RIP and affect the recruitment of these adapters to LMP1 wt.

The consequences of the LMP1 adapter squelching can be measured through impairment of signal transduction, reduced cell viability and proliferation and increased apoptosis after expression of LMP1-DNs. Interestingly, similar results were obtained in LCLs displaying a latency III (squelching of adapters, diminution of signal transduction leading to apoptosis and growth arrest). LMP1 is constitutively active (9). LMP1 constitutive activation of NF- κ B regulates the main biological process in cells (18, 45). NF- κ B induced genes involved in survival include anti-apoptotic proteins such as cellular-FLIP, Bcl-2, A20, c-IAPs and TRAFs (28, 30, 36, 42, 44, 45). Constitutive NF- κ B activation contributes to transformation of cell lines by LMP1 (19). When LMP1-DN expression is induced, NF- κ B

activation is impaired and survival signals disappear. Our data indicate that LMP1-DNs reduced activation of NF- κ B within 24 hrs of induction and completely abolished NF- κ B activation by 48 hrs. Interestingly, LMP1-DNs impair the other pathways involved in survival such as PI3K/Akt and p38 (data not shown), but their effects on the JNK pathway are less important. While LMP1-DNs are shown to impair JNK activation in transiently transfected HEK cells, this inhibition is not complete in EBV infected cell NC5.

For several oncogene products, inhibition of their activity leads to rapid decrease in survival pathways without affecting apoptosis pathways (40, 41). In our model, survival signals decline progressively within 72 h, but JNK pathways remain activate. It was not possible to monitor a relevant change in JNK activity after this time because all cells expressing high-levels of DNs had died and the only cells that remained were non-responsive to doxycycline induction.

Several studies have shown the transforming properties of LMP1 in EBV infected cell lines. LMP1 is sufficient to transform many cell types such as rodent fibroblasts (46), lymphocytes, and monocytes (19, 27). It can induce cell phenotypes such as invasive growth in MDCK epithelial cells (21). We previously showed that LMP1 is able to induce apoptosis in some cases (23, 24). Our study demonstrates for the first time that in EBV latency II type cell lines, inhibition of LMP1 by an inappropriately localized monomeric C-terminal domain (LMP1-DNs) is sufficient to induce apoptosis and to reverse LMP1 induced phenotypes. This inhibition leads also to impairment of increased levels of ICAM, an adhesion molecule whose transcription is regulated by LMP1 NF- κ B activation. Modification in ICAM expression level could explain changes in NC5 cells spontaneous aggregation when LMP1 signaling is inhibited.

The LMP1-DNs characterized in this article are able to inhibit signalling pathways as well as phenotypes linked to LMP1 and can be interesting for investigation and setting up of therapeutic tools for malignant disease such as NPC in which LMP1 plays an important role (20, 32, 35, 43).

NC5 cell lines displaying EBV latency II program were tumorigenic. NC5 cells transferred intraperitoneally into SCID mice induces mice death (data not shown) starting 12 weeks post transfer. Interestingly, we confirm an *in vivo* role for LMP1-DNs since mice death induced by

EBV-latency II cells xenograft can be reduced by inhibiting LMP1.

The use of inhibiting peptides synthesized in retro-inverso form which increased their stability (12, 13) showed the same effects as LMP-DNs *in vitro*. Studies using inhibitory peptide approaches have promising results. Inhibitory peptides against NEMO to block the NF- κ B pathway, induce the death of transplanted tumor cells and tumor regression. Approaches using inhibitors of LMP1 or its downstream signaling adapters appear to be encouraging these last years. Recent data show that the use of dehydroxymethylepoxyquinomicin (DHMEQ), an inhibitor of NF- κ B, induces apoptosis of LCLs and EBV infected cells expressing LMP1 and prevents tumor growth in NOG mice (31). In our model, further experiments will be performed to monitor the evolution of tumor manifestation or regression after peptides administration. If no adverse effects was observed, our inhibiting peptides will seem to be serious candidates in EBV-associated diseases.

We show that inhibition of LMP1 signaling by dominant negatives or synthetic peptides leads not only to impairment of survival signals, but also to pro-apoptotic processes. Cell death could be clearly observed around 16-18 hrs and this coincides with the time required for the expression of DNs and interaction of LMP1-DNs with LMP1 signaling adapters. By performing LMP1-DNs immunoprecipitation, we discovered that TRAF2 and TRADD, the proximal LMP1 signaling adapters are co-precipitated, and surprisingly FADD and caspase 8 are co-precipitated. This interaction resembles TNFR1 induced apoptosis through complex II (17, 29, 33, 47). To exclude the presence of secreted TNF in culture medium, we performed ELISA assays on the supernatant because activated T-lymphocytes produce TNF. We found no significant production of TNF compared to human peripheral blood mononuclear cells or enriched CD4⁺ cells (data not shown). This mechanism confirms our previous study showing that LMP1-DNs reverse TNF induced phenotypes (34). The LMP1-DNs resemble TNFR1 induced apoptosis. Firstly, they inhibit the NF- κ B pathway induced by LMP1 by squelching required adapters. Secondly, they take part into formation of an apoptotic complex that includes TRADD but also FADD and activated caspase 8. The role of DNs in the early stage of this complex generation is unknown. We think that generation of this complex is probably due to the inhibition of NF- κ B, and this similar to TNF receptor induced apoptosis. Recruitment of FADD or

caspase 8 by DNs facilitates a complex II. A recent study has shown that by replacing the death domain of TNFR1 with LMP1 CTAR2, cells previously responsive to TNF induced cell death became resistant. The authors concluded that recruitment of TRADD by CTAR2 masks the apoptotic properties of TRADD (38). By contrast to our model, their proteins are localized to the membrane and NF- κ B is activated. Moreover, complex II is shown to be localized to the cytoplasm after internalization of TNFR1 (25, 29, 37, 39) and our DNs are mainly localized to the cytoplasm.

In the case of TNFR1 induced apoptosis, TRADD is shown to be the adapter leading the recruitment of FADD and caspase 8 to the signaling complex (29, 33, 47). However another laboratory has demonstrated that RIP plays a major role in activating apoptosis (17), but the authors admitted that this phenomenon may be cell type dependent. In our study we demonstrate interaction between TRADD, FADD and caspase 8 but not RIP. We could not detect RIP because of its low-level expression in the NC5 or TE1 cell lines.

In all experiments where we have expressed DNs, we observed that DN-LMP1-TES2S is more efficient at inducing apoptosis based on PARP or caspase 8 cleavage. This may be due to LMP1-TES2S directly recruiting TRADD which interacts with FADD.

Our data demonstrate that inhibition of LMP1 reduces the growth of latency II cell lines *in vitro* and *in vivo*. These constructs will allow further elucidation of the biochemical events constituting the signaling pathways of LMP1. Inhibition of adapter recruitment may contribute to the clarification of signaling pathways as well as the genes targeted by LMP1 and the dominant negative forms of LMP1 or derivatives may have useful therapeutic applications.

Footnotes

This work is especially dedicated to the late Jean Coll who initiated and developed this project. We thank Pierre Busson for the generous gift of the S12 antibody. We thank Annick Blanpain and Hervé Drobecq for skillful technical assistance. This study was supported by grants from the Association de la Recherche contre le Cancer, the Ligue Nationale contre le Cancer (Comité du Pas-de-Calais, Comité de l'Aisne) and the Réseau Herpès et Cancer. Ndour P.A. was supported by grants from the Ministère délégué à

References

1. **Adriaenssens, E.**, A. Mougél, G. Goormachtigh, E. Loing, V. Fafeur, C. Auriault, and J. Coll. 2004. A novel dominant-negative mutant form of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) selectively and differentially impairs LMP1 and TNF signaling pathways. *Oncogene* **23**:2681-93.
2. **Bornkamm, G. W.**, C. Berens, C. Kuklik-Roos, J. M. Bechet, G. Laux, J. Bachl, M. Korndoerfer, M. Schlee, M. Holzel, A. Malamoussi, R. D. Chapman, F. Nimmerjahn, J. Mautner, W. Hillen, H. Bujard, and J. Feuillard. 2005. Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res* **33**:e137.
3. **Brodeur, S. R.**, G. Cheng, D. Baltimore, and D. A. Thorley-Lawson. 1997. Localization of the major NF- κ B-activating site and the sole TRAF3 binding site of LMP-1 defines two distinct signaling motifs. *J Biol Chem* **272**:19777-84.
4. **Devergne, O.**, E. D. Cahir McFarland, G. Mosialos, K. M. Izumi, C. F. Ware, and E. Kieff. 1998. Role of the TRAF binding site and NF- κ B activation in Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-induced cell gene expression. *J Virol* **72**:7900-8.
5. **Devergne, O.**, E. Hatzivassiliou, K. M. Izumi, K. M. Kaye, M. F. Kleijnen, E. Kieff, and G. Mosialos. 1996. Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF- κ B activation. *Mol Cell Biol* **16**:7098-108.
6. **Eliopoulos, A. G.**, and L. S. Young. 2001. LMP1 structure and signal transduction. *Semin Cancer Biol* **11**:435-44.
7. **Floettmann, J. E.**, and M. Rowe. 1997. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) C-terminus activation region 2 (CTAR2) maps to the far C-terminus and requires oligomerisation for NF- κ B activation. *Oncogene* **15**:1851-8.
8. **Gires, O.**, F. Kohlhuber, E. Kilger, M. Baumann, A. Kieser, C. Kaiser, R. Zeidler, B. Scheffer, M. Ueffing, and W. Hammerschmidt. 1999. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *Embo J* **18**:3064-73.
9. **Gires, O.**, U. Zimmer-Strobl, R. Gonnella, M. Ueffing, G. Marschall, R. Zeidler, D. Pich, and W. Hammerschmidt. 1997. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *Embo J* **16**:6131-40.
10. **Goormachtigh, G.**, T. S. Ouk, A. Mougél, D. Tranchand-Bunel, E. Masy, C. Le Cloennec, J. Feuillard, G. W. Bornkamm, C. Auriault, E. Manet, V. Fafeur, E. Adriaenssens, and J. Coll. 2006. Autoactivation of the Epstein-Barr virus oncogenic protein LMP1 during type II latency through opposite roles of the NF- κ B and JNK signaling pathways. *J Virol* **80**:7382-93.
11. **Groux, H.**, F. Cottrez, C. Montpellier, B. Quatannens, J. Coll, D. Stehelin, and C. Auriault. 1997. Isolation and characterization of transformed human T-cell lines infected by Epstein-Barr virus. *Blood* **89**:4521-30.
12. **Herve, M.**, B. Maillere, G. Mourier, C. Texier, S. Leroy, and A. Menez. 1997. On the immunogenic properties of retro-inverso peptides. Total retro-inversion of T-cell epitopes causes a loss of binding to MHC II molecules. *Mol Immunol* **34**:157-63.
13. **Hong, S. S.**, B. Gay, L. Karayan, M. C. Dabauvalle, and P. Boulanger. 1999. Cellular uptake and nuclear delivery of recombinant adenovirus penton base. *Virology* **262**:163-77.
14. **Izumi, K. M.**, E. D. Cahir McFarland, A. T. Ting, E. A. Riley, B. Seed, and E. D. Kieff. 1999. The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated proteins TRADD and receptor interacting protein (RIP) but does not induce apoptosis or require RIP for NF- κ B activation. *Mol Cell Biol* **19**:5759-67.
15. **Izumi, K. M.**, K. M. Kaye, and E. D. Kieff. 1997. The Epstein-Barr virus LMP1 amino acid sequence that engages tumor necrosis factor receptor associated factors is critical for primary B lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:1447-52.
16. **Izumi, K. M.**, and E. D. Kieff. 1997. The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF- κ B. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:12592-7.
17. **Jin, Z.**, and W. S. El-Deiry. 2006. Distinct signaling pathways in TRAIL- versus tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* **26**:8136-48.
18. **Karin, M.**, and A. Lin. 2002. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* **3**:221-7.
19. **Kaye, K. M.**, K. M. Izumi, and E. Kieff. 1993. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**:9150-4.
20. **Kieff, E.** 1996. Epstein-Barr virus and its replication. In *Fields Virology* vol.2, 3rd edition. Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott-Raven:2343-2396.
21. **Kim, K. R.**, T. Yoshizaki, H. Miyamori, K. Hasegawa, T. Horikawa, M. Furukawa, S. Harada, M. Seiki, and H. Sato. 2000. Transformation of Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) induces expression of Ets1 and invasive growth. *Oncogene* **19**:1764-71.
22. **Kulwichit, W.**, R. H. Edwards, E. M. Davenport, J. F. Baskar, V. Godfrey, and N. Raab-Traub. 1998. Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:11963-8.

23. **Le Cloennec, C.,** T. S. Ouk, I. Youlyouz-Marfak, S. Panteix, C. C. Martin, J. Rastelli, E. Adriaenssens, U. Zimmer-Strobl, J. Coll, J. Feuillard, and C. Jayat-Vignoles. 2008. Molecular basis of cytotoxicity of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 (LMP1) in EBV latency III B cells: LMP1 induces type II ligand independent autoactivation of CD95/Fas with caspase 8-mediated apoptosis. *J Virol* **82**:6721-33.
24. **Le Cloennec, C.,** I. Youlyouz-Marfak, E. Adriaenssens, J. Coll, G. W. Bornkamm, and J. Feuillard. 2006. EBV latency III immortalization program sensitizes B cells to induction of CD95-mediated apoptosis via LMP1: role of NF κ B, STAT1, and p53. *Blood* **107**:2070-8.
25. **Legler, D. F.,** O. Micheau, M. A. Doucey, J. Tschopp, and C. Bron. 2003. Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNF α -mediated NF- κ B activation. *Immunity* **18**:655-64.
26. **Liebowitz, D.,** D. Wang, and E. Kieff. 1986. Orientation and patching of the latent infection membrane protein encoded by Epstein-Barr virus. *J Virol* **58**:233-7.
27. **Masy, E.,** E. Adriaenssens, C. Montpellier, P. Crepieux, A. Mougel, B. Quatannens, G. Goormachtigh, N. Faumont, F. Meggetto, C. Auriault, H. Groux, and J. Coll. 2002. Human monocytic cell lines transformed in vitro by Epstein-Barr virus display a type II latency and LMP-1-dependent proliferation. *J Virol* **76**:6460-72.
28. **Micheau, O.** 2003. Cellular FLICE-inhibitory protein: an attractive therapeutic target? *Expert Opin Ther Targets* **7**:559-73.
29. **Micheau, O.,** and J. Tschopp. 2003. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**:181-90.
30. **Miller, W. E.,** H. S. Earp, and N. Raab-Traub. 1995. The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces expression of the epidermal growth factor receptor. *J Virol* **69**:4390-8.
31. **Miyake, A.,** M. Z. Dewan, T. Ishida, M. Watanabe, M. Honda, T. Sata, N. Yamamoto, K. Umezawa, T. Watanabe, and R. Horie. 2008. Induction of apoptosis in Epstein-Barr virus-infected B-lymphocytes by the NF- κ B inhibitor DHMEQ. *Microbes Infect* **10**:748-56.
32. **Morris, M. A.,** C. W. Dawson, and L. S. Young. 2009. Role of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1, LMP1, in the pathogenesis of naso-pharyngeal carcinoma. *Future Oncol* **5**:811-25.
33. **Muppidi, J. R.,** J. Tschopp, and R. M. Siegel. 2004. Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity* **21**:461-5.
34. **Ndour, P. A.,** T. S. Ouk, G. Brocqueville, A. Mougel, E. Vanhecke, J. Feuillard, J. Coll, and E. Adriaenssens. 2010. Inhibition of tumor necrosis factor-induced phenotypes by short intracellular versions of latent membrane protein-1. *Cell Signal* **22**:303-13.
35. **Rickinson, A.,** and E. Kieff. 2007. *Fields Virology*, Fifth ed., Fields BN, Lippincott- Raven, Philadelphia:p. 2655.
36. **Roy, N.,** Q. L. Deveraux, R. Takahashi, G. S. Salvesen, and J. C. Reed. 1997. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo J* **16**:6914-25.
37. **Schneider-Brachert, W.,** V. Tchikov, J. Neumeyer, M. Jakob, S. Winoto-Morbach, J. Held-Feindt, M. Heinrich, O. Merkel, M. Ehrenschwender, D. Adam, R. Mentlein, D. Kabelitz, and S. Schutze. 2004. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptorsomes as death signaling vesicles. *Immunity* **21**:415-28.
38. **Schneider, F.,** J. Neugebauer, J. Griese, N. Liefold, H. Kutz, C. Briseno, and A. Kieser. 2008. The viral oncoprotein LMP1 exploits TRADD for signaling by masking its apoptotic activity. *PLoS Biol* **6**:e8.
39. **Schutze, S.,** and W. Schneider-Brachert. 2009. Impact of TNF-R1 and CD95 Internalization on Apoptotic and Antiapoptotic Signaling. *Results Probl Cell Differ*.
40. **Sharma, S. V.,** P. Gajowniczek, I. P. Way, D. Y. Lee, J. Jiang, Y. Yuza, M. Classon, D. A. Haber, and J. Settleman. 2006. A common signaling cascade may underlie "addiction" to the Src, BCR-ABL, and EGF receptor oncogenes. *Cancer Cell* **10**:425-35.
41. **Sharma, S. V.,** and J. Settleman. 2007. Oncogene addiction: setting the stage for molecularly targeted cancer therapy. *Genes Dev* **21**:3214-31.
42. **Suzuki, Y.,** Y. Nakabayashi, K. Nakata, J. C. Reed, and R. Takahashi. 2001. XIAP inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. *J Biol Chem* **276**:27058-63.
43. **Tsang, N. M.,** C. C. Chuang, C. K. Tseng, S. P. Hao, T. T. Kuo, C. Y. Lin, and P. C. Pai. 2003. Presence of the latent membrane protein 1 gene in nasopharyngeal swabs from patients with mucosal recurrent nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* **98**:2385-92.
44. **Uren, A. G.,** M. Pakusch, C. J. Hawkins, K. L. Puls, and D. L. Vaux. 1996. Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:4974-8.
45. **Wang, C. Y.,** M. W. Mayo, R. G. Korneluk, D. V. Goeddel, and A. S. Baldwin, Jr. 1998. NF- κ B antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* **281**:1680-3.
46. **Wang, D.,** D. Liebowitz, and E. Kieff. 1985. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* **43**:831-40.
47. **Zheng, L.,** N. Bidere, D. Staudt, A. Cubre, J. Orenstein, F. K. Chan, and M. Lenardo. 2006. Competitive control of independent programs of tumor necrosis factor receptor-induced cell death by TRADD and RIP1. *Mol Cell Biol* **26**:3505-13.

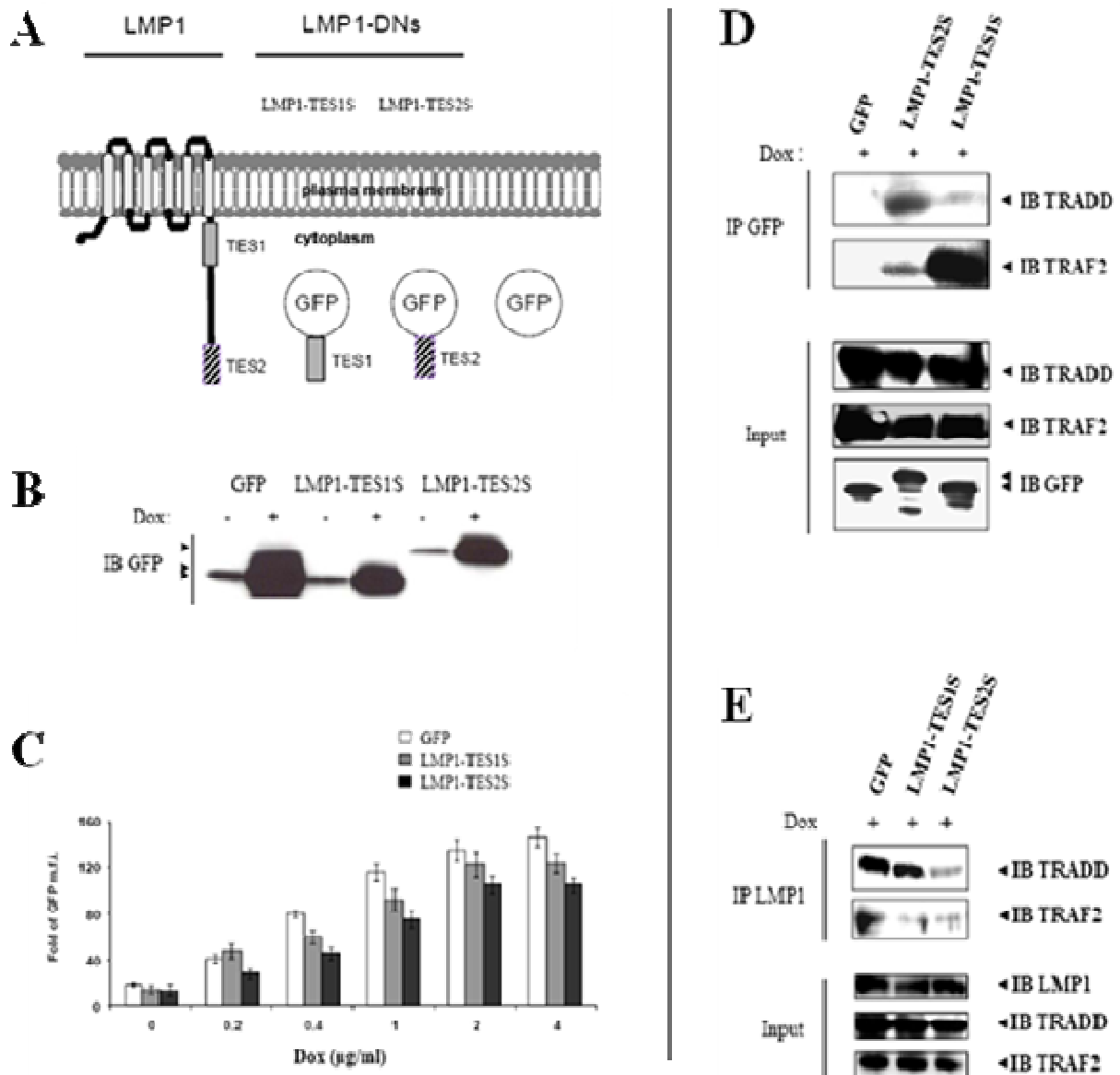


Figure 1. Expression of LMP1 Dominant Negatives in Latency II EBV transformed T-Cell. **A**, Diagram of LMP1 and LMP1 Dominant Negatives. GFP alone or fused with TES 1 or 2 are cloned in a vector inducible by doxycycline. **B**, Expression of LMP1 Dominant Negatives in Latency II EBV-transformed T-Cell. Whole-cell lysates from mock or 2 µg/ml doxycycline-treated NC5-GFP, NC5-LMP1-TES1S and NC5-LMP1-TES2S cell lines were examined by western blot with GFP antibody. **C**, Dox induced expression of DN in NC5 cell lines. NC5-GFP, NC5-LMP1-TES1S and NC5-LMP1-TES2S cells were incubated in medium with doxycycline at 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1, 2 and 4µg/ml for 24 hrs and then cells were analyzed by flow cytometry. Mean fluorescence intensity (m.f.i) values are compared with the NC5 parental cell line to obtain the fold increased expression. Three experiments in triplicate were done and results are shown as mean ± SD. **D** and **E**, LMP1-DNs recruit LMP1 adapters and impair their binding to LMP1-wt. Lymphocyte NC5 and monocyte TE1 control infected cells and those expressed inducible LMP1-DNs, were treated with 2 µg/ml doxycycline for 20 hrs, then, immunoprecipitations (IP) were performed in parallel with GFP antibody (**D**) or LMP1 antibody (S12)

(E). Samples and whole cell lysates were subjected to western immunoblot (IB) analysis for LMP1, GFP-DNs and endogenous TRADD and TRAF2.

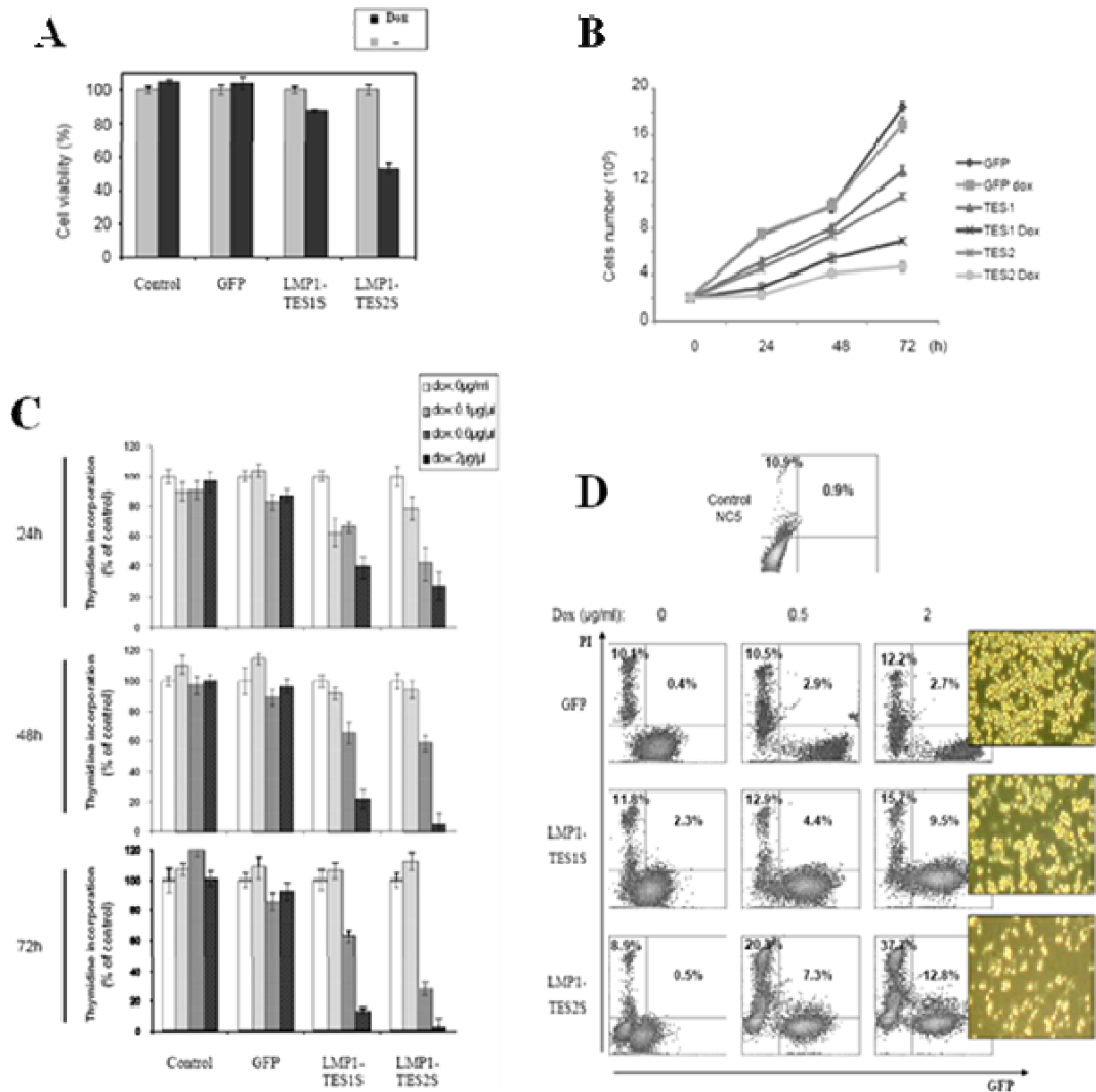


Figure 2. LMP1-DNs, LMP1-TES1S and LMP1-TES2S display an anti proliferative effect in Latency II EBV transformed T-cell lines (NC5). **A**, Effects of LMP1-DNs on cell viability. NC5 T-cell lines wild type and those with inducible GFP, or Dominant Negative LMP1-TES1S or LMP1-TES2S were counted then 2×10^5 cells for each assay were seeded twice in medium with (black bars) or without (gray bars) $2 \mu\text{g/ml}$ doxycycline for 24 hrs. For each assay, cells were counted twice using trypan blue to analyse viability. **B**, Effects of LMP1-DNs on cell growth. NC5 T-cell lines with inducible GFP, DN LMP1-TES1S or DN LMP1-TES2S were counted and seeded as previously described with or without $2 \mu\text{g/ml}$ doxycycline for 3 days. For each assay, cells were counted every 24 hrs for growth analysis. Results are shown as mean \pm SD values of 3 experiments in triplicate. We compared induced and non-induced conditions for each cell line and statistical analysis indicated that growth of NC5 T-cell line with inducible GFP was the same in the two conditions, whereas growth retardation in cells expressing LMP1-TES1S or LMP1-TES2S after Doxycycline induction was statistically significant. **C**, Effects of LMP1-DNs on cell proliferation. NC5 T-cell lines wild type and those with inducible or Dominant Negative LMP1-TES1S or LMP1-TES2S were counted then 5×10^4 cells for each assay were seeded twice in 96 wells plate with $1 \mu\text{Ci/well}$ of [methyl- ^3H]-Thymidine ($^3\text{H-TdR}$) in the indicated dose of doxycycline (0, 0.1, 0.5 or $2 \mu\text{g/ml}$). Incorporation of thymidine was analyzed every 24 hrs over 3 days. Results are shown as mean \pm SD values of triplicate experiments. **D**, Cell death due to LMP1-DNs induction is dose dependent. NC5 T-cell line with inducible LMP1-DNs or control vector were incubated with the indicated dose of doxycycline (0, 0.5, or $2 \mu\text{g/ml}$) for 24 hrs then cell death were assessed

by adding 50 $\mu\text{g/ml}$ propidium iodide (PI) to samples just before flow cytometry analysis. Inset pictures show cells treated with 2 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline for 24 hrs. Percentage indicate number of PI positive cells.

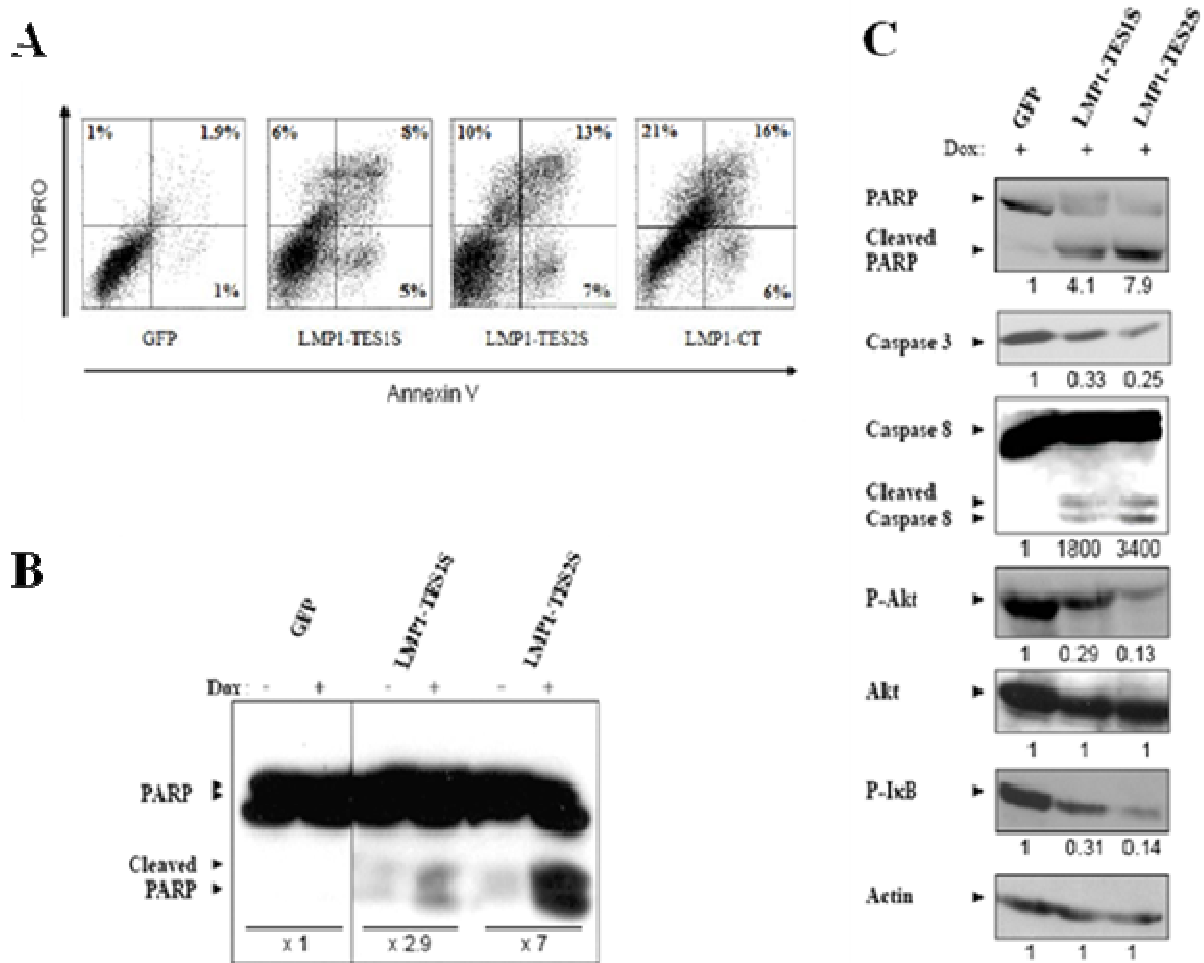


Figure 3 (A, B and C). Induction of LMP1-DNs triggers apoptosis cascade and inhibits survival pathway. **A**, Using flow cytometry analysis, an AnnexinV/TOPRO staining was performed to study apoptosis induction after expression of LMP1-DNs TES1 and TES2. NC5-LMP1-DNs and NC5-GFP cells were incubated in medium with doxycycline at 2 $\mu\text{g/ml}$ for 24 hrs then each sample was stained with Annexin V and 1 mM TOPRO. Cells were analyzed by flow cytometry. The percentage of Annexin V and TOPRO positive or negative cells are indicated in each quadrant. Total cell death was 3.9%, 19%, and 30% for NC5-GFP, NC5-LMP1-TES1S and NC5-LMP1-TES2S cells respectively. Cells expressing LMP1-CT were used as control (total cell death : 43%). **B**, Apoptosis resulting from LMP1-DN expression is correlated with caspase activation. NC5 T-cell lines (NC5-LMP1-TES1S, NC5-LMP1-TES2S and NC5-GFP) were incubated for 24 hrs with or without 2 $\mu\text{g/ml}$ doxycycline. Cells lysed with PY buffer supplemented with a phosphatase inhibitors (PhoSTOP, Sigma-Aldrich) and each sample were analyzed by western blot to evaluate caspase activation through the cleavage of poly ADP ribose polymerase (cleaved PARP). Western blot was quantified and fold induction between 2 $\mu\text{g/ml}$ Dox and control was shown. **C**, Effects of LMP1-DNs on apoptosis and survival signals. Expression of LMP1-DNs was induced in NC5-T-cell lines as previously described then total cell lysates were subjected to electrophoresis. Western blots were performed using an PARP, caspase 8, caspase 3, P-Akt, Akt, P-I κ B antibodies. β -actin detection was used to control equal protein loading. Western blot was quantified and results obtained for LMP1-DNs expressing cells was compared to control GFP after normalization with actin expression or Akt expression for P-Akt.

