



**HAL**  
open science

**Identification et caractérisation des partenaires cellulaires de zebra, facteur de transcription du virus Epstein-Barr : mise en évidence d'un complexe tripartite entre la protéine virale zebra et les protéines cellulaires ubinucléine et 14-3-3epsilon**

Charlotte Sueur

► **To cite this version:**

Charlotte Sueur. Identification et caractérisation des partenaires cellulaires de zebra, facteur de transcription du virus Epstein-Barr : mise en évidence d'un complexe tripartite entre la protéine virale zebra et les protéines cellulaires ubinucléine et 14-3-3epsilon. Sciences pharmaceutiques. 2011. dumas-00653237

**HAL Id: dumas-00653237**

**<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00653237v1>**

Submitted on 19 Dec 2011

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

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

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 2011

N°

**THESE**  
**PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE**  
DIPLOME D'ETAT

**IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES PARTENAIRES  
CELLULAIRES DE ZEBRA, FACTEUR DE TRANSCRIPTION DU  
VIRUS EPSTEIN-BARR**

Mise en évidence d'un complexe tripartite entre la protéine virale  
ZEBRA et les protéines cellulaires Ubinucléine et 14-3-3 $\epsilon$

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le 24 novembre 2011

PAR : Charlotte Sueur  
Née le 16 février 1984 à Nancy

DEVANT LE JURY COMPOSE DE :

Président du jury : Dr Claudine PINEL, MCU-PH

Membres : Pr Florence MORFIN, PU-PH

Pr Patrice MORAND, PU-PH, directeur de thèse

Dr Véronique BOYER, CR1 INSERM

*La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.*

## UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI  
38706 LA TRONCHE CEDEX – France  
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00  
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



Doyen de la Faculté : **M. Christophe RIBUOT**  
Vice-doyen et Directeur des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

### **Année 2010-2011**

#### **PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE (n = 18)**

BAKRI	Aziz	Pharmacie Gélénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
CORNET	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)- À partir du 1er mai
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I) –
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
GRILLOT	Renée	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH) - À partir du 1er mai
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie Nutrition (L.B.F.A)
WOUESSIDJEWÉ	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

#### **PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=3)**

BELLET	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)

#### **MAITRE DE CONFERENCES DE PHARMACIE (n = 34)**

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
ALLENET	Benoît	Pharmacie Clinique (ThEMAS TIMC-IMAG / MCU-PH)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I / MCU-PH)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)

GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
PINEL	Claudine	Parasitologie - Mycologie Médicale (GIN / MCU-PH)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie Organique (D.P.M.)
VILLET	Annick	Chimie Analytique (VP Form Adjoint UJF, D.P.M.)

### **ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=2)**

BUSSER	Benoît	Biochimie (IAB, AHU-Biochimie)
MONNERET	Denis	Biochimie (HP2, AHU-Biochimie)

### **ENSEIGNANTS ANGLAIS (n=3)**

COLLE	Pierre Emmanuel Maître de conférence	
FITE	Andrée	Professeur Certifié
GOUBIER	Laurence	Professeur Certifié

### **ATER (n= 5)**

DEFENDI	Frédérica	ATER Immunologie Médicale (GREPI-TIMC)
GRATIA	Séverine	½ ATER Biochimie Biotechnologie (LBFA)
REGENT	Myriam	½ ATER Biochimie Biotechnologie (IAB)
ROSSI	Caroline	ATER Anglais Master ISM (JR)
RUFFIN	Emilie	ATER Pharmacie Galénique (Therex/TIMC, La serve)
SAPIN	Emilie	ATER Physiologie Pharmacologie (HP2)

### **MONITEURS ET DOCTORANTS CONTRACTUELS (n=7)**

BOUCHET	Audrey	(01-10-2009 au 30-09-2012) Biotechnologie (GIN, ESRF)
DUCAROUGE	Benjamin	(01-10-2008 au 30-09-2011) Laboratoire HP2 (JR)
FAVIER	Mathieu	(01-10-2009 au 30-09-2012) Laboratoire HP2 (JR)
GRAS	Emmanuelle	(01-10-2010 au 30-09-2013) Laboratoire HP2 (JR)
HAUDECOEUR	Romain	(01-10-2008 au 30-09-2011) Chimie Thérapeutique (DPM)
LESART	Anne-Cécile	(01-10-2009 au 30-09-2013) Informatique C2i
POULAIN	Laureline	(01-10-2009 au 30-09-2012) Laboratoire HP2 (JR)

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches  
 CHU : Centre Hospitalier Universitaire  
 CIB : Centre d'Innovation en Biologie  
 DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire

HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire  
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »  
IBS : Institut de Biologie Structurale  
JR : Jean Roget  
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes  
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée  
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux  
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie  
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine  
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques  
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel  
PRAG : Professeur Agrégé  
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition  
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

---

**Dernière mise à jour : 19/05/2011 Rédacteur : F. GIGLIOTTI ; Bureau de la Scolarité Pharmacie  
DOMAINE DE LA MERCI - 38706 LA TRONCHE CEDEX - France - TEL : +33 (0)4 75 63 71 00 - FAX :  
+33 (0)4 75 63 71 70**

## REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier les membres de mon jury :

**Patrice Morand**, merci de m'avoir accueillie avec enthousiasme au laboratoire de virologie. Grâce à vous mon internat de Pharmacie Spécialisé a été quatre belles années riches en découvertes professionnelles et personnelles. Quelle bonne idée ce droit au remords !

**Claudine Pinel**, ma tutrice d'internat, je vous remercie pour vos conseils tout au long mon internat et pour présider aujourd'hui mon jury de thèse.

**Florence Morfin**, merci d'être présente aujourd'hui pour ma soutenance de thèse. Et un plus grand merci encore pour votre investissement dans notre filière de Pharmacie Spécialisée.

**Véronique Boyer**, je te remercie pour tout ce que tu m'as appris. Je suis venue passer 6 mois à l'UVHCI pour découvrir la recherche, j'y suis restée depuis bientôt 4 ans. Et c'est en grande partie grâce à toi, ton encadrement quotidien, tes conseils, ta patience, ta disponibilité, ton soutien pendant le M2 puis la thèse de science... Merci pour tout !

Ensuite je voudrais exprimer toute ma gratitude à l'association **ASPIRAL** (association des internes et anciens internes de Pharmacie Spécialisée et Innovation Pharmaceutique et Recherche de la région Rhône-Alpes et Auvergne, oui c'est long, merci les réformes !!!) et à tous les aspiraliens, qui m'ont montré la voie de la recherche, la vie associative et en qui j'ai trouvé des amis :

- Les plus anciens, Soline, Sandrine B., Caroline S., Sandrine D., Xavier, Benoit, Damien, Marie-Lo, Paul R., Caroline G. qui m'ont guidé à mes débuts et ont toujours été de bon conseil.
- Pascal et Paul V., pour ces heures passées au téléphone à préparer les COP et en réunion pour représenter au mieux notre filière et défendre les profils de poste de chacun.
- Mes « petits » IPR grenoblois, Delphine, Manu, Julie et Kathy : vous avez chacun trouvé un cursus bien à vous et vous représentez magnifiquement la filière IPR ! bonne continuation !
- et tous les autres aspiraliens avec qui ça a été un plaisir de se retrouver à Grenoble, à Lyon ou sur les pistes de ski...

Je remercie l'**UVHCI** et Rob Ruigrok de m'avoir accueillie pour faire de la recherche dans un environnement scientifique excellent, avec plein de personnes qui m'ont aidée au quotidien : Julien L., Pierre-Alain, Lucy, Alex, Nolwenn, Eric, Céleste, Audrey, Nico M, Julien P., Nico T., Wim, Raphaëlle, Laurence et tous les autres...

Une pensée pour les internes grenoblois avec qui j'ai commencé mon internat : Amélie qu'est-ce que tu cuisines ce soir ? Marion, Claudette, Nathalie et les autres...

