



HAL
open science

Etude fonctionnelle de l'Ubinucléine, partenaire cellulaire du facteur de transcription EB1 du virus d'Epstein-Barr et inhibition du cycle lytique viral

Audrey Conti

► **To cite this version:**

Audrey Conti. Etude fonctionnelle de l'Ubinucléine, partenaire cellulaire du facteur de transcription EB1 du virus d'Epstein-Barr et inhibition du cycle lytique viral. Sciences agricoles. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENV059 . tel-00819882

HAL Id: tel-00819882

<https://theses.hal.science/tel-00819882>

Submitted on 2 May 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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

« **Audrey CONTI** »

Thèse dirigée par «**Dr Véronique Boyer**»

préparée au sein du **Laboratoire « *Unit of Virus Host Cell Interactions* » (UVHCI)**

dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du vivant**

Etude fonctionnelle de l'Ubinucléine, partenaire cellulaire du facteur de transcription EB1 du virus d'Epstein-Barr et inhibition du cycle viral productif

Thèse soutenue publiquement le « **14.12.2012** »,
devant le jury composé de :

Pr Xavier Ronot

Directeur d'étude à Grenoble, Président du jury

Dr Laurence Briant

Directrice de Recherche à Montpellier I, Rapporteur

Pr Vincent Maréchal

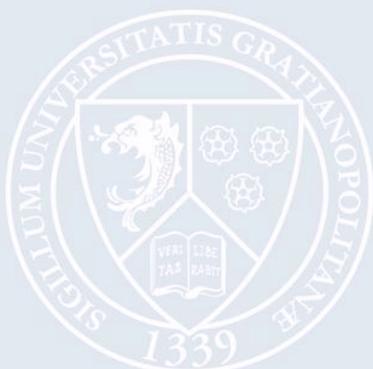
Professeur à Paris VI, Rapporteur

Dr Henri Gruffat

Chargé de Recherche à Lyon I, Examineur

Dr Pascal Fender

Chargé de Recherche à Grenoble, Examineur



Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier vivement le Dr Véronique Boyer, directrice de thèse, pour sa grande patience, son aide, sa disponibilité et son accompagnement tout au long de ces trois années.

Je remercie également le Pr Rob Ruigrok d'avoir accepté de m'accueillir au sein de l'UVHCI (Unit of Virus Host Cell Interactions) ainsi que les Pr Patrice Morand et Wim Burmeister de m'avoir intégrée dans leur équipe.

J'adresse un grand merci aux membres du jury qui ont si gentiment accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Je remercie fortement Charlotte Sueur, Catherine Fallecker pour le travail d'équipe, leur aide très précieuse, leur bonne humeur et leur amitié.

Merci aux collègues et amis travaillant à l'UVHCI et au laboratoire de virologie du Centre hospitalier de Grenoble pour leur accueil très chaleureux et sympathique. Travailler à vos côtés a été très enrichissant et une grande joie. Merci à Laurence Grossi et au Dr Raphaëlle Germi du CHU à Grenoble pour m'avoir confiée les cellules lymphocytaires qui ont été un outil précieux lors de ce travail de thèse. Merci au Dr Julien Lupo pour tout son travail réalisé au cours de sa thèse sur l'Ubinucléine, travail qui a été un formidable support pour cette thèse.

Je tiens à remercier les collaborateurs, les Dr Evelyne Manet et Henri Gruffat de l'ENS à Lyon et le Dr Carlo Petosa de l'IBS à Grenoble, qui m'ont permis de participer à leurs projets. Merci également pour leurs conseils, leur aide et pour m'avoir apportée du matériel essentiel pour la réalisation de ce travail.

Enfin, je souhaite remercier très tendrement ma famille, en particulier mes parents, mon frère et mes grand-parents pour leur soutien, leurs sacrifices et leur encouragement jour après jour.

Table des matières

Index des figures

Liste des abbréviations

Résumé/Summary

Introduction	p1
I) Le virus d'Epstein-Barr.....	p1
1- Généralités	p1
2- Les deux cycles viraux	p4
A- Cycle latent	p5
B- Cycle productif	p9
a-Gènes précoces immédiats EB1 et Rta	p10
b-Gènes précoces	p14
c-Gènes tardifs	p15
d- Induction du cycle productif	p18
3- Latence et Réactivation	p19
4- Pathologies associées au virus d'Epstein-Barr	p22
A- Pathologies causées par le virus d'Epstein-Barr	p22
B- Pathologies liées au virus d'Epstein-Barr	p23
II) Approches thérapeutiques	p27
1- Traitements utilisés lors des infections par les herpesvirus	p27
2- Cibles potentielles et développement de nouveaux traitements	p29
A- Cibles spécifiques au virus d'Epstein-Barr	p29
a-EB1 et/ou Rta Ciblant	p29
b-la protéase virale du virus d'Epstein-Barr	p30
B- Autres pistes	p30
a-La protéine chaperone Hsp90	p30
b-Vecteur minicircle	p30
c-Vaccination	p31
3- Activation du cycle productif pour lutter contre les cancers associés au virus d'Epstein-Barr	p32
4- Immunothérapie	p34

III)	Partenaires cellulaires utilisés par le virus	p35
1-	Stabilisation ARNm viraux, cycle cellulaire et signalisation	p35
2-	L'Ubinucléine	p38
IV)	Les jonctions serrées et leurs interactions avec les virus	p42
1-	Les jonctions serrées : fonction et composants	p43
A-	Les protéines transmembranaires	p44
B-	Les protéines associées aux protéines transmembranaires	p45
C-	Les protéines « NACos »	p46
2-	Action des virus sur les jonctions serrées	p47
Résultats		p55
I)	L'Ubinucléine et sa caractérisation dans la cellule	p55
1-	Identification de nouveaux partenaires de l'Ubinucléine	p55
A-	Recherche de partenaires de l'Ubinucléine par spectrométrie de masse.....	p55
B-	Recherche d'autres partenaires de l'Ubinucléine	p70
2-	Analyse fonctionnelle de l'Ubinucléine	p75
A-	L'Ubinucléine emprunte la voie dépendante de la clathrine	p75
B-	Modification de la localisation de l'Ubinucléine <i>via</i> la PKA	p79
II)	Identification de molécules inhibitrices d'EB1	p105
1-	Criblage de composés chimiques anti-EB1	p105
2-	Suivi des stades du cycle productif sur lignées lymphocytaires	p107
3-	Etude de la cytotoxicité par cytométrie en flux	p109
4-	Mise au point d'un test de sélection des molécules inhibitrices d'EB1 en culture cellulaire	P110
III)	Matériels et méthodes hors article n°1 et n°2	p113
Discussion et perspectives		p118
Références		p137
Annexe		p151

Index des figures

Introduction

Figure 1 : Shématisation du génome viral	p1
Figure 2 : CryoEM et structure 3D de la capside	p2
Figure 3 : Représentation du virus d'Epstein-Barr et observation en microscopie électronique	p3
Figure 4 : Schéma classique d'infection par le virus d'Epstein-Barr	p4
Figure 5 : Cycle productif du virus d'Epstein-Barr	p10
Figure 6 : Structure schématique d'EB1	p12
Figure 7 : Organisation des glycoprotéines gH et gL	p16
Figure 8 : Résumé des cibles des miARN cellulaires et viraux dans les cellules Jijoye	p20
Figure 9 : L'Ubinucléine interagit avec le facteur de transcription EB1	p38
Figure 10 : Localisation par immunomarquage de l'Ubinucléine en fonction de la confluence dans les cellules MDCK	p40
Figure 11 : Localisation de l'Ubinucléine dans les jonctions serrées dans les cellules HT29	p41
Figure 12 : Organisation du tissu épithélial	p42
Figure 13 : Jonctions serrées observées en microscopie électronique	p43
Figure 14 : Composition des jonctions serrées	p45
Figure 15 : Virus intervenant sur les jonctions serrées	p48
Figure 16 : Voie de signalisation activée par l'interaction de CVB avec DAF	p49
Figure 17 : Interaction virale avec les protéines des jonctions serrées	p50
Figure 18 : Modèle d'échappement de l'Adenovirus de la cellule épithéliale infectée	p51

Résultats

Figure 19 : Etapes suivies pour l'identification des partenaires de l'Ubinucléine par spectrométrie de masse	p56
Figure 20 : Séquence peptidique de l'Ubinucléine (UBN-1)	p71
Figure 21 : Séquence peptidique de l'Ubinucléine (résidus 341-360)	p71
Figure 22 : Co-immunoprécipitation de l'Ubinucléine et de la protéine 14.3.3ε	p72
Figure 23 : Colocalisation de l'Ubinucléine et de la protéine 14.3.3ε	p72
Figure 24 : Co-immunoprécipitation de l'Ubinucléine et de la chaîne lourde de la molécule de clathrine	p73
Figure 25 : Colocalisation de l'Ubinucléine et de la chaîne lourde de la molécule de clathrine dans les cellules HT29	p74
Figure 26 : Détection par western blot de la protéine Claudine-1 après traitement trypsique et privation de calcium	p76
Figure 27 : Colocalisation de l'Ubinucléine avec les protéines Claudine-1 et ZO-1	p76
Figure 28 : Suivi cinétique par immunomarquage de l'Ubinucléine après privation de calcium	p77
Figure 29 : Immunomarquage de l'Ubinucléine après privation de calcium accompagnée ou pas par acidification du milieu	p78
Figure 30 : Séquence peptidique de l'Ubinucléine (résidus 341-360)	p79
Figure 31 : La phosphorylation de la sérine 352 du peptide UBN-1 est nécessaire pour son interaction avec la protéine 14.3.3ε	p80
Figure 32 : Phosphorylation <i>in vitro</i> de l'Ubinucléine par la sous-unité C-α de la protéine kinase A	p81
Figure 33 : Association entre la GST-Ubn-1 phosphorylée et la protéine 14.3.3ε	p82
Figure 34 : L'Ubinucléine et 14.3.3ε sont délocalisées vers les jonctions serrées après traitement des cellules AGS par l'inhibiteur de la PKA	p83
Figure 35 : L'Ubinucléine est concentrée dans les zones de contact tricellulaire après traitement des cellules MDCK par l'inhibiteur de la PKA	p83
Figure 36 : Fractionnement subcellulaire des cellules AGS avec ou sans traitement par l'inhibiteur de PKA	p85
Figure 37 : Diminution de la présence d'Ubinucléine dans les jonctions serrées après traitement des cellules MDCK par la Forskolin	p86
Figure 38 : Inhibition de la fixation de la protéine EB1 sur l'ADN cible par la molécule 706811	p106

Figure 39: Gamme de concentration et suivi de l'expression de la protéine précoce BMRF1 dans la lignée Daudi (lymphome de Burkitt) après 72h de traitement	p107
Figure 40 : Expression des protéines virales EB1 (Zebra) et BMRF1 en présence ou absence de traitement par la molécule dans deux lignées de lymphome de Burkitt (Daudi et P3HR-1)	p108
Figure 41 : Marquage à l'iodure de propidium des cellules Daudi (lymphome de Burkitt) et mesure de la mort cellulaire par cytométrie en flux	p109
Figure 42 : Marquage à l'iodure de propidium des cellules P3HR-1 (lymphome de Burkitt) et mesure de la mort cellulaire par cytométrie en flux	p110
Figure 43 : Mesure d'intensité de luciférase dans les cellules AGS positives pour le virus d'Epstein-Barr transfectées avec le vecteur pGl3 basic et pGl3 Zp luc	p111
Figure 44 : Intensité luciférase mesurée après transfection des vecteurs dans les cellules AGS négatives pour le virus d'Epstein-Barr et AGS positive pour le virus d'Epstein-Barr KO pour Zebra	p112

Discussion et perspectives

Figure 45 : Mécanismes régulés par la protéine Lyric	p119
Figure 46 : Nouveaux composants des jonctions serrées	p121
Figure 47 : Les différents modes d'endocytose	p123
Figure 48 : Organisation des molécules de clathrine	p124
Figure 49 : Voie d'endocytose dépendante de la clathrine	p125
Figure 50 : Fonctions des RabGTPases dans le transport vésiculaire	p127
Figure 51 : Domaines impliqués dans l'interaction entre l'Ubinucléine et 14.3.3e	p128
Figure 52 : Localisation cellulaire de la Tricelluline dans les cellules MDCK	p129
Figure 53 : Résumé de la caractérisation et l'étude fonctionnelle de l'Ubinucléine	p133

Liste des abréviations

ACV : Acyclovir	DSG2 : Desmoglein 2
ADCC : Antibody-dependent Cellular Cytotoxicity	EA : Early antigen
AMPc : Adenosine monophosphate cyclique	EBER : EBV-encoded RNA
AP-1 : Activator protein-1	EBNA : Epstein-Barr Nuclear Antigen
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated	EBP2 : EBNA-1 Binding Protein 2
ATP : Adenosine triphosphate	EBV : Epstein-Barr virus
BA : Butyric acid	EGCG : Epigallocatechin gallate
BARF : BamH1-A Reading Frame-1	EGFR : Epidermal growth factor receptor
BART : BamHI-A rightward transcript	EGR : Early Growth Response
Bcl2 : B-cell leukemia protein-2	FAK : Focal Adhesion Kinase
BCR : B cell receptor	GCV : Gancyclovir
Blimp-1 : B-lymphocyte-induced maturation Protein 1	GST : Glutathione S transferase
BRAP-2: BRCA-1 binding protein	HDAC : Histone deacetylase
bZIP : Basic leucine Zipper	HEK : Human Embryonic Kidney
C-terminal: Carboxy-terminal Domain	HLA : Human Leukocyte Antigen
CABIN : Calcineurin-Binding protein	HMGB2 : High-Mobility Group Box 2
CAR : Coxsackievirus B Adenovirus receptor	HPV : Human papilloma virus
CBF1 : C-promoter binding factor 1	HSV : Herpes simplex virus
CHK2 : Checkpoint kinase 2	IFN : Interferon
CIDR1 α : Cystein-rich Inter-Domain Region 1	Ig : Immunoglobulin
CK2 : Casein kinase 2	IL : Interleukin
CMV : Cytomegalovirus	IR : Internal Repeat
CSF-1: Colony-stimulating factor-1	ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
CST : Complementary Strand Transcripts	JAK : Janus Kinase
CVB : Coxsackievirus B	JAM : Junction Adhesion Molecules
DDR : DNA Damage Response	JDP2 : Jun Dimerization Protein 2
	JO-1 : Junction Opener

Liste des abréviations

KSR : Kinase Suppressor of Ras	PLZF : Promyelocytic leukemia zinc finger
LCL : Lymphoblastoid cell line	PML : Promyelocytic leukemia
LMP : Latent membrane protein	PR : Protéase de virus d'Epstein-Barr
Lyric : LYsine-Rich CEACAM1	PTLD : Post-Transplant Lymphoproliferative Disease
MBV : Maribavir	Rack : Receptor for activated C kinase
MCAF1 : MBD1-containing chromatin-associated factor 1	RRE : Rta Responsive Element
MDCK : Madin Darby canine kidney	RRV : Rhesus monkey rotavirus
MEF2 : Myocyte enhancer binding factor	RS : Reed-Stenberg
MMP2 : Metalloproteinase-2	SAHA : suberoylanilide hydroxamic Acid
MSRV : Multiple sclerosis associated retroviral element	SAHF : Senescence-Associated Heterochromatin Foci
N-terminal: amino-terminal domain	SAP : SLAM-Associated Protein
NACos : Nuclear and Adhesion Complex Components	SCID : Severe Combined Immunodeficiency
NFκB : Nuclear Factor Kappa light chain enhancer of activated B cells	SEP : Sclérose en plaque
NK : Natural Killer	SLAM : Signaling lymphocyte activation molecule
NPC : Nasopharyngeal Carcinoma	STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
NR : Nuclear orphan Receptors	SV40 : Simian Virus 40
OHL : Oral Hairy Leukoplakia	T.J : Tight Junction
ORF : Open Reading Frame	TAP : Transporter associated with Antigen-Processing
PAR : Partitioning defective	TER : Transepithelial Electrical Resistance
PAX : Paired box protein	TFIIβ : Transcription Factor II β
PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell	TK : Thymidine Kinase
PI3-K : Phosphatidylinositol 3 kinase	TLR : Toll Like Receptor
PK : Protein kinase	TNF : Tumor Necrosis Factor
PKA: Protein kinase A AMPc dependent	TPA : 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate ou Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PKC : Protein kinase C	

Liste des abréviations

TRAF : Tumour-necrosis-factor Receptor
Associated Factors

TR : Terminal repeat

TSA : Trichostatine A

UBN: Ubinuclein

VCA : Viral Capsid Antigen

VHC : Virus de l'hépatite C

VIH : Virus d'immunodéficience humaine

VPA : Valproic Acid

VZV : Varicella-Zoster Virus

XBP1 : X Box binding Protein 1

ZO : Zonula Occludens

ZONAB : ZO-1-associated
Nucleic-Acid-Binding protein

ZRE : Z responsive element

Zta : EB1 ou Zebra (Z Epstein-Barr Replication
Activator)

Résumé/Summary

Découvert en 1964, le virus d'Epstein-Barr appartient à la sous-famille des gamma-herpèsvirus. Ce virus à ADN présente une forte prévalence (90% de la population adulte est infectée). Ce fut le premier virus identifié comme associé à des cancers humains (lymphome de Burkitt et d'Hodgkin, carcinome gastrique et du cavum). Ce virus a pour spécificité de posséder deux cycles distincts : latent et productif (production de particules virales). Le facteur de transcription viral EB1 (ou Zebra) est un élément clé lors de l'initiation du cycle productif et semble une cible importante pour l'élaboration de nouveaux traitements. Une première partie de ce travail concerne la caractérisation d'une protéine cellulaire (l'Ubinucléine) qui interagit et inhibe l'activité de EB1. Cette protéine voyage entre noyaux et jonctions serrées. Elle appartient à la famille des « NACos » (nuclear and adhesion complex components). La fonction de l'Ubinucléine n'est pas connue et sa protéomique quand elle est localisée dans les jonctions serrées, a été réalisée. Des études fonctionnelles montrent que l'Ubinucléine interagit avec plusieurs partenaires cellulaires, emprunte la voie d'endocytose dépendante de la clathrine et que sa localisation cellulaire (nucléaire ou dans les jonctions serrées) est affectée par la PKA. Dans une seconde partie, nous nous sommes intéressés à des molécules inhibitrices du facteur de transcription viral EB1. Après criblage à haut débit de composés chimiques (EMBL-Heidelberg), des tests *in vitro* ont permis d'en sélectionner un pour des essais *in vivo*. Ce composé chimique inhibe l'activité du facteur de transcription EB1 et bloque précocement la mise en place du cycle productif dans des cellules de lymphome de Burkitt. Il semble donc intéressant d'améliorer l'efficacité et la spécificité de cette molécule.

Discovered in 1964, Epstein-Barr virus belongs to the Gamma-herpesvirus subfamily. This DNA virus shows an important prevalence (90% of the adult population is infected). It was the first virus identified as associated with human cancers (Hodgkin and Burkitt lymphomas, Gastric and oropharyngeal carcinomas). It presents two distinct cycles: Latency and productive cycle (viral particle production). Viral transcription EB1 (or Zebra) is a key element for lytic cycle initiation and seems to be an important target for future treatment development. A first part of this work concerned the characterization of the cellular protein Ubinuclein that inhibits EB1 activity. This protein travels between nucleus and tight junctions. It belongs to the "NACos" (nuclear and adhesion complex components) protein family. Ubinuclein function is not known and its proteomic was performed when it was localized at tight junction. Next, functional studies showed that Ubinuclein interacts with various cellular partners and goes through the clathrin dependent endocytosis pathway. It's localisation (nuclear or at tight junction) changes with PKA activity. In the second part of this work, we focus on viral transcription factor EB1 inhibitors. After high-throughput screening of compounds (EMBL-Heidelberg), *in vitro* assays allowed to select one molecule for *in vivo* experiments. This compound inhibits the activity of the transcription factor EB1 and stops early lytic cycle establishment in Burkitt lymphoma cells. Further work needs to be done to increase efficacy and specificity of this molecule.

Introduction

Introduction

I) Le virus d'Epstein-Barr

1- Généralités

Le virus d'Epstein-Barr (HHV-4) fait partie du genre lymphocryptovirus (LCV) et de la famille des Herpesviridae comprenant également les virus herpès simplex (HSV-1 et HSV-2), le virus de la varicelle et Zona (VZV), le cytomégalovirus (CMV) et les herpèsvirus (HHV-6, HHV-7, HHV-8). Les herpesviridae sont divisés en trois sous-famille (Alpha, Beta et Gamma) selon leurs propriétés biologiques et physicochimiques. Le virus d'Epstein-Barr est un gammaherpèsvirus. Il a été observé par microscopie électronique en 1964, dans des cellules issues d'un patient africain atteint de lymphome de Burkitt, par l'équipe du Dr Epstein (Epstein et al., 1964).

Il s'agit d'un virus à ADN linéaire double brin dont le génome est de 170 kb. Le premier génome complet séquencé est celui de la souche P3HR1 dérivée d'un patient présentant un lymphome de Burkitt (Baer et al., 1984). Le génome du virus d'Epstein-Barr comprend une centaine de cadres ouverts de lecture (ORF) nommés après le fragment de restriction BamHI. Il comporte une série de séquences terminales répétées (TR ou Terminal Repeat) d'environ 500 pb à chacune de ses deux extrémités (figure 1). Le nombre de séquences TR varie de 4 à 12, et ces dernières permettent la circularisation du génome viral lors de l'infection des cellules hôtes. Dans cette configuration, l'EBV peut maintenir stablement son génome dans les cellules infectées, sans avoir à l'intégrer au génome de la cellule hôte. Des séquences de répétition internes (IR ou Internal Repeat) divisent le génome en cinq régions uniques (U1 à U5). Le génome contient les deux origines de réplication du cycle productif du virus (ori-Lyt) et l'origine de réplication latente. Il codera plus de 80 protéines virales qui ne sont pas toutes caractérisées.

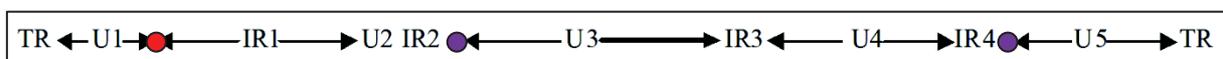


Figure 1 : schématisation du génome viral

Deux régions répétées terminales (TR) encadrent le génome. Quatre régions répétées internes (IR) découpent le génome et dessinent cinq régions uniques de grande séquence (U1 à U5). ● = ori-P ● = ori-Lyt

Cet ADN est renfermé dans une capsidie icosaédrique composée de 162 capsomères (150 hexamères et 12 pentamères) et mesurant 100-120 nm de diamètre. La capsidie possède une protéine majeure de 155 kDa, un portail de 68 kDa, une troisième de 40 kDa, une mineure de 30 kDa et une petite de 18 kDa. Sa structure 3D a été établie (Germi et al., 2012) (figure 2). A chaque jonction, entre trois capsomères (trois hexons ou un penton et deux hexons), se trouve un complexe trimérique (320 complexes par capsidie) qui jouerait un rôle dans la stabilisation de la capsidie.

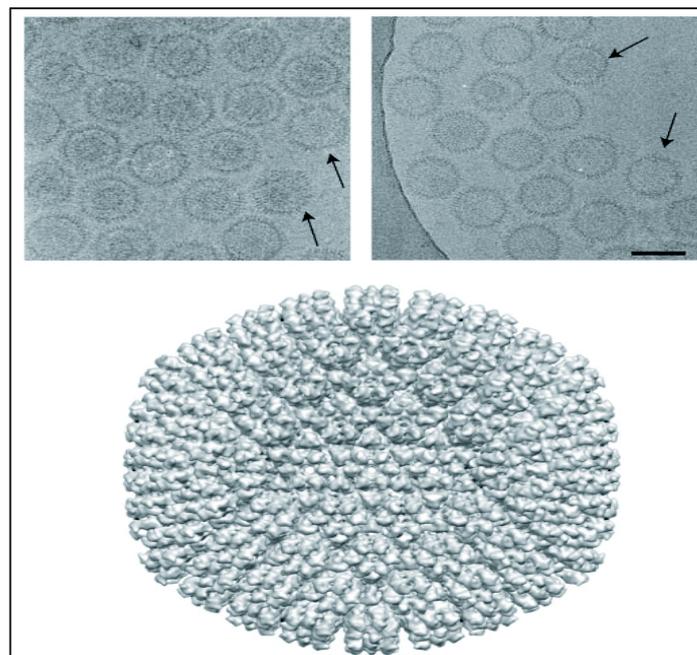


Figure 2 : Cryo-EM et structure 3D de la capsidie

Représentation d'un groupe de particules (gauche, purifiées au CsCl; droite, purifiées au sucrose) utilisé pour la détermination du modèle 3D de la capsidie (en bas, purifiée au sucrose et déterminée à 20 Å). Capsides produites dans des cellules B (B95.8). Barre de mesure : 100 nm. D'après Germi et al., *J. of Gen. Vir.* (2012), 93 : 1769-1773

L'ensemble est entouré par une structure fibrillaire (le tégment) puis par une enveloppe glycoprotéique (Yamaguchi et al., 1967) (figure 3). Le tégment se compose de protéines communes aux herpèsvirus et par des protéines cellulaires (Actine, HSP70, Cofilin, β -Tubuline, Enolase, HSP90).

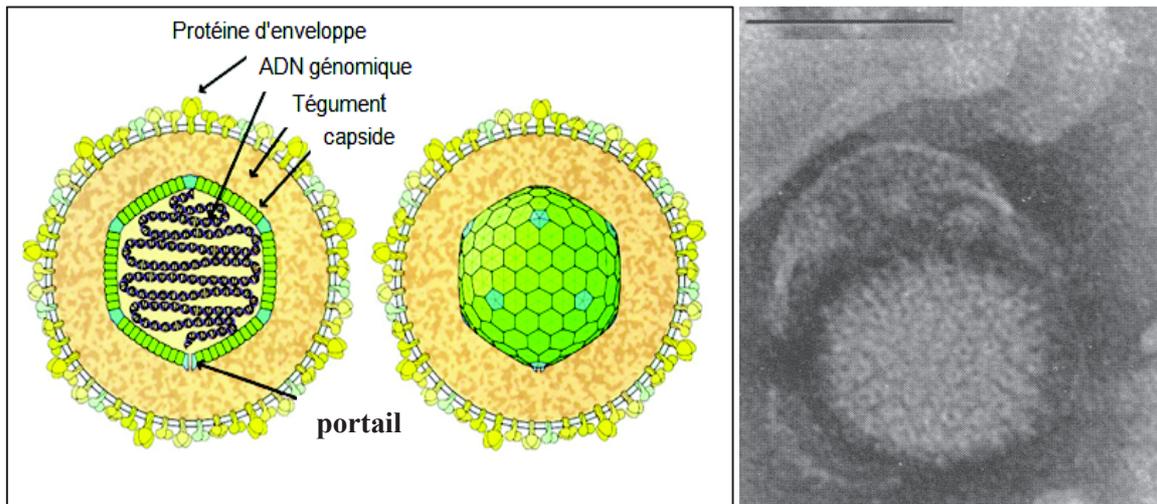


Figure 3 : Représentation du virus d'Epstein-Barr et observation en microscopie électronique
 L'ADN viral est protégé par une capsid. L'ensemble est entouré par le tégument puis une enveloppe glycoprotéique. La particule virale est observée dans une cellule P3HR-1 (lymphome de Burkitt). Barre de mesure : 0.1 μ M. Représentation schématique d'après le site internet « <http://cullenlab.duhs.duke.edu/research/ebv/> » et photo de microscopie électronique d'après J. Yamaguchi et al., J. Virol. (1967), 1 (3) : 640-642

Ce virus présente une forte prévalence car environ 90% de la population adulte mondiale est infectée. Il est capable d'infecter les lymphocytes et les cellules épithéliales. Il a pour particularité de persister tout au long de la vie. Dans certains cas, il peut y avoir réactivation conduisant à un cycle productif.

La primo-infection est en grande majorité asymptomatique. Au cours de la primo-infection, le virus (latence de type III) va infecter des cellules épithéliales et des lymphocytes B circulant au niveau du rhinopharynx. Il infecte les lymphocytes B par l'interaction de la protéine gp350 avec le récepteur CD21 à la surface des cellules B. L'enveloppe va fusionner avec la membrane de la cellule et la nucléocapsid est transportée jusqu'au noyau. Après relargage dans le noyau, l'ADN linéaire est circularisé pour former un épisode (Thorley-Lawson, 2001). Il va alors se répliquer dans les lymphocytes B et provoquer leur transformation, leur prolifération (figure 4). Nous aurons une mise en route d'une réponse immunitaire primaire et activation de cellules T mémoires en cellules T cytotoxiques spécifiques d'antigènes viraux du stade latent et productif. Cela permettra de conserver un certain équilibre et de « contrôler » la prolifération de lymphocytes B transformés. Le virus va alors adopter un stade de latence particulier (latence 0) et persister dans les lymphocytes B mémoires. Parfois, l'équilibre peut être déstabilisé et une réactivation transitoire du virus s'établit. Le cycle productif est en route amenant à la réplication virale et à la production de virions. De nouveaux lymphocytes B circulant et cellules épithéliales du rhinopharynx vont pouvoir être

infectés. Généralement, l'équilibre revient et le cycle productif s'éteint. Les mécanismes responsables et ceux régulant cette réactivation sont encore aujourd'hui mal compris.

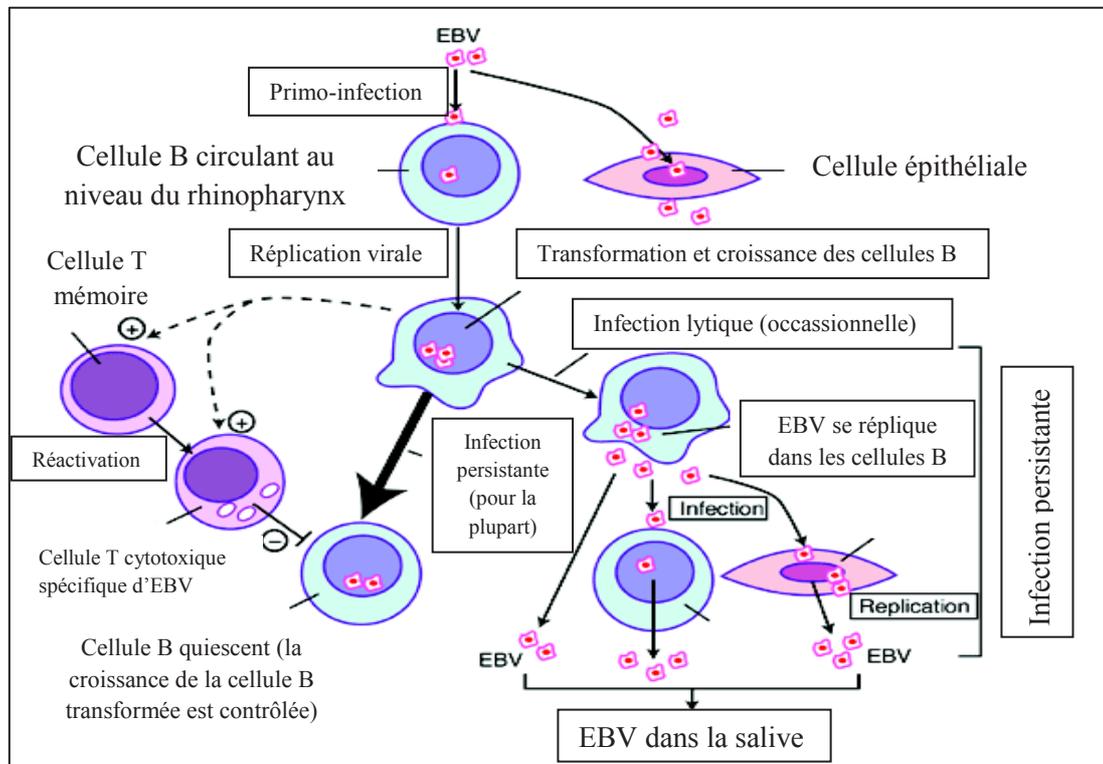


Figure 4 : Schéma classique d'infection par le virus d'Epstein-Barr
Molecular Medicine (2001), Cambridge University Press

2- Les deux cycles viraux

Il existe deux cycles distincts dans l'infection par le virus d'Epstein-Barr : le cycle latent et le cycle productif qui vous sont présentés dans ce chapitre.

Ces deux cycles se différencient par des origines de réplication bien distinctes : une pour le maintien de l'épisome viral ori-P {Rawlins, 1985 #287} et une pour la réplication virale lors du cycle productif ori-Lyt (Hammerschmidt and Sugden, 1988) (figure 1).

A) Cycle latent

La latence va permettre l'établissement d'une infection persistante. Au cours de la primo-infection, le virus va infecter des lymphocytes B où il persistera sous forme épisomale (extrachromosome circulaire) : c'est ce qui correspond au cycle latent. La circularisation du génome se fait par recombinaison homologue des deux régions TR (Raab-Traub and Flynn, 1986). Durant ce cycle, l'expression des gènes viraux est restreinte et l'épisome viral répliqué à une copie par cycle. Trois promoteurs de latence virale sont décrits : Wp, Cp et Qp. Dans un premier temps, l'expression des protéines de la famille EBNA (Epstein-Barr Nuclear Antigen) est initiée à partir du promoteur Wp (localisé dans la région BamHI W de la carte de restriction du génome viral), ensuite lorsque la transformation cellulaire est réalisée, c'est le promoteur Cp (localisé dans BamHI C) qui prend le relais (latence III). Le promoteur Qp est utilisé en latence I et II.

Ce sera le profil d'expression des gènes codant les neuf protéines de latence (6 protéines EBNA et 3 protéines LMP (latent membrane protein)) qui va différencier les quatre types de latence existant chez le virus d'Epstein-Barr (0 à III). Ces gènes auront pour rôle de bloquer la réplication virale, inhiber l'apoptose, stimuler la prolifération cellulaire et assurer la bonne distribution de l'épisome viral lors de la division cellulaire (Kieff et al., 2001).

La latence dite de type 0 se restreint à l'expression d'ARN non codants 2 EBERs (EBV-encoded RNA) et BART (BamHI-A rightward transcript). Cette étape est nécessaire au virus pour échapper au système immunitaire de l'hôte (Kieff et al., 2001). Au cours de tous les stades de latence, les petits ARN non codants EBER (EBER-1 et 2) et BART sont exprimés. Les transcrits BART pourraient intervenir dans le maintien de la latence. Le virus utilise la latence de type 0 pour persister dans un état quiescent parmi les cellules B mémoires infectées qui circulent dans le sang périphérique (Thorley-Lawson, 2001).

La latence de type I (découverte à l'origine dans des biopsies de lymphome de Burkitt) se caractérise par la détection de la protéine EBNA-1 (LMP-1 parfois) et la latence de type II (découverte à l'origine dans des biopsies de carcinome du cavum) par l'expression d'EBNA1, LMP-2A et LMP-2B et parfois LMP-1 (les carcinomes gastriques et une majorité des carcinomes du cavum n'exprimeront pas LMP-1). La latence de type II va être nécessaire pour apporter les signaux de survie aux cellules infectées.

Au moment de la latence de type III, toutes les protéines EBNA et LMP sont exprimées. L'expression de ces protéines virales amène à initier la réplication virale pour maintenir une prolifération constante et évite la survenue de l'apoptose (Tsurumi et al., 2005).

La protéine EBNA-1 (*bkrf1*) de 56 kDa, sera tout particulièrement impliquée dans la conservation de l'épisome viral. Le génome viral sera répliqué en parallèle du génome de la cellule en division (Yates et al., 1985). EBNA-1 peut s'associer avec la protéine cellulaire du nucléole EBP2 (EBNA-1 Binding Protein 2). Cette interaction a lieu dans le nucléoplasme et le nucléole durant l'interphase mais n'est pas présente au cours de la mitose (Jourdan et al., 2012). Au cours de l'interphase et de la mitose, la protéine EBNA-1 va pouvoir interagir directement avec un des composants de la chromatine HMGB2 (High-Mobility Group Box 2), nouvellement identifiée comme partenaire d'EBNA-1 (Jourdan et al., 2012). Suivant le stade de latence, *bkrf1* sera transcrit à partir de promoteurs distincts : le promoteur Qp pour les deux premiers types, puis Cp et Wp pour le type III. En revanche, il sera transcrit à partir du promoteur Fp lors du cycle productif.

Le dimère d'EBNA-1 s'associe à l'ADN viral au niveau d'une séquence partielle palindromique (TAGGATAGCATATGCTACCCAGATCCAG) qui existe à trois reprises dans le génome viral (Rawlins et al., 1985). De plus, elle améliorera la survie en diminuant l'activation de la protéine p53 et en évitant la mort cellulaire par apoptose en réponse aux dommages sur l'ADN (Sivachandran et al., 2012). Elle présente des similarités structurales avec la protéine E2 du papilloma virus (HPV).

EBNA-2 (*byrf1*) de 52 kDa, est un transactivateur de différents gènes viraux (comme *lmp1*, *lmp2*) et cellulaires comme les marqueurs d'activation des lymphocytes B (CD23 et CD21). Elle est la première exprimée et va être essentielle lors de la transformation des cellules B en bloquant leur différenciation *via* le contrôle de la machinerie transcriptionnelle (Ling et al., 1994). La transcription du gène *lmp1* est sous le contrôle d'un promoteur indépendant d'EBNA-2 régulé par la voie de signalisation JAK/STAT (Chen et al., 2001). Son activité est modulable grâce à la protéine virale EBNA-3C (109 kDa). Les lignées cellulaires Daudi et P3HR-1, utilisées lors des travaux exposés dans le chapitre des résultats, n'expriment pas cette protéine de latence (gène délété dans le génome de la souche virale présente).

EBNA-LP (54 kDa), avec EBNA-2, participe à la transition entre la phase G0 et G1 du cycle cellulaire (Sinclair et al., 1994). Elle peut aussi se lier au suppresseur de tumeur p53 évoqué juste avant et à pRb.

L'expression des gènes de latence (surtout EBNA-2 et les protéines de latence type III) par la cellule B amène à l'activation du mécanisme cellulaire de réparation de l'ADN (DDR). La protéine virale EBNA-3C (*berf3*) va atténuer l'établissement de cette réponse afin de promouvoir des conditions propices pour la transformation des lymphocytes B infectés.

Les protéines LMP agissent comme des ligands constitutivement actifs indépendants des récepteurs (Gires et al., 1997). LMP1 est la protéine transformante majeure de l'EBV et se comporte comme un oncogène pouvant permettre la transformation cellulaire, par l'EBV, des cellules épithéliales ou lymphocytaires B ou T. La protéine LMP1 est une protéine transmembranaire qui est un homologue fonctionnel de CD40. Le récepteur CD40 possède la capacité d'augmenter *in vivo* et *in vitro* la croissance et la survie des lymphocytes B. LMP1 est une protéine de 63 kDa divisée en trois domaines. La région N-terminale (1-23) permet l'adressage de LMP1 vers la membrane plasmique. Le second domaine (24-186) est composé de six hélices α hydrophobes transmembranaires et il est impliqué dans l'oligomérisation. Le dernier domaine correspond à la région C-terminale (187-386). Grâce à ce dernier domaine, LMP-1 (*bnfl1* ou *lmp1*) va interagir avec les molécules dites «TRAFs» (tumor-necrosis-factor receptor associated factors) qui interviennent dans la voie de signalisation NF- κ B induite par le récepteur TNF (Huen et al., 1995; Mosialos et al., 1995). NF- κ B est un facteur de transcription cellulaire régulant de nombreux gènes dont le produit est impliqué dans la réponse immunitaire ou inflammatoire. De plus, LMP-1 modulera la sécrétion de cytokines. Elle active aussi les voies JAK/STAT et la petite GTPase Cdc42. Grâce à cette intervention sur les voies de signalisation, LMP-1 évite aux cellules B de se diriger vers l'apoptose, provoque leur prolifération et module le cytosquelette.

Le gène *lmp2* est transcrit en deux ARNm différents à partir de deux promoteurs bien distincts, après circularisation du génome viral. Ces deux transcrits vont être ensuite traduits en deux protéines différentes, LMP2A (13 kDa) et LMP2B (40 kDa). LMP2A est une protéine transmembranaire de 497 acides aminés. Elle est composée d'une région C-terminale de 27 acides aminés, d'une région très longue de 12 domaines transmembranaires, et enfin d'un long domaine N-terminal cytoplasmique de 119 acides aminés responsable de ses fonctions. LMP-2A va intervenir sur la survie des cellules B en mimant le signal de survie induit par le récepteur BCR *via* les tyrosines kinase de la famille Src (Caldwell et al., 1998). De plus, LMP-2A conserve des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) ou SH2 pouvant interagir avec les tyrosines kinases Fyn ou Syk afin d'éviter

l'activation des lymphocytes B infectés (Longnecker, 2000). Son activité va être modulée par la protéine LMP-2B.

Le produit du gène *barf1* code une protéine de 33 kDa (BARF1 ou p33). La partie extracellulaire, peut être sécrétée dans le milieu après clivage (Strockbine et al., 1998). Elle est alors capable de se lier au CSF-1 (colony-stimulating factor) et inhibe son effet prolifératif. CSF-1 est important pour présenter une réaction immunitaire efficace et BARF1 (BamH1-A Reading Frame-1) permettra d'éviter cela. Elle a aussi été identifiée comme potentiellement oncogénique et l'acide aminé N-terminal 49 semble essentiel à son pouvoir transformant (Sheng et al., 2001). Nous verrons lors de la présentation des pathologies, que les carcinomes gastriques et du cavum (NPC) associés au virus d'Epstein-Barr n'expriment pas la protéine de latence LMP-1. L'expression de BARF1, quant à elle, est très fortement répandue dans ces types de cancers : 100% des cancers gastriques et 85% pour les NPC associés au virus d'Epstein-Barr (Decaussin et al., 2000). BARF1 pourrait remplacer LMP-1 quand celle-ci est anormale. C'est lors des stades de latence I à III que peuvent s'établir certaines pathologies comme les lymphomes de Hodgkin ou des carcinomes du cavum. Le lymphome Hodgkinien et les carcinomes expriment la protéine EBNA-1 mais vont différer concernant l'expression des gènes *lmp* (Rickinson and Kieff, 2007).

Le virus d'Epstein-Barr peut infecter *in vitro* des cellules B primaires et les convertir en cellules immortalisées (LCLs : Lymphoblastoid cell lines). Ces cellules présentent la latence de type III avec expression des six protéines nucléaires (EBNA-1 à EBNA-6) et les protéines LMP (LMP1, 2a et 2b) (Rickinson and Kieff, 2007). L'expression de ces protéines virales va conduire à un changement du profil d'expression de certains gènes cellulaires ainsi que des voies de signalisation. Au cours de ce processus de transformation, il y a une forte expression du miARN cellulaire miR155 et l'inhibition de ce dernier va bloquer la croissance des LCLs (ce qui n'est pas le cas des cellules B non immortalisées) (Linnstaedt et al., 2010).

La transition entre les deux cycles et les éléments déclenchant la mise en place du cycle productif restent mal connus. Un des éléments importants dans cette transition est l'existence de microARN dont les cinq membres de la famille miR200 (Bracken et al., 2008). Ces derniers régulent négativement l'expression du facteur de transcription EB1, maintenant ainsi le virus latent.

B) Cycle productif

Le cycle productif aura toute son importance lors de la transmission de l'infection d'un hôte à un autre. Précédemment, nous avons vu que l'établissement d'un carcinome ou lymphome associé au virus d'Epstein-Barr avait lieu au cours des stades de latence I et II. En revanche, la survenue d'une réactivation menant au cycle productif pourrait corrélérer avec les stades avancés de la pathologie (Lei et al., 2000; Lo et al., 2001). Sa détection avant diagnostic pourrait même correspondre à un facteur de risque, prévenir de l'apparition de la tumeur (Chien et al., 2001). La leucoplasie orale chevelue (OHL) est une pathologie pouvant avoir lieu chez les patients immunodéprimés et caractérisée par la présence d'un cycle productif (Greenspan et al., 1985; Young et al., 1991). L'usage des anti-rétroviraux anti-VIH, chez les personnes infectées par le VIH, fait que cette pathologie disparaît progressivement (essentiellement dans les pays du Nord).

La réplication virale, au cours de ce cycle, aura lieu à partir d'une origine de réplication nommée ori-Lyt. L'ori-Lyt contient deux régions : le promoteur BHLF1 et un second distant de 0.5 kb nécessaire pour la réplication. Le promoteur BHLF1 possède des domaines ZRE (Zta responsive element). Ces domaines ZRE peuvent être reconnus par le facteur de transcription viral EB1 dont nous parlerons. BMRF1 (facteur associé à la polymérase), BALF2 (protéine de liaison à l'ADN simple brin), BALF5 (polymérase), BSLF1 (primase), BBLF4 (hélicase) et BBLF2/3 (protéine accessoire de la primase) forment les gènes clés de la réplication (Fixman et al., 1992) et sont indispensables pour le passage de la phase précoce à la phase tardive du cycle productif. L'hélicase, la primase et la protéine accessoire de la primase s'associent en un complexe nucléaire (Yokoyama et al., 1999).

La réactivation virale va être contrôlée par le niveau des deux transactivateurs EB1 et Rta (Feederle et al., 2000). Lors de l'étape initiale de réactivation du virus, EB1 et Rta stimulent leur propre expression (gènes précoces immédiats). De manière réciproque et coopérative, chacun d'eux induit la cascade du cycle productif (Adamson et al., 2000). Ils conduiront de manière indépendante ou en synergie à la transcription des gènes dits précoces puis des gènes tardifs (Amon and Farrell, 2005) (figure 5).

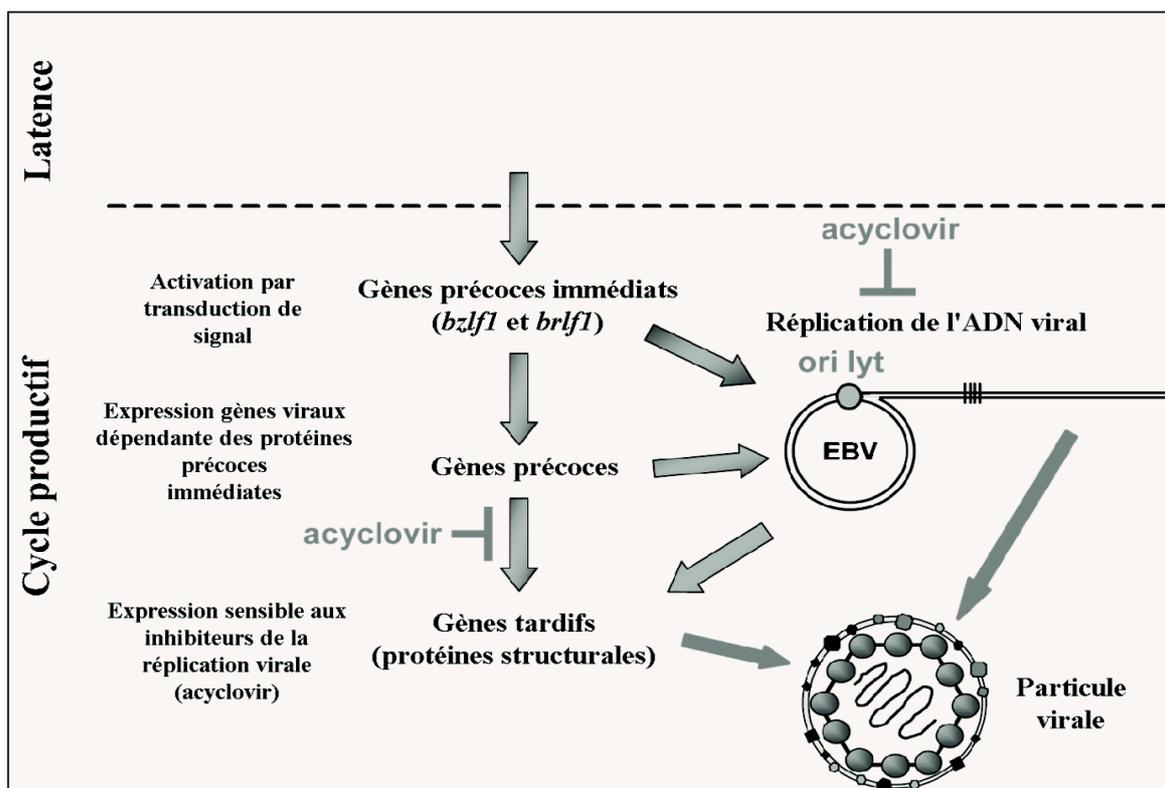


Figure 5 : Cycle productif du virus d'Epstein-Barr

Les gènes du cycle productif sont transcrits dans l'ordre suivant : gènes précoces immédiats (codant EB1 et Rta), gènes précoces puis gènes tardifs. Ce cycle amène à la production de particules virales. La réplication virale et l'expression des protéines tardives peuvent être inhibées lors du traitement par l'Acyclovir. D'après W. Amon and P. J. Farrell, Rev. Med. Virol. (2005), 15: 149–156

a- Gènes précoces immédiats EB1 et Rta

Le premier élément clé déclenchant le cycle productif est le facteur de transcription viral EB1 (ou Zebra, Zta) codé par le gène *bzlfl*. Ce facteur de transcription de 246 résidus fait partie des sept protéines impliquées dans la réplication virale (Fixman et al., 1995). EB1 possède une forte homologie avec les facteurs cellulaires c-Fos and c-Jun, c'est un membre des facteurs de transcription dits "basic zipper" (bZIP) qui sont capables de se fixer aux sites AP-1 (TGAGTCA) (Farrell et al., 1989). Ce facteur de transcription se lie aussi à des domaines ZRE (qui ont dans leur séquence un site AP-1) et peut activer la transcription des gènes *brlfl* ou *bzlfl* puis des gènes viraux précoces. EB1 peut également se fixer au domaine particulier de la réplication dit « ori-Lyt » (Gruffat et al., 1990). La réplication virale est alors mise en place et la cascade d'expression des gènes viraux du cycle productif est initiée. Nous verrons

plus loin que ce dernier interagit avec des facteurs cellulaires, modulant ainsi leur activité ou leur localisation. EB1 peut être phosphorylée par diverses kinases : la protéine kinase C (PKC) au niveau de deux sites (T159A/S186A), la caséine kinase 2 (CK2) aux sites S167 et S173, potentiellement une JN Kinase au site T14 et la kinase virale (*bglf4*) (Asai et al., 2006; Baumann et al., 2000; El-Guindy et al., 2006). Cependant, cela n'est pas indispensable pour l'activité elle-même d'EB1, mais plutôt nécessaire aux étapes conduisant à l'expression de ce facteur de transcription (El-Guindy et al., 2002). Toutefois le cycle productif peut être induit indépendamment de la voie de phosphorylation de la PKC (Gradoville et al., 2002).

EB1 est essentielle pour la réplication de l'ADN viral et l'expression des gènes du cycle productif. L'étude de mutants au niveau de ce facteur de transcription ont permis d'observer cela (Feederle et al., 2000). Des essais utilisant des ARN interférence visant l'expression de EB1 peuvent, *in vitro*, éviter les étapes précoces et tardives du cycle productif (Chang et al., 2004). Blimp-1 (B-lymphocyte-induced maturation protein) intervient dans le déclenchement du cycle productif. En effet, cette protéine est un répresseur transcriptionnel et pourrait éventuellement éviter l'intervention répressive d'un facteur cellulaire sur le promoteur de *bzlf1*. Ce mécanisme, dans les cellules B, se déroule *via* la régulation négative de Pax5 (Paired box protein 5), qui à son tour réprime le transactivateur du promoteur d'EB1 : Xbp1 (X Box binding Protein). Pax-5 est un facteur de transcription qui joue un rôle dans le développement des cellules B. Les cellules épithéliales ne présentent pas l'expression de Pax5 et Xbp1. Cet élément met donc en vue une différence, entre les cellules épithéliales et les cellules B, concernant l'activation de la transcription de *bzlf1* (Buettner et al., 2012).

Le domaine de dimérisation d'EB1 est capable de s'associer avec une partie du domaine C-terminal du suppresseur de tumeur p53 (Zhang et al., 1994). p53 va éviter le passage vers le cycle productif et, en se fixant au domaine C-terminal (qui possède deux sites potentiels de phosphorylation), EB1 peut altérer la fonction de p53. La balance entre les deux cycles peut dépendre des proportions entre ces deux protéines. Une autre protéine cellulaire partenaire de p53, 53BP1, régule par son interaction avec EB1 la réplication virale. La protéine nucléaire 53BP1 est impliquée dans la voie de réparation de l'ADN (voie qui est notamment activée lors de l'expression de protéines de latence par le virus d'Epstein-Barr). Dans cette interaction, les parties C-terminales des protéines sont mises en jeu (Bailey et al., 2009). Ainsi l'activation du complexe cellulaire de réparation de l'ADN sera atténuée (en diminuant, par exemple, l'expression des protéines virales déclenchant cette activation). En effet, ce mécanisme mis en route par la cellule empêche la transformation par le virus et la

prolifération des lymphocytes infectés *via* deux kinases cellulaires essentielles : Chk2 (Checkpoint kinase 2) et ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) (Nikitin et al., 2010).

La structure d'EB1 a été résolue au laboratoire. Nous verrons plus tard que cette dernière peut être une cible de choix en thérapeutique et des ligands visant à bloquer son activité peuvent être élaborés. Le domaine candidat pour cette inhibition semble être le domaine de dimérisation (Petosa et al., 2006). EB1 possède l'organisation suivante : un domaine d'activation transcriptionnelle (1-167 aa)- un domaine de régulation (168-177 aa)- un domaine de reconnaissance de l'ADN (178-194 aa)- un domaine de dimérisation (195-227 aa) et une région accessoire stabilisatrice de l'homodimère (228-245 aa) (figure 6).

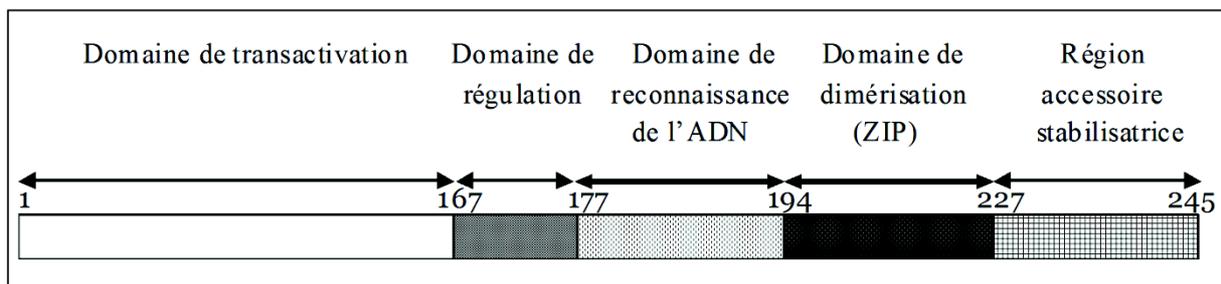


Figure 6 : Structure schématique d'EB1

EB1 possède cinq domaines illustrant l'activité transcriptionnelle, la reconnaissance de l'ADN et une capacité de dimérisation

De façon surprenante, il a été démontré qu'EB1 extracellulaire peut s'accrocher à la surface (au niveau des protéoglycanes héparanes sulfates) de la cellule lymphoïde et traverser la membrane (de manière similaire à l'endocytose) pour finalement rejoindre le noyau cellulaire (Mahot et al., 2005). Une approche originale viserait à utiliser EB1 comme un outil, vecteur thérapeutique. En effet, EB1 a la particularité de traverser la membrane, s'accumuler dans le noyau des cellules B et pourrait être utilisée comme transporteur de protéines d'intérêt. Cette entrée s'exécute indépendamment des voies d'endocytose (Rothe et al., 2010).

L'implication d'EB1 dans le développement de lymphome a été démontré *in vitro* et chez la souris SCID (Severe Combined Immunodeficiency) (Hong et al., 2005). Lorsque des LCLs (dont la souche virale utilisée pour les obtenir est déficiente pour l'expression d'EB1) sont inoculées à des souris SCID, ces dernières ne présentent pas l'apparition de lymphoprolifération. La restauration de l'expression d'EB1 entraîne l'établissement de phénomènes lymphoprolifératifs et l'utilisation d'antiviraux comme l'ACV n'évite pas ce processus suggérant l'importance d'EB1 dans ce mécanisme. De plus, un modèle de souris humanisée a été élaboré pour tester les effets du cycle productif du virus d'Epstein-Barr sur

l'établissement des lymphomes (Ma et al., 2011). Une comparaison a été réalisée entre une infection par le virus délété pour EB1 et le virus contrôle. Dans les deux cas, la latence peut s'établir. Lors de l'infection des souris par le virus délété pour EB1, nous observons un développement tumoral moins important. Ces travaux indiquent l'importance de la transmission horizontale du virus lors de la formation des lymphomes (probablement pour entretenir un réservoir de cellules latentes infectées). Ces modèles murins peuvent être utile pour étudier les pathologies associées au virus d'Epstein-Barr et soulignent l'intérêt de développer des molécules inhibitrices d'EB1.

Le deuxième facteur de transcription mis en jeu est la protéine Rta codée par le gène *brlf1*. Contrairement à EB1, elle ne présente pas d'homologie de séquence avec des facteurs de transcriptions cellulaires. Elle contient un domaine de liaison à l'ADN ainsi qu'un domaine d'homodimérisation du côté N-terminal. En position C-terminale, nous avons un domaine d'activation transcriptionnel (Manet et al., 1991). Rta pourra activer de manière directe la transcription de certains gènes du cycle productif (*bmlf1*, *bmrfl* et *bhrfl*). Elle agira comme un « enhancer » en fixant directement le site consensus riche en GC (GNCCN₉GGNG) appelé RRE (Rta response element), présent notamment au niveau des promoteurs des gènes viraux *bmrfl*, *bmlf1* et *balf2* (Gruffat et al., 1990). Lors de sa fixation au niveau des sites RRE, Rta va interagir directement avec TBP et TFIIB pour activer la transcription (Manet et al., 1993). Rta est aussi capable d'activer indirectement la transcription de quelques gènes comme *bzlf1* et lui-même (Ragoczy et al., 1998). Rta a été observé comme interagissant avec une seule protéine virale : LF2 (Heilmann et al., 2010). La protéine virale LF2 évite la réactivation virale, *via* ce facteur de transcription, en délocalisant Rta hors du noyau cellulaire (vers le cytosquelette). Nous éviterons ainsi la transcription des gènes viraux *bmrfl*, *bmlf1* et *balf2* (Calderwood et al., 2008). En revanche, LF2 n'affecte pas la transcription de *brlf1* (gène codant Rta). Il se pourrait qu'il s'agisse d'une séquestration de Rta par LF2.

L'action synergique de ces deux facteurs de transcription viraux est un élément clé et permettra une transcription très efficace de certains gènes viraux du cycle productif. Une publication réalisée en 2010 montre qu'EB1 et Rta sont associées en complexe en partenariat avec la protéine cellulaire MCAF1 (MBD1-containing chromatin-associated factor 1) au niveau des ZRE (Chang et al., 2010). Cela n'est pas le cas au niveau des RRE et expliquerait pourquoi les deux facteurs de transcription viraux utilisent les ZRE pour transcrire en synergie les gènes viraux précoces comme *brlf1* (qui n'a pas de RRE). MCAF1 permet la méthylation

de l'histone H3 *via* le complexe SETDB1/ESET (Chang et al., 2010). Elle interagit aussi avec MBD1 et rendra possible la répression des gènes dépendants de MBD1. De plus, elle joue les intermédiaires entre Rta et SP1, engendrant ainsi l'autorégulation de la transcription du gène viral *brlf1*. Rta semble éviter l'association entre les protéines KSR1 (Kinase Suppressor of Ras) et BRAP2 (BRCA-1 binding protein), activant ainsi le voie de signalisation et la transcription du gène *bzlf1*. L'activation de cette voie peut être importante pour la continuité et le maintien du cycle productif car l'absence de transcription du gène *bzlf1* est absolument nécessaire pour la conservation de la latence et la transformation des cellules B.

b- Gènes précoces

La protéine EB2 (Mta ou SM) est codée par le gène *bmlf1* et exprimée tôt lors du cycle productif. Phosphoprotéine nucléaire de 60 kDa, elle fait partie des protéines de la famille PML (Promyelocytic leukemia protein) et joue un rôle dans l'inhibition de la transcription d'un grand nombre de gènes cellulaires. EB2 permet l'export et « l'accumulation », dans le cytoplasme, d'ARNm viraux non épissés codant des protéines virales impliquées dans la réplication ou des protéines structurales virales tardives comme Balf4 (Gruffat et al., 2002). Elle a aussi la capacité de voyager entre le noyau et le cytoplasme. En utilisant un mutant délété pour *bmlf1* (EB2), Gruffat et al. (2002) montrent que le complexe EB2/Mta est essentiel pour la production des particules virales. Afin de mieux comprendre le lien entre cette protéine virale et les protéines cellulaires impliquées dans le traitement des ARNm, les partenaires cellulaires d'EB2 ont été recherchés par double hybride {Juillard, 2012 #466}. EB2 interagit avec trois protéines cellulaires (SF2, SRp20 et 9G8) membres de la famille protéique SR. Ces travaux ont aussi démontré que SRp20 régule négativement l'accumulation des ARNm viraux tardifs et que cet effet peut être contrebalancé par la protéine virale EB2.

La famille des protéines Bcl2 (B-cell leukemia protein-2) sont connues pour induire ou réprimer le phénomène de mort cellulaire par apoptose. Bcl2 va s'associer avec Bax pour l'empêcher d'initier l'apoptose. Le virus d'Epstein-Barr présente deux orthologues de ces protéines : BHRF1 ou EA-R (*bhrf1*) et BALF1 (*balf1*). BHRF1 est une protéine membranaire de 17 kDa ayant une activité anti-apoptotique qui peut tout de même être présente en concentration extrêmement faible au cours du cycle latent (Henderson et al., 1993). Quant à BALF1, il s'agit d'une protéine de 25 kDa ayant un rôle pro-apoptotique.

Les promoteurs des gènes *bmrfl* et *bhrfl* contiennent des RE (responsive elements) pour les facteurs de transcription EB1 et Rta qui les réguleront de manière différente (Cox et al., 1990) (Holley-Guthrie et al., 1990). p50/52 (*bmrfl*) agit comme un facteur de processivité de la polymérase BALF5. Suite à la fixation de EB1 au niveau de l'ori-Lyt, BMRF1 sera recrutée de manière indirecte (*via* SP1/ZBP89). De manière synergique EB1 et BMRF1 induisent la transcription du promoteur BHLF1. Dans le cas des cellules lymphoïdes, l'induction de l'expression de *bmrfl* nécessite la coopération de EB1 et Rta, alors que pour les cellules épithéliales, EB1 semble suffisante (Feederle et al., 2000) (Ragoczy and Miller, 1999).

Le gène *BCRF1* code une interleukine virale de 20 kDa orthologue à l'IL-10. Elle sera impliquée dans la modulation de la réponse immunitaire locale, l'inhibition de l'activité des macrophages et des cellules NK, puis la production d'interféron γ (Kanegane et al., 1997). Elle va former un complexe au niveau du site TATT, présent au niveau des promoteurs de gènes viraux du cycle productif (gènes tardifs), qui sera important pour la transcription de ces gènes viraux (Gruffat et al., 2012). Si *bcrfl* est muté, le cycle productif est arrêté après la synthèse de l'ADN viral. Dans ce cas, les gènes tardifs peuvent ne pas être exprimés.

Lorsqu'une cellule est infectée, le mécanisme appelé TAP (Transporter associated with Antigen- Processing) peut avoir lieu. Les protéines TAP-1 et TAP-2 forment un transporteur dépendant de l'ATP à la membrane du réticulum endoplasmique. Grâce à ce transporteur, les peptides issus après dégradation par le protéasome vont pouvoir rejoindre le réticulum endoplasmique où ils seront associés à une molécule du CMH de classe 1. Les peptides antigéniques sont conduits jusqu'à la membrane cellulaire et cette présentation à la surface sera détectée par le système immunitaire de l'hôte. Pour échapper à cela, la protéine virale BNLF2A (*bnlf2a*) de 6 kDa entre en action en bloquant l'interaction des peptides avec les transporteurs du système TAP (Wycisk et al., 2011).

Les autres protéines codées par les gènes précoces ne seront pas traitées ici.

c- Gènes tardifs

Leurs produits constitueront les protéines structurales des particules virales (capside, glycoprotéines d'enveloppe). Les glycoprotéines ont été les plus étudiées et nous présenterons seulement quelques exemples.