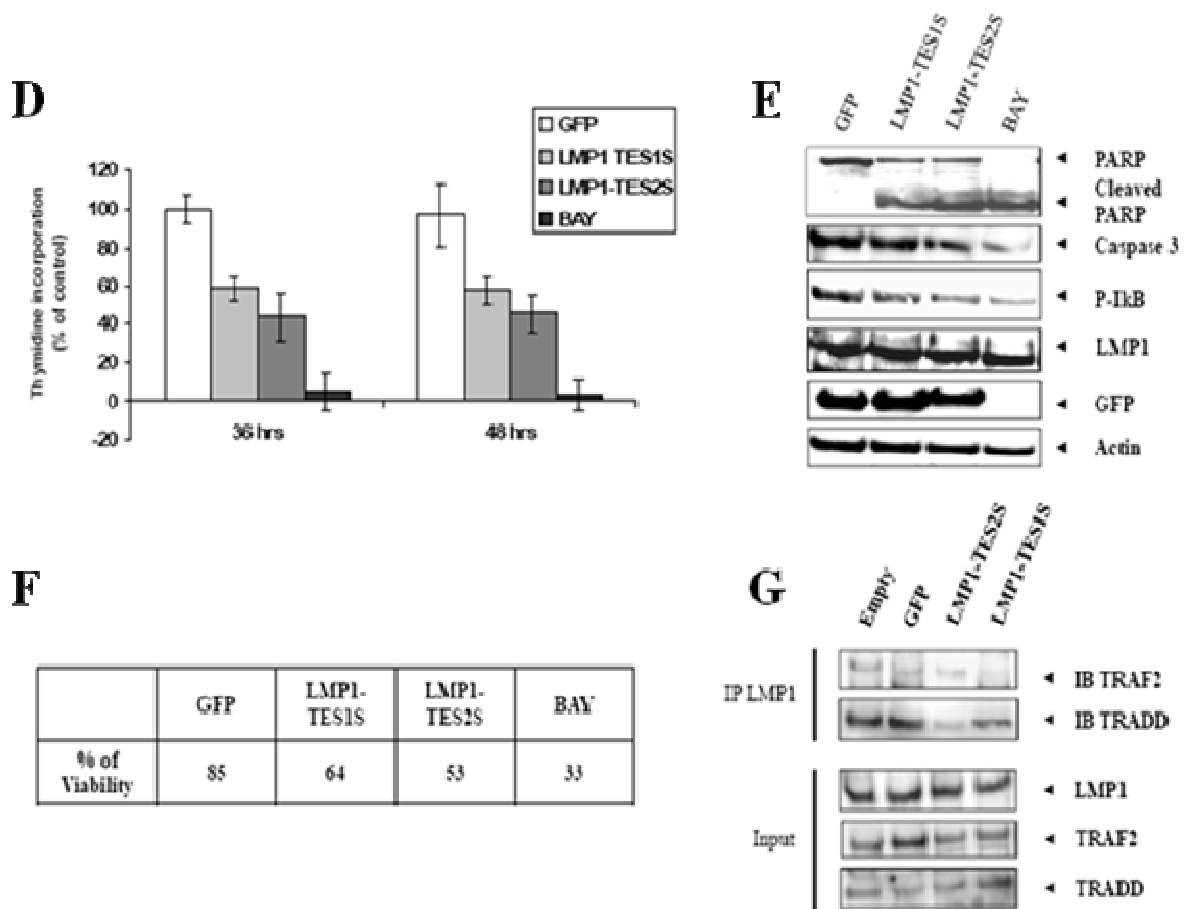


Figure 3 (D, E, F and G). Induction of LMP1-DNs trigger apoptosis cascade and inhibit survival pathway. **D**, Effects of LMP1-DNs on cell proliferation of LCLs. LCLs transiently transfected with GFP, LMP1-TES1S or LMP1-TES2S or treated with BAY 11-7082 were counted then 5×10^4 cells for each assay were seeded twice in 96 wells plate with $1 \mu\text{Ci}/\text{well}$ of [methyl- ^3H]-Thymidine (3H-TdR). Incorporation of thymidine was analyzed at 36 and 48 hrs. Results are shown as mean \pm SD values of triplicate experiments. **E**, Effects of LMP1-DNs on cell viability of LCLs. LCLs transiently transfected with GFP, LMP1-TES1S or LMP1-TES2S or treated with BAY 11-7082 were counted then 2×10^5 cells for each assay were seeded. For each assay, cells were counted twice using trypan blue to analyse viability. **F**, Effects of LMP1-DNs on apoptosis and survival signals in LCLs. LCLs were transiently transfected with GFP, LMP1-TES1S or LMP1-TES2S or treated with BAY 11-7082. Total cell lysates (100 μg) were subjected to electrophoresis. Western blots were performed using an PARP, caspase 3, P-I- κB , LMP1 or GFP antibodies. β -actin detection was used to control equal protein loading. **G**, LMP1-DNs recruit LMP1 adapters and impair their binding to LMP1-wt in LCLs. LCLs transiently transfected with empty vector, GFP, LMP1-TES1S or LMP1-TES2S were subjected to immunoprecipitations (IP) with LMP1 antibody (S12). Samples and whole cell lysates were subjected to western immunoblot (IB) analysis for LMP1, and endogenous TRADD and TRAF2.

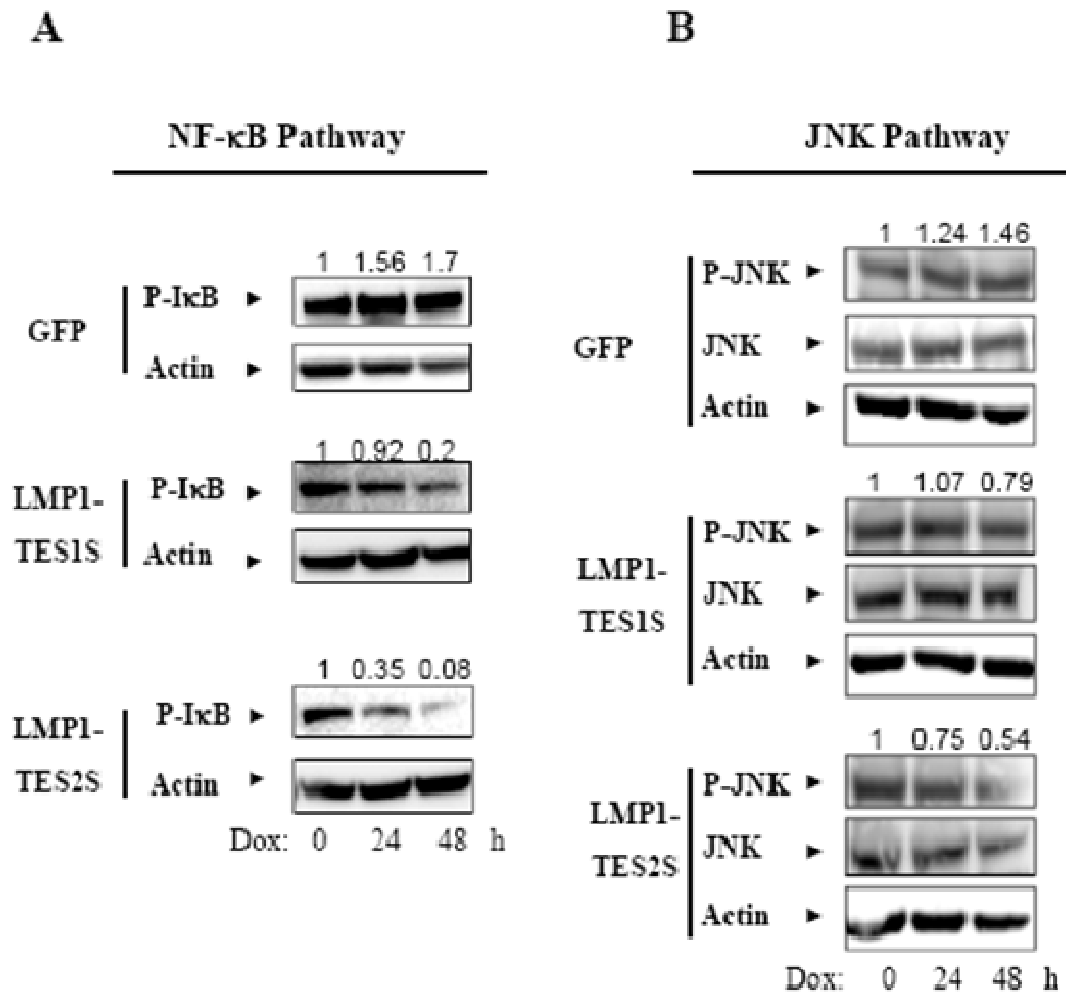


Figure 4. LMP1-DNs impair the NF- κ B survival signaling but not the c-jun fos kinase (JNK) signaling pathway in EBV lymphocyte (NC5) transformed cell lines. Expression of LMP1-DNs was induced by doxycycline for 0, 24 and 48 hrs and then lysed as described above (figure 3). Effect of LMP1-DNs on NF- κ B (**A**) and on JNK (**B**) pathways. Total cell lysate was analyzed by western blot using antibodies to phosphorylated-I- κ B, phosphorylated-JNK, JNK and β -actin. Western blot was quantified and results obtained for LMP1-DNs or GFP expressing cells was compared to control (without Dox) after normalization with actin expression (**A**) or JNK expression (**B**).

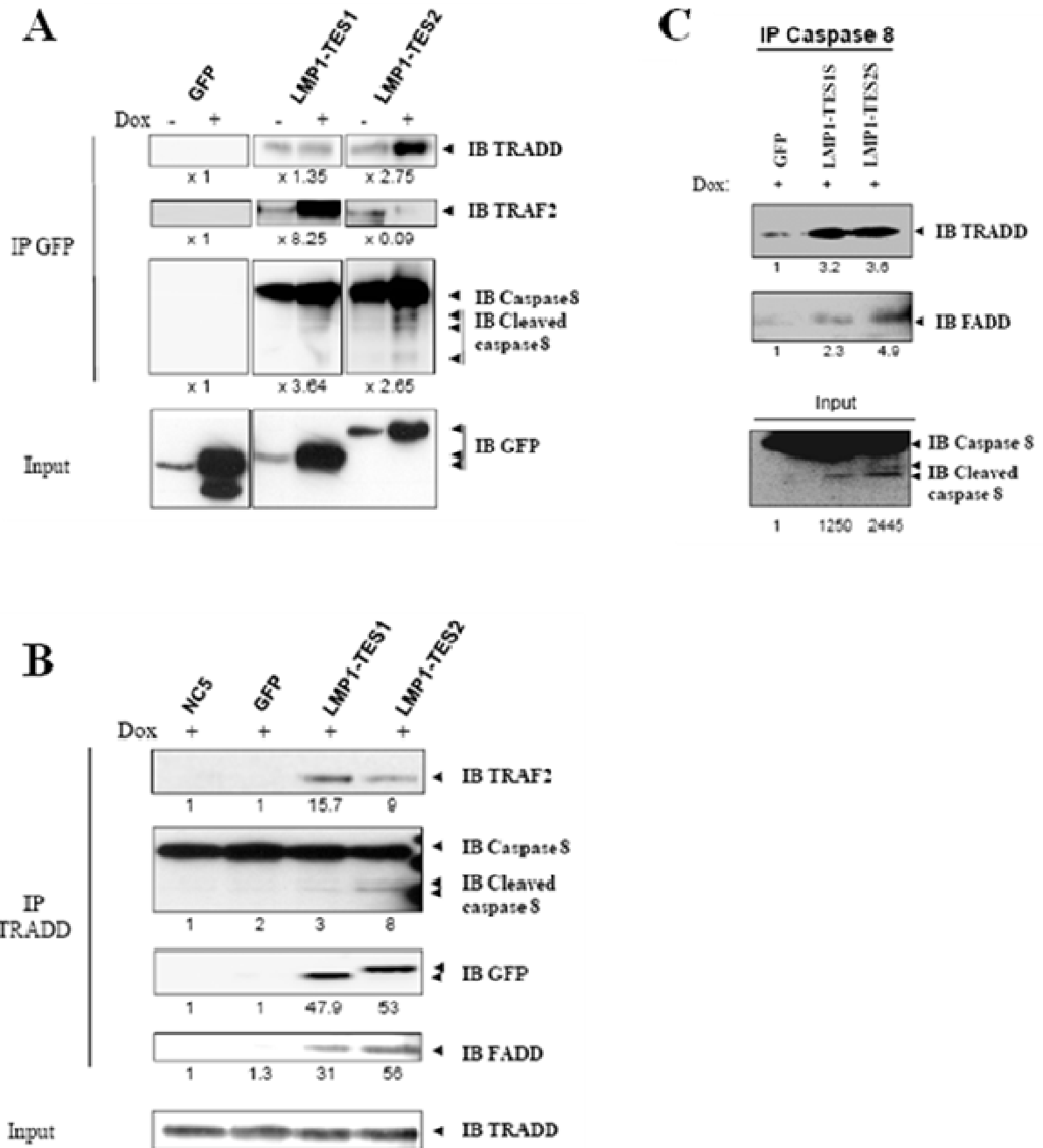


Figure 5. Recruitment of an apoptotic complex by LMP1-DNs in NC5 infected cell line. A, LMP1-DNs bind proximal and distal proteins involved in apoptosis. Expression of LMP1-DNs was induced as described in figure 3 for 16 hrs and co-immunoprecipitation was performed using a GFP antibody following by western blot analysis to detect proteins (TRADD, TRAF2, caspase 8) binding to LMP1-DNs and which can form an apoptotic complex. Whole cell lysate was used to detect LMP1-DNs expression with a GFP antibody. Western blot was quantified and results obtained for LMP1-DNs or GFP expressing cells was compared to control (without Dox). **B, C,** Role of LMP1-DNs in apoptotic complex generation. To assess the formation of an apoptotic complex following LMP1-DNs induction, co-immunoprecipitation experiments were performed using a TRADD (**B**) and caspase 8 (**C**) antibodies followed by western blot to analyze the increase in proteins partners such as cleaved caspase 8, FADD and LMP1- DNs in this complex. Western blot was quantified and results obtained for LMP1-DNs or GFP expressing cells was compared to parental NC5 cell line (**B**) or GFP expressing cells (**C**).

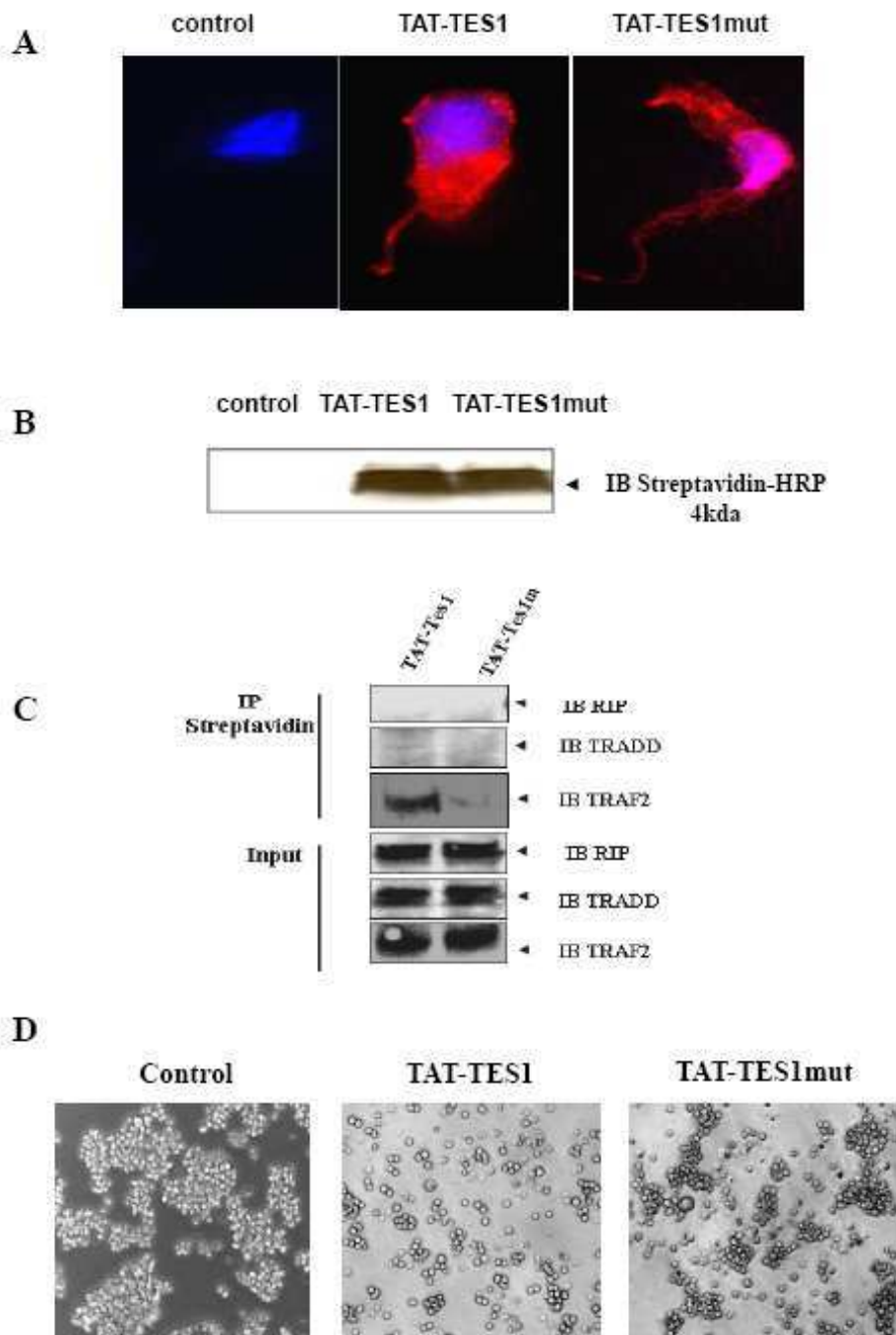


Figure 6. Effect of synthetic peptides derived from LMP1 C-terminal sequences. **A**, Monitoring of cellular uptake of peptides in HEK cells and sub-cellular localization. 2×10^5 HEK cells were plated then incubated with $5 \mu\text{m}$ of biotinylated TAT-TES1, TAT-TES1mut or vehicle only for 5 minutes. Then, cells were labeled with Hoechst for nucleus detection and a Phycoerythrin-labeled streptavidin was used for peptide detection. Cells were then analyzed by fluorescence microscopy. **B**, HEK cells were incubated with each peptide as described above then cells were lysed and analyzed by western blotting using a streptavidine-horse radish conjugate for peptide detection. **C**, HEK cells were incubated with peptides for 10 minutes and then cells were lysed. Peptides were immunoprecipitated with streptavidin coupled to sepharose beads. A western blot was then performed using TRAF2, TRADD and RIP antibodies to verify the ability of peptides to interact with LMP1 signaling adaptors. **D**, Effect of peptides in EBV infected cell lines. NC5 cells were incubated with $15 \mu\text{m}$ of each peptide for 10 hrs then cells mortality and induced phenotypes were analyzed by photomicrograph.

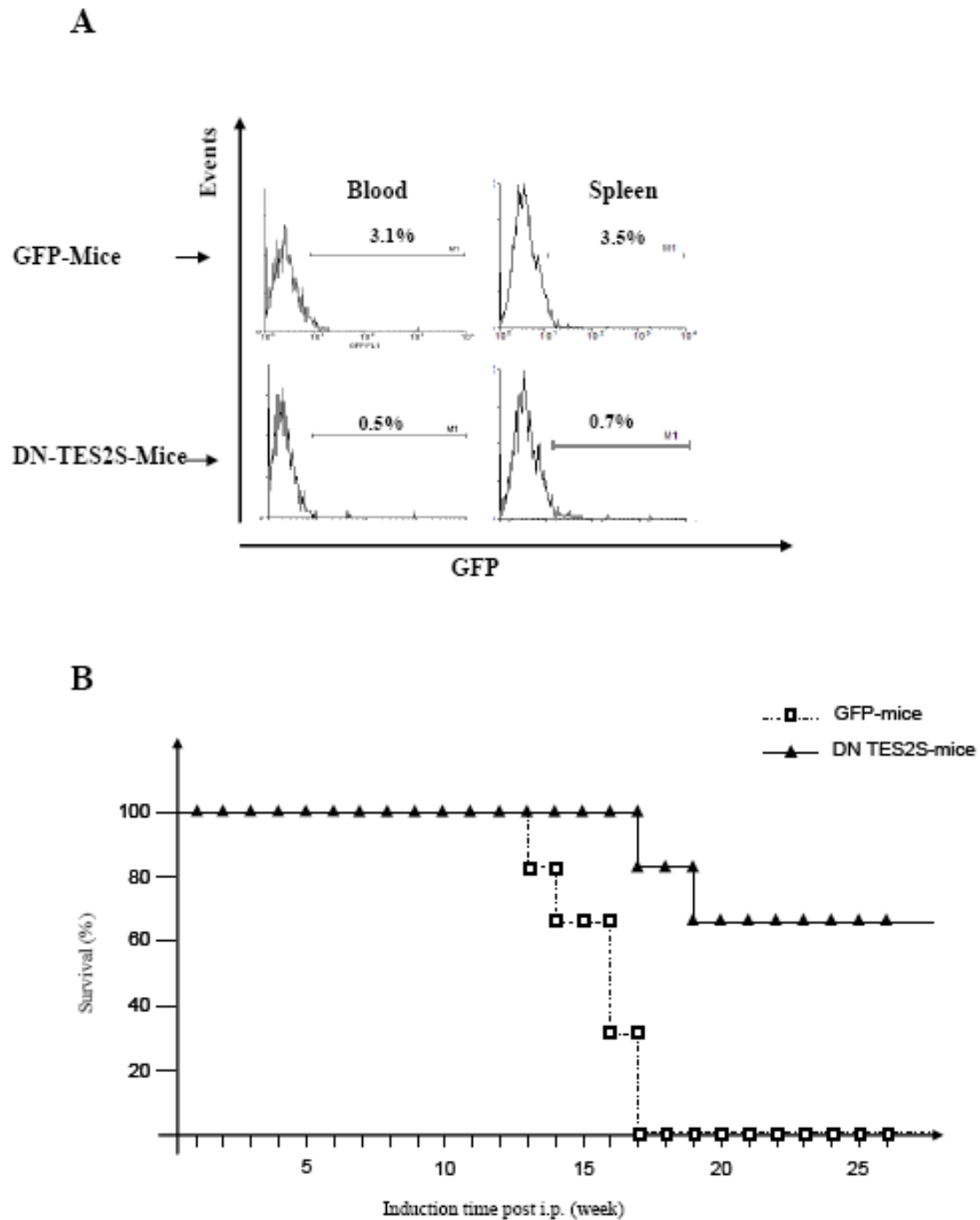


Figure 7. LMP1 dominant negatives promote SCID mouse survival after intraperitoneal transfer of EBV transformed cells. **A**, Analysis of NC5 transformed cell lines survival in mice after intraperitoneal transfer. Three weeks after transfer and continuous doxycycline administration, blood and organs were recovered and analyzed for their content of NC5-GFP and NC5-LMP1-TES2S cells by flow cytometry. **B**, Effect of induced LMP1-DN-cell lines in SCID mice survival. In each condition, total number of mice was set at 100 and survival monitoring was done at percentage during experimental time. Black curve with triangle show mice injected with NC5- LMP1-TES2S cell line and gray curve with diamond, mice injected with GFP NC5 cell line.

Article 3

The viral oncoprotein LMP1 regulates cell death and cooperates with HGF/SF-MET signaling to induce cell invasive growth

Guillaume Brocqueville, Papa Alioune Ndour, Tan-Sothéa Ouk, Arnaud Le Goff, Caroline De Witte, Alexandra Mougel, Jean Coll, Véronique Fafeur and Eric Adriaenssens.

Manuscrit en préparation

Présentation de l'article 3

L'EBV est associé à plusieurs pathologies malignes d'origine épithéliale telles que les carcinomes gastriques et les carcinomes du rhinopharynx (CRP). Dans ces cancers, la protéine LMP1 est exprimée. La protéine LMP1 est l'oncogène majeur du virus d'Epstein-Barr et joue un rôle crucial dans le développement des pathologies associées à ce virus. Bien que la protéine LMP1 soit considérée comme l'oncogène majeur d'EBV et qu'elle active des voies de signalisation impliquées dans des processus de survie comme la voie NF- κ B, les effets cytotoxiques d'une surexpression de LMP1 dans une cellule sont connus. De plus, son homologie fonctionnelle avec le TNFR1, de par sa capacité à fixer les mêmes protéines adaptatrices et à activer les mêmes voies de transduction, suggère que LMP1 peut présenter des propriétés pro-apoptotiques.

Dans ce troisième article, nous avons étudié les effets d'une expression transitoire de LMP1 dans la lignée cellulaire épithéliale MDCK. Dans ces cellules, l'expression transitoire de LMP1 induit une mort cellulaire massive. De plus, en condition d'induction d'apoptose, LMP1 semble amplifier l'apoptose et favoriser l'activation de la caspase 3. Ces effets néfastes pour les cellules MDCK dépendent du niveau d'expression de la protéine LMP1 et de sa signalisation. En effet, l'expression d'un variant de LMP1 dont les sites TES1 et TES2 sont non fonctionnels n'est pas toxique pour les cellules.

Afin de faciliter l'étude de cette mort induite par LMP1 nous avons généré des lignées MDCK stablement transfectées avec des vecteurs inductibles de type « Tet-ON » permettant normalement l'expression conditionnelle de LMP1. Les clones obtenus expriment de manière constitutive LMP1 et ne semblent plus sensible à ses effets cytotoxiques. Au contraire LMP1 favorise la survie de ces clones en inhibant l'activation de caspases lors d'une apoptose induite par des stress. De plus, l'expression stable de LMP1 dans les MDCK accroît leur motilité et amplifie les phénotypes induits en réponse à une stimulation par le facteur de croissance HGF/SF.

THE VIRAL ONCOPROTEIN LMP1 REGULATES CELL DEATH AND COOPERATES WITH HGF/SF-MET SIGNALING TO INDUCE CELL INVASIVE GROWTH

Brocqueville Guillaume¹, Ndour Papa Alioune¹, Ouk Tan-Sothéa², Le Goff Arnaud¹, De Witte Caroline¹, Mougél Alexandra¹, Coll Jean¹, Faveur Véronique¹ and Adriaenssens Eric¹.

¹ CNRS UMR8161, Institut de Biologie de Lille, IFR 142, Université Lille-Nord de France, 1 rue du Pr Calmette, 59021 Lille Cedex

² CNRS UMR6101, Faculté de Médecine de Limoges, CHU Dupuytren, 2 rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges Cedex

Corresponding author : Pr Eric Adriaenssens, CNRS UMR8161, Institut de Biologie de Lille, 1 rue du Pr Calmette, BP441, Lille Cedex. Tel : 33 3 20 87 12 43, Fax : 33 3 20 87 11 90, mail : eric.adriaenssens@ibl.fr

Running title: LMP1 induces both cell death and cell survival.

Key Words: EBV, LMP1, apoptosis, survival, HGF/SF, MDCK.

Abstract

The Epstein-Barr virus (EBV)-encoded latent membrane protein 1 (LMP1), the main viral oncoprotein, has a significant role in proliferation, transformation and metastasis of several EBV-associated tumors. LMP1 is a constitutively active membrane signaling protein that regulates multiple signal transduction pathways via its C-terminal Transformation effector sites (TES)-1 and -2. We report, in transient transfection, LMP1 expression induces cell death in the tested epithelial cell lines and enhance stress-induced apoptosis. This cytotoxic effect is proportional to expression level of LMP1 and it depends on LMP1 signaling. By contrast, in the same cell line, after obtention of cell lines stably expressing LMP1, cell survival is favored. The current data support the notion that differences in physiological context may orientate LMP1 activity to one of its ambivalent effects. Interestingly, in survival context, LMP1 protects epithelial cells from stress-induced apoptosis and synergizes with HGF/SF-MET signaling. In this context, LMP1 accentuates HGF/SF activation of ERK and AKT and enhance HGF/SF-induced phenotypes as

scattering and morphogenesis. Together, these data demonstrate that high level expression of LMP1 in epithelial cells induces cell death but LMP1 participates in the selection of resistant cells in which it synergizes with HGF/SF to favor invasive phenotypes.

Introduction

Epstein-Barr virus (EBV) is an ubiquitous human gammaherpesvirus that infects over 90% of the worldwide population. This virus is involved in infectious mononucleosis and pathogenesis of several human malignancies including Burkitt lymphoma, Hodgkin disease, gastric carcinoma and nasopharyngeal carcinoma (NPC) (Rickinson & Kieff, 2007). In these cancers, EBV is usually found in a latent state characterized by the expression of a type II latency pattern in which expression is restricted to EBV nonpolyadenylated RNAs (EBERs), EBV BamHI A rightward-oriented transcripts (BARTs), EBV nuclear antigen 1 (EBNA1), and the three latent membrane proteins (LMP1, LMP2A and LMP2B) (Rickinson & Kieff, 2007).

Among these gene products, LMP1 is a prime candidate for EBV involvement in the

development of malignancies. LMP1 is considered as the major oncogene of EBV because it is able to transform B lymphocytes (Kaye *et al.*, 1993), T lymphocytes (Groux *et al.*, 1997), monocytes (Masy *et al.*, 2002) and fibroblast (Wang *et al.*, 1985). It inhibits epithelial cell differentiation (Dawson *et al.*, 1990), and induces genomic instability in human epithelial cells (Liu *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2008). LMP1 functions as a constitutively active, ligand-independent, tumor necrosis factor receptor (TNFR) (Gires *et al.*, 1997 ; Eliopoulos & Young, 2001). LMP1 is a 63 kDa plasma membrane protein with short N-terminal hydrophilic region, six transmembrane domains and a long C-terminal cytoplasmic region containing two critical signaling sites called Transformation Effector Sites 1 and 2 (TES1 and TES2). A variety of signaling pathways are activated by LMP1 including NF- κ B, c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (Paine *et al.*, 1995 ; Eliopoulos & Young, 1998 ; Eliopoulos *et al.*, 1999 ; Dawson *et al.*, 2003). Activation of these different signaling pathways leads to expression modulation of specific genes that are involved in cell survival, cell cycle progression, proliferation, migration and cell death (Nitta *et al.*, 2003 ; Everly *et al.*, 2004 ; Dawson *et al.*, 2008 ; Le Clorennec *et al.*, 2006 ; Shair *et al.*, 2008). In contrast, cytotoxic properties are also conferred on LMP1 for many years (Hammerschmidt *et al.*, 1989). LMP1 is able to trigger cell death in an NF- κ B-dependent manner (Nitta *et al.*, 2003) and can sensitize cells to or even promote apoptosis (Lu *et al.*, 1996 ; Zhang *et al.*, 2002 ; Le Clorennec *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2007 ; Le Clorennec *et al.*, 2008). This dual function of LMP1 may seem paradoxical, but, the same ability to induce both cell death and survival has been described for other proteins such as RAS and MYC cellular oncogenes (Overmeyer & Maltese, 2011 ; Nilsson & Cleveland, 2003) as well as TNFR1 which is functionally related to LMP1 (Micheau & Tschoop, 2003).

In this study, we investigate in the same epithelial cell line both effects of LMP1 on cell death and cell survival. We used transient experiments to determine effect of LMP1 overexpression in Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells and determine region of LMP1 implicate in this phenomenon. We generate cell lines stably expressing LMP1. On these cells we induce apoptosis to see the impact of LMP1 expression on cell survival. And then, we consider the phenotypes induced in response to stimulation by the hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) on cell stably expressing LMP1 to identify possible cooperation between LMP1 and the receptor tyrosine kinase MET activated by HGF/SF.

Materials and methods

Cytokines, drugs and cell cultures

Human recombinant HGF/SF was purchased from Peprotech. Anisomycin was purchased from Calbiochem. Doxycycline was purchased from Sigma. Hygromycin B was purchased from Euromedex. Geneticin (G418) was purchased from Invitrogen. MDCK epithelial cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Invitrogen) and antibiotics at 37°C in water-saturated 5% CO₂ atmosphere.

Plasmid constructs and antibodies.

The pcDNA3-LMP1 plasmid was obtained by cloning the wt LMP1 cDNA derived from the B95.8 strain of EBV. LMP1 expression is controlled by CMV promoter of the pcDNA3 vector. pcDNA3-LMP1 mutants (named T1Mut, T2Mut and T1,2Mut) were generated by site-directed mutagenesis. T1Mut, T2Mut and T1,2Mut were obtained from LMP1 in which TES1 or TES2 or both were respectively mutated. For TES1 mutation, 204 to 208 codons (PXQXT) were substituted by AXAXA and for TES2 mutation, 384 to 386 codons (YYD) were deleted. The inducible vector pRT1-LMP1 was a generous gift of G. W. Bornkamm (Bornkamm *et al.*, 2005). The bidirectional tetracycline-inducible promoter drives the expression of both an inactive

truncated version of NGFR lacking the cytoplasmic domain (NGFRt) and the cDNA coding for LMP1. The pSTAR-LMP1 was obtained by cloning LMP1 cDNA derived from the B95.8 strain of EBV in the pSTAR vector (Zeng *et al.*, 1998).

The TRADD and TRADD-DN expression vectors were a generous gift of M. Rothe (Tularik). The TRAF2-DN expression plasmid was a generous gift of P. Mehlen (Ye *et al.*, 1999). The normalizing vector pRLnull has no promoter sequence to drive expression of the *Renilla* luciferase gene and was purchased from Promega. The monoclonal antibody directed against LMP1 was obtained from the S12 hybridoma culture supernatant (a generous gift of P. Busson). Anti-ERK2 (sc-154) antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology. Anti-AKT (4691), anti-phospho-AKT (4060), anti-phospho-ERK1/2 (9106), anti-phospho-MET (3077), anti-cleaved caspase 3 (9664) and anti-PARP (9542) antibodies were purchased from Cell Signaling Technology®. Anti-MET (3D4) antibody was purchased from Invitrogen™. Anti-NGFR-PE conjugated antibody (C40-1457) was purchased from BD Pharmingen.

Transfections

For transient expression experiments in MDCK cells, 9.10^4 cells were seeded in six well plates. Cotransfections were performed using Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (Invitrogen) in serum-free OptiMEM (Gibco, Invitrogen). Routinely, 1µg DNA of interest vector was transfected. When needed, 25 ng of normalizing vector was cotransfected with 1 µg DNA of interest vector. In case of dose effect, the amount of DNA was completed with empty vector. Cells were incubated with reagents 5 h at 37°C and then the culture medium was replaced by fresh medium with serum for 24 h.

For stable transfection with pRT1-LMP1 vector, MDCK were transfected as described above. After 2 days, cells were cultured in DMEM 10% FBS (tetracycline-free) with 150 µg/ml of Hygromycin B. After 3 weeks, induction of LMP1 expression was performed with doxycycline.

For stable transfection with pSTAR vectors, MDCK were transfected as described above with the empty vector or the pSTAR-LMP1 vector. After 2 days, cells were cultured in DMEM 10% FBS (tetracycline-free) with 800 µg/ml of G418. 14 days after G418 selection, several clones were isolated.

RNA interference

RNA interference was carried out by using synthetic siRNA duplexes (Eurogentec). A synthetic siRNA duplex (siMET) corresponding to the MET mRNA sequence (5'-GUGAGAGCACAACAAAUAU-3') and a synthetic siRNA duplex (siGFP) corresponding to the green fluorescent protein mRNA sequence (5'-GCUGACCCUGAAGUUCAU-3'), as a negative control, were used. Cells were transfected in 6-well plates using Lipofectamine™ RNAiMAX transfection reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Luciferase activity assay

Cells were harvested 24 h after transfections, with passive lysis buffer (Promega). The lysates were clarified by centrifugation and luciferase assay was performed using the Dual Luciferase assay system (Promega) and luciferase activities were measured by a Berthold Lumat LB 9501 luminometer. Triplicate samples were performed in each experiment, and standard deviations (s.d.) are shown.

Western blotting

Cells were lysed in the following solution: 20mM Tris-HCl pH 7.4, 50mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Triton X-100. Total protein concentrations were assessed using Bio-Rad protein assay. Proteins were resolved by SDS-PAGE (10%) and transferred onto PVDF membranes (Immobilon-P, Millipore) by electroblotting. Membranes were blocked with 0.2% casein in PBS-0.1% Tween 20 and incubated with appropriate primary antibodies described above. After extensive washing in PBS-0.2% Tween 20, membranes were incubated with

horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) and peroxidase activity was revealed using an ECL (enhanced chemiluminescence) substrate (SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific) and a LAS-3000 camera acquisition system (FujiFilm). Quantification of the acquired bioluminescent images was performed using MultiGauge v3.0 image analysis program (Fujifilm).

Immunofluorescent labeling

For immunofluorescent labeling with PE-conjugated NGFR antibody, cells were transfected according to protocol described above with pRT1-LMP1. Cells were treated with 2 μ g/ml doxycycline for 24h. Cells were washed and incubated with PE-conjugated NGFR antibody 30 min at 37°C. Cells were washed twice with PBS.

Flow cytometry analysis

For cell death analysis : cells were washed and stained with PI (50 μ g/ml) just before flow-cytometric analysis.

For cell cycle analysis : 24h after transient transfection with indicated vectors, cells were washed twice with ice-cold PBS, fixed and permeabilized with ice-cold 70% ethanol, pelleted, washed with PBS, treated with RNase A (1mg/ml) and stained with PI (100 μ g/ml). After 1 hour, DNA content of cells was measured using a flow cytometer (Coulter EPICS XL-MCL). The results were analyzed with the WinMDI 2.9 software and percentages of sub G0/G1 phase cells were indicated.

Determination of caspase activity

Caspase-3 activity was assayed using the EnzChek® Caspase-3 Assay Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's protocols. Equal protein loading amounts of each sample were incubated with caspase substrate (Z-DEVD-AMC) at room temperature for 1 h. Caspase-3 activity was measured using a fluorometer equipped with a 355 nm excitation filter and a 430 nm emission filter.

Colony-formation assay

10⁵ MDCK cells/well were plated in six-well plates. Transient transfections were performed using the lipofectamine 2000 procedure (Invitrogen) with 1 μ g of DNA/well. Two days after transfection, cells were split into five 100-mm dishes and transfected cells selection was induced with G418 (800 μ g/ml). Cells were either stained, lysed for western blot analysis or counted.

Tubule formation assay

Cells were seeded at a density of 10⁵ cells/well onto solidified growth factor reduced Matrigel basement membrane matrix (BD Biosciences) in 24-well plates and cells were subjected to various treatments for 48 hours. Representative pictures of the resulting tubular/cord-like networks were snap-captured using a phase contrast microscopy (magnification x40, Nikon Eclipse TS100).