Merci à Michèle et Brigitte, mes pharmaciennes préférées, avec qui j'ai démarré ma courte carrière de pharmacie officinale. J'ai toujours apprécié de passer à la pharmacie, pour travailler ou pour fêter Nouvel An...

Un grand merci à ma famille qui m'a soutenue pendant toutes ces années d'études à Nancy puis à Grenoble. Papa, je te dois de m'être inscrite à la fac de pharmacie et à Grenoble, deux tournants de ma vie dans lesquels tu m'as aidée à prendre une décision importante !

A tous mes amis, des différentes périodes de ma vie : Marylène qui est là depuis le début, les copains du lycée Flo, Pierre, Vanessa, Marjorie, Yohann, Pauline, qui sont et seront toujours présents dans ma vie, Nadine, Mathilde, Camille, Julien, Cécile et tous les autres qui ont partagé de joyeux moments à Nancy à la fac, rue des Carmes et encore après ça. Je pense aussi à Sönke, Julia, Dimitri et Corinne, notre bande de grenoblois, merci pour ces heures passées ensemble. Ensuite, il y a Julien, Nolwenn, David, Mathieu et le Kfée des Jeux avec qui la vie à Grenoble est bien plus sympa !

Et un énorme remerciement à Lucien, qui me pousse toujours à donner le meilleur de moi, qui m'a soutenue jusqu'au bout de mes études et m'entraîne toujours plus loin en voyage...

## SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	5
TABLE DES ILLUSTRATIONS .....	9
LISTE DES ABREVIATIONS .....	10
INTRODUCTION GENERALE.....	11
REVUE GENERALE DE LA LITTERATURE.....	12
I.    Le Virus d'Epstein-Barr ou EBV .....	12
A.    Découverte du Virus d'Epstein-Barr .....	12
B.    Structure d'EBV.....	13
C.    Cycle de vie de l'EBV .....	14
1.    Primo-infection : Attachement et pénétration cellulaire .....	14
2.    Phase de latence.....	16
3.    Phase de réplication - Cycle lytique .....	19
D.    Pathogénicité .....	22
1.    Mononucléose infectieuse.....	22
2.    Lymphomes associés à l'EBV .....	23
3.    Carcinomes associés à l'EBV .....	25
E.    Traitements antiviraux.....	27
II.   L'Ubinucléine ou UBN-1 .....	30
A.    Découverte d'une nouvelle protéine nucléaire interagissant avec ZEBRA.....	30
B.    Double localisation cellulaire de l'Ubn et interaction avec les protéines ZO .....	31
C.    Rôle de l'ubinucléine dans la régulation du cycle lytique de l'EBV .....	36
III.  14-3-3 $\epsilon$ et la famille des protéines 14-3-3.....	39
A.    Généralités sur les protéines 14-3-3.....	39
B.    Fonction des protéines 14-3-3 .....	40
1.    Régulation de la localisation subcellulaire.....	40
2.    Régulation de l'activité enzymatique .....	41
3.    Régulation du cycle cellulaire - apoptose .....	42
C.    14-3-3 $\epsilon$ .....	43
D.    14-3-3 et pathogénicité .....	44
1.    14-3-3 dans les maladies neuro-dégénératives .....	45
2.    14-3-3 $\sigma$ et les cancers.....	46
3.    14-3-3 et les virus.....	48

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE .....	51
MATERIELS ET METHODES .....	52
RESULTATS .....	57
I. Mise en évidence d'une interaction entre ZEBRA, 14-3-3 $\epsilon$ et l'ubiquitine <i>in vitro</i> .....	57
A. Mise en évidence du complexe tripartite <i>in vitro</i> par GST-pulldown.....	57
B. Analyse des interactions entre protéines <i>in vitro</i> .....	58
1. Etude de l'interaction ZEBRA-Ubn .....	58
2. Etude de l'interaction ZEBRA-14-3-3 $\epsilon$ .....	59
3. Etude de l'interaction Ubn-14-3-3 $\epsilon$ .....	59
II. Mise en évidence d'une interaction entre ZEBRA, 14-3-3 $\epsilon$ et l'ubiquitine <i>in vivo</i> .....	60
A. Etude de l'interaction Ubn-14-3-3 $\epsilon$ .....	60
B. Colocalisation cellulaire de 14-3-3 $\epsilon$ , ZEBRA et l'ubiquitine visualisée par microscopie confocale .....	60
C. Mise en évidence du rôle d'intermédiaire de l'Ubn dans le complexe tripartite.....	62
III. Importance de la phosphorylation de l'Ubn pour sa liaison à 14-3-3 $\epsilon$ .....	63
A. Etude de la liaison entre un peptide de l'Ubn et 14-3-3 $\epsilon$ .....	63
B. Etude de la liaison de mutants de l'Ubn avec 14-3-3 $\epsilon$ .....	64
C. Impact de la phosphorylation de l'Ubn sur sa localisation cellulaire.....	65
DISCUSSION - PERSPECTIVES .....	67
CONCLUSION .....	71
RÉFÉRENCES .....	73
SERMENT DES APOTHICAIRES.....	78

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Particules d'EBV visualisées en microscopie électronique .....	12
Figure 2 : Cycle de vie du virus d'Epstein-Barr et ses interactions avec les cellules hôtes .....	15
Tableau 1 : Profil d'expression des protéines virales selon le type de latence .....	17
Figure 3 : Représentation schématique de l'ubinucléine .....	30
Figure 4 : Localisation nucléaire de l'ubinucléine visualisée en microscopie à fluorescence.....	31
Figure 5 : L'ubinucléine endogène colocalise au niveau des jonctions cellulaires avec ZO-1 et claudine-1.....	32
Figure 6 : Interaction in vivo entre les parties N-terminales de l'ubinucléine et de ZO-1 visualisée par une technique de complémentarité de fluorescence .....	34
Figure 7 : Définition des domaines d'interaction de l'ubinucléine et de ZO-1.....	35
Figure 8 : Interaction de l'Ubn avec le domaine basique de différents facteurs de transcription	36
Figure 9 : Effet de l'ubinucléine sur le cycle lytique d'EBV.....	37
Figure 10 : Modèle du contrôle du cycle productif de l'EBV dans les cellules épithéliales .....	38
Figure 11 : Structure d'un dimère 14-3-3.....	39
Figure 12 : Régulation de la localisation cellulaire des protéines par les protéines 14-3-3.....	40
Tableau 2 : les différentes isoformes de 14-3-3 et leurs implications en pathologie .....	47
Figure 13 : Interaction in vitro de ZEBRA avec l'Ubn et 14-3-3 $\epsilon$ .....	57
Figure 14 : Interaction directe in vitro entre ZEBRA et l'Ubn .....	58
Figure 15 : Interaction in vitro entre ZEBRA et 14-3-3 $\epsilon$ .....	59
Figure 16 : Interaction in vivo entre l'Ubn et 14-3-3 $\epsilon$ .....	59
Figure 17 : Colocalisation cellulaire de 14-3-3 $\epsilon$ , ZEBRA et l'ubinucléine visualisée par microscopie confocale.....	61
Figure 18 : Interaction in vivo de ZEBRA avec l'Ubn et 14-3-3 $\epsilon$ .....	62
Figure 19 : Séquence protéique de l'Ubn (331-370) chez différentes espèces de mammifères...	63
Figure 20 : 14-3-3 $\epsilon$ se fixe sur l'Ubn au niveau d'un site consensus contenant une sérine phosphorylée.....	63
Figure 21 : La liaison de 14-3-3 $\epsilon$ à ZEBRA se fait par l'intermédiaire de l'Ubn selon son état de phosphorylation .....	64
Figure 22 : Modulation de la localisation de l'Ubn par la protéine kinase A.....	66