Il existe plusieurs protéines d'enveloppe qui ne seront pas toutes présentées dans ce manuscrit. Le complexe majeur est celui de la gp350/220 (codé par le gène *blf1*). Il s'agit là d'un polypeptide pouvant subir un épissage alternatif. C'est la région N-terminale du complexe protéique gp350/220 qui va se lier au récepteur CD21 (ou CR2 qui est le récepteur du composant du complément C3d) des lymphocytes B (Fingeroth et al., 1984). Cette interaction va provoquer le phénomène d'endocytose et l'entrée du virus dans la cellule. A ceci s'ajoute le déclenchement de la voie de signalisation tyrosine/PI kinase et NF- κ B (Sugano et al., 1997). Cependant, d'autres protéines virales peuvent être impliquées dans l'attachement à la cellule hôte. En effet, un virus déficient pour le complexe gp350/220 peut tout de même infecter des cellules lymphocytaires B et des cellules épithéliales (Janz et al., 2000). L'hypothèse suivante peut être proposée: l'attachement du virus sur les cellules B se fait premièrement par l'interaction *via* le complexe gp350/220–CD21 et cela est renforcé par la fixation de la glycoprotéine gp42 aux molécules HLA (Human Leukocyte Antigen) de classe II.

Pour finir, la fusion entre le virus et la cellule B serait médiée par le complexe gH/gL (Lake and Hutt-Fletcher, 2000). La glycoprotéine gL se compose d'un domaine D-1 (Matsuura et al., 2010) (figure 7). Ce domaine sera en étroite interaction avec celui de gH lors de la formation du complexe. Quant à gH, elle est divisée en quatre domaines. D-I et D-II sont séparés par 3 hélices et D-IV se compose de deux feuillets β antiparallèles. D-II et D-IV jouent un rôle essentiel lors de la fusion avec la membrane cellulaire. Les cellules épithéliales ne présentant pas de molécules HLA de classe II, gp42 n'interviendrait pas mais le complexe gH/gL se lierait aux intégrines *via* le domaine D-II.

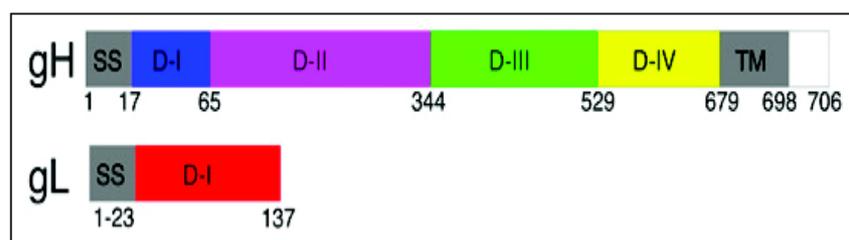


Figure 7 : Organisation des glycoprotéines virales gH et gL

Les glycoprotéines gL et gH forment un complexe au niveau de leurs domaines D-I (unique domaine pour gL). gH est divisée en quatre domaines dont D-II et D-IV impliqués dans le processus de fusion avec la membrane. Les résidus présents au début et à la fin de chaque domaines sont indiqués. D'après H. Matsuura et al., PNAS (2010), 107 (52) : 22641–22646

La protéine d'enveloppe gH ou gp85 (*bxlf2*) forme un complexe avec deux autres glycoprotéines, gL (*bkrf2*) et gp42 (*bzlf2*). Cette association tripartite sera impliquée dans l'entrée du virus dans les cellules B et utilise les molécules de surface HLA de classe II comme corécepteur. A cette machinerie de fusion s'ajoute la protéine gp110.

La glycoprotéine gp110 ou gB (*balf4*) présente un domaine N-terminal, trois régions potentielles d'ancrage à la membrane et un domaine C-terminal. Le domaine C-terminal localisé dans le nucléoplasme produirait des signaux responsables de l'assemblage des nucléocapsides (Lee and Longnecker, 1997). Cette glycoprotéine va être essentielle pour l'étape suivant l'adhésion virale, elle améliore la capacité du virus à infecter la cellule (surtout les cellules épithéliales). En revanche, elle ne sera pas impliquée lors de la réplication et la production de particules virales. Le taux de protéines gp110 incorporées varie et sera particulièrement déterminant pour le ciblage des cellules pouvant être infectées (pour la fusion virus-cellule) et le tropisme viral (Neuhierl et al., 2002). Elle est produite sous la forme d'une pro-protéine qui nécessite un clivage au niveau du motif RXX/RR par la furin convertase pour être active (Sorem and Longnecker, 2009).

La coexpression des glycoprotéines gN (*blrf1*) et gM (*bbrf3*) est requise lors de la maturation des virions (Lake et al., 1998).

Les protéines gp60 (*bilf1*) de 34kDa et BMRF2 (*bmrfl2*) de 39 kDa sont prédites comme ayant de multiples domaines transmembranaires (Hutt-Fletcher and Lake, 2001). BMRF2 est une protéine membranaire pouvant interagir avec les intégrines pour faciliter l'infection de surfaces basolatérales des cellules épithéliales par le virus d'Epstein-Barr (Tugizov et al., 2003).

Enfin, la protéine membranaire gp78 (*bilf2*) de 27 kDa a une fonction encore indéterminée. Toutefois, il est intéressant de noter que le dosage d'anticorps dirigés contre cette protéine virale semble pouvoir être utilisé pour le diagnostic de carcinome du cavum (Gu et al., 2008).

d- Induction du cycle productif

TGF- β (Transforming growth factor β), en association avec les protéines Smad3/Smad4 et c-Jun/c-Fos, peut induire le cycle productif (Liang et al., 2002). Le site de liaison avec Smad4, GTCTG (-233 to -229) est localisé dans la région régulatrice du promoteur de *bzlf1*.

L'utilisation d'anti-IgG provoque la voie de signalisation induite normalement par la fixation de l'antigène sur son récepteur BCR (B-Cell Receptor). Le facteur de transcription viral est alors exprimé et le cycle productif est initié.

Les esters de phorbol vont directement activer la protéine kinase C (PKC) qui est une kinase sérine/thréonine. Cette kinase est capable de phosphoryler EB1 (notamment au niveau de la sérine S186), améliorant sa fixation à l'ADN cible et son activité transcriptionnelle (Baumann et al., 1998). Nous pouvons citer pour exemple le TPA (12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate qui est un analogue du diacylglycérol (activateur allostérique de la PKC).

Pour activer le cycle viral productif, il est envisageable d'employer des inhibiteurs d'histone déacétylase tels que le BA (Butyric acid) (Luka et al., 1979) ou le sodium valproate (VPA) (Feng and Kenney, 2006). Le SAHA est également capable d'induire le cycle productif du virus d'Epstein-Barr et cela préférentiellement dans les cellules épithéliales (Hui and Chiang, 2010). Les inhibiteurs d'histone déacétylase ne sont pas efficaces lorsque le virus est en latence de type III.

Certains traitements utilisés en chimiothérapie peuvent avoir comme conséquence de réactiver le cycle productif du virus d'Epstein-Barr (comme la Gemcitabine et Doxorubicine) *via* des voies de signalisation (Feng et al., 2002).

Une dernière possibilité, beaucoup moins physiologique pour induire le cycle lytique, est de surexprimer le facteur de transcription EB1 ou Rta.

3- Latence et réactivation

Les régulations épigénétiques au niveau du gène *bzlf1* auront une grande importance lors de la mise en route du cycle viral productif. En effet, l'épisome viral va être sujet, au même titre que le génome de l'hôte aux modifications épigénétiques. Une étude menée sur les modifications épigénétiques du promoteur de EB1 dans des cellules de lymphome de Burkitt (Raji) a montré que les histones H3K27me3 et H4K20me3 seraient impliquées dans la répression de ce promoteur (Murata et al., 2012). L'histone H2AX intervient également et sera sous forme phosphorylée durant le cycle productif (phosphorylation commune à tous les herpesvirus). H2AX recrutera les facteurs impliqués dans la réparation de l'ADN et des facteurs de signalisation. Il a été clairement observé dans les cellules avec activité virale productive, une faible méthylation des promoteurs d'EB1 et Rta. Nous verrons d'ailleurs, à la fin de cette introduction, que les inhibiteurs d'histone déacétylases sont utilisés dans certains protocoles pour provoquer la mise en route du cycle productif.

Comme vu précédemment, la protéine virale EBNA-2 est un transactivateur de la protéine LMP-1. Lorsque l'expression d'EBNA-2 et la transcription de ces gènes cibles (dont *lmp1*) sont supprimées, le cycle productif viral peut être observé (Adler et al., 2002). Cela serait dû à LMP-1 qui bloque la transcription d'EB1, gardant ainsi le virus à l'état latent. Cette protéine virale a la possibilité de mimer le récepteur cellulaire CD40 « activé » et la stimulation par le CD40 ligand peut également préserver la conservation de latence. De cette manière, une réponse immunitaire lymphocyte T cytotoxique vis-vis des protéines virales précoces immédiates et précoces du cycle productif est déclenchée. Le virus, pour conserver la latence, va donc éviter que le cycle productif aboutisse jusqu'à la production de particules virales (Adler et al., 2002).

Un autre composant viral peut être déterminant dans l'établissement et la continuité de la latence ; il s'agit des miARN. Ces mi-ARN viraux cibleront soit des transcrits cellulaires, soit des transcrits viraux (*ebna2*, *lmp-1* et *bhrf1*). Ces derniers interviendront vis-à-vis de plusieurs mécanismes (transcription, signalisation, transport intracellulaire, cycle cellulaire, apoptose ...) et entretiennent un environnement propice pour le virus (Riley et al., 2012) (figure 8).

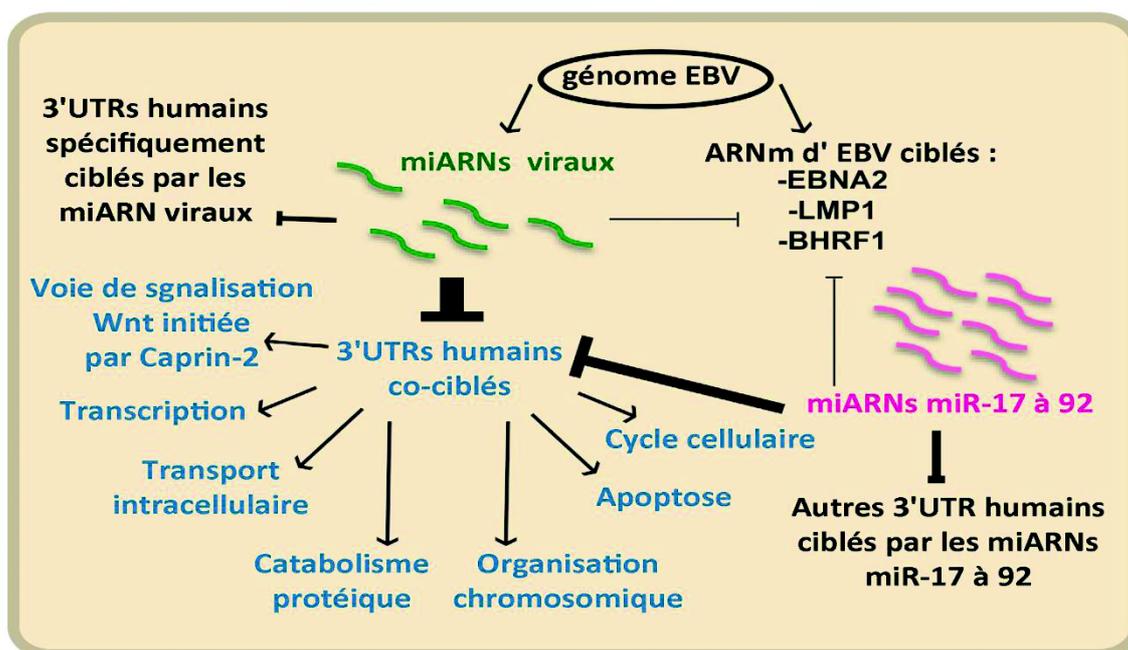


Figure 8 : Résumé des cibles des miARN cellulaires et viraux dans les cellules Jijoye

Les cellules Jijoye sont des cellules de lymphome de Burkitt. Dans cette lignée cellulaire, les miARN d'EBV vont cibler d'une part des 3'UTR de gènes humains mais également des ARNm viraux. Les miARN mir-17 à 92 sont capables de cibler des ARNm d'EBV. Une grande partie des 3'UTR sont co-ciblés par les miARN viraux et les miARN humains miR-17 à 92. D'après K. J. Riley et al., EMBO J. (2012), 31 : 2207–2221

Les miARN dans le système du virus d'Epstein-Barr sont organisés en deux clusters : trois se retrouvent adjacents au gène *bhrf1* et les vingt restants sont compris au niveau de l'intron du transcrit du gène *bart* (cluster BART) (Pfeffer et al., 2004) (Cai et al., 2006). L'expression de ces ARN non codants va varier suivant le stade de latence (le premier sera exprimé surtout durant la latence de type III et le second pendant celle du type I/II). Lors de la latence de type III, les miARN viraux vont jusqu'à représenter 25% des miARN présents dans la cellule hôte. Leur expression sera tout particulièrement présente avant l'induction de cycle productif (Cai et al., 2006).

Des éléments cellulaires sont aussi à prendre en compte dans la conservation de la latence ou le basculement vers le cycle productif. La protéine cellulaire JDP2 (Jun Dimerization Protein 2) en est un bon exemple. Partenaire du facteur de transcription c-Jun de la famille basic leucine Zipper, elle va jouer un rôle dans le maintien du virus d'Epstein-Barr sous forme latente. En effet, JDP2 va recruter l'histone déacétylase 3 au niveau du promoteur des gènes ciblés amenant à éviter leur transcription. Parmi les gènes ciblés, on peut trouver le gène viral

bzlf1. Lorsque la transcription du gène codant JDP2 est « éteinte » *via* la transfection d'un siARN le ciblant, une forte activité transcriptionnelle de *bzlf1* est observée (Murata et al., 2011). Nous pouvons aussi évoquer les protéines cellulaires ZEB1 et ZEB2 qui répriment l'expression du gène *bzlf1*, régulant ainsi le passage entre latence et cycle productif (Ellis et al., 2010). En évitant l'initiation du cycle productif, elles seront impliquées lors de la persistance du virus sous forme latent.

Toujours en faveur du maintien de la latence, le facteur de transcription cellulaire MEF2 (Myocyte Enhancer binding Factor 2) semble jouer un rôle important. Il va se fixer au niveau des sites ZID présents au niveau du promoteur de EB1 et recruter des histone déacétylases de classe II (Gruffat et al., 2002).

Spécifiquement dans les cellules ayant un souche virale dite « Akata », le traitement par des anti-IgG entraîne une surexpression des protéines cellulaires EGR1, 2, 3 (Early Growth Response) et NR4a1, a3 (Nuclear orphan Receptors) (Ye et al., 2010). EGR1 active la transcription des gènes *bzlf1* (de manière indirecte) et *brlf1*. L'utilisation d'un inhibiteur de la PKC peut éviter l'expression d'EGR1 ainsi que les facteurs de transcription viraux EB1 et Rta. Si on « éteint » l'expression d'EGR1 par l'emploi de siARN, l'activation du cycle productif peut être évitée. Il est tout de même clair que la transcription de ces gènes cellulaires ne suffit pas, à eux seuls, pour initier le cycle productif.

Le virus d'Epstein-Barr et le paludisme causé par le parasite *Plasmodium falciparum* sont deux cofacteurs reconnus dans les cas de lymphome de Hodgkin associés au virus d'Epstein-Barr. Il s'avère que l'infection par le parasite conduit à une réactivation du virus d'Epstein-Barr (Chene et al., 2007). Une des explications viendrait d'une protéine parasitaire *pfEMP1* exprimée à la surface du globule rouge infecté (plus précisément de son domaine CIDR1 α = Cystein-rich Inter-Domain Region 1) qui activerait l'expansion des cellules B dont celles infectées par le virus d'Epstein-Barr *via* son interaction avec les IgG des cellules B (peut-être de la même manière que le traitement par les anti-IgG). Elle n'est peut-être pas la seule protéine virale impliquée dans la réactivation qui peut participer (et non suffire) à l'établissement du lymphome de Burkitt. De plus, il a été montré que les infections récurrentes de malaria diminuent l'immunité T cellulaire vis-à-vis des antigènes des protéines du cycle productif du virus d'Epstein-Barr et non des protéines de latence (Snider et al., 2012). De la même façon, l'induction du cycle productif dans les cellules épithéliales gastriques infectées par le virus d'Epstein-Barr lors de l'infection par la bactérie *helicobacter*

pylori via sa production locale de monochloramine (NH₂Cl). Celle-ci amènerait à une accumulation de calcium intracellulaire corrélant avec une expression du facteur de transcription viral EB1 (Minoura-Etoh et al., 2006).

4- Pathologies associées au virus d'Epstein-Barr

Le fait d'être capable de persister et de pouvoir alterner entre cycle latent et cycle productif peut conduire à diverses pathologies. Le virus d'Epstein-Barr est capable d'infecter des cellules B et des cellules épithéliales. Dès 1970, le lien entre la pathologie et la présence d'Immunoglobulines A spécifiques dirigées contre les antigènes précoces du virus d'Epstein-Barr (EA=early antigen) a été fait chez des patients atteints d'un carcinome du cavum (Klein et al., 1970). Ce fut le premier virus identifié comme pouvant être associé à des cancers chez l'homme (Rickinson AB, 1996) (lymphomes de Burkitt et Hodgkin, carcinomes gastrique et du cavum) (Young et al., 1988; Young and Murray, 2003). En 1997, il fut classé comme agent cancérigène par l'organisation mondiale de la santé (OMS). L'infection par le virus d'Epstein-Barr peut être l'agent responsable de pathologies comme la mononucléose infectieuse. Cependant, ce virus peut engendrer de manière indirecte des pathologies dont les symptômes ne sont pas dûs au virus lui-même.

A) Pathologies causées par le virus d'Epstein-Barr

- Mononucléose infectieuse :

Elle survient essentiellement chez l'adolescent et le jeune adulte avec une incidence plus marquée entre 15 et 25 ans. Il va s'agir d'une réaction non contrôlée des lymphocytes T CD8+ (qui sont activés et vont proliférer) envers les cellules infectées, accompagnée d'une réplication virale active. Une latence de type III est établie et les lymphocytes B vont continuer à proliférer. En général, la mononucléose infectieuse se résout d'elle-même.

- Carcinome du cavum (NPC) :

Il existe deux groupes de NPC : non-kératinisé (le plus fréquent) et kératinisé. Le carcinome du cavum non-kératinisé est strictement associé avec une infection par le virus d'Epstein-Barr. Une forte incidence est retrouvée dans le sud-est de l'Asie et une incidence plus faible existe dans le nord de l'Afrique. EBNA-1 est exprimée, les ARN non codants EBERS sont présents, les transcrits de LMP-2A et LMP-2B sont détectés (latence de type II). La protéine LMP-2A sera détectée dans 50% des cas et LMP-1 dans 35% des cas. Occasionnellement, EB1, EB2 et BARF1 sont exprimées mais ce n'est pas le cas des autres protéines du cycle productif. Il arrive fréquemment de détecter des IgA ou IgG spécifiques des protéines virales précoces du cycle productif ou de la capsidie chez des patients. Comme évoqué, la protéine virale BARF1 va être très fortement exprimée et une surexpression de la protéine anti-apoptotique Bcl2 peut en découler. Nous pourrions observer un influx important de lymphocytes T cytotoxiques.

- OHL (oral hairy leukoplakia) :

Elle peut se développer chez les patients immunodéprimés, en particulier ceux infectés par le VIH. Exceptionnellement, nous aurons une combinaison du stade latent et du cycle productif. L'interleukine 10 virale sera tout particulièrement surexprimée dans cette pathologie (l'IL-10 humaine étant prédominante dans les autres types de cancers) (Hayes et al., 1999). Cette pathologie a disparu avec l'arrivée et l'utilisation des traitements antiviraux anti-VIH (sauf pour les pays dont les patients n'ont pas accès à ces médicaments).

B) Pathologies liées au virus d'Epstein-Barr

- Lymphome de Burkitt :

Il a été décrit par le Dr Denis Burkitt en 1958. Il est présent sous la forme endémique en Papouasie-Nouvelle Guinée et en Afrique (région équatoriale surtout) où il représente le cancer le plus commun en pédiatrie (Kutok and Wang, 2006). Il est présent aussi sous la forme sporadique dans les pays occidentaux. Le virus d'Epstein-Barr est associé dans près de

100 % des cas endémiques et 15-20% dans les cas sporadiques (sauf les patients infectés par le VIH où l'on atteint 30-40%). Le virus doit probablement conférer un avantage pour ce type de tumeur. Ce lymphome est marqué par une translocation au niveau du gène *c-myc* perturbant l'expression de son produit (qui sera surexprimé) et conduisant vers une voie anti-apoptotique. A ce moment-là, seule EBNA-1 est exprimée (latence de type I), accompagnée des ARN EBERs. Nous aurons une diminution de l'expression du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I, en inhibant les transporteurs responsables de leur présentation à la surface.

- Lymphomes non-Hodgkiniens :

Les lymphomes non-Hodgkiniens font partie des syndromes lymphoprolifératifs les plus agressifs. Ces lymphomes sont accompagnés par une perte de contrôle de l'infection par le système immunitaire de l'hôte. C'est principalement la réponse immunitaire due aux lymphocytes T qui fait défaut et permettra une lymphoprolifération. Certains de ces lymphomes présentent un taux élevé d'anticorps spécifiques de la protéine de capsid et d'EBNA-2 (Bertrand et al., 2010). Ils représentent moins de 5 % des lymphomes de cellules B dans la population générale. Ils concernent donc principalement les personnes immunodéprimées. Son incidence est 60 fois plus élevée chez des patients infectés par le VIH et tend à diminuer avec les multithérapies anti-VIH.

- Lymphome de Hodgkin :

Environ 40% des lymphomes de Hodgkin « classiques » sont associés au virus d'Epstein-Barr (Kutok and Wang, 2006). Chez les patients infectés par le VIH, il est associé au virus d'Epstein-Barr dans près de 100% des cas. Cette pathologie concernera les lymphocytes B et est caractérisée par la présence de larges cellules uninucléées (cellules hogkin) et des géantes plurinucléées dénommées cellules de Reed-Stenberg (RS). La tumeur sera infiltrée de cellules de la réaction inflammatoire (neutrophiles, éosinophiles, lymphocytes, histiocytes, fibroblastes). Les cellules T qui s'infiltrent dans cette tumeur semblent être en grande partie des lymphocytes T régulateurs (CD4+ CD25+) (Kennedy-Nasser et al., 2011). Ces cellules T régulatrices joueraient un rôle dans l'inhibition de la réponse immunitaire antitumorale

retrouvée chez les patients. Une mutation au niveau des gènes d'immunoglobuline est un phénomène retrouvé dans ce type de tumeur. Si la mutation rend l'immunoglobuline moins affine ou non fonctionnelle, la cellule de Reed-Stenberg échappe à l'apoptose grâce à l'expression de NFκB. Dans ce type de lymphome, nous observons une latence de type II (présence des ARN non codants EBERs et expression d'EBNA-1, LMP-1 et LMP-2A).

- PTLD (post-transplant lymphoproliferative disease) :

Suite à une immunodépression chez les patients transplantés, la réponse cellulaire T cytotoxique est affaiblie et nous pouvons avoir apparition de PTLN (Kutok and Wang, 2006). Entre 80% et 90% des PTLN sont associés au virus d'Epstein-Barr. C'est une latence de type III qui est mise en place lors de cette pathologie. Elle est principalement issue de lymphocytes B. Nous observons principalement une réponse T cytotoxique spécifique des antigènes de protéines du cycle productif. On aura une très forte proportion de cellules T CD8+ spécifiques des protéines virales précoces immédiates (EB1 et Rta), une plus faible contre les protéines précoces BMRF1 et BMLF1.

- Lymphomes T et NK :

Ils sont rencontrés au sud-est de l'Asie et au Japon (Taylor and Blackbourn, 2011). Les lymphomes NK/T oraux sont systématiquement associés avec une infection par le virus d'Epstein-Barr avec un stade de latence type II. La seule absence du virus dans ces cellules, permet aux cliniciens d'exclure ce type de diagnostic. Les lymphocytes T expriment très faiblement le récepteur CD21 et peuvent être tout de même une cible pour le virus d'Epstein-Barr. Nous notons une prolifération des lymphocytes T qui exprimeront du TNFα (tumor necrosis factor), de l'interféron γ et des cytokines pouvant activer les macrophages. Dans la majorité des cas, ces cellules T n'expriment pas de CD3, ni de TCR (T cell receptor) à leur surface.

- X-LPS (X-linked lymphoproliferative syndrome) :

Le X-LPS est causé par une mutation au niveau d'un gène codant la protéine SAP (SLAM-associated protein) impliquée dans la voie de signalisation d'activation des lymphocytes B. Les molécules SLAM (Signaling lymphocyte activation molecule) sont des ligands présents à

la surface des lymphocytes B, T et NK; si elles interagissent entre-elles, il y aura transduction d'un signal. La protéine SAP va jouer le rôle de régulateur négatif en s'interposant entre les deux molécules SLAM. En cas de mutation, la protéine SAP ne sera pas fonctionnelle et la réponse immunitaire suite à l'infection primaire par le virus d'Epstein-Barr va être extrêmement forte, disproportionnée.

Les pathologies suivantes sont sujettes à controverse. En effet, leur association avec le virus d'Epstein-virus n'a pas encore été clairement démontré et établi.

- Carcinome gastrique :

Il a une grande incidence dans le sud-est de l'Asie, le Groenland et l'Amérique du sud. Cette distribution suggère un mécanisme similaire avec les NPC. Nous retrouvons une latence de type I avec transcription des gènes *ebna1*, *eber*, *lmp2*. Comme dans les NPC, BARTF1 est fortement exprimée.

- Sclérose en plaques :

La sclérose en plaques (SEP) a pour principaux effets une inflammation chronique du système nerveux central accompagnée d'une démyélinisation (la myéline étant la gaine lipidique protectrice entourant les fibres nerveuses) remplacée par de tissu conjonctif. Il s'agit d'une pathologie strictement humaine. Outre des facteurs environnementaux et une déficience en vitamine D, l'agent causal n'a pas été clairement identifié. Le virus d'Epstein-Barr pourrait être un candidat potentiel évoqué lors de plusieurs travaux. La probabilité de développer une SEP est très faible chez les personnes séronégatives pour le virus d'Epstein-Barr et ce risque est très amplifié après une primo-infection (Levin et al., 2010). Cliniquement, les personnes ayant contracté une mononucléose infectieuse sont deux à trois fois plus susceptibles de développer une SEP comparé aux personnes ayant eu une infection par le virus d'Epstein-Barr asymptomatique (Thacker et al., 2006). Le virus d'Epstein-Barr n'est pas le seul mis en lien avec la pathologie. Le MSR-V (Multiple sclerosis associated retroviral element) appartient à la famille des rétrovirus endogènes humains du type W (HERV-W) (Perron et al., 2012). Le modèle suivant est proposé : La réactivation d'un virus cofacteur (le virus d'Epstein-Barr, HSV, VZV par exemple) permettrait la transactivation du rétrovirus endogène HERV-W et

entraînerait une activation des macrophages. Le virus HERV-W va produire des particules virales et les macrophages activés ainsi que la microglie exprimeront la protéine d'enveloppe qui activera la voie TLR4. Ceci aura pour effet de provoquer le processus inflammatoire avec sécrétion de cytokines, de recruter des cellules T et des macrophages. Les lymphocytes T cytotoxiques seront activés par le superantigène et causeront la démyélinisation (Perron et al., 2012).

- Cancer du sein :

Lors d'une étude réalisée en 1999, le virus d'Epstein-Barr a été détecté chez 51% des patientes atteints du cancer du sein contre 10% chez les patientes saines (Bonnet et al., 1999). Ceci montre que le virus d'Epstein-Barr pourrait être un cofacteur éventuel lors de l'établissement de ce cancer. La survenue d'une mononucléose infectieuse a été évoquée comme un facteur de risque de développement de cancer du sein (Yasui et al., 2001). Il est proposé que des cellules B infectées par le virus d'Epstein-Barr puissent s'infiltrer, réguler positivement des facteurs nécessaires à l'invasion cellulaire et établir un environnement propice à la progression tumorale (Hippocrate et al., 2011). Cette hypothèse est appuyé par une analyse (des plusieurs études) menée en 2012 (Huo et al., 2012).

II) Approches thérapeutiques

1- Traitements utilisés lors des infections par les Herpèsvirus

Les deux principaux traitements utilisés pour traiter les patients infectés par un Herpèsvirus, sont des analogues nucléosidiques stoppant l'action de l'ADN polymérase virale des virus herpétiques : l'Acyclovir (ACV) et le Gancyclovir (GCV). Ils ont été découverts à la fin des années 70 (Schaeffer et al., 1978). Ces deux composés doivent être monophosphorylés pour être transformés en nucléotides et intégrés à l'ADN viral. L'activation et la phosphorylation de ces composés ont lieu *via* la protéine kinase virale PK (*bglf4*) (Meng et al., 2010). Etant donné que la thymidine kinase virale TK (*bxlf1*) peut être un substrat pour la protéine kinase PK, cette dernière serait impliquée dans la conversion du GCV ou ACV seulement après

phosphorylation par la PK (Zhu et al., 2009). L'ACV [9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine] est un analogue nucléosidique acyclique de guanosine qui est le plus communément utilisé lors des infections aux virus herpétiques comme HSV et VZV. Il inhibe la synthèse de l'ADN viral mais n'empêche pas la suppression de l'expression des gènes immédiats précoces (*bzlf1*, *brlf1*) et du gène précoce *bmrfl* dont la transcription est indépendante de la réplication virale (Takase et al., 1996). Le fait que l'expression de ces protéines ne soit pas affectée par l'ACV pourrait faciliter la récurrence du cycle productif, expliquant peut-être la fréquence des OHL et des réactivations du virus après traitement par cet antiviral. Trois mécanismes de résistance peuvent être envisagés : une délétion ou mutation rendant incapable le virus d'exprimer la kinase virale ou réduire l'affinité de l'ADN polymérase pour l'ACV ou conduisant la kinase virale à altérer son substrat (Coen and Schaffer, 1980; Schnipper and Crumacker, 1980). Le GCV (9-(1,3-dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine) inhibe l'ADN polymérase virale mais également l'ADN polymérase cellulaire amenant à une certaine cytotoxicité d'où son administration chez les patients les plus sévères (surtout en cas d'infection par le CMV où le GCV est nettement plus efficace que l'ACV). En ce qui concerne la résistance à cet antiviral, deux types de mutations altérant l'ADN polymérase y furent associées (Biron, 1991). Bien sûr ces traitements auront une action chez le patient si il existe une réactivation du virus. Ils seront surtout efficaces dans le traitement des OHL et moins utiles en cas de mononucléose infectieuse.

Un troisième traitement peut être envisagé grâce au Foscarnet (trisodium phosphonoformate). Il s'agit d'un analogue pyrophosphate découvert aussi à la fin des années 70 (Helgstrand et al., 1978). Contrairement aux deux précédents, le Foscarnet ne nécessite pas d'activation *via* une kinase cellulaire ou virale. Il agit en se liant au site de fixation de pyrophosphate des ARN et ADN polymérases qui seront inhibées (Oberge, 1989). Son mécanisme d'inhibition n'est pas clairement établi. En fixant le Foscarnet, la polymérase formerait un intermédiaire instable conduisant à la dégradation des acides nucléiques (Leinbach et al., 1976). Agissant sur les polymérases virales et cellulaires, ce composé est principalement employé en cas d'infection résistante à l'ACV (si la résistance est due à une modification au niveau de l'ADN polymérase, on peut avoir également une résistance au Foscarnet).

Le Maribavir (MBV) est un L-ribofuranoside benzimidazole pouvant bloquer la réplication virale de manière différente de l'ACV. Ce traitement, principalement utilisé pour traiter les infections par le CMV, évite la phosphorylation des protéines cibles de la protéine kinase PK

(*bglf4*) du virus d'Epstein-Barr et du Cytomégalo­virus (Wang et al., 2009). Ses cibles sont EBNA-LP, EBNA2, la protéine accessoire de la machinerie de réplication virale (EA-D) et EB1 (Asai et al., 2006). Lors de l'utilisation de cette molécule, une diminution d'expression des protéines virales EA-D, gp125 et gp350 fut observée. Les mécanismes permettant au MBV de réguler la transcription de différents gènes viraux reste à étudier. De plus, des composés indolocarbazoles peuvent bloquer l'autophosphorylation de la protéine kinase PK (*bglf4*) du virus (Gershburg et al., 2004).

2- Cibles potentielles et développement de nouveaux traitements

A) Cibles spécifiques au virus d'Epstein-Barr

a- EB1 et/ou Rta

L'acide moronique a été montré comme une molécule pouvant inhiber l'expression des facteurs de transcription EB1 et Rta, ainsi que les protéines codées par les gènes précoces (*bmrfl* par exemple). En effet, elle inhibe la transcription de l'ARNm bicistronique BRLF1-BZLF1 et donc supprime l'expression de Rta et EB1. Elle perturbe aussi la capacité de Rta à se fixer au niveau des RRE et ne semblent pas intervenir directement auprès de EB1 (Chang et al., 2010). De plus, cette molécule présente une activité antiherpétique HSV-1 (Herpes simplex virus-1) chez la souris (Kurokawa et al., 1999).

Nous pouvons compléter ces molécules par l'EGCG (Epigallocatechin gallate) présente dans le thé vert. Elle va inhiber l'initiation de la cascade du cycle productif soit l'expression de EB1, Rta et EA-D (Chang et al., 2003). A ces observations s'ajoute le fait que l'EGCG peut stopper la croissance cellulaire au milieu de la phase G1 du cycle cellulaire empêchant l'entrée en phase S (Liberto and Cobrinik, 2000).

Plus récemment, une étude a montré que le protoapigénone bloque l'expression des deux protéines Rta et EB1 ainsi que EA-D (protéine virale précoce) et VCA (protéine de la capsid). (Tung et al., 2011).

b- La protéase virale du virus d'Epstein-Barr

La protéase du virus d'Epstein-Barr PR (*bvrf2*) permet la maturation de la capside et l'incorporation de l'ADN viral durant la phase tardive du cycle productif. Afin d'inhiber la réplication virale, des siARN ciblant les ARNm correspondant à cette protéase virale ont été utilisés et induisent une forte diminution du taux de particules virales libérées dans le surnageant (Larrat et al., 2009).

B) Autres pistes

a- La protéine chaperone Hsp90

Un inhibiteur de la protéine chaperone Hsp90 peut représenter un moyen de cibler le virus à l'état latent en intervenant sur l'expression de EBNA1 et provoquant la mort des cellules B transformées par le virus d'Epstein-Barr (Sun et al., 2010; Sun and Kenney, 2010) . En bloquant cette protéine chaperone, les protéines virales (comme EBNA1) seront mal repliées et cela conduira à leur dégradation. Cette action a lieu quel que soit le type de latence et fonctionne au niveau des lymphocytes B et des cellules épithéliales. L'intervention de l'inhibiteur se fait au niveau d'une région répétée glycine-alanine d'EBNA1 (région évitant la traduction d'EBNA1 et sa dégradation par le protéasome si elle est produite). Il faut ajouter que l'inhibiteur de Hsp90 inhibe aussi l'expression de protéines cellulaires comme NF- κ B, essentielle pour la survie des cellules B transformées. Cela serait un moyen d'éviter le développement et la croissance de cellules cancéreuses associées au virus.

b- Vecteur minicircle

Une autre approche a été développée pour lutter de manière plus spécifique contre les cancers du cavum associés au virus d'Epstein-Barr. Il s'agit d'utiliser un vecteur (mc-oriP-IFN γ). Ce vecteur « minicircle » est composé du transgène (IFN- γ dans ces travaux) sous contrôle du promoteur du CMV associé à l'origine de réplication ori-P du virus d'Epstein-Barr. Ori-p est l'origine de réplication à partir de laquelle aura lieu la réplication de l'épisome viral durant la latence. Comparé au promoteur du CMV, la présence de l'ori-P permet une expression du

transgène ciblée, spécifique au niveau des cellules tumorales associées au virus. La croissance tumorale va être ainsi freinée tout en préservant les cellules non infectées par le virus d'Epstein-Barr (Zuo et al., 2011). Nous pourrions aussi envisager d'employer cette méthode en cas de lymphomes associés au virus d'Epstein-Barr ou de PTLD.

c- Vaccination

Afin de prévenir les cancers du cavum (ainsi que d'autres pathologies associées au virus d'Epstein-Barr comme la mononucléose infectieuse), l'élaboration d'un vaccin serait une stratégie intéressante. En vue de couvrir tous les variants viraux, une équipe a déterminé une région conservée de la glycoprotéine virale gp 350/220 qui se lie au récepteur cellulaire CR2 (CD21) lors de l'infection. Pour cela, les séquences protéiques des différents variants ont été alignées et les structures analysées. Cette région, importante pour la liaison avec le récepteur cellulaire CR2, possède des propriétés immunogènes et antigéniques. Un épitope (résidus 147-165) n'ayant pas de similarités avec une protéine cellulaire de surface a pu être désigné (Sitompul et al., 2012). Cet épitope serait un candidat pour le développement d'un vaccin. Cependant, le virus à l'état latent ne sera pas éliminé par le système immunitaire lors de cette vaccination. Nous pouvons donc imaginer vacciner les personnes séronégatives.

Toujours en vue d'une vaccination, Mok et son équipe (2000) ont étudié le fait d'utiliser le virus atténué de la rougeole comme vecteur. Le gène codant la glycoprotéine gp 350/220 serait inséré dans le génome viral de la rougeole. Après construction de ce virus recombinant, les études ont montré un faible taux d'anticorps IgG spécifiques de la glycoprotéine gp 350/220 et aucune réponse neutralisante (Mok et al., 2012). L'élaboration et l'utilisation d'un tel vaccin n'est donc pas envisageable avec cet antigène hétérologue (gp 350/220). L'emploi de vecteurs viraux atténués pose un souci concernant les personnes vaccinées vis-à-vis du virus vecteur ou l'ayant contracté auparavant, car l'immunité préexistante peut atténuer l'efficacité d'un tel vecteur.

3- Activation du cycle productif pour lutter contre les cancers associés au virus d'Epstein-Barr

Les lymphomes de cellules B associés au virus d'Epstein-Barr est un problème majeur chez les patients immunodéprimés. En vue de les traiter, l'approche suivante est envisagée : réactiver le virus afin de traiter, en combinaison avec la chimiothérapie, par des antiviraux. On cible ainsi la lyse des cellules tumorales infectées par le virus d'Epstein-Barr et la dispersion de particules virales est évitée *via* le traitement antiviral.

Chimiquement, il est possible de réactiver le virus et d'induire le cycle productif. Pour cela des inhibiteurs d'histone déacétylase (HDAC comme la trichostatine A=TSA, L'acide butyrique=BA, l'acide valproïque=VPA et l'acide hydroxamique suberoylanilide=SAHA) ou des agonistes de la PKC peuvent être utilisés (comme le TPA). Le lien entre l'inhibiteur d'histone déacétylase et l'interruption de la latence est constaté expérimentalement mais n'est pas cliniquement observé. Plus récemment, l'inhibiteur d'histone déacétylase sulforaphane a été démontré comme inhibant l'activité du facteur de transcription viral Rta (Wu et al., 2012).

Pour certain cas de coinfection, il n'est pas rare d'observer une réactivation du virus d'Epstein-Barr. Nous pouvons citer pour exemple la coinfection avec la bactérie *porphyromonas gingivalis*. En effet une étude a montré que l'acide butyrique, provoquant un remodelage des histones, produit par la bactérie est capable d'induire le cycle productif (l'expression de EB1 et BMRF1) du virus d'Epstein-Barr présent (Imai et al., 2012). Bien sûr, la proximité entre les lieux d'infection par le microorganisme et par le virus doit être essentielle.

Dans les lignées dites « Akata », le cycle productif peut être stimulé grâce à l'utilisation d'anti-IgG *via* l'activation d'une voie de signalisation.

Des travaux ont été menés avec l'utilisation d'un vecteur adénoviral déficient pour la réplication et exprimant les gènes *bzlf1* et *brfl1* sur des cellules de lymphome de Burkitt. Le cycle productif est ainsi induit et le traitement par GCV peut agir en empêchant la réplication virale (Westphal et al., 1999). En parallèle, des travaux utilisant ce type de vecteur furent réalisés sur des cellules épithéliales de cancer gastrique ou du cavum. Ce vecteur est capable de provoquer préférentiellement la mort des cellules épithéliales positives pour le virus

d'Epstein-Barr. Ici, le GCV n'accentue pas significativement l'effet antitumoral de ce vecteur adénoviral (Feng et al., 2002).

Une étude menée en 2002 a montré une activation du cycle productif dans les lignées lymphoblastoïdes suite à l'emploi de certains agents en chimiothérapie (comme la Gemcitabine et Doxorubicine) mettant en jeu les voies de signalisation PI3kinase, MEKinase et p38 MAPkinase (Feng et al., 2002). Ces deux composés n'entraînent plus l'activation des promoteurs de EB1 et Rta si les deux sites (présents au niveau du promoteur de Rta) de liaison avec la protéine cellulaire EGR1 (Early Growth Response gene 1) sont absents (Ye et al., 2010). En associant un traitement antiviral (GCV), la croissance des cellules lymphoprolifératives positives pour le virus d'Epstein-Barr chez la souris SCID va être fortement atténuée (Feng et al., 2004).

D'autres travaux ont porté sur l'effet de modification épigénétique (*via* la trichostatine A et la 5-aza-20-deoxycytidine) sur le cycle productif dans des cellules de cancer gastrique en combinaison avec un traitement antiviral (GCV) (Jung et al., 2007). C'est l'association des deux composés qui conduira à l'apoptose des cellules cancéreuses infectées par le virus d'Epstein-Barr. Les modifications épigéniques sont essentielles dans l'établissement de l'environnement propice à la tumeur avec notamment une extinction, par exemple, des gènes cellulaires suppresseurs de tumeur ou codant les enzymes de réparation de l'ADN. C'est dans l'optique de contrecarrer cet effet que les agents déméthylants comme la 5-azacytidine ont été utilisés cliniquement lors de traitements anticancéreux (notamment dans les cancers du cavum). Un travail a démontré que cette molécule entraîne l'activation du virus d'Epstein-Barr (Chan et al., 2004). Ceci peut être un moyen de réactiver le cycle productif du virus afin de compléter avec un traitement antiviral comme le Ganciclovir.

Jones et ses collaborateurs (2010) ont traité un patient atteint d'un lymphome positif pour le virus d'Epstein-Barr en associant la chimiothérapie avec le VPA le sodium valproate (VPA, reconnu comme un inhibiteur d'histone déacétylase pouvant induire le cycle productif viral (Feng and Kenney, 2006) et le GCV (Jones et al., 2010). Ce traitement a conduit à une augmentation d'interféron γ sécrété par les cellules T dirigées contre les protéines de latence du cycle productif. Le VPA a aussi été employé pour traiter des lymphomes T et NK associés au virus d'Epstein-Barr. Ce traitement va entraîner la mort par apoptose de certaines cellules T et NK et cause l'arrêt du cycle cellulaire. En revanche, le cycle productif ne sera pas induit

et l'efficacité de ce traitement est améliorée si on le combine avec un inhibiteur de protéasome comme le Bortezomibe (Iwata et al., 2012).

L'utilisation du SAHA comme inhibiteur d'histone déacétylase est utilisé lors des traitements anticancéreux. Cependant, il est capable d'induire le cycle productif du virus d'Epstein-Barr et cela préférentiellement dans les cellules épithéliales. Il serait donc à utiliser principalement en cas de carcinome (gastrique ou du cavum) associé au virus d'Epstein-Barr (Hui and Chiang, 2010). Cette molécule est également employée en cas d'infection par le virus d'immunodéficience humain (VIH). En effet, il existe en cas de thérapie antivirale, des cellules T CD4+ infectées par le virus d'Epstein-Barr qui possèdent une forme latente du virus (Archin et al., 2009). Dans le but d'éliminer ces cellules persistantes, le traitement par inhibiteur d'histone déacétylase pourrait être envisageable.

Dans le cas de l'induction du cycle productif dans des cellules infectées par le virus d'Epstein-Barr et en état de latence III, on ne pourra pas utiliser les composés HDAC ; nous pourrions choisir le TPA. Cela tendrait à dire que l'on pourrait en fonction du type de cancer choisir un agent inducteur du cycle productif adapté.

4- Immunothérapie

Les cas de réactivation virale, suivie par l'établissement de pathologies comme la PTLD (post-transplant lymphoproliferative disease), sont très fortement observés chez les patients immunodéprimés. On pourrait alors envisager de traiter ces patients en vue de restaurer une immunité adaptative (lymphocyte T cytotoxique) spécifique du virus d'Epstein-Barr.

Dans le cas de transplantation, la lymphoprolifération peut être d'origine du donneur ou du receveur. Une possibilité est de transférer des lymphocytes T CD8+ spécifiques de protéines virales du donneur infecté vers le receveur : ces lymphocytes T seront cocultivés avec les PBMC (Peripheral blood mononuclear cell) du donneur en présence d'interleukine-2 avant d'être transmis au greffé (Rooney et al., 1995).

Ce protocole est aussi envisageable dans les cas de lymphome (Hodgkin et Burkitt) et de carcinome du cavum. Il faut préciser que le virus est là sous forme de latence de type II, où les gènes latents potentiellement antigéniques sont peu exprimés. Des virus recombinants codant

les protéines virales EBNA-1, LMP-1 et LMP2 sont ajoutés au protocole établi pour le traitement des PTLD (Bollard et al., 2007). L'ajout de lymphocytes T CD4+ (T helper), améliorant la réponse cytotoxique et pouvant éliminer les lymphocytes B transformés, est aussi envisageable (Pan et al., 2006).

Smith et son équipe, ont établi un vecteur adénoviral codant de multiples épitopes (AdE1-LMPpoly) pouvant conduire à une réponse des lymphocytes T CD8+, CD4+ et utilisable pour traiter des cancers du cavum. Ces épitopes sont issus des antigènes correspondants aux protéines virales LMP-1, LMP-2 et EBNA-1 sans la région répétée gly-ala. Nous observons alors une expansion rapide des cellules T spécifiques des antigènes viraux (Smith et al., 2006). La première phase clinique a été réalisée et l'utilisation des lymphocytes T générés de cette manière stabilise les symptômes et ralentirait la progression de la tumeur (Smith et al., 2012).

Cette nouvelle approche peut être encore améliorée (avec notamment la restitution d'effecteurs de l'immunité innée comme les cellules NK) et représente une avancée encourageante. Cependant, elle ne sera peut-être pas envisageable à grande échelle, pour chaque patient. Ces protocoles nécessitent l'expansion des cellules *in vitro* et demande donc du temps.

III) Partenaires cellulaires utilisés par le virus

Afin de persister chez son hôte ou de se répliquer, le virus aura besoin d'interagir avec diverses protéines cellulaires. Ceci dans l'optique d'utiliser la machinerie cellulaire ou d'échapper au système immunitaire de l'hôte. Dans ce manuscrit, nous ne traiterons pas l'ensemble des protéines cellulaires utilisées par le virus d'Epstein-Barr mais certaines ont particulièrement retenu notre attention.

1- Stabilisation ARNm viraux, cycle cellulaire et signalisation

Comme évoqué plus tôt, le virus d'Epstein-barr peut exprimer des miARN qui agissent aussi bien envers l'expression de gènes viraux que de gènes cellulaires. Il a été montré que, dans

certaines tumeurs associées au virus d'Epstein-Barr, ces miARN peuvent être présents dans le milieu extracellulaire et diffusé dans le sang circulant. Ce transport a lieu grâce à une protection *via* des protéines associées ou les exosomes (Kosaka et al., 2010).

Nous pouvons citer la protéine cellulaire Sp110b dont l'expression sera induite par la protéine virale EB2. Le recrutement de Sp110b aura comme fonction de stabiliser les transcrits viraux issus de la réplication lors du cycle productif (Nicewonger et al., 2004).

De plus, le virus va tout particulièrement interagir avec le cycle cellulaire, afin d'assurer sa réplication et sa persistance (O'Nions and Allday, 2004). En interagissant avec différents partenaires cellulaires impliqués dans le cycle cellulaire, le virus d'Epstein-Barr va pouvoir « contrôler » la division cellulaire. Le cycle productif a lieu préférentiellement au moment de la transition G0–G1 et il s'avère que la protéine EB1 est capable de provoquer l'arrêt de cette transition (Cayrol and Flemington, 1996). La protéine Rta va provoquer l'arrêt de croissance dans les cellules de cancer de rein (HEK293). L'expression de p21 (CDKN1A), p27 (CDKN1B) et cycline E vont augmenter, alors que celle des cyclines D1, CDK4 and CDK6 diminuera. L'augmentation de la phosphorylation de H2AX et p53, accompagnée de la mise en place du processus de réparation de l'ADN, indiquerait que Rta va initier le programme de sénescence cellulaire (Chen et al., 2009). En plus d'agir sur le cycle cellulaire des cellules HEK293, Rta inhibe l'expression des protéines cellulaires Rb, p53 dans les cellules HeLa (cellule cancéreuse du col de l'utérus) et induit l'expression d'E2F1. A cela s'ajoute une diminution d'expression de c-myc suite à l'intervention de Rta ou EB1.

Les protéines virales EBNA 3,4 ET 6 furent identifiées comme bloquant le point de passage G2/M du cycle cellulaire (O'Nions and Allday, 2003). De plus, la transition G0–G1 peut être modulée par EBNA-2 et EBNA-5 (ou EBNA-LP) via une surexpression de la cycline D2 en phase G1 (Sinclair et al., 1994). Les mécanismes employés par le virus afin d'éviter une diminution de la cycline D2 reste inconnus.

Il a été démontré que l'expression de LMP-1,2 et EBNA3, 4 6 précède la transition du cycle cellulaire en phase S. L'infection par le virus d'Epstein-Barr peut amener à une interruption de la régulation G2/M (Sculley et al., 2002).

En réponse à un stress endommageant l'ADN des cellules B primaires infectées par le virus d'Epstein-Barr, on observe un maintien de l'hyperphosphorylation de la protéine cellulaire pRb (suppresseur de tumeur) et de l'activité de cdk2 (impliquée dans régulation des points de

passage G1 et S). Cela permettra la réplication de l'ADN cellulaire avant d'être dégradé par apoptose (O'Nions and Allday, 2003).

Nous avons évoqué le fait que le facteur de transcription EB1, dans le but d'exercer la réactivation virale, possède des partenaires cellulaires. Un de ses partenaires est RACK1 (receptor of activated C kinase) (Baumann et al., 2000). Cette protéine cellulaire fait partie de la famille des protéines régulatrices et elle est connue comme interagissant avec la PKC (Ron et al., 1994). RACK1 pourrait recruter EB1 dans un complexe de signalisation avec la PKC. Elle agirait ainsi comme une protéine « scaffold ». Nous pourrions aussi émettre l'hypothèse que le virus utiliserait EB1 afin d'altérer l'interaction entre RACK1 et PKC, perturbant ainsi la signalisation cellulaire (Tardif et al., 2002).

Le virus peut interagir avec le milieu cellulaire de l'hôte mais la réciproque est aussi vraie. En effet, l'hôte va intervenir face à l'infection. Nous avons énoncé l'implication des protéines cellulaires ZEB1 et ZEB2 dans la persistance du virus à l'état latent. En réponse à cela, l'infection par le virus d'Epstein-Barr peut conduire à une diminution de l'activité de ces gènes *via* des miARN cellulaires (miARNs 200b et 429 par exemple) (Ellis-Connell et al., 2010) ou viraux (plus de 20) comme miBART5 (Choy et al., 2008). L'expression de miBART5 va cibler la protéine PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) qui contrôle positivement le phénomène de mort cellulaire par apoptose. On retrouvera surtout ce miARN viral chez les patients atteints de carcinome du cavum. Il ne faut pas oublier, qu'au départ, le mécanisme d'ARN interférence représente un phénomène de défense de l'hôte (réponse antivirale principalement) que certains virus arrivent à contourner ou à utiliser pour l'infection et la persistance virale.

Les miARN de la famille BHRF1 sont exprimés principalement dans les lymphocytes B infectés présentant un virus latent et ceux de la famille BART sont détectés surtout dans les cellules épithéliales infectées, où le virus est produit. Une analyse d'une partie des miARN BART a été menée sur des lignées de cancers du cavum ainsi que sur le plasma de patients atteints de NPC. Ces miARN ont pu être détectés dans les tumeurs du cavum et le plasma des patients atteints.

2- L'Ubinucléine

Le facteur de transcription viral EB1 interagit avec diverses protéines cellulaires. La recherche de ses partenaires a conduit en 2000 à la découverte de l'Ubinucléine. A la même période, une équipe a identifié un gène jusqu'ici inconnu (*ubn-1*) en caractérisant le locus où se situe la périplakin (PPL) (Aho et al., 1999). La protéine virale EB1 fait partie de la famille des protéines bZip. Il a été démontré que l'Ubinucléine interagit avec le domaine basique de cette famille protéique (Aho et al., 2000) et ce domaine est directement impliqué dans leur liaison avec l'ADN. L'hypothèse suivante a alors été émise : l'Ubinucléine pourrait interférer dans la liaison du facteur de transcription viral EB1 avec son ADN cible.

Cette hypothèse a été testée par une technique de biologie moléculaire de retard sur gel (EMSA : Electrophoretic Mobility Shift Assay) (figure 9). Dans cette expérience, la protéine virale EB1 est mise en contact avec un ADN cible (séquence ZRE) et une concentration croissante d'Ubinucléine. EB1 se lie à son ADN cible; si il est associé à l'Ubinucléine, une diminution du complexe EB1/ADN cible est alors observée. Ainsi, l'Ubinucléine, en se liant à la protéine virale EB1, bloque sa fixation au niveau de son ADN cible.

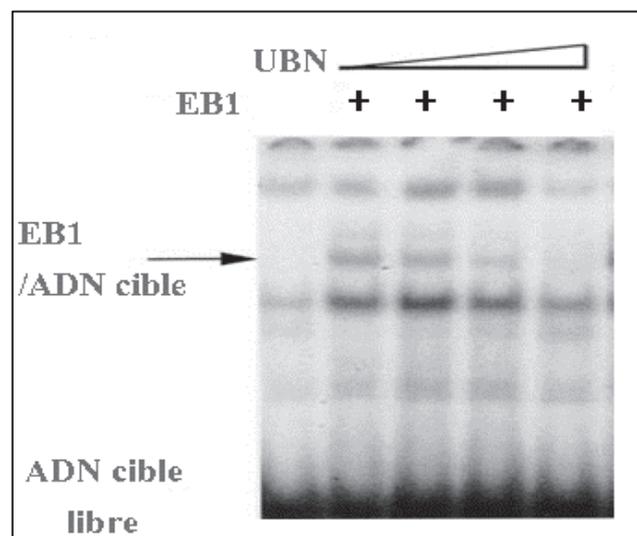


Figure 9 : L'Ubinucléine interagit avec le facteur de transcription viral EB1

En reconnaissant l'ADN cible, EB1 va former un complexe que l'on peut visualiser sur gel. En présence de concentrations croissantes d'Ubinucléine, la formation du complexe EB1/ADN cible est progressivement diminuée. L'Ubinucléine, en se liant à EB1, évite la reconnaissance de l'ADN cible par EB1. D'après S. Aho et al., J. Cell. Biol. (2000), 148 (6):1165–1176

En bloquant la fixation de la protéine virale EB1, l'Ubinucléine évite la transcription de ses gènes cibles et donc la mise en place du cycle productif. En effet, il a été démontré dans la lignée épithéliale HEK-293 positive pour le virus d'Epstein-Barr que la surexpression de l'Ubinucléine diminue la production des particules virales. Inversement, la répression du gène *ubn-1* accentue la production de particules virales et donc favorise la cascade du cycle productif (Gruffat et al., 2011).

L'Ubinucléine est une protéine basique (poids isoélectrique=9.34) de 1134 résidus avec un poids moléculaire de 121 kDa (Aho et al., 2000). La région N-terminale est composée d'acides aminés chargés suggérant, en prédictions de structure secondaire, la présence de plusieurs hélices α dans cette région. En revanche la région C-terminale présente des acides aminés polaires et apolaires appoyant une flexibilité avec une prédominance de feuillets β . 18 exons ont été identifiés dans la séquence d'*ubn-1*. Initialement, l'Ubinucléine a été décrite comme une protéine nucléaire dans des kératinocytes et son domaine N-terminal va être essentiel pour sa localisation nucléaire (Aho et al., 2000).

L'Ubinucléine possède un orthologue chez la drosophile (la protéine nucléaire Yémanucléine- α) et chez la levure (Hpc2p) (Banumathy et al., 2009). Comme la Yémanucléine et Hpc2p, l'Ubinucléine a été observée comme pouvant s'associer au complexe HIRA/ASF1a et l'histone H3.3 (variant 3 de l'histone H3) (Tagami et al., 2004). Un autre membre (CABIN1 : Calcineurin-Binding protein) de cette association HIRA/UBN1/ASF1a a été identifié conduisant au complexe quaternaire HUCA (Rai et al., 2011). La protéine CABIN facilite la répression de la transcription de certains gènes par les facteurs de transcription (MEF2 ou P53 par exemple) en recrutant des enzymes modifiant les histones. Lors de la formation du complexe HUCA, la protéine HIRA va être responsable du recrutement des trois autres membres. La protéine HIRA va lier ASF1 par son domaine central B (Tang et al., 2006), CABIN par son domaine C-terminal (Rai et al., 2011) et l'Ubinucléine par son domaine répété WD40 (Banumathy et al., 2009). La région de l'Ubinucléine nécessaire pour son interaction avec la protéine cellulaire HIRA a été identifiée (résidus 120-175) (Tang et al., 2012). Ce site d'interaction est compris dans une région conservée chez l'orthologue Hpc2 et dénommée NHRD (N-terminal to the Hpc2-Related Domain) chez l'Ubinucléine (résidus 1-40 et 77-175). Cette interaction va être importante pour la stabilité et la fonction du complexe HUCA. De plus, cette association permettrait le recrutement de ce complexe au niveau des corps nucléaires PML des cellules sénescents afin de former les domaines spécialisés SAHF d'hétérochromatine SAHF (senescence-associated heterochromatin foci) réprimant

l'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Zhang et al., 2005). En s'associant à ce complexe, l'Ubinucléine peut être considérée comme un des régulateurs du mécanisme de sénescence (caractérisé par un arrêt de prolifération) (Banumathy et al., 2009) dans les fibroblastes.

Au niveau cellulaire, suivant l'état de différenciation de la cellule, l'Ubinucléine sera localisée préférentiellement dans les noyaux ou au niveau sous-membranaire (Aho et al., 2009) (figure 10). Les cellules non confluentes présentent un marquage nucléaire et partiellement au niveau des membranes. Les cellules confluentes présentent un marquage « en damier » au niveau des membranes, caractéristique des cellules jointives.

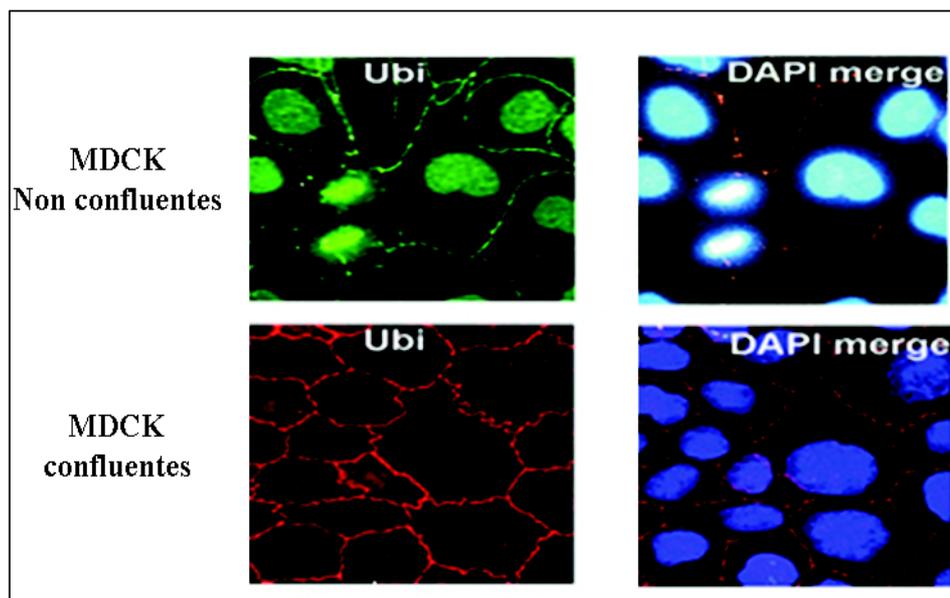


Figure 10 : Localisation par immunomarquage de l'Ubinucléine en fonction de la confluence dans les cellules MDCK

L'Ubinucléine sera présente dans les noyaux et les membranes lorsque les cellules ne sont pas confluentes. En revanche, l'Ubinucléine est fortement localisée au niveau des membranes et très peu présente dans les noyaux si les cellules sont à confluence. D'après S. Aho et al., Biol. Cell (2009), 101 : 319–334

Afin de connaître le type de membranes et de jonctions visualisées lors de l'imagerie par immunomarquage de l'Ubinucléine, les observations microscopiques de marqueurs spécifiques ont été réalisées.

La figure 11 montre le même profil d'immunofluorescence et une colocalisation de l'Ubinucléine avec la protéine ZO-1 (caractéristique des jonctions serrées) indiquant sa présence dans les jonctions serrées dans les cellules HT29 (Carcinome du colon).

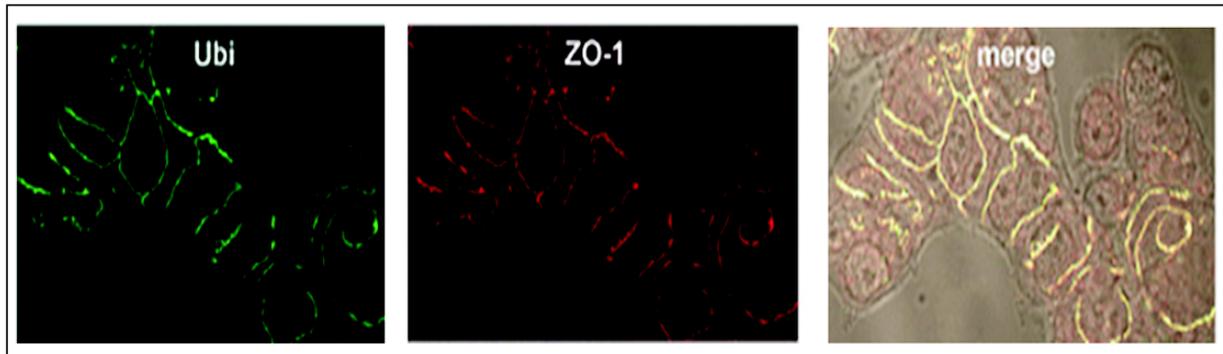


Figure 11 : Localisation de l'Ubinucléine au niveau des jonctions serrées dans les cellules HT29
L'Ubinucléine (en vert) et la protéine des jonctions serrées ZO-1 (en rouge) montrent une colocalisation dans les cellules HT29. L'Ubinucléine est donc présente dans les jonctions serrées. D'après S. Aho et al., *Biol. Cell* (2009), 101 : 319–334

L'Ubinucléine, de part sa localisation nucléaire et au niveau des membranes, fait donc partie de la famille des protéines dites NACos (Nuclear and Adhesion Complex components). Les études précédentes ont donc porté sur sa mise en évidence (Tardif et al., 2002), sa capacité à être dans les jonctions serrées (Aho et al., 2009), son rôle dans le noyau (Banumathy et al., 2009) et sa capacité à inhiber le cycle viral (Gruffat et al., 2011).

Cependant, tout reste à découvrir à propos de la fonction initiale de l'Ubinucléine qui pourrait aider notre compréhension du complexe Ubinucléine/EB1 et ses conséquences sur le cycle du virus. C'est pour cette raison que nous nous intéresserons, lors de la première partie des résultats à la recherche de partenaire (spécifiquement au niveau des jonctions serrées) et à l'analyse fonctionnelle de l'Ubinucléine.