Wound-healing assay

In 6-well plate, confluent monolayers of MDCK cells stably expressing LMP1 or not were scratched with a 1 ml pipette tip, washed with PBS to remove cell debris and subsequently cultured in medium containing 0.1% FBS. Representative images of three wounds were snap-captured using a phase contrast microscopy (magnification x40, Nikon Eclipse TS100) at 0 and 14 h post-wounding.

Results

Transient expression of LMP1 induces cell death in MDCK epithelial cells.

We investigate the effect of LMP1 expression in MDCK cells. We show that anisomycin-induced apoptosis in MDCK epithelial cells was amplified by ectopic expression of LMP1 as demonstrated by PARP cleavage (Fig. 1A) and the caspase 3 activity (Fig. 1B). MDCK cells transfected were also analyzed by flow cytometry after staining with propidium iodide (PI), a DNA-binding fluorochrome, to detect dead cells (Fig. 1C). Usually, the transfection efficiency of MDCK cells, in our conditions, is about 30 to 40%. Despite the fact that not all cells are transfected, this result indicates that most cells that express LMP1 die. To

focus on transfected cells, we cotransfected with LMP1 expression vector the normalizing vector pRLnull (Fig. 1D). The luciferase activity is independent of inductors or cell types, but reveals the number of transfected living cells. Thus, we showed the massive cell death induced by LMP1 in MDCK cells, since the most part of transfected cells died (Fig. 1D).

Cell cycle analysis was performed on MDCK transfected with increasing amount of LMP1 expression vector and showed that cell death induced (sub G0/G1 cells) was proportional to the expression level of LMP1 (Fig. 1E). A positive control with TRADD expression vector was used and number of cells in sub G0/G1 was indicated. To confirm the observations obtained in transient transfection, we stably transfected MDCK cells with the bidirectional Tet-on inducible vector pRT1-LMP1 which conditionally expresses both NGFRt and LMP1 after doxycycline treatment. Twenty-four hours after induction with doxycycline, we first labeled cells with PE-conjugated NGFR antibody and PI for DNA. Data indicated that control MDCK cells were not labeled with PI (Fig. 1F, top panel). Without doxycycline induction, an expression vector leak leads to expression of NGFRt and LMP1 (Fig. 1F, middle panel) without induction of significant death (R2: 32%; PI+: 5%). After 24 h doxycycline induction, a cell fraction (Fig. 1F, bottom panel) expressed moderately NGFRt and LMP1 (R2: 39%) with increasing cell death (PI+: 12%) and a cell fraction (R3: 3%) expressed high level of NGFRt and therefore LMP1. All cells of this fraction were died as evidenced by PI stained.

In MDCK epithelial cells, transient expression of LMP1 induces cell death and the proportion of dead cells is correlated with its level of expression.

LMP1 induced cell death depends on its signaling ability.

To evaluate signaling implication in this cell death, we constructed several vector expressing mutated forms of LMP1. LMP1 signaling ability was impaired by mutating TES1 or TES2 or both (Fig. 2A). The proper

expression of each LMP1 variants was confirmed by western blot analysis with an anti-LMP1 antibody (Data not shown). As expected, LMP1-T1Mut, LMP1-T2Mut and LMP1-T1,2Mut proteins have the same molecular weight as LMP1wt (63 kDa) and no significant difference of expression was noticed. To evaluate the ability of LMP1wt or variants to induce cell death, MDCK cells were cotransfected with the normalizing vector pRLnull. Reduction of LMP1 signaling prevents cell from the cytotoxic effect of LMP1 (Fig. 2B). In these experiments, the role of TES2 domain appears essential, then we have sought the involvement of two cellular adapters that can be recruited at this site, TRADD and TRAF2. We cotransfected the expression vector encoding LMP1 and increasing doses of the vector encoding for a dominant negative mutant of TRADD (Fig. 2C) or TRAF2 (Fig. 2D). The normalizing vector was also cotransfected to reveal cell viability. The use of mutant TRADD leads to a restoration of cell viability, in a dose dependent manner, which demonstrates the involvement of this adapter in LMP1-induced cell death (Fig. 2C). TRAF2 does not appear to be involved (Fig. 2D). Death induced by LMP1 involves its TES2 signaling and requires the recruitment of TRADD.

LMP1-induced cell death limits the establishment of cell lines that stably express LMP1.

In order to evaluate the consequence of LMP1 signaling during G418 selection, we transfected MDCK cells with the expression vectors encoding the different LMP1 variants and containing the *neo* gene as selectable marker. Three days later, cells were split into 100-mm dishes. Cells were then selected 11 days with G418. The figure 3A shows a representative dish with the number of clones that were obtained under the different conditions. As expected, the strongest cytotoxic effect is induced by LMP1wt. This effect decreases when TES1 or TES2 is impaired and is abolished when both TES sites are mutated. We also counted number of cells present in dish to assess cell

survival and proliferation (Fig. 3B), and data were reported to the cell number obtain with empty vector (100%). Proteins expression was controlled before and after G418 selection (3 and 14 days after transfection of MDCK cells, Fig.3C). Prior to selection, for each condition, the transfected cells have similar levels of expression of our proteins of interest, but after G418 selection, just cells transfected with expression vectors encoded mutated forms of LMP1 expressed variants at similar level, and LMP1wt expression level is very low. It is also the case for another epithelial cell line like HEK-293 (Supplemental data). LMP1 induced cell death limited generation of stably expressing LMP1 MDCK cell lines.

Stable LMP1 expression protects MDCK cells from stress-induced apoptosis.

pSTAR vector was used to generate MDCK cells that stably express LMP1 protein. As previously, we got a few cells expressing LMP1 compared to the number of cells obtained in control conditions. Besides, all the clones obtained with the pSTAR-LMP1 vector showed constitutive expression of LMP1 while the pSTAR vector is meant to be a conditional expression plasmid. We named the cell lines obtained with empty vector with the letter “V” (V1 and V20), and those obtained with the pSTAR-LMP1 vector with the letter “C” (C9, C15 and C27). Cells were treated with doxycycline for 24 hours to induce LMP1 expression and western blot analysis was performed (Figure 4). In the “C” cell lines, LMP1 expression is constitutive (Fig. 4, higher panel). In these cells, the absence of PARP cleavage revealed that LMP1 has surprisingly no cytotoxic property (Fig. 4, lower panel). It was reported that LMP1 is able to transform MDCK cells and induce phenotypic changes similar to those obtained by HGF/SF treatment. We controlled the expression of MET in our cells and we investigated the activation of ERK and AKT survival pathways. MET is expressed at the same level in all our cells (Fig. 4, MET panel), LMP1 does not induce MET expression nor activation, since revealed by absence of phospho-MET (Fig. 4, P-MET panel). ERK

and AKT proteins are expressed at the same level in all our MDCK-derived cell lines (Fig. 4, ERK and AKT panels). Phospho-ERK and phospho-AKT do not increase in presence of LMP1 suggesting that these survival pathways are constitutively activated (Fig. 4, P-ERK and P-AKT panels). However LMP1 protects these cells from anisomycin-induced apoptosis. Anisomycin treatment induces apoptosis, cell detachment and caspase 3 activation. In presence of LMP1, the cell detachment, resulting from apoptosis, is less important than detachment observed with V20 control cells (Fig. 5A). To confirm this protection, we used PARP and MET cleavage as caspase 3 activation markers. When LMP1 is expressed, in C15 and C27 cell lines, caspase 3 activation, PARP cleavage and MET cleavage are less effective (Fig. 5B, MET, PARP and active Casp 3 panels).

In MDCK cells that stably express LMP1, stress-induced apoptosis is decreased and caspase 3 is less activated.

Stable LMP1 expression enhances cell responses to HGF/SF stimulation.

The HGF/SF-MET pathway promotes survival, proliferation, migration, and morphogenesis. LMP1 could transform MDCK cells and induce similar phenotypic changes than HGF/SF-MET pathway by Ets1 activation (Kim *et al.*, 2000). In addition, LMP1 could induce MET expression in MDCK cells (Horikawa *et al.*, 2001). So we proposed to analyze, in the presence of LMP1, expression of MET and its activation by its ligand and induced phenotypes in MDCK. In first, stably expression of LMP1 in our MDCK do not increase MET protein level (Fig. 6A, MET panel), against in absence of HGF/SF, there was no activation of MET (Fig. 6A, P-MET panel). When we stimulated cells with HGF/SF, we can see a similar activation, even better with control cells, of the receptor in the short time in response to ligand (Fig. 6B, P-MET/MET graph). In contrast, we observed strong activation of ERK and AKT, but not JNK, signaling pathways when LMP1 is expressed (Fig. 6A, P-ERK, P-AKT and P-JNK panels, and 6B P-ERK, P-AKT

and P-JNK graphs). Then, the scattering and morphogenesis phenotypes induced by HGF/SF-MET pathway are enhanced in presence of LMP1 (Fig 6C and 6D). Indeed, treatment with HGF on V20 control cells into dishes induces lower scattering than that obtained in the same conditions with cells expressing LMP1 (C15 and C27) (Fig. 6C), and on matrigel, HGF/SF stimulation did not induce structural formation of control cells whereas, in the presence of LMP1, cells form tubular structures (Fig. 6D). We also observed this synergy between LMP1 and MET after cell culture in soft agar with HGF/SF treatment. In presence of LMP1 the growth of MDCK cells was stimulated and colonies were much numerous and larger than those of control MDCK cells (Data not shown). In addition, we can see that LMP1-expressed cells (C27) are scattered basal cells compared to control cells (V20) which were very cohesive in absence of HGF/SF treatment (Fig. 6C). LMP1 induces MDCK cells scattering without growth factor stimulation and synergizes with MET receptor to activate ERK and AKT transduction pathways and resulting phenotypes in response to HGF/SF.

Inhibition of MET impairs HGF/SF-induced phenotypes but not LMP1-induced motility.

To evaluate the effects of LMP1 expression and MET inhibition on cell motility, cell monolayers were wounded to create a small scratch wound and were allowed to heal with or without HGF for 14 hours. LMP1, as HGF/SF, enhances epithelial wound closure (Fig. 7A and 7B). LMP1 displays the same effect after MET repression mediated by RNAi in absence of HGF/SF, but in presence of HGF/SF, the wound closures are slower, indicating that LMP1 phenotypes was not mediated by MET. The MET expression inhibition was controlled by western blot (Fig. 7C). RNAi-mediated MET inhibition impairs HGF/SF-induced phenotype, and we observed the same result with scattering test (Data not shown). By contrast, MET knock-down had no effect on basal LMP1-induced scattering

as shown in figure 6C with the high LMP1-producer clone C27.

Discussion

LMP1, that is expressed in most EBV-associated malignancies, is the major EBV oncogene. This status may seem contradictory to the cytotoxic effects which are conferred to this protein. However, the same kind of properties are also associated with cellular oncogenes such as RAS and MYC (Overmeyer & Maltese, 2011 ; Albiñ *et al.*, 2010). In addition, LMP1 is functionally related to members of the TNF receptor family, which are particularly involved in the processes of both cell death and survival.

In this work, we demonstrated that LMP1 induces cell death in epithelial cells. In MDCK cells, LMP1 expression leads to caspase 3 activation as indirectly evidenced by PARP cleavage, and enhances anisomycin-induced apoptosis. This cell death is proportional to LMP1 expression level. The mechanism of cell death induced by LMP1 in MDCK epithelial cells is unclear although we detect caspase 3 activation. Indeed, PI labeling (direct labeling and cell cycle analyzing) reveals that LMP1 overexpression induces important cell death in MDCK while a low level of caspase 3 activation is detected compared to what one might expect. This suggests that either cells strongly expressing LMP1 are already dead, so we cannot detect caspase activity, or apoptosis is not the only type of cellular death involved in LMP1 cytotoxic effect. Indeed, as TNFR1 receptor, TES2 domain of LMP1 recruits TRADD and RIP1 adaptors which may be involved in different cell death process as apoptosis (Micheau & Tschopp, 2003) or necroptosis (Christofferson & Yuan 2010).

LMP1 induces cell death through its TES2 domain signaling. However, the clonogenicity test result shows that both TES domains are involved in the cytotoxic effect of LMP1. Probably at least one signaling pathway induced by these two functional sites contributes to this deleterious effect. The NF- κ B signaling pathway is the best candidate because its implication in cell

death induction by LMP1 in 293T and Rat-1 was previously demonstrated (Nitta *et al.*, 2003) and its inhibition reduced caspase activation in LMP1-expressing HeLa cells treated with cisplatin (Zhang *et al.*, 2007).

We used tetracycline-inducible vector to generate cells which conditionally expressed LMP1, but we only obtained cells that constitutively expressed LMP1. In transient experiment and during G418 selection, despite the use of inducible vectors and medium supplemented with tetracycline-free fetal bovine serum, we consistently detected basal expression of LMP1, which was sufficient to induce cell death, favoring the selection LMP1-expressing cells that were resistant to this death.

Kim *et al.* showed that LMP1 is able to transform MDCK epithelial cells, induce morphological change, as well as high motility (Kim *et al.*, 2000). In their study, expression of LMP1 gene in MDCK cells has similar effects as HGF/SF treatment, including induction of expression of the same genes (Fafeur *et al.*, 1997). In our study, we show that LMP1 enhances cell motility and synergizes with HGF/SF-MET signaling but cannot upregulate MET expression nor induce spontaneously formed branching tubules without HGF treatment. One possibility is that their MDCK cells transformed by LMP1 expressed more MET protein than ours. MET expression can be upregulated by LMP1 in MDCK cells (Horikawa *et al.*, 2001). Both of these two studies use different expression vectors and expression level of LMP1 could be higher in the study of Kim *et al.* resulting in higher expression level of MET. An upregulation of MET expression could be sufficient to induce its activation despite the absence of its ligand HGF/SF.

After its stable expression in MDCK epithelial cells, LMP1 induces phenotypic changes including basal cell scattering and increased cell motility. The same phenotypic changes were described in induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT). LMP1 is able to induce the same phenotypic changes in nasopharyngeal epithelial cells (Horikawa *et al.*, 2007) and may be involved in induction of EMT in nasopharyngeal

carcinoma (NPC; Horikawa *et al.*, 2011). These findings suggest that LMP1 favors epithelial cell invasive growth and may contribute to the metastasis of EBV-associated carcinoma.

Moreover, it is known that the HGF/SF enhances MMP-9 production and invasiveness of nasopharyngeal cancer cells (Zhou *et al.*, 2008). Another study also suggests that HGF/SF might be a potential marker for the prognosis of NPC (Li-Juan *et al.*, 2009). We show that the viral oncogene LMP1 synergizes with MET receptor in presence of HGF/SF. This suggests that cooperation between these proteins could be involved in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma, and perhaps other EBV-associated carcinomas. This partnership could promote cancer cells survival and metastasis.

The present study demonstrates the effect of LMP1 on cell death and cell transformation in MDCK epithelial cells. Elucidating the function of LMP1 is important for the understanding of the tumorigenic potential of EBV, and further studies in epithelial cells are necessary to elucidate the molecular mechanisms underlying the differential outcome of LMP1 in epithelial cell. Better understanding of the signaling pathways that control the ambivalent effects of LMP1 could be used to suggest new therapeutic targets in EBV-associated carcinomas in which LMP1 is expressed. These data also suggest the importance of developing therapeutic strategies against EBV-associated carcinoma to target both the viral oncoprotein LMP1 and the HGF/SF-MET signaling.

Acknowledgments

This work is especially dedicated to the late Dr Jean Coll who initiated this and developed this project. We thank Pierre Busson for the generous gift of the S12 antibody.

References

1. Albiñ, A., Johnsen, J. I. & Henriksson, M. A. (2010). MYC in oncogenesis and as a target for cancer therapies. *Adv Cancer Res* **107**, 163-224.

2. **Bornkamm, G. W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J.-M., Laux, G., Bachl, J., Korndoefer, M., Schlee, M., Hölzel, M., Malamoussi, A., Chapman, R. D., Nimmerjahn, F., Mautner, J., Hillen, W., Bujard, H. & Feuillard, J. (2005).** Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res* **33**(16), e137.
3. **Chen, Y.-R., Liu, M.-T., Chang, Y.T., Wu, C.-C., Hu, C.-Y. & Chen, J.-Y. (2008).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 represses DNA repair through the PI3K/Akt/FOXO3a pathway in human epithelial cells. *J Virol* **82**(16), 8124-8137.
4. **Christofferson, D. E. & Yuan, J. (2010).** Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol* **22**(2), 263-268.
5. **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**(7), 3654-3664.
6. **Dawson, C. W., Rickinson, A. B. & Young, L. S. (1990).** Epstein-Barr virus latent membrane protein inhibits human epithelial cell differentiation. *Nature* **344**(6268), 777-780.
7. **Dawson, C. W., Tramoutanis, G., Eliopoulos, A. G. & Young L. S. (2003).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. *J Biol Chem* **278**(6), 3694-3704.
8. **Eliopoulos, A. G., Gallagher, N. J., Blake, S. M., Dawson, C. W. & Young, L. S. (1999).** Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J Biol Chem* **274**(23), 16085-16096.
9. **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**(13), 1731-1742.
10. **Eliopoulos, A. G. & Young, L. S. (2001).** LMP1 structure and signal transduction. *Semin Cancer Biol* **11**(6), 435-444.
11. **Everly, D. N. Jr., Mainou, B. A. & Raab-Traub, N. (2004).** Induction of Id1 and Id3 by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus and regulation of p27/Kip and cyclin-dependent kinase 2 in rodent fibroblast transformation. *J Virol* **78**(24), 13470-13478.
12. **Fafeur, V., Tulasne, D., Quéva, C., Vercamer, C., Dimster, V., Mattot, V., Stéhelin, D., Desbiens, X. & Vandebunder, B. (1997).** The ETS1 transcription factor is expressed during epithelial-mesenchymal transitions in the chick embryo and is activated in scatter factor-stimulated MDCK epithelial cells. *Cell Growth Differ* **8**(6), 655-665.
13. **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**(20), 6131-6140.
14. **Groux, H., Cottrez, F., Montpellier, C., Quatannens, B., Coll, J., Stehelin D. & Auriault, C. (1997).** Isolation and characterization of transformed human T-cell lines infected by Epstein-Barr virus. *Blood* **89**(12), 4521-4530.
15. **Hammerschmidt, W., Sugden, B. & Baichwal, V. R. (1989).** The transforming domain alone of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus is toxic to cells when expressed at high levels. *J Virol* **63**(6), 2469-2475.
16. **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**(1), 27-33.
17. **Horikawa, T., Yang, J., Kondo, S., Yoshizaki, T., Joab, I., Furukawa, M. & Pagano, J. S. (2007).** Twist and epithelial-mesenchymal transition are induced by the EBV oncoprotein latent membrane protein 1 and are associated with metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* **67**(5), 1970-1978.
18. **Horikawa, T., Yoshizaki, T., Kondo, S., Furukawa, M., Kaizaki, Y. & Pagano, J. S. (2011).** Epstein-Barr Virus latent membrane protein 1 induces Snail and epithelial-mesenchymal transition in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Br J Cancer* **104**(7), 1160-1167.
19. **Kaye, K. M., Izumi, K. M. & Kieff E. (1993).** Epstein-Barr virus latent membrane

protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(19), 9150-9154.

20. **Kim, K.-R., Yoshizaki, T., Miyamori, H., Hasegawa, K., Horikawa, T., Furukawa, M., Harada, S., Seiki, M. & Sato, H. (2000).** Transformation of Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) induces expression of Ets1 and invasive growth. *Oncogene* **19**(14), 1764-1771.

21. **Le Clorennec, 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**(13), 6721-6733.

22. **Le Clorennec, C., Youlyouz-Marfak, I., Adriaenssens, E., Coll, J., Bornkamm, G. W. & Feuillard, J. (2006).** EBV latency III immortalization program sensitizes B cells to induction of CD95-mediated apoptosis via LMP1: role of NF-kappaB, STAT1, and p53. *Blood* **107**(5), 2070-2078.

23. **Li-Juan, B., Bing, L., Zhi, L., Yang, L. & Ying-jie, L. (2009).** Hepatocyte growth factor suppresses tumor cell apoptosis in nasopharyngeal carcinoma by upregulating Bcl-2 protein expression. *Pathol Res Pract* **205**(12), 828-837.

24. **Liu, M.-T., Chang, Y.-T., Chen, S.-C., Chuang, Y.-C., Chen, Y.-R., Lin C.-S. & Chen, J.-Y. (2005).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 represses p53-mediated DNA repair and transcriptional activity. *Oncogene* **24**(16), 2625-2646.

25. **Liu, M.-T., Chen, Y.-R., Chen, S.-C., Hu, C.-Y., Lin C.-S., Chang, Y.-T., Wang, W.-B. & Chen, J.-Y. (2004).** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces micronucleus formation, represses DNA repair and enhances sensitivity to DNA-damaging agents in human epithelial cells. *Oncogene* **23**(14), 2531-2539.

26. **Lu, J. J., Chen, J.-Y., Hsu, T.-Y., Yu, W. C., Su, I.-J. & Yang, C. S. (1996).** Induction of apoptosis in epithelial cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *J Gen Virol* **77**(Pt 8), 1883-1892.

27. **Masy, E., Adriaenssens, E., Montpellier, C., Crépieux, P., Mougel, A., Quatannens, B., Goormachtigh, G., Faumont, N., Meggetto, F., Auriault, C., Groux, H. & Coll, J. (2002).** Human monocytic cell lines transformed in vitro by Epstein-Barr virus display a type II latency and LMP-1-dependent proliferation. *J Virol* **76**(13), 6460-6472.

28. **Micheau, O. & Tschopp, J. (2003).** Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* **114**(2), 181-190.

29. **Nilsson, J. A. & Cleveland J. L. (2003).** Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene* **22**(56), 9007-9021.

30. **Nitta, T., Chiba, A., Yamashita, A., Rowe, M., Israël, A., Reth, M., Yamamoto, N. & Yamaoka, S. (2003).** NF-kappaB is required for cell death induction by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *Cell Signal* **15**(4), 423-433.

31. **Overmeyer, J. H. & Maltese, W. A. (2011).** Death pathways triggered by activated Ras in cancer cells. *Front Biosci* **16**, 1693-1713.

32. **Paine, E., Scheinman, R. I., Baldwin, A. S. Jr. & Raab-Traub, N. (1995).** Expression of LMP1 in epithelial cells leads to the activation of a select subset of NF-kappa B/Rel family proteins. *J Virol* **69**(7), 4572-4576.

33. **Rickinson, A. B. & Kieff, K. (2007).** Epstein-Barr Virus. In *Fields Virology*, 5th edn. pp. 2655-2700. Edited by D.M. Knipe and P.M. Howley, Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.

34. **Shair, K. H., Schnegg, C. I. & Raab-Traub, N. (2008).** EBV latent membrane protein 1 effects on plakoglobin, cell growth, and migration. *Cancer Res* **68**(17), 6997-7005.

35. **Wang, D., Liebowitz, D. & Kieff, E. (1985).** An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* **43**(3 Pt 2), 831-840.

36. **Ye, X., Mehlen, P., Rabizadeh, S., VanArsdale, T., Zhang, H., Shin, H., Wang, J. J., Leo, E., Zapata, J., Hauser, C. A., Reed, J. C. & Bredesen, D. E. (1999).** TRAF family proteins interact with the common neurotrophin receptor and modulate apoptosis induction. *J Biol Chem* **274**(42), 30202-30208.

37. **Zeng, Q., Tan, Y.H. & Hong, W. (1998).** A single plasmid vector (pSTAR)

mediating efficient tetracycline-induced gene expression. *Anal Biochem* **259**(2), 187-194.

38. **Zhang, X., Hu, L., Fadeel, B. & Ernberg, I. T. (2002)**. Apoptosis modulation of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 in the epithelial cell line HeLa is stimulus-dependent. *Virology* **304**(2), 330-341.

39. **Zhang, X., Sanmun, D., Hu, L., Fadeel, B. & Ernberg, I. (2007)**. Epstein-Barr virus-encoded LMP1 promotes cisplatin-induced caspase activation through JNK and

NF-kappaB signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* **360**(1), 263-268.

40. **Zhou, H. Y., Wan, K. F., Ip, C. K., Wong, C. K., Mak, N. K., Lo, K. W. & Wong, A. S. (2008)**. Hepatocyte growth factor enhances proteolysis and invasiveness of human nasopharyngeal cancer cells through activation of PI3K and JNK. *FEBS Lett* **582**(23-24), 3415-3422.

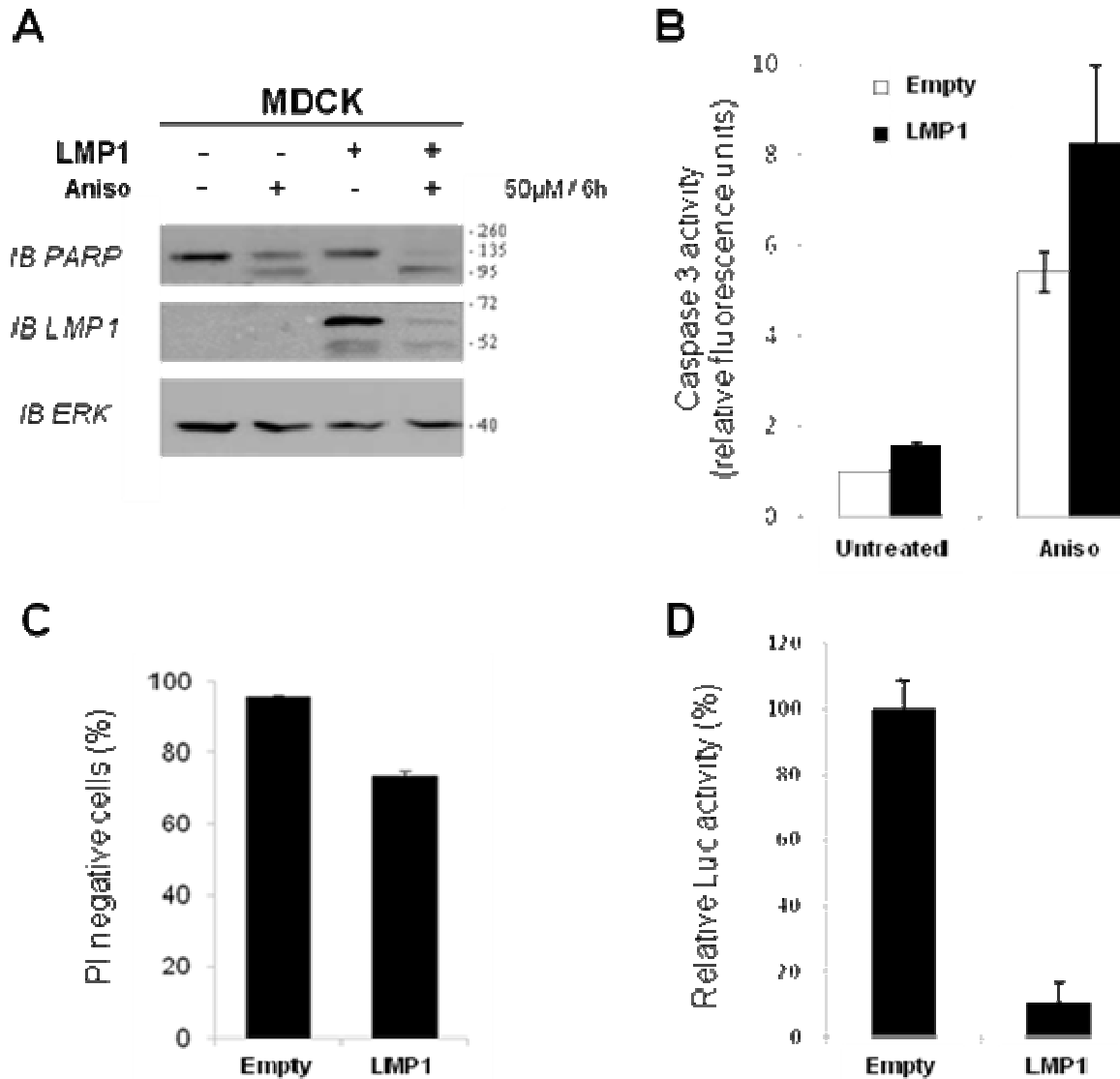


Figure 1 (A to D). Transient expression of LMP1 protein in MDCK cells induces cell death.

MDCK epithelial cells were transiently transfected with a LMP1-expressing vector or empty plasmid as a control. **(A, B)** Transfected cells were treated for 6 hours with Anisomycin (Aniso, 50μM) or DMSO as control, and proteins were extracted for western blot analysis **(A)** using antibodies (IB: immunoblot) directed against PARP (top panel), LMP1 (middle panel) and ERK2 (lower panel). ERK2 detection was used to control equal protein loading. Molecular weight (in kDa) of the marker proteins are indicated on the right side. **(B)** Caspase-3 activation was assessed by the relative fluorescence intensity of the fluorogenic substrate Z-DEVD-AMC reported to 1 for the result obtains in control condition. Values represent the means of duplicate assays ± standard deviations of experiment. **(C)** Propidium iodide labeling was performed to determine cell viability (% of viable cells equal % of PI negative cells) using flow cytometry analysis. Experiment was performed three times with the same results. **(D)** Cotransfection with pRLnull plasmid and expression plasmid for LMP1, cell viability was determined by luciferase (Luc) activity assay. Cells transfected with empty plasmid were indexed to 100%. Values represent the means of triplicate assays ± standard deviations of representative experiment.

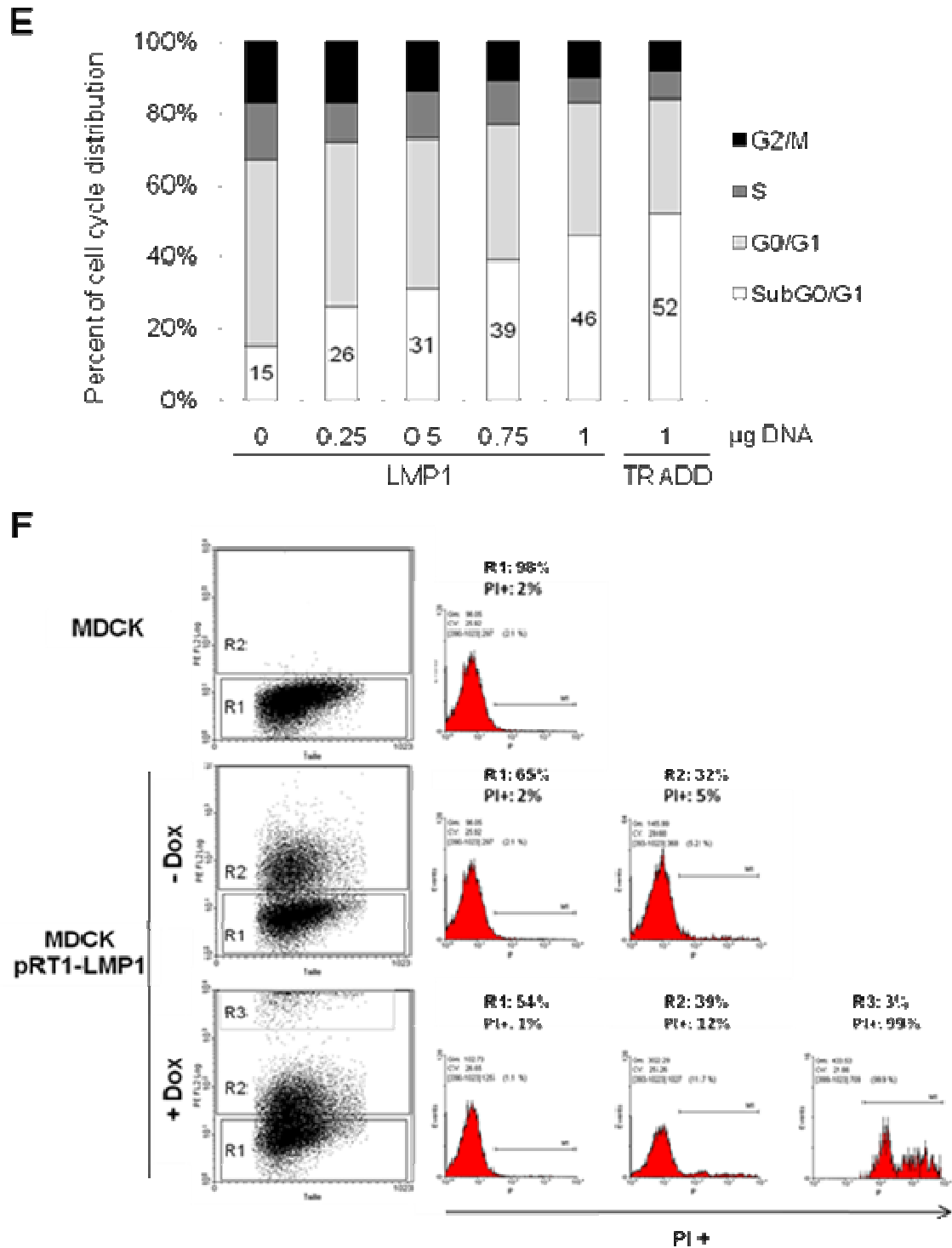


Figure 1 (E and F). Transient expression of LMP1 protein in MDCK cells induces cell death.

MDCK epithelial cells were transiently transfected with a LMP1-expressing vector or empty plasmid as a control. (E) Cell cycle analysis was performed using FACS by propidium iodide labeling on transfected cells with indicated dose. (F) MDCK cells were transfected with the inducible vector pRT1-LMP1, which contains cDNA coding for LMP1 and NGFRt as a reporter gene. After 24 h of induction, untreated cells (- Dox) and doxycycline (2µg/ml)-treated cells (+ Dox) were stained with propidium iodide and PE-conjugated NGFR MAb and analyzed by flow cytometry. Non transfected MDCK cells were used as control. Percentage of cells in each cell population (R1, R2 and R3) and corresponding propidium iodide positive cells (PI+) were indicated.

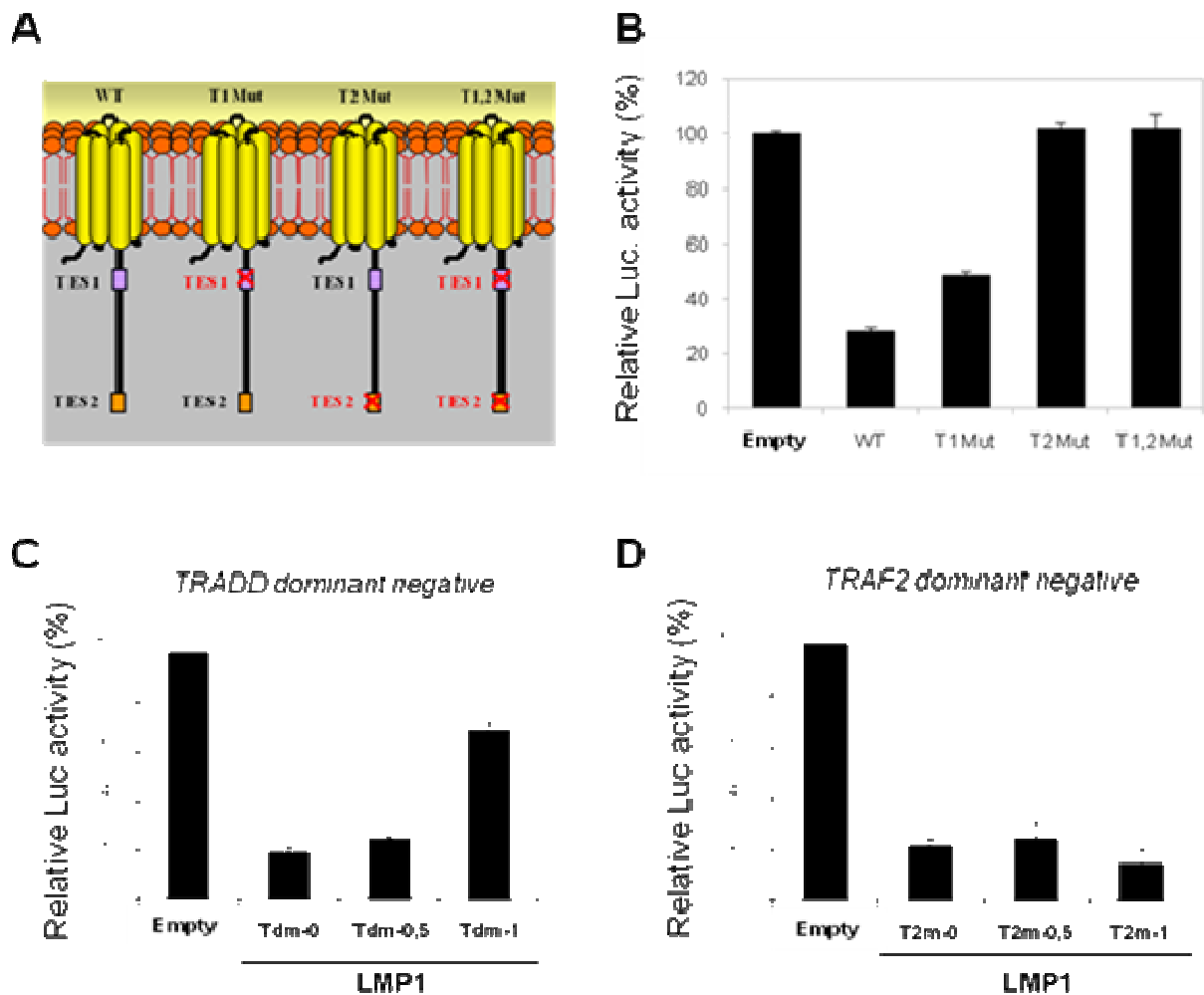


Figure 2. LMP1-induced cell death depends on its signaling ability.