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique  
ARN : Acide ribonucléique  
BP : Boite de Petri  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
DMEM : Dulbecco's modified Eagle's medium  
DMSO : diméthylsulfoxyde  
EBV : Epstein-Barr virus  
EBNA : Epstein-Barr Nuclear Antigene  
GPI : Goat pre-immun  
GST : Gluthation-S-Transférerase  
IP : Immunoprécipitation  
IPTG : isopropyl- $\beta$ -thiogalactoside  
LCL : lignée cellulaire lymphoblastoïde  
MNI : mononucléose infectieuse  
NACos : Nuclear and adhesion complex proteins  
NLS : Nuclear localization signal  
NPC : carcinome du nasopharynx  
ON : over-night, toute une nuit  
PBS : Phosphate buffer saline  
PFA : paraformaldéhyde  
PKA : protéine kinase A  
PKC : protéine kinase C  
PLA2 : phospholipase A2  
RSC : cellules de Reed-Sternberg  
SLPT : syndrome lymphoprolifératif post-transplantation  
SVF : Sérum de veau foetal  
TBS : Tris buffer saline  
Ubn : ubinucléine  
VHC : Virus de l'hépatite C  
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine  
ZEBRA : BamHI-Z-encoded EBV replication activator

## INTRODUCTION GENERALE

Le virus Epstein-Barr (EBV) est un virus présent à l'état latent chez 95% de la population adulte. La primo-infection est souvent asymptomatique mais peut entraîner chez l'adolescent ou le jeune adulte une mononucléose infectieuse. Le virus persiste ensuite dans l'organisme toute la vie à l'état latent dans les lymphocytes B mémoires et peut se réactiver de manière intermittente et initier un cycle lytique aboutissant à la production de nouvelles particules virales. L'EBV a également été décrit comme un virus oncogène pouvant être associé à des cancers lymphoïdes et épithéliaux et la protéine virale ZEBRA est un facteur de transcription clé dans la réactivation virale et l'oncogenèse associée à l'EBV.

Au sein de l'UVHCI (Unit for Virus Host-Cell Interactions, UMI 3265 EMBL-CNRS-UJF), notre équipe de recherche étudie le virus d'Epstein-Barr et s'intéresse à ses caractéristiques structurales et à ses interactions avec les cellules hôtes infectées. Nous nous intéressons particulièrement aux interactions de ZEBRA avec les protéines cellulaires, dans des modèles issus de différents cancers. Des travaux antérieurs ont décrit une protéine cellulaire, l'ubynucléine (Ubn), capable d'empêcher la fixation de ZEBRA sur ses séquences cibles d'ADN (Aho *et al.*, 2000). Notre équipe a montré par la suite que l'Ubn possède une double localisation cellulaire, nucléaire et dans les jonctions serrées (Aho *et al.*, 2009). Le transport de l'Ubn entre ces deux sites fait très certainement intervenir d'autres partenaires cellulaires et notre attention s'est portée particulièrement sur les protéines 14-3-3 connues pour réguler l'import/export nucléaire de certaines protéines (Sakiyama *et al.*, 2008, Aguilera *et al.*, 2006).

L'objectif de mon travail a été de mettre en évidence l'existence d'un complexe entre les trois protéines ZEBRA, Ubn et 14-3-3 $\epsilon$  pour préciser les conditions dans lesquelles l'Ubn inhibe les fonctions de ZEBRA et donc le cycle lytique. De plus, nous avons cherché à comprendre comment la protéine 14-3-3 $\epsilon$  interviendrait dans la régulation de l'interaction entre ZEBRA et l'Ubn, en contrôlant la localisation cellulaire de cette dernière.

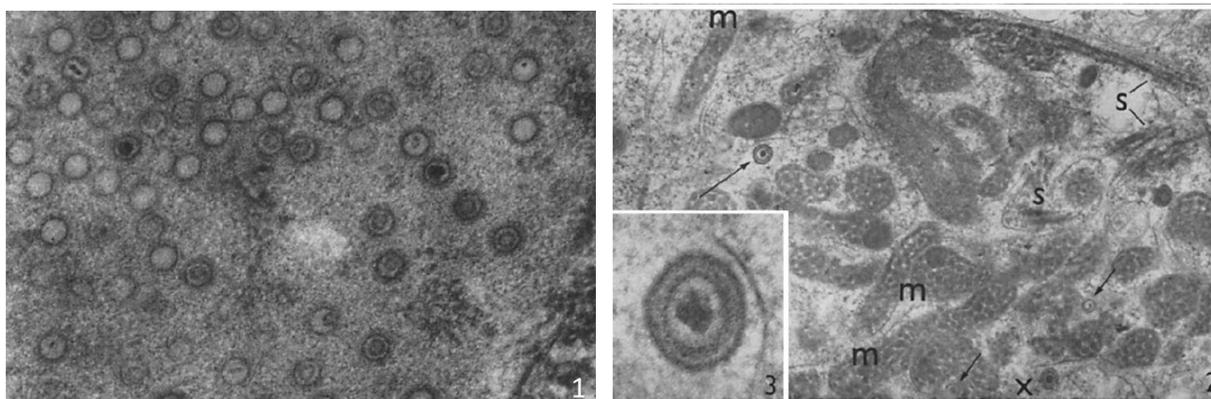
Dans une première partie, nous présenterons le virus Epstein-Barr et ses caractéristiques d'infection des cellules, ainsi que les protéines cellulaires Ubn et 14-3-3, leurs rôles dans le fonctionnement cellulaire et leur implication avec les virus. Dans une deuxième partie, nous présenterons les matériels et méthodes nécessaires à nos travaux. Puis dans une troisième partie seront présentés les résultats obtenus, suivis par les conclusion, discussion et perspectives de cette étude.

## REVUE GENERALE DE LA LITTERATURE

### I. Le Virus d'Epstein-Barr ou EBV

#### A. Découverte du Virus d'Epstein-Barr

Dans les années 60, Epstein, Achong et Barr se sont intéressés aux lymphomes de Burkitt, tumeur très fréquente chez les enfants en Afrique sub-saharienne et dont la distribution géographique, correspondant à celle du paludisme, suggérait une étiologie impliquant la transmission d'un agent infectieux par un vecteur arthropode. Ils ont découvert par microscopie électronique sur des cultures lymphomateuses issues de lymphomes de Burkitt une particule virale avec les mêmes caractéristiques morphologiques que les herpes-virus (Fig.1) (Epstein *et al.*, 1965). Des études immunologiques et antigéniques menées par Henlé *et al.* ont alors mis en évidence qu'il s'agissait d'un nouveau membre de la famille des herpes-virus, qui fut dès lors nommé virus d'Epstein-Barr (EBV), et que la vaste majorité des individus, dans toute la population mondiale, présentait des anticorps dirigés contre ce virus. En 1968, un technicien du laboratoire de Gertrude Henlé, séronégatif pour EBV, développa une mononucléose infectieuse (MNI), puis fit une séroconversion EBV. Grâce à cet évènement, l'EBV fut reconnu comme l'agent étiologique de la MNI.



**Figure 1 : Particules d'EBV visualisées en microscopie électronique** (Epstein *et al.*, 1965) (1) Coupe de lymphoblaste contenant de nombreuses particules immatures d'environ 75nm de diamètre, délimitées par une simple membrane et de profil hexagonal (x76500) (2) Coupe de lymphoblaste contenant des particules immatures (flèche courte) et une particule mature (longue flèche) de 110nm de diamètre, avec une double membrane et un nucléoïde dense (x42000) m désigne les mitochondries et s désigne des faisceaux de microtubules (3) Détail d'une particule virale mature de 115nm de diamètre avec une double membrane et un nucléoïde central dense de 45nm (x213500)

Il a été montré que le titre en anticorps anti-EBV était beaucoup plus élevé chez les patients atteints de lymphome de Burkitt que dans la population contrôle. Ces études épidémiologiques ainsi que la démonstration *in vitro* de la capacité du virus à immortaliser les lymphocytes B (Gerber *et al.*, 1969) ont permis de démontrer pour la première fois qu'un virus humain peut être associé à un cancer. Depuis, l'EBV a également été associé à d'autres cancers comme les lymphomes de Burkitt et Hodgkin, les syndromes lymphoprolifératifs post-greffe, les carcinomes du nasopharynx ou gastriques ou bien encore certaines maladies auto-immunes.