IV) Les jonctions serrées et leurs interactions avec les virus

En vue d'infecter l'hôte, de nombreux pathogènes (bactériens, viraux, parasitaires et fongiques) doivent se confronter à la barrière épithéliale et endothéliale constituant les différentes muqueuses. Elles constitueront une barrière physique empêchant l'entrée des pathogènes (par des récepteurs membranaires), mais elles seront aussi un lieu défendu par le système immunitaire de l'hôte. Cette barrière possède deux grandes catégories d'adhésion : cellule/matrice extracellulaire mettant en jeu les protéines de la famille des intégrines et cellule/cellule avec les jonctions adhérentes, gap (jonctions communicantes) et serrées (la plus proche du pôle apical) (Guttman and Finlay, 2009) (figure 12).

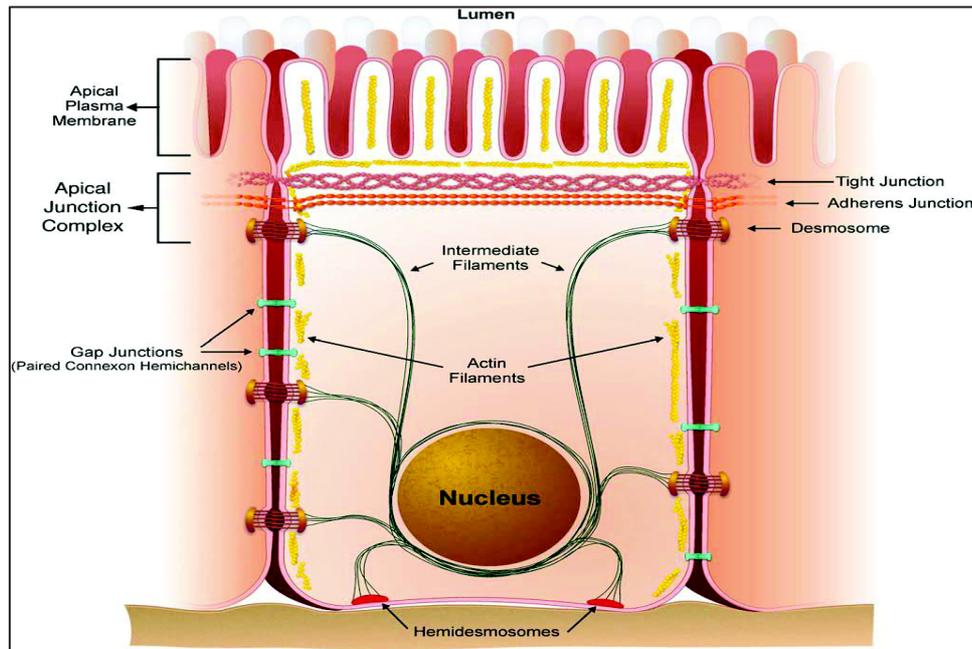


Figure 12 : Organisation du tissu épithélial

Les jonctions apicales établies sont composées des jonctions adhérentes et des jonctions serrées. A ces dernières, peuvent s'associer des desmosomes. Le long de la membrane latérale se disposeront des desmosomes des jonctions GAP. Les hémidesmosomes seront présents au pôle basal de la cellule. Desmosomes et hémidesmosomes seront reliés par les filaments intermédiaires. Les filaments d'actine vont se rattacher à chaque jonctions (sauf les hémidesmosomes). D'après J. A. Guttman and B. Finlay, B.B.A - Biomembranes (2009), 1788 : 832-841

Comme nous le verrons par la suite, les virus vont tout particulièrement interagir directement ou indirectement avec les protéines des jonctions serrées. Ces dernières ont un rôle important au cours de l'infection.

1- Les jonctions serrées : fonction et composants

Les jonctions serrées permettent de localiser et réguler la diffusion paracellulaire de solutés, d'ions, d'eau, de macromolécules et lipides (Cereijido et al., 2008). Ces jonctions maintiennent l'intégrité et la polarité des cellules (distinction pôles basal et apical) ; la perte de polarité est généralement associée aux cancers. Elles vont représenter un contact très étroit entre deux cellules endothéliales ou épithéliales voisines (Furuse, 2010) (figure 13). Ces jonctions serrées sont composées par un complexe de protéines transmembranaires liées à des protéines cytoplasmiques servant soit de lien entre la membrane cellulaire et le cytosquelette d'actine, soit de molécules de signalisation informant la cellule du milieu extracellulaire ou encore de protéines adaptatrices ou de protéines de recrutement « scaffold ». Des protéines impliquées dans le transport membranaire, comme les petites protéines G de la famille Rab, sont aussi associées aux jonctions serrées.



Figure 13 : Jonctions serrées observées en microscopie électronique

Section de jonctions serrées dans une cellule épithéliale d'épiderme de souris. Les jonctions serrées forment un contact étroit entre les membranes plasmiques de cellules adjacentes.

Barre de mesure: 100 nm. D'après M. Furuse, C.S.H. *Perspect. Biol.* (2010), 2(1)

A) Les protéines transmembranaires

Trois composants membranaires majeurs sont représentés par l'Occludine, les Claudines et JAM (junction-associated molecules) (Bonazzi and Cossart, 2011) (figure 14). Les protéines CAR (coxsackievirus B adenovirus receptor) régulant le flux des ions et des macromolécules (Cohen et al., 2001).

L'Occludine est la première protéine transmembranaire identifiée dans les jonctions serrées (Furuse et al., 1993). Elle se compose de quatre domaines transmembranaires et sera impliquée dans le contrôle et la sélection de la diffusion paracellulaire des petites molécules hydrophiles. Elles régulent aussi la migration transépithéliale de neutrophiles (Aijaz et al., 2006). Leur implication dans des voies de signalisation (MAP-kinase et RhoA GTPase) a aussi été montrée (Murata et al., 2005; Yu et al., 2005).

Les diverses protéines Claudines (famille de 24 membres) sont responsables de la formation des jonctions serrées et sont exprimées de manière spécifique au tissu. Ce sont des protéines avec quatre domaines transmembranaires et possèdent un domaine de liaison PDZ dans la région C-terminale qui peut interagir avec des protéines comme celles de la famille ZO ou MUPP1. Les Claudines sont capables de se polymériser et de former des pores qui permettent une diffusion sélective des ions et molécules à travers l'espace paracellulaire. La perméabilité sélective de ces canaux dépend de la concentration et du type de Claudine exprimé par la cellule épithéliale ou endothéliale. Une altération de l'expression de cette famille protéique peut jouer un rôle dans la survenue de certains cancers et dans la progression de ces tumeurs (Kojima et al., 2010).

Les protéines JAM (Junctional Adhesion Molecules) sont membres de la famille IgSf impliquées dans l'architecture et la régulation de la formation des jonctions serrées (Liu et al., 2000). Elles ont un seul domaine transmembranaire de type I avec deux domaines « IgG like » extracellulaires (Liu et al., 2000). Elles sont en interaction avec les autres protéines des jonctions serrées (comme ZO-1, la Cinguline, PAR-3) (Ebnet et al., 2004) et le cytosquelette (Bazzoni et al., 2000). Elles agissent aussi sur la migration des leucocytes à travers les barrières endothéliale et épithéliale au cours de la réponse inflammatoire (Lechner et al., 2000).

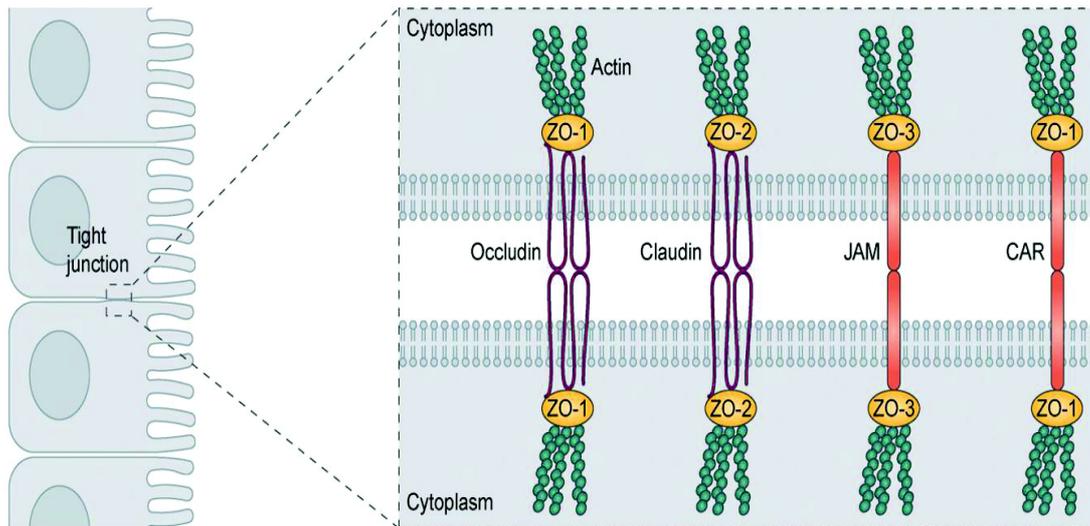


Figure 14 : Composition des jonctions serrées

Les jonctions vont se composer de protéines transmembranaires (Occludine, Claudines, Jam et CAR) reliées au cytosquelette d'actine par des protéines associées (par exemple les protéines de la famille ZO). D'après M. Bonazzi and P.Cossart, J.C.B. (2011), 195 (3) : 349–358

B) Les protéines associées aux protéines transmembranaires

Aux composants majeurs précédemment vus, vont s'associer d'autres protéines cellulaires comme celle de la famille ZO (1, 2 et 3) et PAR (Citi and Cordenonsi, 1998).

ZO-1 est une protéine adaptatrice associée aux protéines membranaires des jonctions serrées. Elle fut la première protéine des jonctions serrées à être identifiée (Stevenson et al., 1986). Elle fait le lien entre les protéines membranaires des jonctions serrées, le cytosquelette et la plaque protéique de signalisation (Paris et al., 2008). Comme ZO-2 et ZO-3, elle possède trois domaines PDZ dans sa région N-terminale. Son premier domaine PDZ s'associe avec les protéines Claudines puis le second se lie aux protéines ZO-2 et ZO-3. ZO-1 possède également un domaine GUK nécessaire pour son interaction avec l'Occludine. La présence d'un domaine SH3 lui permet de se lier avec des protéines impliquées dans la signalisation. La liaison avec les filaments d'actine et la protéine α -catenin se fait au niveau de la région C-terminale.

Initialement identifiées chez *Caenorhabditis elegans*, les protéines Par, qui sont au nombre de six, sont fortement impliquées dans le maintien de la polarité cellulaire et le développement de l'épithélium. Les protéines Par-4 (protéine kinase) et Par-5 (homologue des protéines 14.3.3) sont cytosoliques, alors que les protéines Par-3 et Par-6 (protéines scaffold) vont se

trouver dans les jonctions serrées. La protéine Par-6, qui possède un domaine PDZ, va s'associer à la sous unité α de la protéine kinase C et ce complexe sera recruté au niveau du CDC42-GTP pour activer la protéine kinase C (Macara, 2004).

La Cinguline va principalement agir, directement ou indirectement, vis-à-vis de la voie de signalisation RhoA et pas uniquement dans la formation des jonctions serrées. Sa présence au niveau des jonctions serrées entraîne une régulation de transcription de certains gènes comme ceux codant les protéines Claudine-2, 6, 7 et l'Occludine. Un défaut d'expression de la Cinguline entraîne une augmentation d'expression de la protéine ZO-3 indépendamment de la voie de signalisation RhoA (Guillemot and Citi, 2006).

Certaines protéines des jonctions serrées pourront montrer un profil d'expression différent et caractéristique lors de certains cancers. Lors de la tumérogenèse et l'invasion par les métastases, les jonctions serrées peuvent être profondément altérées. Par exemple, les protéines de la famille Claudine seront soit plus faiblement, soit plus fortement exprimées ; Cela dépend du type de cancer. Le suivi du profil d'expression des protéines des jonctions serrées peut aider au diagnostic de certains cancers (utilisation en biomarqueur) et à la détermination du phénotype. Il a été démontré que le facteur transcription cellulaire TTF-1, pouvant être présent au niveau des jonctions serrées, active la transcription des gènes *ocln* et *cldn1* codant l'Occludine et la protéine Claudine-1. TTF-1 aura, dans ce cas-là un rôle pro-oncogénique (Runkle et al., 2012).

C) Les protéines « NACos »

De nombreuses protéines présentes dans l'organisation des jonctions serrées font partie des protéines dites « NACos ». Cela signifie qu'elles ont la propriété d'être membranaires (dans les jonctions serrées) ou nucléaires.

La toute première identifiée est la Symplékine (Keon et al., 1996). Lorsqu'elle est nucléaire, elle intervient dans la maturation et la polyadénylation des ARNm (Takagaki and Manley, 2000). Elle joue un rôle dans la prolifération et la différenciation cellulaire (Kavanagh et al., 2006). En effet, elle est capable d'interagir avec la facteur de transcription ZONAB (ZO-1-associated nucleic-acid-binding protein). Son association avec ce facteur de transcription va

conduire à son accumulation au niveau du noyau et régulera positivement l'expression de la cycline 1.

ZONAB est un facteur de transcription Y-box qui se lie au domaine SH3 de ZO-1. Cette liaison conduira à la séquestration cytoplasmique et l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de ZONAB (Balda and Matter, 2000). Cette interaction est importante pour la régulation de l'expression du proto-oncogène Erb-2 jouant un rôle dans la différenciation cellulaire .

La localisation de la protéine ZO-2 est dépendante de la confluence cellulaire. Comme ZO-1, ZO-2 interagit avec des facteurs de transcription (Jun, Fos et C/EBP) au niveau de sa région C-terminale (Betanzos et al., 2004). En les recrutant dans les jonctions serrées, ZO-2 régulerait l'activité de ces facteurs de transcription.

Nous pouvons aussi citer l'Ubinucléine et la protéine Lyric comme appartenant à ce groupe de protéines (Aho et al., 2009). Nous nous sommes tout particulièrement intéressés à l'Ubinucléine comme nous le verrons dans la suite du manuscrit.

2- Action des virus sur les jonctions serrées

Lors de l'infection, les microorganismes devront à plusieurs reprises faire face à l'épithélium muqueux constitué, notamment par les jonctions serrées. Afin de contourner cet obstacle, le pathogène utilise des stratégies. Les divers pathogènes ont, comme possibilité, d'interagir ou altérer les jonctions serrées. Ici, sont présentés seulement des cas d'interaction entre un virus et les jonctions serrées (Greber and Gastaldelli, 2007) (figure 15).

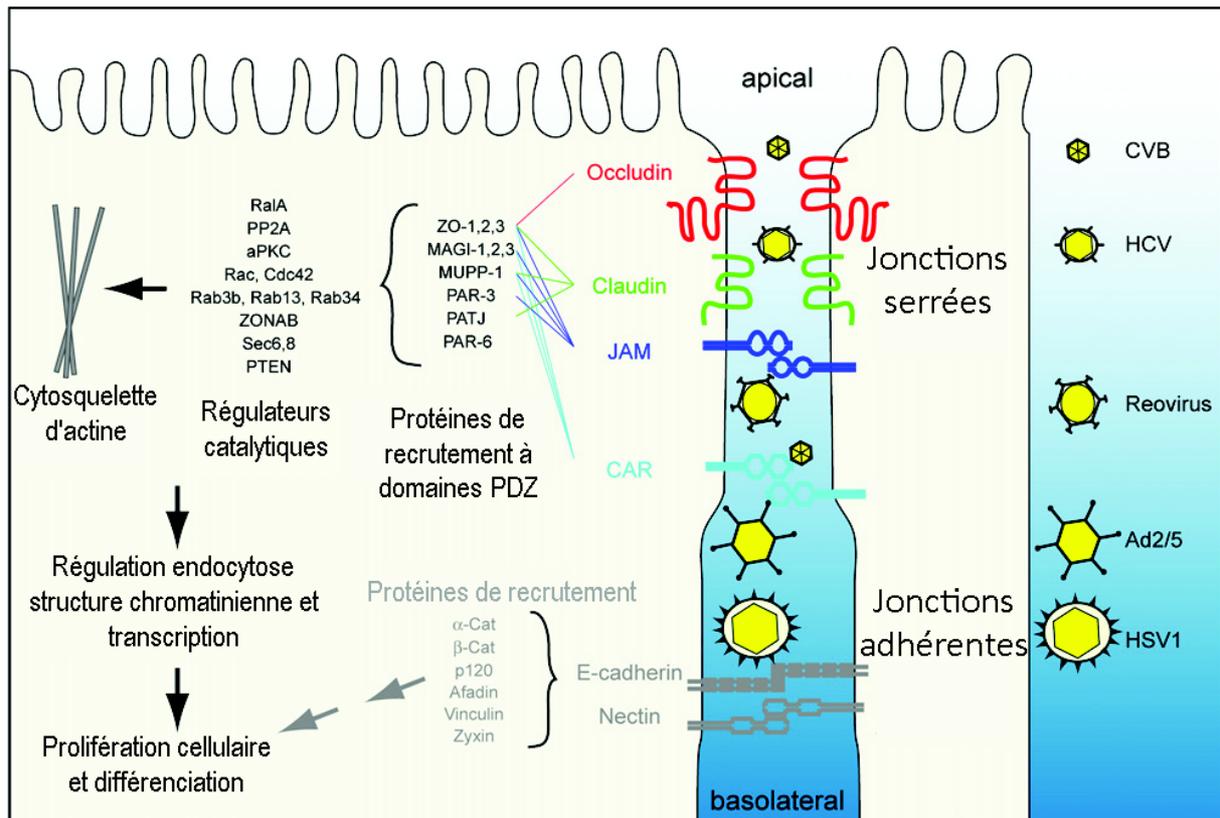


Figure 15 : Virus intervenant sur les jonctions serrées

De nombreux virus agissent sur les jonctions cellulaires lors de l'infection. Diverses protéines de ces jonctions sont alors susceptibles d'être altérées. D'après U. F. Greber and M. Gastaldelli., Cell Host & Microbe 2 (2007)

Le coxsackievirus B (CVB) fait partie des picornavirus. Pour initier l'infection, une première étape consiste à se fixer au récepteur DAF qui est lui présent sur la membrane apicale (fixation possible démontré dans (Shieh and Bergelson, 2002)). Cette fixation conduira à la formation d'un « cluster » et à l'activation d'AbI. AbI est une tyrosine kinase non récepteur remodelant le cytosquelette d'actine suite aux facteurs de croissance et signaux de la matrice extracellulaire. Ce remodelage sera utilisé pour conduire le cluster jusqu'aux jonctions serrées. Le virus va donc être transporté grâce à la relocation du cluster DAF. En « ouvrant » les jonctions serrées, il se libère le passage et pourra y retrouver le récepteur CAR présent au niveau des jonctions serrées mais absent de la membrane apicale (figure 14) (Coyne and Bergelson, 2006). Lors de la fixation à ce récepteur nous aurons une altération structurale des virions formant des « particules A » (étape essentielle et nécessaire pour l'entrée du virus (Milstone et al., 2005). En parallèle une autre tyrosine kinase Fyn va aussi être activée amenant par voie de signalisation à la phosphorylation de la cavéoline-1. Ce sera la

combinaison de tout cela qui permettra l'entrée du virus *via* la voie endocytaire cavéoline dépendante (figure 16).

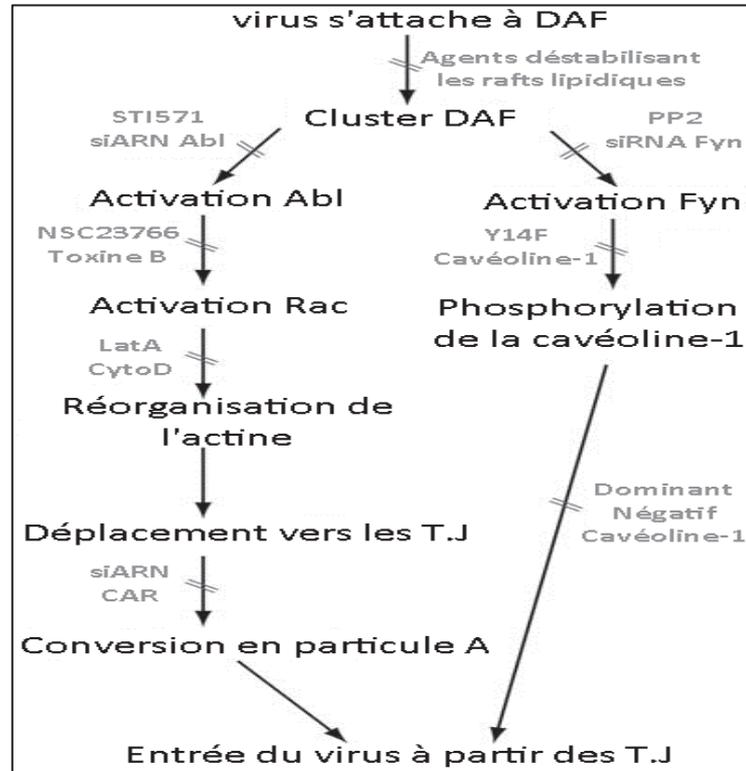


Figure 16 : Voie de signalisation activée par l'interaction de CVB avec DAF

Le virus induit deux voies de signalisation pour entrer dans la cellule : l'activation d'Abl ou de Fyn. L'une provoque le déplacement vers les jonctions serrées (T.J.) et la seconde permet l'entrée du virus par des vésicules d'endocytose associées à la cavéoline. Les barres obliques indiquent la disruption de la signalisation ou l'entrée du virus par certains agents. D'après C.B. Coyne and J.M. Bergelson., Cell (2006), 124 : 119–131

Cependant, cette voie d'entrée n'est pas la seule mise en jeu. L'entrée virale nécessite également l'internalisation de l'Occludine (protéine des jonctions serrées) amenant à une entrée par macropinocytose *via* la voie de signalisation induite par Rab34. L'Occludine jouerait le rôle de protéine « scaffold » en recrutant des protéines de signalisation et de régulation (Coyne et al., 2007).

Le réovirus possède une protéine virale ($\sigma 1$) qui interagit avec le domaine N-terminal du récepteur des jonctions serrées (JAM-A) (Guttman and Finlay, 2009) (figure 17). Cette interaction va entraîner l'activation du facteur de transcription cellulaire NF- κ B et amener au déclenchement de l'apoptose (Barton et al., 2001). Déclencher le phénomène d'apoptose

serait un moyen de limiter les éléments inflammatoires et d'échapper à la réponse immunitaire (O'Brien, 1998).

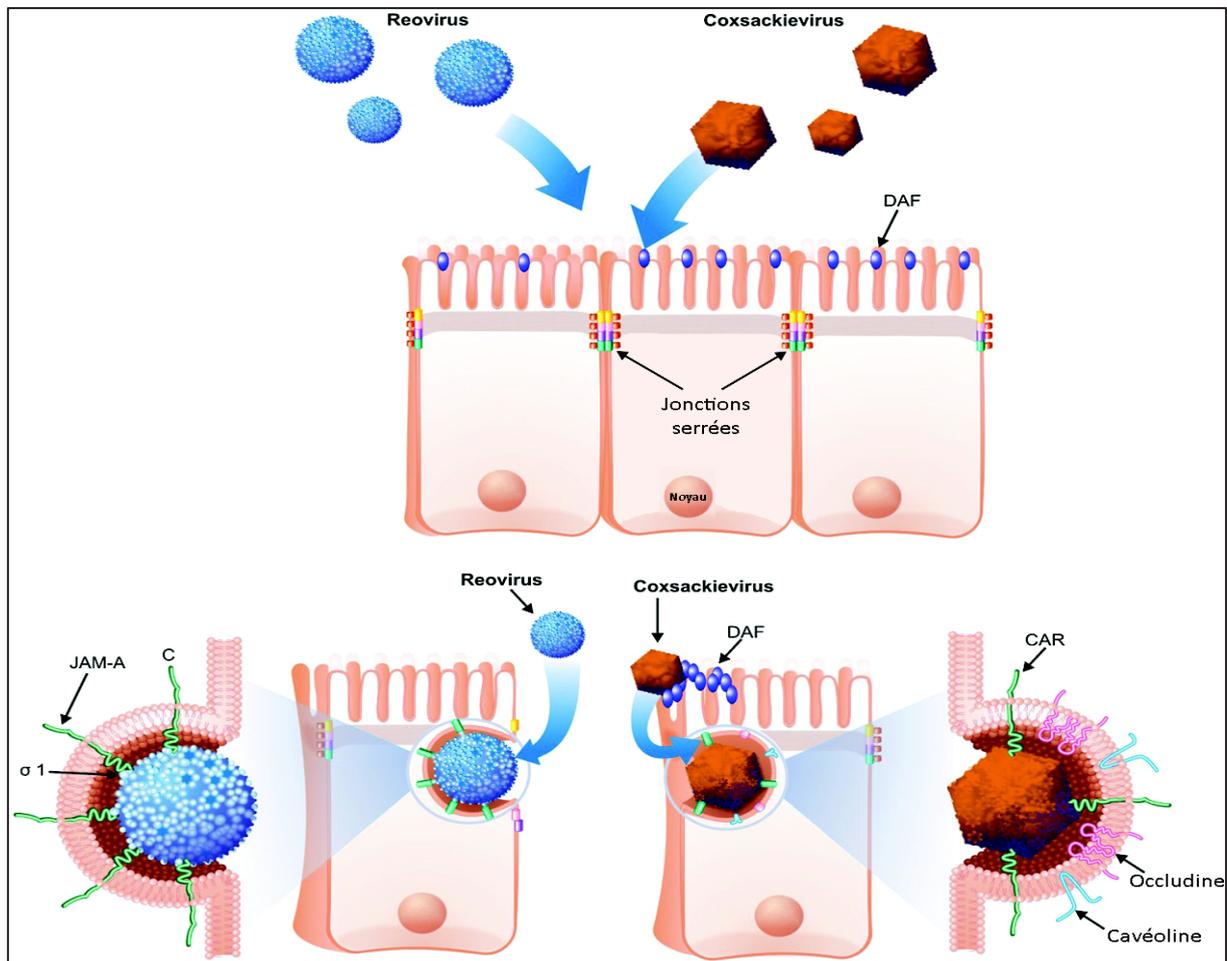


Figure 17 : Interaction virale avec les protéines des jonctions serrées

La protéine de surface $\sigma 1$ du réovirus s'associe à la protéine JAM-A qui est utilisée pcomme récepteur pour l'internalisation du virus. Le coxsackievirus s'associe d'abord avec la protéine DAF, provoquant le regroupement des protéines DAF en cluster. Le virus va migrer vers les jonctions serrées (où il se lie avec le récepteur CAR) et est internalisé *via* la voie d'endocytose médiée par la cavéoline. D'après J. A. Guttman and B. Finlay, *B.B.A.-Biomembranes* (2009), 1788(4) : 832–841

Les fibres protéiques de l'Adénovirus peuvent aussi se lier avec les protéines CAR empêchant l'interaction CAR/CAR des jonctions serrées. De cette manière, le virus pourra accéder au pôle basal et se fixer à l'intégrine et être internalisé. De plus, cette interaction peut être employée par le virus pour s'échapper de la cellule infectée (Walters et al., 2002) (figure 18).

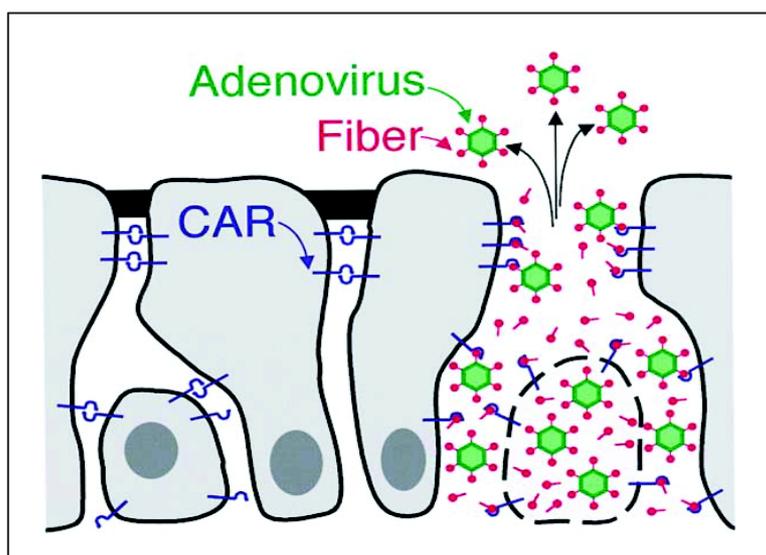


Figure 18 : Modèle d'échappement de l'Adénovirus de la cellule épithéliale infectée
 L'adénovirus peut de fixer au récepteur CAR (en bleu) *via* les fibres (en rouge). L'association des fibres aux récepteurs CAR vont, par compétition, dissocier les complexes CAR/CAR. Les jonctions vont s'ouvrir et le virus pourra s'échapper. D'après L .W. Walters et al., Cell (2002), 110(6) : 789-799

Certains serotype d'Adénovirus (dont les 3 et 7) utilisent la protéine DSG2 (Desmogléine 2) qui appartient à la famille protéique des cadhérines, comme récepteur lors de l'attachement sur la cellule cible. Cette fixation conduira à une activation de certaines voies de signalisation. Une ouverture transitoire des jonctions aura alors lieu et les récepteurs présents dans les jonctions cellulaires (CD46, Her2/neu) seront accessibles au virus. Cette propriété a mené à l'établissement d'une protéine recombinante issue de l'Adénovirus type 3 (correspondant à deux fibres du domaine knob) nommée JO-1 (Junction Opener) (Beyer et al., 2011). Cette protéine va permettre le clivage des dimères de Desmogléine et la perturbation des jonctions cellulaires. Les traitements anticancéreux dont le cetuximab et le trastuzumab ont dans leurs composants un anticorps monoclonal humanisé IgG reconnaissant les récepteurs Her2/neu et EGFR (epidermal growth factor receptor). Une fois l'anticorps monoclonal fixé, le récepteur est internalisé empêchant une fixation ultérieure de l'EGF. La protéine recombinante JO-1 rendant plus accessibles ces récepteurs, permettrait une reconnaissance plus efficace de ces derniers par l'anticorps monoclonal. Associer cette protéine recombinante aux traitements anticancéreux pourrait améliorer leur efficacité.

L'entrée du virus de l'hépatite C (VHC) se fait de manière séquentielle, mettant plusieurs récepteurs en jeu qui ne sont pas encore tous connus. Le virus va s'attacher aux héparane

sulfate LDL-R (low-density lipoprotein receptor) et SRB1, continuer son chemin grâce au réarrangement du cytosquelette d'actine en se liant à la tetraspanine (CD81) et Claudine-1 (Coller et al., 2009). L'association CD81/Claudine-1 est primordiale pour l'entrée virale (Mee et al., 2009) (Evans et al., 2007). Ensuite, il se fixe aux protéines Claudine-6 et 9 (de manière moins importante qu'avec Claudine-1) (Meertens et al., 2008) puis à l'Occludine (Ploss et al., 2009). Ces étapes seront suivies par le déclenchement de l'endocytose dépendante de la clathrine qui s'avère essentielle pour l'entrée du virus dans l'hépatocyte (Coller et al., 2009). De plus, la protéine virale E2 interagit avec l'Occludine provoquant une rétention dans le réticulum endoplasmique. Cela amènera à une altération de l'organisation des jonctions serrées (Benedicto et al., 2008).

Dans cet exemple les protéines des jonctions serrées sont utilisées comme récepteurs mais, contrairement aux autres virus, l'impact du VHC sur la structure elle-même de ces jonctions n'est pas démontré.

Il a été observé des cas d'infection rétinienne par le virus VIH-1 (Bai et al., 2008). Au niveau de cette barrière épithéliale, la protéine virale Tat augmente la perméabilité transépithéliale et diminue la résistance électrique transépithéliale. Contrairement à la protéine Claudine-2, les protéines Claudine-1,3 et 4 montrent une expression réduite dans les cellules épithéliales du pigment rétinien. La détérioration de la barrière épithéliale sera accompagnée de l'activation de la voie de signalisation ERK $\frac{1}{2}$ et du facteur de transcription cellulaire NF- κ B (Bai et al., 2008). Une autre étude a montré que la protéine gp120 entraîne une dégradation des protéines ZO-1 et ZO-2 (Nakamuta et al., 2008).

Dans le cas du rotavirus, la toxine NSP4 augmente la concentration calcique intracellulaire. Cet événement conduira à l'inhibition du recrutement de la protéine ZO-1 au niveau des jonctions cellulaires en perturbant le cytosquelette d'actine (Tafazoli et al., 2001). La protéine virale VP8 va ensuite perturber de manière transitoire la perméabilité paracellulaire des jonctions serrées et affectera la distribution cellulaire de l'Occludine, ZO-1 et Claudine-3 (Nava et al., 2004). Après ces étapes, le rotavirus pourra rejoindre son récepteur (qui est dans ce cas l'intégrine) localisé au pôle basal de la cellule.

Il existe aussi un exemple de virus associé à certains cancers qui interagit avec ces jonctions particulières. En effet, le virus SV40 (Simian virus 40) présente l'antigène T qui affectera

spécifiquement les jonctions serrées en altérant la distribution et l'expression des protéines ZO-1, Occludine, and Claudine-1 dans les cellules MDCK (cellule de cancer rénal du chien). Cet antigène va entraîner la déphosphorylation de la forme cytosolique de ces protéines. Le virus cible une sous-unité du complexe PP2A (serine/threonine protein phosphatase 2A) et évite son association avec le complexe protéique des jonctions serrées. On aura accumulation des protéines non phosphorylées des jonctions serrées. Ceci a peut-être son importance dans le pouvoir transformant de ce virus (Nunbhakdi-Craig et al., 2003).

Les cellules épithéliales sont une cible pour le virus West Nile. La protéine virale de la capsid (protéine C) va perturber la perméabilité paracellulaire et réduire la résistance électrique transépithéliale. L'infection va mener à une perte de l'expression, à la dégradation de protéines de la famille des Claudines. Dans ce cas, l'action sur l'intégrité des jonctions serrées serait importante pour la réplication virale et la dissémination, mais pas pour l'entrée du virus (cela reste à étudier).

Généralement les herpèsvirus se lient à des récepteurs du pôle apical (dans certains cas au pôle basal). Il existe des cas de pathologie rétinienne chez des personnes immunodéprimées ayant acquis le syndrome d'immunodéficience où il y a réactivation du cytomégalovirus (CMV). Dans ce cas-là, les jonctions serrées sont altérées par désassemblage de la protéine ZO-1 (Pereira et al., 1995).

Les cellules épithéliales constituent le type cellulaire le plus représenté. Elles forment la première ligne de défense face aux divers pathogènes et les jonctions serrées participent à l'adhésion et à la cohésion entre les cellules épithéliales adjacentes. L'altération de ces jonctions sera à l'origine de diverses pathologies. Une meilleure compréhension de cette structure particulière permettrait donc d'envisager et de développer de nouveaux traitements. C'est pour cela que nous nous sommes intéressés à l'Ubinucléine, récemment identifiée comme un composant des jonctions serrées dont la fonction reste à explorer.

Objectifs du travail de thèse

Le premier objectif de mon travail de thèse a été d'apporter de nouvelles informations sur la fonction cellulaire de l'Ubinucléine, partenaire d'EB1, dans le but d'utiliser ces connaissances dans l'infection par le virus d'Epstein-Barr. L'Ubinucléine pouvant voyager entre noyaux et membranes en fonction de l'état de différenciation cellulaire, il nous a semblé intéressant de mieux connaître sa fonction. Les études réalisées par d'autres équipes ont porté essentiellement sur son rôle dans le noyau. Nous avons cherché à en savoir plus sur l'Ubinucléine présente au niveau des jonctions serrées. Pour cela, nous avons recherché des partenaires de l'Ubinucléine dans des fractions biochimiques enrichies en jonctions et tenté d'avoir une approche plus fonctionnelle pour mettre en évidence de nouvelles voies où l'Ubinucléine pourrait être impliquée.

Le deuxième objectif de ma thèse a été de contribuer à la caractérisation d'un inhibiteur d'EB1. Ce projet fait partie d'une collaboration avec les Drs Carlo Petosa (IBS- Grenoble), Evelyne Manet et Henri Gruffat (ENS-Lyon). Cibler EB1, et donc la mise en route du cycle productif, pourrait être d'une aide précieuse lors du traitement des pathologies associées au virus d'Epstein-Barr. De plus, rares sont les traitements antiviraux anti-EBV efficaces actuellement disponibles. Ma participation à ce projet, suite au criblage à haut débit de molécules chimiques, a consisté à les tester en culture cellulaire, afin de déterminer si elles avaient un effet inhibiteur sur EB1 *in vivo*.

Résultats

I) L'Ubinucléine et sa caractérisation dans la cellule

1- Identification de nouveaux partenaires de l'Ubinucléine

Explorer les protéines en interaction avec la protéine d'intérêt est une étape importante lorsqu'on étudie une nouvelle protéine dont beaucoup reste à découvrir. Deux approches ont été envisagées : une étude par spectrométrie de masse et une par probabilité *via* analyse de la séquence peptidique. Les étapes de recherche et de confirmation des partenaires de l'Ubinucléine par biochimie et immunofluorescence à laquelle j'ai participé (Lupo et al., 2012) vous sont présentées ici.

A) Recherche de partenaires de l'Ubinucléine par spectrométrie de masse (article n°1, p58)

Dans une étude précédente, l'Ubinucléine a été localisée au niveau des jonctions serrées (Aho et al., 2009). Afin de comprendre son rôle dans ce compartiment cellulaire particulier, les partenaires protéiques de l'Ubinucléine spécifiquement associés dans les jonctions serrées ont été recherchés.

Principaux résultats de l'article n°1 (Lupo et al., 2012) :

Nous avons vu que l'Ubinucléine interagit avec la protéine ZO-1. Les domaines d'interaction des protéines ZO-1 et Ubinucléine impliqués dans cette liaison ont été tout d'abord caractérisés par PCA (Protein-Complementation Assay). Dans cet essai, le fragment N-terminal (1-300) de l'Ubinucléine a été fusionné à la partie N-terminale de la protéine fluorescente Vénus, puis le domaine N-terminal (1-500) de la protéine ZO-1 fut fusionné au fragment C-terminal de la protéine Vénus. Si il y a interaction entre les deux domaines, les fragments de la protéine Vénus sont réunis et une fluorescence sera émise. Cette fluorescence a été observée par analyse microscopique de cellules HEK-293 co-transfectées avec les deux constructions. Les domaines N-terminal de l'Ubinucléine et de ZO-1 interagissent donc ensemble. Des expériences *in vitro* de GST-pulldown ont été réalisées afin de préciser les

domaines de liaison d'interaction de l'Ubinucléine et ZO-1. Le domaine N-terminal de la protéine ZO-1 a été fusionné à la GST (Glutathione-S-transférase) puis mis en contact avec la protéine UBN-1 partielle ou complète. La protéine ZO-1 partielle fusionnée à la GST fut récupérée spécifiquement grâce à des billes de sépharose liées à la glutathione. Si une interaction a lieu, l'Ubinucléine sera détectée par western blot. La zone comprise entre les acides aminés 39 et 223 de la séquence peptidique de l'Ubinucléine est nécessaire pour sa liaison avec le domaine PDZ2 de la protéine ZO1 (article n°1, figure 2 p63).

Un fractionnement subcellulaire des cellules HT29 (carcinome du colon où l'on a observé une colocalisation entre l'Ubinucléine et ZO-1) a permis d'isoler les fractions cellulaires solubles et membranaires. Les protéines partenaires de l'Ubinucléine ont été identifiées par la suite par spectrométrie de masse au CEA de Grenoble (figure 19).

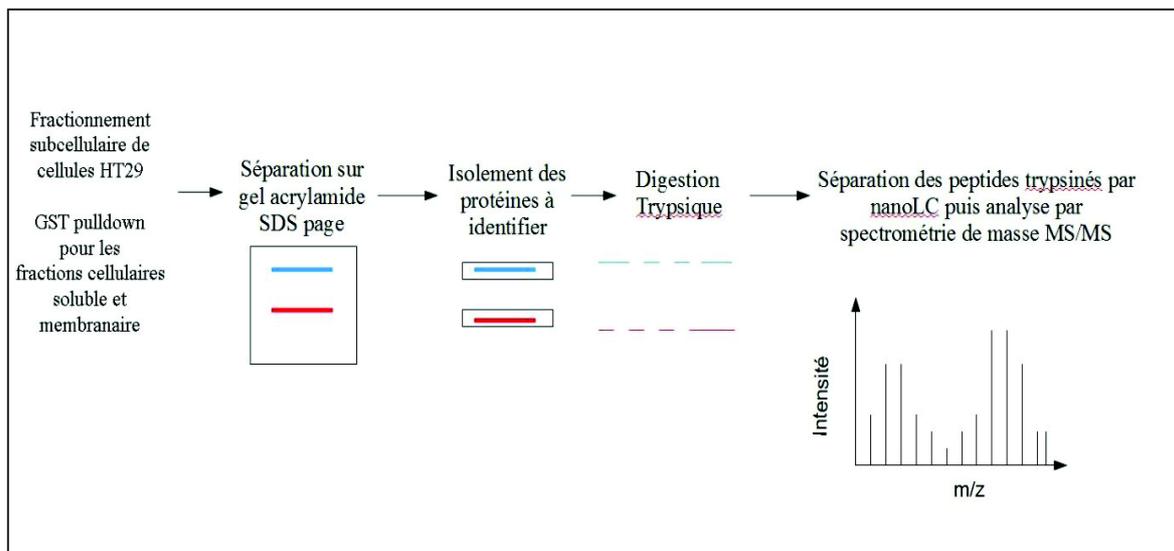


Figure 19 : Etapes suivies pour l'identification des partenaires de l'Ubinucléine par spectrométrie de masse

Après un fractionnement subcellulaire, l'Ubinucléine et ses protéines partenaires sont repêchées par GST-pulldown. Les diverses protéines récupérées sont isolées, digérées par la trypsine. Les peptides issus sont ensuite analysés par spectrométrie de masse afin d'obtenir une identification des protéines récupérées.

Spécifiquement au niveau membranaire, des partenaires potentiels ont pu être identifiés.

Ces protéines peuvent être associées suivant leur(s) fonction(s) et réunies en six grands groupes fonctionnels. Parmi eux, on retiendra tout particulièrement le groupe de protéines associées au cytosquelette et des protéines associées aux membranes, ainsi que ceux du transport intracellulaire et de la signalisation (article n°1, figure 4 p65).

Après analyse des résultats, notre attention a été retenue par deux protéines partenaires potentiels : Lyric et Rack1. La protéine Lyric a été identifiée comme présente dans les jonctions serrées (Britt et al., 2004). Rack1 (Receptor for Activated C Kinase) est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation et interagit, comme l'Ubinucléine, avec le facteur de transcription viral EB1 (Tardif et al., 2002). Des expériences biochimiques et des analyses par microscopie après immunomarquage ont permis de confirmer que ces protéines interagissent avec l'Ubinucléine et montrent des zones de colocalisation (article n°1, figure 5 p66).

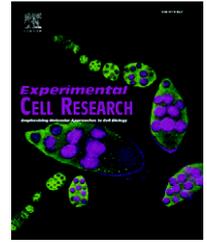
Données supplémentaires :

Il serait intéressant de confirmer et d'étudier d'autres protéines partenaires de l'Ubinucléine identifiées suite à l'analyse par spectrométrie de masse. Tout d'abord, de nombreuses protéines sont associées au cytosquelette (Actine et Microtubules) : la Spectrin, la Catenin- α , l' α -actinin-4, l'actine, la tubuline et la Moesin (impliquée dans la connexion des principales structures de la membrane plasmique) (annexe, p151).

On retrouve aussi des protéines associées au noyau cellulaire. Parmi elles, nous avons les protéines Transportin-1, Exportin-1, Importin-7 et Importin sous-unité beta-1 impliquées dans l'export ou l'import des protéines vers le noyau. De plus, des composants du nucléole ont été identifiés : la Nucléoline (protéine majeur du nucléole associée à la chromatine) dont l'Ubinucléine est proche structurellement (Aho et al., 2000) et la phosphoprotéine nucléolaire P130. La protéine Caprin-1 a également été identifiée, elle peut participer au transport et à la traduction des ARNm impliqués dans la prolifération et la migration cellulaire. De plus, un régulateur transcriptionnel a été retrouvé : la protéine Cirhin (annexe, p151).

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/yexcr

Research Article

Identification of new interacting partners of the shuttling protein ubinuclein (Ubn-1)

Julien Lupo^{a,b}, Audrey Conti^{a,1}, Charlotte Sueur^{a,b,1}, Pierre-Alain Coly^a, Yohann Couté^{c,d,e}, Walter Hunziker^f, Wim P. Burmeister^a, Raphaëlle Germe^{a,b}, Evelyne Manet^{g,h,i}, Henri Gruffat^{g,h,i}, Patrice Morand^{a,b}, Véronique Boyer^{a,*}

^aUnit of Virus Host Cell Interactions (UVHCI), UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS, 6 rue Jules Horowitz, BP 181, F-38042 Grenoble Cedex 9, France

^bCHU de Grenoble, BP217, 38043 Grenoble Cedex 9, France

^cCEA, IRTSV, Laboratoire Biologie à Grande Echelle, F-38054 Grenoble, France

^dINSERM, U1038, F-38054 Grenoble, France

^eUniversité Joseph Fourier, Grenoble 1, F-38000 Grenoble Cedex 09, France

^fInstitute of Molecular and Cell Biology, Epithelial Cell Biology Laboratory, Singapore 1386473, Singapore

^gINSERM U758, Unité de Virologie humaine, Lyon, 46 allée d'Italie F-69007 France

^hEcole Normale Supérieure de Lyon, F-69007 France

ⁱUniversité Lyon1, F-69007, Lyon, France

ARTICLE INFORMATION

Article Chronology:

Received 11 July 2011

Revised version received

21 December 2011

Accepted 24 December 2011

Available online 4 January 2012

Keywords:

NACos, Nuclear and Adhesion junction

Complex components

TJ, tight junction

ZO, Zonula occludens

Proteomic

ABSTRACT

We have previously characterized ubinuclein (Ubn-1) as a NACos (Nuclear and Adhesion junction Complex components) protein which interacts with viral or cellular transcription factors and the tight junction (TJ) protein ZO-1. The purpose of the present study was to get more insights on the binding partners of Ubn-1, notably those present in the epithelial junctions. Using an *in vivo* assay of fluorescent protein-complementation assay (PCA), we demonstrated that the N-terminal domains of the Ubn-1 and ZO-1 proteins triggered a functional interaction inside the cell. Indeed, expression of both complementary fragments of venus fused to the N-terminal parts of Ubn-1 and ZO-1 was able to reconstitute a fluorescent venus protein. Furthermore, nuclear expression of the chimeric Ubn-1 triggered nuclear localization of the chimeric ZO-1. We could localize this interaction to the PDZ2 domain of ZO-1 using an *in vitro* pull-down assay. More precisely, a 184-amino acid region (from amino acids 39 to 223) at the N-terminal region of Ubn-1 was responsible for the interaction with the PDZ2 domain of ZO-1. Co-immunoprecipitation and confocal microscopy experiments also revealed the tight junction protein cingulin as a new interacting partner of Ubn-1. A proteomic approach based on mass spectrometry analysis (MS) was then undertaken to identify further binding partners of GST-Ubn-1 fusion protein in different subcellular fractions of human epithelial HT29 cells. LYRIC (Lysine-rich CEACAM1-associated protein) and RACK-1 (receptor for activated C-kinase) proteins were validated as bona fide interacting partners of Ubn-1. Altogether, these results suggest that Ubn-1 is a scaffold

* Corresponding author at: Unit of Virus Host Cell Interactions (UVHCI), 6 rue Jules Horowitz, BP 181, F-38042 Grenoble Cedex 9, France. Fax: + 33 4 76 20 94 00.

E-mail address: boyer@embl.fr (V. Boyer).

Abbreviations: LYRIC, lysine-rich CEACAM1-associated protein; MS, mass spectrometry; NACos, Nuclear and Adhesion junction Complex components; RACK-1, receptor for activated C-kinase; TJ, tight junction; Ubn-1, Ubinuclein-1; ZO, Zonula Occludens.

¹ These authors contributed equally to this work.

protein influencing protein subcellular localization and is involved in several processes such as cell–cell contact signalling or modulation of gene activity.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Tight junctions (TJs) are thought to be responsible for the intercellular sealing of simple epithelium [1]. They consist of a set of different types of transmembrane proteins that function in barrier formation and regulation, adhesion and signal transduction. These transmembrane components are linked to a cytoplasmic plaque that consists of a scaffold of adaptor proteins such as the ZO family proteins that anchor the junction to the actin cytoskeleton. They are members of the MAGUK (membrane-associated guanylate kinase homologs) family with domains binding to adherens and tight junction proteins in addition to the actin cytoskeleton [2]. The MAGUK family is characterized by their PDZ, SH3, and guanylate kinase homologous domains [3]. ZO-1 can bind directly to ZO-2 or ZO-3 to form ZO-1/ZO-2 and ZO-1/ZO-3 complexes that link directly to actin filaments. ZO-1 binds also directly to the cytoplasmic tail of transmembrane proteins such as occludin or claudin proteins [4]. Interestingly, ZO-1 and ZO-2 have also been shown to concentrate within nucleus in response to chemical stress or mechanical injury, during cell dissociation such as in cancer processes or when cells are cultured at low confluence [5–8]. Several nuclear localisation and export signals (NLS and NES) have been described for ZO-2 [9]. The nuclear localization of ZO proteins may be functionally linked to the description that ZO-1 and ZO-2 associate with proteins involved in the regulation of cell proliferation such as the transcription factors Jun, Fos, C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) [10], ZONAB/DbpA (ZO-1 associated nucleic-acid-binding protein/DNA binding protein A) [11] and KyoT2 [12]. ZO-2 has also been shown to modulate AP-1-regulated gene transcription [13].

TJs, apart from their role as barriers between adjacent cells are also implicated in vesicle targeting, cytoskeletal dynamics, signalling for proliferation and transcription, and definition of cellular polarity. The growing list of diseases caused by mutations in the genes encoding TJ proteins has provided significant insight into the roles of TJs. Moreover, the deregulation of TJs in epithelia seen during cancer processes or following bacterial or viral infections leads to junctional dissociation and loss of the epithelial barrier function which are critical steps in these diseases. For example, the CagA protein of *H. pylori* translocates into host cells and associates with the ZO-1 (zonula occludens)–JAM-A (junctional adhesion molecule) complex of the TJs, thus contributing to the corruption of the gastric epithelial barrier [14]. A second example is the SV40 small tumour antigen which, during the process of epithelial cell transformation, induces a marked disorganization of the actin cytoskeleton accompanied by an altered localization and a down-regulation of several TJ proteins such as ZO-1, occludin and claudin-1 [15]. Finally, another striking example concerns rotavirus infection during which occludin totally disappears from intestinal epithelial differentiated cells, this phenomenon contributes to the disorganization of the barrier function of the TJs [16].

We have previously shown that ZO proteins could interact with ubinuclein (Ubn-1) [17], a cellular protein described as a nuclear protein interacting with the EBV transcription factor EB1

(also called ZEBRA or Zta) and other cellular transcription factor of the leucine-zipper family such as C/EBP or Jun [18,19]. It has also been shown that Ubn-1 can play a role as a histone chaperone protein in senescent cells [20,21]. We reported that this cellular protein shuttles between the nucleus and the TJs, which assign it to the nuclear and the adhesion complex components (NACos) [17]. However the role of Ubn-1 in epithelial cells remains elusive. In this work, we characterized the biochemical interaction between Ubn-1 and ZO-1, and identified new interacting partners of Ubn-1 using a proteomic approach, confirmed by co-immunoprecipitation and immunofluorescence assays.

Materials and methods

Expression constructs

Expression vectors encoding FLAG-epitope-tagged full-length Ubn-1 have been described previously (p1813 and p1771), [18]. Plasmid p2101 was made from a construct containing the first 1037 nucleotide of the Ubn-1 ORF in which the NgoMIV restriction fragment was deleted. p2163, p2234 and p2235 contain respectively the 744, 490 and 231 first nucleotides of the Ubn-1 ORF. These plasmids contain a T7 promoter upstream of the Ubn-1 ORF allowing *in vitro* transcription of the different Ubn-1 mutants. Vectors encoding the N-terminal (Venus1) and the C-terminal (Venus2) fragment of Venus protein were kindly provided by Dr S.W. Michnick (Biochemistry Department, Montréal University, Canada) [22]. Restriction enzyme sites *Bspel/XbaI* and *XmaI/Spel* were inserted by PCR at N-terminal ends of Ubn-1 (amino acids 1–300) and ZO-1 (amino acids 1–500) to clone into *Bspel/XbaI* sites of Venus1 and Venus2, respectively. As negative control, we used vectors encoding Venus1-Alix and Venus2-Alix fusion proteins kindly provided by Dr. W. Weissenhorn (UVHCI, Grenoble, France).

Cell cultures and transfection

HEK 293 cells were cultured in DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) containing 10% fetal bovine serum and antibiotics (100 units/ml penicillin/streptomycin). All cell lines were grown at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. For transfection, cells were plated on 35-mm diameter plates, and Lipofectamine 2000 (Invitrogen) was used in the ratio of 10 µl transfection reagent for 0.25 µg of each DNA, following the manufacturer's instructions.

Antibodies

The mAb directed against Ubn-1 (IgG1 kappa) was produced and used as described previously [17]. The rabbit polyclonal antibody against LYRIC was a gift from Dr. D. E. Britt (Department of Medicine, Rhode Island Hospital/Brown University, USA). Purified mouse IgG1 kappa (Gentaur, Brussels, Belgium) or rabbit polyclonal Ab (anti-Flag Ab, Sigma, St Louis, USA) were used as control antibodies

for co-immunoprecipitation assays. The following commercial antibodies were used: mouse IgM anti-RACK-1 (BD Biosciences, San Jose, CA), mouse anti-lamin A/C (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), rabbit anti-cingulin, anti-ZO-1 (Invitrogen), rabbit anti-tubulin (Sigma). HRP-conjugated anti-mouse antibody used for Western blotting was purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA). HRP-Protein A was purchased from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Alexa 350, Alexa 488 and Alexa 594-conjugated secondary antibodies (Invitrogen) were used for indirect immunofluorescence. IgM anti-Rack-1 was revealed with a biotin-conjugated anti-IgM antibody and Alexa 594-conjugated streptavidine for indirect immunofluorescence or HRP-conjugated streptavidine (Invitrogen) for Western blotting.

GST-fusion proteins and in vitro protein-binding assays

The GST-Ubn-1 fusion protein was described previously [18]. The GST-ZO-1-N-ter (aa 1–568), ZO-2-N-ter and ZO-3-N-ter fusion proteins [23] or GST-PDZ1 (from ZO1; aa 1–108), GST-PDZ2 (from ZO1; aa 189–263) and GST-PDZ3 (from ZO1; aa 424–568) were expressed in *Escherichia coli*, and purified according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare Life Sciences, Orsay, France). The GST-fusion proteins bound to glutathione-sepharose were incubated with *in vitro*-translated ³⁵S-labelled Ubn-1 constructs (Promega, Madison, WI, USA), essentially as described previously [24]. Bound proteins were subjected to SDS/PAGE (10% gel) and visualized by autoradiography.

Preparation of HT29 cellular extracts

For mass spectrometry (MS) analysis, HT29 cells were plated onto 10 100-mm diameter plates at 80% confluence 48–72 h before utilization for biochemistry. The day of the purification, cells were quickly rinsed four times with ice-cold 10 mM HEPES, pH 9.0, and incubated in the same buffer for 3 h at 4 °C without agitation. Cells were immediately scraped off the plates, collected in a 10 ml conical tube chilled on ice and passed 10 times through a 22 G needle. After homogenization, a cocktail of proteases (Complete EDTA-free, Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) and phosphatase inhibitors (Protein Phosphatase Inhibitor Set II, Merck, Whitehouse Station, New Jersey, USA) was added immediately. Large organelles, nuclei, and whole cells were gently removed by centrifugation at 1000× g for 15 min at 4 °C. A second centrifugation was performed at 6000× g for 30 min at 4 °C to clear the supernatant and to remove the rest of nuclear components. Half of the resulting supernatant called S1 was kept at 4 °C for co-IP or pull-down experiments and Western blotting. The other half of S1 was centrifuged at 100,000× g (Optima LE-80K ultracentrifuge, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) for 60 min at 4 °C onto a saturated sucrose cushion. The supernatant thus obtained (S2 supernatant fraction) was stored at 4 °C for further experiments. Membrane fraction (MB fraction) was collected at the buffer and sucrose interface, washed with ice-cold distilled water, and re-centrifuged at 100,000× g onto a saturated sucrose cushion into a new tube. The washed membranes were collected at the water/sucrose interface and diluted in 10% CHAPS in distilled water (chilled to 4 °C) to a final concentration of 2% CHAPS detergent. Nuclear extracts were prepared after the first centrifugation at 1000× g. The pellet was resuspended in ice-cold lysis buffer, containing 250 mM sucrose, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM

MgCl₂ and a cocktail of protease/phosphatase inhibitors, then was centrifuged at 6000× g for 15 min at 4 °C. The pellet was resuspended in cushion buffer (2 M sucrose, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂ and protease/phosphatase inhibitors), filtered, layered onto sucrose cushion, and ultracentrifuged at 100,000× g for 1 h at 4 °C. Nuclear proteins were extracted by resuspending the pellet in 5 volumes of 20 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 0.42 M NaCl, 0.2 mM EDTA, and 25% glycerol for 30 min at 4 °C with gentle shaking. The nuclei were then lysed by 10 passages through a 20 G needle, and debris was removed by centrifugation at 6000× g for 30 min. The supernatant was called "nucleus" fraction (N).

Pull-down and co-immunoprecipitation assays

For GST pull-down assays, lysates were pre-cleared for 2 h at 4 °C with 25 µl of glutathione-linked sepharose beads to remove non-specifically interacting proteins. After centrifugation at 2000× g for 3 min, the supernatants were incubated with GST-fusion proteins overnight at 4 °C. Beads were then collected and washed 4 times at 4 °C with 0.5 ml of washing buffer (250 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 0.1% NP40, 0.5% Triton X-100). Proteins were eluted by boiling with 50 µl of Laemmli buffer and resolved by SDS-PAGE.

For MS validation, confluent HT29 cells from 100-mm diameter culture dishes were washed three times with cold PBS and lysed in 0.9 ml of lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.2% Triton X-100, 0.01% SDS and 1% glycerol) for 20 min at 4 °C, centrifuged and the supernatant pre-cleared with Protein A/G PLUS agarose (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Antibodies directed against targeted protein or control antibodies were then added to 0.45 ml of the lysate and left overnight at 4 °C, followed by the addition of 15 µl of bead suspension for 2 h. Beads were washed four times with PBS supplemented with 250 mM NaCl and 0.1% Triton X-100, and proteins were eluted by boiling with 50 µl of Laemmli buffer before loading on a SDS gel (6–15% acrylamide) and transferred to a PVDF membrane followed by Western blot analysis. The signal was developed by Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, USA).

MS analysis

Protein bands were excised manually from the gels and washed several times by incubation in 25 mM NH₄HCO₃ for 15 min and then in 50% (v/v) acetonitrile containing 25 mM NH₄HCO₃ for 15 min. Gel pieces were dehydrated with 100% acetonitrile and then incubated with 7% H₂O₂ for 15 min before being washed again with the destaining solutions described above. 0.15 µg of modified trypsin (Promega, Madison WI, USA, sequencing grade) in 25 mM NH₄HCO₃ was added to the dehydrated gel spots for an overnight incubation at 37 °C. Peptides were then extracted from gel pieces in three 15 min sequential extraction steps in 30 µl of 50% acetonitrile, 30 µl of 5% formic acid and finally 30 µl of 100% acetonitrile. The pooled supernatants were then dried under vacuum. The dried extracted peptides were resuspended in 5% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid and analysed by on-line nanoliquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS, Ultimate 3000, Dionex and LTQ-Orbitrap, Thermo Fischer Scientific) as described [25]. Data were

processed automatically using Mascot Daemon software (version 2.2, Matrix Science, Boston, MA, USA). Consecutive searches against the concatenated Swiss-Prot and Trembl databases (respectively version 57.6 and 40.6, decoy database, *Homo sapiens* taxonomy, 164,620 entries) were performed for each sample using an in-house version of Mascot 2.2). Proteins identified with a minimum of 2 peptides, each with a score higher than the query identity threshold ($p < 0.01$) and of rank 1, were automatically validated using IRMa (version 1.23.1) [26]. For each identified protein, the spectral count values (number of spectra assigned per protein in the sample) were calculated and reported in the result tables (see Supplemental data). Mass spectrometry identifications were compiled and structured within dedicated databases and grouped and compared using a homemade software (hEIDI).

Western blot of different prepared fractions

N, S1, S2 and MB fractions were prepared as described above and aliquoted (100 μ l each) for Western blot analysis. Total protein concentrations of the different fractions were measured using a Bradford assay. After boiling for 10 min, 20 μ g aliquots of cell lysates were separated on 6–15% acrylamide SDS gels and then transferred to PVDF membranes, which were blocked for 1 h at room temperature (20 °C) in TBS containing 5% non-fat dried milk powder. After primary antibody incubation, the membranes were washed two times, 10 min each wash, in TBS/0.1% Tween 20, incubated for 1 h at room temperature with the secondary antibody, washed again, and the signal was developed using Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fischer Scientific).

Immunofluorescence studies

Cells cultured on coverslips were fixed with methanol for 20 min and with acetone for 30 s or only with PFA for 20 min, followed by washes with PBS. 3% goat pre-immune serum (GPI) diluted in 0.1% Triton X-100/TBS for 30 min at room temperature was used for saturation. The slides were incubated with the primary antibody diluted in 1% GPI/0.1% Triton X-100/TBS for 1 h at room temperature and then washed two times with 0.1% Triton X-100/TBS followed by the secondary antibody incubation at room temperature for 1 h. After washes with 0.1% Triton X-100/TBS, slides were mounted with Mowiol (Sigma) and studied using a fluorescence microscope (Axio Imager Z1 Microscope System, Zeiss, Jena, Germany) and a confocal microscope (Confocal Axioplan2 LSM510, Zeiss). Images were processed with Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

Results

N-terminal domains of Ubn-1 and ZO promote their interaction

As previously shown by biochemical and microscopic studies, Ubn-1 interacts with the N-terminal part of ZO-1 encompassing its PDZ domain [17]. In order to define more precisely the interaction domains between both proteins, experiments based on fluorescent protein-fragment complementation assay (PCA) were carried out. This technique is based on the formation of a fluorescent complex when fragments of Venus proteins fused to the gene

of interest interact together [22]. The N-terminal regions of Ubn-1 (amino acids 1 to 300) and ZO-1 proteins (amino acids 1 to 568, including the three PDZ domains), were fused respectively to the N-terminal and C-terminal halves of Venus protein. In HEK 293 cells, co-expression of these chimeric proteins led to the formation of a specific green fluorescent signal localised in the nuclei of the transfected cells (Fig. 1A), whereas the expression of each of these proteins alone or with another protein (Alix protein fused to N-terminal or C-terminal fragment of Venus protein) did not trigger any fluorescence emission (Figs. 1A, see the first two panels and 1B). Furthermore, expression of the Venus1-Ubn-1-N-ter and Venus2-ZO-1-N-ter in the same cell induced the relocalization of ZO-1-N-ter in the nucleus as shown in Fig. 1A (third panel, see arrows).

In order to localize the interaction between Ubn-1 and ZO-1 proteins, GST pull-down assays were carried out. A series of *in vitro*-translated Ubn-1 constructs (Fig. 2A) was tested for the affinity to GST-ZO-1 (N-terminus)-fusion protein (amino acids 1–568). As shown in Fig. 2B, deletion of the N-terminal region of Ubn-1 (p1771 mutant) abrogated the binding with GST-ZO-1N-ter. In accordance, region involving amino acids 1 to 248 is sufficient for binding to ZO-1 (p2163 mutant). Furthermore, the use of p2101 mutant in GST pull-down abrogated the binding of Ubn-1 to the N-terminal part of ZO-1, implicating amino acids 39 to 223 of Ubn-1. In addition, results obtained with p2234 and p2235 mutants suggest that the region including amino acids 39 to 77 of Ubn-1 could be implicated in the interaction with the N-terminal part of ZO-1. More precisely and as shown in Fig. 2C, the PDZ2 domain (amino acids 189–263) of ZO-1 was responsible for the interaction with Ubn-1.

Cingulin is a partner of Ubn-1

Among TJ proteins described in the literature, the cingulin protein has the property to interact with ZO-1, ZO-2 and ZO-3 proteins [27], as it is the case for Ubn-1 [17]. We tested if Ubn-1 and cingulin could represent binding partners. As shown in Fig. 3A, cingulin co-immunoprecipitated with the anti-Ubn-1 antibody but not with the control antibody of the same subclass. Moreover, this result was confirmed using the anti-cingulin antibody for immunoprecipitation. Confocal microscopy at the TJ stack level was able to demonstrate a large co-localisation of both proteins in TJs of HT29 cells (Fig. 3B).