(A) Schematic representation of the mutants used. LMP1 is composed of a short N-terminal cytoplasmic region, six transmembrane domains, and a long C-terminal cytoplasmic region responsible of signaling. Domains involved in signal transduction (transforming effector sites TES1 and TES2) are depicted by boxes. For LMP1-T1Mut, LMP1-T2Mut and LMP1-T1,2Mut, point mutations in TES1 and TES2 were generated (cross) to impair recruitment of cell adapters. (B) After MDCK cells cotransfection with pRLnull plasmid and LMP1-expressing plasmids (wt and mutants), cell viability was determined by luciferase activity assay. (C, D) Cell viability was determined by luciferase (Luc) activity assay after MDCK cotransfection with pRLnull plasmid, LMP1-encoding plasmid and increasing doses (0, 0.5, 1 μ g DNA) of TRADD mutant- or TRAF2 mutant-encoding plasmid (respectively Tdm, C and T2m, D). Experiments were performed three times with the same results. Values represent the means of triplicate assays \pm standard deviations of representative experiment. Luciferase activity of cells transfected with empty vector was arbitrary defined as 100%.

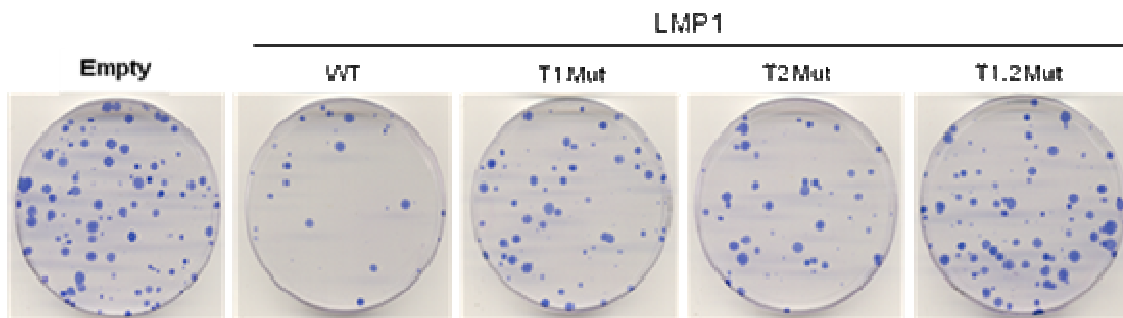
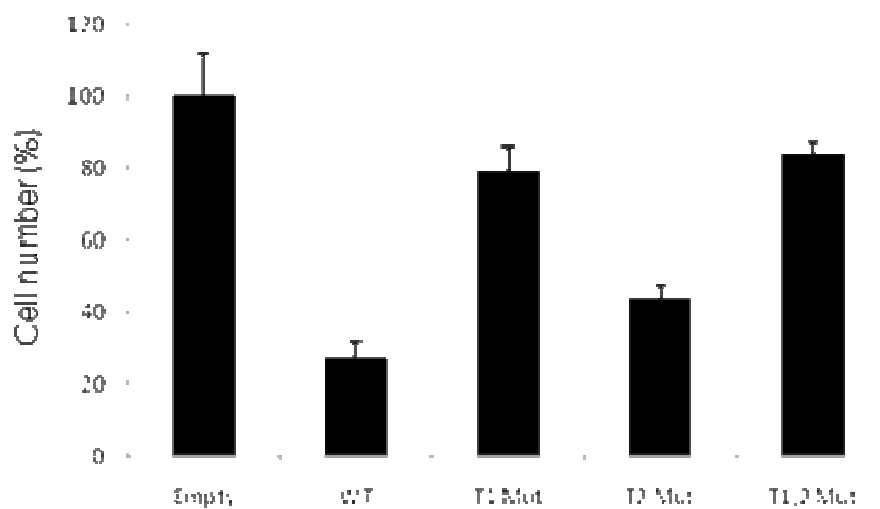
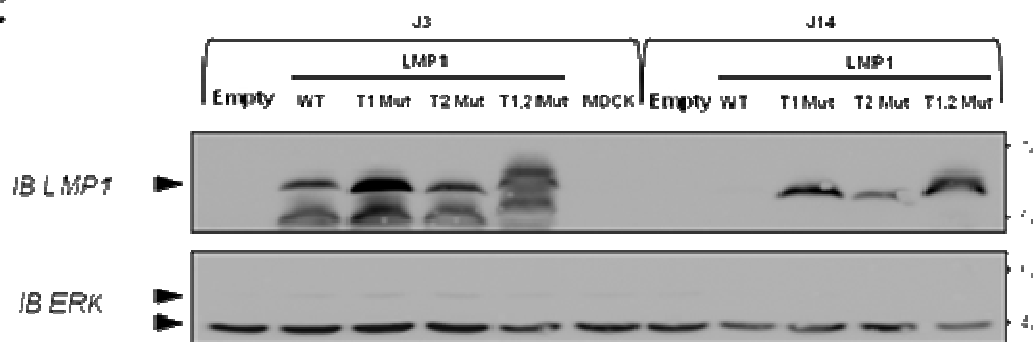
A**B****C**

Figure 3. Alteration of LMP1 signaling decreases LMP1 ability to induce cell death.

MDCK cells were transfected with empty vector or LMP1-expressing plasmids (wt and mutants). After G418 selection, cells were either stained (A) or counted, results are represented as percentage of surviving cells using empty vector transfection as reference (n=3; \pm S.D.) (B). Cell extracts prepared the second day after transfection and 11 days after selection were resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by western blot using antibodies (IB: immunoblot) directed against ERK2 and LMP1 (C). ERK detection was used to control equal protein loading. Molecular weight (in kDa) of the marker proteins are indicated on the right side.

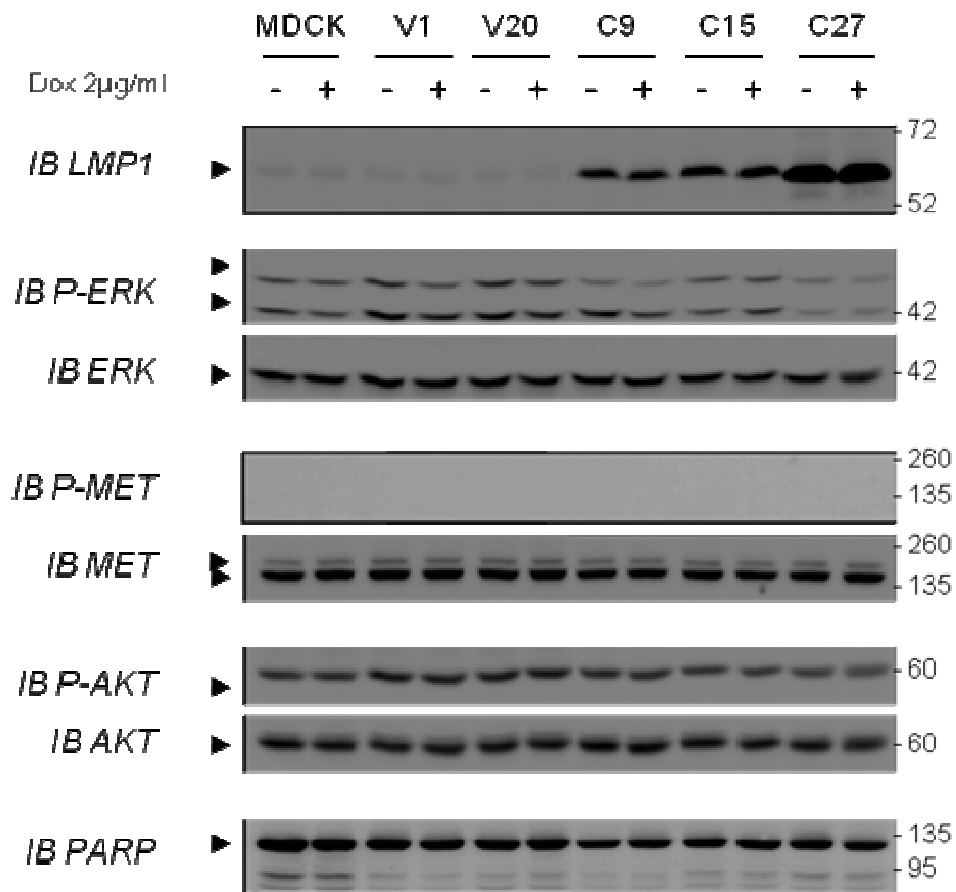


Figure 4. Stable expression of LMP1 in MDCK cells does not induce cell death anymore.

MDCK were stably transfected with the control vector or the inducible vector pSTAR, which contains the cDNA encoding LMP1. Whole-cell extracts were analyzed by western blot using antibodies directed against LMP1, PARP, phosphorylated-ERK (P-ERK), ERK, phosphorylated-MET (P-MET), MET, phosphorylated-AKT (P-AKT), and AKT, after 24h of doxycycline (Dox) induction ((-): untreated cells; (+): doxycycline-treated cells). ERK detection was used to control equal protein loading. Molecular weight (in kDa) of the marker proteins are indicated on the right side.

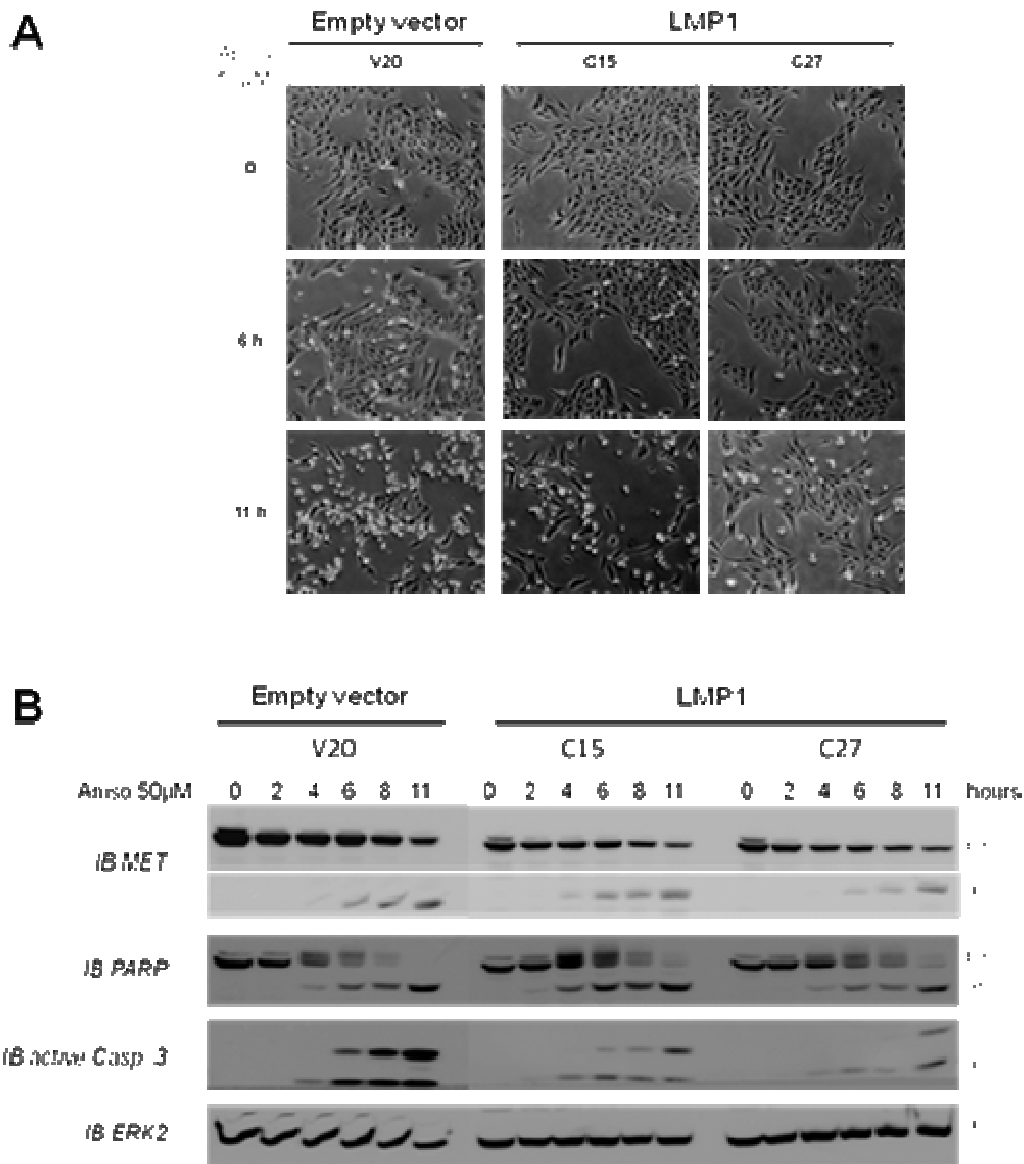


Figure 5. Stable expression of LMP1 protects cells from stress-induced cell death. MDCK epithelial cells stably expressed LMP1 (2 clones, C15 and C27) or stably transfected with empty vector (clone V20) were cultured one day in DMEM-10% FCS and treated with anisomycin (Aniso, 50 µM). At different times, (A) Photographs were taken on light microscopy (magnification x40), cells were lysed for western blot analysis (B) using antibodies (IB: immunoblot) directed against MET, PARP, active Caspase 3 and ERK2. ERK detection was used to control equal protein loading. Molecular weight (in kDa) of the marker proteins are indicated on the right side.

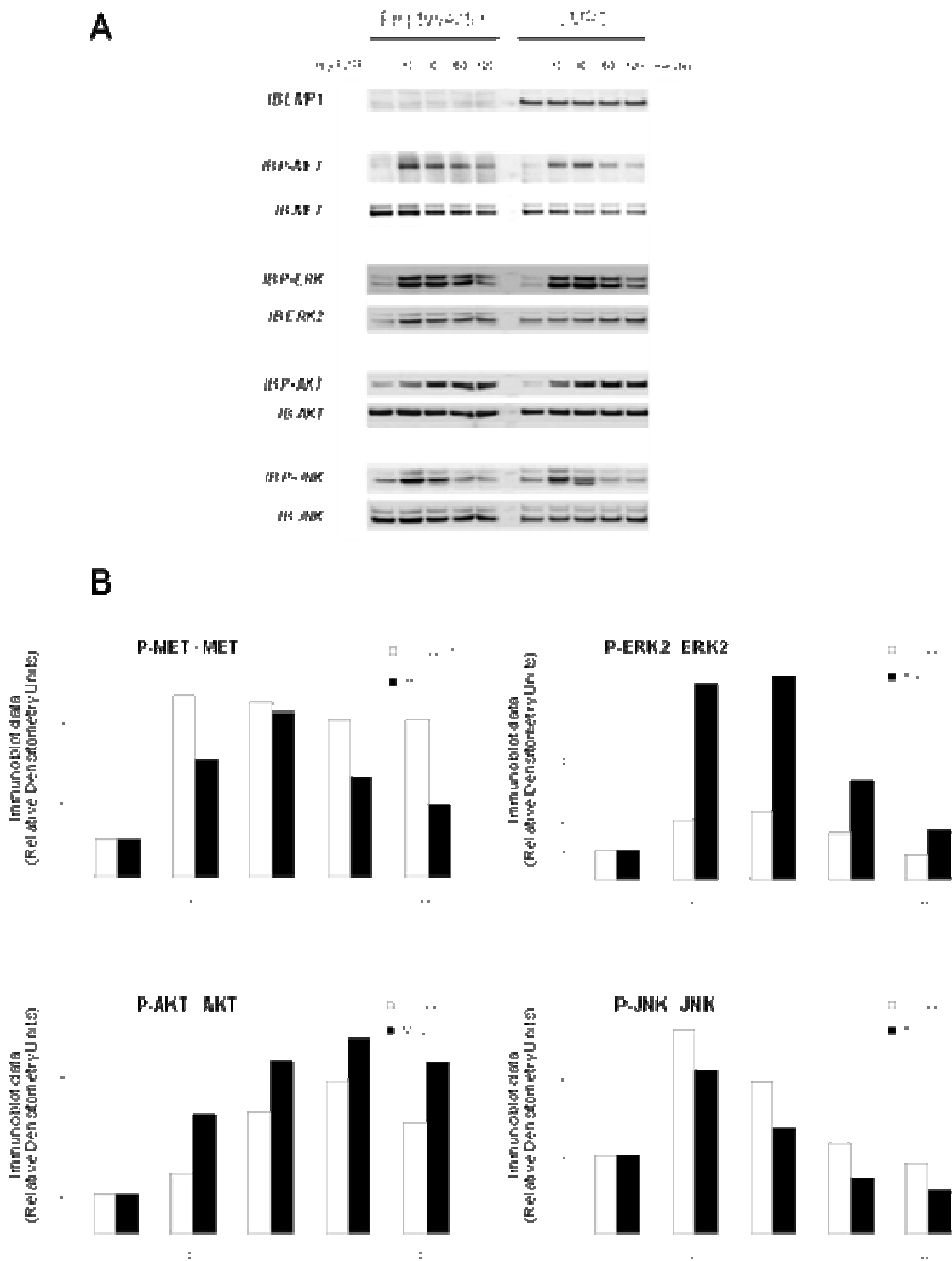


Figure 6 (A and B). LMP1 enhances HGF/SF-induced phenotypic changes

MDCK epithelial cells stably expressing LMP1 or stably transfected with empty vector were starved serum (0.1% FBS) and stimulated or not at different times (0, 10, 30, 60, 120 minutes) with 10 ng/ml of HGF/SF. Cells were lysed and proteins were analyzed by western blot (A) using antibodies (IB: immunoblot) directed against LMP1, phosphorylated-MET (P-MET), MET, phosphorylated-ERK (P-ERK), ERK2, phosphorylated-AKT (P-AKT), AKT, phosphorylated-JNK (P-JNK) and JNK. ERK2 detection was used to control equal protein loading. (B) Quantification of immunoblots by densitometry, showing P-MET protein normalized to total MET, P-AKT protein normalized to total AKT, P-ERK protein normalized to total ERK2 and P-JNK protein normalized to total JNK.

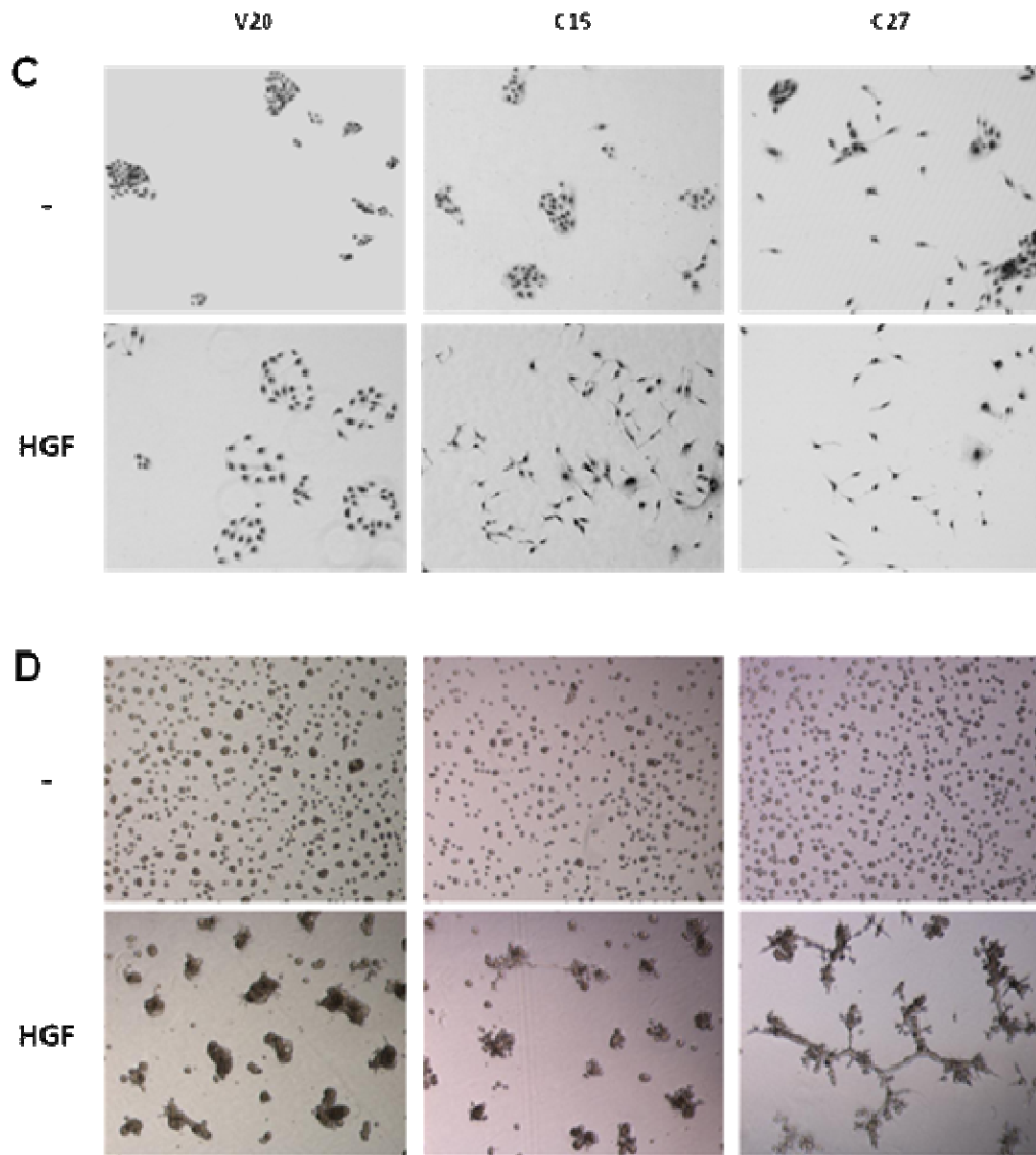


Figure 6 (C and D). LMP1 enhances the HGF/SF-induced phenotypic changes (C) MDCK cells stably expressing LMP1 or stably transfected with empty vector were seeded at low density. One day later, cells were cultured for 24 h in the absence (-) or presence of 10 ng/ml of HGF/SF and pictures were taken (magnification x40). (D) MDCK cells stably expressing LMP1 or stably transfected with empty vector were seeded on matrigel and cultured for 48 h in absence (-) or presence of 30 ng/ml of HGF/SF and pictures were taken (magnification x40).

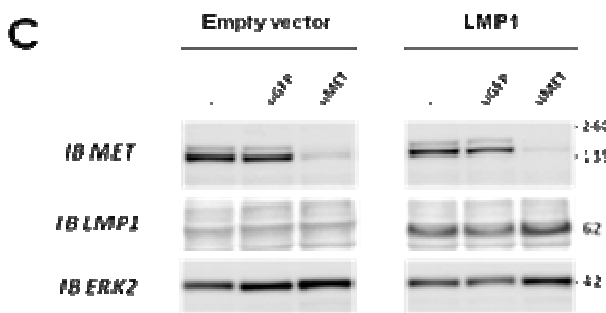
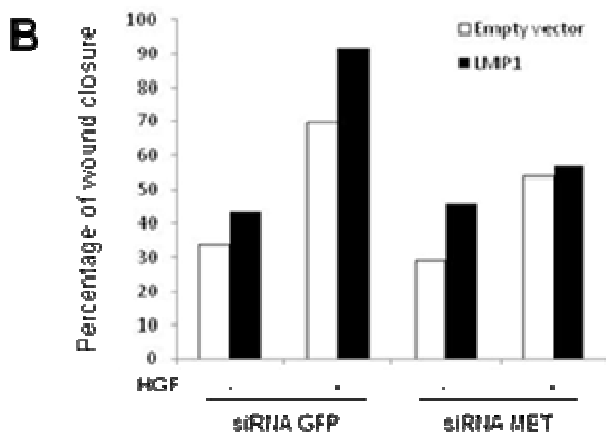
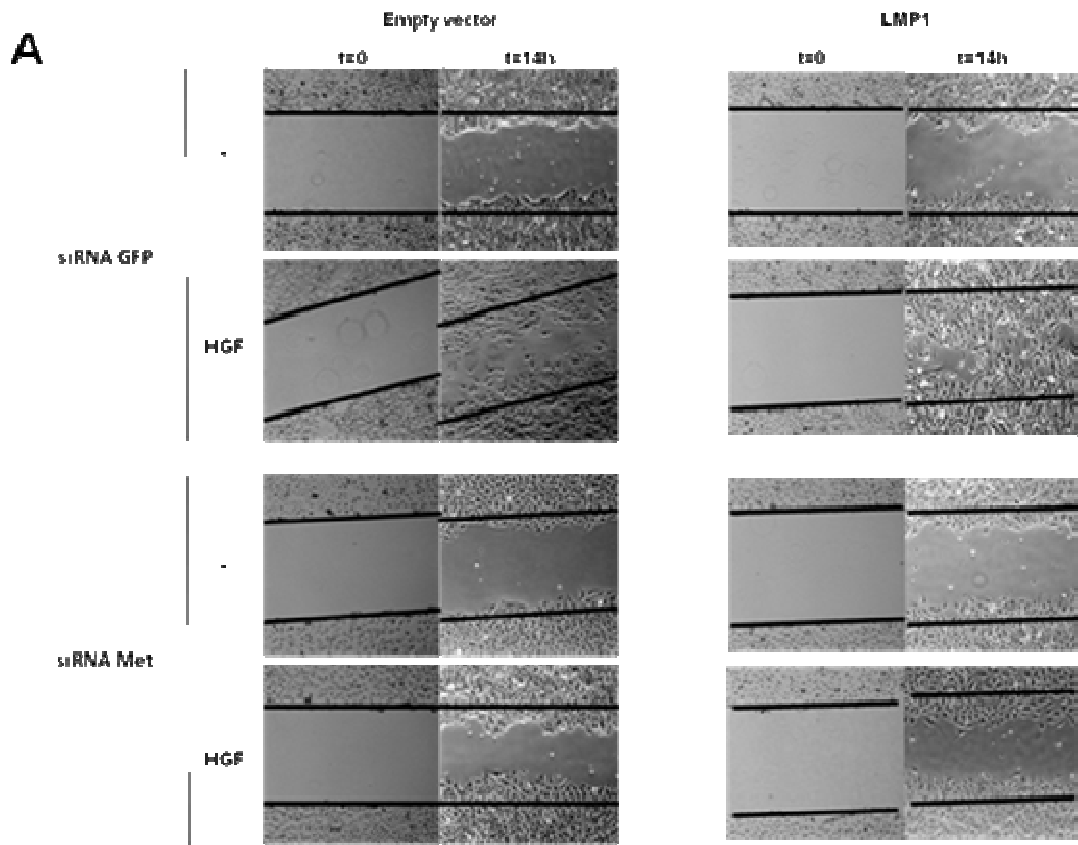
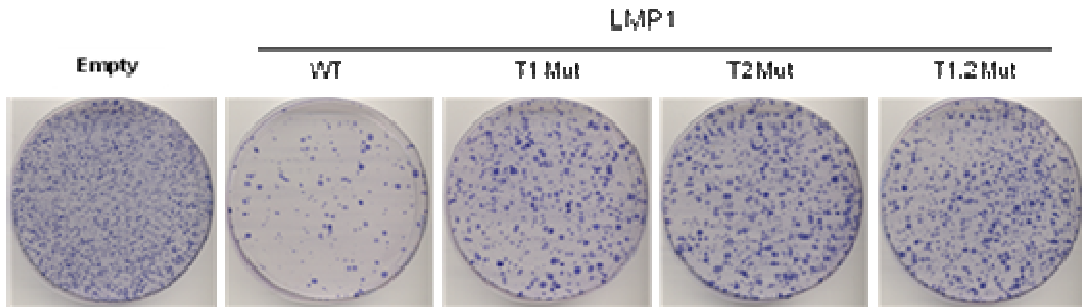


Figure 7. RNAi knockdown of MET impairs HGF-induced phenotype but not LMP1-induced motility.

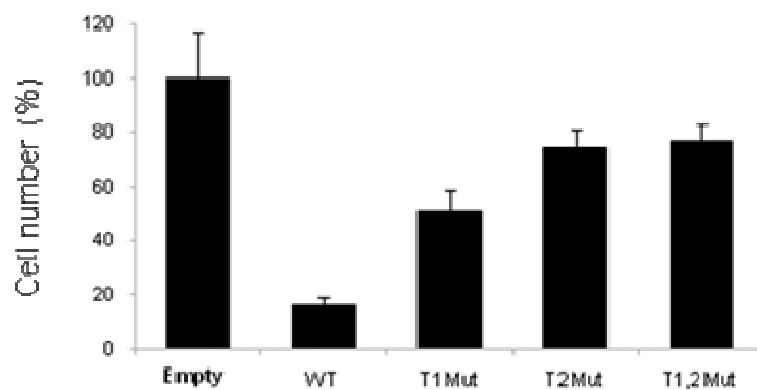
MDCK cells stably expressing LMP1 or stably transfected with empty vector were transfected with siRNA sequences against GFP mRNA (control siRNA) or siRNA sequences against MET mRNA. (A) One day after, cells were wounded and treated for 14 h in the absence (-) or presence of 10 ng/ml of HGF/SF and pictures were taken (magnification x40). (B) Quantitative measurement of migration distance.

(C) Whole-cell extracts were analyzed by western blot using antibodies (IB: immunoblot) directed against LMP1, MET and ERK2. ERK2 detection was used to control equal protein loading. Molecular weight (in kDa) of the marker proteins are indicated on the right side.

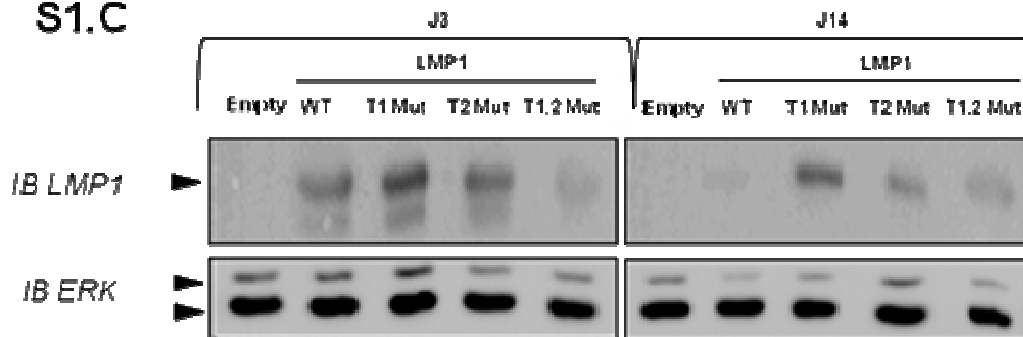
S1.A



S1.B



S1.C



Supplemental figure 1. Alteration of LMP1 signaling decreases LMP1 ability to induce cell death.

HEK cells were transfected with empty vector or LMP1-expressing plasmids (wt and mutants). After G418 selection, cells were either stained (A) or counted, results are represented as percentage of surviving cells using empty vector transfection as reference ($n=3$; \pm S.D.) (B). Cell extracts prepared the second day after transfection and 11 days after selection were resolved by 10% SDS-PAGE and analyzed by western blot using antibodies (IB: immunoblot) directed against ERK2 and LMP1 (C). ERK detection was used to control equal protein loading. Molecular weight (in kDa) of the marker proteins are indicated on the right side.

I. Présentation des données supplémentaires

Plusieurs données autour des propriétés de LMP1 dans les MDCK n'ont pas pu être intégrées à cet article. En effet, certains résultats sont trop préliminaires et d'autres sont redondants avec certains résultats présentés dans le troisième article.

Tout d'abord je vais vous présenter les données concernant l'implication des voies de signalisation NF- κ B et JNK dans les effets cytotoxiques de LMP1 dans les MDCK, en effet l'inhibition de ces voies de signalisation semble bloquer les effets délétères de LMP1. Puis, j'exposerai des données sur le clivage par les caspases de LMP1 mises en évidence par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques sur des cultures cellulaires de MDCK exprimant transitoirement LMP1 d'une part, et par des expériences de clivage *in vitro* de LMP1 par des caspases recombinantes d'autre part.

Ensuite, je vous présenterai des données concernant les variations phénotypiques des cellules MDCK exprimant stablement la protéine LMP1 (MDCK-LMP1). L'expression stable de LMP1 dans ces cellules semble induire une transition épithélium-mésenchyme révélée par la baisse d'expression de l'E-cadhérine, par l'acquisition d'une morphologie plutôt fibroblastoïde des cellules et une dispersion basale de ces cellules en culture alors que les cellules MDCK parentales sont épithéloïdes et très cohésives. De plus, les cellules MDCK-LMP1 semblent avoir les mêmes capacités de clonogénicité en agar que les cellules parentales, toutefois, en présence d'HGF, les MDCK-LMP1 génèrent des clones plus gros et plus nombreux que les cellules contrôle, suggérant une coopération entre le récepteur à l'HGF et LMP1.

Enfin, des données très préliminaires sur les voies de signalisation impliquées dans l'acquisition des modifications phénotypiques des cellules MDCK-LMP1 seront décrites et discutées.

II. Matériels et méthodes supplémentaires

II.1. Culture cellulaire

Les cellules épithéliales MDCK sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Invitrogen) complété par 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Invitrogen), 1% d'acides aminés non essentiels et 100 unités de gentamycine, à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂.

II.2. Transfection cellulaire

II.2.1. Vecteurs plasmidiques

II.2.1.a. Vecteurs d'expression

Nous avons utilisé les vecteurs d'expression suivants :

- pcDNA3, pcDNA3-LMP1, pcDNA3-IκBm, pcDNA3-JNK-APF contenant respectivement les ADN complémentaires (ADNc) de LMP1wt (souche B95-8), IκBm (IκB mutée au niveau des sites phosphorylables par IKK, jouant le rôle de dominant négatif de la voie NF-κB) et JNK-APF (JNK mutée au niveau des sites d'activation de cette kinase jouant le rôle de dominant négatif de la voie JNK).
- pSTAR (vecteur inductible), pSTAR-LMP1 contenant l'ADN complémentaire (ADNc) de LMP1wt (souche B95-8).

II.2.1.b. Vecteurs rapporteurs

Nous avons utilisé les vecteurs rapporteurs suivants :

- le vecteur κB-Luc (Luc pour *Firefly* luciférase) est un vecteur rapporteur de la voie NF-κB. Ce vecteur possède 3 sites κB en amont d'un promoteur minimal contrôlant l'expression de la luciférase (Stratagene).
- les vecteurs Gal4-Jun et Gal4-Luc sont les vecteurs rapporteurs de la voie JNK. Gal4-Jun code pour une protéine de fusion entre le domaine de fixation à l'ADN Gal4 et le domaine d'activation de Jun. Gal4-Luc code pour la *Firefly* luciférase et comporte 5 sites de fixation Gal4 en amont d'un promoteur minimal.

II.2.1.c. Vecteur normalisateur

Nous avons utilisé le vecteur pRL-null (Promega) contenant le gène codant la *Renilla* luciférase et ne possédant aucun promoteur en amont de ce gène. Son expression est donc indépendante des conditions de transfections et des molécules transfectées.

II.2.2. Transfection des cellules

II.2.2.a. Transfection des vecteurs plasmidiques

- pour les tests d'activité rapportrice :

Les cellules sontensemencées la veille dans des plaques 6 puits à raison de 90000 cellules par puits. L'agent de transfection est la lipofectamine (Invitrogen). Le mélange contient : 1,225 µg d'ADN final (comprenant 200 ng de vecteur rapporteur, 25 ng de vecteur normalisateur et 1 µg de vecteur(s) d'expression) et 20 µg de lipofectamine. Le contact ADN/lipofectamine est réalisé dans 200µl d'OptiMEM (milieu sans sérum, Invitrogen) pendant 30 minutes. Les cellules

sont rincées avec de l'OptiMEM, puis mises en culture avec 800 µl OptiMEM. Le mélange ADN/lipofectamine est déposé sur les cellules. Au bout de 5 heures, le milieu est remplacé par 2 ml de DMEM 10% SVF.

- pour l'établissement des clones cellulaires et l'étude du clivage de LMP1 :

Les cellules sontensemencées la veille dans des plaques 6 puits à raison de 120000 cellules par puits. L'agent de transfection est la lipofectamine (Invitrogen). Le mélange contient : 1 µg de vecteur d'expression) et 20 µg de lipofectamine. Le contact ADN/lipofectamine est réalisé dans 200µl d'OptiMEM (milieu sans sérum, Gibco, Invitrogen) pendant 30 minutes. Les cellules sont rincées avec de l'OptiMEM, puis mises en culture avec 800 µl OptiMEM. Le mélange ADN/lipofectamine est déposé sur les cellules. Au bout de 5 heures, le milieu est remplacé par 2 ml de DMEM 10% SVF.