## **B. Structure d'EBV**

Le virus d'Epstein-Barr ou HHV-4 (human herpes virus type 4) appartient à la famille des *Herpesviridae*, sous famille des *Gammaherpesvirinae*, genre *Lymphocryptovirus*. Il partage les mêmes caractères structuraux que tous les Herpesviridae : un ADN bicaténaire protégé par une capsidie icosaédrique, un tégument et une enveloppe externe.

Le génome de l'EBV se compose d'un ADN bicaténaire de 172kb codant pour quelques 86 protéines. L'ADN est linéaire dans la particule virale et porte à ses extrémités deux séquences répétitives (TR : terminal repeat) dont la séquence varie de 4 à 12 répétitions suivant les souches virales. La fusion de ces deux extrémités aboutit à la circularisation du virus, pour donner la forme épisomale sous laquelle le virus persistera lors de sa phase de latence dans les cellules infectées (Rickinson *et al.*, 2007). Pendant cette période de latence, l'EBV utilise une origine de réplication latente Ori-P pour se répliquer de façon synchrone avec la cellule infectée. Il existe une autre origine de réplication, Ori-Lyt, composée de deux régions homologues DR et DL, servant à la réplication lytique.

L'ADN est protégé par une capsidie icosaédrique. Pour former cette capsidie, 6 protéines s'arrangent en 12 pentons et 150 hexons, soit 162 capsomères, la protéine majoritaire étant la protéine VCA (viral capsid antigen). La capsidie est elle-même entourée d'un tégument et d'une enveloppe constituée d'une double couche lipidique, dans laquelle s'insèrent des glycoprotéines. Parmi ces glycoprotéines, la gp350/220 permet l'adhésion cellulaire grâce à sa liaison au récepteur CR2, appelé également CD21, ce qui correspond à la toute première étape de l'infection virale des lymphocytes B (Szakonyi *et al.*, 2006).

### C. Cycle de vie de l'EBV

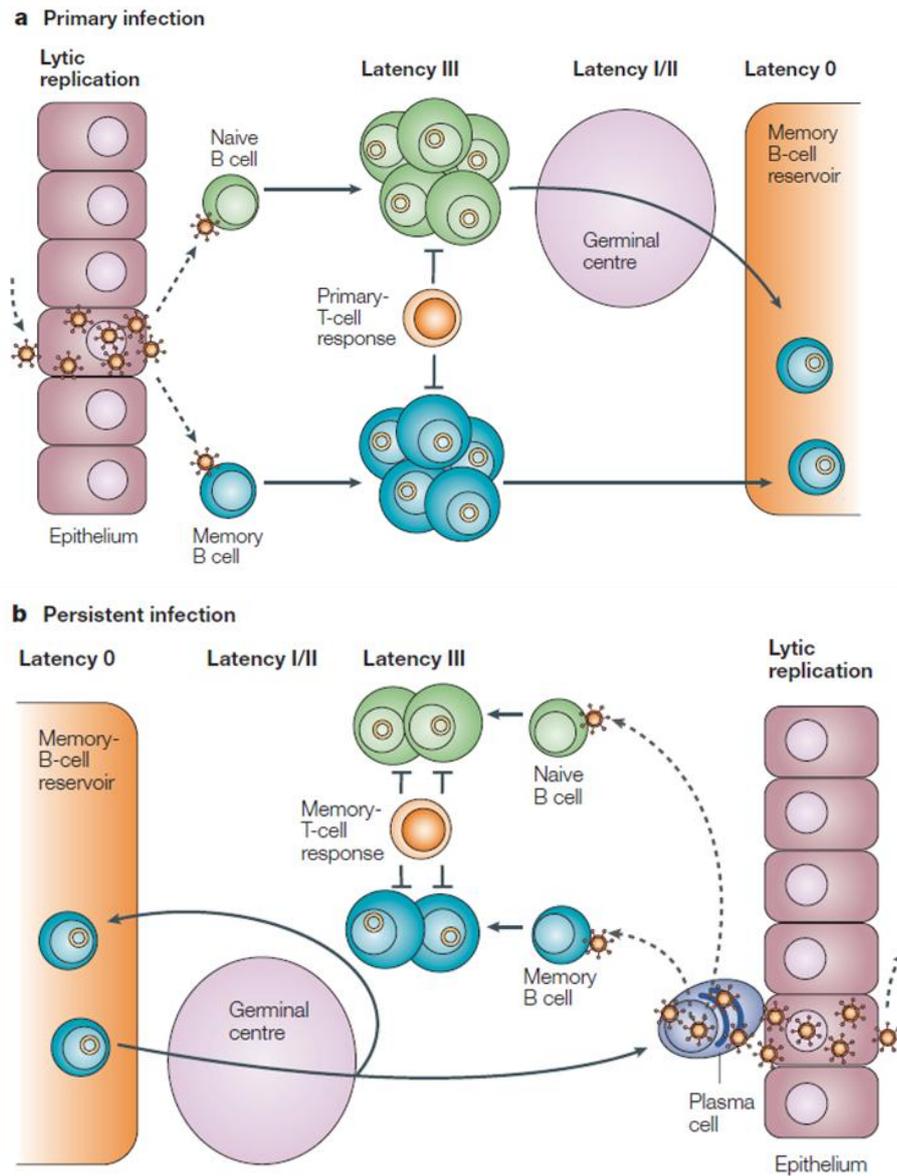
Les connaissances actuelles du cycle biologique de l'EBV viennent principalement d'expériences *in vitro* effectuées sur des lignées cellulaires continues. Il peut s'agir de lignées lymphoblastoïdes établies à partir de lymphocytes B humains normaux immortalisés par EBV ou bien de lignées lymphomateuses établies spontanément à partir de lymphocytes B malins issus de lymphomes associés à l'EBV.

#### 1. Primo-infection : Attachement et pénétration cellulaire

La première phase de l'infection est caractérisée par une infection lytique dont le siège est le tissu lymphoépithélial de l'oropharynx (Fig.2). Les lymphocytes B présents dans l'oropharynx sont les cibles préférentielles d'EBV. L'attachement de la particule virale à la membrane cellulaire des lymphocytes B se fait par une interaction entre la glycoprotéine d'enveloppe virale gp350/220 et le récepteur cellulaire CR2, appelé également CD21. L'entrée d'EBV requiert ensuite la formation d'un complexe entre les quatre glycoprotéines gH, gL, gB et gp42. Ce complexe va permettre à la gp42 d'interagir avec une molécule HLA de classe II et provoquer l'endocytose du virus (Li *et al.*, 1997).

L'entrée d'EBV dans les cellules épithéliales est un mécanisme plus complexe, non encore complètement résolu. Le taux d'expression de CD21 sur les cellules épithéliales est faible *in vitro*, et n'est pas connu *in vivo*. De même, ces cellules n'expriment pas le HLA de classe II, la présence de la gp42 n'est donc pas nécessaire. L'attachement et l'entrée de la particule virale dans les cellules épithéliales se fait grâce aux glycoprotéines gH et gL sur un récepteur gHgL (Wang *et al.*, 1998). Une seconde hypothèse est que l'infection des cellules épithéliales peut également avoir lieu par un transfert direct à partir des lymphocytes infectés *via* une synapse virale (Shannon-Lowe *et al.*, 2006). Borza *et al.* (2002) ont mis en évidence le fait que les particules virales produites par les lymphocytes B sont déficientes en gp42 et auront une plus grande capacité à infecter les cellules épithéliales, tandis que les particules virales produites par les cellules épithéliales sont riches en gp42 et auront un très haut niveau d'infectivité pour les lymphocytes B.