Identification of Ubn-1 interacting partners using a proteomic approach

In order to identify multi-protein complexes associated with Ubn-1 and localized outside the nucleus, GST-pull-down assays were combined with MS analyses. For this purpose, different subfractions of HT29 confluent epithelial cells corresponding to the soluble (S1 and S2) and membrane-associated proteins (MB) were prepared as described in Fig. 4A. These fractions were tested by Western blotting to reveal the distribution of well-known markers (Fig. 4B). The nuclear lamin A/C marker was recovered in the nuclear fraction and the cytoplasmic tubulin marker was recovered in the S1 and S2 fractions as expected. The ZO-1 protein, a marker of TJs and a partner of Ubn-1 was present in the cytosolic fractions (S2) and in the membrane fraction (MB) which is equivalent to a classical microsomal fraction [28]. Ubn-1 was found in all fractions although more

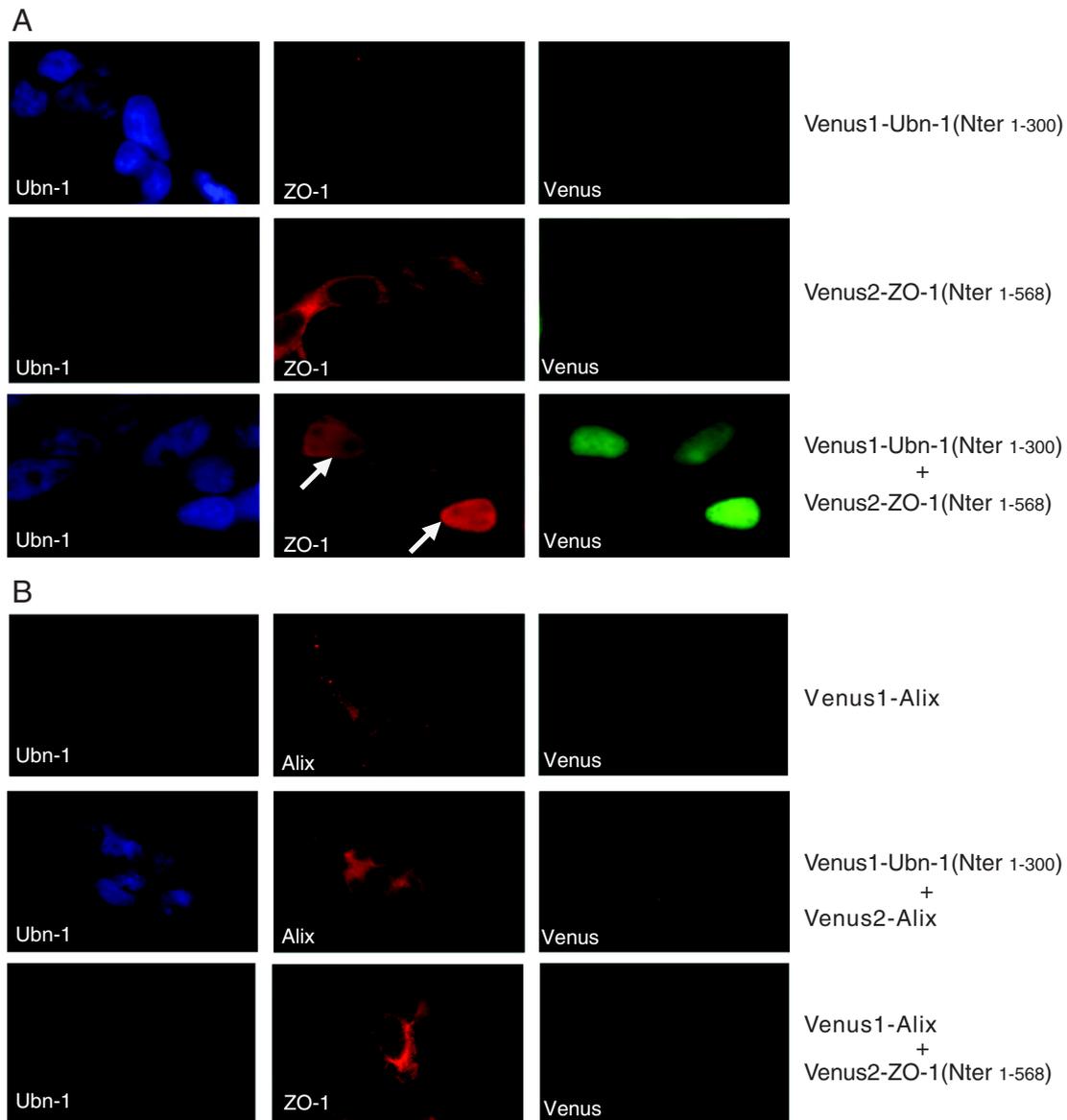


Fig. 1 – Protein-fragment complementation assay between the N-terminal parts of Ubn-1 and ZO-1 proteins. A. Cotransfection of Venus1-Ubn-1(N-ter₁₋₃₀₀) and Venus2-ZO-1(N-ter₁₋₅₆₈) fusion proteins triggered Venus fluorescence in HEK 293 cells (third panel). Transfection of Venus1-Ubn-1(N-ter₁₋₃₀₀) (first panel) and Venus2-ZO-1(N-ter₁₋₅₀₀) (second panel) alone did not lead to any fluorescence. Overexpression of Venus2-ZO-1(N-ter₁₋₅₀₀) alone showed a cytosolic and perinuclear signal (second panel). In co-transfected cells, signal of ZO-1 was restricted to the nucleus (third panel, see arrows). B. Experiments with negative control proteins (Venus1-Alix and Venus2-Alix) were performed to exclude non-specific signal. Anti-Ubn-1 antibody was revealed by Alexa 350 (blue); anti-ZO-1 and anti-Alix antibodies were revealed by Alexa 594 (red); Venus fluorescence appears in green.

concentrated in the nuclear and S2 fractions, a result in accordance with the previously dual localization of this protein in the nucleus and cytoplasmic plaque of TJs.

To understand the role of Ubn-1 in the protein interaction network of the epithelial junctional complex, the cytosolic (S1 and S2) and membrane (MB) fractions from HT29 cells were incubated with the GST-Ubn-1 fusion protein (GST protein alone was used as negative control). After extensive washes, the proteins were eluted and separated on SDS-PAGE gels before being digested with trypsin and the resulting peptides were submitted

to nano-LC MS/MS. Proteins identified with a minimum of two individual peptides were taken into consideration. Proteins identified in the negative controls were subtracted to the list of proteins obtained in the GST-Ubn-1 samples. This highlighted about a hundred of non-redundant proteins specifically identified in the three fractionated samples containing Ubn-1 (see supplemental data for a comprehensive list of all specific identified proteins). Extensive bibliographic and bioinformatic analyses allowed to group the putative partners of Ubn-1 into functional classes (Fig. 4C). Ribosomal proteins or translation initiation/elongation factors represented the majority

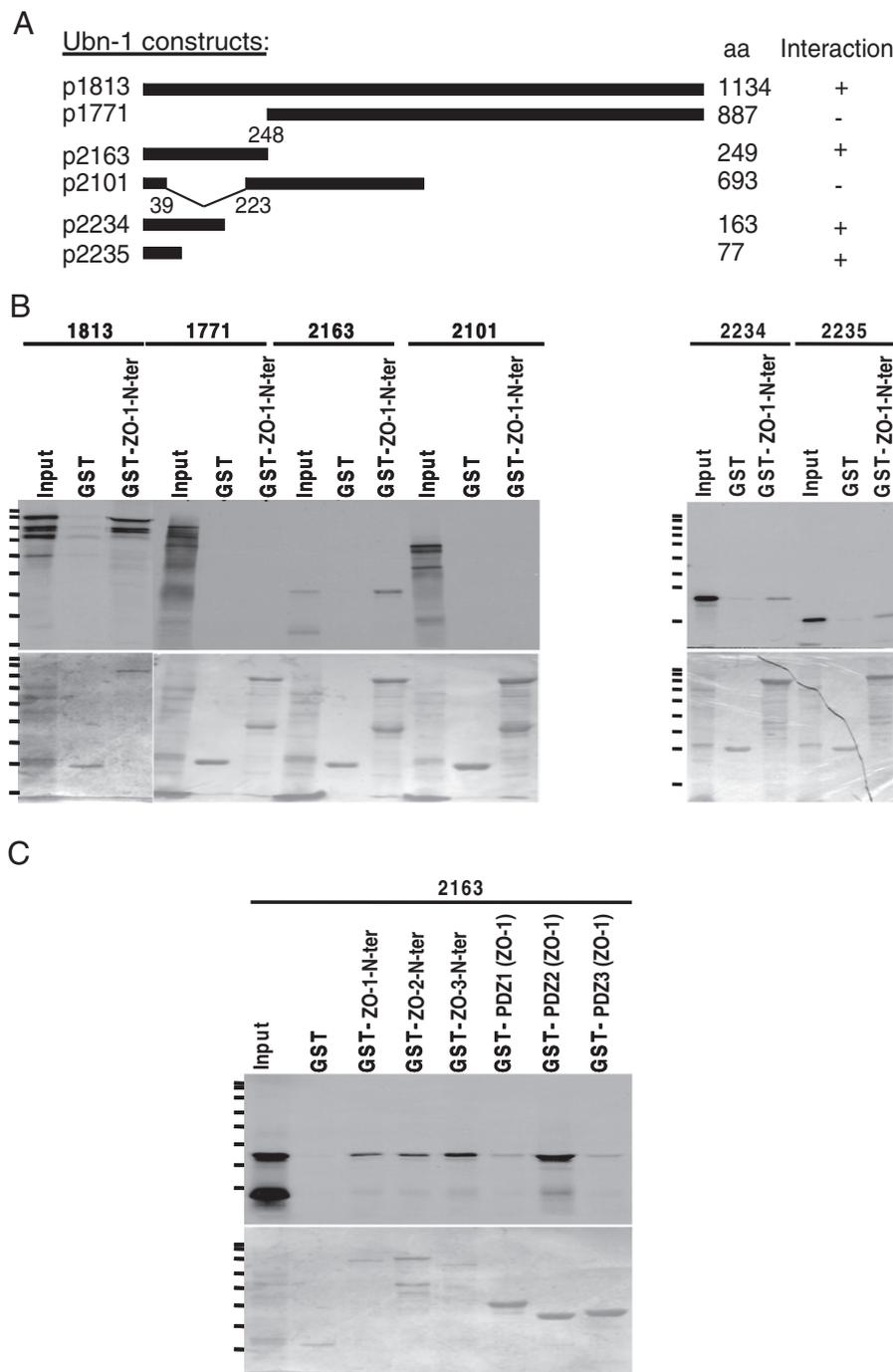


Fig. 2 – Definition of interacting domains of Ubn-1 and ZO-1. A. Scheme describing the different *in vitro*-translated constructs of Ubn-1. For each mutant, the number of amino acids (aa) is indicated as well as the presence (+) or absence (–) of interaction with GST-ZO-1 (N-terminus)-fusion protein. The p1813 construct leads to the Ubn-1 full-length protein production (1134 amino acids). **B.** GST-pull-down assay. *In vitro*-translated Ubn-1 constructs labelled with [³⁵S]methionine were incubated with GST or GST-ZO-1Nter protein which contained the N-terminal part of ZO-1 protein with the three PDZ domains (aa 1–568) fused to the GST protein (top). The amount of GST and GST-ZO-1Nter proteins used was controlled on membrane by Ponceau Red staining (bottom). **C.** GST-pull-down assay with the 2163 Ubn-1 N-terminal domain. *In vitro*-translated Ubn-1 construct labelled with [³⁵S]methionine was incubated with GST or GST-ZO-1, ZO2 or ZO3 (N-terminus) proteins or each GST-PDZ domain of ZO-1 (GST-PDZ1 aa 1–108; GST-PDZ2 aa 189–263; GST-PDZ3 aa 424–568).

of pulled proteins in each fraction (from 56% to 37%), followed by proteins implicated in RNA processing and transcription (from 30% to 20%). Such proteins were less retrieved in the MB fraction.

These ubiquitous proteins are involved in the machinery of cellular transcription and translation and might be contaminants due to non-specific interactions within highly charged sequences of

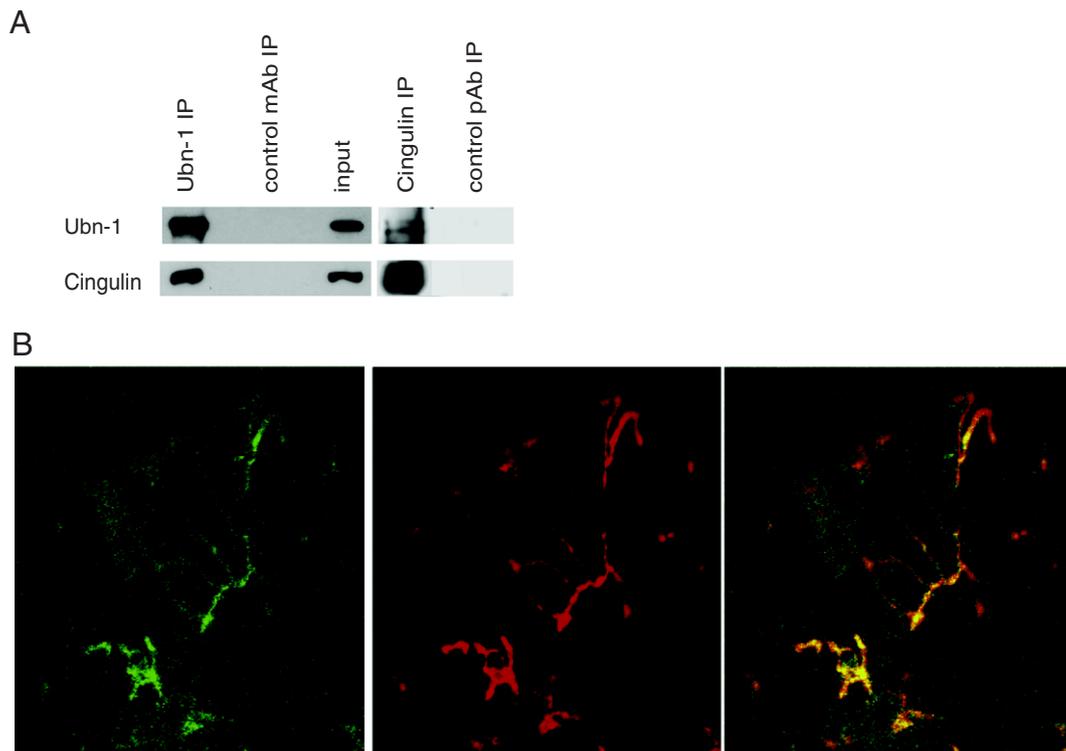


Fig. 3 – Ubn-1 interacts with cingulin in HT29 cells. A. Cingulin was co-immunoprecipitated with anti-Ubn-1 antibody or Ubn-1 was co-immunoprecipitated with anti-cingulin antibody from HT29 lysate. No signal was obtained with the control antibodies (mouse monoclonal-mAb- or rabbit polyclonal-pAb-antibody). After SDS-PAGE and transfer, membrane was blotted either with anti-Ubn-1 or anti-cingulin antibody. B. Co-localization of Ubn-1 (green) and cingulin (red). Co-localization of both proteins is indicated by a yellow staining at the z axis of the TJ.

Ubn-1. More interestingly, differences in representation of the protein classes were then observed in each used fraction for the pull-down assay. Indeed, intracellular trafficking proteins were present at 11 and 12% in S2 and MB fractions respectively, whereas only at 2% in the S1 fraction. Twice the amount of cell cycle proteins were retrieved as partners of Ubn-1 in the MB fraction (6%) compared with the S2 fraction. As expected, cytoskeletal and membrane-associated proteins were more retrieved with the pull-down carried out with the MB fraction (7.5%) compared with the S2 (0%) or the S1 fraction (2%).

Validation of putative Ubn-1 partners

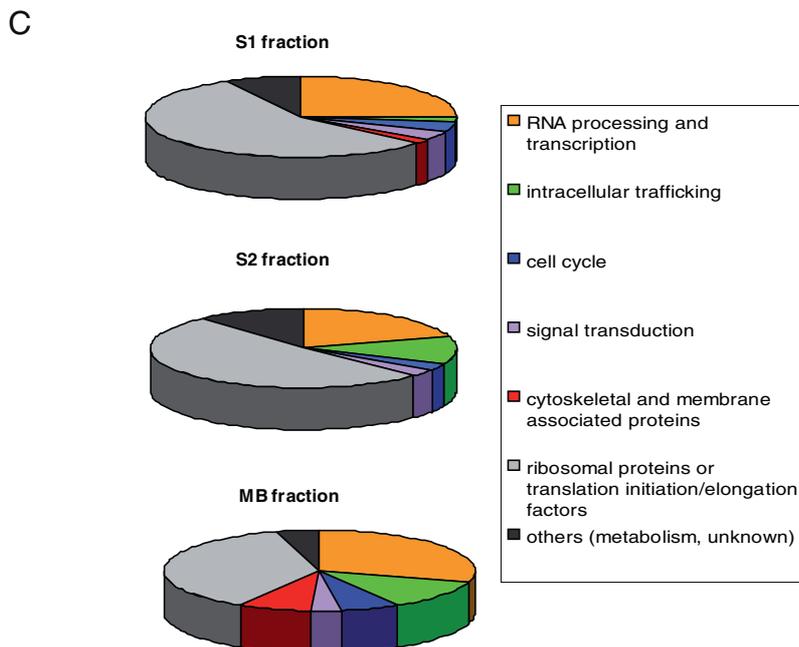
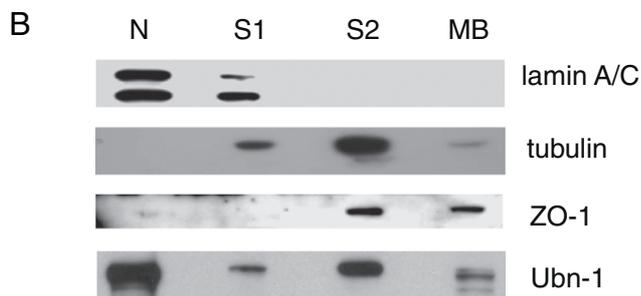
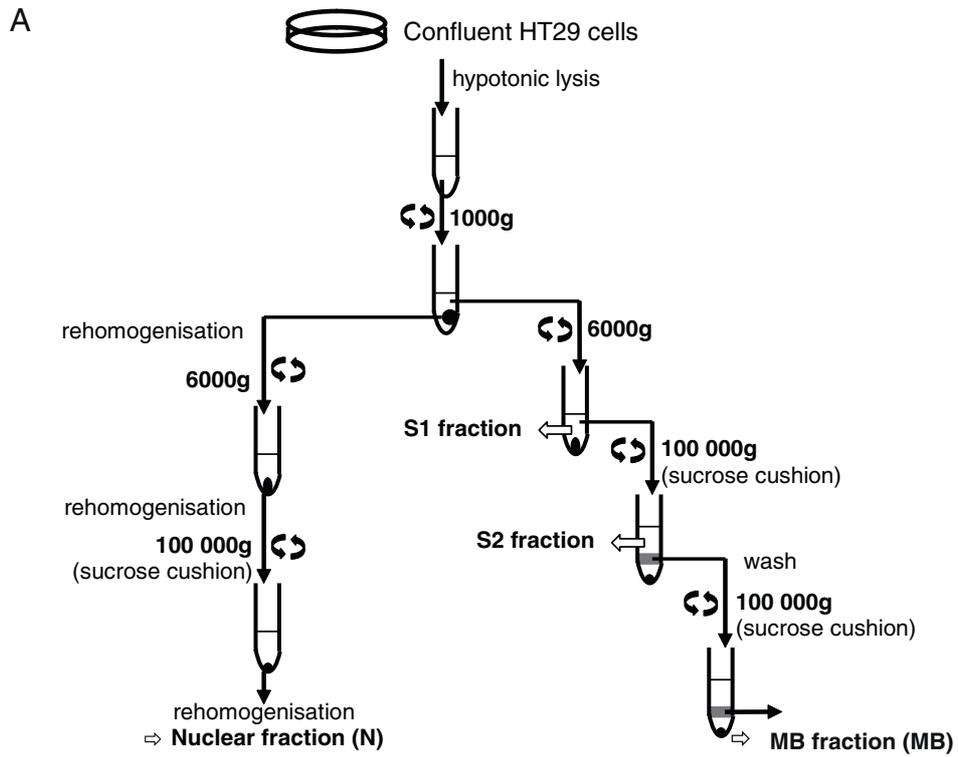
Among the proteins found to be partners of Ubn-1, we carried out co-immunoprecipitation assays in order to confirm the results obtained with the MS analysis. We focused our attention on the most plausible partners according to the knowledge of Ubn-1, their presence at the TJs and their capacity to shuttle between TJs and nucleus. The interaction of Ubn-1 with two proteins from the S1 and the MB compartments was checked either by immunoprecipitating with an antibody directed against Ubn-1 or with a control mouse antibody and could be validated (Fig. 5A). Of note that Ubn-1 could also be detected after immunoprecipitating the LYRIC protein (Fig. 5A). This protein (the Lysine-rich CEACAM1-associated protein, Swiss-Prot entry Q86UE4, LYRIC) has been shown to shuttle between the nucleus and the plasma membranes

[29–31], like Ubn-1. Furthermore, RACK-1 (also called guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1-GBLP, Swiss-Prot entry P63244), a receptor for activated C-kinase and a partner of the EBV transcription factor EB1 [32] was also co-immunoprecipitating with Ubn-1 (Fig. 5A).

Confocal microscopy at the TJ stack level showed a co-localisation of co-immunoprecipitated proteins either localized at the TJ (for LYRIC) and/or in the cytoplasm (for RACK-1) of HT29 cells (Fig. 5B).

Discussion

We mapped the respective interacting domains on Ubn-1 and ZO-1 proteins using *in vivo* and *in vitro* assays. We showed that the PDZ2 domain of ZO-1 was involved in the interaction with Ubn-1. This domain was previously described as responsible for homo- and heterodimerization of ZO proteins, and for binding to connexins [32,33]. Furthermore, structural analysis of PDZ2 domain had showed a novel dimerization mode via three-dimensional swapping due to its high conservation among the ZO proteins [34]. PDZ domains generally interact with short C-terminal amino acid sequences but internal “ligands” have also been identified [35]. Thus, the PDZ2 domain of ZO-1 interacts with Ubn-1 at a non-classical binding site localized within a 184-amino acid N-terminal region. When overexpressed, the N-terminus of Ubn-1 accumulated within nucleus as



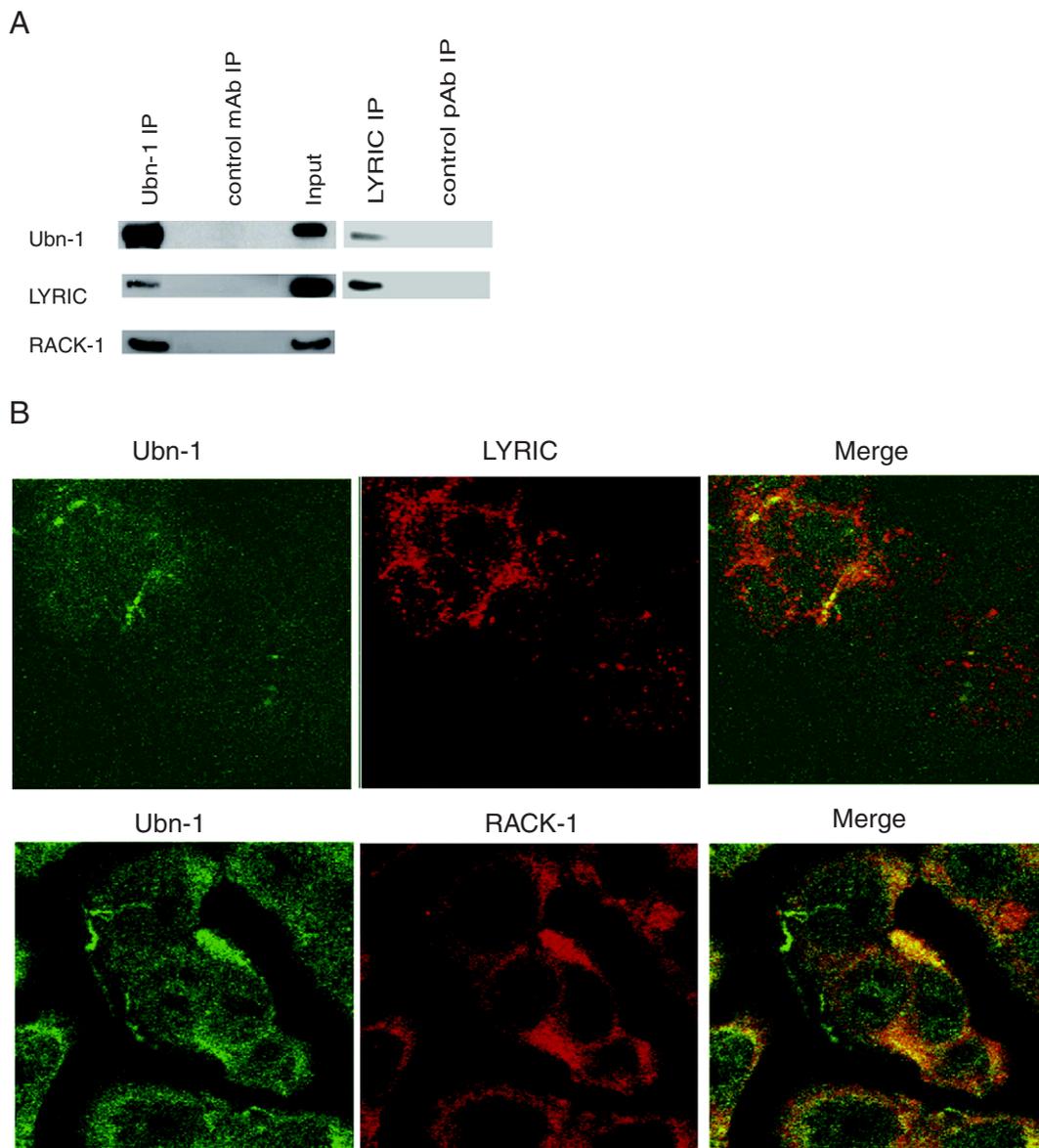


Fig. 5 – Validation of the putative Ubn-1 partners. **A.** Co-immunoprecipitation of the Ubn-1 partners. Confluent HT29 cells were lysed and immunoprecipitated by mouse monoclonal anti-Ubn-1, rabbit polyclonal anti-LYRIC or control mouse (mAb) or rabbit (pAb) antibodies. After SDS-PAGE and transfer, membranes were blotted with either anti-Ubn-1, anti-LYRIC, or anti-RACK-1 antibodies. **C.** Confocal analysis of the specific Ubn-1 partners. HT29 cells were double stained with anti-Ubn-1 (green) and the antibody directed against the corresponding partner (red). Yellow staining indicates co-localization at the z axis.

previously described [17,18] due to the presence of nuclear localization signals. PCA revealed that the N-terminal part of Ubn-1 interacts with the N-terminal part of ZO-1. Moreover, the co-expression

of Ubn-1-N-ter and ZO-1-N-ter induced the relocalization of ZO-1-N-ter from the cytoplasm to the nucleus suggesting a functional interaction between Ubn-1 and ZO-1. A nuclear localization has been

Fig. 4 – Fractionation and MS analysis. **A.** Schematic representation of subcellular fractionation. Confluent HT29 cells were lysed by a hypotonic lysis buffer as described in **Materials and methods**. Soluble and membrane-associated proteins were isolated by passages through two sucrose cushions. **B.** Assessment of the subcellular fractionation. Western blot of lamin A/C (marker of the nucleus), tubulin (marker of the cytoskeleton), ZO-1 and Ubn-1 proteins in each fraction. The same quantity of proteins (20 μ g) was loaded. N, nuclear fraction; S1 and S2, cytosolic fraction; MB, membrane fraction. **C.** Classification of proteins sorted by MS analysis from the GST pull-down assay. S1, S2 and MB fractions were incubated with GST-Ubn-1 fusion protein (GST protein alone was used as negative control). After extensive washes and migration on gel electrophoresis, captured protein complexes were analysed by MS. Proteins obtained with the negative control were subtracted. Identified proteins were classified according to their known biological function. See Supplemental Data for details.

described for ZO-1 in some cells and under specific conditions [8,23,36]. Therefore, our results suggest that Ubn-1 may be a partner of ZO-1 influencing its nuclear localization.

Cingulin is a well-known member of the TJ protein complex, linked to ZO proteins [27]. For this reason, we decided to test a possible interaction between Ubn-1 and cingulin. By using co-immunoprecipitation experiments, the interaction between the 2 proteins was revealed and confocal microscopy analyses demonstrated that these 2 proteins co-localized greatly in human colon epithelial HT29 cells. Thus, our result makes Ubn-1 an additional actor of the molecular complex of the TJ architecture. Of note is that cingulin is linked to the RhoA small G-protein signalling cascade [37] and that the proteomic analysis revealed binding partners of Ubn-1 such as small G-proteins from the different cellular fractions.

In order to identify new binding partners of Ubn-1 in epithelial cells, we performed MS-based identifications of proteins eluted from pull-down assays. About a hundred different proteins were identified only with Ubn-1 as the bait and were grouped into functional classes. Interestingly, several membrane-associated proteins were identified. Among them, LYRIC and RACK-1 were validated as true partners of Ubn-1 through co-immunoprecipitation and confocal microscopy analyses. LYRIC protein was originally identified in TJs where it co-localized with ZO-1 [29]. It has also been localized in other subcellular compartments such as in endoplasmic reticulum (ER), nucleolus, cytoplasm and nucleus [30]. In colon epithelial HT29 cells, staining of LYRIC shows concentrated dots in the cytoplasm and at cell membrane. In our MS experiments, LYRIC was identified in the cytosolic fraction S1, although we observed a co-localisation of both proteins at the TJ level. LYRIC was first identified as partner of the cell adhesion CEACAM1, and then has been shown to have the same limited pattern of distribution of ZO-3 [29]. At the functional level, LYRIC has been proposed to act as an oncogene and promote tumourigenesis [38,39]. It would be interesting to investigate a potential role for Ubn-1 in this process. RACK-1 was the second potential binding partner of Ubn-1 chosen to be tested. It was identified in the pull-down assay using the MB fraction. RACK-1 has been described as a component of the small subunit of ribosome [40] explaining its identification in the MB fraction which contains ribosomes of the rough ER [28]. Using confocal microscopy, we showed that it co-localized with Ubn-1 in the cytoplasm of HT29 cells. RACK-1 regulates several key processes that involve contact with the extracellular matrix, such as cell spreading, the establishment of focal adhesion and cell-cell contacts. In the context of EBV infection, interaction of the viral transcription factor EB1 with RACK-1 could result in inhibition of PKC activity, which affects functions of EBV-infected monocytes such as phagocytosis [31]. RACK-1 has been described to interact with the integrin receptor and interferes with integrin-signalling pathways by recruiting specific kinases [41–43]. RACK-1 interacts also with spectrin [44], IP₃R (receptor for inositol 1,4,5 triphosphate) [45] and Scp160p which is a member of the vigilin family of RNA-binding proteins [46]. Interestingly these partners of RACK-1, including integrin, were also identified in this study as interacting partners of Ubn-1 (see supplemental data).

In addition to cytoplasmic or membrane proteins, nuclear proteins have also been found by our strategy. Indeed, we identified for example histone proteins (H2A, H2B) as well as vigilin and HP1B3 (heterochromatin protein 1 binding protein 3) involved in the formation of heterochromatin [47]. These proteins were found in the less fractionated sample (S1) which contained some nuclear components. Recent studies have shown that Ubn-1 may be a

histone chaperone involved in transcription repression of proliferation-promoting genes [20,21]. Indeed, nuclear Ubn-1 interacts with histone H3.3 and histone chaperone Hira (histone cell cycle regulation defective homologue A) [48], and has been associated with specialized domains of facultative heterochromatin called SAHF (senescence-associated heterochromatin foci) [21]. It is striking to see that another NACos protein, HuAsH1, the human homolog of *Drosophila* ASH1 (absent, small, or homeotic discs 1), contributes also to chromatin remodelling [49,50]. Whether Ubn-1 could participate in the same cells to the architecture of the TJ and to the chromatin modelling is currently under investigation. In addition, our data and others suggest that Ubn-1 may interact with proteins involved in closely related cellular processes such as RNA processing and regulation of translation (for example RACK-1, RNA helicases, the translational activator GCN1, the eIF2A protein kinase 2) [40,51–53]. In this context, it should be noted that symplekin, a nuclear protein that can also associate with TJs, has been linked to the machinery involved in 3'-end processing of pre-mRNA [54,55]. Finally, Ubn-1 may interact with other transcription factors than those already described [18], such as the Y-box factor 1/DNA binding protein B (YB-1/DbpB). Interestingly, ZO-1 binds ZONAB/DbpA, another member of the Y-box factor family and regulates its activity by influencing its subcellular localization [36]. Confirmation of the interaction between Ubn-1 and YB-1 is in progress.

Altogether, our data showed a functional interaction between the TJ proteins Ubn-1 and ZO-1 and identified new interacting partners of Ubn-1 in the TJs using a proteomic approach based on MS analysis. These results suggest that Ubn-1 may act as a scaffold protein regulating processes in the cytoplasmic plaque of TJs.

Conflict of interest

The authors have no financial conflict of interest.

Acknowledgments

This research was supported by the Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Agence Nationale pour la Recherche (grant number RPV06120CSA), the Pôle de Compétitivité Lyon-Biopôle, La Ligue contre le Cancer, the Grenoble University Hospital and the Herpesvirus and Cancer network. E. M. is a CNRS scientist. H. G. and V. B. are INSERM scientists. We thank A. Grichine and J. Mazzega for technical support for the confocal microscopy at Institut Albert Bonniot in Grenoble.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at [doi:10.1016/j.yexcr.2011.12.020](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.12.020).

REFERENCES

- [1] M.S. Balda, K. Matter, Tight junctions at a glance, *J. Cell Sci.* 121 (Pt 22) (2008) 3677–3682.

- [2] A. Hartsock, W.J. Nelson, Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton, *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (3) (2008) 660–669.
- [3] L. Funke, S. Dakoaji, D.S. Bredt, Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions, *Annu. Rev. Biochem.* 74 (2005) 219–245.
- [4] S. Aijaz, M.S. Balda, K. Matter, Tight junctions: molecular architecture and function, *Int. Rev. Cytol.* 248 (2006) 261–298.
- [5] S. Islas, J. Vega, L. Ponce, L. Gonzalez-Mariscal, Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells, *Exp. Cell Res.* 274 (1) (2002) 138–148.
- [6] A. Traweger, R. Fuchs, I.A. Krizbai, T.M. Weiger, H.C. Bauer, H. Bauer, The tight junction protein ZO-2 localizes to the nucleus and interacts with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein scaffold attachment factor-B, *J. Biol. Chem.* 278 (4) (2003) 2692–2700.
- [7] E. Takai, X. Tan, Y. Tamori, M. Hirota, H. Egami, M. Ogawa, Correlation of translocation of tight junction protein Zonula occludens-1 and activation of epidermal growth factor receptor in the regulation of invasion of pancreatic cancer cells, *Int. J. Oncol.* 27 (3) (2005) 645–651.
- [8] C.J. Gottardi, M. Arpin, A.S. Fanning, D. Louvard, The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (20) (1996) 10779–10784.
- [9] L. Gonzalez-Mariscal, A. Ponce, L. Alarcon, B.E. Jaramillo, The tight junction protein ZO-2 has several functional nuclear export signals, *Exp. Cell Res.* 312 (17) (2006) 3323–3335.
- [10] A. Betanzos, M. Huerta, E. Lopez-Bayghen, E. Azuara, J. Amerena, L. Gonzalez-Mariscal, The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells, *Exp. Cell Res.* 292 (1) (2004) 51–66.
- [11] E. Kavanagh, M. Buchert, A. Tsapara, A. Choquet, M.S. Balda, F. Hollande, K. Matter, Functional interaction between the ZO-1-interacting transcription factor ZONAB/DbpA and the RNA processing factor symplekin, *J. Cell Sci.* 119 (Pt 24) (2006) 5098–5105.
- [12] H.Y. Huang, R. Li, Q. Sun, J. Wang, P. Zhou, H. Han, W.H. Zhang, LIM protein KyoT2 interacts with human tight junction protein ZO-2-i3, *Yi Chuan Xue Bao* 29 (11) (2002) 953–958.
- [13] M. Huerta, R. Munoz, R. Tapia, E. Soto-Reyes, L. Ramirez, F. Recillas-Targa, L. Gonzalez-Mariscal, E. Lopez-Bayghen, Cyclin D1 is transcriptionally down-regulated by ZO-2 via an E box and the transcription factor c-Myc, *Mol. Biol. Cell* 18 (12) (2007) 4826–4836.
- [14] M.R. Amieva, R. Vogelmann, A. Covacci, L.S. Tompkins, W.J. Nelson, S. Falkow, Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter pylori* CagA, *Science* 300 (5624) (2003) 1430–1434.
- [15] V. Nunbhakdi-Craig, L. Craig, T. Machleidt, E. Sontag, Simian virus 40 small tumor antigen induces deregulation of the actin cytoskeleton and tight junctions in kidney epithelial cells, *J. Virol.* 77 (5) (2003) 2807–2818.
- [16] I. Beau, J. Cotte-Laffitte, R. Amsellem, A.L. Servin, A protein kinase A-dependent mechanism by which rotavirus affects the distribution and mRNA level of the functional tight junction-associated protein, occludin, in human differentiated intestinal Caco-2 cells, *J. Virol.* 81 (16) (2007) 8579–8586.
- [17] S. Aho, J. Lupo, P.A. Coly, P. Morand, A. Sergeant, E. Manet, V. Boyer, H. Gruffat, Characterization of the ubinuclein protein as a new member of the Nuclear and Adhesion Complex components (NaCos), *Biol. Cell* 101 (2009) 319–334.
- [18] S. Aho, M. Buisson, T. Pajunen, Y.W. Ryoo, J.F. Giot, H. Gruffat, A. Sergeant, J. Uitto, Ubinuclein, a novel nuclear protein interacting with cellular and viral transcription factors, *J. Cell Biol.* 148 (6) (2000) 1165–1176.
- [19] H. Gruffat, J. Lupo, P. Morand, V. Boyer, E. Manet, The nuclear and adherent junction complex component protein ubinuclein negatively regulates the productive cycle of Epstein–Barr virus in epithelial cells, *J. Virol.* 85 (2) (2011) 784–794.
- [20] S. Balaji, L.M. Iyer, L. Aravind, HPC2 and ubinuclein define a novel family of histone chaperones conserved throughout eukaryotes, *Mol. Biosyst.* 5 (3) (2009) 269–275.
- [21] G. Banumathy, N. Somaiah, R. Zhang, Y. Tang, J. Hoffmann, M. Andrade, H. Ceulemans, D. Schultz, R. Marmorstein, P.D. Adams, Human UBN1 is an ortholog of yeast Hpc2p and has an essential role in the HIRA/ASF1a chromatin-remodeling pathway in senescent cells, *Mol. Cell. Biol.* 29 (3) (2009) 758–770.
- [22] I. Remy, S.W. Michnick, Clonal selection and in vivo quantitation of protein interactions with protein-fragment complementation assays, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (10) (1999) 5394–5399.
- [23] M. Reichert, T. Muller, W. Hunziker, The PDZ domains of zonula occludens-1 induce an epithelial to mesenchymal transition of Madin–Darby canine kidney I cells. Evidence for a role of beta-catenin/Tcf/Lef signaling, *J. Biol. Chem.* 275 (13) (2000) 9492–9500.
- [24] E. Manet, C. Allera, H. Gruffat, I. Mikaelian, A. Rigolet, A. Sergeant, The acidic activation domain of the Epstein–Barr virus transcription factor R interacts in vitro with both TBP and TFIIB and is cell-specifically potentiated by a proline-rich region, *Gene Expr.* 3 (1) (1993) 49–59.
- [25] A. Marmagne, M. Ferro, T. Meinel, C. Bruley, L. Kuhn, J. Garin, H. Barbier-Brygoo, G. Ephritikhine, A high content in lipid-modified peripheral proteins and integral receptor kinases features in the Arabidopsis plasma membrane proteome, *Mol. Cell. Proteomics* 6 (11) (2007) 1980–1996.
- [26] V. Dupierris, C. Masselon, M. Court, S. Kieffer-Jaquinod, C. Bruley, A toolbox for validation of mass spectrometry peptides identification and generation of database: IRMA, *Bioinformatics* 25 (15) (2009) 1980–1981.
- [27] M. Cordenonsi, F. D’Atri, E. Hammar, D.A. Parry, J. Kendrick-Jones, D. Shore, S. Citi, Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin, *J. Cell Biol.* 147 (7) (1999) 1569–1582.
- [28] B. Cox, A. Emili, Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics, *Nat. Protoc.* 1 (4) (2006) 1872–1878.
- [29] D.E. Britt, D.F. Yang, D.Q. Yang, D. Flanagan, H. Callanan, Y.P. Lim, S.H. Lin, D.C. Hixson, Identification of a novel protein, LYRIC, localized to tight junctions of polarized epithelial cells, *Exp. Cell Res.* 300 (1) (2004) 134–148.
- [30] H.G. Sutherland, Y.W. Lam, S. Briers, A.I. Lamond, W.A. Bickmore, 3D3/lyric: a novel transmembrane protein of the endoplasmic reticulum and nuclear envelope, which is also present in the nucleolus, *Exp. Cell Res.* 294 (1) (2004) 94–105.
- [31] M. Tardif, M. Savard, L. Flamand, J. Gosselin, Impaired protein kinase C activation/translocation in Epstein–Barr virus-infected monocytes, *J. Biol. Chem.* 277 (27) (2002) 24148–24154.
- [32] D.I. Utepbergenov, A.S. Fanning, J.M. Anderson, Dimerization of the scaffolding protein ZO-1 through the second PDZ domain, *J. Biol. Chem.* 281 (34) (2006) 24671–24677.
- [33] P.J. Kausalya, M. Reichert, W. Hunziker, Connexin45 directly binds to ZO-1 and localizes to the tight junction region in epithelial MDCK cells, *FEBS Lett.* 505 (1) (2001) 92–96.
- [34] J. Wu, Y. Yang, J. Zhang, P. Ji, W. Du, P. Jiang, D. Xie, H. Huang, M. Wu, G. Zhang, J. Wu, Y. Shi, Domain-swapped dimerization of the second PDZ domain of ZO2 may provide a structural basis for the polymerization of claudins, *J. Biol. Chem.* 282 (49) (2007) 35988–35999.
- [35] R.R. Penkert, H.M. DiVittorio, K.E. Prehoda, Internal recognition through PDZ domain plasticity in the Par-6-Pals1 complex, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 (11) (2004) 1122–1127.
- [36] M.S. Balda, K. Matter, The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression, *EMBO J.* 19 (9) (2000) 2024–2033.
- [37] E. Steed, M.S. Balda, K. Matter, Dynamics and functions of tight junctions, *Trends Cell Biol.* 20 (3) (2010) 142–149.

- [38] L. Emdad, D. Sarkar, Z.Z. Su, A. Randolph, H. Boukerche, K. Valerie, P.B. Fisher, Activation of the nuclear factor kappaB pathway by astrocyte elevated gene-1: implications for tumor progression and metastasis, *Cancer Res.* 66 (3) (2006) 1509–1516.
- [39] S.G. Lee, Z.Z. Su, L. Emdad, D. Sarkar, T.F. Franke, P.B. Fisher, Astrocyte elevated gene-1 activates cell survival pathways through PI3K-Akt signaling, *Oncogene* 27 (8) (2008) 1114–1121.
- [40] J. Nilsson, J. Sengupta, J. Frank, P. Nissen, Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome, *EMBO Rep.* 5 (12) (2004) 1137–1141.
- [41] J. Lilliental, D.D. Chang, Rack1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin beta subunit, *J. Biol. Chem.* 273 (4) (1998) 2379–2383.
- [42] E.A. Cox, D. Bennin, A.T. Doan, T. O'Toole, A. Huttenlocher, RACK1 regulates integrin-mediated adhesion, protrusion, and chemotactic cell migration via its Src-binding site, *Mol. Biol. Cell* 14 (2) (2003) 658–669.
- [43] T. Vomastek, M.P. Iwanicki, H.J. Schaeffer, A. Tarcsafalvi, J.T. Parsons, M.J. Weber, RACK1 targets the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway to link integrin engagement with focal adhesion disassembly and cell motility, *Mol. Cell. Biol.* 27 (23) (2007) 8296–8305.
- [44] M.M. Rodriguez, D. Ron, K. Touhara, C.H. Chen, D. Mochly-Rosen, RACK1, a protein kinase C anchoring protein, coordinates the binding of activated protein kinase C and select pleckstrin homology domains in vitro, *Biochemistry* 38 (42) (1999) 13787–13794.
- [45] B.C. Bandyopadhyay, H.L. Ong, T.P. Lockwich, X. Liu, B.C. Paria, B.B. Singh, I.S. Ambudkar, TRPC3 controls agonist-stimulated intracellular Ca²⁺ release by mediating the interaction between inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and RACK1, *J. Biol. Chem.* 283 (47) (2008) 32821–32830.
- [46] S. Baum, M. Bittins, S. Frey, M. Seedorf, Asc1p, a WD40-domain containing adaptor protein, is required for the interaction of the RNA-binding protein Scp160p with polysomes, *Biochem. J.* 380 (Pt 3) (2004) 823–830.
- [47] J. Zhou, Q. Wang, L.L. Chen, G.G. Carmichael, On the mechanism of induction of heterochromatin by the RNA-binding protein vigilin, *RNA* 14 (9) (2008) 1773–1781.
- [48] H. Tagami, D. Ray-Gallet, G. Almouzni, Y. Nakatani, Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis, *Cell* 116 (1) (2004) 51–61.
- [49] T. Nakamura, J. Blechman, S. Tada, T. Rozovskaia, T. Itoyama, F. Bullrich, A. Mazo, C.M. Croce, B. Geiger, E. Canaani, huASH1 protein, a putative transcription factor encoded by a human homologue of the *Drosophila ash1* gene, localizes to both nuclei and cell-cell tight junctions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (13) (2000) 7284–7289.
- [50] C. Beisel, A. Imhof, J. Greene, E. Kremmer, F. Sauer, Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator Ash1, *Nature* 419 (6909) (2002) 857–862.
- [51] A.C. Dar, T.E. Dever, F. Sicheri, Higher-order substrate recognition of eIF2alpha by the RNA-dependent protein kinase PKR, *Cell* 122 (6) (2005) 887–900.
- [52] F.V. Fuller-Pace, DExD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation, *Nucleic Acids Res.* 34 (15) (2006) 4206–4215.
- [53] M.J. Marton, Vazquez de Aldana CR, H. Qiu, K. Chakraburttu, A.G. Hinnebusch, Evidence that GCN1 and GCN20, translational regulators of GCN4, function on elongating ribosomes in activation of eIF2alpha kinase GCN2, *Mol. Cell. Biol.* 17 (8) (1997) 4474–4489.
- [54] B.H. Keon, S. Schafer, C. Kuhn, C. Grund, W.W. Franke, Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein, *J. Cell Biol.* 134 (4) (1996) 1003–1018.
- [55] I. Hofmann, M. Schnolzer, I. Kaufmann, W.W. Franke, Symplekin, a constitutive protein of karyo- and cytoplasmic particles involved in mRNA biogenesis in *Xenopus laevis* oocytes, *Mol. Biol. Cell* 13 (5) (2002) 1665–1676.

B) Recherche d'autres partenaires de l'Ubinucléine (articles n°1 p58 et n°2 p87)

Afin de découvrir d'autres protéines partenaires qui conduiraient à une meilleure connaissance par des analyses fonctionnelles de l'Ubinucléine, d'autres pistes ont été explorées.

Comme l'Ubinucléine, la Cinguline est capable de se lier à la protéine des jonctions serrées ZO-1 ainsi qu'aux deux autres membres de cette famille ZO-2 et ZO-3. Ayant un partenaire en commun, on peut se demander si l'Ubinucléine et la Cinguline sont capables d'interagir entre elles. Dans le but de vérifier cette hypothèse, des expériences biochimiques par immunoprécipitation et des analyses microscopiques ont été entreprises. Ces analyses ont confirmé le partenariat entre ces deux protéines et ont montré leur colocalisation (article n°1, figure 3 p64).

L'analyse de la séquence peptidique de l'Ubinucléine et des précédents résultats issus de la recherche des partenaires de l'Ubinucléine par spectrométrie de masse ont apporté d'autres pistes. Deux partenaires potentiels ont été étudiés : la protéine 14.3.3ε et la chaîne lourde de la molécule de clathrine. Les motifs présents au niveau de l'Ubinucléine sont indiqués dans la figure 20 (en rouge pour les motifs reconnus par la chaîne lourde de la clathrine et en marron pour le motif reconnu par les protéines de la famille 14.3.3).

```

>sp|Q9NPG3|UBN1_HUMAN Ubiquitin-1 OS=Homo sapiens GN=UBN1 PE=1 SV=2

MSEPHRVQFTSLPGSLNPAFLKKSRRKEEAGAGEQHGDCEPAAAAVRITLTLFEPDHKRCPEFFYPELV
KNIRGKVKGLQPGDKKKDLSDPFNDEEKERHKVEALARKFEEKYGGKKRRKDRIQDLIDMGYGYD
ESDSFIDNSEAYDELVPASLTTKYGGFYINSGTLQFRQASESEDDFIKEKKKKSPKRRKLKEGGEKIK
KKKKDDTYDKEKKSFKSKAGFTALNASKEKKKKKYSGALSVKEMLKKFQKEKEAQQKREEE
HKPVAVPSAEAQGLRELEGASDPLLSLFGSTSDNDLLQAATAMDSLTDLDLEHLLSESPEGSPFRDM
DDGSDSLGVGLDQEFRQPSLPEGLPAPLEKRVKELAQAAARAAEGESRQKFFTQDINGILLDIEAQT
RELSSQVRSGVYAYLASFLPCKDALLKRARKLHLYEQGGRLKEPLQKLKEAIGRAMPEQMAKYQD
ECQAHTQAKVAKMLEEEKDKEQRDRICSDEEEDEEKGGRRIMGPRKKFQWNDEIRELLCQVVKIKL
ESQDLERNNAQAWEDCVKGFDAEVKPLWPKGWMQARTLFKESRRGHGHLTSILAKKKVMAPS
KIKVKESSTKPKKVSVPSPGQIGGPIALPSDHQTGGLSIGASSRELPSQASGGLANPPPVNLEDSLDED
LIRNPASSVEAVSKELAALNSRAAGNSEFTLPAPSKAPAEKVGVLCTEEKRNFAKPSAPSAPPASSL
QSPNLFLAEQALALGQSSQEKPESSGYKELSCQAPLNKGLPEVHQSKAKHHSPLRTPSHGPQVAVPV
PGPQVKVFHAGTQQQKNFTPPSPFANKLGPASPTQCHRSLQLVKTAAGQGFHPSAPATSGGLSA
SSSSHKTPASSSALSHPAKPHSVSSAGSSYKNNPFASSISKHGVSSGSSSSGGTPVQSSVSGSLVPGI
QPPSVGQATSRPVSSAGKKMPVSQKLTLVAPGGPNGDSSGGTQGVAKLLTSPSLKPSAVSSVTSST
SLSKGASGTVLLAGSSLMASPYKSSSPKLSGAMSSNSLGIITPVPIPVHVLVSFADSSAKAGVSKDAIV
TGPAPGSFHHGLGHSLLAGLHSSPPHAAPLPHAAVPTHIPQSLPGASQLHGKGPVPRKL

```

Figure 20 : Séquence peptidique de l'Ubiquitine (UBN-1)
 Séquence présente dans la banque de données Uniprot

La famille protéique 14.3.3 est impliquée dans de très nombreux mécanismes cellulaires (localisation cellulaire, transport, métabolisme...). Elles reconnaissent et fixent leurs ligands au niveau de deux types de sites consensus: RSXpSXP (motif type 1) et RXXXpSXP (motif type 2). L'Ubiquitine possède le motif de type 2 dans sa séquence peptidique (figures 20 et 21). Nous nous sommes tout particulièrement intéressés à la protéine 14.3.3e car elle interagirait avec la protéine EB1 du virus d'Epstein-Barr (résultat communiqué par le Dr Irène Joab, Master 2 de Charlotte Sueur).

VGLDQEFRQPSLPEGLPAP	
341	360

Figure 21 : Séquence peptidique de l'Ubiquitine (résidus 341-360)

Le motif de type 2 présent dans la séquence peptidique de l'Ubiquitine est indiqué en vert. La sérine indiquée en violet correspond à la sérine 352 qui peut être phosphorylée.

Pour vérifier l'interaction entre l'Ubinucléine et la protéine 14.3.3ε, une expérience biochimique par immunoprécipitation a été réalisée. Dans la figure 22, on observe que les deux protéines co-précipitent, et ce, de façon spécifique, puisque l'anticorps contrôle ne révèle aucune bande. L'Ubinucléine et la protéine 14.3.3ε peuvent donc interagir.

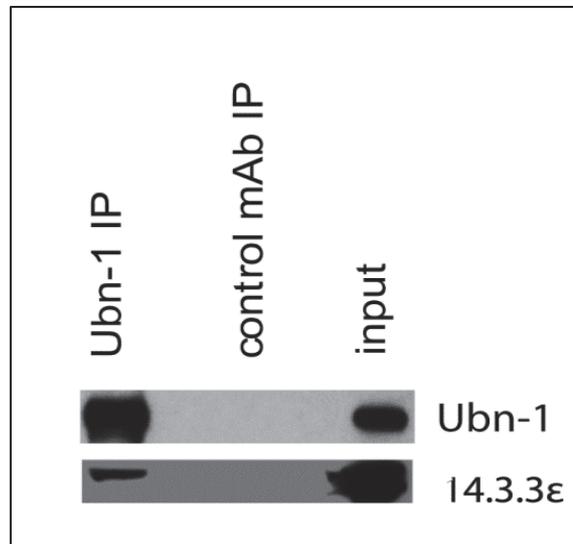


Figure 22 : Co-immunoprécipitation de l'Ubinucléine et de la protéine 14.3.3ε

L'Ubinucléine est spécifiquement immunoprécipitée et détectée par western blot. La protéine 14.3.3ε, ayant co-immunoprécipité est également détectée par western blot. Ceci indique son interaction directe avec l'Ubinucléine

Pour confirmer les résultats obtenus par la technique d'immunoprécipitation, la localisation cellulaire de l'Ubinucléine et de 14.3.3ε a été observée par microscopie après immunomarquage (figure 23). On peut noter que l'Ubinucléine est présente essentiellement au niveau des jonctions serrées alors que 14.3.3ε est présente dans le cytoplasme et les jonctions cellulaires. La colocalisation des deux protéines est révélée par la couleur jaune, au niveau des jonctions serrées (indiqué par la flèche).

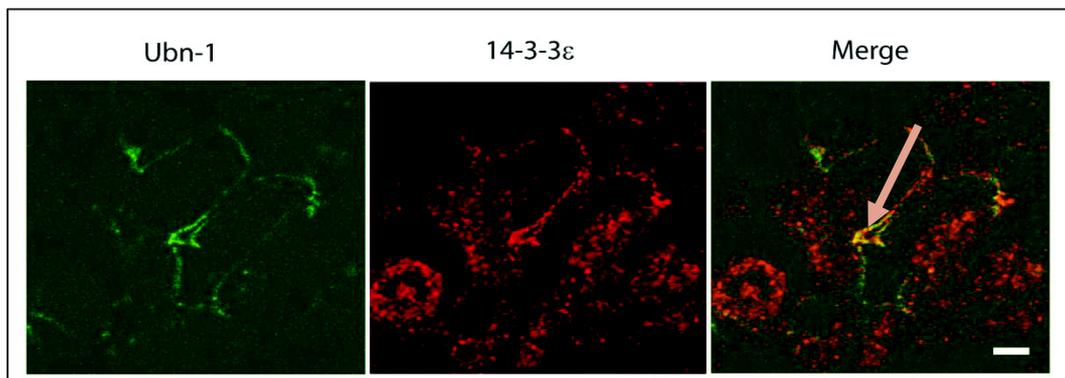


Figure 23 : Colocalisation de l'Ubinucléine et de la protéine 14.3.3ε

L'observation de la localisation cellulaire de l'Ubinucléine (marquage vert) et de 14.3.3ε (marquage rouge) par immunomarquage, montrent des zones de co-localisation (marquage jaune). Ces deux protéines sont, par endroit, toutes les deux présentes (exemple indiqué par la flèche). Barre de mesure : 10 μm.

Les expériences d'immunoprécipitation et les observations microscopiques après immunomarquage nous informent donc que l'Ubinucléine a pour protéine partenaire 14.3.3ε (article n°2, p87).

Au niveau de la séquence peptidique de l'Ubinucléine, deux motifs présents sont susceptibles de se lier à la chaîne lourde de la clathrine : YDEL soit YAYL (figure 20). Les mêmes analyses que précédemment (immunoprécipitation et immunomarquage) ont été réalisées afin de confirmer que la protéine de la chaîne lourde de la clathrine peut s'associer avec l'Ubinucléine.

L'expérience biochimique d'immunoprécipitation nous a montré que la chaîne lourde de la molécule de clathrine co-précipite (figure 24), indiquant leur interaction dans les cellules HT29.

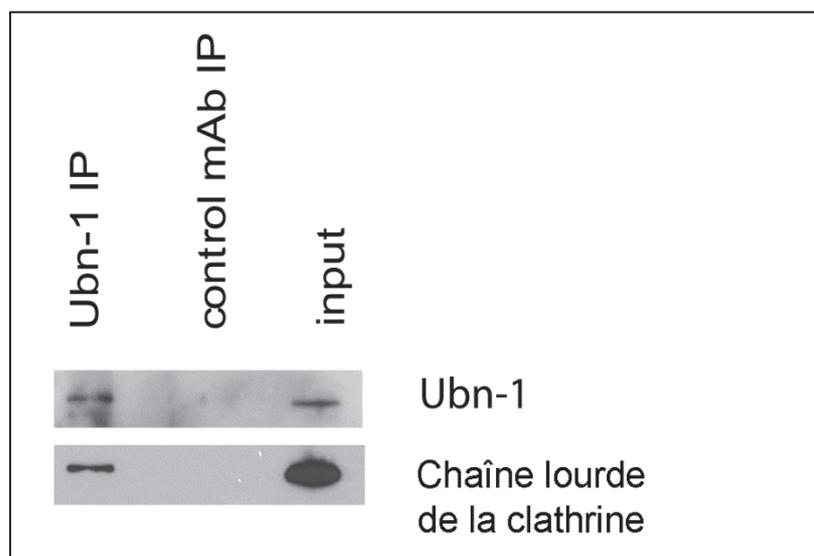


Figure 24 : Co-immunoprécipitation de l'Ubinucléine et de la chaîne lourde de la molécule de clathrine

L'Ubinucléine est spécifiquement immunoprécipitée et détectée par western blot. La chaîne lourde de la clathrine, ayant co-immunoprécipité est également détectée par western blot. Ceci indique son interaction directe avec l'Ubinucléine

Le marquage par immunofluorescence de ces deux protéines montre des zones où ces deux partenaires sont présents (figure 25). La colocalisation confirme les observations biochimiques précédentes.

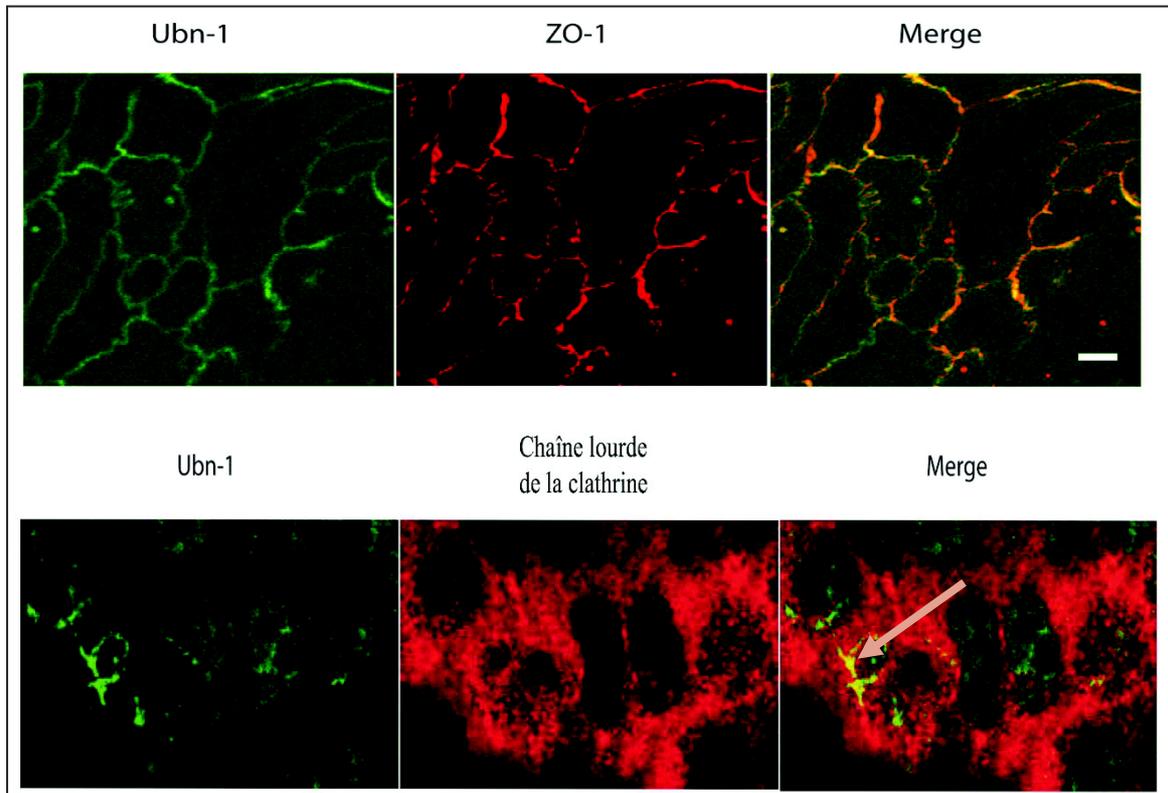


Figure 25 : Colocalisation de l'Ubinucléine et de la chaîne lourde de la molécule de clathrine dans les cellules HT29

L'observation de la localisation cellulaire de l'Ubinucléine (marquage vert) et de la chaîne lourde de la clathrine (marquage rouge) par immunomarquage, montrent des zones de colocalisation (marquage jaune et indiqué par la flèche). Ces deux protéines sont, par endroit, toutes les deux présentes (exemple indiqué par la flèche). Barre de mesure: 5 μ m.

En résumé, trois nouvelles protéines potentiellement partenaires de l'Ubinucléine ont été identifiées : Cinguline, 14.3.3 ϵ et la chaîne lourde de la molécule de clathrine. Deux d'entre elles nous ont conduit vers deux pistes de mécanisme fonctionnel (les diverses voies impliquées par la famille protéique 14.3.3 et la voie d'endocytose *via* les molécules de clathrine).

2- Analyse fonctionnelle de l'Ubinucléine

A) L'Ubinucléine emprunte la voie dépendante de la clathrine

Les protéines membranaires (trans et sous-membranaires) sont régulièrement recyclées dans la cellule. De plus, divers stimuli ou stress peuvent entraîner un remaniement des composants membranaires impliquant un transport de ces protéines par endocytose. Il existe plusieurs mécanismes d'endocytose : mini et macropinocytose, endocytose par la cavéoline, la phagocytose et l'endocytose dépendante de la clathrine. La voie endosomale mise en route sera choisie en fonction de la protéine cellulaire concernée ou du stimulus déclenchant ce mécanisme.