II.2.2.b. Transfection transitoire des séquences siRNA

Les cellules sontensemencées la veille dans des boites 100 mm à raison de 50000 cellules par boîte. L'agent de transfection est la lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen). La lipofectamine RNAiMAX est diluée dans 1 ml de milieu de transfection OptiMEM à une concentration de 30 µg/ml, puis 60 pmoles de siRNA sont ajoutées et mis à incuber à température ambiante pendant 20 minutes. Les cellules sont rincées avec du milieu DMEM 10% SVF sans antibiotiques puis mises en culture avec 5 ml de DMEM 10% SVF sans antibiotiques. Les complexes Lipofectamine RNAiMAX-siRNA sont ensuite mélangés au milieu de culture et incubé à 37°C.

II.3. Dosage des activités rapportrices et normalisatrices

48 heures après la transfection (Paragraphe II.2.a.) les cellules sont lavées 2 fois au PBS 1X et lysées dans 500 µl de tampon de lyse « Passive Lysis Buffer » (Promega). Le dosage est réalisé par l'intermédiaire du Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega) qui permet à partir du même extrait de lysat cellulaire de quantifier à la suite les activités rapportrice (luciférase Firefly) et normalisatrice (luciférase Renilla). Le réactif « luciférase » est additionné à 20 µl du lysat cellulaire. Ce réactif contient de la Luciférine qui lorsqu'elle est dégradée par la luciférase Firefly, émet de la lumière. L'activité est alors mesurée à l'aide d'un luminomètre LUMAT 9501 (Berthold). Le dosage de l'activité de la luciférase Renilla exprimée par le vecteur pRL-null est réalisé par ajout de réactif « Stop & Glo[®] » qui stoppe l'activité de la luciférase Firefly et permet la mesure de l'activité de la luciférase Renilla. L'activité de la séquence promotrice étudiée et placée en amont de la séquence codant la luciférase Firefly est finalement estimée en faisant le ratio de l'activité Firefly sur l'activité Renilla.

II.2.4. Etablissement des clones cellulaires

Les cellules sont transfectées avec le vecteur plasmidique pSTAR ou pSTAR-LMP1 contenant une cassette de résistance à la néomycine, selon le protocole décrit dans le paragraphe II.2.2.a. 72 heures après la transfection les cellules contenant le vecteur plasmidique d'intérêt sont cultivées dans du milieu de culture DMEM 10% SVF (tetracycline free) contenant 800 µg/ml d'antibiotique néomycine (G418, Invitrogen). Les clones cellulaires ayant acquis la résistance à l'antibiotique à l'issue de 2 semaines de culture sont amplifiés et l'expression de la protéine LMP1 est vérifiée par la technique de Western blot.

II.3. Analyse des protéines par la technique de Western blot

II.3.1. Extraction des protéines

Les cellules en culture sub-confluentes sont rincées avec une solution de PBS 1X, puis lysées pendant 15 minutes à 4°C dans du tampon de lyse protéique PY (20mM Tris-HCl pH 7.4, 50mM NaCl, 5mM EDTA, 1% Triton X-100) complété avec des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (respectivement #P8340 et #P5726, Sigma). L'extrait cellulaire est centrifugé à 20000 g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est alors conservé. La concentration des protéines est déterminée par dosage des protéines par la méthode à l'acide bicinchoninique (BCA protein assay, Pierce).

II.3.2. Préparation migration des échantillons

20 à 50 µg de protéines sont diluées dans une solution de Laemmli et dénaturées par chauffage à 95°C pendant 10 minutes. Les protéines sont alors déposées dans un gel d'acrylamide/bisacrylamide dénaturant pour l'étape de migration électrophorétique (gel de séparation de 4% / gel de concentration de 10%). La migration électrophorétique s'effectue dans le tampon de migration. Dans ces conditions les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire.

II.3.3. Transfert des protéines sur une membrane de PVDF

Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (difluorure de polyvinylidène, Immobilon-P, Millipore) selon une technique de transfert électrophorétique.

II.3.4. Révélation immunologique

La membrane est placée dans une solution de PBS 1X Tween (Tris Buffer Saline) contenant 0,2% de caséine pendant au moins une heure. L'anticorps primaire est dilué dans le

tampon PBS 1X Tween contenant 5% de BSA (anticorps anti β -actine, sc-47778, dilué au 1/1000^{ème}, anticorps anti ERK2, sc-154 et anticorps anti E-cadherine, sc-7870, dilué au 1/500^{ème} Santa Cruz Biotechnology. Anticorps S12 anti LMP1, dilué au 1/10^{ème}; dilué au 1/2000^{ème}, anticorps anti MMP-9, #1939 Epitomocs, dilué au 1/1000^{ème},) et incubé avec la membrane pendant une nuit. La membrane est ensuite lavée quatre fois dix minutes dans une solution de PBS 1X Tween 0,1% puis incubée pendant une heure avec un anticorps secondaire, anti lapin ou anti souris, couplé à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch), dilué au 1/10000^{ème}. Après rinçage par une solution de PBS 1X, la détection est effectuée par chimioluminescence en ajoutant le substrat de la peroxydase mélangé à un catalyseur (système SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate, Pierce), la luminescence est détectée par le système d'imagerie LAS 3000 imager (Fujifilm).

II.4. Etudes phénotypiques

II.4.1. Croissance cellulaire indépendante de l'ancrage (en agar mou)

A 40°C, une solution 'Base Agar' à 0,56% (55% de MEM 2X / 45% d'Agar à 1,25%) est coulée dans une plaque 24 puits (environ 300 μ l/puits). Ensuite, la solution 'Top Agar' à 0,39% contenant les cellules est ajoutée (300 μ l avec 4500 cellules par puits). La plaque est ensuite incubée à 37°C. 24h après, du milieu DMEM 10% SVF est ajouté sur l'agar. Si besoin l'HGF/SF est ajouté à la concentration de 10 ng/ml. La culture est maintenue pendant 10 jours.

II.4.2. Dispersion cellulaire en réponse à l'HGF/SF

Les cellules sontensemencées à basse densité (2500 à 5000 cellules par puits de plaque 6 puits) 48 h avant le traitement à l'HGF/SF et cultivées dans du DMEM 10% SVF. Si besoin, les inhibiteurs pharmacologiques sont ajoutés. La veille du traitement, le milieu est remplacé par du DMEM 0,1% SVF. Si besoin, les cellules peuvent être transfectées par des siRNA. L'HGF/SF est ajouté à la concentration de 10 ng/ml. La culture est maintenue 48 heures.

II.5. Test de clivage par les caspases

Les cellules sont transfectées selon le protocole décrit dans le paragraphe II.2.2.a. Après 24 heures, les cellules sont lysées dans du tampon caspase (20 mM PIPES pH 7,2; 100 mM NaCl; 1% Chaps; 10% sucrose; 5 mM DTT; 0.05 mM EDTA). Les extraits protéiques sont incubés pendant 1 à 8 heures à 37°C avec 1 μ l de caspase purifiée puis analysés par western blot. Les

caspases purifiées ont été obtenues auprès du Dr Salvesen (The Burnham Institute, La Jolla, CA, USA).

III. Résultats et discussion supplémentaires

L'inhibition de voies de signalisation module la mort cellulaire induite par LMP1

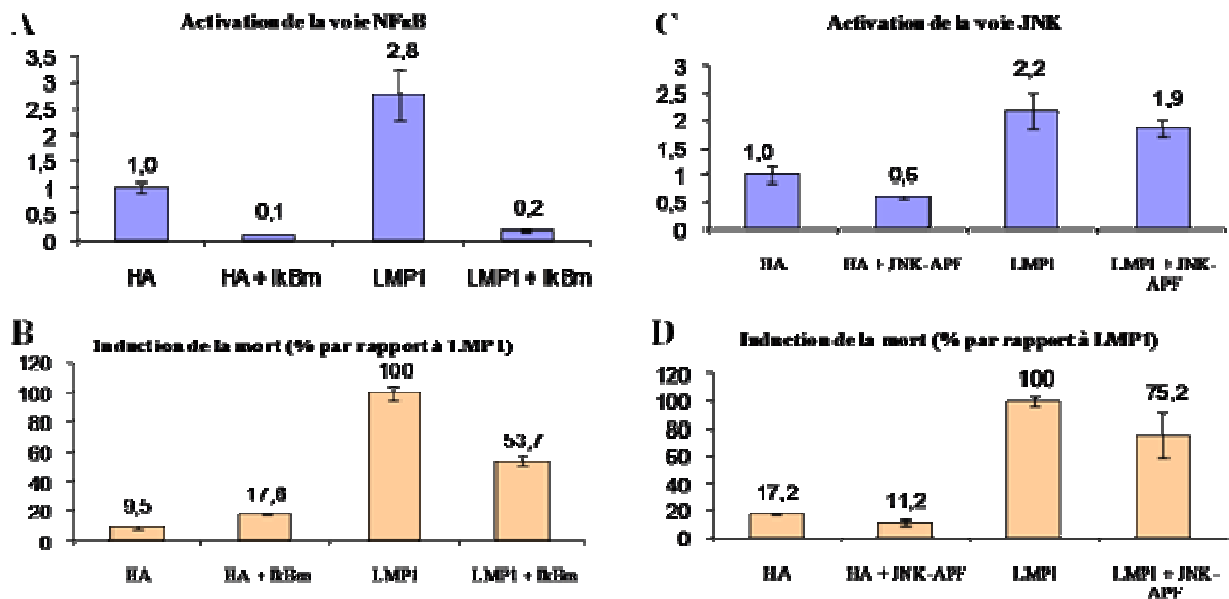


Figure 1: Effet de l'inhibition des voies de signalisation NFκB et JNK sur l'induction de la mort cellulaire par LMP1 dans les MDCK. Les cellules MDCK sont co-transfectées avec 500 ng/ml du vecteur d'expression pcDNA3 ou pcDNA3-LMP1, 200 ng/ml de vecteur rapporteur κB-Luc ou Gal4-Jun/Gal4-Luc, 500 ng/ml de vecteur codant le DN de la voie de signalisation étudiée, et 25 ng/ml de vecteur normalisateur pRL-null. Les tests de transactivation sont effectués 24h après la transfection. (A) Activation de la voie NF-κB par rapport à celle obtenue avec le contrôle HA. (B) Effet de l'inhibition de la voie NF-κB sur l'induction de la mort par LMP1. (C) Activation de la voie JNK par rapport à celle obtenue avec le contrôle HA. (D) Effet de l'inhibition de la voie JNK sur l'induction de la mort par LMP1.

Comme nous l'avons vu dans l'article 3, le domaine TES2 est impliqué dans la mort cellulaire induite par LMP1. Le domaine TES2 est connu pour activer les voies de signalisation NF-κB et JNK. Nous avons donc voulu regarder quels seraient les effets de l'inhibition de ces voies sur cette mort induite par LMP1. Pour cela nous avons utilisé des vecteurs d'expression codant pour des molécules capables d'inhiber l'une ou l'autre de ces deux voies de signalisation. Pour la voie NF-κB, nous utilisons le dominant négatif IκBm qui est une version mutée d'IκB, non dégradable. La protéine IκB piège les facteurs de transcription de la famille NF-κB dans le

cytoplasme. Après sa phosphorylation par les IKK, IκB libère ces facteurs pour permettre leur translocation dans le noyau. La version mutée, IκBm, ne peut pas être phosphorylée par les IKK et donc séquestre les facteurs de la famille NF-κB dans le cytoplasme. Pour la voie JNK, nous utilisons le dominant négatif (DN) JNK-APF, qui est une version mutée non activable (par phosphorylation) de la kinase JNK. Nous cotransfectons ces vecteurs avec LMP1 et le vecteur rapporteur correspondant ainsi que le normalisateur.

Les résultats obtenus des activités luciférase Firefly (**figure 1A et 1C**) nous témoignent de la fonctionnalité de IκBm dans l'inhibition de la voie NF-κB. L'effet DN de JNK-APF est moins clair dans les résultats présentés. Nous nous intéressons alors à l'induction de la mort par LMP1 en présence de l'un ou l'autre de ces inhibiteurs des voies (**figure 1B et 1D**).

L'utilisation d'IκBm entraîne une diminution de 50% de l'induction de la mort par LMP1, et l'utilisation de JNK-APF la fait diminuer de 25%. Ces expériences nous permettent de dire que la voie NF-κB est clairement impliquée dans ce phénomène. L'effet obtenu avec le DN de la voie JNK laisse entrevoir un rôle possible de celle-ci, mais l'absence de réelle validation de la fonctionnalité du DN par le système rapporteur laisse la question ouverte.

La voie NF-κB est en général associée au phénomène de survie et de prolifération cellulaire car elle induit la surexpression de gènes anti-apoptotiques tel Bcl-2. Mais on connaît également à cette voie un rôle pro-apoptotique par l'induction de gènes pro-apoptotiques cibles de la voie NF-κB tel que le récepteur de mort CD95/Fas. En effet, dans des LCL, LMP1 potentialise l'apoptose induite par le récepteur CD95/Fas (Le Clorennec *et al.*, 2006 ; Le Clorennec *et al.*, 2008). Une autre étude a montré que la voie NF-κB est impliquée dans l'apoptose induite par LMP1 dans d'autres modèles cellulaires (Nitta *et al.*, 2003). Nos résultats dans les MDCK vont dans le même sens puisque nous mettons en évidence que la voie NF-κB est impliquée dans la mort cellulaire induite par LMP1. Il est à cet égard utile de rappeler que la voie NF-κB recouvre en fait des voies d'activation variées (voie canonique et voie non canonique) faisant intervenir différents membres de la famille Rel/NF-κB dont les effets sur la physiologie cellulaire peuvent être antagonistes. On sait par la littérature que ces différents modes d'activation sont actifs dans la transduction du signal LMP1 (Eliopoulos *et al.*, 2003). Un décorticage plus précis du rôle respectif des différentes composantes de la voie NF-κB dans la mort cellulaire induite par LMP1 sera donc nécessaire.

De la même façon et selon le contexte cellulaire, la voie JNK peut intervenir dans la signalisation de survie cellulaire induite par Jun ou peut, à l'inverse, être à l'origine de la mort cellulaire par apoptose par la voie mitochondriale (Lamb *et al.*, 2003). Dans notre cas, l'utilisation de l'inhibiteur moléculaire JNK-APF nous indique que la voie JNK pourrait aussi

être impliquée dans l'apoptose induite par LMP1. Cependant, l'effet dominant négatif de JNK-APF n'est pas significatif. Pour confirmer ce résultat, il convient donc d'envisager l'utilisation d'autres DN de la voie JNK comme ceux dérivés de la protéine d'échafaudage du signal JNK, JIP1 ou les DN des kinases en amont de JNK, MKK4-DN et MKK7-DN, ainsi que des inhibiteurs pharmacologiques.

La protéine LMP1 peut être clivée par les caspases.

Nous avons régulièrement observé la génération de plusieurs fragments de la protéine LMP1 après la transfection, dans différentes lignées cellulaires, de vecteurs d'expression codant pour cette protéine. Un clivage de LMP1 a d'ailleurs été décrit générant un fragment p35 ancré à la membrane et un fragment soluble p25 (Moorthy & Thorley-Lawson, 1990), cependant aucune donnée n'a été établie sur l'impact fonctionnel de ce clivage. Dans l'article 3, nous montrons que LMP1 est capable d'induire la mort par apoptose des cellules épithéliales MDCK. Pour savoir si la protéine LMP1 peut être clivée par ces protéases à cystéine, qui jouent un rôle essentiel dans les processus d'apoptose, nous avons traité les cellules MDCK transfectées par un inhibiteur général des caspases, le Z-VAD-FMK. L'analyse par western blot des protéines extraites de ces cellules nous a permis de mettre en évidence l'implication des caspases dans la génération de certains fragments de LMP1 (**figure 2**).

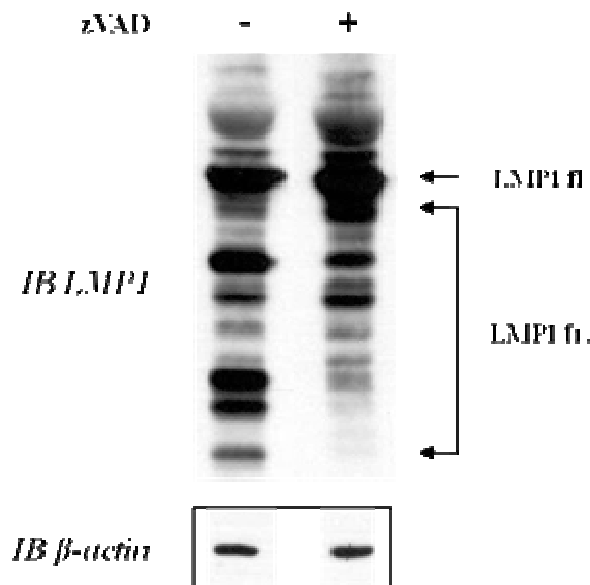


Figure 2: Clivage de LMP1 dépendant des caspases.

Les cellules MDCK ont été transfectées avec 1µg de plasmide codant LMP1. Les cellules sont traitées pendant 24 h avec un inhibiteur des caspases (zVAD pour Z-VAD-FMK, 20 µM). Les cellules sont ensuite lysées et le clivage de la protéine LMP1 est analysé par western blot. (fl: full length ; fr.: fragments).

L'utilisation de l'anticorps dirigé contre la β -actine nous permet de contrôler la charge de protéines mis en jeu pour chacune des conditions. Les deux pistes semblent donc équilibrées. L'anticorps S12, utilisé pour détecter la protéine LMP1, est dirigé contre la région C-terminale de la protéine. Dans la piste de gauche, correspondante aux lysats des cellules non traitées par l'inhibiteur des caspases, la forme pleine longueur de LMP1 est présente ainsi que plusieurs fragments majoritaires. Dans la piste de droite, correspondante aux cellules traitées avec le zVAD, la forme pleine longueur est majoritaire, une bande juste en-dessous apparaît, et les fragments les plus petits ne sont plus détectables, probablement car ils ne sont plus générés. Les caspases sont donc impliquées dans la génération des différents fragments de la protéine LMP1 puisque leur inhibition conduit à la stabilisation de la protéine de pleine longueur.

Afin de déterminer quel est la ou les caspases responsables spécifiquement de ces clivages, nous avons réalisé des tests de clivage *in vitro* à l'aide de caspases actives recombinantes. Le lysat de cellules exprimant transitoirement LMP1 est incubé avec différentes caspases pendant 1 à 8 heures puis l'analyse des fragments générés est réalisée par western blot (**figure 3**).

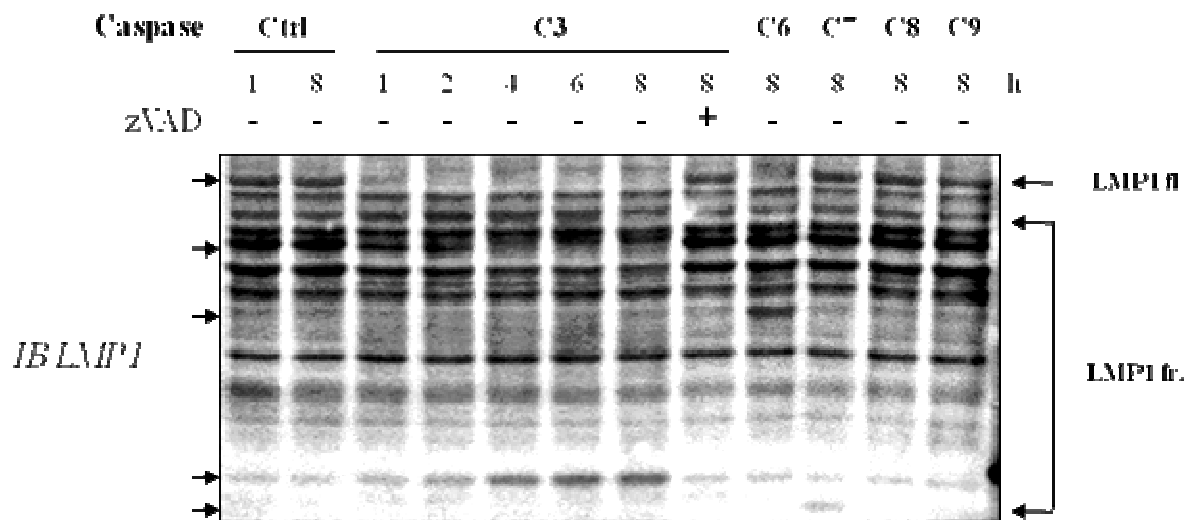


Figure 3: LMP1 est une cible de la caspase 3

Les cellules MDCK ont été transfectées avec 1 μ g de plasmide codant LMP1. Les cellules sont lysées et incubées avec différentes caspases recombinantes purifiées (caspase-3, -6, -7, -8 et -9). Le clivage de la protéine LMP1 est ensuite analysé par western blot. Les flèches de gauches indiquent les bandes dont l'intensité varie. (C: caspase ; fl: full length ; fr.: fragments ; zVAD : z-VAD-fmk est un inhibiteur général des caspases).

Les deux premières pistes nous permettent de contrôler la stabilité des différents fragments durant l'incubation des extraits protéiques. Comme nous pouvons le voir, il ne semble pas y avoir de dégradation des différents fragments entre le temps 1h et 8h. Les variations d'intensité

des bandes des autres pistes témoignent donc de l'activité des différentes caspases purifiées utilisées. La bande qui correspond à la protéine LMP1 de pleine longueur disparaît et n'est plus détectable après l'action de caspase 3 active et de caspase 6 active. En présence de zVAD l'action de la caspase 3 est totalement inhibée puisque la piste correspondante présente le même profil que celui obtenu avec les contrôles. Quant aux caspases 7, 8 et 9, elles ne semblent pas être capable de cliver la protéine LMP1.

L'oncogène viral LMP1 peut donc être clivé par des caspases *in cellulo*. Les caspases responsables de ces clivages sont probablement les caspases effectrices 3 et/ou 6 identifiées par les tests de clivages *in vitro*. La relevance et le rôle potentiel de ce(s) clivage(s) restent cependant à déterminer. L'identification des sites reconnus par les caspases permettrait de vérifier leur présence dans la séquence des différents variants naturels de LMP1 et d'étudier leurs importances dans les effets cytotoxiques et le pouvoir transformant de LMP1. Si de tels sites ont été conservés au cours de l'évolution du virus d'Epstein-Barr, il est fort probable que de ces clivages favorisent la survie du virus et le maintien de l'intégrité de son hôte.

L'expression stable de LMP1 dans les cellules MDCK induit des modifications phénotypiques.

Comme mentionné dans l'article 3, les cellules MDCK exprimant stablement LMP1 présentent une dispersion basale en culture (**figure 4A**). En effet, les cellules V20 ont la même morphologie que les cellules MDCK parentales, c'est à dire des cellules très cohésives et de forme épithéloïde. Par contre, les cellules qui expriment stablement LMP1, et plus particulièrement les cellules C27 qui l'expriment le plus, sont de forme fibroblastoïde et constituent des amas cellulaires plus lâches. Ces modifications phénotypiques font penser à celles observées lors d'une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT pour Epithelial-Mesenchymal Transition). L'EMT est un processus morphogénique qui permet, lors du développement embryonnaire, la conversion d'une cellule épithéliale en cellule mésenchymateuse. Ce processus peut être réactivé lors de la progression tumorale, et conférer aux cellules des capacités de motilité et d'invasion, favorisant ainsi la dissémination métastatique de tumeurs d'origine épithéliale. Nous avons donc recherché, par western blot, des variations au niveau de l'expression de certains marqueurs de l'EMT (**figure 4B**). Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à l'expression de l'E-cadherine, un marqueur des cellules épithéliales qui est généralement sous-exprimé lors d'une EMT, et à la MMP-9, une métalloprotéinase de matrice capable d'hydrolyser le collagène de type IV natif, principal composant des membranes

basales. Nous avons également contrôlé l'expression de la protéine LMP1 dans nos différents clones et vérifié la charge des pistes à l'aide de la protéine ERK2.

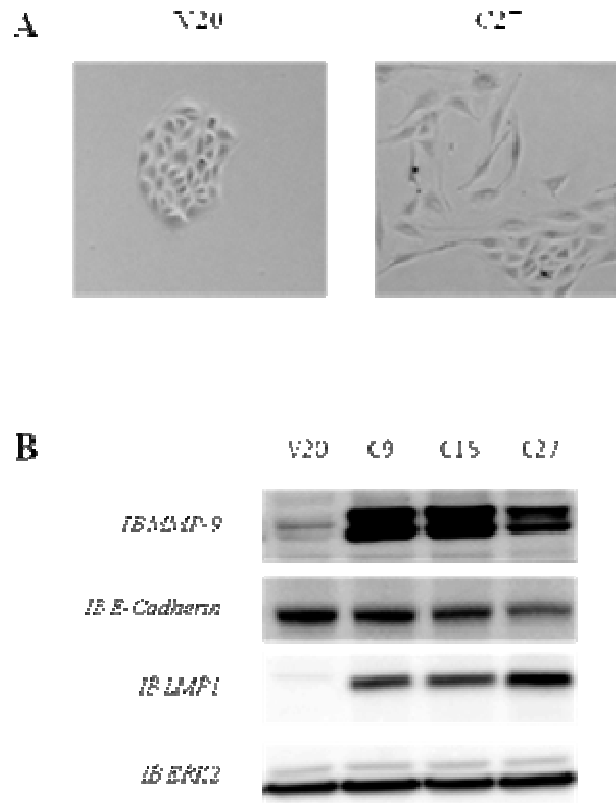


Figure 4: LMP1 induit des modifications phénotypiques dans les cellules MDCK.

Les cellules MDCK ont été transfectées stablement avec le vecteur pSTAR-LMP1. Le clone V20 est le clone contrôle obtenu avec le vecteur pSTAR vide. Les clones C9, C15 et C27 sont les clones exprimant constitutivement LMP1 à des niveaux variables. (A) L'expression stable de LMP1 dans les MDCK induit des modifications morphologiques. (B) Des extraits protéiques de ces cellules ont été analysés par western blot pour rechercher des marqueurs de transition epithelium-mésenchyme.

Les cellules V20 expriment peu de MMP-9 et exprime l'E-cadherine. Dans nos clones qui expriment stablement LMP1, la MMP-9 est surexprimée tandis que l'E-cadherine est sous-exprimée. De manière intéressante, le clone qui exprime le plus LMP1 présente le niveau d'expression de l'E-cadherine le plus bas et est le seul clone avec un phénotype dispersé marqué.

LMP1 coopère avec l'HGF/SF pour favoriser la croissance sans ancrage des cellules MDCK.

Afin de déterminer l'état de transformation de nos cellules MDCK exprimant stablement LMP1, nous avons recherché l'acquisition par nos cellules de la capacité à croître sans ancrage. Dans ce but, nous avons effectué des tests de clonogénicité et de croissance en agar mou (**figure**

5). Le test de clonogénicité en agar mou permet d'évaluer *in vitro* le pouvoir tumorigène des cellules. Nous avons utilisé ce test pour déterminer si LMP1 était capable de conférer des propriétés tumorigènes aux cellules épithéliales MDCK. Comme nous l'avons vu dans l'article 3, l'expression stable de LMP1 dans ces cellules amplifie leur réponse à l'HGF/SF, nous avons donc recherché également cette coopération sur l'acquisition de propriétés tumorigènes par ces cellules. Comme nous pouvons le voir sur les images des cellules non traitées avec l'HGF/SF (-), les cellules exprimant stablement ne génère pas plus de clone que les cellules témoins par contre, en présence de HGF/SF, les cellules exprimant stablement LMP1 génèrent un nombre plus important de clones que les cellules V20 et les clones sont plus gros. On observe à nouveau une différence entre les cellules C15 et C27, exprimant LMP1, les cellules C27 qui expriment le plus LMP1 présentent l'augmentation du nombre de clones et de leur taille la plus importante.

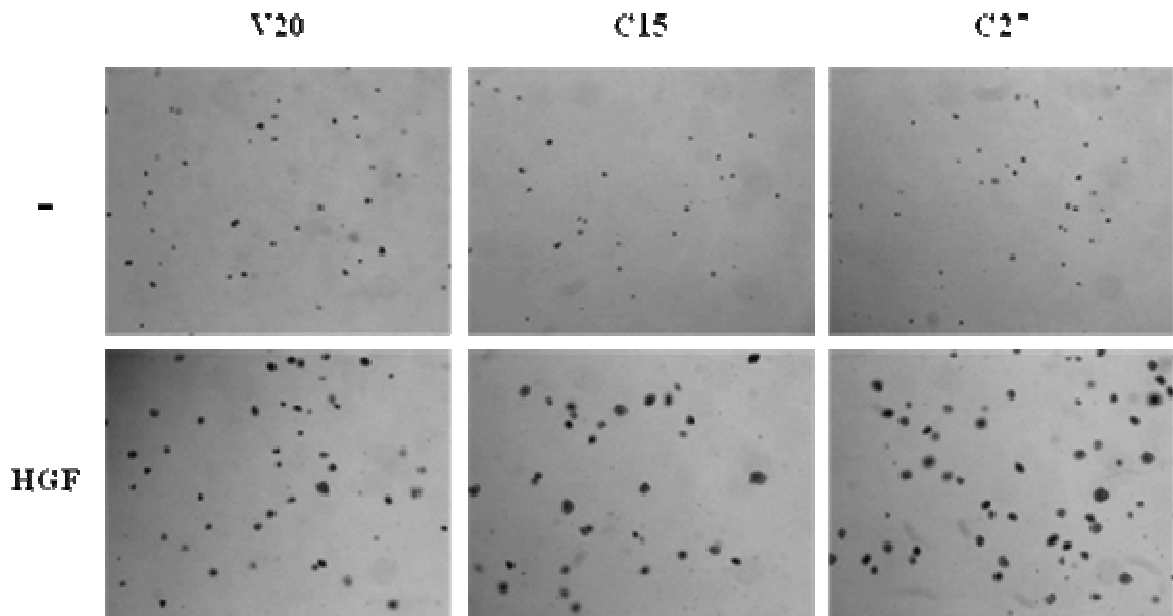


Figure 5. LMP1 coopère avec l'HGF/SF pour favoriser la croissance sans ancrage.

Le même nombre de cellules MDCK V20, C15 et C27 sont ensemencées dans un gel d'agar 0,39% et cultivées en présence ou non de 10 ng/ml d'HGF/SF. Les images présentées sont représentatives des résultats obtenus après 10 jours de culture.

Ces résultats nous indiquent que LMP1 ne semble pas avoir transformé nos cellules MDCK. Il est probable que le niveau d'expression de LMP1 joue un rôle important dans l'acquisition de propriétés tumorigènes des cellules qui l'expriment, mais la notion de durée doit aussi intervenir. Les cellules exprimant LMP1 subissent différentes modifications phénotypiques qui peuvent conduire à la dérive des cellules suite à l'accumulation d'anomalies au niveau de leur ADN. De plus, LMP1 peut induire des aberrations chromosomiques (formation de micronoyaux ; Liu *et al.*, 2004) et réprimer la réparation de l'ADN (Chen *et al.*, 2008 ; Liu *et al.*,

2005), favorisant l'instabilité génomique et l'accumulation d'anomalies au cours de la genèse tumorale.

Dans des carcinomes du rhinopharynx, LMP1 entraîne une augmentation de l'expression de la MMP-9 et induit l'EMT (Horikawa *et al.*, 2000 ; Horikawa *et al.*, 2007 ; Horikawa *et al.*, 2011). Nos résultats montrent que LMP1 est capable d'induire ces phénotypes dans notre modèle cellulaire, néanmoins, les résultats obtenus avec le test de clonogénicité et de croissance en agar mou ont l'air d'indiquer que la seule expression de LMP1, à cours terme, n'est pas suffisante pour leur transformation. Nos clones MDCK-LMP1 constituent peut être un modèle d'initiation de la tumorigenèse, il serait intéressant de suivre l'évolution des cultures de ces cellules pour voir si ces cellules acquièrent d'autres propriétés au cours du temps.

La dispersion basale induite par LMP1 est indépendante de la signalisation du récepteur à l'HGF/SF, MET.

Le phénotype constitutif de dispersion de notre clone C27, précédemment présenté dans la figure 4A, ressemble à la réponse cellulaire observée en présence du facteur de croissance HGF/SF. Afin de déterminer si cette motilité cellulaire accrue en présence de LMP1 est le résultat d'une activation du récepteur MET, nous avons effectué des tests de dispersion cellulaire à basse densité en inhibant la signalisation HGF/SF-MET de deux manières : soit par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique, le SU11274 (il s'agit d'une petite molécule inhibitrice qui rentre en compétition avec l'ATP, inhibant sélectivement l'activité catalytique du récepteur à activité tyrosine kinase MET), soit par une approche d'ARN interférence en utilisant des siRNA synthétiques spécifiques de MET.

Les cellules V20, n'exprimant pas LMP1, forment des îlots serrés à basse densité cellulaire, le traitement à l'HGF/SF induit la dispersion des cellules qui deviennent moins cohésives et prennent une forme plus étirée. En présence d'HGF/SF et de l'inhibiteur de MET (HGF+SU) les cellules restent cohésives et en îlots serrés, témoignant de l'efficacité de l'inhibiteur. Les cellules exprimant LMP1, quant à elles, sont constitutivement dispersées, rappelant un phénotype d'EMT, comme nous l'avons vu précédemment (**figure 4**). En présence d'HGF/SF, ces cellules ont une morphologie plus étirée que les cellules V20, et semblent avoir une motilité accrue. Le SU11274 semble avoir bloqué la signalisation HGF/SF-MET, comme pour les cellules V20, néanmoins, les cellules C27 ne forment pas pour autant des îlots serrés, les cellules ont conservées leur morphologie étirée suggérant que le phénotype observé n'est pas induit par le récepteur MET (**figure 6A**).

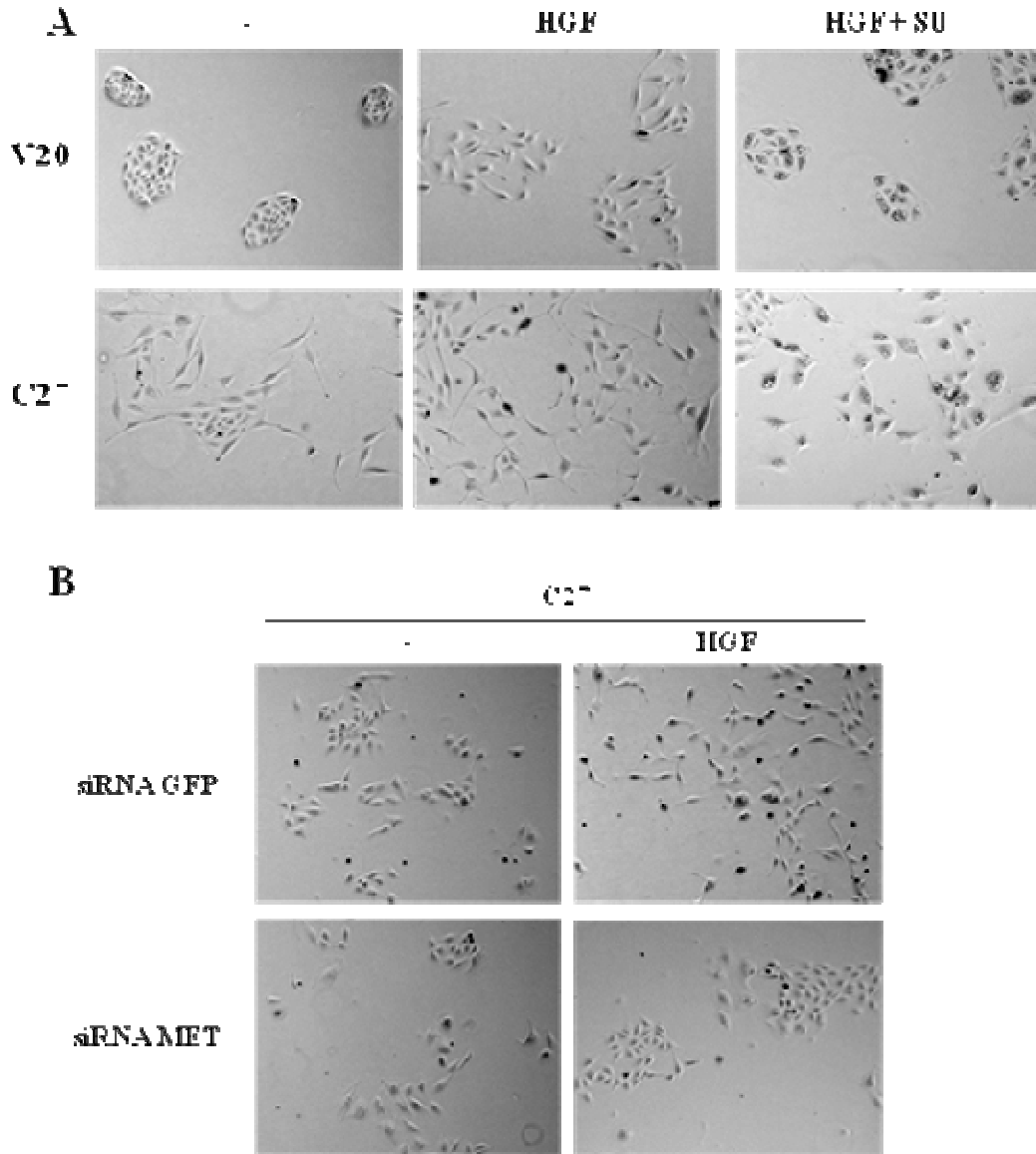


Figure 6. LMP1 augmente la motilité des cellules MDCK indépendamment de la signalisation HGF/SF-MET. Le même nombre de cellules MDCK V20 et C27 sont ensemencées à basse densité. Une fois que les cellules ont formé des petits amas cellulaires, les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM 0,1% SVF. (A) 10 ng/ml d'HGF/SF sont ajoutés le lendemain, en présence ou non d'un inhibiteur de MET (SU11274, un compétiteur de l'ATP). (B) les cellules sont transfectées avec des siRNA dirigés contre la protéine GFP (contrôle) ou le récepteur à l'HGF/SF, MET. Le lendemain, les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM 0,1% SVF, puis stimulées avec 10 ng/ml d'HGF/SF. Les images sont représentatives des résultats obtenus après 48 heures de culture.