Chez le sujet sain, les cellules épithéliales ne semblent pas être un site où le virus établit une infection latente, mais un site d'amplification de la production virale dans la salive qui peut se maintenir pendant une longue période (Fafi-Kremer *et al.*, 2005; Hadinoto *et al.*, 2009). Cette première phase de l'infection lytique conduit à une forte production de particules virales excrétées dans la salive du sujet qui est alors très contagieux. Au cours de cette primo-infection, le virus va parallèlement établir une infection latente dans des lymphocytes B naïfs ou des



**Figure 2 : Cycle de vie du virus d'Epstein-Barr et ses interactions avec les cellules hôtes** (Young *et al.*, 2004) (a) Primo-infection : le virus transmis par la salive infecte un lymphocyte B naif ou mémoire du tissu lymphoépithélial oropharyngé soit directement, soit après passage à travers une cellule épithéliale (transcytose). Le virus établit une infection latente dans le lymphocyte B qui se transforme en lymphoblaste proliférant (latence III). La prolifération de ces cellules est contrôlée par la réponse immunitaire des lymphocytes T CD8+, seuls quelques lymphoblastes échappent à la réponse immunitaire et vont constituer un réservoir de cellules B mémoires dans lesquelles l'expression d'antigènes viraux est réduite au minimum (latence 0), sauf lors d'une division cellulaire physiologique (latence I). Cela constitue le site de persistance du virus EBV. (b) Persistance de l'infection : lors d'une stimulation antigénique, une cellule B mémoire se différencie en plasmocyte, provoquant la réactivation du virus et l'initiation du cycle lytique. Les virions produits peuvent infecter des lymphocytes B naifs ou mémoires ou les cellules épithéliales de l'oropharynx, où l'infection lytique est entretenue et amplifiée avec excrétion de virus dans la salive. La réponse immune de l'hôte (en particulier les lymphocytes T CD8+), permet de contrôler l'infection à presque tous les stades hormis lors de la phase de latence 0.

lymphocytes B mémoires, conduisant à la multiplication de lymphoblastes exprimant une latence de type III. La prolifération de ces cellules est contrôlée par une forte réponse immune menée par les lymphocytes T CD8+. Seules quelques cellules survivent en réduisant au minimum l'expression d'antigènes viraux de latence, constituant ainsi un réservoir de cellules B mémoires, de latence 0/I en fonction de l'absence ou de la présence d'expression d'EBNA-1. Ainsi, l'EBV persiste à vie dans quelques lymphocytes B mémoires (un sur un million) chez le sujet immunocompétent (Fig.2) (Thorley-Lawson *et al.*, 2005).

Le réservoir de lymphocytes B mémoires infectés par EBV est soumis au même contrôle que tous les autres lymphocytes mémoires concernant la migration et la différenciation. Occasionnellement, des cellules infectées par l'EBV sont recrutées au niveau des centres germinaux, activant différents programmes de latence, après lesquels les cellules retournent simplement dans le réservoir de lymphocytes B mémoires, ou bien se différencient en plasmocytes, retournent sur les sites de l'oropharynx et activent le cycle lytique viral (Fig.2). Les virions produits peuvent à leur tour induire le cycle lytique dans les cellules épithéliales, l'individu sera alors contagieux quelques jours, voire quelques semaines. Les plasmocytes activés seront finalement contrôlés par les lymphocytes T CD8+ ou augmenteront le réservoir de lymphocytes B mémoires.

## 2. Phase de latence

A l'état latent, le génome de l'EBV est maintenu sous forme épisomale dans la cellule hôte et n'exprime qu'un nombre de gènes limité. Chaque copie de l'épisome est répliquée par une ADN polymérase cellulaire lors du cycle cellulaire, à partir de l'origine de réplication Ori-P. Plusieurs types de latence peuvent être observés *in vitro*, associés à différentes pathologies *in vivo*. Les latences de type I, II et III sont définies en fonction du nombre de protéines exprimées (Tableau 1).

Le modèle le plus couramment utilisé *in vitro* pour étudier la latence sont les lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL), issues de l'infection de lymphocytes B humains sains par l'EBV. Ces cellules montrent un profil de latence de type III, c'est-à-dire que tous les gènes de latence sont exprimés, soit 6 antigènes nucléaires : EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-LP et 3 protéines de latence membranaires LMP1, LMP2a et LMP2b. De plus, les LCL montrent une expression abondante de petits ARN non-polyadénylés, les EBER1 et EBER2. Leur fonction n'est pas clairement décrite mais ils sont exprimés dans toutes les formes de latence. Dans les lignées lymphomateuses, l'expression des gènes de latence est variable mais plus restreinte. Il s'agit d'une latence de type I quand seuls EBNA-1 et les EBERs sont exprimés, et de latence de type II quand il y a expression de EBNA-1, LMP1, LMP2 et les EBERs. Il existe

également une latence de type 0, encore appelée « latence vraie », lors de laquelle les EBERs seuls sont exprimés. C'est le cas des lymphocytes B mémoires qui ne sont pas ciblés par le système immunitaire et constituent ainsi le site de persistance du virus (Young *et al.*, 2004, Young *et al.*, 2003).

	Latence de type 0	Latence de Type I	Latence de type II	Latence de Type III
EBNA1	-	+	+	+
EBNA2	-	-	-	+
EBNA3A,B,C	-	-	-	+
EBNALP	-	-	-	+
LMP1	-	-	+	+
LMP2A,B	-	-	+	+
EBER	+	+	+	+
BART	?	+	+	+
<u>Exemples</u>	Lymphocytes B mémoires	Lymphome de Burkitt	Lymphome de Hodgkin, Carcinome du nasopharynx	lignées cellulaires lymphoblastoïdes, Lymphomes associés au VIH, lymphoproliférations post-transplantation

**Tableau 1 : Profil d'expression des protéines virales selon le type de latence**

## LES PROTEINES DE LATENCE :

### Les antigènes nucléaires (EBNA, Epstein-Barr virus Nuclear Antigens) :

Les EBNA sont des protéines nucléaires ayant une action sur des facteurs de transcription aussi bien viraux que cellulaires.

- EBNA1 est exprimée dans toutes les cellules infectées. Elle est nécessaire à la réplication et au maintien du génome de l'EBV sous forme épisomale, via sa liaison à l'origine de réplication OriP.
- EBNA2 est essentielle à l'immortalisation des lymphocytes *in vitro*. Elle interagit avec des protéines qui reconnaissent des séquences d'ADN spécifiques (tel que RBP-Jκ) et active ainsi la transcription de gènes cellulaires comme CD21 et CD23 ou viraux tels que LMP1 et LMP2. EBNA2 semble également interagir avec l'oncogène *c-myc* afin de favoriser la prolifération des lymphocytes B.

- EBNA3 A, B et C sont des régulateurs de transcription. EBNA3 A et C sont particulièrement importantes pour la transformation des lymphocytes B *in vitro*. En se liant à RBP-J $\kappa$ , elles répriment l'activation de la transcription par EBNA-2.
- EBNA-LP interagit avec EBNA2 et est requise pour la survie des lymphocytes après la transformation *in vitro*.

#### Les protéines de latence membranaires (LMP, Latent Membrane Proteins) :

- LMP1 est la principale protéine oncogénique de l'EBV, elle est essentielle pour la transformation des lymphocytes B *in vitro*. Elle fonctionne comme un récepteur au TNF- $\alpha$  constitutivement activé et induit de nombreuses cascades de signalisation aboutissant à l'expression de cytokines et de protéines anti-apoptotiques telles que BCL2 et A20, dans le but de favoriser la survie et la croissance cellulaire.
- LMP2A et LMP2B ne sont pas nécessaires à la transformation des lymphocytes B *in vitro* mais jouent un rôle dans la prolifération et la survie cellulaire. LMP2A est capable d'induire l'expression de gènes impliqués dans l'induction du cycle cellulaire, l'inhibition de l'apoptose et la suppression de l'immunité cellulaire.

#### Les EBERs (EBV-Encoded small non polyadenylated RNAs) :

Les EBERs sont deux petits ARN non codants exprimés dans tous les types de latence. Dans des modèles cellulaires de lymphome de Burkitt, les EBERs augmentent la tumorigénicité et la survie cellulaire en induisant l'expression d'IL-10. Yajima *et al.* (2005) ont montré qu'un virus dépourvu des EBERs est capable d'infecter un lymphocyte B, mais le pouvoir transformant du virus est réduit de 100 fois. Cela suggère que les EBERs ont un rôle dans la pathogenèse des maladies associées à l'EBV et dans la persistance virale.