Nous venons de voir que l'Ubinucléine peut s'associer à la chaîne lourde des molécules de clathrine. Pour démontrer que l'Ubinucléine sous-membranaire passe par la voie d'endocytose dépendante de la clathrine, le mécanisme d'internalisation des protéines membranaires et sous-membranaire par privation calcique (connu comme provoquant l'internalisation des protéines des jonctions adhérentes et membranaires) a été choisi. Pour tester par biochimie cette méthode, la déplétion calcique est suivie d'une expérience de résistance à protéinase (la Trypsine). La protéine Claudine-1 a été choisie en tant que marqueur des protéines transmembranaires des jonctions serrées. Nous observons une dégradation presque complète de la Claudine-1 par la trypsine dans les cellules MDCK cultivées dans un milieu complet (figure 26, ligne 2). En revanche, la protéine Claudine-1 est plus présente (environ deux fois, normalisation par rapport au signal d'actine) dans les cellules privées en calcium (figure 26, ligne 4). Ceci indique qu'une partie des protéines Claudine-1 a été protégée suite à leur internalisation provoquée par la privation calcique. Le fait de priver le milieu cellulaire en calcium entraîne donc une internalisation des protéines membranaires des jonctions serrées par endocytose et peut être utilisé pour la suite de l'étude.

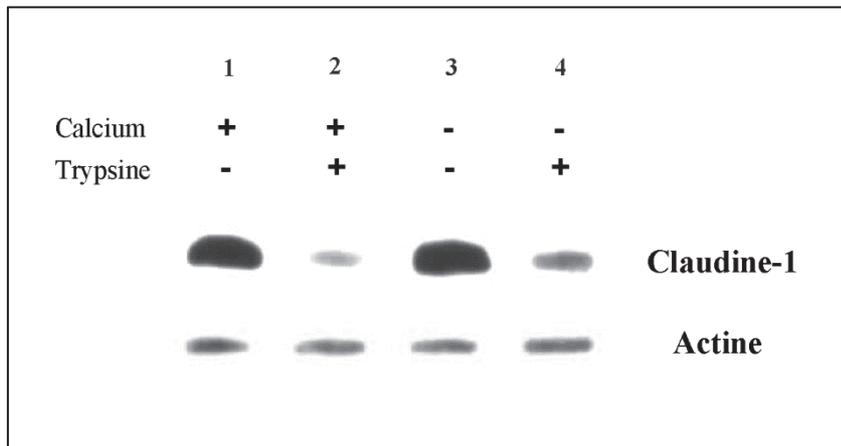


Figure 26 : Détection par western blot de la protéine Claudine-1 après traitement trypsique et privation de calcium

La claudine-1 est une protéine transmembranaire des jonctions. L'actine est choisie pour normaliser les résultats. La trypsine est une protéinase qui dégrade l'extrémité cytosolique des protéines transmembranaires. Sa détection par western blot a été réalisée sans ou avec privation calcique et sans ou avec traitement par la trypsine.

Après une heure de privation calcique, nous pouvons observer par immunomarquage des points de colocalisation des protéines Claudine-1, ZO-1 et Ubn-1 au niveau des jonctions cellulaires (figure 27). Nous notons également une concentration de l'Ubinucléine au niveau de jonctions tricellulaires à partir de 2h de privation calcique (indiquée par une flèche sur la figure 26).

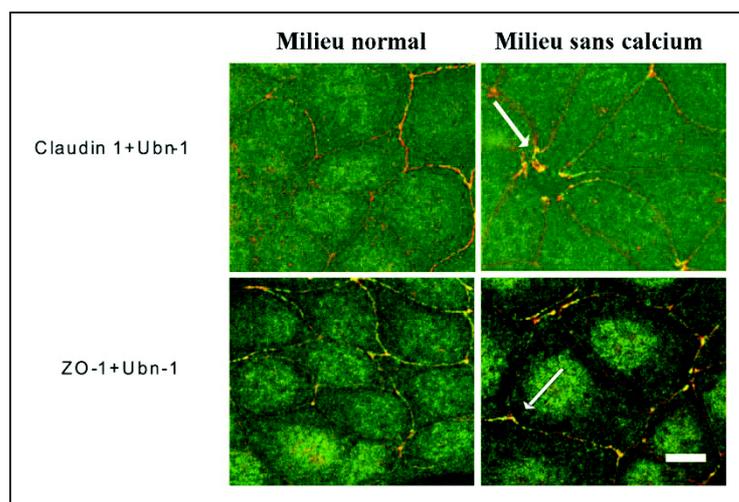


Figure 27 : Colocalisation plus importante de l'Ubinucléine avec les protéines Claudine-1 et ZO-1

La colocalisation de l'Ubinucléine (marquage en vert) avec les protéines Claudine-1 et ZO-1 (marquage en rouge), est suivie par immunomarquage. Deux conditions sont étudiées : en présence ou en absence de calcium. En absence de calcium, nous observons une colocalisation (marquage en jaune) concentrée en certains points. Barre de mesure : 5 µm

Afin de vérifier que l'Ubinucléine emprunte une voie de transport vésiculaire, des analyses par microscopie à fluorescence après différents temps de privation calcique ont été faites. Dans la figure 28, on observe que dès 2h d'internalisation, l'Ubinucléine diminue en intensité de marquage au niveau membranaire. Il en est de même (mais avec moins d'intensité) pour nos protéines spécifiques des jonctions serrées Claudine-1 et ZO-1. L'Ubinucléine peut donc emprunter une voie de transport vésiculaire de manière plus marquée et rapide que les protéines ZO-1 ou Claudine-1.

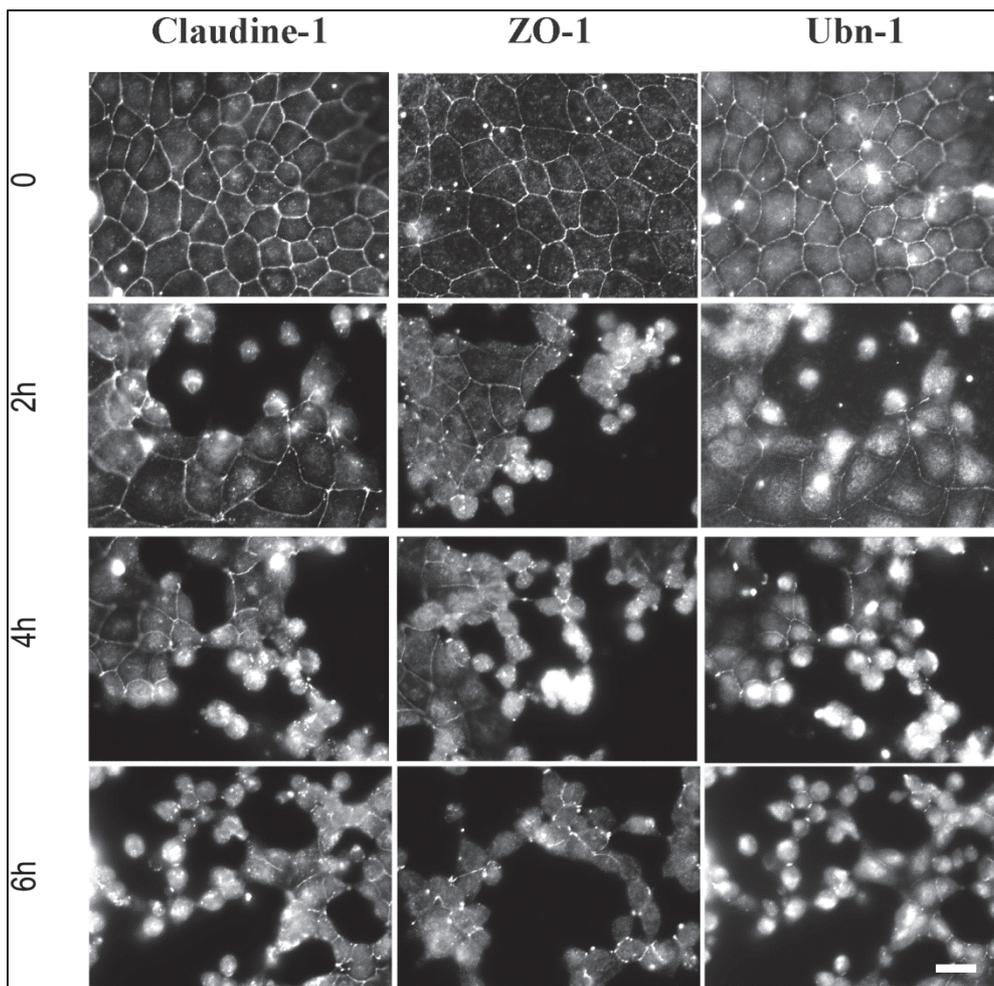


Figure 28 : Suivi cinétique par immunomarquage de l'Ubinucléine après privation de calcium
 L'Ubinucléine est suivie cinétiquement par immunomarquage après privation calcique.
 Barre de mesure : 20 μ m

Pour démontrer que l'Ubinucléine passe par la voie d'endocytose dépendante de la clathrine, l'acidification du milieu est présente. Ceci entraîne un blocage de l'utilisation de cette voie endosomale particulière par la cellule. Comme montré dans la figure 29, les protéines ZO-1 et Ubinucléine ont une localisation caractéristique au niveau des jonctions serrées dans les

cellules MDCK contrôle. Après 2h de culture dans un milieu privé en calcium, l'Ubinucléine est presque absente au niveau des jonctions serrées (figure 29, panel X), alors que la protéine ZO-1 est très faiblement endocytée (figure 29, panel Z). L'Ubinucléine reste présente après privation calcique lorsque le milieu est acide (pH=5.5) (figure 29, panel Y). La diminution de l'Ubinucléine au niveau membranaire suite à l'initiation du processus d'endocytose par privation calcique (durée : 2h), est donc contrebalancée par le blocage de la voie d'endocytose dépendante de la clathrine *via* l'acidification du milieu.

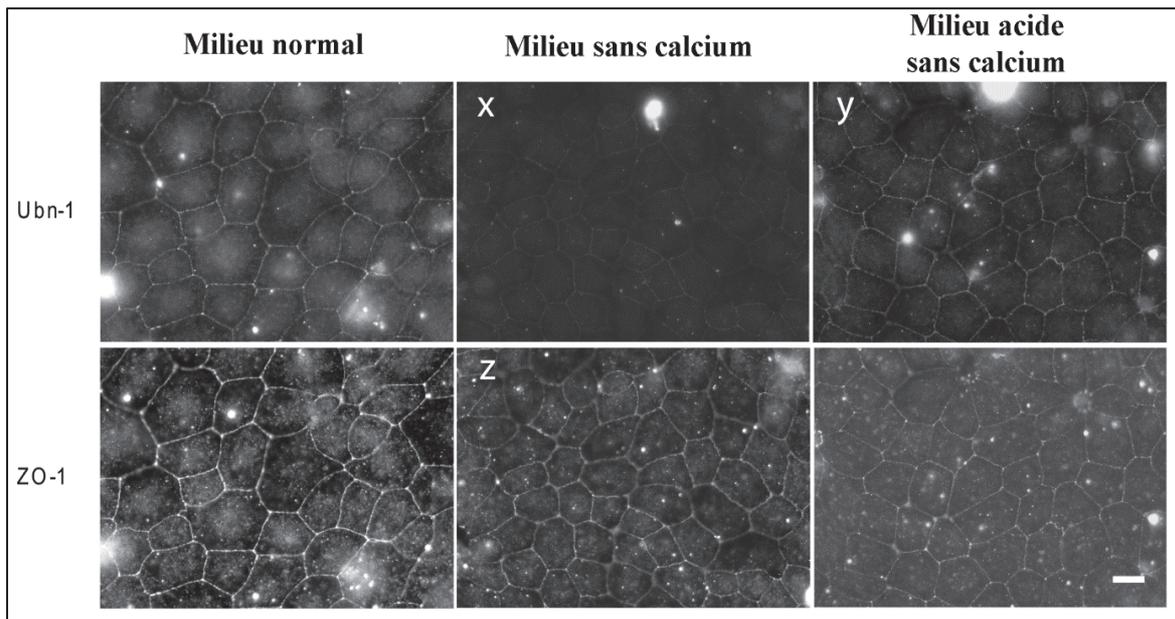


Figure 29 : Immunomarquage de l'Ubinucléine après privation de calcium accompagnée ou pas par acidification du milieu

L'Ubinucléine et ZO-1 sont observées par immunomarquage dans trois conditions : en milieu normal, en absence de calcium, en milieu acide avec absence de calcium. La privation calcique provoque le transport vésiculaire de l'Ubinucléine. L'acidification du milieu bloque l'endocytose dépendante de la clathrine.

Barre de mesure : 15 μ m

L'Ubinucléine sous-membranaire peut donc emprunter la voie endosomale dépendante de la clathrine afin d'être recyclée.

B) Modification de la localisation de l'Ubinucléine via la PKA
(article n°2, p87)

Nous avons identifié la protéine 14.3.3ε comme nouveau partenaire protéique de l'Ubinucléine. La sérine en position 352 fait partie de la séquence peptidique du site de liaison (motif de type 2, figure 30) avec les protéines de la famille 14.3.3.

VGLDQEF FRQPSS LPEGLPAP
350 360

Fig 30 : Séquence peptidique de l'Ubinucléine (résidus 341-360)

Le motif de type 2 présent dans la séquence peptidique de l'Ubinucléine est indiqué en vert. La sérine indiquée en violet correspond à la sérine 352 qui peut être phosphorylée.

La protéine 14.3.3 peut lier son ligand quand elle est sous forme dimérique et chaque monomère est composé par neuf hélices (Liu et al., 1995) . L'organisation des hélices n°3 et n°5 de la protéine sont importantes pour la formation de la poche de reconnaissance avec le ligand (Zhang et al., 1997) (Thorson et al., 1998). C'est pour cela qu'un mutant dominant négatif de 14.3.3 a été construit au laboratoire. Ce mutant nommé 14.3.3 DN2 possède deux mutations au niveau de l'hélice n°3 (R56A et R60A) et une mutation au niveau de l'hélice n°5 (R132A). Des peptides correspondant à la partie intégrant le domaine de liaison de l'Ubinucléine avec les protéines de la famille 14.3.3 ont été utilisés pour cette expérience (figure 30). Seul le peptide phosphorylé de l'Ubinucléine au niveau de la sérine 352 est capable de fixer la protéine 14.3.3ε (figure 31). De plus, cette liaison avec le peptide Ubn-1 phosphorylé est abolie lors de l'incubation avec le mutant 14.3.3 DN2. Les trois résidus arginines mutés sont donc essentiels pour la reconnaissance par 14.3.3ε de l'Ubinucléine phosphorylée.

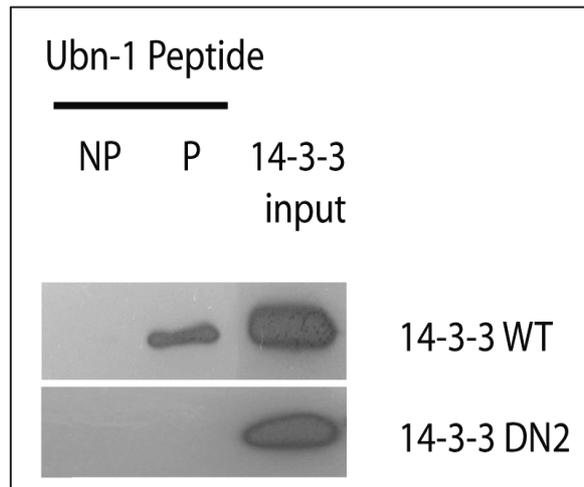


Figure 31 : La phosphorylation de la sérine 352 du peptide Ubn-1 est nécessaire pour son interaction avec la protéine 14.3.3ε

14.3.3ε DN2 : 14.3.3ε mutée R56A, R60A et R132A. Le peptide UBN-1 (VGLDQEFRQPSSLPEGLPAP) non phosphorylé ou phosphorylé, sont mis en contact avec les protéines recombinantes 14.3.3ε ou 14.3.3 DN2 (taggées Histidine). La protéine 14.3.3ε interagit avec la peptide UBN-1 si il est phosphorylé (interaction qui est absente avec 14.3.3 DN2).

Nous avons démontré que la phosphorylation de cette sérine est indispensable pour l'interaction avec la protéine 14.3.3ε. La sérine 352 de l'Ubinucléine peut être potentiellement phosphorylée par trois protéines kinases : la DNA PK, GSK-3β et la PKA.

Afin d'identifier la protéine kinase qui pourrait phosphoryler l'Ubinucléine, nous avons fait des tests de phosphorylation *in vitro*. Dans un premier temps, la PKA constitutivement active a été utilisée. L'Ubinucléine recombinante a été fusionnée à la GST (Aho et al., 2000) et une expérience par « pulldown » a été entreprise. Afin d'être phosphorylée, l'Ubinucléine recombinante est mise en contact avec la PKA recombinante et de l'ATP ayant un phosphate marqué au P³². La sous-unité C-α de la PKA phosphoryle l'Ubinucléine, le phosphate radio marqué sera transféré sur l'Ubinucléine qui sera visualisable par radiographie. La protéine GST-Ubn-1 (avec ou sans l'étape de phosphorylation) est ensuite précipitée par des billes GSH (glutathione) couplée à la sépharose. De la même façon qu'une immunoprécipitation, les protéines associées sont récupérées et peuvent être analysées. L'Ubinucléine recombinante montre un signal par autoradiographie lorsqu'elle a été phosphorylée par la sous-unité C-α de la PKA (figure 32). Cela indique que l'Ubinucléine est bien un substrat pour cette kinase.

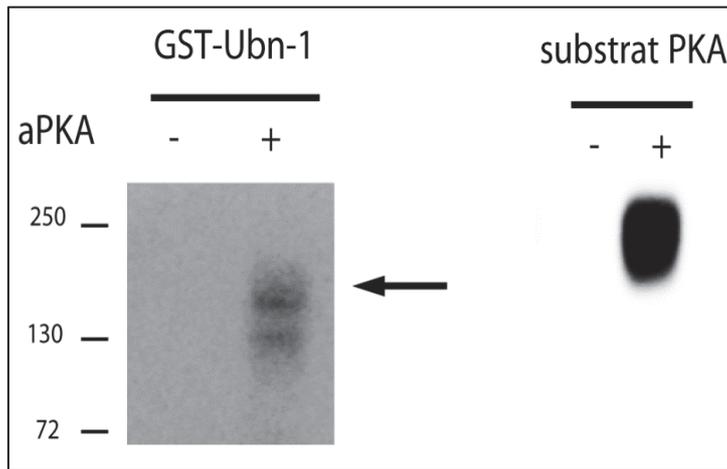


Figure 32 : Phosphorylation *in vitro* de l'Ubinucléine par la sous-unité C- α de la protéine kinase A (aPKA)
 UBN-1 est fusionnée à la GST et mise en contact avec la sous-unité C- α de la PKA et du P^{32} . L'UBN-1 phosphorylée par la PKA sera détectée par autoradiographie.

Les mêmes essais ont été réalisés avec la DNA PK et la GSK3 β . Aucune phosphorylation n'a été observée. Pour tester, si la phosphorylation de l'Ubinucléine par la PKA peut médier son interaction avec la protéine 14.3.3 ϵ , des expériences de GST « pulldown » ont été réalisées. La protéine recombinante GST-Ubn-1 est mise en contact avec la protéine recombinante 14.3.3 ϵ complète ou mutée (14.3.3 ϵ DN2, ne pouvant plus se lier à l'Ubinucléine). La figure 33 montre que la protéine 14.3.3 ϵ s'associe avec la protéine recombinante GST-Ubn-1 phosphorylée *in vitro* par la sous-unité C- α de la PKA. Cette observation confirme les résultats de l'expérience précédente obtenus avec les peptides d'Ubinucléine (figure 31). Aucune interaction entre la protéine GST-Ubn-1 phosphorylée *in vitro* et la protéine 14.3.3 ϵ mutée (mutant DN2) n'est observée. Ce résultat indique l'importance des résidus arginines 56, 60 et 132 de 14.3.3 ϵ pour son interaction avec l'Ubinucléine phosphorylée.

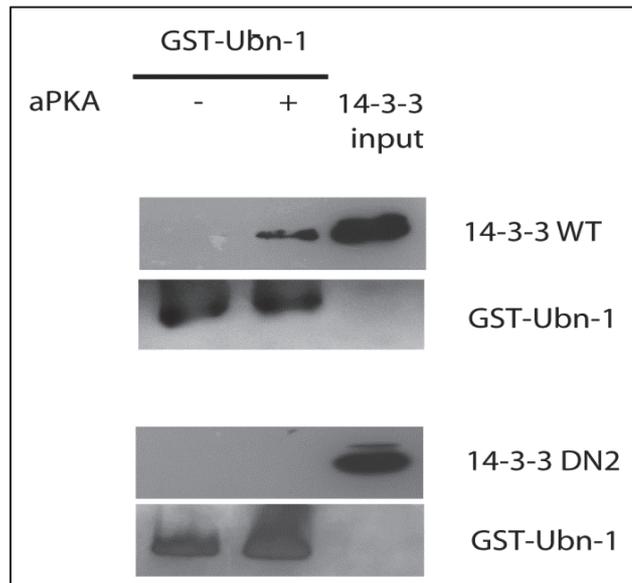


Figure 33 : Association entre la GST-Ubn1 phosphorylée et la protéine 14.3.3ε
 14.3.3ε DN2 : 14.3.3ε mutée R56A, R60A et R132A. UBN-1 est fusionnée à la GST. Avec ou sans phosphorylation préalable par la sous-unité C-α de la PKA, GST-UBN-1 est incubée avec la protéine recombinante taggée histidine 14.3.3ε ou 14.3.3 DN2. Révélation avec un anticorps anti-14.3.3 ε.

Dans le but de tester l'implication de la PKA *in vivo*, un inhibiteur spécifique de cette kinase fut utilisé. L'Ubinucléine est largement présente dans les noyaux et faiblement localisée au niveau des jonctions serrées dans les cellules de carcinome gastrique AGS (figure 34). En revanche, le traitement par l'inhibiteur de la PKA (KT5720) conduit à une concentration de cette protéine dans les jonctions serrées au détriment des noyaux (figure 34). La protéine 14.3.3ε montre aussi le même profil de localisation cellulaire. Lors de ces expériences, la protéine ZO-1 est utilisée comme marqueur des jonctions serrées.

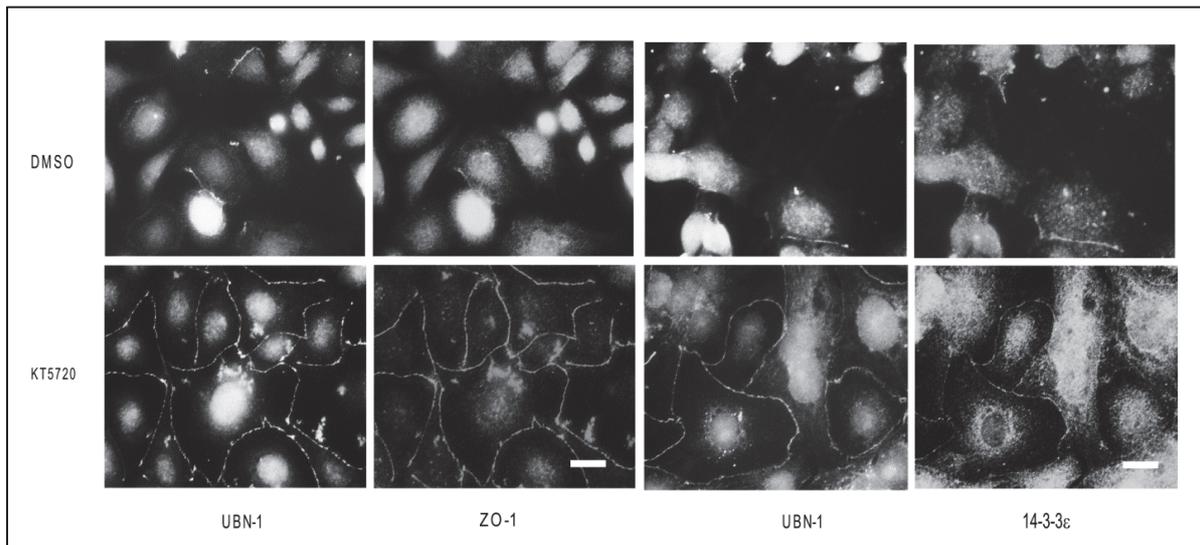


Figure 34 : L'Ubinucléine et 14.3.3ε sont délocalisées vers les jonctions serrées après traitement des cellules AGS par l'inhibiteur de la PKA

La localisation cellulaire de l'Ubinucléine (UBN-1), ZO-1 et 14.3.3ε est observée par immunomarquage avec ou sans traitement des cellules AGS (cellule de carcinome gastrique) par l'inhibiteur de la PKA (KT5720).
Barre de mesure : 10 μm

Les cellules MDCK, lorsqu'elles sont confluentes forment de nombreuses jonctions serrées (en forme de damier). De ce fait, il est difficile d'observer plus d'Ubinucléine dans les jonctions serrées après traitement par l'inhibiteur de PKA ; Toutefois, nous pouvons noter une accumulation de cette protéine en des points précis, aux intersections entre les cellules, dans les jonctions serrées (figure 35). Aucune différence n'est observée après traitement par le KT5720 pour les protéines des jonctions serrées ZO-1 et 14.3.3ε (résultats non montrés).

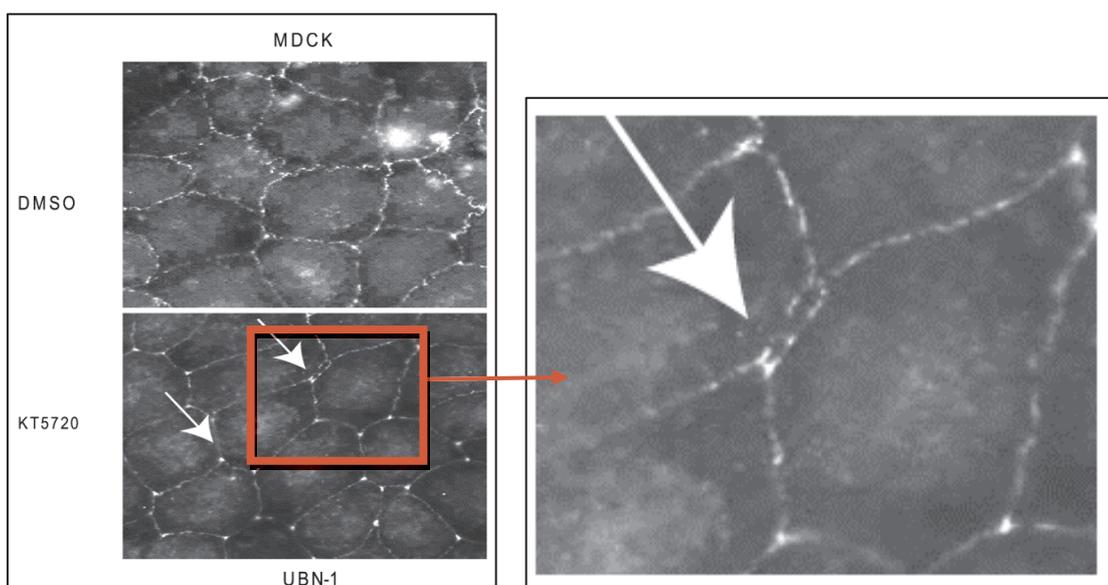


Figure 35 : L'Ubinucléine est concentrée dans les zones de contact tricellulaire après traitement des cellules MDCK par l'inhibiteur de la PKA

La localisation cellulaire de l'Ubinucléine (UBN-1) est observée par immunomarquage avec ou sans traitement des cellules MDCK (cellule de carcinome rénal chez le chien) par l'inhibiteur de la PKA (KT5720). Barre de mesure : 10 μm

Une technique biochimique a permis de confirmer les observations précédentes (figure 36). Pour la réaliser, les cellules AGS traitées par l'inhibiteur de PKA (KT5720) ou du DMSO ont été fractionnées grâce à des lyses chimiques (schéma de la figure 36). Trois fractions sont isolées : une cytoplasmique, une nucléaire soluble au NP40 et une insoluble au NP40 correspondant aux protéines le plus fortement associées aux membranes). Nous observons une absence de l'Ubinucléine dans les fractions cytoplasmiques (visibles seulement avec 300 µg de protéines totales chargées). Dans la fraction nucléaire soluble au NP40, nous pouvons noter une proportion plus importante d'Ubinucléine dans les cellules contrôle DMSO que dans les cellules traitées par le KT5720. Inversement, l'Ubinucléine semble plus présente dans la fraction insoluble au NP40 lorsque les cellules sont traitées par le KT5720. La protéine 14.3.3ε est détectée dans la fraction cytoplasmique ainsi que la fraction soluble au NP40 de manière équivalente dans les cellules contrôle DMSO et les cellules traitées par le KT5720. En revanche, elle est absente de la fraction insoluble au NP40 car elle fut complètement solubilisée. La lamine est une protéine présente spécifiquement à la surface nucléoplasmique de la membrane nucléaire existant sous les isoformes A et C. La lamine A/C n'est pas présente dans la fraction cytoplasmique et la fraction insoluble au NP40. Elle est observée uniquement dans la fraction soluble NP40 correspondant à la lamine A/C nucléaire solubilisée. L'actine est une protéine du cytosquelette extrêmement conservée qui nous permet une normalisation des résultats. Elle est retrouvée dans chacune des fractions et fut fortement solubilisée dans la fraction cytoplasmique comme attendu.

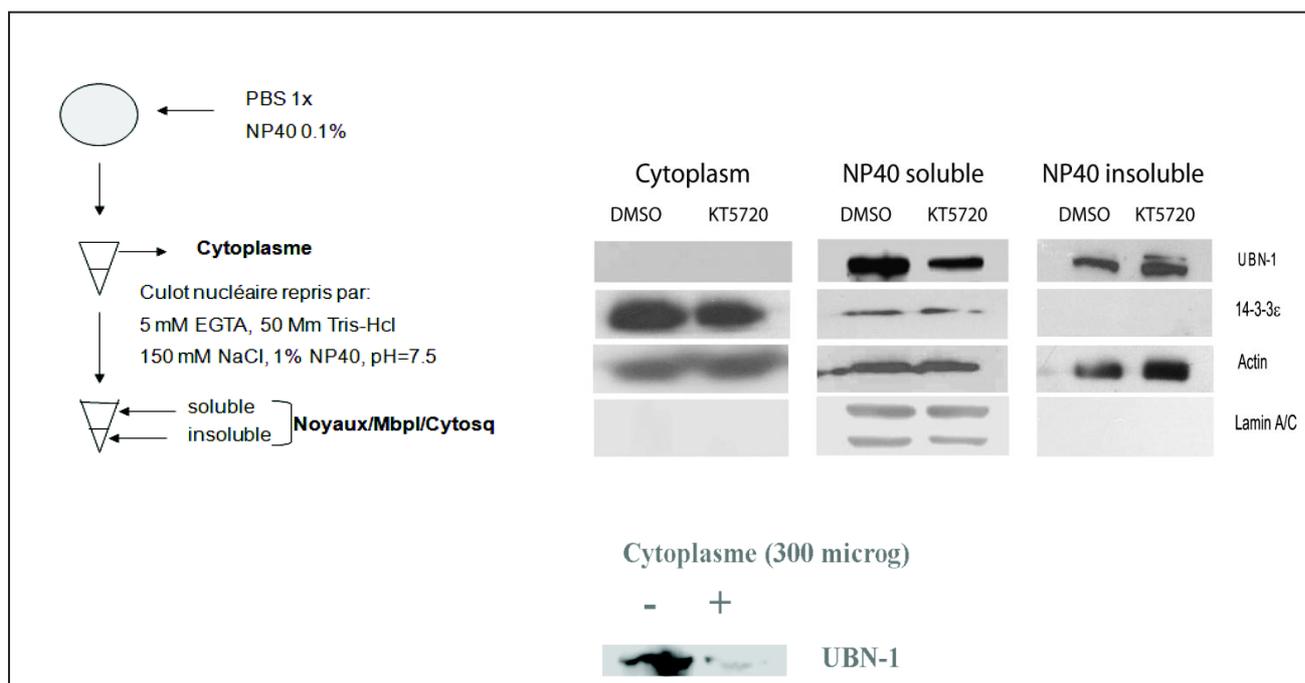


Figure 36 : Fractionnement subcellulaire des cellules AGS avec ou sans traitement par l'inhibiteur de PKA
 Les cellules de carcinome gastrique AGS avec ou sans traitement par l'inhibiteur de PKA (KT5720) sont fractionnées en une fraction cytoplasmique, une fraction soluble au NP40 et une fraction insoluble au NP40 (protéines le plus fortement associées aux membranes). La présence de l'Ubinucléine (UBN-1) et 14.3.3ε dans chaque fraction, est analysée par western blot. L'actine permet une normalisation des résultats et la lamin A/C est une protéine présente spécifiquement à la surface nucléoplasmique de la membrane nucléaire.

La localisation cellulaire de l'Ubinucléine a également été étudiée lorsque la PKA est active *in vivo*. Ceci a été possible grâce à l'utilisation de la Forskolin qui active l'enzyme adénylate cyclase responsable de la conversion de l'adenosine triphosphate (ATP) en adenosine cyclique monophosphate (AMPc) et l'AMPc active à son tour la PKA.

Dans la figure 37, on observe une diminution de la présence de l'Ubinucléine au niveau des jonctions serrées des MDCK par rapport aux cellules n'étant pas traitées par la Forskolin.

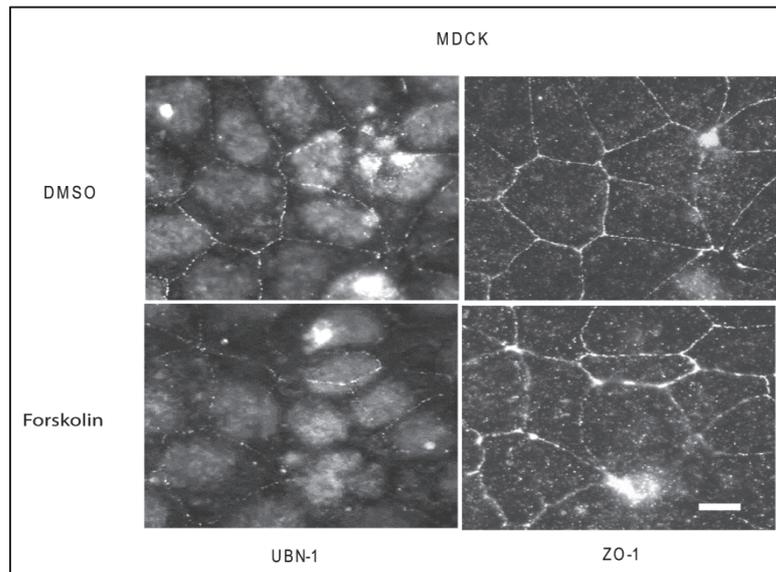


Figure 37: Diminution de la présence d'Ubinucléine dans les jonctions serrées après traitement des cellules MDCK par la Forskolin

La localisation cellulaire de l'Ubinucléine (UBN-1) et ZO-1 est observée par immunmarquage avec ou sans traitement par la Forskolin dans les cellules MDCK (carcinome rénale chez le chien).
Barre de mesure : 10 μ M

En conclusion, cinq partenaires protéiques de l'Ubinucléine ont été identifiés et confirmés. Deux d'entre eux ont conduit à des études fonctionnelles nous informant que l'Ubinucléine est capable d'être endocytée par la voie d'endocytose dépendante de la clathrine et que la PKA peut jouer un rôle dans sa localisation cellulaire. Leur rôle respectif sera discuté dans la partie suivante de la thèse.

**INTERACTION OF UBINUCLEIN-1, A NUCLEAR AND ADHESION JUNCTION
PROTEIN, WITH THE 14-3-3 EPSILON PROTEIN IN EPITHELIAL CELLS:
IMPLICATION OF THE PKA PATHWAY**

**Audrey Conti^{1*}, Charlotte Sueur^{1,2*}, Julien Lupo^{1,2}, Xavier Brazzolotto¹, Wim P
Burmeister¹, Evelyne Manet^{3,4,5}, Henri Gruffat^{3,4,5}, Patrice Morand^{1,2} and
Véronique Boyer^{1§}**

¹ Unit of Virus Host Cell Interactions (UVHCI), UJF Grenoble1-EMBL-CNRS UMI 3265, 6 rue Jules Horowitz, BP 181, F-38042 Grenoble Cedex 9; ²CHU de Grenoble, BP217, 38043 Grenoble Cedex9; ³ INSERM U758, Unité de Virologie humaine, Lyon, 46 allée d'Italie F-69007 France; ⁴Ecole Normale Supérieure de Lyon, F-69007 France; ⁵Université Lyon1, F-69007, Lyon, France

Running head: Ubn-1, 14-3-3 ϵ and PKA pathway

§Address correspondence to: Dr Véronique Boyer, Unit of Virus Host Cell Interactions (UVHCI), 6 rue Jules Horowitz, BP 181, F-38042 Grenoble cedex 9. Tel: +33 (0) 4 76 20 72 87; Fax: +33 (0) 4 76 20 94 00; E-mail: boyer@embl.fr

* These authors contributed equally to this work

Abbreviations: TJ, tight junction; NACos, Nuclear and Adhesion junction Complex components; Ubn-1, Ubinuclein-1; cAMP-dependent Protein Kinase A, PKA

Key words: Epithelial; Tight Junction; Signaling pathway; PKA; 14-3-3 ϵ

ABSTRACT

Ubinuclein-1 is a NACos (Nuclear and Adhesion junction Complex components) protein which shuttles between the nucleus and tight junctions, but its function in the latter is not understood. Here, by co-immunoprecipitation and confocal analysis, we show that Ubinuclein-1 interacts with the 14-3-3 ϵ protein both in HT29 colon cells, and AGS gastric cells. This interaction is mediated by an Ubinuclein-1 phosphoserine motif. We show that the arginine residues (R56, R60 and R132) which form the 14-3-3 ϵ ligand binding site are responsible for the binding of 14-3-3 ϵ to phosphorylated Ubinuclein-1. Furthermore, we demonstrate that *in vitro* Ubinuclein-1 can be directly phosphorylated by cAMP-dependent

protein kinase A. This *in vitro* phosphorylation allows binding of wildtype 14-3-3 ϵ . Moreover, treatment of the cells with an inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase, KT5720, modifies the subcellular localization of Ubinuclein-1. Indeed, KT5720 greatly increases the staining of Ubinuclein-1 at the tight junctions in AGS gastric cells. In the presence of the kinase inhibitor, the amount of Ubinuclein-1 in the NP40 insoluble fraction is increased, together with actin. Moreover, treatment of the cells with KT5720 induces the concentration of Ubinuclein-1 at tricellular intersections of MDCK cells. Taken together, our findings demonstrate novel cell signalling trafficking by Ubinuclein-1 *via* association with 14-3-3 ϵ following Ubinuclein-1 phosphorylation by the cAMP-dependent protein kinase-A.

Introduction

Tight junctions (TJs) are a type of intercellular junction found at the most apical end of the lateral side of epithelial cells. TJs are understood to function in the control of the paracellular diffusion of ions and certain molecules. However, it became evident that the TJs have a vital role in maintaining cell to cell integrity. Indeed, loss of cohesion of TJ structure can lead to invasion and ultimately to the metastasis of cancer cells (Martin et al., 2009 ; Wang et al., 2011). The specific properties of TJs vary among epithelia, according to the physiological role of the epithelium. For example, TJs in epidermis play an important role as a barrier to keratinisation (Morita et al., 2011). In the intestinal epithelium, they play a fundamental role hindering the invasion of tissues by pathogens (Bonazzi et al., 2011). Furthermore, TJs are key components of the integrity of the blood-brain barrier, essential to avoid neurological dysfunction (Rosenberg et al., 2011).

TJs are constituted by transmembrane proteins, anchored to a cytoplasmic plaque by adaptor proteins. This network recruits several signalling proteins that regulate TJ function, cell proliferation and differentiation. TJs contain multiple and single-span transmembrane proteins, such as occludin, claudins, tricellulin, JAMs (Junctional Adhesion Molecules), Crumbs homologue 3, and Bves (Balda et al., 2008). The structural backbone of the TJs plaque is formed by proteins that contain PDZ domains, of which the ZO family proteins, the MAGI proteins, the multiple PDZ proteins MUPP1, the Ras target protein AF-6/afadin, and the PAR-3, PAR-6, PALS-1, PATJ are involved in the establishment of apico-basal epithelial polarity (Guillemot et al., 2008; Steed et al., 2010). The other proteins of the TJ plaque are represented by non-PDZ proteins such as cingulin and paracingulin/JACOP protein, angiomin family proteins, signalling and regulators of small GTPase proteins, and symplekin (Guillemot et al., 2008). Using Mass Spectrometry, we previously identified LYRIC and spectrin as partners of Ubinuclein (Ubn-1), together with actin (Lupo et al., 2012). It is noteworthy that the former proteins have been shown to belong to the non-PDZ proteins of the TJ plaque (Britt et al., 2004; Mattagajasingh et al., 2000).

Some of the TJ proteins exhibit both nuclear and junctional localization, and are therefore called NACos, for Nuclear and Adhesion junction Complexes. NACos are associated with all intercellular junctions and can also be found at sites of cell-extracellular-matrix adhesion, such as focal adhesions (Balda et al., 2009). At TJs, several NACos have been described, such as ZO1, ZO2, symplekin, and huASH1, which contribute to the localization of transcription factors (ZONAB/DbpA and AP-1), to mRNA processing, and to chromatin remodelling respectively (Matter et al., 2007). We previously reported that Ubn-1 shuttles between the

nucleus and the TJs, thus belonging to the NACos (Aho et al., 2009; Lupo et al., 2012). When Ubn-1 is localized in the nucleus, it interacts with cellular transcription factors of the leucine-zipper family such as AP1, C/EBP, Jun or the viral transcription factor EB1 of EBV (also called ZEBRA or Zta; Aho et al., 2000, Gruffat et al., 2011). Ubn-1 can also play a role as a histone chaperone protein (Balaji et al., 2009; Banumathy et al., 2009; Tang et al., 2012). We have shown that when Ubn-1 is localized at TJs, it interacts with ZO1 and cingulin (Aho et al., 2009; Lupo et al., 2012). However, the role of Ubn-1 as a nuclear and junctional shuttle protein in epithelial cells remains elusive.

In this work, we have identified a novel interacting partner of Ubn-1 belonging to the 14-3-3 family of proteins which has led us to new insights on the cellular pathway followed by this protein.

Results

Ubn-1 interacts with 14-3-3 ϵ

The 14-3-3 highly conserved protein family has been shown to be implicated in the dynamic nucleocytoplasmic transport of a number of proteins (Muslin et al., 2000). They specifically recognize one or more short phosphoserine/threonine-containing sequence motifs on target proteins. A consensus binding motif for the 14-3-3 family of proteins is present in the Ubn-1 sequence (RXXXSXP type 2 motif; amino acids 348-354) (Muslin et al., 1996). As common partners of the ϵ isoform of 14-3-3 were identified among the binding partners of Ubn-1 (Lupo et al., 2012), we investigated whether both proteins could interact in a co-immunoprecipitation assay. As shown in Figure 1A, endogenous 14-3-3 ϵ did indeed co-immunoprecipitate with Ubn-1 in a HT29 lysate. Immunofluorescence studies showed 14-3-3 ϵ staining as being punctuated in HT29 colon cells, whereas it was diffuse in the nuclei and cytoplasm of AGS gastric cells (Fig.1B, in red). Interestingly, both cell lines also exhibit a 14-3-3 ϵ labeling at the TJ site. Ubn-1 staining was present at the upper TJ stack level (Fig.1B, in green). Confocal microscopy demonstrated colocalisation of the two proteins at TJs in both cell lines (Fig.1B, merge).

Ubn-1 is phosphorylated by PKA

Based on the putative phospho-binding motif found in Ubn-1 for 14-3-3 family proteins, we then developed an *in vitro* peptide pull-down assay. For this, an agarose-coupled Ubn-1 peptide, phosphorylated or not at the serine residue (VGLDQEFRQPSSLPEGLPAP; phosphoS underlined) was incubated with the His-tagged 14-3-3 ϵ recombinant protein. As shown in Figure 2A, only the phosphorylated Ubn-1 peptide retained 14-3-3 ϵ . Furthermore, when the arginine residues (56, 60 and 132) which form the ligand binding site of 14-3-3 ϵ were mutated to alanines (14-3-3 DN2 mutant), specific binding to the phosphorylated Ubn-1 peptide was abolished (Fig.2A).

Since the phospho-binding motif of Ubn-1 could potentially be a target for the cAMP-dependent protein kinase A (PKA), we used activated PKA together with recombinant GST-Ubn-1 in a radioactive phosphorylation *in vitro* assay. As shown in Figure 2B, both a specific PKA control peptide substrate and GST-Ubn-1, could be phosphorylated directly by PKA in this assay, whereas GST alone did not show any phosphorylation signal (data not shown).

To further determine if phosphorylation of GST-Ubn-1 by PKA could mediate its binding to 14-3-3 ϵ , we carried out a pull-down with GST-Ubn-1, previously phosphorylated by the activated PKA, which has been incubated with recombinant 14-3-3 ϵ proteins (wt or mutated DN2). As shown in Figure 2C, phosphorylated GST-Ubn-1 retained the wt 14-3-3 ϵ protein, but not the mutated DN2 form of 14-3-3 ϵ .

Ubn-1 shuttles in a PKA-dependent manner

In order to determine whether modification of the PKA activity could affect the expression or localization of Ubn-1, we used an inhibitor of PKA. As shown in Figure 3A (left panel), TJ labeling with both Ubn-1 and ZO-1 antibodies, was observed in the AGS cells, as expected (control cultures with DMSO). However, when cells were treated with the PKA inhibitor KT5720, labeling with Ubn-1 and ZO-1 antibodies was greatly enhanced at the TJs in both gastric cells (AGS) and colon cells (HT29; data not shown). In the same manner, 14-3-3 ϵ staining was increased at TJs when cells were treated with KT5720 (Fig.3A, right panel). It is noteworthy that from the observed pattern of Hoechst labelled nuclei, the drug did not induce any toxicity (data not shown).

Subfractionation of AGS cells (treated or not by KT5720) into cytoplasmic and associated membrane protein fractions was further realized (Fig. 3B). As expected, a substantial amount of solubilized actin was found in the cytoplasmic fraction. The NP40 soluble fraction contained the soluble nuclear protein Lamin A/C. The NP40 insoluble fraction corresponds to proteins tightly associated with membranes. Western blot analysis of the subfractionated preparations using anti-Ubn-1 antibody showed that Ubn-1 was recovered only in the NP40 extracted fractions. Ubn-1 was enriched in the nuclear NP40 soluble fraction of DMSO-treated cells, whereas it was enriched, together with actin, in the NP40 insoluble fraction in KT5720-treated cells (Fig.3B). This NP40 insoluble fraction contained adaptor proteins associated with the cytoplasmic plaque, a highly insoluble compartment of the cell, where actin is detectable. 14-3-3 ϵ could be revealed in the cytoplasm and NP40 soluble fractions of both the DMSO- and KT5720-treated cultures but unsurprisingly, not in the NP40 insoluble fraction, since it is not known as an adaptor protein associated with the cytoplasmic plaque.

It is interesting to note that in MDCK cells treated with KT5720, Ubn-1 was concentrated in punctuate granules areas corresponding to cell intersections (Fig.3C, see arrows). ZO-1 and 14-3-3 ϵ labeling showed no difference in the localization of these two proteins in the MDCK cultures, treated or not by KT5720 (data not shown).

Taken together, these results demonstrate that localization of Ubn-1, ZO-1 and 14-3-3 ϵ in epithelial cells is under the control of the PKA pathway .

Discussion

Although proteins of the 14-3-3 family are widely distributed inside the cell, few proteins specifically interacting with 14-3-3 ϵ have been identified. Comparison of sorted proteins obtained by proteomic approaches used to identify Ubn-1 (Lupo et al., 2012) or 14-3-3 ϵ associated proteins (Liang et al, 2009 ; Zuo et al., 2010) revealed common partners, such as, beta-actin, tropomyosin 3, thioredoxin, tubulin beta-2C chain, hnRNP C and heat shock proteins (90kD and 70 kD). However, we did not identify 14-3-3 ϵ as an Ubn-1 partner in our previous work, since the proteomic approach had been carried out with a GST-Ubn-1 recombinant protein produced in bacteria and thus not phosphorylated. In this work, we show an interaction between the two proteins, 14-3-3 ϵ and Ubn-1, by co-immunoprecipitation of endogenous proteins and confocal analysis. Furthermore, we show a direct interaction of 14-3-3 ϵ with a phosphorylated Ubn-1-derived peptide. The inner surface

residues of 14-3-3 ϵ helices (R56, R60 and R132) previously shown to be important for binding to Raf-1 kinase and p65-I κ B α (Thorson et al., 1998; Aguilera et al., 2006) are also implicated in the binding to Ubn-1.

We previously showed that Ubn-1 can be localized either in the nucleus or at the TJs, depending on the state of cell differentiation (Aho et al., 2009). When cells are undifferentiated, Ubn-1 is localized in the nucleus and when cells are differentiated, Ubn-1 is localized at TJs. In the present work, we have identified a specific pathway implicated in differential Ubn-1 localization. Indeed, by using inhibitor of PKA, we were able to modify the staining and/or the subcellular localization of Ubn-1. An inhibitor of PKA greatly increased the labeling of Ubn-1, ZO-1 and 14-3-3 ϵ at the TJs in AGS cells. In MDCKs, we found a very particular concentration of Ubn-1 at tricellular TJ regions when cells were treated with the PKA inhibitor. Thus, signaling through PKA is implicated in the Ubn-1 intracellular pathway. Several studies have demonstrated that PKA activity is important for the regulation and localization of TJ-associated proteins. Indeed, subcellular localization of claudin 1, paracellin-1 or occludin is dependent on phosphorylation by PKA in both physiological and pathological states (French et al., 2009; Kawedia et al., 2008; Ikari et al., 2006). Interestingly, Klinger et al. (Klingler et al., 2000) showed that disruption of TJ barriers after calcium depletion could be preserved when PKA inhibitors were used. In our hands, we observed an increased of TJ assembly (characterized by the Ubn-1 and ZO-1 stainings) after the use of the PKA inhibitor, together with an increase of 14-3-3 staining at the TJ sites.

We have investigated the PKA pathway because the phospho-binding motif found in Ubn-1 was a target of PKA. A direct link between 14-3-3 ϵ and PKA has been previously reported (Gu et al., 2006). Indeed, PKA can phosphorylate and regulate dimerization of 14-3-3 ϵ . 14-3-3 family proteins control the nuclear and cytoplasmic distribution of signaling molecules that they interact with (Brunet et al., 2002). 14-3-3 ϵ may be implicated in the process of enabling the shuttling of Ubn-1 from the nucleus to the TJs in a phosphorylation-dependent pathway. In addition, PKA has also been shown to affect transcriptional activation by EBV proteins (Fuentes-Panana et al., 2000; Han et al., 2002). We previously showed that Ubn-1 could interfere with the viral transcription factor EB1 of EBV and its level of expression could modulate viral particle production (Aho et al., 2009; Gruffat et al., 2011). Another example of a link between viral infection, tight junction protein (occludin) and PKA has been shown in the case of rotavirus (Beau et al., 2007). This viral-induced diarrheal disease induces the disappearance of occludin at TJs, which can be restored by PKA inhibitors during the time course of infection. In the case of the EBV viral infection, it would be interesting to know whether 14-3-3 ϵ could be a link between the viral transcription factor EB1 and Ubn-1 during the transition of latent and lytic phases of infection.

To our knowledge, the concentration of TJ components at the cell intersection upon drug treatment of the cells (Fig3C) has not been previously observed. In effect, under treatment with the PKA inhibitor, Ubn-1 was much more concentrated at tricellular intersections. These specialized TJ structures seal the intercellular space and are thought to impede the diffusion of solutes. This intersection is characterized by the presence of tricellulin, which has been shown to participate in the formation of tricellular TJs (Ikenouchi et al., 2005; Mariano et al., 2011). Up to now, the only way to modify the staining of tricellulin has been to use occludin or tricellulin knockdown cells (Ikenouchi et al., 2005; Ikenouchi et al., 2008). Here, by using a kinase inhibitor, we were able to modify the protein composition at the tricellular contacts. Whether knockdown of Ubn-1 could affect tricellulin distribution remains to be determined.

In conclusion, the present study identifies 14-3-3 ϵ as a new partner of Ubn-1. Moreover, these results show that Ubn-1 is an adaptor protein linked to the cytoplasmic plaque whose addressing could be modulated by the PKA pathway.

Materials and Methods

Cell culture and drug treatment

Epithelial cells were cultured in DMEM (HT29 and MDCK) or HAM F12 (AGS) medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) containing 10% fetal bovine serum and antibiotics (100 units/ml penicillin/streptomycin). All cell lines were grown at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Cell cultures (80% confluency) were treated by the cAMP-dependent protein kinase A inhibitor (KT5720, 10 μ M, Sigma, St Louis, USA) overnight. The stock solution was dissolved in DMSO and diluted in medium immediately before each experiment. DMSO was used at 1% in control culture.

Antibodies and plasmids

The mAb directed against Ubn-1 was produced and used as described previously (Aho et al., 2000). The control mAb was a purified mouse IgG1 kappa (Gentaur, Brussels, Belgium). The following commercially available primary antibodies were used: anti-14-3-3 ϵ (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-ZO-1 (Invitrogen), rabbit anti-actin

(Sigma). HRP-conjugated anti-mouse or anti-rabbit antibodies used for Western blotting were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA). Alexa 488 and Alexa 594-conjugated secondary antibodies (Invitrogen) were used for indirect immunofluorescence.

Expression vectors encoding His-tagged 14-3-3 ϵ were constructed by RT-PCR amplification of the 14-3-3 ϵ coding sequence, followed by cloning into the pRSET vector using EcoRI/HindIII. Site-directed mutagenesis to generate point mutations (R56A, R60A and R132A) as described (Thorson et al., 1998; Aguilera et al., 2006) was made using the Quickchange site-directed mutagenesis kit from Stratagene (La Jolla, CA, USA) and verified by DNA sequencing.

Biochemical cellular fractionation

After treatment with the PKA inhibitor (KT5720, Sigma), AGS cells were washed with PBS and lysed for 5 min on ice by 0.4 ml ice-cold 0.1% NP40, 1X PBS and protease/phosphatase inhibitors (Complete EDTA-free, Roche Diagnostics, In, USA), (Musch et al., 2006). The reaction was stopped by 0.4 ml of ice-cold 1X PBS. After centrifugation (2000 rpm, 8 min), supernatant (cytoplasmic fraction) was recovered (concentrated by acetone precipitation if required); the pellet (nuclei and membrane-associated proteins) was washed 3X with 0.4 ml of ice-cold 1X PBS, centrifuged at 2000 rpm for 8 min and resuspended in 0.5 ml of lysis buffer (50 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA) for 1 h on ice. To extract different pools of junctional proteins, soluble and insoluble NP40 fractions were then separated by centrifugation (13 000 rpm, 30 sec) as described (Musch et al., 2006). The remaining insoluble fraction was solubilised in 0.5 ml of Laemmli buffer without dye. The protein assay was carried out with the BCA reagent (bicinchoninic, Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, USA). The fractionated proteins (30 μ g) were eluted by boiling in 50 μ l of sample buffer before being loaded onto an SDS gel (10% acrylamide) and transferred to a PVDF membrane followed by Western blot analysis. The signal was developed by Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, USA).

Pull-down and co-immunoprecipitation assays

Ubn-1 peptide-coupled agarose beads (VGLDQEFRQPSSSLPEGLPAP; phosphoS underlined, Biotem, France) were incubated with recombinant His-tagged 14-3-3 ϵ proteins for 30 min at 4°C. Beads were then collected and washed twice at 4°C with 0.5 ml of each one of washing buffer (HBB buffer 20 mM Hepes, 50 mM NaCl, 0.1mM EDTA, 2.5 mM MgCl₂, 0.5% Triton X-100 or Etournay buffer PBS/25 mM NaCl, 0.1% Triton X-100). Proteins were eluted by boiling in Laemmli buffer, resolved by SDS-PAGE and blotted.

For co-immunoprecipitation assays, confluent HT29 cells from 100-mm-diameter culture dishes were washed three times with cold PBS and lysed in 0.9 ml of lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.2% Triton X-100, 0.01% SDS and 1% glycerol) for 20 min at 4°C, centrifuged and the supernatant was pre-cleared with Protein A/G plus agarose (Santa Cruz Biotechnology). Antibodies (directed against Ubn-1 or control mouse monoclonal antibody) were then added to 0.45 ml of the lysate and left overnight at 4°C, followed by addition of 15 μ l of bead suspension for 2 h. Beads were washed four times with PBS supplemented with 250 mM NaCl and 0.1% Triton X-100, and proteins were eluted by boiling in 50 μ l of Laemmli buffer before being loaded onto a SDS gel (10% acrylamide) and transferred to a PVDF membrane followed by Western blot analysis. The signal was developed by Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, USA).

Immunofluorescence studies

Cultured cells were fixed on coverslips with PFA for 20 min at 4°C, followed by washes with PBS and blocked with 3% goat pre-immune serum (GPI) diluted in 0.1% Triton X-100/TBS for 30 min at room temperature. Cells fixed on the slides were incubated with the primary antibody diluted in 1% GPI/0.1% Triton X-100/TBS for 1h at room temperature and then washed twice with 0.1% Triton X-100/TBS followed by incubation with the secondary antibody at room temperature for 1h. After washes with 0.1% Triton X-100/TBS, slides were mounted with Mowiol and studied using a fluorescence microscope (Axio Imager Z1 Microscope System, Zeiss, Jena, Germany) and a confocal microscope (Confocal Axioplan2 LSM510, Zeiss). Images were processed with Adobe Photoshop CS4 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

***In vitro* kinase assay**

GST-Ubn-1 fusion protein (10 ng), obtained as described (Aho et al., 2000) and bound to GSH-coupled sepharose, or a PKA control substrate peptide provided by SignalChem (Richmond, Canada) was incubated in presence of the catalytic subunit C-alpha of PKA (aPKA; 50 ng) in kinase buffer and ATP ($\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, 0.5 μCi and cold ATP, 2.5 nmol) for 15 min at 30°C according to the manufacturer's instructions (SignalChem). Beads were then washed three times and eluted by boiling in Laemmli buffer before being loaded onto an SDS gel (10% or 6% acrylamide for GST-Ubn-1 or PKA substrate peptide respectively) and visualized with a phosphorimager.

References

Aguilera, C., Fernandez-Majada, V., Ingles-Esteve, J., Rodilla, V., Bigas, A. and Espinosa, L. (2006). Efficient nuclear export of p65-IkappaBalpha complexes requires 14-3-3 proteins. *J Cell Sci* **119**, 3695-704.

Aho, S., Buisson, M., Pajunen, T., Ryoo, Y. W., Giot, J. F., Gruffat, H., Sergeant, A. and Uitto, J. (2000). Ubinuclein, a novel nuclear protein interacting with cellular and viral transcription factors. *J Cell Biol* **148**, 1165-76.

Aho, S., Lupo, J., Coly, P. A., Morand, P., Sergeant, A., Manet, E., Boyer, V. and Gruffat, H. (2009). Characterization of the ubinuclein protein as a new member of the Nuclear and Adhesion Complex components (NaCos). *Biol Cell* **101**, 319-334.

Balaji, S., Iyer, L. M. and Aravind, L. (2009). HPC2 and ubinuclein define a novel family of histone chaperones conserved throughout eukaryotes. *Mol Biosyst* **5**, 269-75.

Balda, M. S. and Matter, K. (2008). Tight junctions at a glance. *J Cell Sci* **121**, 3677-82.

Balda, M. S. and Matter, K. (2009). Tight junctions and the regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 761-7.

Banumathy, G., Somaiah, N., Zhang, R., Tang, Y., Hoffmann, J., Andrade, M., Ceulemans, H., Schultz, D., Marmorstein, R. and Adams, P. D. (2009). Human UBN1 is an ortholog of yeast Hpc2p and has an essential role in the HIRA/ASF1a chromatin-remodeling pathway in senescent cells. *Mol Cell Biol* **29**, 758-70.

Beau, I., Cotte-Laffitte, J., Amsellem, R. and Servin, A. L. (2007). A protein kinase A-dependent mechanism by which rotavirus affects the distribution and mRNA level of the functional tight junction-associated protein, occludin, in human differentiated intestinal Caco-2 cells. *J Virol* **81**, 8579-86.

Bonazzi, M. and Cossart, P. (2011). Impenetrable barriers or entry portals? The role of cell-cell adhesion during infection. *J Cell Biol* **195**, 349-58.

Britt, D. E., Yang, D. F., Yang, D. Q., Flanagan, D., Callanan, H., Lim, Y. P., Lin, S. H. and Hixson, D. C. (2004). Identification of a novel protein, LYRIC, localized to tight junctions of polarized epithelial cells. *Exp Cell Res* **300**, 134-48.

Brunet, A., Kanai, F., Stehn, J., Xu, J., Sarbassova, D., Frangioni, J. V., Dalal, S. N., DeCaprio, J. A., Greenberg, M. E. and Yaffe, M. B. (2002). 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol* **156**, 817-28.

French, A. D., Fiori, J. L., Camilli, T. C., Leotlela, P. D., O'Connell, M. P., Frank, B. P., Subaran, S., Indig, F. E., Taub, D. D. and Weeraratna, A. T. (2009). PKC and PKA phosphorylation affect the subcellular localization of claudin-1 in melanoma cells. *Int J Med Sci* **6**, 93-101.

Fuentes-Panana, E. M., Peng, R., Brewer, G., Tan, J. and Ling, P. D. (2000). Regulation of the Epstein-Barr virus C promoter by AUF1 and the cyclic AMP/protein kinase A signaling pathway. *J Virol* **74**, 8166-75.

Gruffat, H., Lupo, J., Morand, P., Boyer, V. and Manet, E. (2011). The nuclear and adherent junction complex component protein ubinuclein negatively regulates the productive cycle of Epstein-Barr virus in epithelial cells. *J Virol* **85**, 784-94.

Gu, Y. M., Jin, Y. H., Choi, J. K., Baek, K. H., Yeo, C. Y. and Lee, K. Y. (2006). Protein kinase A phosphorylates and regulates dimerization of 14-3-3 epsilon. *FEBS Lett* **580**, 305-10.

Guillemot, L., Paschoud, S., Pulimeno, P., Foglia, A. and Citi, S. (2008). The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 601-13.

Han, I., Xue, Y., Harada, S., Orstavik, S., Skalhegg, B. and Kieff, E. (2002). Protein kinase A associates with HA95 and affects transcriptional coactivation by Epstein-Barr virus nuclear proteins. *Mol Cell Biol* **22**, 2136-46.

Ikari, A., Matsumoto, S., Harada, H., Takagi, K., Hayashi, H., Suzuki, Y., Degawa, M. and Miwa, M. (2006). Phosphorylation of paracellin-1 at Ser217 by protein kinase A is essential for localization in tight junctions. *J Cell Sci* **119**, 1781-9.

Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S. and Tsukita, S. (2005). Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* **171**, 939-45.

Ikenouchi, J., Sasaki, H., Tsukita, S., Furuse, M. and Tsukita, S. (2008). Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol Biol Cell* **19**, 4687-93.

Kawedia, J. D., Jiang, M., Kulkarni, A., Waechter, H. E., Matlin, K. S., Pauletti, G. M. and Menon, A. G. (2008). The protein kinase A pathway contributes to Hg²⁺-induced alterations in phosphorylation and subcellular distribution of occludin associated with increased tight junction permeability of salivary epithelial cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* **326**, 829-37.

Klingler, C., Kniesel, U., Bamforth, S. D., Wolburg, H., Engelhardt, B. and Risau, W. (2000). Disruption of epithelial tight junctions is prevented by cyclic nucleotide-dependent protein kinase inhibitors. *Histochem Cell Biol* **113**, 349-61.

Liang, S., Yu, Y., Yang, P., Gu, S., Xue, Y. and Chen, X. (2009). Analysis of the protein complex associated with 14-3-3 epsilon by a deuterated-leucine labeling quantitative proteomics strategy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **877**, 627-34.

Lupo, J., Conti, A., Sueur, C., Coly, P. A., Couté, Y., Burmeister, W. P., Germi, R., Manet, E., Gruffat, H., Morand, P. et al. (2012). Identification of new interacting partners of the shuttling protein ubinuclein (Ubn-1). *Exp Cell Res* **318**, 509-20.

Mariano, C., Sasaki, H., Brites, D. and Brito, M. A. (2011). A look at tricellulin and its role in tight junction formation and maintenance. *Eur J Cell Biol* **90**, 787-96.

Martin, T. A. and Jiang, W. G. (2009). Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 872-91.

Mattagajasingh, S. N., Huang, S. C., Hartenstein, J. S. and Benz, E. J., Jr. (2000). Characterization of the interaction between protein 4.1R and ZO-2. A possible link between the tight junction and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* **275**, 30573-85.

Matter, K. and Balda, M. S. (2007). Epithelial tight junctions, gene expression and nucleo-junctional interplay. *J Cell Sci* **120**, 1505-11.