L'utilisation d'un siRNA dirigé contre MET dans nos cellules C27 donne un résultat similaire (**figure 6B**). En effet, les cellules C27, malgré l'inhibition de MET (contrôlé par western blot, figure 7C de l'article 3), présentent une dispersion basale dans la condition sans HGF/SF, et la réponse à l'HGF/SF par ces cellules est abolie.

La motilité induite par LMP1 fait intervenir la voie de signalisation p38 MAPK.

Nous avons voulu déterminer par la suite si ce phénotype dispersé était réversible ou non. Pour cela nous avons utilisé une batterie d'inhibiteurs pharmacologiques afin de bloquer diverses voies de signalisation cellulaire pour analyser leur implication éventuelle dans ce phénomène. Par souci de clarté, je ne présenterai seulement les résultats obtenus avec deux inhibiteurs, le SB202190, spécifique de la voie de signalisation p38 MAPK, et le LY294002, spécifique de la voie PI3K (**figure 7**).

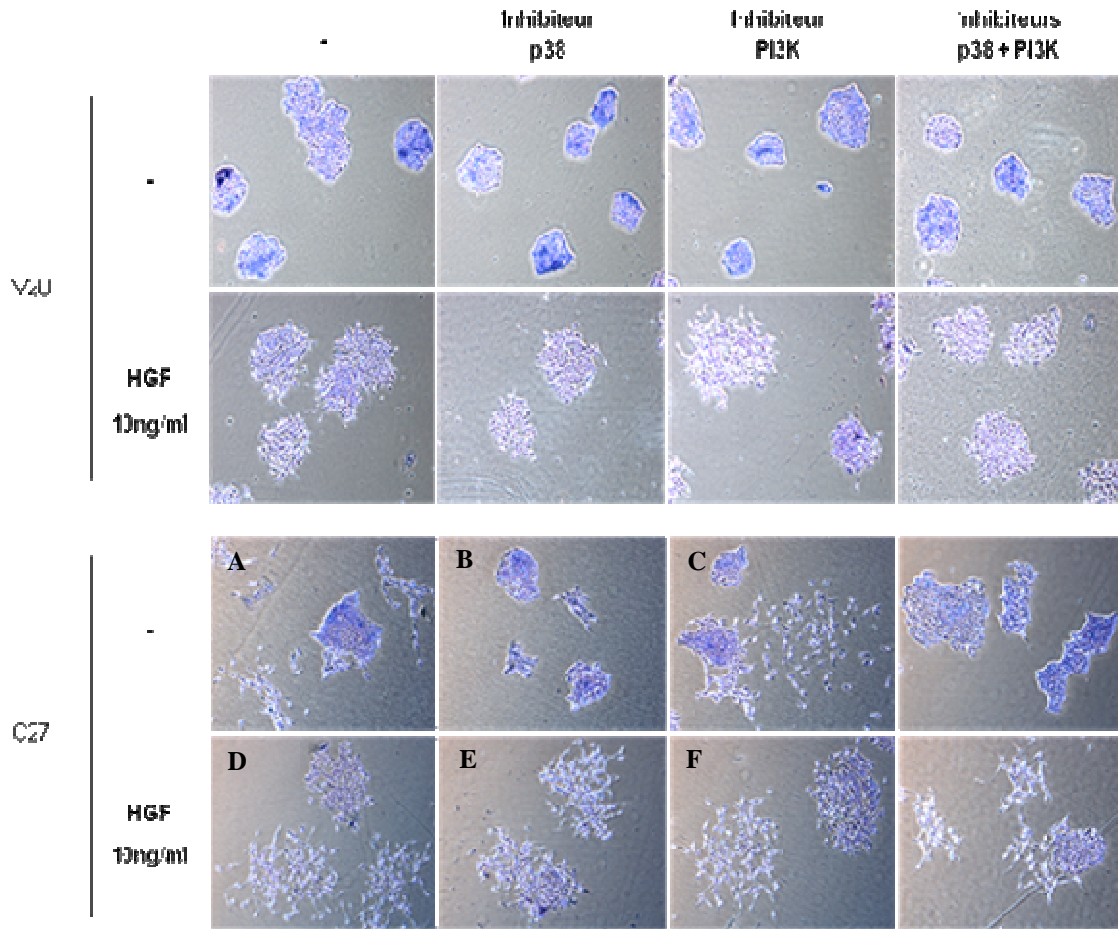


Figure 7. LMP1 induit la dispersion des cellules MDCK par la voie p38 MAPK.

Le même nombre de cellules MDCK V20 et C27 sont ensemencées à basse densité en présence ou non des inhibiteurs pharmacologiques SB202190 et LY294002. Une fois que les cellules ont formé des petits amas cellulaires, les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM 0,1% SVF, toujours en présence ou non des inhibiteurs. 10 ng/ml d'HGF/SF sont ajoutés le lendemain. Les images sont représentatives des résultats obtenus après 48 heures de culture. (SB202190: inhibiteur de la voie p38 et LY294002: inhibiteur de la voie PI3K, utilisés à 5µM).

Une stimulation par l'HGF/SF des cellules V20, qui n'exprime pas LMP1, entraîne une dispersion qui n'est pas bloquée par l'inhibiteur de la voie p38 ni par l'inhibiteur de la voie PI3K, et l'association des deux inhibiteurs n'a pas plus d'effet. Ces résultats étaient attendus puisque le

phénotype de dispersion induit par l'HGF/SF implique principalement la voie ERK. D'ailleurs, l'utilisation de l'inhibiteur U0126, spécifique de la voie ERK, bloque ce phénotype.

Par contre, l'utilisation de l'inhibiteur de la voie p38 sur les cellules C27 limite la dispersion basale de ce clone (figure 7, photo B versus photo A), mais n'a pas d'effet sur le phénotype induit par l'HGF/SF (photo D versus photo E). L'inhibiteur de la voie PI3K, quant à lui, n'est pas capable d'influencer le phénotype observé (sans HGF : photo C versus photo A ; avec HGF : photo F versus photo D). La combinaison de l'inhibiteur LY294002 avec l'inhibiteur SB202190 ne semble pas avoir d'effet additionnel sur le résultat observé avec seulement l'inhibiteur de la voie p38. Ces résultats témoignent de l'implication de la voie p38 dans ce phénotype « EMT-like » induit par LMP1 dans les cellules MDCK.

Nous nous ne pouvons pas exclure que d'autres voies de signalisation interviennent dans ce phénotype, n'ayant pas pu inhiber toutes les voies de signalisation ni tester toutes les combinaisons d'inhibiteurs. Dans le cas où d'autres voies interviendraient, elles agiraient plus probablement en aval de la voie p38 puisque la seule inhibition de cette voie semble suffisante pour bloquer le phénotype observé.

La voie p38 MAPK est impliquée dans l'EMT et la migration cellulaire induite par le TGF β . Dans nos résultats, cette voie semble également responsable de la motilité de nos cellules MDCK. Il a d'ailleurs été montré que LMP1 et le TGF- β 1 peuvent induire en synergie la transition épithélio-mésenchymateuse de certaines cellules épithéliales (Sides *et al.*, 2011). L'induction de l'EMT induite par LMP1 ne fait probablement pas intervenir les mêmes acteurs moléculaires que ceux participant à l'EMT induite par le TGF- β 1 sinon l'addition des deux ne serait pas synergique. Nous n'avons pas pu tester l'implication de toutes les voies de signalisation, et notamment celle de la voie NF- κ B en raison de la trop forte toxicité du composé inhibiteur, pourtant la voie NF- κ B semble être une bonne candidate. En effet, elle est décrite comme pouvant accentuer les effets du TGF- β 1 conduisant à l'EMT. Un co-traitement des cellules A549 par le TNF (inducteur de la voie NF- κ B) et par le TGF- β 1 accentue l'EMT induite, et l'inhibition de la voie NF- κ B (en ciblant IKK β) bloque l'EMT induite par le TGF- β 1 et l'effet amplificateur du TNF (Borthwick *et al.*, 2011).

De plus amples données sur les interactions existantes entre les différentes voies de signalisation induites par LMP1 et ses éventuels partenaires cellulaires tels que les récepteurs MET et TGF- β R pourraient permettre une meilleure compréhension de l'impact de l'expression de LMP1 dans les événements précoces de la tumorigenèse.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les différents résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis de fournir des données supplémentaires sur les propriétés transformantes, mais aussi cytotoxique de LMP1. En effet, bien qu'elle soit décrite comme l'oncogène majeur du virus d'Epstein-Barr, la protéine LMP1 est capable d'induire des signaux de mort cellulaire dans certains contextes. Nous avons montré, que la surexpression transitoire de LMP1 dans des cellules épithéliales induit la mort massive de celles-ci, par contre, son expression stable dans ce même type cellulaire à des effets radicalement opposés en favorisant plutôt la survie et l'invasion de ces cellules. En complément, notre approche visant à inhiber la protéine LMP1 dans un contexte de cellules tumorigènes présentant une latence de type II, nous a permis de mettre en évidence que des variants dérivés de LMP1 mais dépourvu de sa région transmembranaire ont un effet dominant négatif sur la signalisation et les phénotypes induits par LMP1wt. A la lumière de ses nouvelles données, il est intéressant de replacer nos travaux par rapport à la littérature existante dans ce domaine.

Le niveau d'expression de LMP1 influence le devenir de la cellule

Les premiers travaux conférant des propriétés cytotoxiques à LMP1 ont été décrits par Hammerschmidt *et al.*, en 1989. Ces propriétés cytotoxiques et cytostatiques de LMP1 ont lieu lorsque cette protéine est exprimée à de hauts niveaux d'expression. Un fort taux d'expression de LMP1 corrèle également avec à la phosphorylation d'eIF2 α (eIF2 α -P, Lam *et al.*, 2004). LMP1 induit la phosphorylation d'eIF2 α *via* la protéine kinase PERK (Lee & Sugden, 2008). eIF2 α -P va activer ATF4 qui va, avec ATF6, induire l'expression du gène codant la protéine CHOP. Cette dernière peut inhiber l'action de Bcl-2, et ainsi sensibiliserait les cellules à l'action des molécules pro-apoptotiques Bax et Bid, permettant l'activation des caspases suite au relargage dans le cytoplasme du cytochrome c par la mitochondrie.

Comme nous avons pu le montrer dans les cellules MDCK, en dehors d'un contexte infectieux, l'induction de la mort de LMP1 dépend de son niveau d'expression et également de sa signalisation. En effet, LMP1 est capable d'induire la voie NF- κ B qui semble intervenir dans ce phénomène, néanmoins nous avons également montré que la voie de signalisation NF- κ B, cette fois ci dans un modèle de cellules infectées et transformées par l'EBV, est indispensable à la survie de nos modèles de latence de type II puisque l'inhibition de cette voie de signalisation dans ces cellules aboutit à leur mort cellulaire. L'inhibition de LMP1 conduit au même résultat. LMP1, *via* NF- κ B, se trouve donc à l'interface de deux processus cellulaires, la survie et l'apoptose (Dirmeier *et al.*, 2005) et il semblerait donc que leur niveau d'expression ou d'activation joue un rôle important dans la survie cellulaire. En effet, il semble exister un niveau

d'expression de LMP1, optimum pour la survie cellulaire (Sandberg *et al.*, 2000). Ainsi, une trop forte expression de LMP1 pourrait entraîner le « suicide » de la cellule par apoptose. Ceci permettrait une sélection de cellules possédant un niveau d'expression adéquat de LMP1 favorisant la survie cellulaire.

Le contexte cellulaire semble donc pouvoir faire pencher la balance soit vers la survie, soit vers l'apoptose. Ce type de dualité fonctionnelle est connu pour les récepteurs de la famille du récepteur au TNF tels que le TNFR1, CD40 et CD95/Fas. L'oncoprotéine LMP1 étant fonctionnellement apparentée aux membres de cette famille de récepteur, il n'est pas étonnant de retrouver cette ambivalence entre apoptose et survie dans ses propriétés. Ceci nous amène tout de même à nous poser la question de la relevance de la mort cellulaire induite par cette protéine virale. Même si dans un premier temps on pourrait penser qu'induire l'apoptose est défavorable au virus, il se pourrait qu'un tel phénomène favorise au contraire la persistance du virus dans l'hôte. En effet, une des hypothèses serait que, dans un contexte physiologique, cette induction de mort cellulaire permettrait au virus d'échapper au système immunitaire, en détruisant les cellules qui exprimeraient les protéines virales à de trop forts taux rendant la présence du virus facilement détectable par le système immunitaire. Une autre possibilité serait que la mort induite par LMP1 permettrait d'éliminer une cellule « fragilisée » pour éviter que le virus y commence son cycle s'en qu'il puisse aboutir. Un tel phénomène pourrait aussi limiter la génération de cellule cancéreuse associée à « l'emballement » des voies de survie activées par LMP1 et donc la destruction de l'organisme. Dans tous les cas, le virus d'Epstein-Barr à co-évoluer avec l'espèce humaine et sa stratégie d'infection et de survie est très performante puisqu'aujourd'hui ce virus infecte plus de 90% de la population mondiale.

Révélation des propriétés pro-apoptotiques de LMP1 suite à son inhibition ?

L'utilisation des inhibiteurs de LMP1 nous a permis de démontrer leur efficacité sur les phénotypes induits par la protéine LMP1 mais également sur ceux induits par le TNF. Le TNF est capable d'induire aussi bien l'apoptose (dans les cellules L929) que la survie (dans les cellules HEK293). Dans l'article 1, nous montrons que nos DN sont capable de limiter l'apoptose induite par le TNF dans les cellules sensibles, et de l'induire dans les cellules normalement résistantes. Dans le second cas, l'inhibition de la signalisation du TNFR1 à révéler ses propriétés pro-apoptotiques dans des cellules qui normalement n'y sont pas sensibles. Dans l'article 2, nous montrons que nos DN sont capables d'inhiber la signalisation de LMP1 et d'induire l'apoptose dans des modèles cellulaires infectés et transformés par l'EBV.

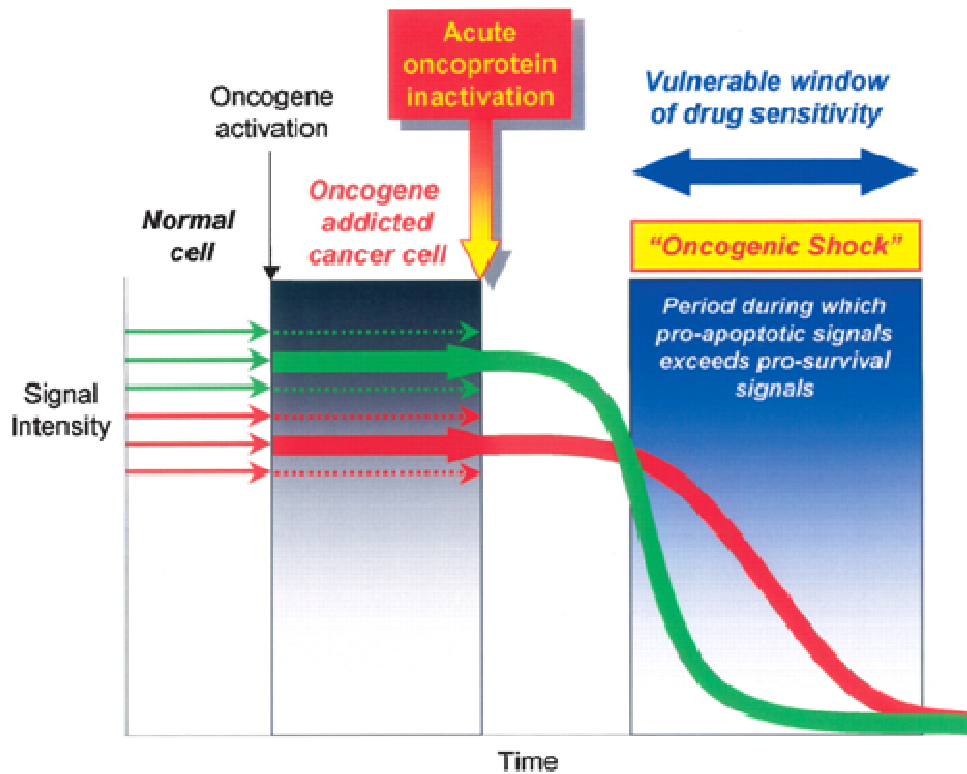


Figure 22. Modèle illustrant la relation entre l'oncogène dépendance et le choc oncogénique. En vert, les signaux pro-survie prédominants et en rouge, les signaux pro-apoptotiques pendant la phase d'oncogène dépendance. Après l'inhibition de l'oncogène, les signaux de survie déclinent rapidement alors que les signaux pro-apoptotiques, plus stables, persistent. Ceci se traduit par un choc oncogénique aiguë. Durant ce choc oncogénique, les signaux pro-apoptotiques sont plus intenses que les signaux pro-survie entraînant la mort des cellules. (D'après Sharma & Settleman, 2007)

On peut alors proposer deux hypothèses :

L'inhibition de la signalisation de LMP1 entraîne un blocage des voies de survie cellulaire et les cellules, ayant développé une dépendance vis-à-vis de ces voies pour leur survie, meurent.

L'inhibition de LMP1 révèle ses propriétés pro-apoptotiques lorsque ses effets anti-apoptotiques sont bloqués.

Certains travaux sont plutôt en faveur de la seconde hypothèse. En effet, une étude a été réalisée sur différents oncogènes montrant que leur inhibition conduit à une apoptose induite par leurs propres signaux pro-apoptotiques (Sharma *et al.*, 2006). Ces oncogènes semblent induire simultanément des signaux de survie et des signaux pro-apoptotiques mais les signaux de survie sont plus intenses que les signaux de mort conduisant à la survie cellulaire. Ces signaux n'ont

cependant pas la même stabilité dans le temps suite à leur inhibition. Ainsi lorsque l'oncogène est inhibé, les signaux de survie décroissent rapidement alors que les signaux pro-apoptotiques, plus stables, persistent. Les signaux de mort se retrouvent donc d'une intensité supérieure à celle des signaux de survie résiduels, induisant la mort irréversible des cellules (**figure 22**).

L'ambivalence de LMP1 vis-à-vis de la survie/transformation et de la mort cellulaire est connue, j'ai d'ailleurs pu la mettre en évidence dans un même modèle cellulaire (article 3). Son implication dans des processus d'apoptose est de plus en plus étudiée (Le Clorennec *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2007 ; Le Clorennec *et al.*, 2008). Dans nos modèles cellulaires, l'inhibition de LMP1 conduit à l'apoptose, il s'agit probablement d'un processus dans lequel intervient LMP1.

Déplétion et séquestration des adaptateurs par nos dominants négatifs.

Notre DN LMP1-CT est capable de recruter les adaptateurs TRADD et TRAF2 et de les délocaliser dans le cytoplasme (Adriaenssens *et al.*, 2004), empêchant ainsi leur interaction avec LMP1 et avec le TNFR1 et inhibant leur signalisation. Au cours de ma thèse j'ai participé à la caractérisation d'autres protéines à effet dominant négatif de LMP1 (DN) dérivées de sa région CT mais dont la taille est compatible avec les techniques de synthèse chimique en vue d'une possible utilisation thérapeutique.

Le DN LMP1-CT est capable de recruter les adaptateurs TRAF3 et RIP. Les autres DN sont capables de recruter l'ensemble des adaptateurs proximaux connus se fixant à l'un ou l'autre des sites TES1 ou TES2 de LMP1. L'efficacité du recrutement des adaptateurs semble meilleur avec les DN qu'avec les molécules (endogènes) LMP1 et TNFR1 comme le montre les immunoprécipitations et les analyses par microscopie confocale. En effet, les adaptateurs cellulaires se fixent préférentiellement aux DN en présence de LMP1 ou du TNFR1 activé. Pourtant le dogme veut que l'affinité d'une molécule comme TRAF2 soit beaucoup plus importante pour un récepteur qui est trimérisé à la membrane. Une hypothèse possible serait la localisation subcellulaire de nos DN puisque dans le cytoplasme, l'interaction entre les molécules qui s'y trouvent est facilitée. Cela peut se traduire par un défaut d'accessibilité des adaptateurs au niveau des membranes.

Nous parvenons également à détecter d'autres interactions entre nos DN et des protéines cellulaires. Il s'agit de la détection légère mais réelle de TRADD sur le DN TES1Short et de TRAF2 sur TES2Short dans le modèle physiologique NC5. Le site TES1 n'interagit pourtant pas avec TRADD et TRAF2 n'interagit qu'indirectement avec TES2 par l'intermédiaire de TRADD.

Ces résultats peuvent à première vue sembler erronés ou contradictoires mais, i) nos contrôles GFP prouvent leur validité et ii) les complexes apoptotiques mis en évidence permettent d'expliquer ce type d'interactions qui a été démontré par ailleurs dans les études de l'équipe de Jürg Tschopp. En effet, dans l'hypothèse où des molécules, qui se trouvent dans le cytoplasme sous forme monomérique ou trimérique, ont la capacité de se lier à différentes protéines capables elles mêmes d'interagir entre elles, alors il est possible d'envisager la formation de complexes constitués de plusieurs protéines cellulaires. De plus, le contexte cellulaire pourrait fortement favoriser ces interactions et la formation de complexes, car dans les cellules HEK nous n'avons pas pu détecter ce type d'interaction dans le cas d'une transfection transitoire de LMP1. Pour étudier ces interactions, nous pourrions utiliser des constructions de DN avec des « tags » différents afin de pouvoir discriminer la manière dont se composent ces complexes.

L'apoptose induite par LMP1 fait-elle intervenir un complexe comparable à celui formé lors de l'apoptose induite par le TNF?

Nous avons montré la capacité de nos DN à induire l'apoptose suite à l'inhibition de LMP1. Cette inhibition se traduit par une baisse de la croissance cellulaire et la mort. En revanche, en s'intéressant à cette mortalité dans nos modèles de latence de type II, NC5 et TE1, il s'avère de manière surprenante qu'elle ressemble à la mort induite par le TNF *via* la formation d'un complexe II. En effet, les co-immunoprécipitations montrent l'implication de FADD, de la caspase 8 et de TRADD entre autre dans le même complexe. Cependant l'éventualité d'une production de TNF par ces lymphocytes suite à une activation a été écartée puisque les tests ELISA que nous avons réalisés ne montrent aucune production de TNF. Il semble que l'inhibition de NF- κ B produit le même effet que lors de l'induction de l'apoptose par le TNF. De plus, l'analyse des complexes formés montre également la présence des DN. Et l'immunoprécipitation des DN permet de révéler la présence des protéines FADD, caspase 8 ainsi que des adaptateurs TRAF2 et TRADD. Nous ne savons pas si ce sont les mêmes molécules de DN qui sont associées à tous ces adaptateurs ou si ce sont des dimères formés par un DN et une des protéines impliquées dans le complexe. Il est possible que ce soit des oligomères hétérogènes dans lesquels se retrouvent les DN. Il existe deux pré-requis pour l'induction de l'apoptose par le TNF : le blocage de la voie NF- κ B (voie qui induit l'expression de molécules anti-apoptotiques) et la délocalisation, après modifications post-traductionnelles, du complexe I qui va former le complexe II apoptotique dans le cytoplasme (Muppidi *et al.*, 2004 ; Jin & El-Deiry, 2006 ; Zheng *et al.*, 2006). Dans une cellule normale, ce complexe II est

inhibé par la voie NF- κ B. Nous pouvons donc supposer que dans le cas de nos cellules, le premier pré-requis est acquis et le second équivaut à la formation d'un complexe apoptotique « complexe II like » probablement facilitée par la présence des DN cytosoliques.

Les fragments mis en évidence par l'utilisation de caspases recombinantes et d'un inhibiteur général des caspases nous permettent d'émettre l'hypothèse qu'un des fragments peut conduire à la formation d'un complexe pro-apoptotique comme celui identifié pour le TNFR1. En effet, l'un des clivages de LMP1 génère un fragment contenant l'extrémité C-terminale de LMP1 avec le site TES2. Un tel fragment pourrait donc être un dominant négatif naturel de LMP1 se comportant comme le DN TES2Short. Ainsi ce fragment serait capable d'interagir avec différents adaptateurs cellulaires et induire la formation d'un « complexe II like ». Lors de l'induction de l'apoptose, la protéine LMP1 pourrait être clivée, sa signalisation serait donc perturbée et ne permettrait plus d'induire la survie des cellules. Ceci aurait pour conséquence d'amplifier le processus d'apoptose et d'empêcher tout échappement à la mort cellulaire.

Ce processus est connu pour le récepteur MET, un récepteur à activité tyrosine kinase impliqué dans des processus de survie cellulaire en présence de son ligand l'HGF/SF. Cependant, en l'absence d'HGF/SF, et dans des conditions de stress, le récepteur MET peut être clivé par les caspases, générant un fragment cytosolique de 40 kDa appelé p40 et un fragment de 100 kDa, ancré à la membrane, appelé p100. Ce dernier pourrait entrer en compétition avec le récepteur MET non clivé pour la fixation du ligand HGF/SF, jouant le rôle de récepteur leurre et limitant l'activation des voies de survie cellulaire associées à MET (Deheuninck *et al.*, 2008). Le fragment p40, quant à lui, joue le rôle d'amplificateur d'apoptose (Foveau *et al.*, 2007). Ainsi, la génération de ces deux fragments favoriserait la mort cellulaire.

Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'identifier les sites de clivage, et de vérifier leur présence ou non dans les différents variants naturels de LMP1. Cette première comparaison permettrait d'établir une corrélation entre la capacité de LMP1 à être clivée par les caspases, et son pouvoir oncogénique. En effet, on peut imaginer que le processus de mort cellulaire induit par LMP1 limiterait l'apparition de cellules cancéreuses. Dans l'hypothèse où le clivage de LMP1 par les caspases inhiberait ses propriétés oncogéniques, ces sites de clivage seraient présents chez les variants naturels les moins transformants.

En conclusion, cette thèse m'a permis d'une part, de mettre en évidence dans un même modèle cellulaire, la capacité de LMP1 à induire la mort cellulaire mais également des propriétés pro-transformantes montrant son implication éventuelle dans les phases précoces de

tumorigénèse, et d'autre part, de caractériser des molécules et des peptides synthétiques dérivés de l'oncoprotéine LMP1. Ces molécules ont un effet dominant négatif et sont capables d'inhiber les voies de signalisation induites par le TNFR1 et par la protéine LMP1. A l'aide de ces outils moléculaires et après l'étude de leurs mécanismes d'action, nous avons pu montrer l'intérêt d'envisager des approches thérapeutiques alternatives dans les pathologies inflammatoires et cancéreuses. Des travaux complémentaires sont nécessaires pour confirmer la possibilité d'utiliser les peptides synthétiques développés au laboratoire dans de nouvelles approches thérapeutiques.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Adams A, Lindahl T.** Epstein-Barr virus genomes with properties of circular DNA molecules in carrier cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1975**;72(4):1477-81.
2. **Adriaenssens E, Mougel A, Goormachtigh G, Loing E, Fafeur V, Auriault C, Coll J.** A novel dominant-negative mutant form of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) selectively and differentially impairs LMP1 and TNF signaling pathways. *Oncogene.* **2004**;23(15):2681-93.
3. **Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G.** Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol.* **2006**;72(11):1605-21.
4. **Albihn A, Johnsen JI, Henriksson MA.** MYC in oncogenesis and as a target for cancer therapies. *Adv Cancer Res.* **2010**;107:163-224.
5. **Ambinder RF, Mullen MA, Chang YN, Hayward GS, Hayward SD.** Functional domains of Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1. *J Virol.* **1991**;65(3):1466-78.
6. **Anagnostopoulos I, Hummel M, Kreschel C, Stein H.** 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.* **1995**;85(3):744-50.
7. **Ardila-Osorio H, Pioche-Durieu C, Puvion-Dutilleul F, Clause B, Wiels J, Miller W, Raab-Traub N, Busson P.** 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.* **2005**;113(2):267-75.
8. **Ashwell JD.** The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat Rev Immunol.* **2006**;6(7):532-40.
9. **Aviel S, Winberg G, Massucci M, Ciechanover A.** Degradation of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) by the ubiquitin-proteasome pathway. Targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *J Biol Chem.* **2000**;275(31):23491-9.
10. **Baker AH, Edwards DR, Murphy G.** Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* **2002**;115(Pt 19):3719-27.
11. **Babcock GJ, Decker LL, Volk M, Thorley-Lawson DA.** EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity.* **1998**;9(3):395-404.
12. **Babcock GJ, Thorley-Lawson DA.** Tonsillar memory B cells, latently infected with Epstein-Barr virus, express the restricted pattern of latent genes previously found only in Epstein-Barr virus-associated tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2000**;97(22):12250-5.
13. **Baer R, Bankier AT, Biggin MD, Deininger PL, Farrell PJ, Gibson TJ, Hatfull G, Hudson GS, Satchwell SC, Séguin C.** DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature.* **1984**;310(5974):207-11.
14. **Baichwal VR, Sugden B.** Transformation of Balb 3T3 cells by the BNLF-1 gene of Epstein-Barr virus. *Oncogene.* **1988**;2(5):461-7.
15. **Bajaj BG, Murakami M, Cai Q, Verma SC, Lan K, Robertson ES.** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with and enhances the stability of the c-Myc oncoprotein. *J Virol.* **2008**;82(8):4082-90.
16. **Balandraud N, Roudier J, Roudier C.** Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev.* **2004**;3(5):362-7.
17. **Bandobashi K, Maeda A, Teramoto N, Nagy N, Székely L, Taguchi H, Miyoshi I, Klein G, Klein E.** Intranuclear localization of the transcription coadaptor CBP/p300 and the transcription factor RBP-Jk in relation to EBNA-2 and -5 in B lymphocytes. *Virology.* **2001**;288(2):275-82.

18. **Bark-Jones SJ, Webb HM, West MJ.** EBV EBNA2 stimulates CDK9-dependent transcription and RNA polymerase II phosphorylation on serine 5. *Oncogene*. **2006**;25(12):1775-85.
19. **Beaufils P, Choquet D, Mamoun RZ, Malissen B.** The (YXXL/I)2 signalling motif found in the cytoplasmic segments of the bovine leukaemia virus envelope protein and Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A can elicit early and late lymphocyte activation events. *EMBO J*. **1993**;12(13):5105-12.
20. **Bishop GA.** The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B-cell function. *Nat Rev Immunol*. **2004**;4(10):775-86.
21. **Borthwick LA, Gardner A, De Soyza A, Mann DA, Fisher AJ.** Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) Driven Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) is Accentuated by Tumour Necrosis Factor α (TNF α) via Crosstalk Between the SMAD and NF- κ B Pathways. *Cancer Microenviron*. **2011** Jul 27. [Epub ahead of print]
22. **Borza CM, Morgan AJ, Turk SM, Hutt-Fletcher LM.** Use of gHgL for attachment of Epstein-Barr virus to epithelial cells compromises infection. *J Virol*. **2004**;78(10):5007-14.
23. **Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, Croughton K, Cruciat C, Eberhard D, Gagneur J, Ghidelli S, Hopf C, Huhse B, Mangano R, Michon AM, Schirle M, Schlegl J, Schwab M, Stein MA, Bauer A, Casari G, Drewes G, Gavin AC, Jackson DB, Joberty G, Neubauer G, Rick J, Kuster B, Superti-Furga G.** A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol*. **2004**;6(2):97-105.
24. **Bourillot PY, Waltzer L, Sergeant A, Manet E.** Epstein-Barr virus nuclear protein 3C modulates transcription through interaction with the sequence-specific DNA-binding protein J kappa. *J Gen Virol*. **1998**;79(Pt 2):363-70.
25. **Brennan P.** Signalling events regulating lymphoid growth and survival. *Semin Cancer Biol*. **2001**;11(6):415-21.
26. **Brielmeier M, Mautner J, Laux G, Hammerschmidt W.** The latent membrane protein 2 gene of Epstein-Barr virus is important for efficient B cell immortalization. *J Gen Virol*. **1996**;77 (Pt 11):2807-18.
27. **Buck M, Burgess A, Stirzaker R, Krauer K, Sculley T.** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3A contains six nuclear-localization signals. *J Gen Virol*. **2006**;87(Pt 10):2879-84.
28. **Burgess A, Buck M, Krauer K, Sculley T.** Nuclear localization of the Epstein-Barr virus EBNA3B protein. *J Gen Virol*. **2006**;87(Pt 4):789-93.
29. **Burkhardt AL, Bolen JB, Kieff E, Longnecker R.** An Epstein-Barr virus transformation-associated membrane protein interacts with src family tyrosine kinases. *J Virol*. **1992**;66(8):5161-7.
30. **Burkitt D.** A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg*. **1958**;46(197):218-23.
31. **Burkitt D.** Determining the climatic limitations of a children's cancer common in Africa. *Br Med J*. **1962**;2(5311):1019-23.
32. **Cahir McFarland ED, Izumi KM, Mosialos G.** Epstein-barr virus transformation: involvement of latent membrane protein 1-mediated activation of NF-kappaB. *Oncogene*. **1999**;18(49):6959-64.
33. **Caldwell RG, Brown RC, Longnecker R.** Epstein-Barr virus LMP2A-induced B-cell survival in two unique classes of EmuLMP2A transgenic mice. *J Virol*. **2000**;74(3):1101-13.
34. **Caldwell RG, Wilson JB, Anderson SJ, Longnecker R.** Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity*. **1998**;9(3):405-11.

35. **Canaan A, Haviv I, Urban AE, Schulz VP, Hartman S, Zhang Z, Palejev D, Deisseroth AB, Lacy J, Snyder M, Gerstein M, Weissman SM.** EBNA1 regulates cellular gene expression by binding cellular promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2009**;106(52):22421-6.
36. **Ceccarelli S, Visco V, Raffa S, Wakisaka N, Pagano JS, Torrisi MR.** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 promotes concentration in multivesicular bodies of fibroblast growth factor 2 and its release through exosomes. *Int J Cancer.* **2007**;121(7):1494-506.
37. **Chang Y, Tung CH, Huang YT, Lu J, Chen JY, Tsai CH.** Requirement for cell-to-cell contact in Epstein-Barr virus infection of nasopharyngeal carcinoma cells and keratinocytes. *J Virol.* **1999**;73(10):8857-66.
38. **Chang Y, Lee HH, Chang SS, Hsu TY, Wang PW, Chang YS, Takada K, Tsai CH.** Induction of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 by a lytic transactivator Rta. *J Virol.* **2004**;78(23):13028-36.
39. **Chavier P, Gruffat H, Chevallier-Greco A, Buisson M, Sergeant A.** The Epstein-Barr virus (EBV) early promoter DR contains a cis-acting element responsive to the EBV transactivator EB1 and an enhancer with constitutive and inducible activities. *J Virol.* **1989**;63(2):607-14.
40. **Chen A, Divisconte M, Jiang X, Quink C, Wang F.** Epstein-Barr virus with the latent infection nuclear antigen 3B completely deleted is still competent for B-cell growth transformation in vitro. *J Virol.* **2005**;79(7):4506-9.
41. **Chen H, Lee JM, Zong Y, Borowitz M, Ng MH, Ambinder RF, Hayward SD.** Linkage between STAT regulation and Epstein-Barr virus gene expression in tumors. *J Virol.* **2001**;75(6):2929-37.
42. **Chen H, Hutt-Fletcher L, Cao L, Hayward SD.** A positive autoregulatory loop of LMP1 expression and STAT activation in epithelial cells latently infected with Epstein-Barr virus. *J Virol.* **2003**;77(7):4139-48.
43. **Chen MR, Middeldorp JM, Hayward SD.** Separation of the complex DNA binding domain of EBNA-1 into DNA recognition and dimerization subdomains of novel structure. *J Virol.* **1993**;67(8):4875-85.
44. **Chen YR, Liu MT, Chang YT, Wu CC, Hu CY, Chen JY.** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 represses DNA repair through the PI3K/Akt/FOXO3a pathway in human epithelial cells. *J Virol.* **2008**;82(16):8124-37.
45. **Chen ZJ.** Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol.* **2005**;7(8):758-65.
46. **Chesnokova LS, Nishimura SL, Hutt-Fletcher LM.** Fusion of epithelial cells by Epstein-Barr virus proteins is triggered by binding of viral glycoproteins gHgL to integrins alphavbeta6 or alphavbeta8. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2009**;106(48):20464-9.
47. **Chevallier-Greco A, Gruffat H, Manet E, Calender A, Sergeant A.** The Epstein-Barr virus (EBV) DR enhancer contains two functionally different domains: domain A is constitutive and cell specific, domain B is transactivated by the EBV early protein R. *J Virol.* **1989**;63(2):615-23.
48. **Chi LM, Yu JS, Chang YS.** Identification of protein kinase CK2 as a potent kinase of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *Biochem Biophys Res Commun.* **2002**;294(3):586-91.
49. **Chien KY, Chang YS, Yu JS, Fan LW, Lee CW, Chi LM.** Identification of a new in vivo phosphorylation site in the cytoplasmic carboxyl terminus of EBV-LMP1 by tandem mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun.* **2006**;348(1):47-55.
50. **Chou YC, Lin SJ, Lu J, Yeh TH, Chen CL, Weng PL, Lin JH, Yao M, Tsai CH.** Requirement for LMP1-induced RON receptor tyrosine kinase in Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation. *Blood.* **2011**;118(5):1340-9.