#### Les microARN (miRNA) :

A partir d'une lignée cellulaire issue d'un lymphome de Burkitt et infectée par l'EBV, Pfeffer *et al.* (2004) ont été les premiers à mettre en évidence que les virus expriment également des microARN. Ces miRNA sont issus de deux régions principales du génome d'EBV. La première est située à proximité du gène BHRF1 (BamHI fragment H rightward open reading frame 1) et la deuxième est localisée dans la région BART (BamHI fragment A rightward transcript), donnant ainsi leur nom aux miRNA. Les BARTs sont des petits ARN épissés de manière alternative, pour lesquels aucune protéine n'a pu être identifiée. Leur détection systématique dans les lymphocytes B infectés, aussi bien sains qu'associés à des tumeurs, suggère qu'ils aient un rôle dans la persistance virale (Forte *et al.*, 2011).

### 3. Phase de réplication - Cycle lytique

Bien que la plupart des cellules B soient infectées de manière latente par l'EBV, celui-ci peut se réactiver périodiquement et initier un cycle lytique. Le cycle lytique correspond à la phase de réplication du virus lors de laquelle les machineries enzymatiques virale et cellulaire sont exploitées pour exprimer les protéines du cycle lytique, répliquer le génome viral et produire de nouveaux virions infectieux. Ceci conduit généralement à la mort de la cellule hôte, d'où la qualification de cycle lytique.

*In vivo*, l'activation des cellules B par des antigènes viraux pourrait être un stimulus physiologique conduisant à la réactivation du cycle lytique de l'EBV. *In vitro*, il existe différents moyens d'induire le cycle lytique à partir de cellules infectées par l'EBV de manière latente. Il peut être obtenu par stimulation chimique par des esters de phorbol (TPA) et/ou l'acide butyrique (BA), ou par surexpression dans les cellules latentes du facteur de transcription ZEBRA, ou bien encore par stimulation des récepteurs des lymphocytes B (BCR) par des immunoglobulines. Le TGF- $\beta$  est également capable d'induire le cycle lytique *in vitro* dans des lignées cellulaires de lymphome de Burkitt, par un mécanisme dépendant de la protéine kinase ERK (Fahmi *et al.*, 2000). Quel que soit le stimulus, un signal nucléaire est déclenché à partir d'un ou plusieurs mécanismes et aboutit à l'activation des deux promoteurs viraux Zp et Rp des gènes BZLF1 et BRLF1 (Israel *et al.*, 2005).

La réactivation du cycle lytique de l'EBV à partir de cellules infectées de manière latente est un processus séquentiel très précisément régulé. Cela commence par l'expression de gènes très précoces qui activent l'expression de gènes précoces nécessaires à la réplication du génome viral, pour finir avec l'expression de gènes tardifs essentiellement structuraux.

#### **LES PROTEINES DU CYCLE LYTIQUE :**

##### Les protéines très précoces (IEA, Immediate Early Antigen) :

Les gènes BZLF1 et BRLF1 codent pour les protéines ZEBRA (*Bam*HI fragment **Z** Epstein-Barr **R**eplication **A**ctivator, autrement appelé Z, Zta ou EB1) et Rta (ou R). Ce sont des facteurs de transcription déclenchant toute la cascade d'expression des gènes du cycle lytique en transactivant les promoteurs des gènes précoces ainsi que leurs propres promoteurs.

##### Les protéines précoces (EA, Early Antigen) :

Les protéines précoces sont impliquées dans la réplication de l'ADN viral et dans la régulation de l'expression des protéines tardives. Parmi les protéines formant le complexe de réplication, on distingue l'ADN polymérase BALF5, la protéine de liaison à l'ADN BALF2, le complexe hélicase-primase BBLF4-BSLF1, le facteur de processivité BMRF1 ou encore l'exonucléase alcaline

BGLF5. On trouve également des protéines associées au complexe de réplication qui sont importantes pour le métabolisme des acides nucléiques, comme la déoxyuridine triphosphate nucléotidohydrolase (dUTPase) BLLF3, la thymidine kinase BXLF1 ou la ribonucléotide réductase BaRF1.

#### Les protéines tardives :

Les protéines tardives sont exprimées après la réplication du génome, ce sont des protéines de structure impliquées dans la formation de la particule virale. Elles comprennent des antigènes de capsid tels que VCA, (viral capsid antigène, BcLF1) et des antigènes de membrane comme les glycoprotéines gp110 (BALF4), gp 350/220 (BLLF1) ou gp42 (BDLF3). On trouve également la protéase (BVRF2) nécessaire à l'assemblage et à la maturation des particules virales.

ZEBRA est la première protéine virale exprimée lors de la réactivation du cycle lytique d'EBV. Elle appartient à la famille des transactivateurs bZIP (basique/leucine Zipper), avec les facteurs cellulaires c-jun et c-Fos. C'est une protéine homodimérique de 245 acides aminés qui possède un site de dimérisation, un site de fixation à l'ADN reconnaissant des séquences ZRE (Z-Responsive Elements) et un site transactivateur. La structure de la partie C-terminale de ZEBRA (résidus 175-245) en complexe avec l'ADN a pu être résolue en 2006 dans notre laboratoire. Cette étude a permis de mieux caractériser les domaines fonctionnels impliqués dans la dimérisation et la fixation à l'ADN de la protéine (Petosa *et al.*, 2006).

L'expression du gène BZLF1, peut être régulée de manière positive ou négative par la fixation de facteurs cellulaires sur les séquences régulatrices de son promoteur Zp, tel que C/EBP $\alpha$  ou MEF2-D. ZEBRA elle-même est capable de se fixer sur les sites ZRE de son promoteur et d'activer sa propre expression. De plus, des modifications post-traductionnelles de ZEBRA peuvent activer (phosphorylation) ou inhiber (oxydation, S-nitrosylation, sumoylation) ses fonctions. Par exemple la production d'oxyde nitrique (NO) dans des lignées lymphoblastoïdes a été associée à une inhibition de la réactivation virale (Mannick *et al.*, 1994).

En général, la méthylation des promoteurs cellulaires réprime leur transcription et contribue à leur mise sous silence épigénétique. Dans les lymphocytes B infectés par EBV, l'ADN viral est méthylé, la majorité des gènes est alors réprimée et la synthèse de nouveaux virions est inhibée. Une particularité de ZEBRA est sa capacité à se fixer préférentiellement sur les promoteurs de gènes méthylés (Bhende *et al.*, 2004). Ce mécanisme aberrant a certainement été mis en place par l'EBV pour surmonter la répression des gènes viraux et permettre la réplication virale.

Par ailleurs, des interactions entre des protéines cellulaires et ZEBRA permettent d'interférer avec la réactivation virale de l'EBV. La protéine CBP et le facteur oncogène c-myc

coopèrent avec ZEBRA et potentialisent ses fonctions activatrices sur le cycle lytique (Kenney *et al.*, 1992; Zerby *et al.*, 1999). D'autres protéines, en revanche, sont responsables d'une inhibition de ZEBRA, comme les récepteurs de l'acide rétinoïque qui se lient à ZEBRA au niveau de son site de dimérisation et l'empêchent ainsi de se lier à l'ADN (Sista *et al.*, 1995). L'équipe d'Alain Sergeant, en collaboration avec une équipe américaine, a décrit en 2000 un nouveau partenaire cellulaire de ZEBRA, l'Ubn, capable d'interagir avec ZEBRA et l'empêchant de se fixer sur ses séquences d'ADN cibles (Aho *et al.*, 2000) (voir le chapitre II. L'ubinucléine ou UBN-1).