Morita, K., Miyachi, Y. and Furuse, M. (2011). Tight junctions in epidermis: from barrier to keratinization. *Eur J Dermatol* **21**, 12-7.

Musch, M. W., Walsh-Reitz, M. M. and Chang, E. B. (2006). Roles of ZO-1, occludin, and actin in oxidant-induced barrier disruption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**, G222-31.

Muslin, A. J., Tanner, J. W., Allen, P. M. and Shaw, A. S. (1996). Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* **84**, 889-97.

Muslin, A. J. and Xing, H. (2000). 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal* **12**, 703-9.

Rosenberg, R. P., Bogan, R. K., Tiller, J. M., Yang, R., Youakim, J. M., Earl, C. Q. and Roth, T. (2011). A phase 3, double-blind, randomized, placebo-controlled study of armodafinil for excessive sleepiness associated with jet lag disorder. *Mayo Clin Proc* **85**, 630-8.

Steed, E., Balda, M. S. and Matter, K. (2010). Dynamics and functions of tight junctions. *Trends Cell Biol* **20**, 142-9.

Tang, Y., Puri, A., Ricketts, M. D., Rai, T. S., Hoffmann, J., Hoi, E., Adams, P. D., Schultz, D. C. and Marmorstein, R. (2012). Identification of an ubiquitin 1 region required for stability and function of the human HIRA/UBN1/CABIN1/ASF1a histone H3.3 chaperone complex. *Biochemistry* **51**, 2366-77.

Thorson, J. A., Yu, L. W., Hsu, A. L., Shih, N. Y., Graves, P. R., Tanner, J. W., Allen, P. M., Piwnica-Worms, H. and Shaw, A. S. (1998). 14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity. *Mol Cell Biol* **18**, 5229-38.

Wang, X., Tully, O., Ngo, B., Zitin, M. and Mullin, J. M. (2011). Epithelial tight junctional changes in colorectal cancer tissues. *ScientificWorldJournal* **11**, 826-41.

Zuo, S., Xue, Y., Tang, S., Yao, J., Du, R., Yang, P. and Chen, X. (2010). 14-3-3 epsilon dynamically interacts with key components of mitogen-activated protein kinase signal module for selective modulation of the TNF-alpha-induced time course-dependent NF-kappaB activity. *J Proteome Res* **9**, 3465-78.

Acknowledgments

This research was supported by the Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the University Joseph Fourier, the Agence Nationale pour la Recherche (EBV-Inter and EBV-Lyt), the Pôle de Compétitivité Lyon-Biopôle, La Ligue contre le Cancer, the Grenoble University Hospital and the French Herpesvirus and Cancer network. E. M. is a CNRS scientist. H. G. and V. B. are INSERM scientists. We thank C. Petosa for helpful discussions and the Institut Albert Bonniot in Grenoble for use of its confocal microscope and A. Grichine and J. Mazzega for technical support.

Legends for figures

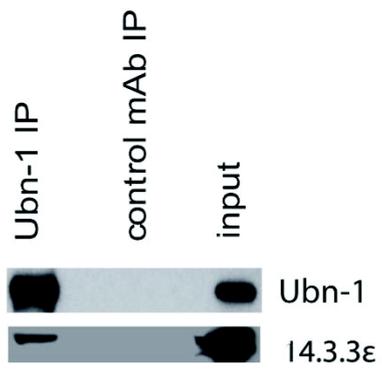
FIGURE 1. 14-3-3 ϵ and Ubn-1 interaction. (A) Co-immunoprecipitation of 14-3-3 ϵ with Ubn-1. Confluent HT29 cells were lysed and proteins immunoprecipitated by the anti-Ubn-1 mouse monoclonal antibody or control mouse antibody (mAb). After SDS-PAGE and transfer, membranes were blotted with either anti-Ubn-1 or anti-14-3-3 ϵ antibodies. (B) Confocal analysis of Ubn-1 and 14-3-3 ϵ staining. HT29 or AGS cells were double stained with anti-Ubn-1 (green) and the antibody directed against 14-3-3 ϵ (red). Yellow staining indicates co-localization at the z axis. Scale bar, 10 μ m.

FIGURE 2. Protein kinase A phosphorylates Ubn-1. (A) Phosphorylation-dependent interaction between Ubn-1 and 14-3-3 ϵ . Agarose-coupled phosphorylated (lane P) or unphosphorylated (lane NP) Ubn-1 peptide (VGLDQEFRQPSSLPEGLPAP; phosphoS underlined) were incubated with 30 ng of recombinant His-tagged 14-3-3 ϵ protein. After washes, SDS-PAGE and transfer, membranes were blotted with an anti-His antibody. Lane indicated as 14-3-3 ϵ input, was loaded with 20 ng of recombinant His-tagged 14-3-3 ϵ . (B) Phosphorylation of GST-Ubn-1 by activated PKA (aPKA). GST-Ubn-1 or the PKA substrate control peptide were incubated in kinase buffer including γ^{32} P-ATP in absence or presence of aPKA. After washes, proteins were loaded on a SDS-PAGE gel and phosphorimaged. (C) Arginine residues 56, 60 and 132 are implicated in the interaction of Ubn-1 with 14-3-3 ϵ . GST-Ubn-1 (10 ng) was phosphorylated or not by activated PKA (aPKA) and incubated with His-tagged recombinant wild type or mutated (R56A, R60A and R132A) 14-3-3 ϵ protein. After washes, SDS-PAGE and transfer, membranes were blotted with an anti-His antibody. Lane 14-3-3 ϵ input was loaded with 20 ng of His-tagged recombinant 14-3-3 ϵ .

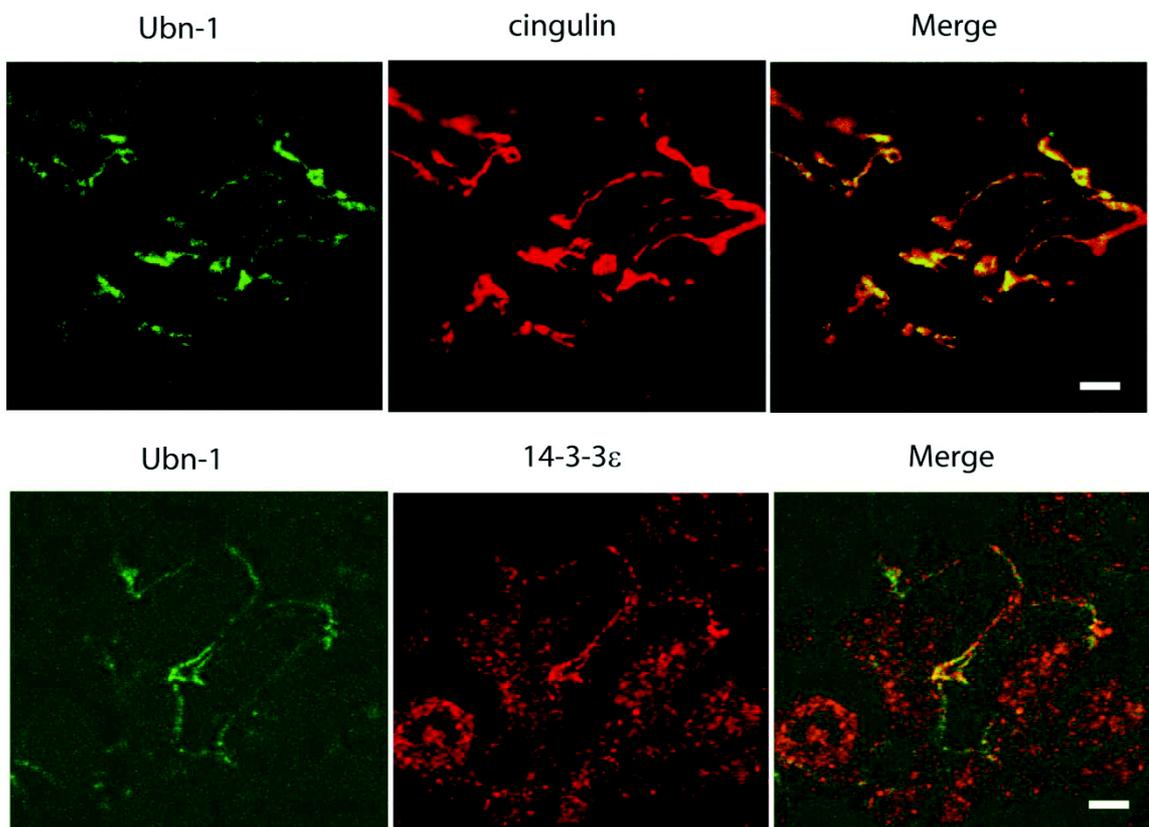
FIGURE 3. Protein kinase A modulates Ubn-1 cellular localization. (A) Treatment of cells with a PKA inhibitor increases the expression of Ubn-1, ZO-1 and 14-3-3 ϵ at the TJs. AGS epithelial monolayers were treated with DMSO (1:100) or 10 μ M of KT5720 overnight. Cells were then fixed and stained for Ubn-1, ZO-1 or 14-3-3 ϵ . (B) Treatment of cells with a PKA inhibitor increases the amount of Ubn-1 in the pool of proteins associated to the membranes. Cytoplasm, NP40 soluble or insoluble membrane-associated protein fractions were analyzed by western blotting using antibodies directed against Ubn-1 and 14-3-3 ϵ . Fractionation was assessed by using antibodies directed against Lamin A/C (for the soluble

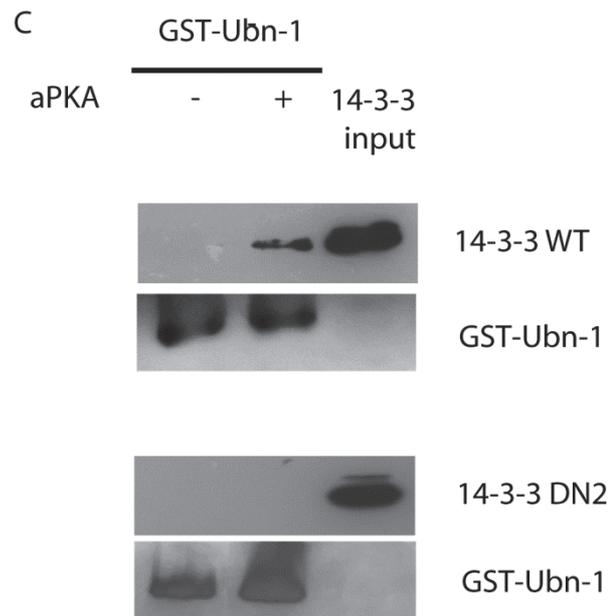
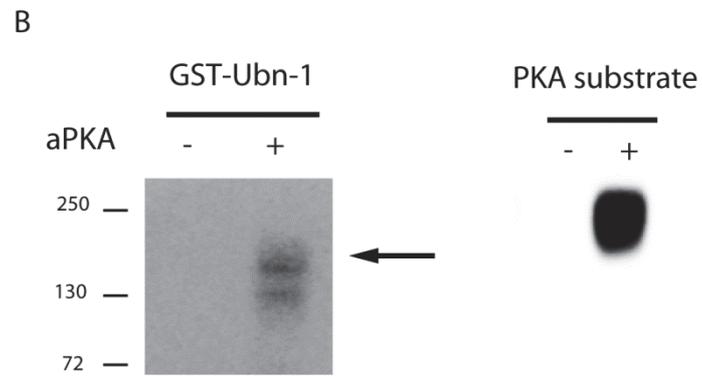
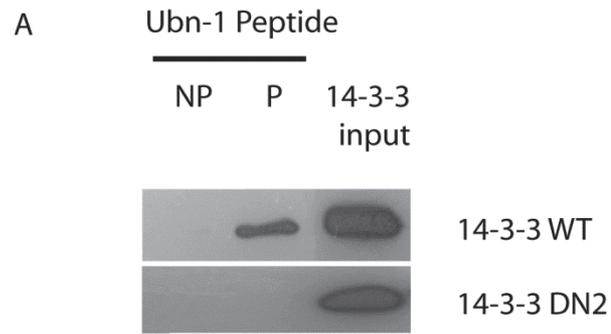
nuclear compartment) and actin. (C) Treatment of cells with a PKA inhibitor increases the expression of Ubn-1 at tricellular intersections. MDCK epithelial monolayers were treated with 10 μ M of KT5720 overnight. Cells were then fixed and stained for Ubn-1. Scale bar, 10 μ m.

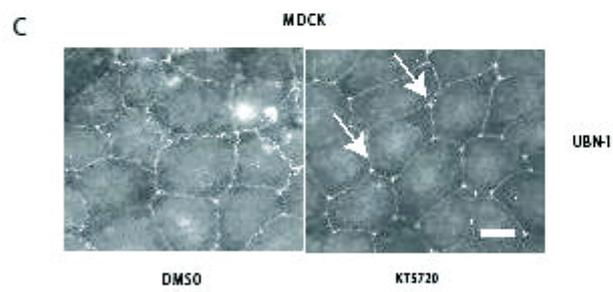
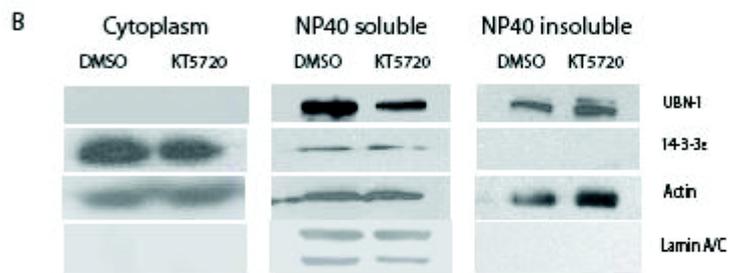
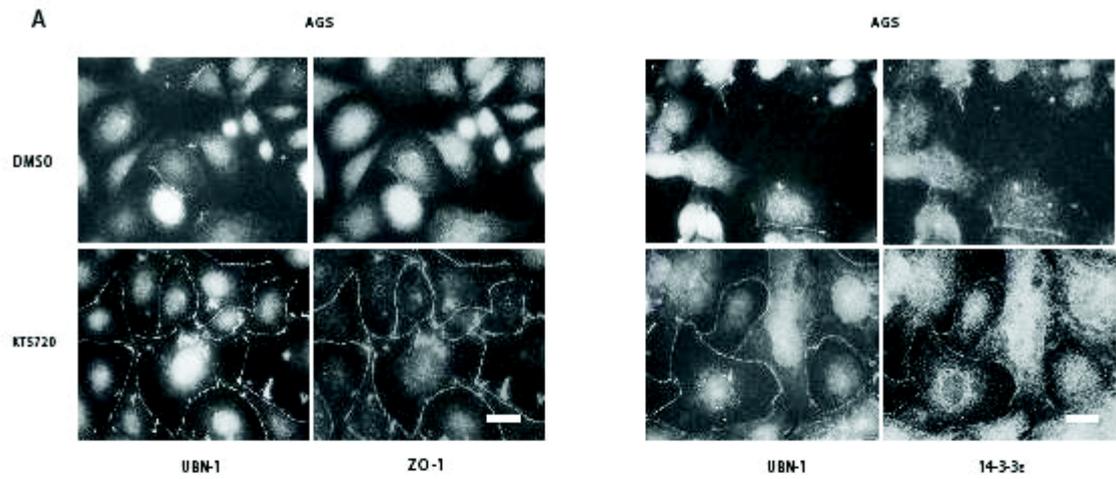
A



B







II) Identification de molécules inhibitrices spécifiques d'EB1

Le virus d'Epstein-Barr va persister tout au long de la vie et a la particularité de présenter deux phases. La première correspond à la phase de latence au cours de laquelle le génome viral persiste sous forme épisomale. La seconde phase est représentée par la phase productive durant laquelle le génome viral est répliqué et des particules virales sont produites. Certains gènes viraux du cycle productif sont transitoirement transcrits peu de temps après l'infection du lymphocyte B. Cependant, aucune particule virale n'est produite. Cela met en lumière un contrôle très rapide de la mise en route de ce cycle productif, ce qui est essentiel pour que le virus établisse le stade de latence. La transition entre latence et cycle productif reste encore mal connu. Cette partie des résultats traitera de l'étude de l'inhibition du cycle viral productif par des composés chimiques inhibant spécifiquement le facteur de transcription EB1.

1- Criblage de composés chimiques anti-EB1

Dans le cadre du projet ANR initié par le Dr Carlo Petosa (IBS- Grenoble), des molécules se fixant sur le facteur de transcription viral EB1 ont été mises en évidence après un criblage à haut débit basé sur l'inhibition d'interaction entre EB1 et une séquence ADN cible (AP1) par polarisation de fluorescence (criblage réalisé par l'EMBL-Heidelberg). La sonde ADN fluorescente est excitée par une lumière polarisée. Les valeurs de polarisation sont différentes selon que l'ADN soit libre ou complexé. Les composés agissant sur cette interaction conduisent à une réduction du signal de fluorescence. La suite du projet repose sur la réalisation de tests *in vitro* et *in vivo* de ces molécules pour vérifier leur potentiel inhibiteur (en collaboration avec les Dr E.Manet et H.Gruffat-ENS Lyon). Ma participation à ce projet concerne les études *in vivo* sur des cellules vivantes infectées par le virus d'Epstein-Barr afin de tester si ces molécules inhibent effectivement et efficacement le cycle productif.

La banque initiale de composés chimiques criblés a été de 74558 composés. Les résultats de la polarisation de fluorescence ont permis de mettre en évidence 28 composés avec une IC50 de 100 μ M. Le deuxième criblage des 28 composés a consisté à les utiliser dans un test EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay). En contact avec la protéine EB1 fusionnée à la MBP, le composé chimique évitera plus ou moins la formation du complexe EB1/ADN cible, cela dépendra de l'affinité de la molécule testée pour EB1. Dans la figure 38, nous observons

moins de protéine EB1 associée à l'ADN cible en présence du composé chimique 706811 (effet qui varie avec le dosage employé). Pour vérifier que cette inhibition est spécifique de EB1, la même technique est réalisée avec deux autres facteurs de transcription de la famille basic leucine Zipper (bZIP) qui sont GCN4 et c-JUN. La présence de la molécule 706811 n'inhibe pas la fixation de MBP-GCN4 ou du chimère MBP-Jun-EB1 sur l'ADN cible. On a donc une spécificité du composé chimique pour la protéine EB1.

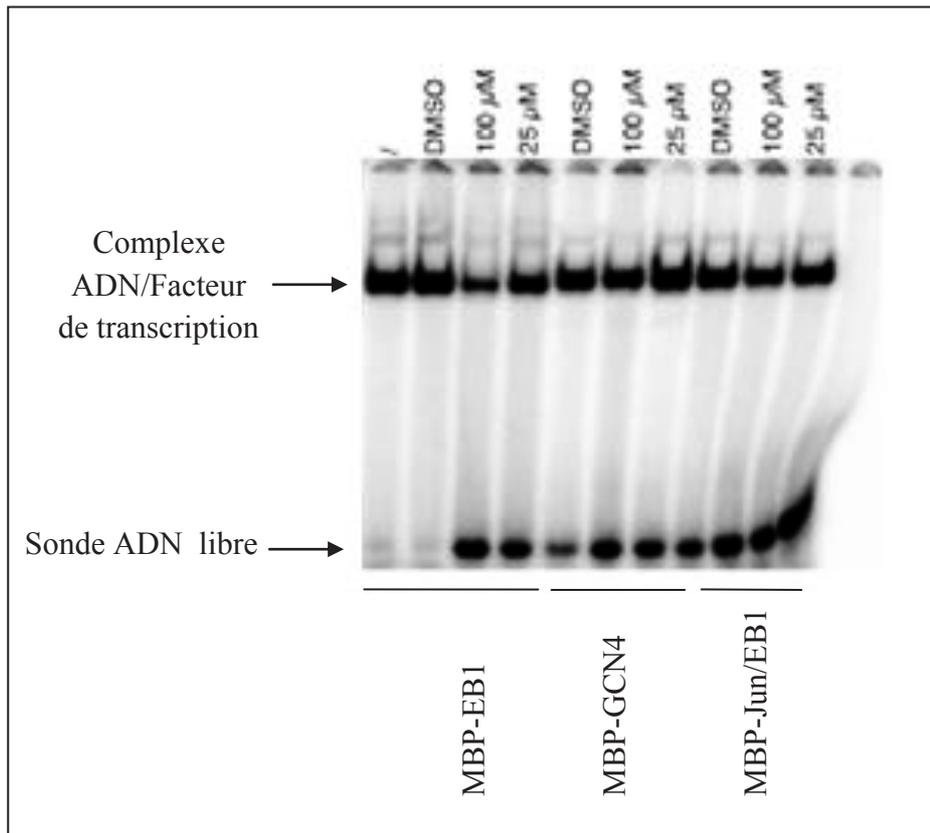


Figure 38 : Inhibition de la fixation de la protéine EB1 sur l'ADN cible par la molécule 706811

H. Gruffat et al., laboratoire de virologie humaine à l'ENS de Lyon, résultats non publiés

La sonde ADN peut être reconnue par chacun de ces facteurs de transcription utilisés. Une sonde ADN est mise en contact avec le facteur de transcription viral EB1, le facteur de transcription cellulaire GCN4 ou le facteur de transcription chimère Jun/EB1. L'ADN cible et le facteur de transcription sont mis en contact en absence ou en présence du composé (à une concentration de 100 µM ou 25 µM).

Le composé 706811 semble donc être un bon candidat pour des essais *in vivo*. Ce composé inhibe-t-il bien le facteur de transcription viral EB1 ? Affecte-t-il le cycle productif et est-il toxique pour la cellule ?

2- Suivi des stades du cycle productif sur lignées lymphocytaires

Afin d'évaluer le potentiel inhibiteur de cette molécule, des premiers tests *in vivo* ont été réalisés. Les cellules utilisées pour ces expériences sont des lignées de lymphome de Burkitt : Daudi et P3HR-1.

Afin d'induire le cycle productif, le TPA et BA ont été utilisés (description lors de l'introduction p). Nous pouvons voir dans la figure 35 que la présence combinée du TPA/BA conduit à une expression d'une des protéines virales précoces p52/50 (BMRF1, facteur de processivité associé à la polymérase virale) dans les cellules Daudi. Cette protéine présente une forme hypo ou hyperphosphorylée p50/52.

Pour déterminer la concentration de produit à employer pour la suite des expériences, une gamme a été réalisée et l'expression de BMRF1 a été suivie par western blot. On observe dans la figure 39 qu'après induction de BMRF1 par le TPA/BA, nous avons un effet inhibiteur significatif de la molécule à une concentration de 100 μ M (d'où le choix de cette concentration pour la suite) 72h après traitement. Cet effet n'est plus présent quand des concentrations plus faibles du composé sont utilisées.

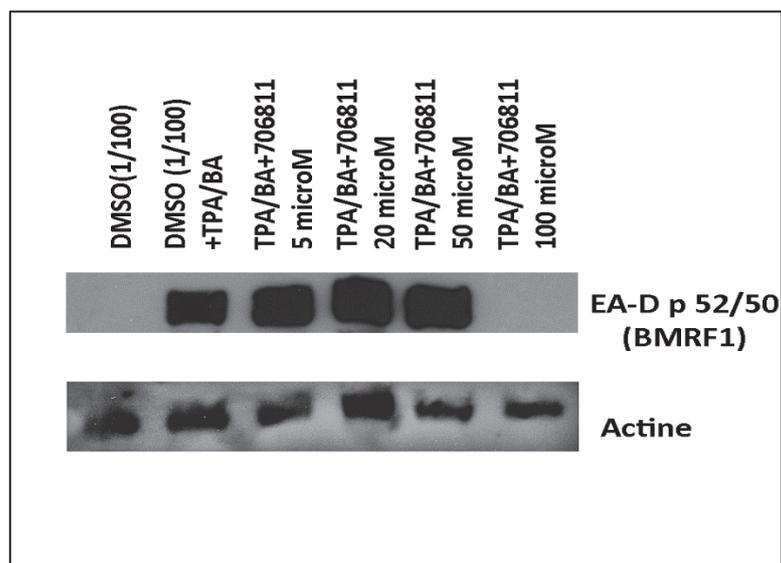


Figure 39: Gamme de concentration et suivi de l'expression de la protéine précoce BMRF1 dans la lignée Daudi (lymphome de Burkitt) après 72h de traitement

L'expression de la protéine virale précoce BMRF1 est analysée par western blot dans différentes conditions : sans induction du cycle productif, avec induction du cycle productif par TPA/BA avec ou sans le composé chimique (5 μ M, 20 μ M, 50 μ M et 100 μ M). L'actine permet la normalisation des résultats.

La figure 40 montre que cette molécule, à la concentration de 100 μ M, inhibe l'expression de BMRF1 dans les cellules Daudi et la diminue de façon significative dans les cellules P3HR-1. De plus, on observe une absence de détection du facteur de transcription EB1 par western blot dans les deux types cellulaires lorsque la molécule 706811 est présente. L'actine permet de vérifier le chargement des protéines de chaque puits et donc de normaliser les résultats.

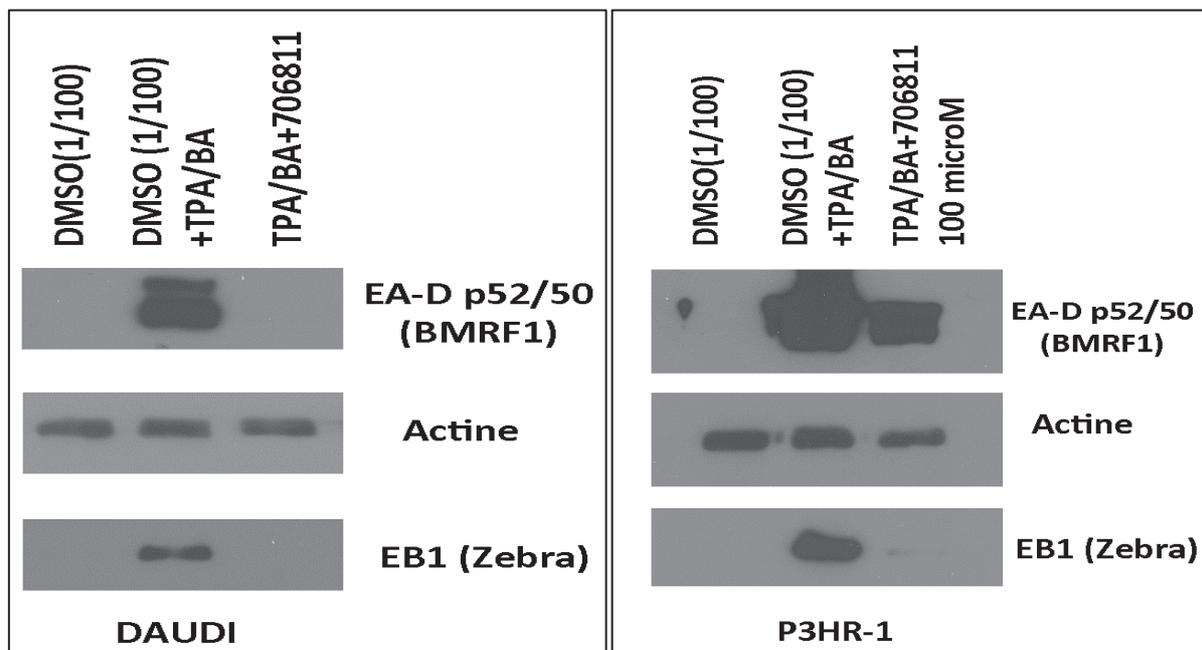


Figure 40 : Expression des protéines virales EB1 (Zebra) et BMRF1 en présence ou absence de traitement par la molécule dans deux lignées de lymphome de Burkitt (Daudi et P3HR-1)

L'expression des protéines virales EB1 et BMRF1 (protéine précoce) est analysée par western blot avec ou sans induction du cycle productif par TPA/BA et avec ou sans 100 μ M de composé chimique. L'actine permet la normalisation des résultats.

En conclusion, le composé 706811 agit sur le facteur de transcription viral EB1 et bloque de façon précoce le cycle productif dans les cellules Daudi. Lors, de l'initiation du cycle productif, EB1 est exprimée et peut agir sur son propre promoteur afin d'amplifier son expression. Nous pourrions supposer que la molécule chimique pourrait stopper cette boucle d'auto-amplification empêchant la mise en place du cycle productif.

3- Etude de la cytotoxicité par cytométrie en flux

Afin de mesurer la toxicité lors du traitement par la molécule inhibitrice d'EB1, les cellules sont analysées par cytométrie en flux après marquage sur cellule vivante par l'iodure de propidium. Cet agent intercallant va s'insérer au niveau des acides nucléiques accessibles ; Nous aurons donc un marquage des cellules mortes par nécrose. Comme le montrent les figures 41 et 42, le pourcentage de cellules positives suite au marquage par l'iodure de propidium est très faible et reste similaire pour les deux types cellulaires (Daudi et P3HR-1, <0.37% et <0.34% respectivement) dont le cycle est induit par le TPA/BA en absence et en présence du composé 706811.

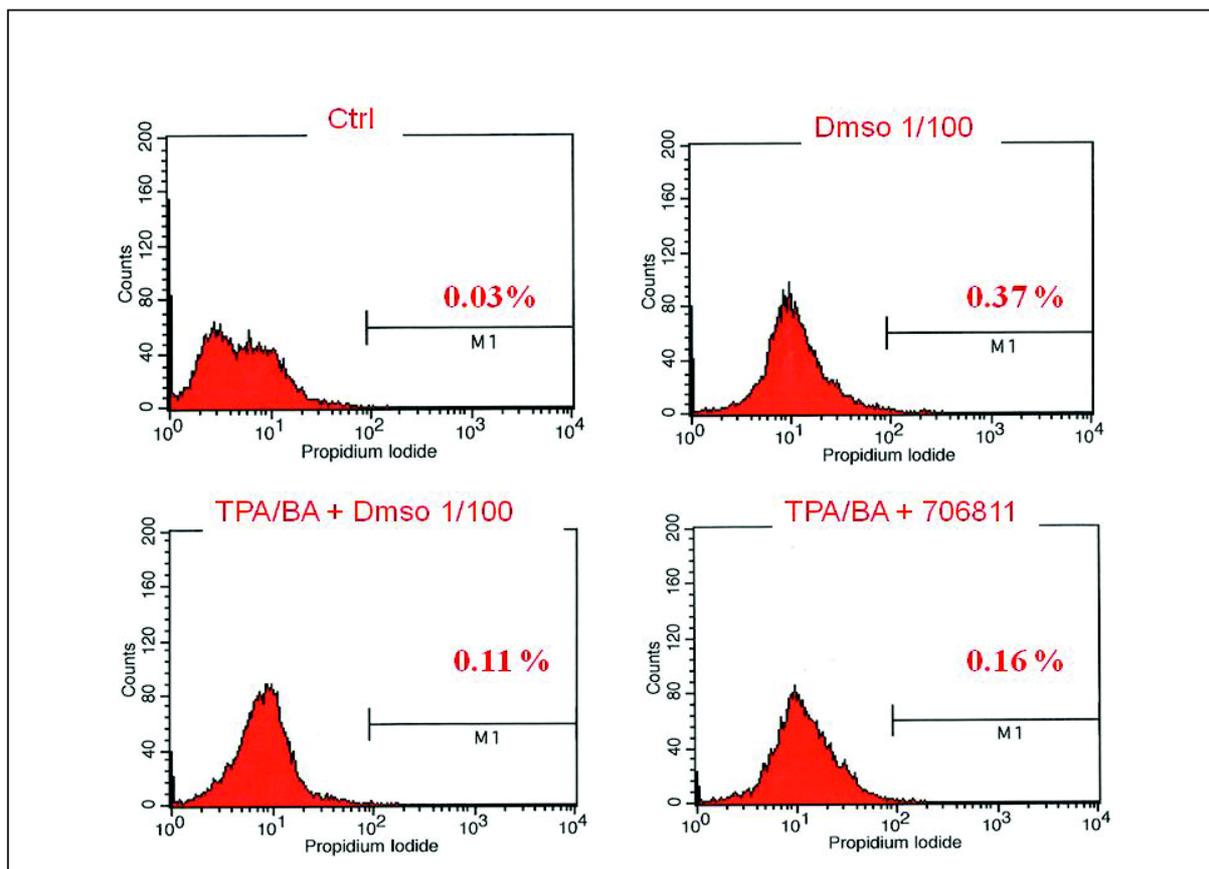


Figure 41 : Marquage à l'iodure de propidium des cellules DAUDI (lymphome de Burkitt) et mesure de la mort cellulaire par cytométrie en flux

Ctrl : Cellules dont le cycle productif n'est pas induit par TPA/BA et non traitées par le composé chimique

DMSO : Cellules dont le cycle productif n'est pas induit par TPA/BA et traitées avec du DMSO 1/100

TPA/BA : Cellules dont le cycle productif est induit par TPA/BA et traitées avec du DMSO 1/100

TPA/BA+706811 : Cellules dont le cycle productif est induit par TPA/BA et traitées avec 100 μ M de composé chimique

Les cellules de chaque condition sont marquées par de l'iodure de propidium et analysées par cytométrie en flux.

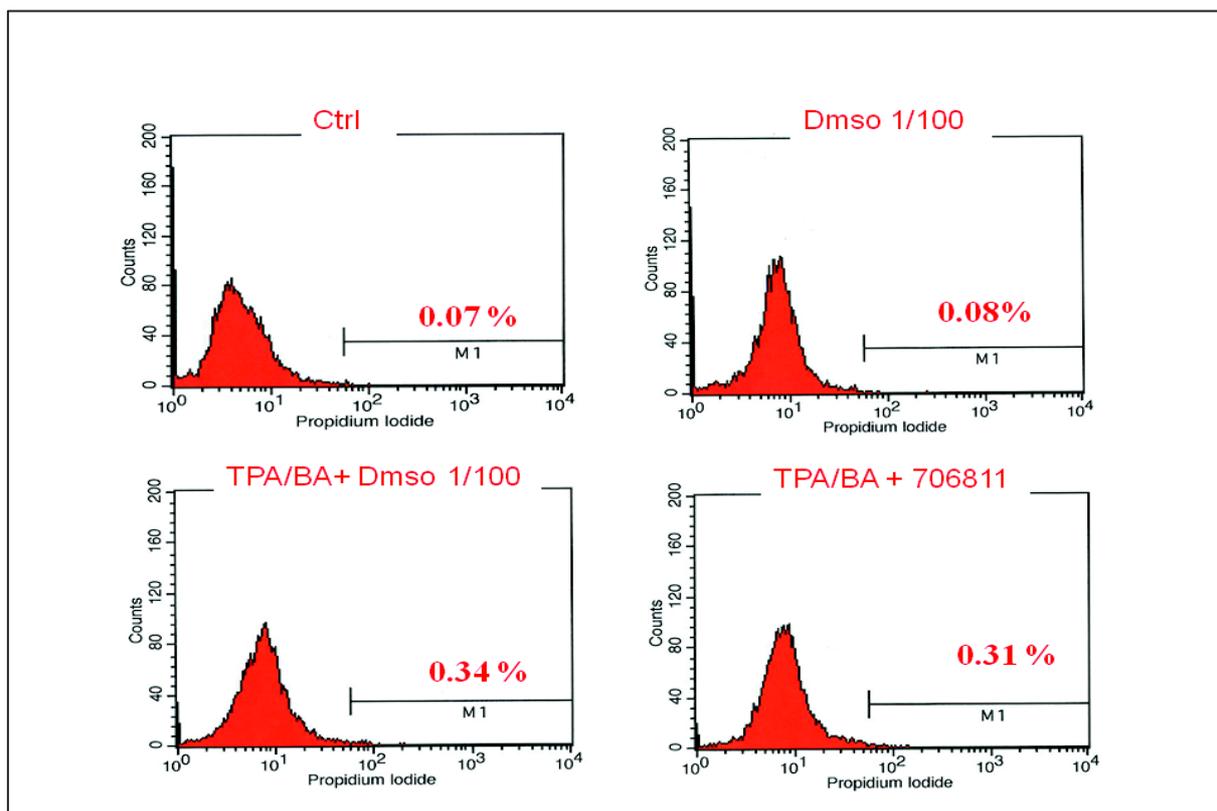


Figure 42 : Marquage à l'iodure de propidium des cellules P3HR-1 (lymphome de Burkitt) et mesure de la mort cellulaire par cytométrie en flux

Ctrl : Cellules dont le cycle productif n'est pas induit par TPA/BA et non traitées par le composé chimique

DMSO : Cellules dont le cycle productif n'est pas induit par TPA/BA et traitées avec du DMSO 1/100

TPA/BA : Cellules dont le cycle productif est induit par TPA/BA et traitées avec du DMSO 1/100

TPA/BA+706811 : Cellules dont le cycle productif est induit par TPA/BA et traitées avec 100 μ M de composé chimique

Les cellules de chaque condition sont marquées par de l'iodure de propidium et analysées par cytométrie en

Le traitement par la molécule 706811 des cellules Daudi et P3HR-1 n'entraînerait donc pas de toxicité significative, d'autant plus qu'il s'agit d'un traitement de 72h. La mort cellulaire par apoptose, suite à ce traitement, reste à étudier.

4- Mise au point d'un test de sélection des molécules inhibitrices d'EB1 en culture cellulaire

Il serait intéressant de tester les 27 autres composés du premier criblage. Les tester en culture cellulaire de la même façon que précédemment prendrait beaucoup de temps et serait très fastidieux. Nous avons donc choisi de mettre en place un protocole permettant un large tri des molécules inhibitrices de la protéine virale EB1, utilisant un gène rapporteur en 3' du promoteur du gène *bzlf1*. Ce gène rapporteur code la luciférase « firefly » qui est donc sous

contrôle d'une partie du promoteur du gène *bzlf1* (correspondant à la séquence de -221 à +28 du site d'initiation de transcription). C'est ce que nous appellerons promoteur Zp. Ainsi, l'activité du facteur de transcription viral pourra être suivie en absence ou en présence des diverses molécules. Le vecteur pGL3 basic sera transfecté dans la cellule et pourra y être exprimé. L'intensité de luminescence émise après ajout du substrat pour la luciférase sera corrélée à l'expression du vecteur rapporteur.

Nous avons testé ce gène rapporteur dans une lignée cellulaire positive pour le virus d'Epstein-Barr (AGS, carcinome gastrique). Comme le montre la figure 43, l'intensité de luminescence mesurée est plus importante lorsque le gène codant la luciférase est sous contrôle du promoteur Zp du gène *bzlf1*.

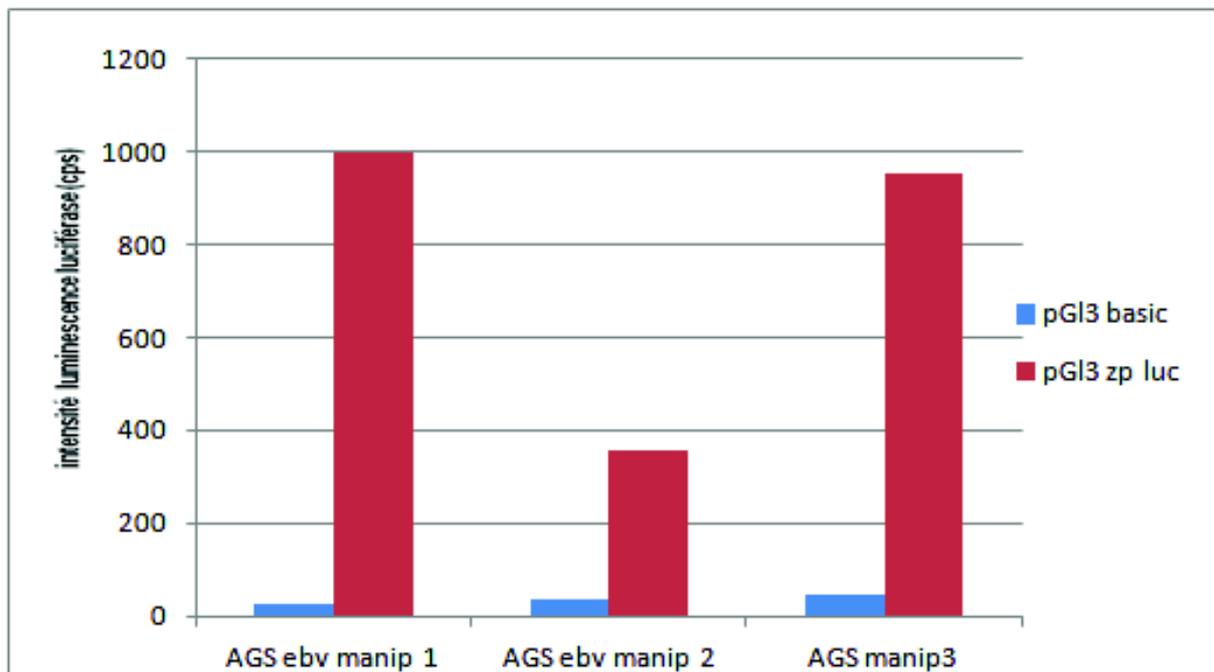


Figure 43 : Mesure d'intensité de luciférase dans les cellules AGS positives pour le virus d'Epstein-Barr transfectées avec le vecteur pGL3 basic et pGL3 Zp luc

Les cellules de carcinome gastrique AGS positives pour EBV, sont transfectées avec le vecteur pGL3 basic ou le vecteur pGL3 Zp luc. 48h après transfection, l'intensité de luminescence du gène rapporteur luciférase est mesurée. Expérience réalisée en triplicate.

Dans le but de vérifier si ce résultat est spécifique du facteur de transcription viral EB1, nous avons à notre disposition la lignée équivalente négative pour le virus d'Epstein-Barr ou la lignée positive pour le virus d'Epstein-Barr dont le génome viral ne possède pas la séquence codant la protéine EB1 (KOZ). La figure 44 montre que dans les cellules transfectées par le

vecteur pGI3 Zp luc, nous détectons une activité luciférase importante. Le promoteur Zp utilisé présente donc des séquences reconnues par des facteurs de transcription cellulaire.

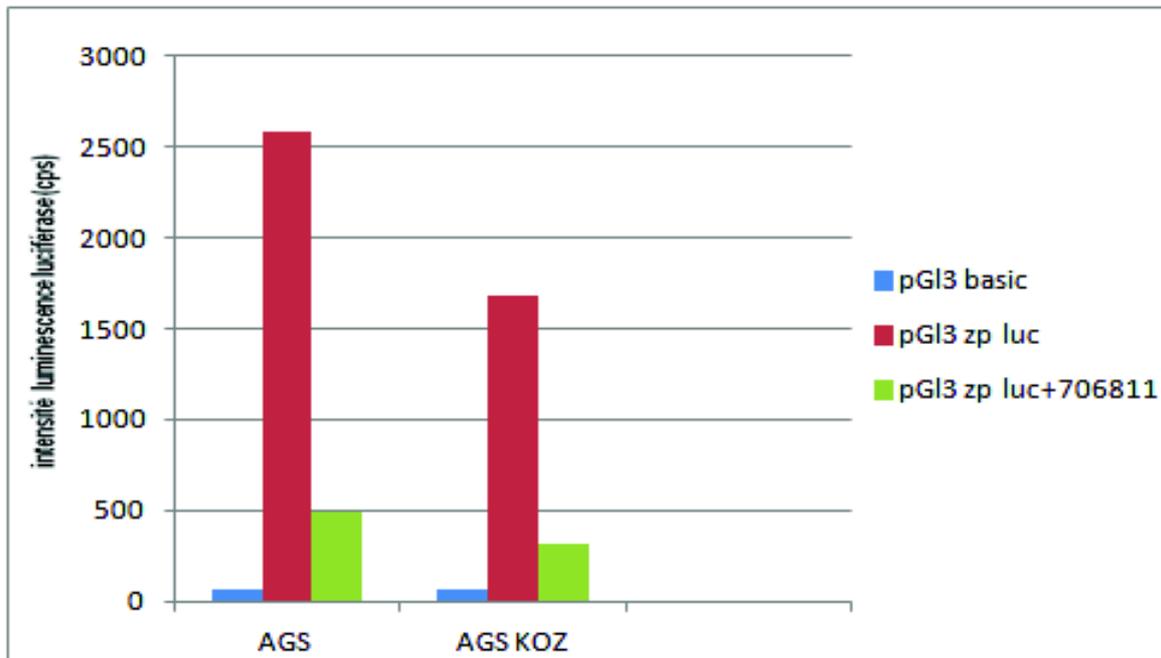


Figure 44 : Intensité luciférase mesurée après transfection des vecteurs dans les cellules AGS négatives pour le virus d'Epstein-Barr et AGS positive pour le virus d'Epstein-Barr KO pour EB1
 Les cellules de carcinome gastrique AGS négatives pour EBV, sont transfectées avec le vecteur pGI3 basic ou le vecteur pGI3 Zp luc. Les cellules de carcinome gastrique AGS positives pour EBV mais n'exprimant pas EB1, sont transfectées avec le vecteur pGI3 basic ou le vecteur pGI3 Zp luc. La transfection est réalisée en absence ou en présence de 100 μ M du composé chimique. 48h après transfection, l'intensité de luminescence du gène rapporteur luciférase est mesurée. Expérience réalisée une seule fois.

Pour pallier à ce manque de spécificité, le gène rapporteur a été mis sous contrôle d'un promoteur plus court, composé de deux séquences ZRE et de la TATA box du gène *bzlf1*. Nous l'appellerons promoteur minpEB1. Les premiers tests avec cette construction n'ont pas été concluants suite à une absence d'induction du cycle productif correct.

En conclusion, parmi les composés chimiques issus du criblage à haut débit, une sélection par biologie moléculaire (EMSA) a été faite afin de procéder à des tests en culture cellulaire. Suite à ces tests, un composé sélectionné a fait l'objet d'analyse *in vivo* par des techniques biochimiques. Les résultats ont indiqué que cette molécule ne présente pas de toxicité significative et qu'elle bloque les étapes précoces du cycle productif dans les lignées

cellulaires de lymphome de Burkitt Daudi et P3HR-1. La suite de ces études est toujours en cours.

III) Matériels et méthodes hors articles n°1 et n°2

1- L'ubiquitine interagit avec la chaîne lourde de la clathrine (p66)

° Immunoprécipitation Ubiquitine/Chaîne lourde de la clathrine (p73) :

Les cellules HT29 sont poussées à confluence (2 boîtes de 100 mm pour l'IP et 2 autres pour l'IP avec l'anticorps contrôle). Les cellules sont rincées à trois reprises avec du PBS (préalablement à 4°C) et lysées avec 900 µL de tampon de lyse (20 mM Tris, pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.2% Triton X-100, 0.01% SDS and 1% glycerol) pendant 20 minutes dans la glace; Le surnageant est récolté après une centrifugation de 15 minutes à 13000 rpm. Un preclearing du surnageant est réalisé avec des billes Protein A/G plus agarose (Santa Cruz Biotechnology) pendant 2h sur une roue à 4°C. Ensuite l'anticorps primaire ou l'anticorps contrôle est ajouté à 450 µL de lysat et laissé en contact pendant la nuit sur la roue à 4°C. Le lendemain 15 µL de billes sont ajoutées et laissées en contact avec le surnageant (dans lequel un complexe anticorps-protéine reconnue s'est formé) pendant 2h sur la roue à 4°C. Une fois les billes culotées après centrifugation de 130000 rpm 30s et retrait du surnageant, elles sont rincées 3 fois. Les protéines sont éluées après 5 min minutes à 95°C dans du tampon Laemmli. Le tout est chargé sur gel SDS (acrylamide 8-15%) puis transféré sur membrane PVDF (millipore) avant analyse par western blot.

Anticorps utilisés : anti-clathrin pAb (Abcam), anti-Ubn-1 mAb, anti-souris.HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories), anti-lapin.HRP (Jackson ImmunoResearch Laboratories)

° Colocalisation Ubiquitine/Clathrine (p74) :

Les cellules Ht29 sont cultivées à 37°C sous 5% de CO₂, en milieu DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) contenant 10% de sérum de veau fœtal et des antibiotiques (100 units/ml pénicilline/streptomycine). Arrivées à confluence, les cellules sont fixées par du paraformaldéhyde 4% pendant 20 min à 4°C avant analyse par immunomarquage.

Toutes les étapes de l'immunomarquage ont lieu à température ambiante et à l'abris de la lumière. Les cellules sont rincées avec du TBS 1X/Triton-100 0.1%. Ensuite, elles sont saturées avec une solution de TBS 1X/Triton-100 0.1% complétée par 3 % de GPI (Goat PreImmune serum). Après une heure d'incubation avec les anticorps primaires (dilués dans du TBS 1X-Triton 100 0.1% complété par 1 % de GPI), les cellules sont rincées à trois reprises avec du TBS 1X/Triton-100 0.1% puis incubées une heure avec les anticorps secondaires couplés avec le fluorochrome Alexa adapté (dilué dans du TBS 1X/Triton-100 0.1% complété par 1 % de GPI et hoecht). Après deux rinçages avec du TBS 1X-Triton 100 0.1% et un rinçage à l'eau, les lamelles sont montées sur lame avec du mowiol. Les observations sont réalisées avec un microscope à fluorescence (Axio Imager Z1 Microscope System, Zeiss, Jena, Germany) ou confocal (Confocal Axioplan2 LSM510, Zeiss).

Anticorps utilisés : anti-clathrin pAb (Abcam), anti-Ubn-1 mAb, anti-souris.Alexa 488 (molecular probes), anti-lapin.Alexa 594 (molecular probes)

2- L'Ubinucléine emprunte la voie d'endocytose dépendante de la clathrine (p 75)

Les cellules épithéliales MDCK (lignée de cancer rénal du chien) ont été choisies pour cette expérience. Elles sont cultivées à 37°C sous 5% de CO₂, en milieu DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) contenant 10% de sérum de veau fœtal et des antibiotiques (100 units/ml pénicilline/streptomycine).

◦ Test de protection à la protéinase (Trypsine) (p76) :

Lorsque les cellules sont à confluence, le milieu complet est retiré et remplacé par du milieu sans calcium (S-MEM, Sigma) supplémenté avec 2 mM EGTA, 10 mM HEPES, 14 mM NaHCO₃, and 5% de sérum de veau fœtal dialysé. Après 6 h de culture, le milieu est retiré et les cellules rincées avec de milieu HBSS- (+2 mM EGTA). Ensuite, les cellules sont mises en contact avec de la trypsine 0.05% pendant 20 min. Les cellules sont récupérées et centrifugées 5 min à 1000 rpm. Après retrait du surnageant, le culot cellulaire est lysé avec du tampon (20 mM Tris, 50 mM EDTA, 1% déoxycholate, 1% Triton, 0.1% SDS, pH 7.4) pendant 20 min

dans la glace. Après une centrifugation de 30 min à 13000 rpm, le surnageant est récupéré et le dosage protéique réalisé par réactif de Bradford (Sigma).

9 µg de protéines totales sont chargés et séparés sur gel acrylamide SDS page puis transférés sur membrane PVDF pour analyse par western blot.

◦ **Suivi cinétique de l'Ubinucléine après privation calcique (p77):**

Lorsque les cellules sont à confluence, le milieu complet est retiré afin de procéder à la déplétion calcique pendant 2h, 4h, 6h ou 8h. Durant ce temps, les cellules sont cultivées en milieu sans calcium (S-MEM, Sigma) supplémenté avec 2 mM EGTA, 10 mM HEPES, 14 mM NaHCO₃, and 5% de sérum de veau fœtal dialysé. En ce qui concerne l'utilisation de milieu acide, les cellules sont cultivées en milieu sans calcium contenant 20 mM MES et 20 mM d'acide succinique, pH 5.5. Les cellules sont fixées par du paraformaldéhyde 4% pendant 20 min à 4°C avant analyse par immunomarquage.

Anticorps utilisés : anti-Ubn-1 mAb, anti-ZO1 pAb (Zymed/Invitrogen), anti-Claudine-1 (Invitrogen)

3- Identification de molécules inhibitrices spécifiques d'EB1 (p105)

◦ **Induction cycle productif dans les lymphocytes B (cellules Daudi et P3HR-1) (p 107) :**

J₀ : 8.10⁵ cellules sont traitées avec du TPA (PMA, Sigma-aldrich) 10 ng/ml final + BA 3 mM final (Sigma-aldrich) (le TPA est dilué au moment de l'utilisation dans du milieu avant ajout). Au même moment peut être ajoutée la molécule 706811 (dilué au moment de l'utilisation dans du milieu avant ajout) à la concentration finale de 100 µM (dilué dans du milieu avant ajout) .

J+72h : Les cellules sont récupérées (2.10⁵ cellules sont mises de côté pour le test de cytotoxicité), centrifugées 5 min à 1000rpm et le surnageant retiré ou conservé à 4°C. Le culot cellulaire est lysé avec 70 µl tampon de lyse d'extraction (50 mM Tris pH=7.5, 150mM NaCl, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, 1% Triton X-100) avec inhibiteur de protéase et

phosphatase pendant 1h dans la glace. Le surnageant est récupéré après centrifugation de 15 min à 13000 rpm à 4°C. Le surnageant est dosé (méthode BCA, Thermo scientific) et peut être conservé à -20°C.

15 µg de protéines totales sont chargés et séparés sur gel acrylamide SDS page puis transférés sur membrane PVDF pour analyse par western blot.

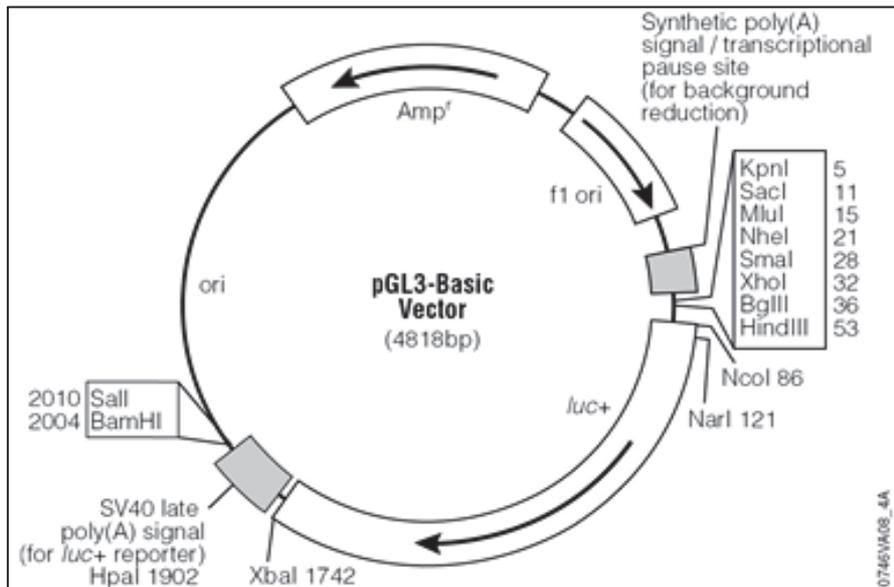
◦ **Mesure de la cytotoxicité par cytométrie en flux (p 109) :**

Les cellules conservées lors de l'induction du cycle productif sont centrifugées 5 min à 1000 rpm et le surnageant retiré. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS 1X puis centrifugées 5 min à 1000 rpm. Après retrait du surnageant, les cellules sont resuspendues dans 1 ml de PBS 1X auquel est ajouté de l'iodure de propidium (Sigma-aldrich) à une concentration finale de 1 µg/ml. Le tout est placé 5 min à l'abri de la lumière. Suite à une centrifugation de 5 min à 1000 rpm, le surnageant est retiré et les cellules rincées à deux reprises avec du PBS 1X. Le culot cellulaire est alors fixé avec du paraformaldéhyde 4% pendant 20 minutes à 4°C. Après centrifugation 5 min à 1000 rpm et retrait du surnageant, les cellules sont rincées à deux reprises avec du PBS 1X. Pour finir le culot est resuspendu dans 800 µL de PBS 1X, conservé à 4°C jusqu'à l'analyse par cytométrie en flux.

◦ **Expression du gène rapporteur codant la luciférase (p110) :**

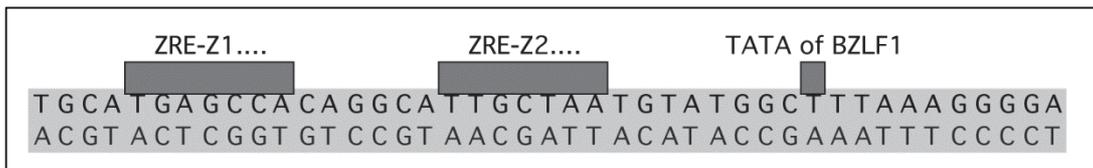
Les vecteurs pGI3 basic et pGI3 Zp luc ont été fournis par le dr Shannon Kenney (Université de Madison, Wisconsin).

Les cellules sont portées à 75% de confluence puis transfectées avec 2 µg du vecteur approprié grâce au genejuice (Novagen) suivant les recommandations. 48h après la transfection, les cellules sont lysées avec du tampon 5X suivant les recommandations du constructeur (luciférase assay system, Promega). 20µL du lysat obtenu servira pour le dosage d'intensité de luciférase sur le luminomètre wallac 1420 Victor II.



Carte du vecteur rapporteur pGL3-Basic

Le vecteur pGL3-Basic porte le gène codant la protéine luciférase



Séquence et organisation du promoteur minpEB1

Le promoteur minpEB1 est composé de deux séquences ZRE et la TATA box d'EB1

Discussion
et perspectives

Discussion et perspectives

L'Ubinucléine a été décrite pouvant faire la navette entre les noyaux et les jonctions serrées, lui conférant la propriété de NACos (Aho et al., 2009). Afin de mieux comprendre sa fonction, en particulier dans les jonctions serrées, nous avons tout d'abord recherché des partenaires cellulaires par spectrométrie de masse. Trois partenaires potentiels ont été identifiés et vérifiés : les protéines Cinguline, Lyric et Rack1.

La Cinguline, en se liant à l'activateur RhoA GEF-H1, a pour rôle de réguler l'activité des protéines de la famille Rho GTPases au niveau des jonctions serrées. Elle contribue aussi à la régulation transcriptionnelle de certains gènes comme ceux codant les protéines Claudine-2 et ZO-3 (Guillemot and Citi, 2006). Dans le tissu nerveux, la Cinguline joue un rôle important dans la migration des cellules de la crête neurale qui sont présentes dans le neuroépithélium dorsal au début du développement (Wu et al., 2011). Nous avons vu en introduction que divers microorganismes altèrent les jonctions serrées au cours de l'infection. Cependant, il existe des microorganismes qui, à l'inverse, favorise ces jonctions et préservent l'intégrité de l'épithélium. C'est le cas de la bactérie probiotique *Lactobacillus plantarum* MB452 qui tend à une augmentation transcriptionnelle des gènes codant la Cinguline, l'Occludine, ZO-1 et ZO-2 (Anderson et al., 2010).

La Cinguline est recrutée grâce à ZO-1 (Umeda et al., 2004) lui-même partenaire de l'Ubinucléine (Aho et al., 2009).

La protéine Lyric (LYsine-RIch CEACAM1 ou AEG-1) fait partie du complexe protéique présent dans les jonctions serrées. Elle serait recrutée au moment de la maturation de ces jonctions dans les cellules épithéliales polarisées (Britt et al., 2004). Elle peut voyager entre le noyau et les membranes (Sutherland et al., 2004). De plus, elle possède des sérines et des thréonines dans sa séquence peptidique qui sont susceptibles d'être phosphorylées par les protéines kinases A et C régulant potentiellement sa localisation cellulaire (Thirkettle et al., 2009). La transcription du gène codant cette protéine est régulée par la voie oncogénique HA-

RAS *via* c-myc. La protéine Lyric régule diverses voies de signalisation dont celle de la PI3-kinase et de NFκB. Par ailleurs, la protéine Lyric peut interagir avec PLZF. PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger) est un composant des corps nucléaires qui régule négativement la transcription de certains gènes (notamment ceux impliqués dans le cycle cellulaire et l'apoptose). Lorsque Lyric est fortement exprimée, on observe une forte association du complexe protéique PLZF/Lyric évitant l'activité négativement régulatrice de la protéine PLZF sur l'expression de certains gènes (Thirkettle et al., 2009). C'est peut-être une des raisons expliquant le fait que la protéine Lyric soit fréquemment régulée positivement lors de la tumérogenèse (Yoo et al., 2011). Le suivi de l'expression de cette protéine en tant que marqueur diagnostique et pronostic est d'ailleurs envisagé. Il est intéressant de noter que cette protéine participe à la survie, à la prolifération cellulaire et à la résistance vis-à-vis des traitements de chimiothérapie (figure 45).

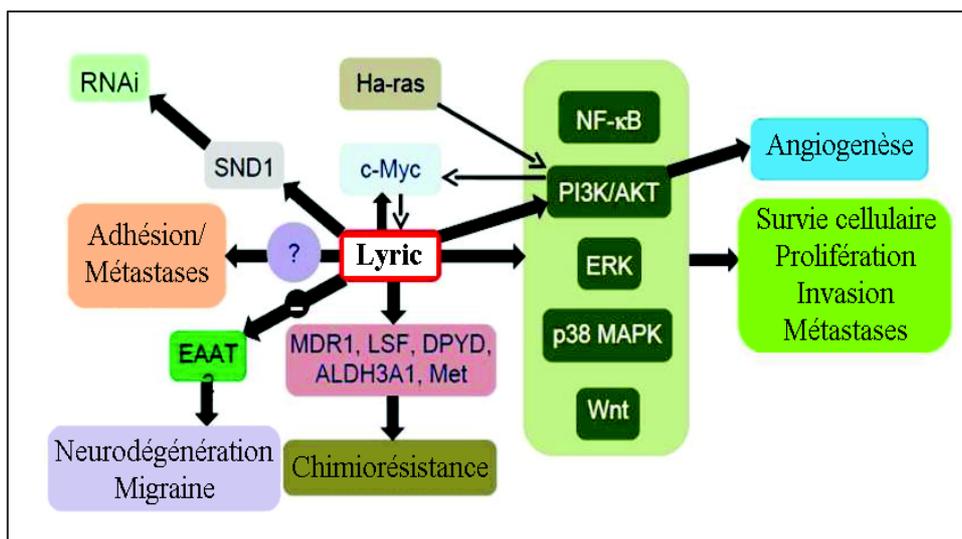


Figure 45 : Mécanismes régulés par la protéine Lyric

Lyric régule de nombreuses voies cellulaires impliquées dans la prolifération, la survie.
D'après B.K. Yoo et al. / *Pharmacology & Therapeutics* (2011), 130 : 1–8

Une question se pose : L'Ubinucléine interagit-elle avec la protéine Lyric pour réguler son activité oncogénique ? Pour y répondre, nous pourrions envisager de tester la progression tumorale sur des cellules exprimant très faiblement l'Ubinucléine en utilisant des siRNA. Si la forte diminution de l'expression de l'Ubinucléine favorise la progression tumorale, nous pourrions émettre l'hypothèse que sa fixation sur la protéine Lyric (et sans doute d'autres protéines impliquées dans la tumorigenèse) régulerait l'activité oncogénique de celle-ci.

Une autre protéine cellulaire partenaire de l'Ubinucléine est Rack1 (ou GNB2L1). Elle fait partie de la famille des protéines RACKs (Récepteur pour la protéine kinase C activée). Elle est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation. Rack1 est principalement libre dans le cytosol mais ne se résume pas à une protéine dite « scaffold ». En interagissant avec la sous-unité ribosomale 40S, elle peut aussi intervenir vis-à-vis de la traduction et de la régulation cellulaire (Sengupta et al., 2004). Il est intéressant de noter que lors de précédents résultats (Lupo et al., 2012) (annexe p151), des protéines appartenant à la sous-unité ribosomale 40S et 60S ont été identifiées comme partenaires de l'Ubinucléine par spectrométrie de masse (interaction restant à confirmer). Dans des carcinomes hépatiques, Rack1 (si localisée au niveau des ribosomes) peut être surexprimée (Ruan et al., 2012). Dans ce cas, elle va favoriser la croissance et la survie cellulaire en se liant à la PKC β II qui a pour substrat le facteur cellulaire eIF4E. Dans le cas du carcinome de la prostate, le récepteur transmembranaire Trop-2 va influencer la capacité d'adhésion de la cellule cancéreuse à la fibronectine en agissant sur l'association entre l'intégrine β 1 et la protéine Rack1 qui va être plutôt localisée dans les jonctions serrées (Trerotola et al., 2012). A ce moment-là, les voies de signalisation FAK (Focal Adhesion Kinase) et Src seront activées. De plus, il est important de dire que la protéine Trop-2 est capable de se lier à la protéine Claudine-1 qui elle-même colocalise avec l'Ubinucléine (Aho et al., 2009). La thrombine induit une augmentation de la perméabilité endothéliale suite à sa fixation sur un récepteur de surface couplé à une protéine G. Lors de la fixation sur ce récepteur, la kinase de la chaîne légère de la myosine et la voie de signalisation RhoA seront activées. Lors d'expériences avec des ARN interférence, Knezevic et son équipe (2009) ont montré que ce dimère de protéine G s'associe avec la protéine Fyn qui, à son tour, induit l'activité de FAK (Focal Adhesion Kinase). La protéine Rack1, qui peut se lier à la protéine Fyn, va réguler négativement ce processus et restaurer la fonction de la barrière endothéliale. En activant la voie de signalisation des petites protéines GTPase RhoA/kinase Rho, Rack1 influence et favorise la migration des cellules cancéreuses (métastases) du carcinome du sein (Cao et al., 2011) ; cela est peut-être dû à son action sur la perméabilité de la barrière endothéliale ou sur les protéines Rho (Ras homologue : Rho, Rac et Cdc42) impliquées dans la régulation du cytosquelette d'actine.