51. **Choy EY, Siu KL, Kok KH, Lung RW, Tsang CM, To KF, Kwong DL, Tsao SW, Jin DY.** An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. *J Exp Med.* **2008**;205(11):2551-60.
52. **Chuang HC, Lay JD, Hsieh WC, Wang HC, Chang Y, Chuang SE, Su IJ.** Epstein-Barr virus LMP1 inhibits the expression of SAP gene and upregulates Th1 cytokines in the pathogenesis of hemophagocytic syndrome. *Blood.* **2005**;106(9):3090-6.
53. **Clausse B, Fizazi K, Walczak V, Tetaud C, Wiels J, Tursz T, Busson P.** High concentration of the EBV latent membrane protein 1 in glycosphingolipid-rich complexes from both epithelial and lymphoid cells. *Virology.* **1997**;228(2):285-93.
54. **Coffin WF 3rd, Erickson KD, Hoedt-Miller M, Martin JM.** The cytoplasmic amino-terminus of the Latent Membrane Protein-1 of Epstein-Barr Virus: relationship between transmembrane orientation and effector functions of the carboxy-terminus and transmembrane domain. *Oncogene.* **2001**;20(38):5313-30.
55. **Cohen JI, Kieff E.** An Epstein-Barr virus nuclear protein 2 domain essential for transformation is a direct transcriptional activator. *J Virol.* **1991**;65(11):5880-5.
56. **Cohen JI, Wang F, Mannick J, Kieff E.** Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1989**;86(23):9558-62.
57. **Cordier M, Calender A, Billaud M, Zimmer U, Rousselet G, Pavlish O, Banchereau J, Tursz T, Bornkamm G, Lenoir GM.** 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.* **1990**;64(3):1002-13.
58. **Dallman C, Johnson PW, Packham G.** Differential regulation of cell survival by CD40. *Apoptosis.* **2003**;8(1):45-53.
59. **Dawson CW, Laverick L, Morris MA, Tramoutanis G, Young LS.** Epstein-Barr virus-encoded LMP1 regulates epithelial cell motility and invasion via the ERK-MAPK pathway. *J Virol.* **2008**;82(7):3654-64.
60. **Dawson CW, Tramoutanis G, Eliopoulos AG, Young LS.** 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.* **2003**;278(6):3694-704.
61. **Deacon EM, Pallesen G, Niedobitek G, Crocker J, Brooks L, Rickinson AB, Young LS.** Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. *J Exp Med.* **1993**;177(2):339-49.
62. **Deheuninck J, Foveau B, Goormachtigh G, Leroy C, Ji Z, Tulasne D, Fafeur V.** Caspase cleavage of the MET receptor generates an HGF interfering fragment. *Biochem Biophys Res Commun.* **2008**;367(3):573-7.
63. **Demetriades C, Mosialos G.** The LMP1 promoter can be transactivated directly by NF-kappaB. *J Virol.* **2009**;83(10):5269-77.
64. **Devergne O, Cahir McFarland ED, Mosialos G, Izumi KM, Ware CF, Kieff E.** Role of the TRAF binding site and NF-kappaB activation in Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-induced cell gene expression. *J Virol.* **1998**;72(10):7900-8.
65. **Devergne O, Hatzivassiliou E, Izumi KM, Kaye KM, Kleijnen MF, Kieff E, Mosialos G.** 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.* **1996**;16(12):7098-108.
66. **Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W.** MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene.* **2007**;26(22):3279-90.

67. **Dirmeier U, Hoffmann R, Kilger E, Schultheiss U, Briseño C, Gires O, Kieser A, Eick D, Sugden B, Hammerschmidt W.** Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus coordinately regulates proliferation with control of apoptosis. *Oncogene*. **2005**;24(10):1711-7.
68. **Dirmeier U, Neuhierl B, Kilger E, Reisbach G, Sandberg ML, Hammerschmidt W.** Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by Epstein-Barr virus. *Cancer Res*. **2003**;63(11):2982-9.
69. **Dolcetti R, Menezes J.** Epstein-Barr virus and undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: new immunobiological and molecular insights on a long-standing etiopathogenic association. *Adv Cancer Res*. **2003**;87:127-57.
70. **D'Souza BN, Edelstein LC, Pegman PM, Smith SM, Loughran ST, Clarke A, Mehl A, Rowe M, Gélinas C, Walls D.** Nuclear factor kappa B-dependent activation of the antiapoptotic bfl-1 gene by the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and activated CD40 receptor. *J Virol*. **2004**;78(4):1800-16.
71. **Dudziak D, Kieser A, Dirmeier U, Nimmerjahn F, Berchtold S, Steinkasserer A, Marschall G, Hammerschmidt W, Laux G, Bornkamm GW.** Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus induces CD83 by the NF-kappaB signaling pathway. *J Virol*. **2003**;77(15):8290-8.
72. **Dykstra ML, Longnecker R, Pierce SK.** Epstein-Barr virus coopts lipid rafts to block the signaling and antigen transport functions of the BCR. *Immunity*. **2001**;14(1):57-67.
73. **Eliopoulos AG, Gallagher NJ, Blake SM, Dawson CW, Young LS.** Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J Biol Chem*. **1999**;274(23):16085-96.
74. **Eliopoulos AG, Young LS.** LMP1 structure and signal transduction. *Semin Cancer Biol*. **2001**;11(6):435-44.
75. **Eliopoulos AG, Caamano JH, Flavell J, Reynolds GM, Murray PG, Poyet JL, Young LS.** Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1 regulates the processing of p100 NF-kappaB2 to p52 via an IKKgamma/NEMO-independent signalling pathway. *Oncogene*. **2003**;22(48):7557-69.
76. **Eliopoulos AG, Waites ER, Blake SM, Davies C, Murray P, Young LS.** 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*. **2003**;77(2):1316-28.
77. **Epstein MA, Achong BG, Barr YM.** Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet*. **1964**;1(7335):702-3.
78. **Epstein MA, Barr YM.** Cultivation in vitro of human lymphoblasts from Burkitt's malignant lymphoma. *Lancet*. **1964**;1(7327):252-3.
79. **Epstein MA, Henle G, Achong BG, Barr YM.** Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *J Exp Med*. **1965**;121:761-70.
80. **Erickson KD, Martin JM.** Early detection of the lytic LMP-1 protein in EBV-infected B-cells suggests its presence in the virion. *Virology*. **1997**;234(1):1-13.
81. **Erickson KD, Martin JM.** The late lytic LMP-1 protein of Epstein-Barr virus can negatively regulate LMP-1 signaling. *J Virol*. **2000**;74(2):1057-60.
82. **Everly DN Jr, Mainou BA, Raab-Traub N.** Induction of Id1 and Id3 by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus and regulation of p27/Kip and cyclin-dependent kinase 2 in rodent fibroblast transformation. *J Virol*. **2004**;78(24):13470-8.

83. **Fåhraeus R, Rymo L, Rhim JS, Klein G.** Morphological transformation of human keratinocytes expressing the LMP gene of Epstein-Barr virus. *Nature*. **1990**;345(6274):447-9.
84. **Farrell PJ.** Tumour viruses--could they be an Achilles' heel of cancer? *Eur J Cancer*. **2002**;38(14):1815-6.
85. **Fennewald S, van Santen V, Kieff E.** Nucleotide sequence of an mRNA transcribed in latent growth-transforming virus infection indicates that it may encode a membrane protein. *J Virol*. **1984**;51(2):411-9.
86. **Feuillard J, Schuhmacher M, Kohanna S, Asso-Bonnet M, Ledeur F, Joubert-Caron R, Bissières P, Polack A, Bornkamm GW, Raphaël M.** Inducible loss of NF-kappaB activity is associated with apoptosis and Bcl-2 down-regulation in Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes. *Blood*. **2000**;95(6):2068-75.
87. **Fischer E, Delibrias C, Kazatchkine MD.** Expression of CR2 (the C3dg/EBV receptor, CD21) on normal human peripheral blood T lymphocytes. *J Immunol*. **1991**;146(3):865-9.
88. **Flanagan J, Middeldorp J, Sculley T.** Localization of the Epstein-Barr virus protein LMP 1 to exosomes. *J Gen Virol*. **2003**;84(Pt 7):1871-9.
89. **Floettmann JE, Ward K, Rickinson AB, Rowe M.** Cytostatic effect of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 analyzed using tetracycline-regulated expression in B cell lines. *Virology*. **1996**;223(1):29-40.
90. **Forsman A, Rüetschi U, Ekholm J, Rymo L.** Identification of intracellular proteins associated with the EBV-encoded nuclear antigen 5 using an efficient TAP procedure and FT-ICR mass spectrometry. *J Proteome Res*. **2008**;7(6):2309-19.
91. **Foufelle F, Ferré P.** Unfolded protein response: its role in physiology and physiopathology. *Med Sci (Paris)*. **2007**;23(3):291-6.
92. **Foveau B, Leroy C, Ancot F, Deheuninck J, Ji Z, Fafeur V, Tulasne D.** Amplification of apoptosis through sequential caspase cleavage of the MET tyrosine kinase receptor. *Cell Death Differ*. **2007**;14(4):752-64.
93. **Franken M, Devergne O, Rosenzweig M, Annis B, Kieff E, Wang F.** Comparative analysis identifies conserved tumor necrosis factor receptor-associated factor 3 binding sites in the human and simian Epstein-Barr virus oncogene LMP1. *J Virol*. **1996**;70(11):7819-26.
94. **Fries KL, Sculley TB, Webster-Cyriaque J, Rajadurai P, Sadler RH, Raab-Traub N.** Identification of a novel protein encoded by the BamHI A region of the Epstein-Barr virus. *J Virol*. **1997**;71(4):2765-71.
95. **Fujiwara S, Ono Y.** Isolation of Epstein-Barr virus-infected clones of the human T-cell line MT-2: use of recombinant viruses with a positive selection marker. *J Virol*. **1995**;69(6):3900-3.
96. **Fukuda M, Kurosaki W, Yanagihara K, Kuratsune H, Sairenji T.** A mechanism in Epstein-Barr virus oncogenesis: inhibition of transforming growth factor-beta 1-mediated induction of MAPK/p21 by LMP1. *Virology*. **2002**;302(2):310-20.
97. **Fukuda M, Longnecker R.** Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 2A regulates B-cell receptor-induced apoptosis and EBV reactivation through tyrosine phosphorylation. *J Virol*. **2005**;79(13):8655-60.
98. **Geiger TR, Martin JM.** The Epstein-Barr virus-encoded LMP-1 oncoprotein negatively affects Tyk2 phosphorylation and interferon signaling in human B cells. *J Virol*. **2006**;80(23):11638-50.
99. **Gires O, Zimmer-Strobl U, Gonnella R, Ueffing M, Marschall G, Zeidler R, Pich D, Hammerschmidt W.** Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J*. **1997**;16(20):6131-40.
100. **Gires O, Kohlhuber F, Kilger E, Baumann M, Kieser A, Kaiser C, Zeidler R, Scheffer B, Ueffing M, Hammerschmidt W.** Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J*. **1999**;18(11):3064-73.

101. **Goormachtigh G, Ouk TS, Mougél A, Tranchand-Bunel D, Masy E, Le Clorennec C, Feuillard J, Bornkamm GW, Auriault C, Manet E, Fafeur V, Adriaenssens E, Coll J.** Autoactivation of the Epstein-Barr virus oncogenic protein LMP1 during type II latency through opposite roles of the NF-kappaB and JNK signaling pathways. *J Virol.* **2006**;80(15):7382-93.
102. **Gosselin J, Flamand L, D'Addario M, Hiscott J, Menezes J.** Infection of peripheral blood mononuclear cells by herpes simplex and Epstein-Barr viruses. Differential induction of interleukin 6 and tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest.* **1992**;89(6):1849-56.
103. **Gosselin J, Menezes J, D'Addario M, Hiscott J, Flamand L, Lamoureux G, Oth D.** Inhibition of tumor necrosis factor-alpha transcription by Epstein-Barr virus. *Eur J Immunol.* **1991**;21(1):203-8.
104. **Grimm T, Schneider S, Naschberger E, Huber J, Guenzi E, Kieser A, Reitmeir P, Schulz TF, Morris CA, Stürzl M.** EBV latent membrane protein-1 protects B cells from apoptosis by inhibition of BAX. *Blood.* **2005**;105(8):3263-9.
105. **Groux H, Cottrez F, Montpellier C, Quatannens B, Coll J, Stehelin D, Auriault C.** Isolation and characterization of transformed human T-cell lines infected by Epstein-Barr virus. *Blood.* **1997**;89(12):4521-30.
106. **Greenspan JS, Greenspan D.** Oral hairy leukoplakia: diagnosis and management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* **1989**;67(4):396-403.
107. **Häcker H, Tseng PH, Karin M.** Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator. *Nat Rev Immunol.* **2011**;11(7):457-68.
108. **Hadinoto V, Shapiro M, Sun CC, Thorley-Lawson DA.** The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLoS Pathog.* **2009**;5(7):e1000496.
109. **Hammerschmidt W, Sugden B.** Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature.* **1989**;340(6232):393-7.
110. **Hammerschmidt W, Sugden B, Baichwal VR.** The transforming domain alone of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus is toxic to cells when expressed at high levels. *J Virol.* **1989**;63(6):2469-75.
111. **Han I, Harada S, Weaver D, Xue Y, Lane W, Orstavik S, Skalhegg B, Kieff E.** EBNA-LP associates with cellular proteins including DNA-PK and HA95. *J Virol.* **2001**;75(5):2475-81.
112. **Hau PM, Tsang CM, Yip YL, Huen MS, Tsao SW.** Id1 interacts and stabilizes the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) in nasopharyngeal epithelial cells. *PLoS One.* **2011**;6(6):e21176.
113. **He Z, Xin B, Yang X, Chan C, Cao L.** Nuclear factor-kappaB activation is involved in LMP1-mediated transformation and tumorigenesis of rat-1 fibroblasts. *Cancer Res.* **2000**;60(7):1845-8.
114. **Hebner C, Lasanen J, Battle S, Aiyar A.** The spacing between adjacent binding sites in the family of repeats affects the functions of Epstein-Barr nuclear antigen 1 in transcription activation and stable plasmid maintenance. *Virology.* **2003**;311(2):263-74.
115. **Henderson S, Rowe M, Gregory C, Croom-Carter D, Wang F, Longnecker R, Kieff E, Rickinson A.** Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell.* **1991**;65(7):1107-15.
116. **Henkel T, Ling PD, Hayward SD, Peterson MG.** Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science.* **1994**;265(5168):92-5.
117. **Henle G, Henle W, Diehl V.** Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1968**;59(1):94-101.

118. **Henle W, Henle G.** Evidence for a relation of Epstein-Barr virus to Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Bibl Haematol.* **1970**;(36):706-13.
119. **Hennessy K, Fennewald S, Hummel M, Cole T, Kieff E.** A membrane protein encoded by Epstein-Barr virus in latent growth-transforming infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1984**;81(22):7207-11.
120. **Higuchi M, Izumi KM, Kieff E.** 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.* **2001**;98(8):4675-80.
121. **Higuchi M, Kieff E, Izumi KM.** The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 putative Janus kinase 3 (JAK3) binding domain does not mediate JAK3 association or activation in B-lymphoma or lymphoblastoid cell lines. *J Virol.* **2002**;76(1):455-9.
122. **Hislop AD, Rensing ME, van Leeuwen D, Pudney VA, Horst D, Koppers-Lalic D, Croft NP, Neefjes JJ, Rickinson AB, Wiertz EJ.** A CD8+ T cell immune evasion protein specific to Epstein-Barr virus and its close relatives in Old World primates. *J Exp Med.* **2007**;204(8):1863-73.
123. **Hitt MM, Allday MJ, Hara T, Karran L, Jones MD, Busson P, Tursz T, Ernberg I, Griffin BE.** EBV gene expression in an NPC-related tumour. *EMBO J.* **1989**;8(9):2639-51.
124. **Hochberg D, Middeldorp JM, Catalina M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Thorley-Lawson DA.** Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2004**;101(1):239-44.
125. **Hong SY, Yoon WH, Park JH, Kang SG, Ahn JH, Lee TH.** Involvement of two NF-kappa B binding elements in tumor necrosis factor alpha -, CD40-, and epstein-barr virus latent membrane protein 1-mediated induction of the cellular inhibitor of apoptosis protein 2 gene. *J Biol Chem.* **2000**;275(24):18022-8.
126. **Horikawa T, Yoshizaki T, Sheen TS, Lee SY, Furukawa M.** Association of latent membrane protein 1 and matrix metalloproteinase 9 with metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer.* **2000**;89(4):715-23.
127. **Horikawa T, Yang J, Kondo S, Yoshizaki T, Joab I, Furukawa M, Pagano JS.** Twist and epithelial-mesenchymal transition are induced by the EBV oncoprotein latent membrane protein 1 and are associated with metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* **2007**;67(5):1970-8.
128. **Horikawa T, Yoshizaki T, Kondo S, Furukawa M, Kaizaki Y, Pagano JS.** Epstein-Barr Virus latent membrane protein 1 induces Snail and epithelial-mesenchymal transition in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Br J Cancer.* **2011**;104(7):1160-7.
129. **Hu LF, Zabarovsky ER, Chen F, Cao SL, Ernberg I, Klein G, Winberg G.** Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol.* **1991**;72 (Pt 10):2399-409.
130. **Hudson GS, Bankier AT, Satchwell SC, Barrell BG.** The short unique region of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Virology.* **1985**;147(1):81-98.
131. **Huen DS, Henderson SA, Croom-Carter D, Rowe M.** 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.* **1995**;10(3):549-60.
132. **Imai S, Nishikawa J, Takada K.** Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells. *J Virol.* **1998**;72(5):4371-8.

133. **Imai S, Sugiura M, Oikawa O, Koizumi S, Hirao M, Kimura H, Hayashibara H, Terai N, Tsutsumi H, Oda T, Chiba S, Osato T.** Epstein-Barr virus (EBV)-carrying and -expressing T-cell lines established from severe chronic active EBV infection. *Blood*. **1996**;87(4):1446-57.
134. **Izumi KM, Kaye KM, Kieff ED.** 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*. **1994**;68(7):4369-76.
135. **Izumi KM, Kaye KM, Kieff ED.** The Epstein-Barr virus LMP1 amino acid sequence that engages tumor necrosis factor receptor associated factors is critical for primary B lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1997**;94(4):1447-52.
136. **Izumi KM, Kieff ED.** The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1997**;94(23):12592-7.
137. **Izumi KM, Cahir McFarland ED, Riley EA, Rizzo D, Chen Y, Kieff E.** 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*. **1999**;73(12):9908-16.
138. **Jansson A, Johansson P, Li S, Rymo L.** Activity of the LMP1 gene promoter in Epstein-Barr virus-transformed cell lines is modulated by sequence variations in the promoter-proximal CRE site. *J Gen Virol*. **2007**;88(Pt 7):1887-94.
139. **Jansson A, Johansson P, Yang W, Palmqvist L, Sjöblom-Hallén A, Rymo L.** Role of a consensus AP-2 regulatory sequence within the Epstein-Barr virus LMP1 promoter in EBNA2 mediated transactivation. *Virus Genes*. **2007**;35(2):203-14.
140. **Jin XW, Speck SH.** Identification of critical cis elements involved in mediating Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-dependent activity of an enhancer located upstream of the viral BamHI C promoter. *J Virol*. **1992**;66(5):2846-52.
141. **Jin Z, El-Deiry WS.** Distinct signaling pathways in TRAIL- versus tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*. **2006**;26(21):8136-48.
142. **Johannsen E, Koh E, Mosialos G, Tong X, Kieff E, Grossman SR.** Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivation of the latent membrane protein 1 promoter is mediated by J kappa and PU.1. *J Virol*. **1995**;69(1):253-62.
143. **Johannsen E, Miller CL, Grossman SR, Kieff E.** EBNA-2 and EBNA-3C extensively and mutually exclusively associate with RBPJkappa in Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes. *J Virol*. **1996**;70(6):4179-83.
144. **Johansson P, Jansson A, Rüetschi U, Rymo L.** Nuclear factor-kappaB binds to the Epstein-Barr Virus LMP1 promoter and upregulates its expression. *J Virol*. **2009**;83(3):1393-401.
145. **Johnson DC, Baines JD.** Herpesviruses remodel host membranes for virus egress. *Nat Rev Microbiol*. **2011**;9(5):382-94.
146. **Kaiser C, Laux G, Eick D, Jochner N, Bornkamm GW, Kempkes B.** The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol*. **1999**;73(5):4481-4.
147. **Kanda T, Otter M, Wahl GM.** Coupling of mitotic chromosome tethering and replication competence in Epstein-Barr virus-based plasmids. *Mol Cell Biol*. **2001**;21(10):3576-88.

148. **Kanegane H, Wado T, Nunogami K, Seki H, Taniguchi N, Tosato G.** Chronic persistent Epstein-Barr virus infection of natural killer cells and B cells associated with granular lymphocytes expansion. *Br J Haematol.* **1996**;95(1):116-22.
149. **Kanegane H, Wang F, Tosato G.** Virus-cell interactions in a natural killer-like cell line from a patient with lymphoblastic lymphoma. *Blood.* **1996**;88(12):4667-75.
150. **Kang MS, Lu H, Yasui T, Sharpe A, Warren H, Cahir-McFarland E, Bronson R, Hung SC, Kieff E.** Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 does not induce lymphoma in transgenic FVB mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2005**;102(3):820-5.
151. **Kapatai G, Murray P.** Contribution of the Epstein Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *J Clin Pathol.* **2007**;60(12):1342-9.
152. **Karin M, Ben-Neriah Y.** Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol.* **2000**;18:621-63.
153. **Kashuba E, Mattsson K, Pokrovskaja K, Kiss C, Protopopova M, Ehlin-Henriksson B, Klein G, Szekely L.** EBV-encoded EBNA-5 associates with P14ARF in extranucleolar inclusions and prolongs the survival of P14ARF-expressing cells. *Int J Cancer.* **2003** Jul 10;105(5):644-53.
154. **Kawaguchi Y, Nakajima K, Igarashi M, Morita T, Tanaka M, Suzuki M, Yokoyama A, Matsuda G, Kato K, Kanamori M, Hirai K.** Interaction of Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein (EBNA-LP) with HS1-associated protein X-1: implication of cytoplasmic function of EBNA-LP. *J Virol.* **2000**;74(21):10104-11.
155. **Kaye KM, Izumi KM, Kieff E.** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1993**;90(19):9150-4.
156. **Kaye KM, Izumi KM, Mosialos G, Kieff E.** The Epstein-Barr virus LMP1 cytoplasmic carboxy terminus is essential for B-lymphocyte transformation; fibroblast cocultivation complements a critical function within the terminal 155 residues. *J Virol.* **1995**;69(2):675-83.
157. **Kaye KM, Devergne O, Harada JN, Izumi KM, Yalamanchili R, Kieff E, Mosialos G.** Tumor necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF-kappa B activation by latent infection membrane protein 1, the Epstein-Barr virus transforming protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1996**;93(20):11085-90.
158. **Kaye KM, Izumi KM, Li H, Johannsen E, Davidson D, Longnecker R, Kieff E.** An Epstein-Barr virus that expresses only the first 231 LMP1 amino acids efficiently initiates primary B-lymphocyte growth transformation. *J Virol.* **1999**;73(12):10525-30.
159. **Kaykas A, Sugden B.** The amino-terminus and membrane-spanning domains of LMP-1 inhibit cell proliferation. *Oncogene.* **2000**;19(11):1400-10.
160. **Kaykas A, Worringer K, Sugden B.** CD40 and LMP-1 both signal from lipid rafts but LMP-1 assembles a distinct, more efficient signaling complex. *EMBO J.* **2001**;20(11):2641-54.
161. **Kennedy G, Komano J, Sugden B.** Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2003**;100(24):14269-74.
162. **Kieff ED, Rickinson AB.** Epstein-Barr Virus and its replication. In Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields Virology*, 5th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. **2007**;Chapter 68A:2603-54.
163. **Kieser A, Kaiser C, Hammerschmidt W.** LMP1 signal transduction differs substantially from TNF receptor 1 signaling in the molecular functions of TRADD and TRAF2. *EMBO J.* **1999**;18(9):2511-21.

164. **Kilger E, Kieser A, Baumann M, Hammerschmidt W.** Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J.* **1998**;17(6):1700-9.
165. **Kim KR, Yoshizaki T, Miyamori H, Hasegawa K, Horikawa T, Furukawa M, Harada S, Seiki M, Sato H.** Transformation of Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) induces expression of Ets1 and invasive growth. *Oncogene.* **2000**;19(14):1764-71.
166. **Kimura H, Nishikawa K, Hoshino Y, Sofue A, Nishiyama Y, Morishima T.** Monitoring of cell-free viral DNA in primary Epstein-Barr virus infection. *Med Microbiol Immunol.* **2000**;188(4):197-202.
167. **Kis LL, Takahara M, Nagy N, Klein G, Klein E.** IL-10 can induce the expression of EBV-encoded latent membrane protein-1 (LMP-1) in the absence of EBNA-2 in B lymphocytes and in Burkitt lymphoma- and NK lymphoma-derived cell lines. *Blood.* **2006**;107(7):2928-35.
168. **Kitagawa N, Goto M, Kurozumi K, Maruo S, Fukayama M, Naoe T, Yasukawa M, Hino K, Suzuki T, Todo S, Takada K.** Epstein-Barr virus-encoded poly(A)(-) RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction. *EMBO J.* **2000**;19(24):6742-50.
169. **Knutson JC.** The level of c-fgr RNA is increased by EBNA-2, an Epstein-Barr virus gene required for B-cell immortalization. *J Virol.* **1990**;64(6):2530-6.
170. **Komano J, Maruo S, Kurozumi K, Oda T, Takada K.** Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J Virol.* **1999**;73(12):9827-31.
171. **Kondo S, Yoshizaki T, Wakisaka N, Horikawa T, Muroso S, Jang KL, Joab I, Furukawa M, Pagano JS.** MUC1 induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 causes dissociation of the cell-matrix interaction and cellular invasiveness via STAT signaling. *J Virol.* **2007**;81(4):1554-62.
172. **Kulathu Y, Akutsu M, Bremm A, Hofmann K, Komander D.** Two-sided ubiquitin binding explains specificity of the TAB2 NZF domain. *Nat Struct Mol Biol.* **2009**;16(12):1328-30.
173. **Kung CP, Raab-Traub N.** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 modulates distinctive NF- κ B pathways through C-terminus-activating region 1 to regulate epidermal growth factor receptor expression. *J Virol.* **2010**;84(13):6605-14.
174. **Kurth J, Spieker T, Wustrow J, Strickler GJ, Hansmann LM, Rajewsky K, Küppers R.** EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: viral strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency. *Immunity.* **2000**;13(4):485-95.
175. **Kusano S, Raab-Traub N.** An Epstein-Barr virus protein interacts with Notch. *J Virol.* **2001**;75(1):384-95.
176. **Laherty CD, Hu HM, Oipari AW, Wang F, Dixit VM.** The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J Biol Chem.* **1992**;267(34):24157-60.
177. **Laichalk LL, Thorley-Lawson DA.** Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J Virol.* **2005**;79(2):1296-307.
178. **Lam N, Sugden B.** LMP1, a viral relative of the TNF receptor family, signals principally from intracellular compartments. *EMBO J.* **2003**;22(12):3027-38.
179. **Lam N, Sandberg ML, Sugden B.** High physiological levels of LMP1 result in phosphorylation of eIF2 alpha in Epstein-Barr virus-infected cells. *J Virol.* **2004**;78(4):1657-64.
180. **Lamb JA, Ventura JJ, Hess P, Flavell RA, Davis RJ.** JunD mediates survival signaling by the JNK signal transduction pathway. *Mol Cell.* **2003**;11(6):1479-89.

181. **Lambert SL, Martinez OM.** Latent membrane protein 1 of EBV activates phosphatidylinositol 3-kinase to induce production of IL-10. *J Immunol.* **2007**;179(12):8225-34.
182. **Larochelle B, Flamand L, Gourde P, Beauchamp D, Gosselin J.** Epstein-Barr virus infects and induces apoptosis in human neutrophils. *Blood.* **1998**;92(1):291-9.
183. **Laux G, Adam B, Strobl LJ, Moreau-Gachelin F.** The Spi-1/PU.1 and Spi-B ets family transcription factors and the recombination signal binding protein RBP-J kappa interact with an Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 responsive cis-element. *EMBO J.* **1994**;13(23):5624-32.
184. **Laux G, Dugrillon F, Eckert C, Adam B, Zimmer-Strobl U, Bornkamm GW.** Identification and characterization of an Epstein-Barr virus nuclear antigen 2-responsive cis element in the bidirectional promoter region of latent membrane protein and terminal protein 2 genes. *J Virol.* **1994**;68(11):6947-58.
185. **Le Clorenec C, Youlyouz-Marfak I, Adriaenssens E, Coll J, Bornkamm GW, Feuillard J.** EBV latency III immortalization program sensitizes B cells to induction of CD95-mediated apoptosis via LMP1: role of NF-kappaB, STAT1, and p53. *Blood.* **2006**;107(5):2070-8.
186. **Le Clorenec C, Ouk TS, Youlyouz-Marfak I, Panteix S, Martin CC, Rastelli J, Adriaenssens E, Zimmer-Strobl U, Coll J, Feuillard J, Jayat-Vignoles C.** 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.* **2008**;82(13):6721-33.
187. **Lee DY, Sugden B.** The LMP1 oncogene of EBV activates PERK and the unfolded protein response to drive its own synthesis. *Blood.* **2008**;111(4):2280-9.
188. **Lee ES, Locker J, Nalesnik M, Reyes J, Jaffe R, Alashari M, Nour B, Tzakis A, Dickman PS.** The association of Epstein-Barr virus with smooth-muscle tumors occurring after organ transplantation. *N Engl J Med.* **1995**;332(1):19-25.
189. **Le Roux A, Kerdiles B, Walls D, Dedieu JF, Perricaudet M.** The Epstein-Barr virus determined nuclear antigens EBNA-3A, -3B, and -3C repress EBNA-2-mediated transactivation of the viral terminal protein 1 gene promoter. *Virology.* **1994**;205(2):596-602.
190. **Li HM, Zhuang ZH, Wang Q, Pang JC, Wang XH, Wong HL, Feng HC, Jin DY, Ling MT, Wong YC, Eliopoulos AG, Young LS, Huang DP, Tsao SW.** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) upregulates Id1 expression in nasopharyngeal epithelial cells. *Oncogene.* **2004**;23(25):4488-94.
191. **Li HP, Chang YS.** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1: structure and functions. *J Biomed Sci.* **2003**;10(5):490-504.
192. **Li L, Guo L, Tao Y, Zhou S, Wang Z, Luo W, Hu D, Li Z, Xiao L, Tang M, Yi W, Tsao SW, Cao Y.** Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus regulates p53 phosphorylation through MAP kinases. *Cancer Lett.* **2007**;255(2):219-31.
193. **Liu LT, Peng JP, Chang HC, Hung WC.** RECK is a target of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *Oncogene.* **2003**;22(51):8263-70.
194. **Li SN, Chang YS, Liu ST.** Effect of a 10-amino acid deletion on the oncogenic activity of latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *Oncogene.* **1996**;12(10):2129-35.
195. **Liao G, Zhang M, Harhaj EW, Sun SC.** Regulation of the NF-kappaB-inducing kinase by tumor necrosis factor receptor-associated factor 3-induced degradation. *J Biol Chem.* **2004**;279(25):26243-50.
196. **Lindhout E, Lakeman A, Mevissen ML, de Groot C.** Functionally active Epstein-Barr virus-transformed follicular dendritic cell-like cell lines. *J Exp Med.* **1994**;179(4):1173-84.

197. **Lindner SE, Sugden B.** The plasmid replicon of Epstein-Barr virus: mechanistic insights into efficient, licensed, extrachromosomal replication in human cells. *Plasmid*. **2007**;58(1):1-12.
198. **Ling PD, Peng RS, Nakajima A, Yu JH, Tan J, Moses SM, Yang WH, Zhao B, Kieff E, Bloch KD, Bloch DB.** Mediation of Epstein-Barr virus EBNA-LP transcriptional coactivation by Sp100. *EMBO J*. **2005**;24(20):3565-75.
199. **Ling PD, Ryon JJ, Hayward SD.** EBNA-2 of herpesvirus papio diverges significantly from the type A and B EBNA-2 proteins of Epstein-Barr virus but retains an efficient transactivation domain with a conserved hydrophobic motif. *J Virol*. **1993**;67(6):2990-3003.
200. **Liu MT, Chen YR, Chen SC, Hu CY, Lin CS, Chang YT, Wang WB, Chen JY.** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces micronucleus formation, represses DNA repair and enhances sensitivity to DNA-damaging agents in human epithelial cells. *Oncogene*. **2004**;23(14):2531-9.
201. **Liu MT, Chang YT, Chen SC, Chuang YC, Chen YR, Lin CS, Chen JY.** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 represses p53-mediated DNA repair and transcriptional activity. *Oncogene*. **2005**;24(16):2635-46.
202. **Lo AK, To KF, Lo KW, Lung RW, Hui JW, Liao G, Hayward SD.** Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2007**;104(41):16164-9.
203. **Lo AK, Dawson CW, Lo KW, Yu Y, Young LS.** Upregulation of Id1 by Epstein-Barr virus-encoded LMP1 confers resistance to TGFbeta-mediated growth inhibition. *Mol Cancer*. **2010**;9:155.
204. **Longnecker R.** Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence? *Adv Cancer Res*. **2000**;79:175-200.
205. **Longnecker R, Neipel F.** Introduction to the human γ -herpesviruses. In Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K, editors. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge: Cambridge University Press. **2007**;Chapter 22.
206. **Lu J, Chua HH, Chen SY, Chen JY, Tsai CH.** Regulation of matrix metalloproteinase-1 by Epstein-Barr virus proteins. *Cancer Res*. **2003**;63(1):256-62.
207. **Luftig M, Prinarakis E, Yasui T, Tsihritzis T, Cahir-McFarland E, Inoue J, Nakano H, Mak TW, Yeh WC, Li X, Akira S, Suzuki N, Suzuki S, Mosialos G, Kieff E.** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activation of NF-kappaB through IRAK1 and TRAF6. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2003**;100(26):15595-600.
208. **Luftig M, Yasui T, Soni V, Kang MS, Jacobson N, Cahir-McFarland E, Seed B, Kieff E.** 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*. **2004**;101(1):141-6.
209. **Lung RW, Tong JH, Sung YM, Leung PS, Ng DC, Chau SL, Chan AW, Ng EK, Lo KW, To KF.** Modulation of LMP2A expression by a newly identified Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART22. *Neoplasia*. **2009**;11(11):1174-84.
210. **Macsween KF, Crawford DH.** Epstein-Barr virus-recent advances. *Lancet Infect Dis*. **2003**;3(3):131-40.
211. **Mainou BA, Everly DN Jr, Raab-Traub N.** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 CTAR1 mediates rodent and human fibroblast transformation through activation of PI3K. *Oncogene*. **2005**;24(46):6917-24.
212. **Mainou BA, Everly DN Jr, Raab-Traub N.** Unique signaling properties of CTAR1 in LMP1-mediated transformation. *J Virol*. **2007**;81(18):9680-92.
213. **Mancao C, Hammerschmidt W.** Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival. *Blood*. **2007**;110(10):3715-21.