La protéine ZEBRA à elle seule a la capacité d'interférer avec l'homéostasie cellulaire en interagissant directement avec des protéines cellulaires ou en régulant l'expression de gènes cellulaires. Elle interagit avec différentes protéines pour arrêter le cycle cellulaire, phénomène qui serait favorable à la réplication virale, au détriment de la réplication de l'ADN cellulaire (Israel *et al.*, 2005). Par ailleurs, des études montrent que ZEBRA régulerait la production de certaines cytokines ; par exemple, en augmentant la sécrétion des cytokines immunosuppressives comme le TGF- $\beta$  et l'IL-10. ZEBRA est également impliquée dans l'inhibition de l'expression des molécules de présentation de l'antigène du CMH de classe I et II. Ce facteur de transcription viral a donc un rôle immunomodulateur qui participe vraisemblablement à créer un microenvironnement favorable à la survie des cellules infectées par l'EBV et à échapper au système immunitaire (Chen *et al.*, 2009).

La capacité de ZEBRA à traverser les membranes cellulaires a été exploitée de manière originale par une équipe de recherche grenobloise, qui a identifié le domaine minimum de ZEBRA nécessaire à l'internalisation. Ce domaine minimum, correspondant aux acides aminés 170-220, a été fusionné à différentes protéines comme la GFP. Leurs travaux montrent une internalisation efficace de ces constructions dans différentes lignées cellulaires, par translocation directe à travers la double couche lipidique de la membrane. Ce mécanisme d'internalisation aidée par le domaine minimum de ZEBRA a une application potentielle en thérapeutique, en permettant une délivrance efficace dans les cellules de protéines biologiquement actives (Rothe *et al.*, 2010).

ZEBRA étant l'initiateur principal du cycle lytique d'EBV, la régulation de son expression est un point critique sur lequel beaucoup d'efforts sont concentrés. Il est important de rechercher, d'identifier et de caractériser tous les partenaires cellulaires de cette protéine virale clef, afin de mieux comprendre sa régulation et le mécanisme d'interaction de l'EBV avec les cellules lors de la réactivation du cycle lytique. L'enjeu est de trouver des molécules qui activent ou répriment le cycle lytique, pour les utiliser à des fins thérapeutiques.

## D. Pathogénicité

L'EBV est un virus ubiquitaire présent chez environ 95% de la population humaine adulte. La transmission du virus se fait principalement par la salive, mais il peut également se transmettre par le sang. La primo-infection est souvent asymptomatique mais peut entraîner chez l'adolescent ou le jeune adulte une mononucléose infectieuse. Le virus persiste ensuite dans l'organisme toute la vie à l'état latent dans les lymphocytes B mémoires et peut se réactiver de manière intermittente et initier un cycle lytique qui aboutit à la production de nouvelles particules virales capables d'infecter aussi un autre type cellulaire, les cellules épithéliales de l'oropharynx. La multiplication de l'EBV au niveau de la sphère oropharyngée entraîne le relargage de virions dans la salive permettant ainsi la transmission interhumaine du virus. Pendant toutes les phases du cycle biologique de l'EBV, la pression immunitaire de l'hôte assure le contrôle de l'infection (Rickinson *et al.*, 2007). Par ailleurs, l'EBV possède la propriété d'induire *in vitro* l'immortalisation des cellules B infectées et a été associé, *in vivo*, à la pathogénie de plusieurs cancers développés aux dépens des lymphocytes B comme le lymphome de Burkitt, le lymphome de Hodgkin ou les lymphoproliférations post-transplantation, ou des cellules épithéliales comme le carcinome indifférencié du nasopharynx (NPC) ou encore le carcinome gastrique.

### 1. Mononucléose infectieuse

La primo-infection à EBV survient très souvent dans la petite enfance. Les enfants de moins de 5 ans montrent une sérologie positive à l'EBV dans 50% des cas dans les pays occidentaux, et dans 100% des cas dans les pays en voie de développement. A cet âge, l'infection par l'EBV est généralement asymptomatique ou peut se révéler sous la forme d'une pharyngite discrète. Lorsque la primo-infection survient plus tard, lors de l'adolescence ou chez les jeunes adultes, elle est symptomatique dans environ 50% des cas et se manifeste par une mononucléose infectieuse (MNI). Après une incubation de 4 à 6 semaines, la MNI se caractérise par de la fièvre, des adénopathies aiguës et une angine, accompagnées souvent d'une asthénie importante. Dans 10% des cas, les patients développeront une splénomégalie ou une hépatomégalie, et de manière exceptionnelle des complications pourront apparaître, telles qu'une anémie hémolytique, une myocardite ou des complications neurologiques. Toutes ces manifestations cliniques ne sont pas dues à l'infection par le virus elle-même, mais sont le produit d'une réaction immunitaire exagérée causant une lymphoprolifération des cellules T CD8+ contre les antigènes viraux (Hislop *et al.*, 2007). Les symptômes régressent habituellement en quelques semaines, sauf l'asthénie qui peut persister plusieurs mois à une année.

## 2. Lymphomes associés à l'EBV

L'EBV est associé à environ 1% des tumeurs mondiales et touche un grand nombre de types cellulaires. A tel point que la détection d'EBV dans certains cancers est devenue une analyse de routine et est pour le médecin clinicien une aide au diagnostic, au pronostic et peut orienter la thérapeutique (Delecluse *et al.*, 2007).

### *a. Lymphoproliférations induites par l'immunosuppression*

#### - Syndrome lymphoprolifératif post-transplantation

Le syndrome lymphoprolifératif post-transplantation (SLPT) regroupe toutes les lymphoproliférations survenant après une greffe. En effet, après une greffe d'organe un traitement immunosuppresseur est administré au receveur pour prévenir d'un rejet du greffon. Les patients greffés de moelle osseuse sont conditionnés avant la greffe avec de fortes doses de radiothérapie et/ou de chimiothérapie et reçoivent après la greffe un traitement immunosuppresseur chargé de prévenir de la réaction du greffon contre l'hôte. Tous ces traitements provoquent un déficit en lymphocytes T et ces patients ont alors un risque élevé de développer des lymphomes des cellules B. La plupart des SLPT se déclarent l'année suivant la greffe, lorsque l'immunosuppression thérapeutique est la plus importante. Leur incidence et leur présentation clinique varie en fonction de l'organe transplanté, de la durée de l'immunosuppression, du dosage et du nombre d'immunosuppresseurs utilisés. Leur gravité peut aller de la simple prolifération polyclonale de lymphocytes B, qui régresse habituellement à la levée de l'immunosuppression, jusqu'au lymphome malin non-hodgkinien monoclonal et agressif, qui ne se résout pas à la levée de l'immunosuppression. La majorité des SLPT est EBV positive, 80% des cas, et montre une latence de type III, bien que des profils de latence de type I et II puissent également être trouvés (Young *et al.*, 2003, Young *et al.*, 2004).

Des lymphoproliférations semblables sont observées chez des patients avec certaines formes d'immunodéficiences héritées comme le syndrome de lymphoprolifération lié à l'X ou chez des patients traités par des immunosuppresseurs pour une maladie auto-immune. Dans ce dernier cas, les syndromes lymphoprolifératifs sont associés à l'EBV dans 50% des cas (Tran *et al.*, 2008).

Quelques cas de SLPT non associés à l'EBV ont été décrits, qui surviendraient plus tardivement après la greffe et auraient un plus mauvais pronostic que les SLPT associés à EBV.

#### - Lymphomes des patients VIH-séropositifs

Depuis une vingtaine d'années, la disponibilité des multithérapies antirétrovirales a aidé à restaurer l'immunité des personnes VIH-séropositives et a clairement permis de diminuer le taux de mortalité dû au SIDA. On a pu observer également une diminution des pathologies

associées au SIDA, avec une diminution globale du nombre de lymphomes, notamment le sarcome de Kaposi et les lymphomes non-hodgkiniens. Néanmoins, les cancers associés au VIH restent une importante cause de décès.

Les patients porteurs du VIH sont particulièrement susceptibles de développer des pathologies associées à l'EBV. En effet, au cours de l'évolution de leur maladie, ces patients pourront présenter différents types de lymphomes, associés à EBV dans 30 à 100 % des cas selon le lymphome. Chez les patients VIH-séropositifs, l'association à l'EBV est de 50-70% pour les lymphomes malins non-Hodgkiniens et de seulement 30-40% dans le cas des lymphomes de Burkitt. Le pourcentage d'association de l'EBV aux lymphomes de patients VIH-séropositifs monte jusqu'à 80-100% dans les cas de lymphome de Hodgkin et 90-100% pour les lymphomes immunoblastiques et cérébraux primitifs. Les trois types de latence d'EBV ont été décrits dans les différentes manifestations lymphoprolifératives associées au VIH (Young *et al.*, 2003).