Lors de certaines infections, la protéine Rack1 va agir comme protéine « scaffold » conduisant aux voies de signalisation nécessaires lors de la mise en route de la réponse immunitaire. De ce fait, elle est une cible importante pour certains virus ou microorganismes. Le facteur de transcription EB1 du virus d'Epstein-Barr peut interagir avec la protéine cellulaire RACK1 (Baumann et al., 2000). En effet, EB1 peut être un substrat pour la PKC et

Rack1 servirait de lien entre les deux en recrutant la PKC. De plus, un des ARN viraux CST (Complementary Strand Transcripts : BART, BARF0) exprime la protéine A73 qui fut démontrée comme partenaire de la protéine cellulaire Rack1 afin de moduler son activité (Smith et al., 2000). Rack1 recrutant diverses protéines impliquées dans des voies de signalisation, nous pouvons supposer qu'en la contrôlant, le virus pourrait favoriser la croissance tumorale. Une autre protéine virale, la protéine Nef du virus d'immunodéficience humaine (VIH) se lie à la protéine cellulaire Rack1. A son tour, elle permettrait le recrutement d'une ou des kinases telle que la PKC phosphorylant la protéine virale Nef (phosphorylation qui serait nécessaire pour son activité immunosuppressive) (Gallina et al., 2001). Nous pouvons également évoquer la bactérie *yersinia pseudotuberculosis* qui va utiliser Rack1 pour éviter la phagocytose (un des éléments clés dans la réponse innée immunitaire de l'hôte). La bactérie va se lier à l'intrégrine $\beta 1$ présente à la surface. Très rapidement, une accumulation de la protéine Rack1 peut être observée au niveau du site d'attachement de la bactérie sur la cellule où elle sera liée avec le senseur bactérien YopK. Le senseur permettra d'induire à l'endroit nécessaire, les effecteurs bactériens qui auront un effet antiphagocytaire (Thorslund et al., 2011).

L'Ubinucléine interagit donc avec trois partenaires (figure 46) ayant diverses fonctions. Lyric et Rack1 ont en commun un impact sur la croissance cellulaire et une implication dans la progression de certaines tumeurs.

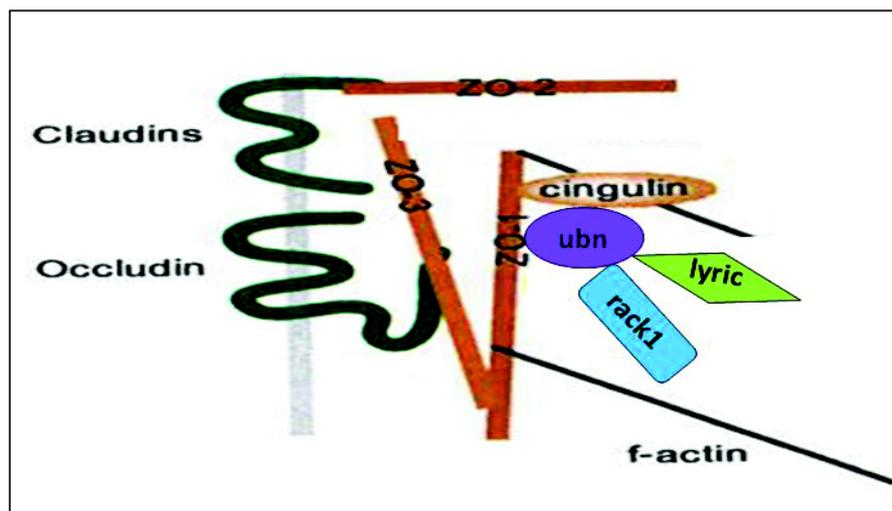


Figure 46 : Nouveaux composants des jonctions serrées
L'Ubinucléine interagit avec la Cinguline, Lyric et Rack1

Les jonctions serrées possèdent plusieurs composants : des protéines transmembranaires permettant l'adhésion cellulaire et des protéines associées qui joueront le rôle de protéines adaptatrices. Ces protéines associées peuvent avoir pour fonction de lier la membrane au cytosquelette ou de recruter des protéines régulatrices impliquées dans des voies de signalisation (kinases, petites protéines GTPases, facteurs de transcription ...). Tous ces éléments vont constituer « la plaque des jonctions serrées ». Cette plaque va jouer diverses fonctions dans la signalisation, l'adhésion cellulaire, la formation du cytosquelette, le transport vésiculaire et l'expression de certains gènes. La protéomique de l'Ubinucléine a révélé qu'elle interagissait avec la tubuline et la protéine Plectin-1 (Lupo et al., 2012) (annexe p151). Cette dernière sert d'ancrage entre les jonctions réalisées par les desmosomes (et hemidesmosomes) et le cytosquelette (microtubules et filaments d'actine et intermédiaires) (Koster et al., 2003). L'interaction entre l'Ubinucléine et ces protéines reste cependant à vérifier et à confirmer. L'Occludine et l'Ubinucléine ont pour partenaires communs les protéines ZO-1 et Cinguline. De plus la Spectrine, la Catenine- α , l' α -actinine-4, l'actine F sont des partenaires potentiels de l'Ubinucléine (Lupo et al., 2012) (annexe p151) et ont déjà été observés comme interagissant avec l'Occludine. La catenine associée à l' α -actinine active la protéine ARP2/3 afin d'initier de nouveaux filaments d'actine. Plusieurs des protéines appartenant à cette plaque peuvent présenter une double localisation (dans les jonctions serrées et le noyau). Certains facteurs de transcription sont en lien étroit avec cette plaque. Un des exemples est le facteur de transcription ZONAB dont la localisation dépendra de son interaction avec ZO-1. Comme l'Ubinucléine, la distribution cellulaire du facteur de transcription ZONAB peut varier suivant la confluence cellulaire : à faible confluence, elle se localise dans le noyau et les jonctions serrées, à forte confluence, elle est exclusivement membranaire (Balda and Matter, 2000). Le réseau d'interactions supposées de l'Ubinucléine, nous amène à émettre l'hypothèse qu'elle fait partie de la plaque des jonctions serrées.

Nous avons ensuite mis en évidence deux autres partenaires de l'Ubinucléine : la chaîne lourde de la clathrine et 14.3.3 ϵ .

Les mécanismes d'endocytose vont réguler la composition lipidique et protéique de la membrane plasmique cellulaire. Ainsi, un renouvellement est mis en place permettant à tout moment d'informer la cellule à propos de son environnement et de réguler de nombreuses cascades de signalisation (Doherty and McMahon, 2009).

Il existe trois classes d'endocytose (figure 47):

- Mini et macropinocytose
- Dépendante de la clathrine
- Indépendante de la clathrine

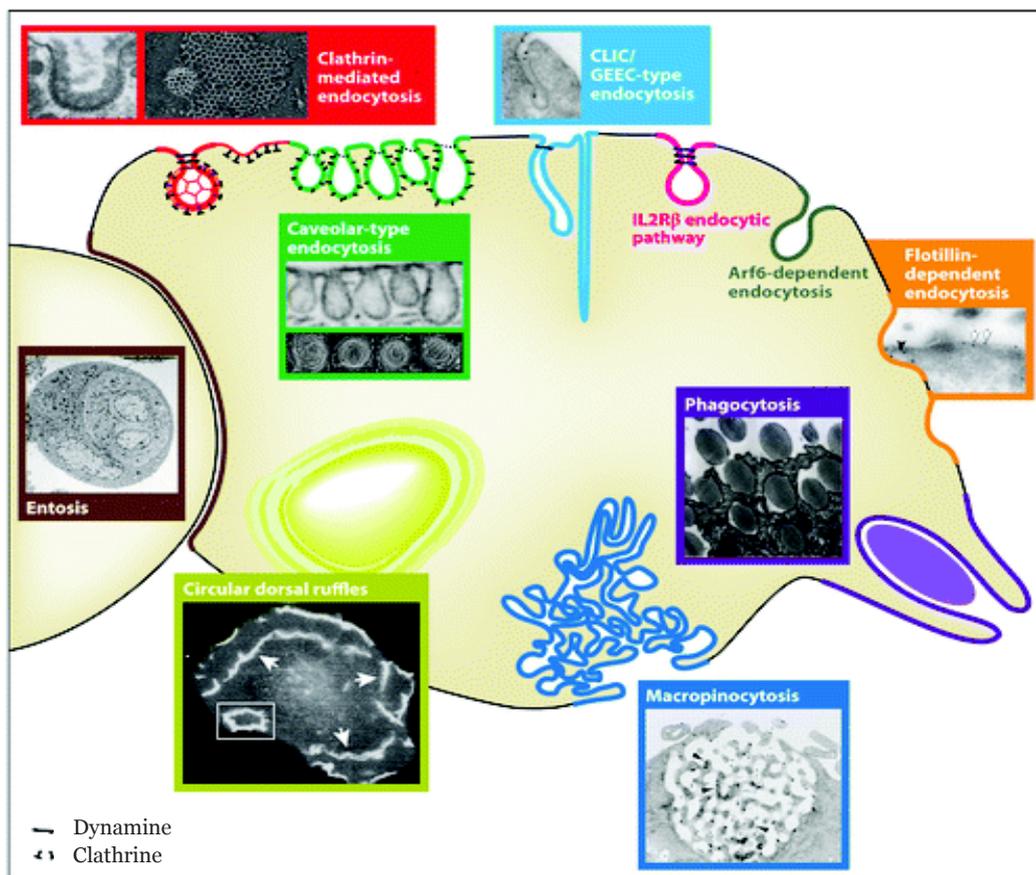


Figure 47 : Les différents modes d'endocytose

Il existe plusieurs voies d'endocytose dont la phagocytose, la macropinocytose, l'endocytose dépendante de la clathrine, l'endocytose médiée par la cavéoline, l'endocytose dépendante de la Flotilline. D'après G. J. Doherty et al., *Annu. Rev. Biochem* (2009), 78 : 857-902

Les mécanismes d'endocytose peuvent être utilisés par les virus afin d'entrer dans la cellule hôte. C'est le cas pour le virus Chikungunya (CHIKV) dont l'entrée dans la cellule se fait par endocytose sous la dépendance de l'Epsin-15, de Rab-5 et non de la clathrine (Bernard et al., 2010). L'Adénovirus, après fixation sur le récepteur cellulaire CAR (Coxsackie and Adenovirus Receptor), va suivre une voie endosomale durant laquelle se détacheront les fibres protéiques associées aux pentons liés à la capsid virale avant de suivre les microtubules pour rejoindre l'enveloppe nucléaire (Trotman et al., 2001).

La reconnaissance spécifique de l'Ubinucléine avec la clathrine nous a incités à déterminer si cette association était fonctionnelle dans la cellule. Le renouvellement des composés de la membrane plasmique se fait notamment par le recyclage des protéines membranaires et sous-membranaires par endocytose. Les protéines des jonctions serrées passent par ce phénomène. Un des types d'endocytose dépend de la voie clathrine. Nous avons montré que l'Ubinucléine empruntait la voie endosomale dépendante de la clathrine. Elle n'est pas la première protéine des jonctions serrées empruntant cette voie. En effet, c'est le cas de l'Occludine, protéine transmembranaire qui va être endocytée par cette voie, puis accumulée dans un compartiment particulier de la membrane basolatérale (Ivanov et al., 2004). La clathrine est composée d'un triple trimère de chaînes lourdes associées à des chaînes légères (Brodsky, 2012) (figure 48).

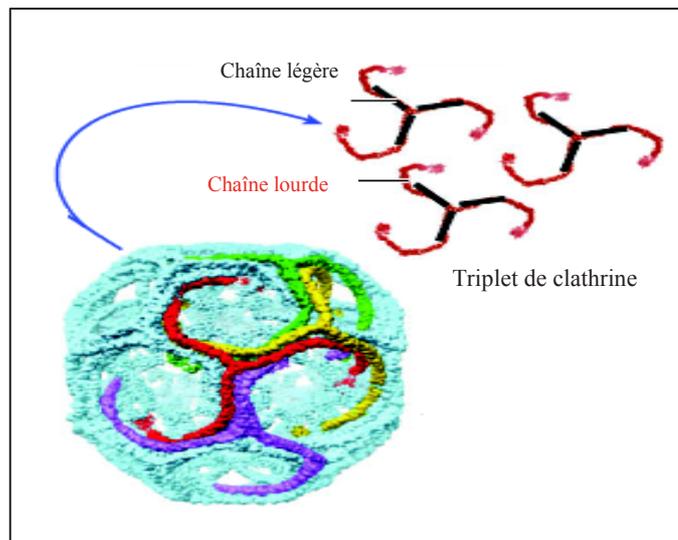


Figure 48 : Organisation des molécules de clathrine

La molécule est composée d'un triplet de clathrine (association d'une chaîne légère avec trois chaînes lourdes). Daprès F. M. Brodsky, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* (2012), 28 : 17.1–17.28

La molécule de clathrine, localisée dans le cytoplasme va être recrutée à la membrane cellulaire grâce à des protéines adaptatrices pour former un « manteau » (figure 49). La membrane va alors se déformer et former une vésicule qui renfermera les protéines présentes à la membrane. Une fois l'endosome précoce formé, les molécules de clathrine se détachent et peuvent être réutilisées pour une prochaine endocytose. Les protéines endocytées sont alors conduites vers les compartiments golgiens pour, en ayant été associées une nouvelle fois aux molécules de clathrine, être relocalisées à la membrane ou vers le phagolysosome (soit en tant que protéine associée, soit pour y être dégradée).

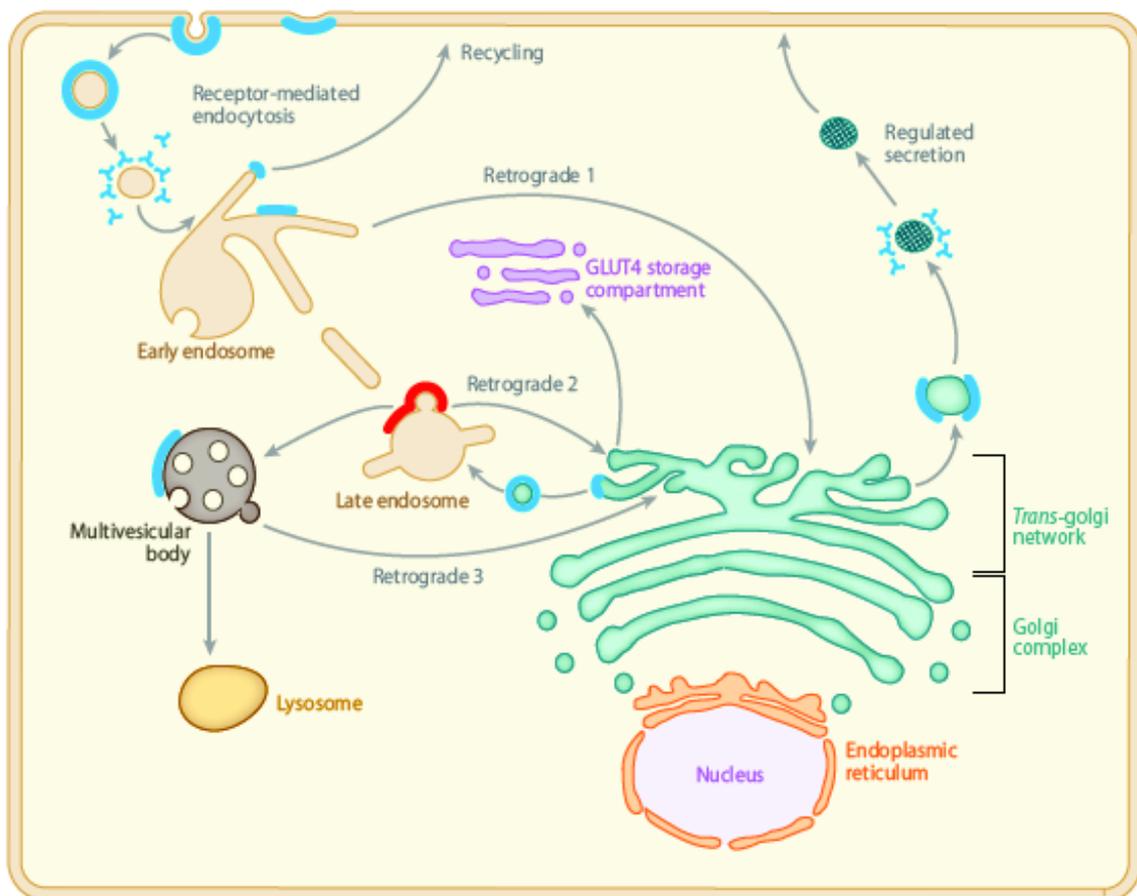


Figure 49 : Voie d'endocytose dépendante de la clathrine

Les étapes sont décrites précédemment dans le texte. D'après F. M. Brodsky, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* (2012), 28:17.1–17.28

Le cytosquelette (quand la force initiale est insuffisante) et les petites protéines G (familles Arf, Rab et Rho) vont jouer un rôle essentiel au cours du mécanisme d'endocytose. En effet, le couplage entre la membrane et le cytosquelette conduit à une invagination efficace de la vésicule d'endocytose. L'ensemble des protéines du cytosquelette (actine, microtubule et protéines motrices associées) recrutées par les protéines adaptatrices représentera le moteur et fournira la force nécessaire pour la formation et le transport des vésicules d'endocytose. Le lien entre les deux se fait grâce à des protéines comme celles de la famille Epsin ou HIP1R. Une étude indique que ces protéines sont ancrées à la membrane (par un domaine ENTH et ANTH) et aux filaments d'actine (par des domaines ACB et THATCH) (Skruzny et al., 2012). Parmi les protéines identifiées par spectrométrie de masse (Lupo et al., 2012), on trouve la protéine Epsin-1 qui est impliquée lors de l'endocytose dépendante de la clathrine. Ceci conforte les résultats indiquant une endocytose de l'Ubinucléine par la voie dépendante de la clathrine. Les protéines Rab1b, Rab11a et Rab7 ont également été identifiées. Rab1b est nécessaire pour le passage entre le réticulum endoplasmique et la vésicule golgienne. Rab11a va réguler le recyclage et Rab7 participe à l'organisation et la maturation de l'endosome tardif ainsi qu'à la fusion du phagosome avec le lysosome. De plus, Rab7A permet le recrutement de la dynéine et de la dynactine impliquées dans le transport par les microtubules (Johansson et al., 2007). Il est envisageable que l'Ubinucléine s'associe avec la protéine Rab11 lors de son recyclage par voie endosomale dépendante de la clathrine. Nous pourrions de plus, émettre l'hypothèse que l'Ubinucléine pourrait être dégradée par le phagolysosome ou participe à sa formation expliquant une interaction avec la protéine Rab7a. Cette hypothèse reste à explorer. Les fonctions des diverses protéines Rab GTPases sont illustrées dans la figure 50 (Stenmark, 2009).

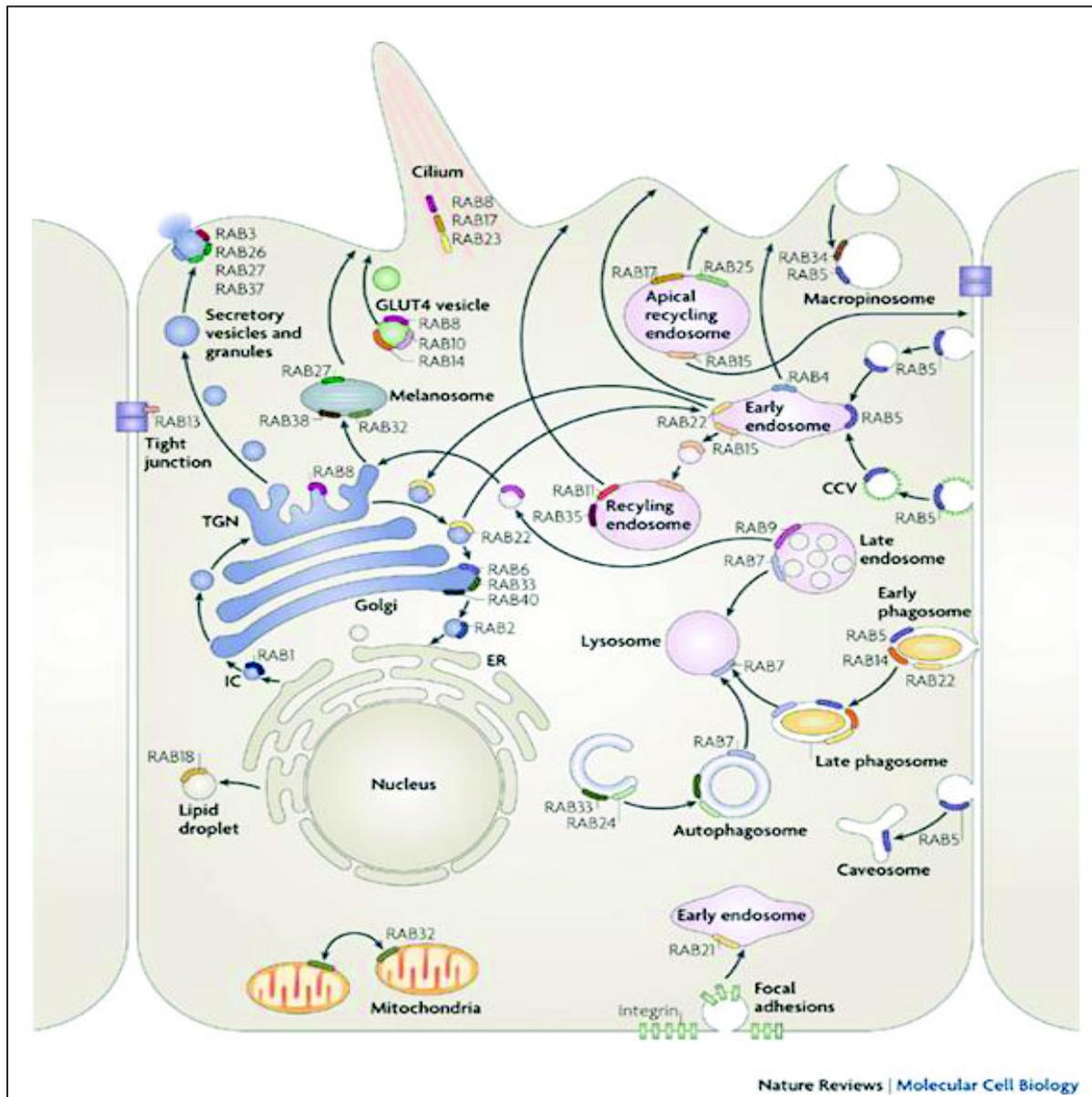


Figure 50 : Fonctions des RabGTPases dans le transport vésiculaire

RAB1, localisée dans le réticulum endoplasmique (ER) et le compartiment pré-golgien (IC), va médier le trafic ER–Golgi. RAB2, localisée au IC, peut aussi réguler le transport Golgi–ER. Localisée au niveau du golgi, RAB6, RAB33 and RAB40 régulent le transport intra-Golgien. RAB33, avec RAB24, régulent également la formation des autophagosomes. RAB8 participe au trafic constitutif du réseau *trans*-Golgien (TGN) à la membrane plasmique et participe aussi à la translocation des vésicules GLUT4 (avec RAB10 et RAB14) et la ciliogenèse (avec RAB17 et RAB23). RAB3, RAB26, RAB27 and RAB37 régulent de nombreux événements d'exocytose et RAB27 va médier la translocation des mélanosomes à la périphérie cellulaire. RAB32 et RAB38 sont impliquées dans la formation des mélanosomes et RAB32 contrôle aussi la fission mitochondriale. RAB13 régule l'assemblage des jonctions serrées. RAB22 va médier le trafic entre le TGN et l'endosome précoce. RAB5 est localisée dans les endosomes précoces, les phagosomes, les cavésomes et la membrane plasmique. Elle va médier l'endocytose, la fusion des vésicules associées à la clathrine (CCVs) avec l'endosome, la macropinocytose (avec RAB34) et la maturation des phagosomes précoces (avec RAB14 et RAB22). RAB21 régule l'endocytose *via* les intégrines. RAB11 et RAB35 vont médier le recyclage des endosomes, alors que RAB4 va médier directement le recyclage rapide à partir des endosomes précoces. RAB15 est impliqué dans le trafic entre les endosomes précoces aux endosomes en recyclage et dans le trafic des endosomes en recyclage à la membrane basolatérale. RAB17 et RAB25 contrôle le trafic à partir des endosomes en recyclage à la membrane plasmique apicale. RAB7, associée à l'endosome tardif, va médier la maturation des endosomes tardifs et des phagosomes ainsi que leur fusion avec les lysosomes. Une autre GTPase de l'endosome tardif, RAB9, va médier le trafic des endosomes tardifs au TGN. D'après H. Stenmark, Nature rev. (2009), 10 : 513-525

Nous avons vu que l'Ubiquitine interagit avec une protéine de la famille 14.3.3. La famille des protéines 14.3.3 intervient dans de nombreuses voies cellulaires. Des études protéomiques ont mis en évidence que les protéines 14.3.3 participent de manière importante à la régulation et à l'organisation du cytosquelette (Jin et al., 2004). Elles sont principalement localisées dans le cytoplasme mais rejoignent parfois le noyau cellulaire où sont présents de nombreux partenaires. Elles fixent leurs ligands en étant sous forme dimérique (figure 51).

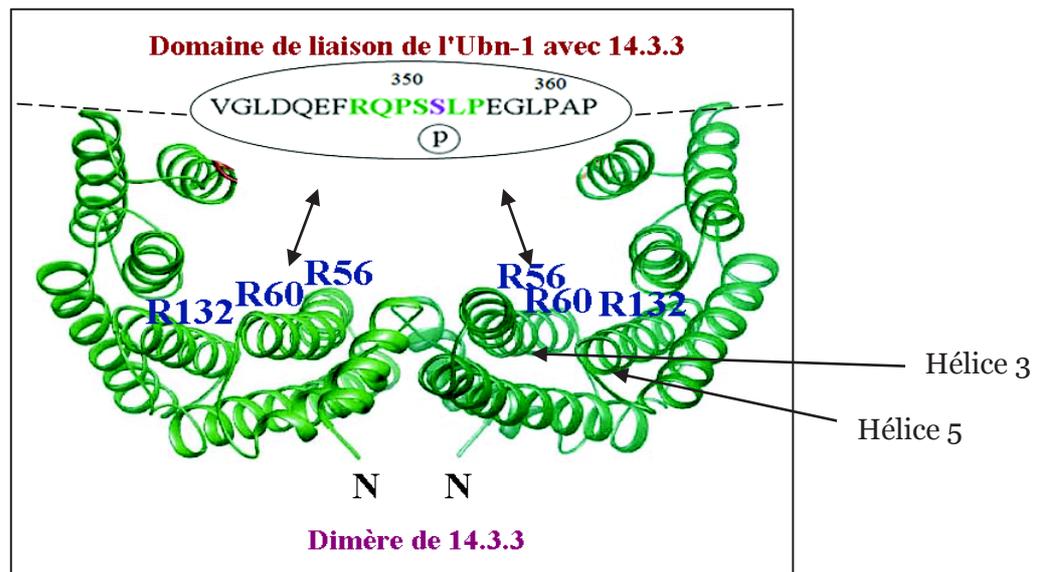


Figure 51 : Domaines impliqués dans l'interaction entre l'Ubiquitine et 14.3.3ε

La protéine 14.3.3 lie ses ligands quand elle est sous forme dimérique. Trois résidus (R56, R60, R132) sont importants pour l'interaction de l'Ubiquitine phosphorylée avec la protéine 14.3.3ε. D'après H. Hermeking, Nature Rev. (2003), 3 : 931-943

La phosphorylation de l'Ubiquitine est essentielle pour son interaction avec 14.3.3ε. Nous avons mis en évidence que l'Ubiquitine est phosphorylable par la PKA. De plus, les études par immunofluorescence et analyses biochimiques montrent que la localisation cellulaire de l'Ubiquitine varie suivant l'activité de la PKA. Il est démontré que la privation de calcium dans le milieu cellulaire entraîne une perturbation des jonctions serrées avec notamment une perte des protéines ZO-1, ZO-2 et Occludine (peut-être par endocytose) (Klingler et al., 2000). Il est important d'ajouter qu'aucune perturbation n'est observée quant à l'association de ces protéines avec le cytosquelette d'actine. L'effet de la privation calcique peut être contrecarrée par l'usage d'inhibiteur de la PKA (Klingler et al., 2000). Ces travaux soulignent donc l'implication de la PKA dans l'organisation des jonctions serrées. Lors de travaux réalisés en 2009 (Aho et al., 2009), l'Ubiquitine a été observée comme interagissant *in vitro* avec la protéine ZO-2 qui elle-même recrute l'α-PKC puis Rab13 et enfin la PKA au niveau

des jonctions serrées. C'est peut-être cette succession d'évènements qui conduirait à la phosphorylation de l'Ubinucléine par la PKA et à sa délocalisation dans le noyau. Cela reste à explorer. En revanche, il reste à déterminer s'il s'agit d'une délocalisation de la protéine ou une modification de son profil de transcription ou d'expression. Pour répondre à cette question, on pourrait envisager de bloquer la transcription par un traitement *via* l'Actinomycine D ou l'expression protéique par la Cycloheximide.

De façon intéressante, l'Ubinucléine se concentre dans des intersections des jonctions serrées (contacts entre trois cellules adjacentes) lorsque la PKA est inhibée. Cette distribution très particulière pourrait correspondre à des zones caractéristiques (figure 52) marquées par la présence d'une protéine des jonctions serrées : la Tricelluline (Ikenouchi et al., 2005; Ikenouchi et al., 2008).

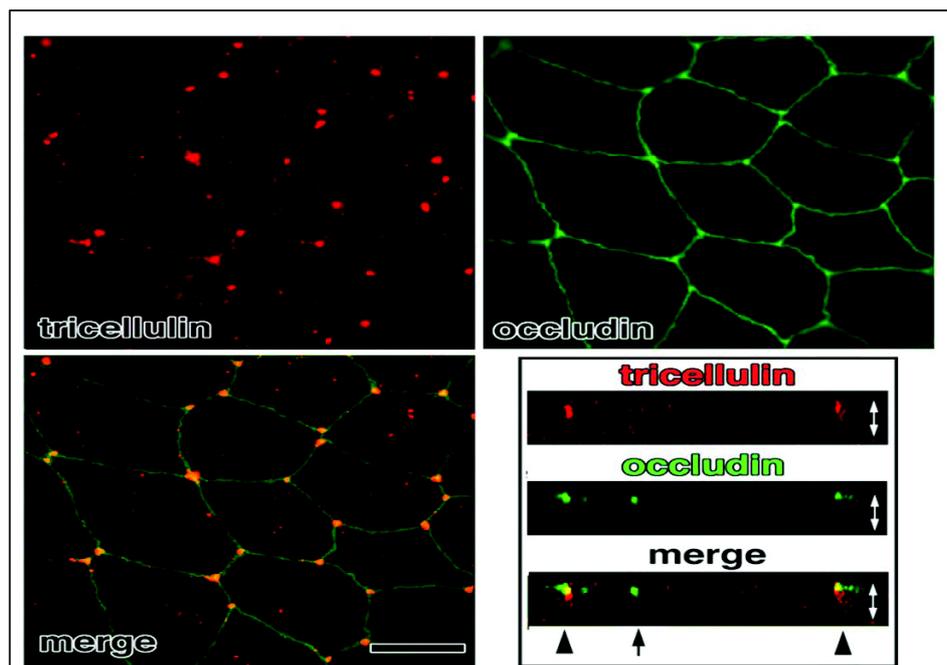


Figure 52 : Localisation cellulaire de la Tricelluline dans les cellules MDCK
 Images de microscopie confocale réalisées au niveau des contacts tricellulaires. Observation de la localisation de la Tricelluline (marquage en rouge) et de l'Occludine (marquage en vert).
 D'après J. Ikenouchi et al., J. Cell. Biol. (2005), 171(6) : 939-945

Cette protéine est concentrée au niveau des contacts tricellulaires et joue un rôle important dans le maintien de la barrière épithéliale. La Tricelluline peut être la cible des microorganismes qui vont chercher à déstabiliser les jonctions serrées afin d'infecter les

cellules épithéliales de l'hôte. C'est le cas de la bactérie *Shigella* (Fukumatsu et al., 2012). Cette bactérie a pour particularité de détourner le cytosquelette d'actine de la cellule pour former une « protusion » de pseudopode servant à atteindre mécaniquement la cellule voisine pour la contaminer à son tour (Dunn and Valdivia, 2010). Une équipe a découvert que les jonctions tricellulaires dont nous venons de parler sont les cibles de ces protusions (Fukumatsu et al., 2012). La Tricelluline va jouer un rôle important car, en son absence, la bactérie infecte les cellules voisines de manière moins efficace. De plus, la bactérie ciblerait cette zone car elle peut être le lieu de transfert membranaire entre deux cellules adjacentes par un processus d'endocytose (voie dépendante de la clathrine). En effet, la voie de signalisation PI3 kinase va être activée entraînant le recrutement des protéines Epsine-1 et Clathrine au niveau de la membrane du pseudopode. Le pseudopode renfermant la bactérie se dirige vers la cellule voisine puis, une fois arrivée, la bactérie entre *via* une endocytose dépendante de la clathrine. Ainsi, les jonctions serrées ne vont pas être altérées, mais détournées par la bactérie (Fukumatsu et al., 2012).

La localisation de la Tricelluline est dépendante d'une autre protéine des jonctions serrées, l'Occludine. En effet, la diminution ou la perte d'expression de l'Occludine amène à une mauvaise localisation de la Tricelluline (Ikenouchi et al., 2008). Nous n'avons pas observé de contact entre l'Ubinucléine et l'Occludine par co-immunoprécipitation (résultat non publié). En revanche, une colocalisation entre ces deux protéines a été observée par microscopie confocale (Aho et al., 2009). Nous pouvons imaginer, comme pour l'Occludine, que si l'expression de l'Ubinucléine est diminuée, la localisation de la Tricelluline pourrait être affectée. Nous pourrions également vérifier si l'Ubinucléine et la Tricelluline interagissent par co-immunoprécipitation.

D'autres protéines des jonctions serrées peuvent être sensibles à la PKA. Comme premier exemple, la Claudine-16 va agir sur la réabsorption des ions magnésium Mg^{2+} par les cellules épithéliales rénales (surtout si elle est associée avec la protéine ZO-1). Sa localisation dans les jonctions serrées est primordiale pour le transport transépithélial du Mg^{2+} . Lorsqu'elle est phosphorylée, elle va se localiser dans les jonctions serrées et cette phosphorylation a lieu *via* la PKA. L'utilisation d'inhibiteur de la PKA n'affecte pas le niveau transcriptionnel et d'expression de la Claudine-16. Cependant, elle va entraîner la dissociation de la Claudine-16 avec la protéine ZO-1 conduisant à sa délocalisation (Ikari et al., 2006).

Les protéines Claudine-3 et Claudine-5 sont également phosphorylées par cette kinase (D'Souza et al., 2005). A l'inverse des protéines Claudine-16 et Claudine-5, la

phosphorylation de la protéine Claudine-3 la conduit vers le cytoplasme (et non vers les jonctions serrées). La PKA affecte sa localisation cellulaire. En effet, l'usage d'inhibiteur de la PKA conduit à une séquestration de la protéine Claudine-1 dans le noyau. Un des schémas pouvant être proposé est le suivant : l'activation de la voie de signalisation PKC conduit à une forte expression de la Claudine-1 et lorsque cette dernière est suffisamment présente, la PKA va orchestrer son départ du noyau vers le cytoplasme (French et al., 2009). Lors d'étude dans les cas de mélanome, les cellules métastatiques présentent une forte expression de la protéine Claudine-1 cytoplasmique ou membranaire, corrélant avec une augmentation de la sécrétion de MMP2 (métalloprotéinase 2) de manière dépendante de la PKC et avec une meilleure capacité invasive de ces cellules. La PKA intervient aussi dans la localisation des protéines ZO (ZO-1 et ZO-2). La protéine Rab13 (protéine GTPase) est associée aux jonctions serrées et permet de réguler le recrutement des protéines ZO-1 et Claudine-1. Elle interagit directement avec la PKA, inhibant ainsi la phosphorylation de VASP (protéine remodelant l'actine) et son recrutement (accompagné de celui des protéines ZO-1 et Claudine-1) au niveau des jonctions serrées (Kohler et al., 2004). Le dernier exemple est celui de l'Occludine. En effet, la PKA affecte la localisation de l'Occludine. Comme la protéine Claudine-3, l'hyperphosphorylation de l'Occludine cause son départ vers le cytoplasme. Plus précisément, une première phosphorylation conduit l'Occludine vers les jonctions serrées, puis une phosphorylation supplémentaire la détache de ces jonctions (Kawedia et al., 2008). Les virus peuvent agir directement ou indirectement sur les protéines des jonctions serrées. Certains de leurs composés peuvent être un substrat pour la PKA. Certains virus développent des stratégies contrôlant ou utilisant cette protéine kinase et donc la fonction de certaines protéines des jonctions serrées. Il a été montré qu'au cours de l'infection par le rhesus monkey rotavirus (RRV), l'expression de l'Occludine est diminuée. Ce phénomène semble dépendant de la PKA car l'inhibition de cette dernière restaure la distribution de cette protéine (Beau et al., 2007). Le virus de l'hépatite C exploite aussi la voie de signalisation dépendante de cette protéine kinase pour favoriser son entrée. L'inhibition de la PKA induit de manière indirecte (peut-être par le biais de VASP) une réorganisation de la protéine Claudine-1 (protéine impliquée lors de l'entrée du virus) qui part de la membrane plasmique vers une vésicule intracellulaire. De plus, le pouvoir infectieux du virus est altéré lors du traitement par un inhibiteur de la PKA (Farquhar et al., 2008). Concernant les Herpèsvirus, HSV-1 (herpes simplex virus 1) a besoin de la protéine nucléaire ICP4 pour la transcription de ces gènes viraux. ICP4 possède une région riche en sérine potentiellement phosphorylable par la PKA qui va alors jouer un rôle dans la croissance et la réplication virale. Nous pouvons alors nous

demander quel impact la phosphorylation de l'Ubinucléine par la PKA peut avoir sur l'activation du cycle productif du virus d'Epstein-Barr ? Nous pourrions étudier l'activité transcriptionnelle de certains gènes viraux du cycle productif par RT-PCR voir Q-PCR au cours du traitement des cellules par l'inhibiteur de la PKA. Tester le potentiel infectieux du surnageant viral de cellules épithéliales positives pour le virus d'Epstein-Barr traitées avec l'inhibiteur pourrait donner également un élément de réponse.

A l'issue de ces travaux de thèse, cinq nouveaux partenaires de l'Ubinucléine ont été identifiés et confirmés (Lyric, Rack1, Cinguline, 14.3.3ε et la chaîne lourde de la clathrine). D'autres ont été identifiés par protéomique, plus en relation avec la plaque des jonctions serrées. Nous avons observé que l'Ubinucléine peut emprunter la voie d'endocytose dépendante de la clathrine et que sa localisation cellulaire peut être régulée par la PKA. Ces observations sont résumées dans la figure 53.

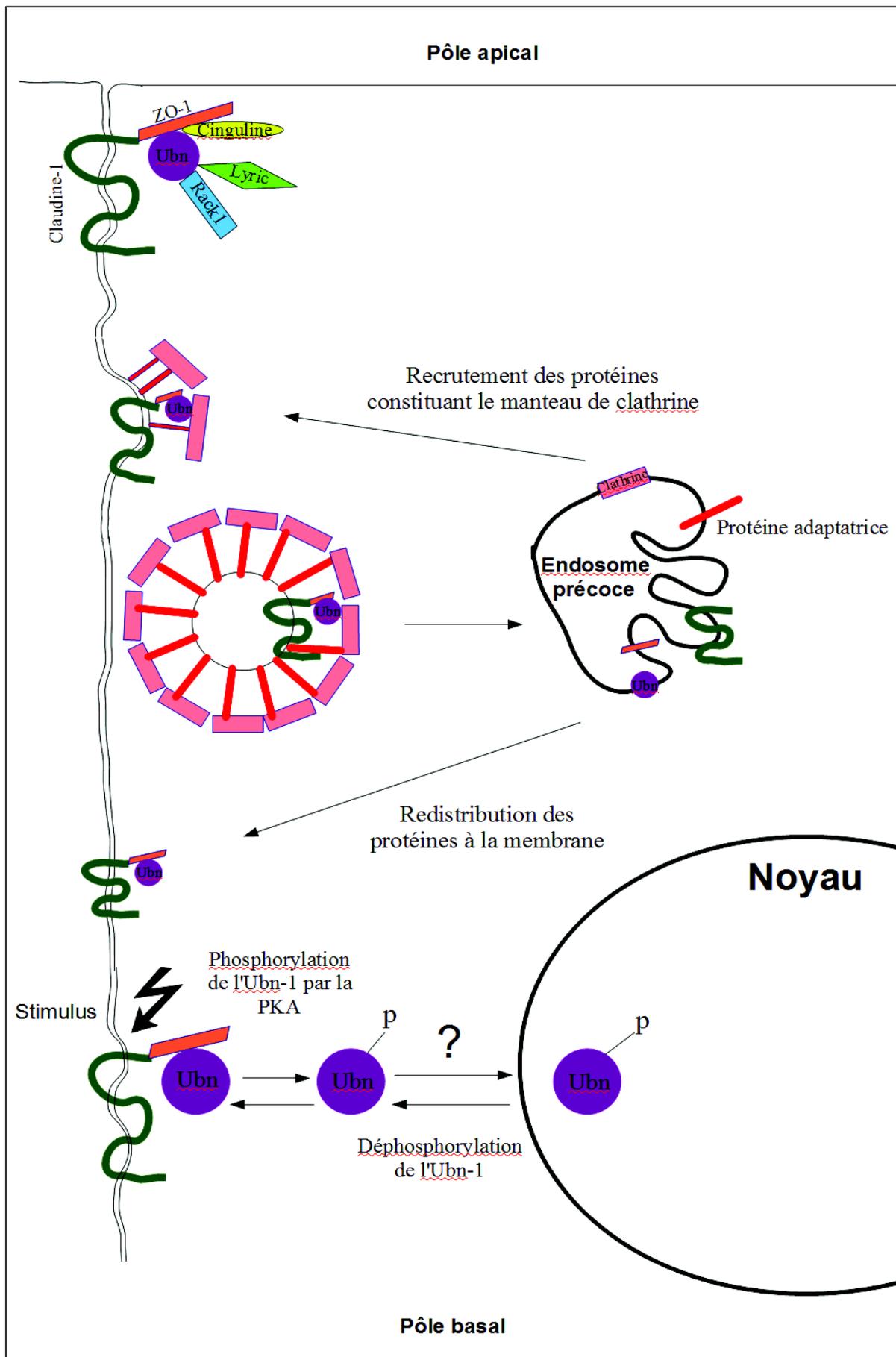


Figure 53 : Résumé de la caractérisation et l'étude fonctionnelle de l'Ubiquitine
 L'Ubiquitine interagit avec la Cinguline, Lyric et Rack1. L'Ubiquitine peut emprunter la voie d'endocytose dépendante de la clathrine. Sa localisation peut être régulée par la PKA.

Très récemment, une équipe Hollandaise a mis en évidence chez des souris mutées de façon aléatoire par des transposons (Maroteaux et al., 2012) que l'Ubinucléine pourrait avoir un rôle dans l'apprentissage. Une collaboration est en cours et permettra peut-être de mettre en évidence une nouvelle fonction de l'Ubinucléine.

Dans le second volet de mon travail, nous nous sommes intéressés à des composés pouvant bloquer le facteur de transcription EB1. Une des molécules testées *in vitro* semblerait posséder *in vivo* un effet inhibiteur sur la protéine EB1 et bloquerait précocement le cycle productif du virus. Afin d'améliorer la capacité et la spécificité de ce composé chimique, des études sont en cours de réalisation (C. Petosa, E. Manet, H. Gruffat). En perspective, parmi les molécules qui s'avèreront les plus efficaces, des analyses supplémentaires seront à entreprendre avec notamment le suivi du contrôle de l'expression de protéines virales tardives: gp350 (protéine enveloppe) et gp110 (ou Balf4, protéine de la capsid). Il sera nécessaire d'évaluer le caractère infectieux des particules virales produites lors de l'utilisation de ces molécules. Nous pourrions entreprendre une production de particules virales dans des lignées épithéliales positives pour le virus d'Epstein-Barr (carcinome du cavum avec les cellules Hone, HK ou carcinome gastrique avec les cellules AGS) et infecter des cellules B par les virions récoltés dans le surnageant des cellules épithéliales.

Nous pouvons nous demander si la molécule chimique étudiée serait efficace chez les patients et surtout comment et quand les traiter. Comme discuté lors de l'introduction, il nous faudrait envisager d'induire le cycle productif pour traiter les carcinomes et lymphomes associés au virus d'Epstein-Barr. On pourrait traiter les cas d'OHL qui ont pour particularité de présenter un cycle viral productif. Toutefois, nous nous posons la question de quand et combien de temps traiter les patients. Pourrions-nous l'employer en traitement préventif sans craindre l'apparition de résistance ? Peut-être que combiner cette molécule avec une seconde, inhibant une protéine du cycle latent serait à l'avenir envisageable et bénéfique.

Chen et son équipe (2011) ont élaboré et amélioré des peptides se liant à la protéine EB1 en vue d'inhiber son activité. Ils ont testé les degrés d'inhibition *in vitro* par la méthode

d'EMSA. Aucune analyse *in vivo* n'a été réalisée (Chen et al., 2011). Il est intéressant de noter que la molécule que nous avons testé (706811), outre son action sur un des gènes précoces (*bmrfl*), agit aussi sur le niveau d'EB1 dans les cellules testées. Une des explications envisageables est une altération de la boucle d'autoamplification d'EB1 par le composé chimique. Nous pouvons aussi mettre en cause la dimérisation d'EB1, nécessaire pour les facteurs de transcription de la famille bZip.

Lors de la recherche de traitements anti-herpétique, la première protéine virale ciblée fut la polymérase virale. Malgré une certaine efficacité de ces traitements, l'apparition de résistances devient de plus en plus fréquente. C'est pour cette raison que de nouvelles cibles doivent être envisagées afin d'élaborer de nouveaux traitements.

Afin de stopper l'initiation du cycle productif, deux cibles sont envisageables. Il s'agit des protéines virales EB1 et Rta. Les composés inhibant l'expression d'EB1 (l'acide moronique, C75 et Cerulenine) agissent de manière indirecte sur son activité. Mise à part l'acide moronique, les composés régulant négativement le facteur de transcription viral Rta interviennent indirectement. La voie de phosphorylation phosphatidylinositol 3-Kinase /AKT joue un rôle important dans la survie, la prolifération cellulaire et va réguler la transcription du gène *brfl1* codant la protéine Rta (Mori and Sairenji, 2006). L'inhibition chimique de la phosphorylation de AKT par la Pi3-Kinase conduit à une diminution d'expression des gènes codant les protéines virales Rta, BMRF1 et EA-D. Il est important de préciser qu'il s'agit d'une inhibition indirecte, non spécifique de Rta et que EB1 n'est pas affectée. Par ailleurs, Rta entraîne aussi une activation du gène cellulaire FAS (son produit est nécessaire pour la synthèse de palmitate) sous l'intervention de la protéine cellulaire P38. Cette activation du gène Fas permet une induction du cycle productif plus efficace (Li et al., 2004). C'est pour cette raison que des inhibiteurs de Fas ont été recherchés. Leur utilisation (composés C75 et Cerulenine) bloque l'induction de EB1 par Rta et inversement. La cascade autorégulatrice n'est plus possible et bloque l'effet synergique nécessaire pour induire les gènes précoces du cycle productif comme *bmrfl* dans les cellules de carcinome gastrique positive pour le virus d'Epstein-Barr (AGS).

Les protéines du cycle viral latent sont également des candidats potentiels et éviterait la nécessité de déclencher le cycle productif. La protéine LMP-1 ne permettrait pas un traitement large de toutes les pathologies associées au virus d'Epstein-Barr car elle n'est pas exprimée dans tous les cas (carcinomes gastrique et du cavum). Des molécules ciblant la protéine virale EBNA-1 ont été développées sachant que cette protéine virale est exprimée

dans la majorité des pathologies et qu'elle ne possède pas de similarité structurale avec des protéines cellulaires (Li et al., 2010). La dimérisation de la protéine virale EBNA-1 est essentielle pour son association avec l'ADN et donc son activité lors de la réplication virale. La molécule EiK1 et le peptide P85 (correspondant à la région 560-574 de la protéine virale EBNA-1) va éviter cette dimérisation. Cela apporte des pistes et peut conduire à des essais *in vivo*. EBNA-2 est importante dans le processus d'immortalisation du lymphocyte B où son interaction avec la protéine cellulaire CBF1 est indispensable. Dans le but d'agir contre cette protéine virale, un peptide correspondant à une partie de la protéine CBF1 (C-promoter binding factor 1) en interaction avec EBNA-2 a été découvert (Farrell et al., 2004). Il entrera en compétition avec la protéine CBF1 endogène vis-à-vis de la protéine virale EBNA-2. Pour être délivrée dans la cellule, une fusion avec le domaine de transduction de la protéine TAT du VIH, qui possède une certaine toxicité, a été nécessaire (Farrell et al., 2004). Il en est de même pour la protéine virale EBNA-3C (Knight et al., 2006). Pour le moment, nous n'avons pas de recul à propos de l'apparition de résistance vis-à-vis de molécules ciblant les protéines virales du cycle latent, mais nous pourrions envisager de les combiner avec un traitement ciblant une protéine virale du cycle productif.

Nous pourrions aussi envisager de cibler des protéines cellulaires impliquées dans l'établissement et la progression des tumeurs. Bien évidemment, le choix de cette cible est compliqué car ce traitement non spécifique du virus peut conduire à des effets secondaires importants. Les cancers du cavum associés au virus d'Epstein-Barr sont très souvent diagnostiqués à un stade avancé. Des travaux mettent en avant l'implication de l'oncoprotéine Jab1/CSN5 (constitutive photomorphogenic 9 signalosome subunit 5). Elle pourrait bien être une cible thérapeutique intéressante pour traiter les patients atteints de cancer du cavum (Pan and Claret, 2012).

Références

- Adamson, A.L., Darr, D., Holley-Guthrie, E., Johnson, R.A., Mauser, A., Swenson, J. and Kenney, S., 2000. Epstein-Barr virus immediate-early proteins BZLF1 and BRLF1 activate the ATF2 transcription factor by increasing the levels of phosphorylated p38 and c-Jun N-terminal kinases, Vol. 74.
- Adler, B., Schaadt, E., Kempkes, B., Zimmer-Strobl, U., Baier, B. and Bornkamm, G.W., 2002. Control of Epstein-Barr virus reactivation by activated CD40 and viral latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 437-42.
- Aho, S., Buisson, M., Pajunen, T., Ryoo, Y.W., Giot, J.F., Gruffat, H., Sergeant, A. and Uitto, J., 2000. Ubinuclein, a novel nuclear protein interacting with cellular and viral transcription factors. *J Cell Biol* 148, 1165-76.
- Aho, S., Lupo, J., Coly, P.A., Sabine, A., Castellazzi, M., Morand, P., Sergeant, A., Manet, E., Boyer, V. and Gruffat, H., 2009. Characterization of the ubinuclein protein as a new member of the nuclear and adhesion complex components (NACos). *Biol Cell* 101, 319-34.
- Aho, S., Rothenberger, K., Tan, E.M., Ryoo, Y.W., Cho, B.H., McLean, W.H. and Uitto, J., 1999. Human periplakin: genomic organization in a clonally unstable region of chromosome 16p with an abundance of repetitive sequence elements. *Genomics* 56, 160-8.
- Aijaz, S., Balda, M.S. and Matter, K., 2006. Tight junctions: molecular architecture and function. *Int Rev Cytol* 248, 261-98.
- Amon, W. and Farrell, P.J., 2005. Reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *Rev Med Virol* 15, 149-56.
- Anderson, R.C., Cookson, A.L., McNabb, W.C., Park, Z., McCann, M.J., Kelly, W.J. and Roy, N.C., 2010. *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiol* 10, 316.
- Archin, N.M., Keedy, K.S., Espeseth, A., Dang, H., Hazuda, D.J. and Margolis, D.M., 2009. Expression of latent human immunodeficiency type 1 is induced by novel and selective histone deacetylase inhibitors. *Aids* 23, 1799-806.
- Asai, R., Kato, A., Kato, K., Kanamori-Koyama, M., Sugimoto, K., Sairenji, T., Nishiyama, Y. and Kawaguchi, Y., 2006. Epstein-Barr virus protein kinase BGLF4 is a virion tegument protein that dissociates from virions in a phosphorylation-dependent process and phosphorylates the viral immediate-early protein BZLF1. *J Virol* 80, 5125-34.
- Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P.J., Gibson, T.J., Hatfull, G., Hudson, G.S., Satchwell, S.C., Seguin, C. and et al., 1984. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 310, 207-11.
- Bai, L., Zhang, Z., Zhang, H., Li, X., Yu, Q., Lin, H. and Yang, W., 2008. HIV-1 Tat protein alter the tight junction integrity and function of retinal pigment epithelium: an in vitro study. *BMC Infect Dis* 8, 77.
- Bailey, S.G., Verrall, E., Schelcher, C., Rhie, A., Doherty, A.J. and Sinclair, A.J., 2009. Functional interaction between Epstein-Barr virus replication protein Zta and host DNA damage response protein 53BP1. *J Virol* 83, 11116-22.
- Balda, M.S. and Matter, K., 2000. The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *Embo J* 19, 2024-33.
- Banumathy, G., Somaiah, N., Zhang, R., Tang, Y., Hoffmann, J., Andrade, M., Ceulemans, H., Schultz, D., Marmorstein, R. and Adams, P.D., 2009. Human UBN1 is an ortholog of yeast Hpc2p and has an essential role in the HIRA/ASF1a chromatin-remodeling pathway in senescent cells. *Mol Cell Biol* 29, 758-70.

- Barton, E.S., Forrest, J.C., Connolly, J.L., Chappell, J.D., Liu, Y., Schnell, F.J., Nusrat, A., Parkos, C.A. and Dermody, T.S., 2001. Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell* 104, 441-51.
- Baumann, M., Gires, O., Kolch, W., Mischak, H., Zeidler, R., Pich, D. and Hammerschmidt, W., 2000. The PKC targeting protein RACK1 interacts with the Epstein-Barr virus activator protein BZLF1. *Eur J Biochem* 267, 3891-901.
- Baumann, M., Mischak, H., Dammeier, S., Kolch, W., Gires, O., Pich, D., Zeidler, R., Delecluse, H.J. and Hammerschmidt, W., 1998. Activation of the Epstein-Barr virus transcription factor BZLF1 by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced phosphorylation. *J Virol* 72, 8105-14.
- Bazzoni, G., Martinez-Estrada, O.M., Orsenigo, F., Cordenonsi, M., Citi, S. and Dejana, E., 2000. Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin. *J Biol Chem* 275, 20520-6.
- Beau, I., Cotte-Laffitte, J., Amsellem, R. and Servin, A.L., 2007. A protein kinase A-dependent mechanism by which rotavirus affects the distribution and mRNA level of the functional tight junction-associated protein, occludin, in human differentiated intestinal Caco-2 cells. *J Virol* 81, 8579-86.
- Benedicto, I., Molina-Jimenez, F., Barreiro, O., Maldonado-Rodriguez, A., Prieto, J., Moreno-Otero, R., Aldabe, R., Lopez-Cabrera, M. and Majano, P.L., 2008. Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum. *Hepatology* 48, 1044-53.
- Bernard, E., Solignat, M., Gay, B., Chazal, N., Higgs, S., Devaux, C. and Briant, L., 2010. Endocytosis of chikungunya virus into mammalian cells: role of clathrin and early endosomal compartments. *PLoS One* 5, e11479.
- Bertrand, K.A., Birmann, B.M., Chang, E.T., Spiegelman, D., Aster, J.C., Zhang, S.M. and Laden, F., 2010. A prospective study of Epstein-Barr virus antibodies and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 116, 3547-53.
- Betanzos, A., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., Azuara, E., Amerena, J. and Gonzalez-Mariscal, L., 2004. The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Exp Cell Res* 292, 51-66.
- Beyer, I., van Rensburg, R., Strauss, R., Li, Z., Wang, H., Persson, J., Yumul, R., Feng, Q., Song, H., Bartek, J., Fender, P. and Lieber, A., 2011. Epithelial junction opener JO-1 improves monoclonal antibody therapy of cancer. *Cancer Res* 71, 7080-90.
- Biron, K.K., 1991. Ganciclovir-resistant human cytomegalovirus clinical isolates; resistance mechanisms and in vitro susceptibility to antiviral agents. *Transplant Proc* 23, 162-7.
- Bollard, C.M., Gottschalk, S., Leen, A.M., Weiss, H., Straathof, K.C., Carrum, G., Khalil, M., Wu, M.F., Huls, M.H., Chang, C.C., Gresik, M.V., Gee, A.P., Brenner, M.K., Rooney, C.M. and Heslop, H.E., 2007. Complete responses of relapsed lymphoma following genetic modification of tumor-antigen presenting cells and T-lymphocyte transfer. *Blood* 110, 2838-45.
- Bonazzi, M. and Cossart, P., 2011. Impenetrable barriers or entry portals? The role of cell-cell adhesion during infection. *J Cell Biol* 195, 349-58.
- Bonnet, M., Guinebretiere, J.M., Kremmer, E., Grunewald, V., Benhamou, E., Contesso, G. and Joab, I., 1999. Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *J Natl Cancer Inst* 91, 1376-81.
- Bracken, C.P., Gregory, P.A., Kolesnikoff, N., Bert, A.G., Wang, J., Shannon, M.F. and Goodall, G.J., 2008. A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 68, 7846-54.
- Britt, D.E., Yang, D.F., Yang, D.Q., Flanagan, D., Callanan, H., Lim, Y.P., Lin, S.H. and Hixson, D.C., 2004. Identification of a novel protein, LYRIC, localized to tight junctions of polarized epithelial cells. *Exp Cell Res* 300, 134-48.
- Brodsky, F.M., 2012. Diversity of clathrin function: new tricks for an old protein. *Annu Rev Cell Dev Biol* 28, 309-36.

- Buettner, M., Lang, A., Tudor, C.S., Meyer, B., Cruchley, A., Barros, M.H., Farrell, P.J., Jack, H.M., Schuh, W. and Niedobitek, G., 2012. Lytic Epstein-Barr virus infection in epithelial cells but not in B-lymphocytes is dependent on Blimp1. *J Gen Virol* 93, 1059-64.
- Cai, X., Schafer, A., Lu, S., Bilello, J.P., Desrosiers, R.C., Edwards, R., Raab-Traub, N. and Cullen, B.R., 2006. Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS Pathog* 2, e23.
- Calderwood, M.A., Holthaus, A.M. and Johannsen, E., 2008. The Epstein-Barr virus LF2 protein inhibits viral replication. *J Virol* 82, 8509-19.
- Caldwell, R.G., Wilson, J.B., Anderson, S.J. and Longnecker, R., 1998. Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* 9, 405-11.
- Cao, X.X., Xu, J.D., Xu, J.W., Liu, X.L., Cheng, Y.Y., Li, Q.Q., Xu, Z.D. and Liu, X.P., 2011. RACK1 promotes breast carcinoma migration/metastasis via activation of the RhoA/Rho kinase pathway. *Breast Cancer Res Treat* 126, 555-63.
- Cayrol, C. and Flemington, E.K., 1996. The Epstein-Barr virus bZIP transcription factor Zta causes G0/G1 cell cycle arrest through induction of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Embo J* 15, 2748-59.
- Cerejido, M., Contreras, R.G., Shoshani, L., Flores-Benitez, D. and Larre, I., 2008. Tight junction and polarity interaction in the transporting epithelial phenotype. *Biochim Biophys Acta* 1778, 770-93.
- Chan, A.T., Tao, Q., Robertson, K.D., Flinn, I.W., Mann, R.B., Klencke, B., Kwan, W.H., Leung, T.W., Johnson, P.J. and Ambinder, R.F., 2004. Azacitidine induces demethylation of the Epstein-Barr virus genome in tumors. *J Clin Oncol* 22, 1373-81.
- Chang, F.R., Hsieh, Y.C., Chang, Y.F., Lee, K.H., Wu, Y.C. and Chang, L.K., 2010. Inhibition of the Epstein-Barr virus lytic cycle by moronic acid. *Antiviral Res* 85, 490-5.
- Chang, L.K., Chuang, J.Y., Nakao, M. and Liu, S.T., 2010. MCAF1 and synergistic activation of the transcription of Epstein-Barr virus lytic genes by Rta and Zta. *Nucleic Acids Res* 38, 4687-700.
- Chang, L.K., Wei, T.T., Chiu, Y.F., Tung, C.P., Chuang, J.Y., Hung, S.K., Li, C. and Liu, S.T., 2003. Inhibition of Epstein-Barr virus lytic cycle by (-)-epigallocatechin gallate. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 1062-8.
- Chang, Y., Chang, S.S., Lee, H.H., Doong, S.L., Takada, K. and Tsai, C.H., 2004. Inhibition of the Epstein-Barr virus lytic cycle by Zta-targeted RNA interference. *J Gen Virol* 85, 1371-9.
- Chen, H., Lee, J.M., Zong, Y., Borowitz, M., Ng, M.H., Ambinder, R.F. and Hayward, S.D., 2001. Linkage between STAT regulation and Epstein-Barr virus gene expression in tumors. *J Virol* 75, 2929-37.
- Chen, T.S., Reinke, A.W. and Keating, A.E., 2011. Design of peptide inhibitors that bind the bZIP domain of Epstein-Barr virus protein BZLF1. *J Mol Biol* 408, 304-20.
- Chen, Y.L., Chen, Y.J., Tsai, W.H., Ko, Y.C., Chen, J.Y. and Lin, S.F., 2009. The Epstein-Barr virus replication and transcription activator, Rta/BRLF1, induces cellular senescence in epithelial cells. *Cell Cycle* 8, 58-65.
- Chene, A., Donati, D., Guerreiro-Cacais, A.O., Levitsky, V., Chen, Q., Falk, K.I., Orem, J., Kironde, F., Wahlgren, M. and Bejarano, M.T., 2007. A molecular link between malaria and Epstein-Barr virus reactivation. *PLoS Pathog* 3, e80.
- Chien, Y.C., Chen, J.Y., Liu, M.Y., Yang, H.I., Hsu, M.M., Chen, C.J. and Yang, C.S., 2001. Serologic markers of Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma in Taiwanese men. *N Engl J Med* 345, 1877-82.
- Choy, E.Y., Siu, K.L., Kok, K.H., Lung, R.W., Tsang, C.M., To, K.F., Kwong, D.L., Tsao, S.W. and Jin, D.Y., 2008. An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. *J Exp Med* 205, 2551-60.
- Citi, S. and Cordenosi, M., 1998. Tight junction proteins. *Biochim Biophys Acta* 1448, 1-11.
- Coen, D.M. and Schaffer, P.A., 1980. Two distinct loci confer resistance to acycloguanosine in herpes simplex virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 2265-9.