214. **Mannick JB, Cohen JI, Birkenbach M, Marchini A, Kieff E.** The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation. *J Virol.* **1991**;65(12):6826-37.
215. **Marechal V, Dehee A, Chikhi-Brachet R, Piolot T, Coppey-Moisan M, Nicolas JC.** Mapping EBNA-1 domains involved in binding to metaphase chromosomes. *J Virol.* **1999**;73(5):4385-92.
216. **Maréchal V, Piolot T.** Lytic infection by double-strand DNA viruses and cell cycle alterations. *Pathol Biol (Paris).* **2000**;48(3):289-300.
217. **Martin J, Sugden B.** The latent membrane protein oncoprotein resembles growth factor receptors in the properties of its turnover. *Cell Growth Differ.* **1991**;2(12):653-600.
218. **Masy E, Adriaenssens E, Montpellier C, Crépieux P, Mougel A, Quatannens B, Goormachtigh G, Faumont N, Meggetto F, Auriault C, Groux H, Coll J.** Human monocytic cell lines transformed in vitro by Epstein-Barr virus display a type II latency and LMP-1-dependent proliferation. *J Virol.* **2002**;76(13):6460-72.
219. **McCann EM, Kelly GL, Rickinson AB, Bell AI.** Genetic analysis of the Epstein-Barr virus-coded leader protein EBNA-LP as a co-activator of EBNA2 function. *J Gen Virol.* **2001**;82(Pt 12):3067-79.
220. **McClain KL, Leach CT, Jenson HB, Joshi VV, Pollock BH, Parmley RT, DiCarlo FJ, Chadwick EG, Murphy SB.** Association of Epstein-Barr virus with leiomyosarcomas in children with AIDS. *N Engl J Med.* **1995**;332(1):12-8.
221. **McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA.** Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta.* **2007**;1773(8):1263-84.
222. **Meckes DG Jr, Shair KH, Marquitz AR, Kung CP, Edwards RH, Raab-Traub N.** Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2010**;107(47):20370-5.
223. **Mehl AM, Fischer N, Rowe M, Hartmann F, Daus H, Trümper L, Pfreundschuh M, Müller-Lantzsch N, Grässer FA.** Isolation and analysis of two strongly transforming isoforms of the Epstein-Barr-Virus(EBV)-encoded latent membrane protein-1 (LMP1) from a single Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer.* **1998**;76(2):194-200.
224. **Menet A, Speth C, Larcher C, Prodinger WM, Schwendinger MG, Chan P, Jäger M, Schwarzmann F, Recheis H, Fontaine M, Dierich MP.** Epstein-Barr virus infection of human astrocyte cell lines. *J Virol.* **1999**;73(9):7722-33.
225. **Middeldorp JM, Brink AA, van den Brule AJ, Meijer CJ.** Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit Rev Oncol Hematol.* **2003**;45(1):1-36.
226. **Miller CL, Lee JH, Kieff E, Longnecker R.** An integral membrane protein (LMP2) blocks reactivation of Epstein-Barr virus from latency following surface immunoglobulin crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1994**;91(2):772-6.
227. **Miller G, Shope T, Coope D, Waters L, Pagano J, Bornkamm G, Henle W.** Lymphoma in cotton-top marmosets after inoculation with Epstein-Barr virus: tumor incidence, histologic spectrum antibody responses, demonstration of viral DNA, and characterization of viruses. *J Exp Med.* **1977**;145(4):948-67.
228. **Molesworth SJ, Lake CM, Borza CM, Turk SM, Hutt-Fletcher LM.** 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.* **2000**;74(14):6324-32.

229. **Montpellier C, Crepieux P, Quatannens B, Delobel B, Croquette M, Stehelin D, Auriault C, Groux H, Coll J.** Homologous T and B cells immortalized in vitro by the Epstein-Barr virus exhibit differential genetical and functional features. *Int J Oncol.* **1997**;11(1):87-96.
230. **Moorthy R, Thorley-Lawson DA.** Processing of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein p63/LMP. *J Virol.* **1990**;64(2):829-37.
231. **Moorthy RK, Thorley-Lawson DA.** All three domains of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein LMP-1 are required for transformation of rat-1 fibroblasts. *J Virol.* **1993**;67(3):1638-46.
232. **Moorthy RK, Thorley-Lawson DA.** Biochemical, genetic, and functional analyses of the phosphorylation sites on the Epstein-Barr virus-encoded oncogenic latent membrane protein LMP-1. *J Virol.* **1993**;67(5):2637-45.
233. **Mori N, Morishita M, Tsukazaki T, Yamamoto N.** Repression of Smad-dependent transforming growth factor-beta signaling by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 through nuclear factor-kappaB. *Int J Cancer.* **2003**;105(5):661-8.
234. **Morita Y, Kanei-Ishii C, Nomura T, Ishii S.** TRAF7 sequesters c-Myb to the cytoplasm by stimulating its sumoylation. *Mol Biol Cell.* **2005**;16(11):5433-44.
235. **Morris MA, Dawson CW, Wei W, O'Neil JD, Stewart SE, Jia J, Bell AI, Young LS, Arrand JR.** Epstein-Barr virus-encoded LMP1 induces a hyperproliferative and inflammatory gene expression programme in cultured keratinocytes. *J Gen Virol.* **2008**;89 (Pt 11):2806-20.
236. **Mosialos G, Birkenbach M, Yalamanchili R, VanArsdale T, Ware C, Kieff E.** The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell.* **1995**;80(3):389-99.
237. **Muppidi JR, Tschopp J, Siegel RM.** Life and death decisions: secondary complexes and lipid rafts in TNF receptor family signal transduction. *Immunity.* **2004**;21(4):461-5.
238. **Murono S, Inoue H, Tanabe T, Joab I, Yoshizaki T, Furukawa M, Pagano JS.** Induction of cyclooxygenase-2 by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is involved in vascular endothelial growth factor production in nasopharyngeal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2001**;98(12):6905-10.
239. **Murono S, Yoshizaki T, Sato H, Takeshita H, Furukawa M, Pagano JS.** Aspirin inhibits tumor cell invasiveness induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 through suppression of matrix metalloproteinase-9 expression. *Cancer Res.* **2000**;60(9):2555-61.
240. **Najjar I, Baran-Marszak F, Le Clorennec C, Laguillier C, Schischmanoff O, Youlyouz-Marfak I, Schlee M, Bornkamm GW, Raphaël M, Feuillard J, Fagard R.** Latent membrane protein 1 regulates STAT1 through NF-kappaB-dependent interferon secretion in Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J Virol.* **2005**;79(8):4936-43.
241. **Nakayama T, Hieshima K, Nagakubo D, Sato E, Nakayama M, Kawa K, Yoshie O.** Selective induction of Th2-attracting chemokines CCL17 and CCL22 in human B cells by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *J Virol.* **2004**;78(4):1665-74.
242. **Ndour PA, Ouk TS, Brocqueville G, Mougel A, Vanhecke E, Feuillard J, Coll J, Adriaenssens E.** Inhibition of tumor necrosis factor-induced phenotypes by short intracellular versions of latent membrane protein-1. *Cell Signal.* **2010**;22(2):303-13.
243. **Nemerow GR, Mold C, Schwend VK, Tollefson V, Cooper NR.** Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediated attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol.* **1987**;61(5):1416-20.

244. **Niederman JC, McCollum RW, Henle G, Henle W.** Infectious mononucleosis. Clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA*. **1968**;203(3):205-9.
245. **Ning S, Hahn AM, Huye LE, Pagano JS.** Interferon regulatory factor 7 regulates expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1: a regulatory circuit. *J Virol*. **2003**;77(17):9359-68.
246. **Nitsche F, Bell A, Rickinson A.** 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*. **1997**;71(9):6619-28.
247. **Nitta T, Chiba A, Yamashita A, Rowe M, Israël A, Reth M, Yamamoto N, Yamaoka S.** NF-kappaB is required for cell death induction by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *Cell Signal*. **2003**;15(4):423-33.
248. **Ohtani N, Brennan P, Gaubatz S, Sanij E, Hertzog P, Wolvetang E, Ghysdael J, Rowe M, Hara E.** Epstein-Barr virus LMP1 blocks p16INK4a-RB pathway by promoting nuclear export of E2F4/5. *J Cell Biol*. **2003**;162(2):173-83.
249. **Okudaira T, Yamamoto K, Kawakami H, Uchihara JN, Tomita M, Masuda M, Matsuda T, Sairenji T, Iha H, Jeang KT, Matsuyama T, Takasu N, Mori N.** Transactivation of CCL20 gene by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *Br J Haematol*. **2006**;132(3):293-302.
250. **Overmeyer JH, Maltese WA.** Death pathways triggered by activated Ras in cancer cells. *Front Biosci*. **2011**;16:1693-713.
251. **Pai S, Khanna R.** Role of LMP1 in immune control of EBV infection. *Semin Cancer Biol*. **2001**;11(6):455-60.
252. **Pandya J, Walling DM.** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP-1) half-life in epithelial cells is down-regulated by lytic LMP-1. *J Virol*. **2004**;78(15):8404-10.
253. **Pandya J, Walling DM.** Oncogenic activity of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP-1) is down-regulated by lytic LMP-1. *J Virol*. **2006**;80(16):8038-46.
254. **Park JH, Faller DV.** Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 induction by histone deacetylase inhibitors mediates induction of intercellular adhesion molecule-1 expression and homotypic aggregation. *Virology*. **2002**;303(2):345-63.
255. **Parker GA, Touitou R, Allday MJ.** Epstein-Barr virus EBNA3C can disrupt multiple cell cycle checkpoints and induce nuclear division divorced from cytokinesis. *Oncogene*. **2000**;19(5):700-9.
256. **Pegtel DM, Middeldorp J, Thorley-Lawson DA.** Epstein-Barr virus infection in ex vivo tonsil epithelial cell cultures of asymptomatic carriers. *J Virol*. **2004**;78(22):12613-24.
257. **Peter ME, Budd RC, Desbarats J, Hedrick SM, Hueber AO, Newell MK, Owen LB, Pope RM, Tschopp J, Wajant H, Wallach D, Wiltrout RH, Zörnig M, Lynch DH.** The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell*. **2007**;129(3):447-50.
258. **Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, John B, Enright AJ, Marks D, Sander C, Tuschl T.** Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*. **2004**;304(5671):734-6.
259. **Pope JH, Horne MK, Scott W.** Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *Int J Cancer*. **1968**;3(6):857-66.
260. **Prokova V, Mosialos G, Kardassis D.** Inhibition of transforming growth factor beta signaling and Smad-dependent activation of transcription by the Latent Membrane Protein 1 of Epstein-Barr virus. *J Biol Chem*. **200**;277(11):9342-50.
261. **Qu L, Rowe DT.** Epstein-Barr virus latent gene expression in uncultured peripheral blood lymphocytes. *J Virol*. **1992**;66(6):3715-24.

262. **Radkov SA, Bain M, Farrell PJ, West M, Rowe M, Allday MJ.** Epstein-Barr virus EBNA3C represses Cp, the major promoter for EBNA expression, but has no effect on the promoter of the cell gene CD21. *J Virol.* **1997**;71(11):8552-62.
263. **Radkov SA, Touitou R, Brehm A, Rowe M, West M, Kouzarides T, Allday MJ.** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with histone deacetylase to repress transcription. *J Virol.* **1999**;73(7):5688-97.
264. **Repic AM, Shi M, Scott RS, Sixbey JW.** Augmented latent membrane protein 1 expression from Epstein-Barr virus episomes with minimal terminal repeats. *J Virol.* **2010**;84(5):2236-44.
265. **Revoltella RP, Vigneti E, Fruscalzo A, Park M, Ragona G, Rocchi G, Calef E.** Epstein-Barr virus DNA sequences in precursor monocyte-macrophage cell lines established from the bone marrow of children with maturation defects of haematopoiesis. *J Gen Virol.* **1989**;70 (Pt 5):1203-15.
266. **Rickinson AB, Kieff E.** Epstein-Barr Virus. In Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE, editors. *Fields Virology*, 5th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. **2007**;Chapter 68B:2655-700.
267. **Roberts ML, Cooper NR.** Activation of a ras-MAPK-dependent pathway by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for cellular transformation. *Virology.* **1998**;240(1):93-9.
268. **Robertson ES, Grossman S, Johannsen E, Miller C, Lin J, Tomkinson B, Kieff E.** Epstein-Barr virus nuclear protein 3C modulates transcription through interaction with the sequence-specific DNA-binding protein J kappa. *J Virol.* **1995**;69(5):3108-16.
269. **Robertson ES, Lin J, Kieff E.** The amino-terminal domains of Epstein-Barr virus nuclear proteins 3A, 3B, and 3C interact with RBPJ(kappa). *J Virol.* **1996**;70(5):3068-74.
270. **Rogatsch H, Bonatti H, Menet A, Larcher C, Feichtinger H, Dirnhofner S.** Epstein-Barr virus-associated multicentric leiomyosarcoma in an adult patient after heart transplantation: case report and review of the literature. *Am J Surg Pathol.* **2000**;24(4):614-21.
271. **Rothenberger S, Burns K, Rousseaux M, Tschopp J, Bron C.** Ubiquitination of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 depends on the integrity of the TRAF binding site. *Oncogene.* **2003**;22(36):5614-8.
272. **Rowe M, Young LS, Cadwallader K, Petti L, Kieff E, Rickinson AB.** Distinction between Epstein-Barr virus type A (EBNA 2A) and type B (EBNA 2B) isolates extends to the EBNA 3 family of nuclear proteins. *J Virol.* **1989**;63(3):1031-9.
273. **Rowe M, Khanna R, Jacob CA, Arguet V, Kelly A, Powis S, Belich M, Croom-Carter D, Lee S, Burrows SR, et al.** Restoration of endogenous antigen processing in Burkitt's lymphoma cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1: coordinate up-regulation of peptide transporters and HLA-class I antigen expression. *Eur J Immunol.* **1995**;25(5):1374-84.
274. **Ruf IK, Rhyne PW, Yang C, Cleveland JL, Sample JT.** Epstein-Barr virus small RNAs potentiate tumorigenicity of Burkitt lymphoma cells independently of an effect on apoptosis. *J Virol.* **2000**;74(21):10223-8.
275. **Rym BM, Mourad M, Bechir Z, Dalenda E, Faika C, Iadh AM, Amel BO.** Erythroderma in adults: a report of 80 cases. *Int J Dermatol.* **2005**;44(9):731-5.
276. **Sadler RH, Raab-Traub N.** Structural analyses of the Epstein-Barr virus BamHI A transcripts. *J Virol.* **1995**;69(2):1132-41.

277. **Sadler RH, Raab-Traub N.** The Epstein-Barr virus 3.5-kilobase latent membrane protein 1 mRNA initiates from a TATA-Less promoter within the first terminal repeat. *J Virol.* **1995**;69(7):4577-81.
278. **Saha A, Murakami M, Kumar P, Bajaj B, Sims K, Robertson ES.** Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C augments Mdm2-mediated p53 ubiquitination and degradation by deubiquitinating Mdm2. *J Virol.* **2009**;83(9):4652-69.
279. **Sample J, Young L, Martin B, Chatman T, Kieff E, Rickinson A, Kieff E.** Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J Virol.* **1990**;64(9):4084-92.
280. **Sandberg M, Hammerschmidt W, Sugden B.** Characterization of LMP-1's association with TRAF1, TRAF2, and TRAF3. *J Virol.* **1997**;71(6):4649-56.
281. **Sandberg ML, Kaykas A, Sugden B.** Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus inhibits as well as stimulates gene expression. *J Virol.* **2000**;74(20):9755-61.
282. **Saridakis V, Sheng Y, Sarkari F, Holowaty MN, Shire K, Nguyen T, Zhang RG, Liao J, Lee W, Edwards AM, Arrowsmith CH, Frappier L.** Structure of the p53 binding domain of HAUSP/USP7 bound to Epstein-Barr nuclear antigen 1 implications for EBV-mediated immortalization. *Mol Cell.* **2005**;18(1):25-36.
283. **Savard M, Bélanger C, Tardif M, Gourde P, Flamand L, Gosselin J.** Infection of primary human monocytes by Epstein-Barr virus. *J Virol.* **2000**;74(6):2612-9.
284. **Schaefer BC, Strominger JL, Speck SH.** Host-cell-determined methylation of specific Epstein-Barr virus promoters regulates the choice between distinct viral latency programs. *Mol Cell Biol.* **1997**;17(1):364-77.
285. **Schneider F, Neugebauer J, Griese J, Liefold N, Kutz H, Briseño C, Kieser A.** The viral oncoprotein LMP1 exploits TRADD for signaling by masking its apoptotic activity. *PLoS Biol.* **2008**;6(1):e8.
286. **Schultheiss U, Püschner S, Kremmer E, Mak TW, Engelmann H, Hammerschmidt W, Kieser A.** TRAF6 is a critical mediator of signal transduction by the viral oncogene latent membrane protein 1. *EMBO J.* **2001**;20(20):5678-91.
287. **Shair KH, Schnegg CI, Raab-Traub N.** EBV latent membrane protein 1 effects on plakoglobin, cell growth, and migration. *Cancer Res.* **2008**;68(17):6997-7005.
288. **Shannon-Lowe CD, Neuhierl B, Baldwin G, Rickinson AB, Delecluse HJ.** Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2006**;103(18):7065-70.
289. **Shannon-Lowe C, Rowe M.** Epstein-Barr virus infection of polarized epithelial cells via the basolateral surface by memory B cell-mediated transfer infection. *PLoS Pathog.* **2011**;7(5):e1001338.
290. **Sharma SV, Gajowniczek P, Way IP, Lee DY, Jiang J, Yuza Y, Classon M, Haber DA, Settleman J.** A common signaling cascade may underlie "addiction" to the Src, BCR-ABL, and EGF receptor oncogenes. *Cancer Cell.* **2006**;10(5):425-35.
291. **Sharma SV, Settleman J.** Exploiting the balance between life and death: targeted cancer therapy and "oncogenic shock". *Biochem Pharmacol.* **2010**;80(5):666-73.
292. **Sharp TV, Schwemmle M, Jeffrey I, Laing K, Mellor H, Proud CG, Hilse K, Clemens MJ.** Comparative analysis of the regulation of the interferon-inducible protein kinase PKR by Epstein-Barr virus RNAs EBER-1 and EBER-2 and adenovirus VAI RNA. *Nucleic Acids Res.* **1993**;21(19):4483-90.
293. **Shibuya H, Yamaguchi K, Shirakabe K, Tonegawa A, Gotoh Y, Ueno N, Irie K, Nishida E, Matsumoto K.** TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science.* **1996** May 24;272(5265):1179-82.

294. **Shimakage M, Kimura M, Yanoma S, Ibe M, Yokota S, Tsujino G, Kozuka T, Dezawa T, Tamura S, Ohshima A, Yutsudo M, Hakura A.** Expression of latent and replicative-infection genes of Epstein-Barr virus in macrophage. *Arch Virol.* **1999**;144(1):157-66.
295. **Sides MD, Klingsberg RC, Shan B, Gordon KA, Nguyen HT, Lin Z, Takahashi T, Flemington EK, Lasky JA.** The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and transforming growth factor- β 1 synergistically induce epithelial--mesenchymal transition in lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **2011**;44(6):852-62.
296. **Siegler G, Meyer B, Dawson C, Brachtel E, Lennerz J, Koch C, Kremmer E, Niedobitek E, Gonnella R, Pilch BZ, Young LS, Niedobitek G.** Expression of tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 in nasopharyngeal carcinoma: possible upregulation by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *Int J Cancer.* **2004**;112(2):265-72.
297. **Sinclair AJ, Farrell PJ.** Host cell requirements for efficient infection of quiescent primary B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *J Virol.* **1995**;69(9):5461-8.
298. **Sinclair AJ, Palmero I, Peters G, Farrell PJ.** EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *EMBO J.* **1994**;13(14):3321-8.
299. **Sixbey JW, Yao QY.** Immunoglobulin A-induced shift of Epstein-Barr virus tissue tropism. *Science.* **1992**;255(5051):1578-80.
300. **Sjöblom A, Jansson A, Yang W, Laín S, Nilsson T, Rymo L.** PU box-binding transcription factors and a POU domain protein cooperate in the Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2-induced transactivation of the EBV latent membrane protein 1 promoter. *J Gen Virol.* **1995**;76 (Pt 11):2679-92.
301. **Sjöblom A, Nerstedt A, Jansson A, Rymo L.** Domains of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) involved in the transactivation of the latent membrane protein 1 and the EBNA Cp promoters. *J Gen Virol.* **1995**;76 (Pt 11):2669-78.
302. **Sjöblom A, Yang W, Palmqvist L, Jansson A, Rymo L.** An ATF/CRE element mediates both EBNA2-dependent and EBNA2-independent activation of the Epstein-Barr virus LMP1 gene promoter. *J Virol.* **1998**;72(2):1365-76.
303. **Smith PR, Gao Y, Karran L, Jones MD, Snudden D, Griffin BE.** Complex nature of the major viral polyadenylated transcripts in Epstein-Barr virus-associated tumors. *J Virol.* **1993**;67(6):3217-25.
304. **Song YJ, Jen KY, Soni V, Kieff E, Cahir-McFarland E.** 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.* **2006** ;103(8):2689-94.
305. **Soni V, Cahir-McFarland E, Kieff E.** LMP1 TRAFficking activates growth and survival pathways. *Adv Exp Med Biol.* **2007**;597:173-87.
306. **Soni V, Yasui T, Cahir-McFarland E, Kieff E.** LMP1 transmembrane domain 1 and 2 (TM1-2) FWLY mediates intermolecular interactions with TM3-6 to activate NF-kappaB. *J Virol.* **2006**;80(21):10787-93.
307. **Speck P, Haan KM, Longnecker R.** Epstein-Barr virus entry into cells. *Virology.* **2000**;277(1):1-5.
308. **Speck P, Longnecker R.** Infection of breast epithelial cells with Epstein-Barr virus via cell-to-cell contact. *J Natl Cancer Inst.* **2000**;92(22):1849-51.
309. **Strauss SE, Cohen JI, Tosato G, Meier J.** NIH conference. Epstein-Barr virus infections :biology, pathogenesis, and management. *Ann Intern Med.* **1993**;118(1):45-58.

310. **Strowig T, Brilot F, Arrey F, Bougras G, Thomas D, Muller WA, Münz C.** Tonsillar NK cells restrict B cell transformation by the Epstein-Barr virus via IFN-gamma. *PLoS Pathog.* **2008**;4(2):e27.
311. **Sung NS, Kenney S, Gutsch D, Pagano JS.** EBNA-2 transactivates a lymphoid-specific enhancer in the BamHI C promoter of Epstein-Barr virus. *J Virol.* **1991**;65(5):2164-9.
312. **Szekely L, Selivanova G, Magnusson KP, Klein G, Wiman KG.** EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1993**;90(12):5455-9.
313. **Takakuwa T, Luo WJ, Ham MF, Wada N, Aozasa K.** Identification of Epstein-Barr virus integrated sites in lymphoblastoid cell line (IB4). *Virus Res.* **2005**;108(1-2):133-8.
314. **Tabiasco J, Vercellone A, Meggetto F, Hudrisier D, Brousset P, Fournié JJ.** Acquisition of viral receptor by NK cells through immunological synapse. *J Immunol.* **2003**;170(12):5993-8.
315. **Takeshita H, Yoshizaki T, Miller WE, Sato H, Furukawa M, Pagano JS, Raab-Traub N.** Matrix metalloproteinase 9 expression is induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 C-terminal activation regions 1 and 2. *J Virol.* **1999**;73(7):5548-55.
316. **Tao Q, Robertson KD, Manns A, Hildesheim A, Ambinder RF.** Epstein-Barr virus (EBV) in endemic Burkitt's lymphoma: molecular analysis of primary tumor tissue. *Blood.* **1998**;91(4):1373-81.
317. **Tomkinson B, Kieff E.** Use of second-site homologous recombination to demonstrate that Epstein-Barr virus nuclear protein 3B is not important for lymphocyte infection or growth transformation in vitro. *J Virol.* **1992**;66(5):2893-903.
318. **Tong X, Drapkin R, Reinberg D, Kieff E.** 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.* **1995**;92(8):3259-63.
319. **Tong X, Drapkin R, Yalamanchili R, Mosialos G, Kieff E.** The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain forms a complex with a novel cellular coactivator that can interact with TFIIE. *Mol Cell Biol.* **1995**;15(9):4735-44.
320. **Tong X, Wang F, Thut CJ & Kieff E.** The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain can interact with TFIIB, TAF40, and RPA70 but not with TATA-binding protein. *J Virol.* **1995**;69(1):585-8.
321. **Toussiroit E, Roudier J.** Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* **2008**;22(5):883-96. Review
322. **Tran H, Nourse J, Hall S, Green M, Griffiths L, Gandhi MK.** Immunodeficiency-associated lymphomas. *Blood Rev.* **2008**;22(5):261-81.
323. **Tremat P, Tabiasco J, Andre P, Faumont N, Meggetto F, Delsol G, Gascoyne RD, Fournie JJ, Vivier E, Brousset P.** Evidence for early infection of nonneoplastic natural killer cells by Epstein-Barr virus. *J Virol.* **2002**;76(21):11139-42.
324. **Tsai CN, Tsai CL, Tse KP, Chang HY, Chang YS.** The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the downregulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2002**;99(15):10084-9.
325. **Tsoukas CD, Lambris JD.** Expression of EBV/C3d receptors on T cells: biological significance. *Immunol Today.* **1993**;14(2):56-9.
326. **Tsurumi T, Fujita M, Kudoh A.** Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Rev Med Virol.* **2005**;15(1):3-15.
327. **Tugizov SM, Berline JW, Palefsky JM.** Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells. *Nat Med.* **2003**;9(3):307-14.

328. **Uchida J, Yasui T, Takaoka-Shichijo Y, Muraoka M, Kulwichit W, Raab-Traub N, Kikutani H.** Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science*. **1999**;286(5438):300-3.
329. **Uemura N, Kajino T, Sanjo H, Sato S, Akira S, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J.** TAK1 is a component of the Epstein-Barr virus LMP1 complex and is essential for activation of JNK but not of NF-kappaB. *J Biol Chem*. **2006**;281(12):7863-72.
330. **van Beek J, Brink AA, Vervoort MB, van Zijp MJ, Meijer CJ, van den Brule AJ, Middeldorp JM.** In vivo transcription of the Epstein-Barr virus (EBV) BamHI-A region without associated in vivo BARF0 protein expression in multiple EBV-associated disorders. *J Gen Virol*. **2003**;84(Pt 10):2647-59.
331. **Vockerodt M, Haier B, Buttgerit P, Tesch H, Kube D.** The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces interleukin-10 in Burkitt's lymphoma cells but not in Hodgkin's cells involving the p38/SAPK2 pathway. *Virology*. **2001**;280(2):183-98.
332. **Vockerodt M, Pinkert D, Smola-Hess S, Michels A, Ransohoff RM, Tesch H, Kube D.** The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 induces expression of the chemokine IP-10: importance of mRNA half-life regulation. *Int J Cancer*. **2005**;114(4):598-605.
333. **Wakisaka N, Kondo S, Yoshizaki T, Muroso S, Furukawa M, Pagano JS.** Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces synthesis of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Mol Cell Biol*. **2004**;24(12):5223-34.
334. **Wakisaka N, Muroso S, Yoshizaki T, Furukawa M, Pagano JS.** Epstein-barr virus latent membrane protein 1 induces and causes release of fibroblast growth factor-2. *Cancer Res*. **2002**;62(21):6337-44.
335. **Waltzer L, Logeat F, Brou C, Israel A, Sergeant A, Manet E.** The human J kappa recombination signal sequence binding protein (RBP-J kappa) targets the Epstein-Barr virus EBNA2 protein to its DNA responsive elements. *EMBO J*. **1994**;13(23):5633-8.
336. **Waltzer L, Perricaudet M, Sergeant A, Manet E.** Epstein-Barr virus EBNA3A and EBNA3C proteins both repress RBP-J kappa-EBNA2-activated transcription by inhibiting the binding of RBP-J kappa to DNA. *J Virol*. **1996**;70(9):5909-15.
337. **Wan J, Sun L, Mendoza JW, Chui YL, Huang DP, Chen ZJ, Suzuki N, Suzuki S, Yeh WC, Akira S, Matsumoto K, Liu ZG, Wu Z.** Elucidation of the c-Jun N-terminal kinase pathway mediated by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1. *Mol Cell Biol*. **2004**;24(1):192-9.
338. **Wan J, Zhang W, Wu L, Bai T, Zhang M, Lo KW, Chui YL, Cui Y, Tao Q, Yamamoto M, Akira S, Wu Z.** BS69, a specific adaptor in the latent membrane protein 1-mediated c-Jun N-terminal kinase pathway. *Mol Cell Biol*. **2006**;26(2):448-56.
339. **Wang D, Liebowitz D, Kieff E.** An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell*. **1985**;43(3 Pt 2):831-40.
340. **Wang D, Liebowitz D, Kieff E.** The truncated form of the Epstein-Barr virus latent-infection membrane protein expressed in virus replication does not transform rodent fibroblasts. *J Virol*. **1988**;62(7):2337-46.
341. **Wang F, Gregory CD, Rowe M, Rickinson AB, Wang D, Birkenbach M, Kikutani H, Kishimoto T, Kieff E.** Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1987**;84(10):3452-6.
342. **Wang F, Gregory C, Sample C, Rowe M, Liebowitz D, Murray R, Rickinson A, Kieff E.** Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. *J Virol*. **1990**;64(5):2309-18.

343. **Wang L, Grossman SR, Kieff E.** Epstein-Barr virus nuclear protein 2 interacts with p300, CBP, and PCAF histone acetyltransferases in activation of the LMP1 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1990**;97(1):430-5.
344. **Wang S, Rowe M, Lundgren E.** Expression of the Epstein Barr virus transforming protein LMP1 causes a rapid and transient stimulation of the Bcl-2 homologue Mcl-1 levels in B-cell lines. *Cancer Res.* **1996**;56(20):4610-3.
345. **Watry D, Hedrick JA, Siervo S, Rhodes G, Lamberti JJ, Lambris JD, Tsoukas CD.** Infection of human thymocytes by Epstein-Barr virus. *J Exp Med.* **1991**;173(4):971-80.
346. **Wei MX, Ooka T.** A transforming function of the BARF1 gene encoded by Epstein-Barr virus. *EMBO J.* **1989**;8(10):2897-903.
347. **Weston CR, Davis RJ.** The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol.* **2007**;19(2):142-9.
348. **Wiech T, Nikolopoulos E, Lassman S, Heidt T, Schöpflin A, Sarbia M, Werner M, Shimizu Y, Sakka E, Ooka T, zur Hausen A.** Cyclin D1 expression is induced by viral BARF1 and is overexpressed in EBV-associated gastric cancer. *Virchows Arch.* **2008**;452(6):621-7.
349. **Wilson JB, Bell JL, Levine AJ.** Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. *EMBO J.* **1996**;15(12):3117-26.
350. **Winberg G, Matskova L, Chen F, Plant P, Rotin D, Gish G, Ingham R, Ernberg I, Pawson T.** Latent membrane protein 2A of Epstein-Barr virus binds WW domain E3 protein-ubiquitin ligases that ubiquitinate B-cell tyrosine kinases. *Mol Cell Biol.* **2000**;20(22):8526-35.
351. **Woissetschlaeger M, Yandava CN, Furmanski LA, Strominger JL, Speck SH.** Promoter switching in Epstein-Barr virus during the initial stages of infection of B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1990**;87(5):1725-9.
352. **Wood VH, O'Neil JD, Wei W, Stewart SE, Dawson CW, Young LS.** Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 regulates cellular gene transcription and modulates the STAT1 and TGFbeta signaling pathways. *Oncogene.* **2007**;26(28):4135-47.
353. **Wu DY, Kalpana GV, Goff SP, Schubach WH.** Epstein-Barr virus nuclear protein 2 (EBNA2) binds to a component of the human SNF-SWI complex, hSNF5/Ini1. *J Virol.* **1996**;70(9):6020-8.
354. **Wu DY, Krumm A, Schubach WH.** Promoter-specific targeting of human SWI-SNF complex by Epstein-Barr virus nuclear protein 2. *J Virol.* **2000**;74(19):8893-903.
355. **Wu H, Kapoor P, Frappier L.** Separation of the DNA replication, segregation, and transcriptional activation functions of Epstein-Barr nuclear antigen 1. *J Virol.* **2002**;76(5):2480-90.
356. **Wu L, Nakano H, Wu Z.** The C-terminal activating region 2 of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 activates NF-kappaB through TRAF6 and TAK1. *J Biol Chem.* **2006**;281(4):2162-9.
357. **Wu S, Xie P, Welsh K, Li C, Ni CZ, Zhu X, Reed JC, Satterthwait AC, Bishop GA, Ely KR.** LMP1 protein from the Epstein-Barr virus is a structural CD40 decoy in B lymphocytes for binding to TRAF3. *J Biol Chem.* **2005**;280(39):33620-6.
358. **Xie P, Bishop GA.** Roles of TNF receptor-associated factor 3 in signaling to B lymphocytes by carboxyl-terminal activating regions 1 and 2 of the EBV-encoded oncoprotein latent membrane protein 1. *J Immunol.* **2004**;173(9):5546-55.
359. **Xie P, Hostager BS, Bishop GA.** Requirement for TRAF3 in signaling by LMP1 but not CD40 in B lymphocytes. *J Exp Med.* **2004**;199(5):661-71.

360. **Xie P, Kraus ZJ, Stunz LL, Bishop GA.** Roles of TRAF molecules in B lymphocyte function. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2008**;19(3-4):199-207.
361. **Yamamoto N, Takizawa T, Iwanaga Y, Shimizu N, Yamamoto N.** Malignant transformation of B lymphoma cell line BJAB by Epstein-Barr virus-encoded small RNAs. *FEBS Lett.* **2000**;484(2):153-8.
362. **Yasui T, Luftig M, Soni V, Kieff E.** Latent infection membrane protein transmembrane FWLY is critical for intermolecular interaction, raft localization, and signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2004**;101(1):278-83.
363. **Yoshizaki T, Sato H, Furukawa M, Pagano JS.** The expression of matrix metalloproteinase 9 is enhanced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1998**;95(7):3621-6.
364. **Yoshiyama H, Imai S, Shimizu N, Takada K.** Epstein-Barr virus infection of human gastric carcinoma cells: implication of the existence of a new virus receptor different from CD21. *J Virol.* **1997**;71(7):5688-91.
365. **Young LS, Rickinson AB.** Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer.* **2004**;4(10):757-68.
366. **Zhang J, Chen H, Weinmaster G, Hayward SD.** Epstein-Barr virus BamHi-a rightward transcript-encoded RPMS protein interacts with the CBF1-associated corepressor CIR to negatively regulate the activity of EBNA2 and Notch1C. *J Virol.* **2001**;75(6):2946-56.
367. **Zhang L, Hong K, Zhang J, Pagano JS.** Multiple signal transducers and activators of transcription are induced by EBV LMP-1. *Virology.* **2004**;323(1):141-52.
368. **Zhang Q, Brooks L, Busson P, Wang F, Charron D, Kieff E, Rickinson AB, Tursz T.** Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 increases HLA class II expression in an EBV-negative B cell line. *Eur J Immunol.* **1994** Jun;24(6):1467-70.
369. **Zhang X, Hu L, Fadeel B, Ernberg IT.** Apoptosis modulation of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 in the epithelial cell line HeLa is stimulus-dependent. *Virology.* **2002**;304(2):330-41.
370. **Zhang X, Uthaisang W, Hu L, Ernberg IT, Fadeel B.** Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 promotes stress-induced apoptosis upstream of caspase-2-dependent mitochondrial perturbation. *Int J Cancer.* **2005**;113(3):397-405.
371. **Zhang X, Sanmun D, Hu L, Fadeel B, Ernberg I.** Epstein-Barr virus-encoded LMP1 promotes cisplatin-induced caspase activation through JNK and NF-kappaB signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* **2007** Aug 17;360(1):263-8.
372. **Zheng L, Bidere N, Staudt D, Cubre A, Orenstein J, Chan FK, Lenardo M.** Competitive control of independent programs of tumor necrosis factor receptor-induced cell death by TRADD and RIP1. *Mol Cell Biol.* **2006**;26(9):3505-13.
373. **Zimber-Strobl U, Kremmer E, Grässer F, Marschall G, Laux G, Bornkamm GW.** The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 interacts with an EBNA2 responsive cis-element of the terminal protein 1 gene promoter. *EMBO J.* **1993**;12(1):167-75.
374. **Zimber-Strobl U, Strobl LJ, Meitinger C, Hinrichs R, Sakai T, Furukawa T, Honjo T, Bornkamm GW.** Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 exerts its transactivating function through interaction with recombination signal binding protein RBP-J kappa, the homologue of Drosophila Suppressor of Hairless. *EMBO J.* **1994**;13(20):4973-82.
375. **Zimber-Strobl U, Strobl LJ.** EBNA2 and Notch signalling in Epstein-Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes. *Semin Cancer Biol.* **2001**;11(6):423-34.

376. **zur Hausen A, Brink AA, Craanen ME, Middeldorp JM, Meijer CJ, van den Brule AJ.** Unique transcription pattern of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-carrying gastric adenocarcinomas: expression of the transforming BART1 gene. *Cancer Res.* **2000**;60(10):2745-8.
377. **zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Klein G, Henle W, Henle G, Clifford P, Santesson L.** EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature.* **1970**;228(5276):1056-8.