- Cohen, C.J., Shieh, J.T., Pickles, R.J., Okegawa, T., Hsieh, J.T. and Bergelson, J.M., 2001. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15191-6.
- Coller, K.E., Berger, K.L., Heaton, N.S., Cooper, J.D., Yoon, R. and Randall, G., 2009. RNA interference and single particle tracking analysis of hepatitis C virus endocytosis. *PLoS Pathog* 5, e1000702.
- Cox, M.A., Leahy, J. and Hardwick, J.M., 1990. An enhancer within the divergent promoter of Epstein-Barr virus responds synergistically to the R and Z transactivators. *J Virol* 64, 313-21.
- Coyne, C.B. and Bergelson, J.M., 2006. Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell* 124, 119-31.
- Coyne, C.B., Shen, L., Turner, J.R. and Bergelson, J.M., 2007. Coxsackievirus entry across epithelial tight junctions requires occludin and the small GTPases Rab34 and Rab5. *Cell Host Microbe* 2, 181-92.
- D'Souza, T., Agarwal, R. and Morin, P.J., 2005. Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. *J Biol Chem* 280, 26233-40.
- Decaussin, G., Sbih-Lammali, F., de Turenne-Tessier, M., Bouguermouh, A. and Ooka, T., 2000. Expression of BARF1 gene encoded by Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma biopsies. *Cancer Res* 60, 5584-8.
- Doherty, G.J. and McMahon, H.T., 2009. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem* 78, 857-902.
- Dunn, J.D. and Valdivia, R.H., 2010. Uncivil engineers: Chlamydia, Salmonella and Shigella alter cytoskeleton architecture to invade epithelial cells. *Future Microbiol* 5, 1219-32.
- Ebnet, K., Suzuki, A., Ohno, S. and Vestweber, D., 2004. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci* 117, 19-29.
- El-Guindy, A.S., Heston, L., Endo, Y., Cho, M.S. and Miller, G., 2002. Disruption of Epstein-Barr virus latency in the absence of phosphorylation of ZEBRA by protein kinase C. *J Virol* 76, 11199-208.
- El-Guindy, A.S., Paek, S.Y., Countryman, J. and Miller, G., 2006. Identification of constitutive phosphorylation sites on the Epstein-Barr virus ZEBRA protein. *J Biol Chem* 281, 3085-95.
- Ellis-Connell, A.L., Iempridee, T., Xu, I. and Mertz, J.E., 2010. Cellular microRNAs 200b and 429 regulate the Epstein-Barr virus switch between latency and lytic replication. *J Virol* 84, 10329-43.
- Ellis, A.L., Wang, Z., Yu, X. and Mertz, J.E., 2010. Either ZEB1 or ZEB2/SIP1 can play a central role in regulating the Epstein-Barr virus latent-lytic switch in a cell-type-specific manner. *J Virol* 84, 6139-52.
- Epstein, M.A., Achong, B.G. and Barr, Y.M., 1964. Virus Particles In Cultured Lymphoblasts From Burkitt's Lymphoma. *Lancet* 1, 702-3.
- Evans, M.J., von Hahn, T., Tschernie, D.M., Syder, A.J., Panis, M., Wolk, B., Hatziioannou, T., McKeating, J.A., Bieniasz, P.D. and Rice, C.M., 2007. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446, 801-5.
- Farquhar, M.J., Harris, H.J., Diskar, M., Jones, S., Mee, C.J., Nielsen, S.U., Brimacombe, C.L., Molina, S., Toms, G.L., Maurel, P., Howl, J., Herberg, F.W., van Ijzendoorn, S.C., Balfe, P. and McKeating, J.A., 2008. Protein kinase A-dependent step(s) in hepatitis C virus entry and infectivity. *J Virol* 82, 8797-811.
- Farrell, C.J., Lee, J.M., Shin, E.C., Cebrat, M., Cole, P.A. and Hayward, S.D., 2004. Inhibition of Epstein-Barr virus-induced growth proliferation by a nuclear antigen EBNA2-TAT peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4625-30.
- Farrell, P.J., Rowe, D.T., Rooney, C.M. and Kouzarides, T., 1989. Epstein-Barr virus BZLF1 trans-activator specifically binds to a consensus AP-1 site and is related to c-fos. *Embo J* 8, 127-32.
- Feederle, R., Kost, M., Baumann, M., Janz, A., Drouet, E., Hammerschmidt, W. and Delecluse, H.J., 2000. The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators. *Embo J* 19, 3080-9.
- Feng, W.H., Hong, G., Delecluse, H.J. and Kenney, S.C., 2004. Lytic induction therapy for Epstein-Barr virus-positive B-cell lymphomas. *J Virol* 78, 1893-902.

- Feng, W.H., Israel, B., Raab-Traub, N., Busson, P. and Kenney, S.C., 2002. Chemotherapy induces lytic EBV replication and confers ganciclovir susceptibility to EBV-positive epithelial cell tumors. *Cancer Res* 62, 1920-6.
- Feng, W.H. and Kenney, S.C., 2006. Valproic acid enhances the efficacy of chemotherapy in EBV-positive tumors by increasing lytic viral gene expression. *Cancer Res* 66, 8762-9.
- Fingerroth, J.D., Weis, J.J., Tedder, T.F., Strominger, J.L., Biro, P.A. and Fearon, D.T., 1984. Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 4510-4.
- Fixman, E.D., Hayward, G.S. and Hayward, S.D., 1992. trans-acting requirements for replication of Epstein-Barr virus ori-Lyt. *J Virol* 66, 5030-9.
- Fixman, E.D., Hayward, G.S. and Hayward, S.D., 1995. Replication of Epstein-Barr virus oriLyt: lack of a dedicated virally encoded origin-binding protein and dependence on Zta in cotransfection assays. *J Virol* 69, 2998-3006.
- French, A.D., Fiori, J.L., Camilli, T.C., Leotlela, P.D., O'Connell, M.P., Frank, B.P., Subaran, S., Indig, F.E., Taub, D.D. and Weeraratna, A.T., 2009. PKC and PKA phosphorylation affect the subcellular localization of claudin-1 in melanoma cells. *Int J Med Sci* 6, 93-101.
- Fukumatsu, M., Ogawa, M., Arakawa, S., Suzuki, M., Nakayama, K., Shimizu, S., Kim, M., Mimuro, H. and Sasakawa, C., 2012. Shigella targets epithelial tricellular junctions and uses a noncanonical clathrin-dependent endocytic pathway to spread between cells. *Cell Host Microbe* 11, 325-36.
- Furuse, M., 2010. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S. and Tsukita, S., 1993. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123, 1777-88.
- Gallina, A., Rossi, F. and Milanese, G., 2001. Rack1 binds HIV-1 Nef and can act as a Nef-protein kinase C adaptor. *Virology* 283, 7-18.
- Germi, R., Effantin, G., Grossi, L., Ruigrok, R.W., Morand, P. and Schoehn, G., 2012. Three-dimensional structure of the Epstein-Barr virus capsid. *J Gen Virol* 93, 1769-73.
- Gershburg, E., Hong, K. and Pagano, J.S., 2004. Effects of maribavir and selected indolocarbazoles on Epstein-Barr virus protein kinase BGLF4 and on viral lytic replication. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 1900-3.
- Gires, O., Zimmer-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D. and Hammerschmidt, W., 1997. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *Embo J* 16, 6131-40.
- Gradoville, L., Kwa, D., El-Guindy, A. and Miller, G., 2002. Protein kinase C-independent activation of the Epstein-Barr virus lytic cycle. *J Virol* 76, 5612-26.
- Greber, U.F. and Gastaldelli, M., 2007. Junctional gating: the achilles' heel of epithelial cells in pathogen infection. *Cell Host Microbe* 2, 143-6.
- Greenspan, J.S., Greenspan, D., Lennette, E.T., Abrams, D.I., Conant, M.A., Petersen, V. and Freese, U.K., 1985. Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral "hairy" leukoplakia, an AIDS-associated lesion. *N Engl J Med* 313, 1564-71.
- Gruffat, H., Batisse, J., Pich, D., Neuhierl, B., Manet, E., Hammerschmidt, W. and Sergeant, A., 2002. Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 is essential for production of infectious virus. *J Virol* 76, 9635-44.
- Gruffat, H., Kadjouf, F., Mariame, B. and Manet, E., 2012. The Epstein-Barr virus BcRF1 gene product is a TBP-like protein with an essential role in late gene expression. *J Virol*.
- Gruffat, H., Lupo, J., Morand, P., Boyer, V. and Manet, E., 2011. The nuclear and adherent junction complex component protein ubinuclein negatively regulates the productive cycle of Epstein-Barr virus in epithelial cells. *J Virol* 85, 784-94.
- Gruffat, H., Manet, E., Rigolet, A. and Sergeant, A., 1990. The enhancer factor R of Epstein-Barr virus (EBV) is a sequence-specific DNA binding protein. *Nucleic Acids Res* 18, 6835-43.
- Gruffat, H., Manet, E. and Sergeant, A., 2002. MEF2-mediated recruitment of class II HDAC at the EBV immediate early gene BZLF1 links latency and chromatin remodeling. *EMBO Rep* 3, 141-6.

- Gu, A.D., Xie, Y.B., Mo, H.Y., Jia, W.H., Li, M.Y., Li, M., Chen, L.Z., Feng, Q.S., Liu, Q., Qian, C.N. and Zeng, Y.X., 2008. Antibodies against Epstein-Barr virus gp78 antigen: a novel marker for serological diagnosis of nasopharyngeal carcinoma detected by xMAP technology. *J Gen Virol* 89, 1152-8.
- Guillemot, L. and Citi, S., 2006. Cingulin regulates claudin-2 expression and cell proliferation through the small GTPase RhoA. *Mol Biol Cell* 17, 3569-77.
- Guttman, J.A. and Finlay, B.B., 2009. Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochim Biophys Acta* 1788, 832-41.
- Hammerschmidt, W. and Sugden, B., 1988. Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell* 55, 427-33.
- Hayes, D.P., Brink, A.A., Vervoort, M.B., Middeldorp, J.M., Meijer, C.J. and van den Brule, A.J., 1999. Expression of Epstein-Barr virus (EBV) transcripts encoding homologues to important human proteins in diverse EBV associated diseases. *Mol Pathol* 52, 97-103.
- Heilmann, A.M., Calderwood, M.A. and Johannsen, E., 2010. Epstein-Barr virus LF2 protein regulates viral replication by altering Rta subcellular localization. *J Virol* 84, 9920-31.
- Helgstrand, E., Eriksson, B., Johansson, N.G., Lannero, B., Larsson, A., Misiorny, A., Noren, J.O., Sjoberg, B., Stenberg, K., Stening, G., Stridh, S. and Oberg, B., 1978. Trisodium phosphonoformate, a new antiviral compound. *Science* 201, 819-21.
- Henderson, S., Huen, D., Rowe, M., Dawson, C., Johnson, G. and Rickinson, A., 1993. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8479-83.
- Hippocrate, A., Oussaief, L. and Joab, I., 2011. Possible role of EBV in breast cancer and other unusually EBV-associated cancers. *Cancer Lett* 305, 144-9.
- Holley-Guthrie, E.A., Quinlivan, E.B., Mar, E.C. and Kenney, S., 1990. The Epstein-Barr virus (EBV) BMRF1 promoter for early antigen (EA-D) is regulated by the EBV transactivators, BRLF1 and BZLF1, in a cell-specific manner. *J Virol* 64, 3753-9.
- Hong, G.K., Gulley, M.L., Feng, W.H., Delecluse, H.J., Holley-Guthrie, E. and Kenney, S.C., 2005. Epstein-Barr virus lytic infection contributes to lymphoproliferative disease in a SCID mouse model. *J Virol* 79, 13993-4003.
- Huen, D.S., Henderson, S.A., Croom-Carter, D. and Rowe, M., 1995. The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene* 10, 549-60.
- Hui, K.F. and Chiang, A.K., 2010. Suberoylanilide hydroxamic acid induces viral lytic cycle in Epstein-Barr virus-positive epithelial malignancies and mediates enhanced cell death. *Int J Cancer* 126, 2479-89.
- Huo, Q., Zhang, N. and Yang, Q., 2012. Epstein-Barr virus infection and sporadic breast cancer risk: a meta-analysis. *PLoS One* 7, e31656.
- Hutt-Fletcher, L.M. and Lake, C.M., 2001. Two Epstein-Barr virus glycoprotein complexes. *Curr Top Microbiol Immunol* 258, 51-64.
- Ikari, A., Matsumoto, S., Harada, H., Takagi, K., Hayashi, H., Suzuki, Y., Degawa, M. and Miwa, M., 2006. Phosphorylation of paracellin-1 at Ser217 by protein kinase A is essential for localization in tight junctions. *J Cell Sci* 119, 1781-9.
- Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S. and Tsukita, S., 2005. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 171, 939-45.
- Ikenouchi, J., Sasaki, H., Tsukita, S., Furuse, M. and Tsukita, S., 2008. Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol Biol Cell* 19, 4687-93.
- Imai, K., Inoue, H., Tamura, M., Cueno, M.E., Inoue, H., Takeichi, O., Kusama, K., Saito, I. and Ochiai, K., 2012. The periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* induces the Epstein-Barr virus lytic switch transactivator ZEBRA by histone modification. *Biochimie* 94, 839-46.
- Ivanov, A.I., Nusrat, A. and Parkos, C.A., 2004. Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. *Mol Biol Cell* 15, 176-88.
- Iwata, S., Saito, T., Ito, Y., Kamakura, M., Gotoh, K., Kawada, J., Nishiyama, Y. and Kimura, H., 2012. Antitumor activities of valproic acid on Epstein-Barr virus-associated T and natural killer lymphoma cells. *Cancer Sci* 103, 375-81.

- Janz, A., Oezel, M., Kurzeder, C., Mautner, J., Pich, D., Kost, M., Hammerschmidt, W. and Delecluse, H.J., 2000. Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. *J Virol* 74, 10142-52.
- Jin, J., Smith, F.D., Stark, C., Wells, C.D., Fawcett, J.P., Kulkarni, S., Metalnikov, P., O'Donnell, P., Taylor, P., Taylor, L., Zougman, A., Woodgett, J.R., Langeberg, L.K., Scott, J.D. and Pawson, T., 2004. Proteomic, functional, and domain-based analysis of in vivo 14-3-3 binding proteins involved in cytoskeletal regulation and cellular organization. *Curr Biol* 14, 1436-50.
- Johansson, M., Rocha, N., Zwart, W., Jordens, I., Janssen, L., Kuijl, C., Olkkonen, V.M. and Neefjes, J., 2007. Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor betalll spectrin. *J Cell Biol* 176, 459-71.
- Jones, K., Nourse, J., Corbett, G. and Gandhi, M.K., 2010. Sodium valproate in combination with ganciclovir induces lysis of EBV-infected lymphoma cells without impairing EBV-specific T-cell immunity. *Int J Lab Hematol* 32, e169-74.
- Jourdan, N., Jobart-Malfait, A., Dos Reis, G., Quignon, F., Piolot, T., Klein, C., Tramier, M., Coppey-Moisan, M. and Marechal, V., 2012. Live-cell imaging reveals multiple interactions between Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 and cellular chromatin during interphase and mitosis. *J Virol* 86, 5314-29.
- Jung, E.J., Lee, Y.M., Lee, B.L., Chang, M.S. and Kim, W.H., 2007. Lytic induction and apoptosis of Epstein-Barr virus-associated gastric cancer cell line with epigenetic modifiers and ganciclovir. *Cancer Lett* 247, 77-83.
- Kanegane, H., Wakiguchi, H., Kanegane, C., Kurashige, T. and Tosato, G., 1997. Viral interleukin-10 in chronic active Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis* 176, 254-7.
- Kavanagh, E., Buchert, M., Tsapara, A., Choquet, A., Balda, M.S., Hollande, F. and Matter, K., 2006. Functional interaction between the ZO-1-interacting transcription factor ZONAB/DbpA and the RNA processing factor symplekin. *J Cell Sci* 119, 5098-105.
- Kawedia, J.D., Jiang, M., Kulkarni, A., Waechter, H.E., Matlin, K.S., Pauletti, G.M. and Menon, A.G., 2008. The protein kinase A pathway contributes to Hg2+-induced alterations in phosphorylation and subcellular distribution of occludin associated with increased tight junction permeability of salivary epithelial cell monolayers. *J Pharmacol Exp Ther* 326, 829-37.
- Kennedy-Nasser, A.A., Hanley, P. and Bollard, C.M., 2011. Hodgkin disease and the role of the immune system. *Pediatr Hematol Oncol* 28, 176-86.
- Keon, B.H., Schafer, S., Kuhn, C., Grund, C. and Franke, W.W., 1996. Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein. *J Cell Biol* 134, 1003-18.
- Kieff, D.M., Rickinson, E., Knipe, A.B. and Howley, P.M., 2001. *Fields Virology* (4th Edition), 2511-2573.
- Klein, G., Geering, G., Old, L.J., Henle, G., Henle, W. and Clifford, P., 1970. Comparison of the anti-EBV titer and the EBV-associated membrane reactive and precipitating antibody levels in the sera of Burkitt lymphoma and nasopharyngeal carcinoma patients and controls. *Int J Cancer* 5, 185-94.
- Klingler, C., Kniesel, U., Bamforth, S.D., Wolburg, H., Engelhardt, B. and Risau, W., 2000. Disruption of epithelial tight junctions is prevented by cyclic nucleotide-dependent protein kinase inhibitors. *Histochem Cell Biol* 113, 349-61.
- Knight, J.S., Lan, K., Bajaj, B., Sharma, N., Tsai, D.E. and Robertson, E.S., 2006. A peptide-based inhibitor for prevention of B cell hyperproliferation induced by Epstein-Barr virus. *Virology* 354, 207-14.
- Kohler, K., Louvard, D. and Zahraoui, A., 2004. Rab13 regulates PKA signaling during tight junction assembly. *J Cell Biol* 165, 175-80.
- Kojima, F., Ishida, M., Takikita-Suzuki, M., Hotta, M., Katsura, K., Nagata, A., Enoki, Y., Kato, G. and Okabe, H., 2010. Claudin expression profiles in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma. *Oncol Rep* 23, 927-31.
- Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y. and Ochiya, T., 2010. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 285, 17442-52.

- Koster, J., Geerts, D., Favre, B., Borradori, L. and Sonnenberg, A., 2003. Analysis of the interactions between BP180, BP230, plectin and the integrin $\alpha 6\beta 4$ important for hemidesmosome assembly. *J Cell Sci* 116, 387-99.
- Kurokawa, M., Basnet, P., Ohsugi, M., Hozumi, T., Kadota, S., Namba, T., Kawana, T. and Shiraki, K., 1999. Anti-herpes simplex virus activity of moronic acid purified from *Rhus javanica* in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 289, 72-8.
- Kutok, J.L. and Wang, F., 2006. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol* 1, 375-404.
- Lake, C.M. and Hutt-Fletcher, L.M., 2000. Epstein-Barr virus that lacks glycoprotein gN is impaired in assembly and infection. *J Virol* 74, 11162-72.
- Lake, C.M., Molesworth, S.J. and Hutt-Fletcher, L.M., 1998. The Epstein-Barr virus (EBV) gN homolog BLRF1 encodes a 15-kilodalton glycoprotein that cannot be authentically processed unless it is coexpressed with the EBV gM homolog BBRF3. *J Virol* 72, 5559-64.
- Larrat, S., Morand, P., Bas, A., Vigne, S., Crance, J.M., Boyer, V., Nicod, S., Grossi, L., Buisson, M., Burmeister, W.P., Seigneurin, J.M. and Germi, R., 2009. Inhibition of Epstein-Barr virus replication by small interfering RNA targeting the Epstein-Barr virus protease gene. *Antivir Ther* 14, 655-62.
- Lechner, F., Sahrbacher, U., Suter, T., Frei, K., Brockhaus, M., Koedel, U. and Fontana, A., 2000. Antibodies to the junctional adhesion molecule cause disruption of endothelial cells and do not prevent leukocyte influx into the meninges after viral or bacterial infection. *J Infect Dis* 182, 978-82.
- Lee, S.K. and Longnecker, R., 1997. The Epstein-Barr virus glycoprotein 110 carboxy-terminal tail domain is essential for lytic virus replication. *J Virol* 71, 4092-7.
- Lei, K.I., Chan, L.Y., Chan, W.Y., Johnson, P.J. and Lo, Y.M., 2000. Quantitative analysis of circulating cell-free Epstein-Barr virus (EBV) DNA levels in patients with EBV-associated lymphoid malignancies. *Br J Haematol* 111, 239-46.
- Leinbach, S.S., Reno, J.M., Lee, L.F., Isbell, A.F. and Boezi, J.A., 1976. Mechanism of phosphonoacetate inhibition of herpesvirus-induced DNA polymerase. *Biochemistry* 15, 426-30.
- Levin, L.I., Munger, K.L., O'Reilly, E.J., Falk, K.I. and Ascherio, A., 2010. Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 67, 824-30.
- Li, N., Thompson, S., Schultz, D.C., Zhu, W., Jiang, H., Luo, C. and Lieberman, P.M., 2010. Discovery of selective inhibitors against EBNA1 via high throughput in silico virtual screening. *PLoS One* 5, e10126.
- Li, Y., Webster-Cyriaque, J., Tomlinson, C.C., Yohe, M. and Kenney, S., 2004. Fatty acid synthase expression is induced by the Epstein-Barr virus immediate-early protein BRLF1 and is required for lytic viral gene expression. *J Virol* 78, 4197-206.
- Liang, C.L., Chen, J.L., Hsu, Y.P., Ou, J.T. and Chang, Y.S., 2002. Epstein-Barr virus BZLF1 gene is activated by transforming growth factor-beta through cooperativity of Smads and c-Jun/c-Fos proteins. *J Biol Chem* 277, 23345-57.
- Liberto, M. and Cobrinik, D., 2000. Growth factor-dependent induction of p21(CIP1) by the green tea polyphenol, epigallocatechin gallate. *Cancer Lett* 154, 151-61.
- Ling, P.D., Hsieh, J.J., Ruf, I.K., Rawlins, D.R. and Hayward, S.D., 1994. EBNA-2 upregulation of Epstein-Barr virus latency promoters and the cellular CD23 promoter utilizes a common targeting intermediate, CBF1. *J Virol* 68, 5375-83.
- Linnstaedt, S.D., Gottwein, E., Skalsky, R.L., Luftig, M.A. and Cullen, B.R., 2010. Virally induced cellular microRNA miR-155 plays a key role in B-cell immortalization by Epstein-Barr virus. *J Virol* 84, 11670-8.
- Liu, D., Bienkowska, J., Petosa, C., Collier, R.J., Fu, H. and Liddington, R., 1995. Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature* 376, 191-4.
- Liu, Y., Nusrat, A., Schnell, F.J., Reaves, T.A., Walsh, S., Pochet, M. and Parkos, C.A., 2000. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci* 113 (Pt 13), 2363-74.

- Lo, Y.M., Chan, W.Y., Ng, E.K., Chan, L.Y., Lai, P.B., Tam, J.S. and Chung, S.C., 2001. Circulating Epstein-Barr virus DNA in the serum of patients with gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 7, 1856-9.
- Longnecker, R., 2000. Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence? *Adv Cancer Res* 79, 175-200.
- Luka, J., Kallin, B. and Klein, G., 1979. Induction of the Epstein-Barr virus (EBV) cycle in latently infected cells by n-butyrate. *Virology* 94, 228-31.
- Lupo, J., Conti, A., Sueur, C., Coly, P.A., Coute, Y., Hunziker, W., Burmeister, W.P., Germi, R., Manet, E., Gruffat, H., Morand, P. and Boyer, V., 2012. Identification of new interacting partners of the shuttling protein ubinuclein (Ubn-1). *Exp Cell Res* 318, 509-20.
- Ma, S.D., Hegde, S., Young, K.H., Sullivan, R., Rajesh, D., Zhou, Y., Jankowska-Gan, E., Burlingham, W.J., Sun, X., Gulley, M.L., Tang, W., Gumperz, J.E. and Kenney, S.C., 2011. A new model of Epstein-Barr virus infection reveals an important role for early lytic viral protein expression in the development of lymphomas. *J Virol* 85, 165-77.
- Macara, I.G., 2004. Par proteins: partners in polarization. *Curr Biol* 14, R160-2.
- Mahot, S., Fender, P., Vives, R.R., Caron, C., Perrissin, M., Gruffat, H., Sergeant, A. and Drouet, E., 2005. Cellular uptake of the EBV transcription factor EB1/Zta. *Virus Res* 110, 187-93.
- Manet, E., Allera, C., Gruffat, H., Mikaelian, I., Rigolet, A. and Sergeant, A., 1993. The acidic activation domain of the Epstein-Barr virus transcription factor R interacts in vitro with both TBP and TFIIB and is cell-specifically potentiated by a proline-rich region. *Gene Expr* 3, 49-59.
- Manet, E., Rigolet, A., Gruffat, H., Giot, J.F. and Sergeant, A., 1991. Domains of the Epstein-Barr virus (EBV) transcription factor R required for dimerization, DNA binding and activation. *Nucleic Acids Res* 19, 2661-7.
- Maroteaux, G., Loos, M., van der Sluis, S., Koopmans, B., Aarts, E., van Gassen, K., Geurts, A., Largaespada, D.A., Spruijt, B.M., Stiedl, O., Smit, A.B. and Verhage, M., 2012. High-throughput phenotyping of avoidance learning in mice discriminates different genotypes and identifies a novel gene. *Genes Brain Behav* 11, 772-784.
- Matsuura, H., Kirschner, A.N., Longnecker, R. and Jardetzky, T.S., 2010. Crystal structure of the Epstein-Barr virus (EBV) glycoprotein H/glycoprotein L (gH/gL) complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 22641-6.
- Mee, C.J., Harris, H.J., Farquhar, M.J., Wilson, G., Reynolds, G., Davis, C., van, I.S.C., Balfe, P. and McKeating, J.A., 2009. Polarization restricts hepatitis C virus entry into HepG2 hepatoma cells. *J Virol* 83, 6211-21.
- Meertens, L., Bertaux, C., Cukierman, L., Cormier, E., Lavillette, D., Cosset, F.L. and Dragic, T., 2008. The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *J Virol* 82, 3555-60.
- Meng, Q., Hagemeyer, S.R., Fingerroth, J.D., Gershburg, E., Pagano, J.S. and Kenney, S.C., 2010. The Epstein-Barr virus (EBV)-encoded protein kinase, EBV-PK, but not the thymidine kinase (EBV-TK), is required for ganciclovir and acyclovir inhibition of lytic viral production. *J Virol* 84, 4534-42.
- Milstone, A.M., Petrella, J., Sanchez, M.D., Mahmud, M., Whitbeck, J.C. and Bergelson, J.M., 2005. Interaction with coxsackievirus and adenovirus receptor, but not with decay-accelerating factor (DAF), induces A-particle formation in a DAF-binding coxsackievirus B3 isolate. *J Virol* 79, 655-60.
- Minoura-Etoh, J., Gotoh, K., Sato, R., Ogata, M., Kaku, N., Fujioka, T. and Nishizono, A., 2006. Helicobacter pylori-associated oxidant monochloramine induces reactivation of Epstein-Barr virus (EBV) in gastric epithelial cells latently infected with EBV. *J Med Microbiol* 55, 905-11.
- Mok, H., Cheng, X., Xu, Q., Zengel, J.R., Parhy, B., Zhao, J., Wang, C.K. and Jin, H., 2012. Evaluation of Measles Vaccine Virus as a Vector to Deliver Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein or Epstein-Barr Virus Glycoprotein gp350. *Open Virol J* 6, 12-22.
- Mori, T. and Sairenji, T., 2006. Functional role of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway on cell growth and lytic cycle of Epstein-Barr virus in the Burkitt's lymphoma cell line, P3HR-1. *Virus Genes* 32, 327-34.

- Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C. and Kieff, E., 1995. The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 80, 389-99.
- Murata, M., Kojima, T., Yamamoto, T., Go, M., Takano, K., Osanai, M., Chiba, H. and Sawada, N., 2005. Down-regulation of survival signaling through MAPK and Akt in occludin-deficient mouse hepatocytes in vitro. *Exp Cell Res* 310, 140-51.
- Murata, T., Kondo, Y., Sugimoto, A., Kawashima, D., Saito, S., Isomura, H., Kanda, T. and Tsurumi, T., 2012. Epigenetic histone modification of Epstein-Barr virus BZLF1 promoter during latency and reactivation in Raji cells. *J Virol* 86, 4752-61.
- Murata, T., Noda, C., Saito, S., Kawashima, D., Sugimoto, A., Isomura, H., Kanda, T., Yokoyama, K.K. and Tsurumi, T., 2011. Involvement of Jun dimerization protein 2 (JDP2) in the maintenance of Epstein-Barr virus latency. *J Biol Chem* 286, 22007-16.
- Nakamuta, S., Endo, H., Higashi, Y., Kousaka, A., Yamada, H., Yano, M. and Kido, H., 2008. Human immunodeficiency virus type 1 gp120-mediated disruption of tight junction proteins by induction of proteasome-mediated degradation of zonula occludens-1 and -2 in human brain microvascular endothelial cells. *J Neurovirol* 14, 186-95.
- Nava, P., Lopez, S., Arias, C.F., Islas, S. and Gonzalez-Mariscal, L., 2004. The rotavirus surface protein VP8 modulates the gate and fence function of tight junctions in epithelial cells. *J Cell Sci* 117, 5509-19.
- Neuhierl, B., Feederle, R., Hammerschmidt, W. and Delecluse, H.J., 2002. Glycoprotein gp110 of Epstein-Barr virus determines viral tropism and efficiency of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15036-41.
- Nicewonger, J., Suck, G., Bloch, D. and Swaminathan, S., 2004. Epstein-Barr virus (EBV) SM protein induces and recruits cellular Sp110b to stabilize mRNAs and enhance EBV lytic gene expression. *J Virol* 78, 9412-22.
- Nikitin, P.A., Yan, C.M., Forte, E., Bocedi, A., Tourigny, J.P., White, R.E., Allday, M.J., Patel, A., Dave, S.S., Kim, W., Hu, K., Guo, J., Tainter, D., Rusyn, E. and Luftig, M.A., 2010. An ATM/Chk2-mediated DNA damage-responsive signaling pathway suppresses Epstein-Barr virus transformation of primary human B cells. *Cell Host Microbe* 8, 510-22.
- Nunbhakdi-Craig, V., Craig, L., Machleidt, T. and Sontag, E., 2003. Simian virus 40 small tumor antigen induces deregulation of the actin cytoskeleton and tight junctions in kidney epithelial cells. *J Virol* 77, 2807-18.
- O'Brien, V., 1998. Viruses and apoptosis. *J Gen Virol* 79 (Pt 8), 1833-45.
- O'Nions, J. and Allday, M.J., 2003. Epstein-Barr virus can inhibit genotoxin-induced G1 arrest downstream of p53 by preventing the inactivation of CDK2. *Oncogene* 22, 7181-91.
- O'Nions, J. and Allday, M.J., 2004. Deregulation of the cell cycle by the Epstein-Barr virus. *Adv Cancer Res* 92, 119-86.
- Oberg, B., 1989. Antiviral effects of phosphonoformate (PFA, foscarnet sodium). *Pharmacol Ther* 40, 213-85.
- Pan, Y. and Claret, F.X., 2012. Targeting Jab1/CSN5 in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett.*
- Pan, Y., Zhang, J., Zhou, L., Zuo, J. and Zeng, Y., 2006. In vitro anti-tumor immune response induced by dendritic cells transfected with EBV-LMP2 recombinant adenovirus. *Biochem Biophys Res Commun* 347, 551-7.
- Paris, L., Tonutti, L., Vannini, C. and Bazzoni, G., 2008. Structural organization of the tight junctions. *Biochim Biophys Acta* 1778, 646-59.
- Pereira, L., Maidji, E., Tugizov, S. and Jones, T., 1995. Deletion mutants in human cytomegalovirus glycoprotein US9 are impaired in cell-cell transmission and in altering tight junctions of polarized human retinal pigment epithelial cells. *Scand J Infect Dis Suppl* 99, 82-7.
- Perron, H., Germi, R., Bernard, C., Garcia-Montojo, M., Deluen, C., Farinelli, L., Faucard, R., Veas, F., Stefas, I., Fabriek, B.O., Van-Horssen, J., Van-der-Valk, P., Gerdil, C., Mancuso, R., Saresella, M., Clerici, M., Marcel, S., Creange, A., Cavaretta, R., Caputo, D., Arru, G., Morand, P., Lang, A.B., Sotgiu, S., Ruprecht, K., Rieckmann, P., Villoslada, P., Chofflon, M., Boucraut, J., Pelletier, J. and Hartung, H.P., 2012. Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease. *Mult Scler*, 1-16.

- Petosa, C., Morand, P., Baudin, F., Moulin, M., Artero, J.B. and Muller, C.W., 2006. Structural basis of lytic cycle activation by the Epstein-Barr virus ZEBRA protein. *Mol Cell* 21, 565-72.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grasser, F.A., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., John, B., Enright, A.J., Marks, D., Sander, C. and Tuschl, T., 2004. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 304, 734-6.
- Ploss, A., Evans, M.J., Gaysinskaya, V.A., Panis, M., You, H., de Jong, Y.P. and Rice, C.M., 2009. Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457, 882-6.
- Raab-Traub, N. and Flynn, K., 1986. The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell* 47, 883-9.
- Ragoczy, T., Heston, L. and Miller, G., 1998. The Epstein-Barr virus Rta protein activates lytic cycle genes and can disrupt latency in B lymphocytes. *J Virol* 72, 7978-84.
- Ragoczy, T. and Miller, G., 1999. Role of the Epstein-Barr virus RTA protein in activation of distinct classes of viral lytic cycle genes. *J Virol* 73, 9858-66.
- Rai, T.S., Puri, A., McBryan, T., Hoffman, J., Tang, Y., Pchelintsev, N.A., van Tuyn, J., Marmorstein, R., Schultz, D.C. and Adams, P.D., 2011. Human CABIN1 is a functional member of the human HIRA/UBN1/ASF1a histone H3.3 chaperone complex. *Mol Cell Biol* 31, 4107-18.
- Rawlins, D.R., Milman, G., Hayward, S.D. and Hayward, G.S., 1985. Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell* 42, 859-68.
- Rickinson AB, K.E., 1996. *Fields Virology*, 2397-2446.
- Rickinson, A.B. and Kieff, E., 2007. *Fields Virology* (5th Edition).
- Riley, K.J., Rabinowitz, G.S., Yario, T.A., Luna, J.M., Darnell, R.B. and Steitz, J.A., 2012. EBV and human microRNAs co-target oncogenic and apoptotic viral and human genes during latency. *Embo J* 31, 2207-21.
- Ron, D., Chen, C.H., Caldwell, J., Jamieson, L., Orr, E. and Mochly-Rosen, D., 1994. Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 839-43.
- Rooney, C.M., Smith, C.A., Ng, C.Y., Loftin, S., Li, C., Krance, R.A., Brenner, M.K. and Heslop, H.E., 1995. Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet* 345, 9-13.
- Rothe, R., Liguori, L., Villegas-Mendez, A., Marques, B., Grunwald, D., Drouet, E. and Lenormand, J.L., 2010. Characterization of the cell-penetrating properties of the Epstein-Barr virus ZEBRA trans-activator. *J Biol Chem* 285, 20224-33.
- Ruan, Y., Sun, L., Hao, Y., Wang, L., Xu, J., Zhang, W., Xie, J., Guo, L., Zhou, L., Yun, X., Zhu, H., Shen, A. and Gu, J., 2012. Ribosomal RACK1 promotes chemoresistance and growth in human hepatocellular carcinoma. *J Clin Invest* 122, 2554-66.
- Runkle, E.A., Rice, S.J., Qi, J., Masser, D., Antonetti, D.A., Winslow, M.M. and Mu, D., 2012. Occludin is a direct target of thyroid transcription factor-1 (TTF-1/NKX2-1). *J Biol Chem*.
- Schaeffer, H.J., Beauchamp, L., de Miranda, P., Elion, G.B., Bauer, D.J. and Collins, P., 1978. 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature* 272, 583-5.
- Schnipper, L.E. and Crumpacker, C.S., 1980. Resistance of herpes simplex virus to acycloguanosine: role of viral thymidine kinase and DNA polymerase loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 2270-3.
- Sculley, T.B., Buck, M., Gabrielli, B., Parsons, P.G. and Krauer, K.G., 2002. A histone deacetylase inhibitor, azelaic bishydroxamic acid, shows cytotoxicity on Epstein-Barr virus transformed B-cell lines: a potential therapy for posttransplant lymphoproliferative disease. *Transplantation* 73, 271-9.
- Sengupta, J., Nilsson, J., Gursky, R., Spahn, C.M., Nissen, P. and Frank, J., 2004. Identification of the versatile scaffold protein RACK1 on the eukaryotic ribosome by cryo-EM. *Nat Struct Mol Biol* 11, 957-62.
- Sheng, W., Decaussin, G., Sumner, S. and Ooka, T., 2001. N-terminal domain of BARF1 gene encoded by Epstein-Barr virus is essential for malignant transformation of rodent fibroblasts and activation of BCL-2. *Oncogene* 20, 1176-85.

- Shieh, J.T. and Bergelson, J.M., 2002. Interaction with decay-accelerating factor facilitates coxsackievirus B infection of polarized epithelial cells. *J Virol* 76, 9474-80.
- Sinclair, A.J., Palmero, I., Peters, G. and Farrell, P.J., 1994. EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *Embo J* 13, 3321-8.
- Sitompul, L.S., Widodo, N., Djati, M.S. and Utomo, D.H., 2012. Epitope mapping of gp350/220 conserved domain of Epstein Barr virus to develop nasopharyngeal carcinoma (npc) vaccine. *Bioinformatics* 8, 479-82.
- Sivachandran, N., Dawson, C.W., Young, L.S., Liu, F.F., Middeldorp, J. and Frappier, L., 2012. Contributions of the Epstein-Barr virus EBNA1 protein to gastric carcinoma. *J Virol* 86, 60-8.
- Skruzny, M., Brach, T., Ciuffa, R., Rybina, S., Wachsmuth, M. and Kaksonen, M., 2012. Molecular basis for coupling the plasma membrane to the actin cytoskeleton during clathrin-mediated endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Smith, C., Cooper, L., Burgess, M., Rist, M., Webb, N., Lambley, E., Tellam, J., Marlton, P., Seymour, J.F., Gandhi, M. and Khanna, R., 2006. Functional reversion of antigen-specific CD8+ T cells from patients with Hodgkin lymphoma following in vitro stimulation with recombinant polyepitope. *J Immunol* 177, 4897-906.
- Smith, C., Tsang, J., Beagley, L., Chua, D., Lee, V., Li, V., Moss, D.J., Coman, W., Chan, K.H., Nicholls, J., Kwong, D. and Khanna, R., 2012. Effective treatment of metastatic forms of Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma with a novel adenovirus-based adoptive immunotherapy. *Cancer Res* 72, 1116-25.
- Smith, P.R., de Jesus, O., Turner, D., Hollyoake, M., Karstegl, C.E., Griffin, B.E., Karran, L., Wang, Y., Hayward, S.D. and Farrell, P.J., 2000. Structure and coding content of CST (BART) family RNAs of Epstein-Barr virus. *J Virol* 74, 3082-92.
- Snider, C.J., Cole, S.R., Chelimo, K., Sumba, P.O., Macdonald, P.D., John, C.C., Meshnick, S.R. and Moormann, A.M., 2012. Recurrent Plasmodium falciparum malaria infections in Kenyan children diminish T-cell immunity to Epstein Barr virus lytic but not latent antigens. *PLoS One* 7, e31753.
- Sorem, J. and Longnecker, R., 2009. Cleavage of Epstein-Barr virus glycoprotein B is required for full function in cell-cell fusion with both epithelial and B cells. *J Gen Virol* 90, 591-5.
- Stenmark, H., 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 513-25.
- Stevenson, B.R., Siliciano, J.D., Mooseker, M.S. and Goodenough, D.A., 1986. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 103, 755-66.
- Strockbine, L.D., Cohen, J.I., Farrah, T., Lyman, S.D., Wagener, F., DuBose, R.F., Armitage, R.J. and Spriggs, M.K., 1998. The Epstein-Barr virus BARF1 gene encodes a novel, soluble colony-stimulating factor-1 receptor. *J Virol* 72, 4015-21.
- Sugano, N., Chen, W., Roberts, M.L. and Cooper, N.R., 1997. Epstein-Barr virus binding to CD21 activates the initial viral promoter via NF-kappaB induction. *J Exp Med* 186, 731-7.
- Sun, X., Barlow, E.A., Ma, S., Hagemeyer, S.R., Duellman, S.J., Burgess, R.R., Tellam, J., Khanna, R. and Kenney, S.C., 2010. Hsp90 inhibitors block outgrowth of EBV-infected malignant cells in vitro and in vivo through an EBNA1-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3146-51.
- Sun, X. and Kenney, S.C., 2010. Hsp90 inhibitors: a potential treatment for latent EBV infection? *Cell Cycle* 9, 1665-6.
- Sutherland, H.G., Lam, Y.W., Briers, S., Lamond, A.I. and Bickmore, W.A., 2004. 3D3/lyric: a novel transmembrane protein of the endoplasmic reticulum and nuclear envelope, which is also present in the nucleolus. *Exp Cell Res* 294, 94-105.
- Tafazoli, F., Zeng, C.Q., Estes, M.K., Magnusson, K.E. and Svensson, L., 2001. NSP4 enterotoxin of rotavirus induces paracellular leakage in polarized epithelial cells. *J Virol* 75, 1540-6.
- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G. and Nakatani, Y., 2004. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* 116, 51-61.

- Takagaki, Y. and Manley, J.L., 2000. Complex protein interactions within the human polyadenylation machinery identify a novel component. *Mol Cell Biol* 20, 1515-25.
- Takase, K., Kelleher, C.A., Terada, N., Jones, J.F., Lucas, J.J. and Gelfand, E.W., 1996. Dissociation of EBV genome replication and host cell proliferation in anti-IgG-stimulated Akata cells. *Clin Immunol Immunopathol* 81, 168-74.
- Tang, Y., Poustovoitov, M.V., Zhao, K., Garfinkel, M., Canutescu, A., Dunbrack, R., Adams, P.D. and Marmorstein, R., 2006. Structure of a human ASF1a-HIRA complex and insights into specificity of histone chaperone complex assembly. *Nat Struct Mol Biol* 13, 921-9.
- Tang, Y., Puri, A., Ricketts, M.D., Rai, T.S., Hoffmann, J., Hoi, E., Adams, P.D., Schultz, D.C. and Marmorstein, R., 2012. Identification of an Ubinuclein 1 Region Required for Stability and Function of the Human HIRA/UBN1/CABIN1/ASF1a Histone H3.3 Chaperone Complex. *Biochemistry* 51, 2366-77.
- Tardif, M., Savard, M., Flamand, L. and Gosselin, J., 2002. Impaired protein kinase C activation/translocation in Epstein-Barr virus-infected monocytes. *J Biol Chem* 277, 24148-54.
- Taylor, G.S. and Blackbourn, D.J., 2011. Infectious agents in human cancers: lessons in immunity and immunomodulation from gammaherpesviruses EBV and KSHV. *Cancer Lett* 305, 263-78.
- Thacker, E.L., Mirzaei, F. and Ascherio, A., 2006. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol* 59, 499-503.
- Thirkettle, H.J., Mills, I.G., Whitaker, H.C. and Neal, D.E., 2009. Nuclear LYRIC/AEG-1 interacts with PLZF and relieves PLZF-mediated repression. *Oncogene* 28, 3663-70.
- Thorley-Lawson, D.A., 2001. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol* 1, 75-82.
- Thorslund, S.E., Edgren, T., Pettersson, J., Nordfelth, R., Sellin, M.E., Ivanova, E., Francis, M.S., Isaksson, E.L., Wolf-Watz, H. and Fallman, M., 2011. The RACK1 signaling scaffold protein selectively interacts with *Yersinia pseudotuberculosis* virulence function. *PLoS One* 6, e16784.
- Thorson, J.A., Yu, L.W., Hsu, A.L., Shih, N.Y., Graves, P.R., Tanner, J.W., Allen, P.M., Piwnicka-Worms, H. and Shaw, A.S., 1998. 14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity. *Mol Cell Biol* 18, 5229-38.
- Trerotola, M., Li, J., Alberti, S. and Languino, L.R., 2012. Trop-2 inhibits prostate cancer cell adhesion to fibronectin through the beta(1) integrin-RACK1 axis. *J Cell Physiol* 227, 3670-7.
- Trotman, L.C., Mosberger, N., Fornerod, M., Stidwill, R.P. and Greber, U.F., 2001. Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. *Nat Cell Biol* 3, 1092-100.
- Tsurumi, T., Fujita, M. and Kudoh, A., 2005. Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Rev Med Virol* 15, 3-15.
- Tugizov, S.M., Berline, J.W. and Palefsky, J.M., 2003. Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells. *Nat Med* 9, 307-14.
- Tung, C.P., Chang, F.R., Wu, Y.C., Chuang, D.W., Hunyadi, A. and Liu, S.T., 2011. Inhibition of the Epstein-Barr virus lytic cycle by protoapigenone. *J Gen Virol* 92, 1760-8.
- Umeda, K., Matsui, T., Nakayama, M., Furuse, K., Sasaki, H., Furuse, M. and Tsukita, S., 2004. Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J Biol Chem* 279, 44785-94.
- Walters, R.W., Freimuth, P., Moninger, T.O., Ganske, I., Zabner, J. and Welsh, M.J., 2002. Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell* 110, 789-99.
- Wang, F.Z., Roy, D., Gershburg, E., Whitehurst, C.B., Dittmer, D.P. and Pagano, J.S., 2009. Maribavir inhibits Epstein-Barr virus transcription in addition to viral DNA replication. *J Virol* 83, 12108-17.
- Westphal, E.M., Mauser, A., Swenson, J., Davis, M.G., Talarico, C.L. and Kenney, S.C., 1999. Induction of lytic Epstein-Barr virus (EBV) infection in EBV-associated malignancies using adenovirus vectors in vitro and in vivo. *Cancer Res* 59, 1485-91.

- Wu, C.C., Chuang, S.Y., Lin, C.Y., Chen, Y.J., Tsai, W.H., Fang, C.Y., Huang, S.Y., Chuang, F.Y., Lin, S.F., Chang, Y. and Chen, J.Y., 2012. Inhibition of epstein-barr virus reactivation in nasopharyngeal carcinoma cells by dietary sulforaphane. *Mol Carcinog*.
- Wu, C.Y., Jhingory, S. and Taneyhill, L.A., 2011. The tight junction scaffolding protein cingulin regulates neural crest cell migration. *Dev Dyn* 240, 2309-23.
- Wycisk, A.I., Lin, J., Loch, S., Hobohm, K., Funke, J., Wieneke, R., Koch, J., Skach, W.R., Mayerhofer, P.U. and Tampe, R., 2011. Epstein-Barr viral BNLF2a protein hijacks the tail-anchored protein insertion machinery to block antigen processing by the transport complex TAP. *J Biol Chem* 286, 41402-12.
- Yamaguchi, J., Hinuma, Y. and Grace, J.T., Jr., 1967. Structure of virus particles extracted from a Burkitt lymphoma cell line. *J Virol* 1, 640-2.
- Yasui, Y., Potter, J.D., Stanford, J.L., Rossing, M.A., Winget, M.D., Bronner, M. and Daling, J., 2001. Breast cancer risk and "delayed" primary Epstein-Barr virus infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10, 9-16.
- Yates, J.L., Warren, N. and Sugden, B., 1985. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* 313, 812-5.
- Ye, J., Gradoville, L. and Miller, G., 2010. Cellular immediate-early gene expression occurs kinetically upstream of Epstein-Barr virus *bzlf1* and *brf1* following cross-linking of the B cell antigen receptor in the Akata Burkitt lymphoma cell line. *J Virol* 84, 12405-18.
- Yokoyama, N., Fujii, K., Hirata, M., Tamai, K., Kiyono, T., Kuzushima, K., Nishiyama, Y., Fujita, M. and Tsurumi, T., 1999. Assembly of the epstein-barr virus BBLF4, BSLF1 and BBLF2/3 proteins and their interactive properties. *J Gen Virol* 80 (Pt 11), 2879-87.
- Yoo, B.K., Emdad, L., Lee, S.G., Su, Z.Z., Santhekadur, P., Chen, D., Gredler, R., Fisher, P.B. and Sarkar, D., 2011. Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1): A multifunctional regulator of normal and abnormal physiology. *Pharmacol Ther* 130, 1-8.
- Young, L.S., Dawson, C.W., Clark, D., Rupani, H., Busson, P., Tursz, T., Johnson, A. and Rickinson, A.B., 1988. Epstein-Barr virus gene expression in nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol* 69 (Pt 5), 1051-65.
- Young, L.S., Lau, R., Rowe, M., Niedobitek, G., Packham, G., Shanahan, F., Rowe, D.T., Greenspan, D., Greenspan, J.S., Rickinson, A.B. and et al., 1991. Differentiation-associated expression of the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator protein in oral hairy leukoplakia. *J Virol* 65, 2868-74.
- Young, L.S. and Murray, P.G., 2003. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 22, 5108-21.
- Yu, A.S., McCarthy, K.M., Francis, S.A., McCormack, J.M., Lai, J., Rogers, R.A., Lynch, R.D. and Schneeberger, E.E., 2005. Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C1231-41.
- Zhang, L., Wang, H., Liu, D., Liddington, R. and Fu, H., 1997. Raf-1 kinase and exoenzyme S interact with 14-3-3zeta through a common site involving lysine 49. *J Biol Chem* 272, 13717-24.
- Zhang, Q., Gutsch, D. and Kenney, S., 1994. Functional and physical interaction between p53 and BZLF1: implications for Epstein-Barr virus latency. *Mol Cell Biol* 14, 1929-38.
- Zhang, R., Poustovoitov, M.V., Ye, X., Santos, H.A., Chen, W., Daganzo, S.M., Erzberger, J.P., Serebriiskii, I.G., Canutescu, A.A., Dunbrack, R.L., Pehrson, J.R., Berger, J.M., Kaufman, P.D. and Adams, P.D., 2005. Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Dev Cell* 8, 19-30.
- Zhu, J., Liao, G., Shan, L., Zhang, J., Chen, M.R., Hayward, G.S., Hayward, S.D., Desai, P. and Zhu, H., 2009. Protein array identification of substrates of the Epstein-Barr virus protein kinase BGLF4. *J Virol* 83, 5219-31.
- Zuo, Y., Wu, J., Xu, Z., Yang, S., Yan, H., Tan, L., Meng, X., Ying, X., Liu, R., Kang, T. and Huang, W., 2011. Minicircle-oriP-IFN γ : a novel targeted gene therapeutic system for EBV positive human nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One* 6, e19407.

Annexe

Annexe : protéines identifiées par spectrométrie de masse après un « pull-down » GST-Ubn-1

		Fraction MB						Fraction S2						Fraction S1					
		MGST			MuGSTbn			S2GST			S2GSTubn			S1GST			S1GSTubn		
		bande	Pep	SC	bande	Pep	SC	bande	Pep	SC	bande	Pep	SC	bande	Pep	SC	bande	Pep	SC
sp Q9NPG3 UBN1_HUMAN Ubinuclein-1 OS=Homo sapiens GN=UBN1 PE=1 SV=2	UBN1_HUMAN	1	25	28	1	9	13	1	37	62	2	1	1	2	2	2	1	41	88
		2	29	70	2	20	30	2	29	77	3	1	1	2	2	2	1	2	37
		3	15	56	3	9	16	3	18	55	4	1	1	3	3	3	20	41	3
		4	9	14	4	1	1	4	10	21	5	4	4	4	4	4	13	24	4
		5	2	2	5	2	2	5	6	6	6	4	6	5	5	4	6	5	9
		6			6	7	7	6	10	6	7	10	6	6	7	7	10	6	5
sp Q00341 VIGLN_HUMAN Vigilin OS=Homo sapiens GN=HDLBP PE=1 SV=2	VIGLN_HUMAN	1	4	4	1	4	4	1	2	2	4	2	2	2	2	1	7	7	7
sp P25398 RS12_HUMAN 40S ribosomal protein S12 OS=Homo sapiens GN=RPS12 PE=1 SV=3	RS12_HUMAN	4	2	2	4	2	2	4	2	2	5	2	3	4	2	6	2	3	3
sp P62244 RS15A_HUMAN 40S ribosomal protein S15a OS=Homo sapiens GN=RPS15A PE=1 SV=2	RS15A_HUMAN	5	3	4	5	3	4	4	2	2	4	2	2	2	2	6	2	3	3
sp Q92499 DDX1_HUMAN ATP-dependent RNA helicase DDX1 OS=Homo sapiens GN=DDX1 PE=1 SV=2	DDX1_HUMAN	2	4	4	2	4	4	2	7	7	3	3	3	3	3	5	2	2	2
sp P15880 RS2_HUMAN 40S ribosomal protein S2 OS=Homo sapiens GN=RPS2 PE=1 SV=2	RS2_HUMAN	4	2	3	4	2	3	4	2	2	4	2	3	4	2	5	2	4	4
sp P27635 RL10_HUMAN 60S ribosomal protein L10 OS=Homo sapiens GN=RPL10 PE=1 SV=4	RL10_HUMAN	4	2	3	4	2	3	4	2	2	4	2	3	4	2	5	3	4	4
sp P62280 RS11_HUMAN 40S ribosomal protein S11 OS=Homo sapiens GN=RPS11 PE=1 SV=3	RS11_HUMAN	4	2	2	4	2	2	4	2	2	4	2	2	2	2	5	2	2	2
sp P84098 RL19_HUMAN 60S ribosomal protein L19 OS=Homo sapiens GN=RPL19 PE=1 SV=1	RL19_HUMAN	4	2	2	4	2	2	4	2	2	4	2	2	2	2	5	2	2	2
sp O60841 IF2P_HUMAN Eukaryotic translation initiation factor 5B OS=Homo sapiens GN=EIF5B PE=1 SV=3	IF2P_HUMAN	1	3	3	1	3	3	1	3	3	1	3	3	1	3	1	7	8	8
sp P61247 RS3A_HUMAN 40S ribosomal protein S3a OS=Homo sapiens GN=RPS3A PE=1 SV=2	RS3A_HUMAN	4	2	3	4	2	3	4	2	3	5	2	3	4	2	5	5	7	7
sp P67809 YBOX1_HUMAN Nuclease-sensitive element-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=YBX1 PE=1 SV=3	YBOX1_HUMAN	3	4	4	3	4	4	3	4	4	3	4	4	3	4	3	2	4	4
sp Q01082 SPTB2_HUMAN Spectrin beta chain, brain 1 OS=Homo sapiens GN=SPTBN1 PE=1 SV=2	SPTB2_HUMAN	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	2	1	2	1	7	7	7
sp Q04637 IF4G1_HUMAN Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 OS=Homo sapiens GN=EIF4G1 PE=1 SV=3	IF4G1_HUMAN	1	4	4	1	4	4	1	4	4	1	4	4	1	4	1	4	4	4
sp Q13151 ROA0_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA0 PE=1 SV=1	ROA0_HUMAN	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
sp Q14152 EIF3A_HUMAN Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A OS=Homo sapiens GN=EIF3A PE=1 SV=1	EIF3A_HUMAN	4	3	3	4	3	3	4	3	3	4	3	3	4	3	4	3	3	3
sp Q14157 UBP2L_HUMAN Ubiquitin-associated protein 2-like OS=Homo sapiens GN=UBAP2L PE=1 SV=2	UBP2L_HUMAN	1	6	6	1	6	6	1	6	6	1	6	6	1	6	1	6	6	6
sp Q14573 ITPR3_HUMAN inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 OS=Homo sapiens GN=ITPR3 PE=1 SV=2	ITPR3_HUMAN	2	3	3	2	3	3	2	3	3	2	3	3	2	3	2	3	3	3
sp Q6Y7W6 PERQ2_HUMAN PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=GIGYF2 PE=1 SV=1	PERQ2_HUMAN	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	1	2	3	3
sp Q92616 GCN1L_HUMAN Translational activator GCN1 OS=Homo sapiens GN=GCN1L1 PE=1 SV=5	GCN1L_HUMAN	1	21	23	1	21	23	1	21	23	1	21	23	1	21	1	21	23	23
tr B4DDB6 B4DDB6_HUMAN cDNA FLJ52659, highly similar to Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 OS=Homo sapiens GN=HNRPA3 PE=2 SV=1	B4DDB6_HUMAN	3	6	8	3	6	8	3	6	8	3	6	8	3	6	3	6	8	8
sp P46783 RS10_HUMAN 40S ribosomal protein S10 OS=Homo sapiens GN=RPS10 PE=1 SV=1	RS10_HUMAN	4	2	2	4	2	2	4	2	2	4	2	2	4	2	4	2	2	2
sp P63244 GBLP_HUMAN Guanidine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 OS=Homo sapiens GN=GNB2L1 PE=1 SV=3	GBLP_HUMAN	4	2	2	4	2	2	4	2	2	4	2	2	4	2	4	2	2	2
sp P63220 RS21_HUMAN 40S ribosomal protein S21 OS=Homo sapiens GN=RPS21 PE=1 SV=1	RS21_HUMAN	5	3	8	5	3	8	5	3	8	5	3	8	5	3	5	3	8	8
sp P10620 MGST1_HUMAN Microsomal glutathione S-transferase 1 OS=Homo sapiens GN=MGST1 PE=1 SV=1	MGST1_HUMAN	5	2	6	5	2	6	5	2	6	5	2	6	5	2	5	2	6	6
sp P62888 RL30_HUMAN 60S ribosomal protein L30 OS=Homo sapiens GN=RPL30 PE=1 SV=2	RL30_HUMAN	5	4	4	5	4	4	5	4	4	5	4	4	5	4	5	4	4	4
sp P62314 SMD1_HUMAN Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 OS=Homo sapiens GN=SNRPD1 PE=1 SV=1	SMD1_HUMAN	5	2	2	5	2	2	5	2	2	5	2	2	5	2	5	2	2	2
tr Q59H46 Q59H46_HUMAN integrin beta (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	Q59H46_HUMAN	1	4	4	1	4	4	1	4	4	1	4	4	1	4	1	4	4	4

Annexe : protéines identifiées par spectrométrie de masse après un « pull-down » GST-Ubn-1

sp Q14692 BMS1_HUMAN Ribosome biogenesis protein BMS1 homolog OS=Homo sapiens GN=BMS1 PE=1 SV=1	BMS1_HUMAN	1	5	6	1	9	12
sp Q14978 NOLC1_HUMAN Nuclear phosphoprotein p130 OS=Homo sapiens GN=NOLC1 PE=1 SV=2	NOLC1_HUMAN	2	2	2	2	2	2
sp Q15149 PLEC1_HUMAN Plectin-1 OS=Homo sapiens GN=PLEC1 PE=1 SV=3	PLEC1_HUMAN	1	7	7	1	10	10
sp Q02878 RL6_HUMAN 60S ribosomal protein L6 OS=Homo sapiens GN=RPL6 PE=1 SV=3	RL6_HUMAN	2	4	4	3	2	2
sp Q07020 RL18_HUMAN 60S ribosomal protein L18 OS=Homo sapiens GN=RPL18 PE=1 SV=2	RL18_HUMAN	3	4	4	4	2	2
sp O00159 MYO1C_HUMAN Myosin-1c OS=Homo sapiens GN=MYO1C PE=1 SV=3	MYO1C_HUMAN	4	2	2	4	2	3
sp O00567 NOP56_HUMAN Nuclear protein 56 OS=Homo sapiens GN=NOP56 PE=1 SV=4	NOP56_HUMAN	2	6	6	2	4	4
sp O43143 DHX15_HUMAN Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15 OS=Homo sapiens GN=DHX15 PE=1 SV=2	DHX15_HUMAN	3	6	7	3	2	2
sp O43684 BUB3_HUMAN Mitotic checkpoint protein BUB3 OS=Homo sapiens GN=BUB3 PE=1 SV=1	BUB3_HUMAN	2	4	4	2	3	4
sp O75643 U520_HUMAN U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase OS=Homo sapiens GN=SNRNP200 PE=1 SV=2	U520_HUMAN	3	2	2	3	2	2
sp O76021 RL1D1_HUMAN Ribosomal L1 domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=RSL1D1 PE=1 SV=3	UTP20_HUMAN	1	5	5	1	8	9
sp P06748 NPM1_HUMAN Nucleophosmin OS=Homo sapiens GN=NPM1 PE=1 SV=2	NPM1_HUMAN	3	5	5	3	4	4
tr Q6N0B3 Q6N0B3_HUMAN Putative uncharacterized protein DKFZp686P03159 OS=Homo sapiens GN=DKFZp686P03159 PE=2 SV=1	Q6N0B3_HUMAN	1	4	6	1	2	3
sp P07910 HNRPC_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 OS=Homo sapiens GN=HNRPC PE=1 SV=4	HNRPC_HUMAN	3	4	6	3	3	6
sp P22087 FBRL_HUMAN rRNA 2'-O-methyltransferase fibrillarlin OS=Homo sapiens GN=FBRL PE=1 SV=2	FBRL_HUMAN	3	2	2	4	2	2
sp P22626 ROA2_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 OS=Homo sapiens GN=HNRNP2B1 PE=1 SV=2	ROA2_HUMAN	3	2	2	3	2	2
sp P23284 PIPB_HUMAN Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B OS=Homo sapiens GN=PIPB PE=1 SV=2	PIPB_HUMAN	3	3	3	3	8	10
sp P32969 RL9_HUMAN 60S ribosomal protein L9 OS=Homo sapiens GN=RPL9 PE=1 SV=1	RL9_HUMAN	4	3	4	4	2	2
sp P36578 RL4_HUMAN 60S ribosomal protein L4 OS=Homo sapiens GN=RPL4 PE=1 SV=5	RL4_HUMAN	4	2	3	4	3	5
sp P38159 HNRPG_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G OS=Homo sapiens GN=RBMX PE=1 SV=3	HNRPG_HUMAN	3	4	4	3	4	4
sp P39023 RL3_HUMAN 60S ribosomal protein L3 OS=Homo sapiens GN=RPL3 PE=1 SV=2	RL3_HUMAN	3	3	3	3	3	3
sp P46087 NOP2_HUMAN Putative ribosomal RNA methyltransferase NOP2 OS=Homo sapiens GN=NOP2 PE=1 SV=2	NOP2_HUMAN	3	3	3	3	4	6
sp P46777 RL5_HUMAN 60S ribosomal protein L5 OS=Homo sapiens GN=RPL5 PE=1 SV=3	RL5_HUMAN	2	7	7	2	8	9
sp P50914 RL14_HUMAN 60S ribosomal protein L14 OS=Homo sapiens GN=RPL14 PE=1 SV=4	RL14_HUMAN	4	2	2	4	5	6
sp P5769 NH2L1_HUMAN NHP2-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=NHP2L1 PE=1 SV=3	NH2L1_HUMAN	4	2	2	4	2	2
sp P56470 LEG4_HUMAN Galactin-4 OS=Homo sapiens GN=LGALS4 PE=1 SV=1	LEG4_HUMAN	5	2	2	5	3	5
sp P61978 HNRPK_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens GN=HNRPK PE=1 SV=1	HNRPK_HUMAN	3	2	2	3	2	2
sp P62424 RL7A_HUMAN 60S ribosomal protein L7a OS=Homo sapiens GN=RPL7A PE=1 SV=2	RL7A_HUMAN	4	1	1	4	3	3
		4	1	1	4	3	3
		3	5	7	3	8	9
		4	2	2	4	6	7

Annexe : protéines identifiées par spectrométrie de masse après un « pull-down » GST-Ubn-1

sp P26641 EF1G_HUMAN Elongation factor 1-gamma OS=Homo sapiens GN=EEF1G PE=1 SV=3	EF1G_HUMAN			3	4	4		
sp P68371 TBB2C_HUMAN Tubulin beta-2C chain OS=Homo sapiens GN=TUBB2C PE=1 SV=1	TBB2C_HUMAN			3	3	4		
sp Q71U36 TBA1A_HUMAN Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1A PE=1 SV=1	TBA1A_HUMAN			3	2	2		
sp P07900 HS90A_HUMAN Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens GN=HSP90AA1 PE=1 SV=5	HS90A_HUMAN						2	6
sp P14625 ENPL_HUMAN Endoplasmin OS=Homo sapiens GN=HSP90B1 PE=1 SV=1	ENPL_HUMAN						2	2
sp P10809 CH60_HUMAN 60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2	CH60_HUMAN						3	2
tr B2RDE1 B2RDE1_HUMAN cDNA, FLJ96568, highly similar to Homo sapiens tropomyosin 3 (TPM3), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	B2RDE1_HUMAN							2
sp P00338 LDHA_HUMAN L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens GN=LDHA PE=1 SV=2	LDHA_HUMAN						4	3
sp P60660 MYL6_HUMAN Myosin light polypeptide 6 OS=Homo sapiens GN=MYL6 PE=1 SV=2	MYL6_HUMAN						4	3
sp P14649 MYL6B_HUMAN Myosin light chain 6B OS=Homo sapiens GN=MYL6B PE=1 SV=1	MYL6B_HUMAN						5	2
							6	2
								3