#### *b. Lymphomes B*

##### - Lymphome de Burkitt

En Afrique sub-saharienne, le lymphome de Burkitt est endémique avec une incidence annuelle de 5 à 10 cas pour 100 000 enfants. Dans plus de 90% des cas, on le trouve associé à l'EBV. Dans le reste du monde, les cas sont sporadiques et sont associés à l'EBV dans seulement 15% des cas. Le facteur principal de la pathogenèse du lymphome de Burkitt est une translocation chromosomique impliquant le bras long du chromosome 8 (8q24), dans la région du proto-oncogène *c-myc*. Cette translocation conduit à la dérégulation de l'expression de l'oncogène *c-myc* favorisant l'apparition de cellules cancéreuses. Le rôle d'EBV n'est pas clairement élucidé, mais l'expression des gènes de latence de type I, EBNA1 et les EBERs, pourrait avoir un rôle dans la sélection et la prolifération des cellules malignes (Young *et al.*, 2003).

On constate une corrélation entre la répartition des lymphomes de Burkitt endémiques et celle du paludisme qui est reconnu comme étant avec EBV un cofacteur des lymphomes de Burkitt. Certaines protéines de l'agent du paludisme, *P. falciparum*, tel qu'un domaine riche en cystéine de l'antigène membranaire (CIDR1 $\alpha$ ), sont impliquées dans l'activation de lymphocytes B et peuvent également jouer un rôle dans la réactivation d'EBV (Chene *et al.*, 2007).

##### - Lymphome de Hodgkin

La maladie de Hodgkin est caractérisée par une prolifération de cellules lymphoïdes B atypiques malignes : les cellules de Reed-Sternberg (RSC), représentant environ 2% de la population cellulaire dans la tumeur. L'existence de lymphomes de Hodgkin non associés à l'EBV soulève la question de savoir si l'EBV est réellement un agent étiologique de cette pathologie.

Mais, malgré les incertitudes concernant la nature et l'origine des RSC, beaucoup d'arguments suggèrent que l'EBV doit être considéré comme un facteur de risque dans la pathogenèse de ces lymphomes.

En effet, l'EBV est retrouvé dans les RSC dans 30 à 50% des cas dans les pays occidentaux et jusqu'à 90% des cas dans les pays en développement. Si l'on amplifie l'ADN viral, on retrouve l'EBV dans les lymphocytes B normaux entourant les RSC dans 60 à 80% des cas. Plusieurs études utilisant des techniques d'hybridation ont montré la clonalité du virus dans les tissus de lymphome de Hodgkin. Cela démontre que l'infection par l'EBV des cellules B précède leur cancérisation et leur expansion clonale. D'autre part, des études sérologiques montrent que la plupart des patients développant un lymphome de Hodgkin ont un taux d'anticorps anti-EBV élevé au diagnostic. Par immunohistochimie on peut voir que les RSC infectées par EBV expriment les protéines de latence EBNA1, LMP1 et LMP2, caractéristiques d'une latence de type II (Dolchetti *et al.*, 1998).

#### *c. Lymphomes des cellules T*

L'EBV a été relié également à différents lymphomes touchant les cellules T, bien que la cible préférentielle d'infection par l'EBV soit les lymphocytes B. Un exemple commun en Asie est un lymphome extranodal qui se présente sous forme d'une lésion érosive dans la cavité nasale. Ce type de lymphome dériverait de cellules cytotoxiques infectées par l'EBV ayant pour origine soit un lymphocyte T, soit une cellule NK (Young *et al.*, 2004).

### 3. Carcinomes associés à l'EBV

#### *a. Carcinome indifférencié du nasopharynx*

Le carcinome indifférencié du nasopharynx (NPC), cancer des cellules épithéliales, est très répandu en Chine, où il représente 20% des cancers. Il est présent également en Asie du sud-est et autour du bassin méditerranéen. Les patients atteints de carcinome du nasopharynx présentent un taux élevé d'anticorps anti-EBV, et la présence d'ADN d'EBV a été observée dans 100% des carcinomes indifférenciés du nasopharynx étudiés, suggérant l'association entre le virus et ce carcinome. L'antigène nucléaire EBNA1 est exprimé dans 100% des cas et on retrouve également l'expression des protéines de latence LMP2A, LMP2B et les transcrits BARTs. La protéine de latence LMP1 n'est exprimée que dans 10% des cas. Cela correspond à une latence de type II. L'hybridation d'ADN dans les tissus de NPC a démontré la monoclonalité des génomes viraux présents, indiquant que l'infection par EBV a lieu avant l'expansion clonale. Des études plus récentes utilisant la PCR quantitative en temps réel pour mesurer l'ADN d'EBV dans le sang de patients avec un NPC ont montré que le taux d'ADN d'EBV avant le traitement est étroitement

associé avec la survie globale et que le niveau d'ADN EBV post-traitement est un bon marqueur de prédiction de la survie globale (Young *et al.*, 2004).

#### *b. Cancer du sein*

L'étude de l'implication d'EBV dans le développement des cancers du sein montre des disparités dans la détection du génome et de l'expression des protéines virales. En effet selon les techniques utilisées le pourcentage de tumeurs EBV-positives peut varier de 6,7 à 51%. Comme EBV n'est détecté que dans un nombre limité de cas de cancers du sein, il semble peu probable qu'il en soit un agent étiologique. En revanche, il pourrait contribuer à la carcinogénèse en augmentant les propriétés oncogéniques de la tumeur telles que l'angiogénèse, l'invasivité ou le développement de métastases (Arbach *et al.*, 2005).

#### *c. Carcinome gastrique*

Les plus importants facteurs de risque pour ce cancer sont les prédispositions génétiques et les facteurs environnementaux. EBV n'est retrouvé que dans 10% des adénocarcinomes gastriques. Il exprime alors une latence similaire à celle des NPC, avec expression des protéines de latence EBERs, EBNA1, LMP2a et BARTs, mais pas d'expression de LMP1 ni des autres EBNAs. Les carcinomes gastriques EBV-positifs montrent des caractéristiques phénotypiques et cliniques distinctes par rapport aux tumeurs EBV-négatives, dont une augmentation de la survie des patients. Il existe d'importantes variations géographiques à l'association avec EBV, due peut-être à des différences ethniques ou génétiques. Le rôle précis de l'EBV dans la pathogénèse du carcinome gastrique reste à déterminer, mais l'absence d'EBV dans les lésions pré-malignes suggère que l'infection virale arrive tardivement dans la carcinogénèse (Young *et al.*, 2004).

## E. Traitements antiviraux

Les molécules antivirales potentiellement efficaces lors d'une infection aiguë par EBV sont celles qui inhibent son cycle lytique. Afin d'empêcher la réplication du virus, de nombreuses molécules ciblent l'ADN polymérase virale. C'est le cas des analogues nucléosidiques tels que l'aciclovir, le ganciclovir et leurs prodrogues respectives, ainsi que des analogues nucléotidiques, le cidofovir et l'adéfovir. Ils sont incorporés à l'ADN par l'ADN polymérase virale lors de la réplication et empêchent l'élongation de la chaîne d'ADN. Les analogues nucléosidiques ont la particularité de devoir être phosphorylés par une kinase virale pour être actifs. Lors de son cycle lytique, l'EBV code pour deux kinases : la thymidine kinase codée par le gène BXL1 et une protéine kinase codée par le gène BGLF4. Cela confère à ces molécules une très bonne spécificité antivirale puisqu'ils sont activés uniquement dans les cellules infectées par le virus. Le foscarnet est un analogue du pyrophosphate qui inhibe également l'ADN polymérase virale, sans affecter l'ADN polymérase humaine. Il est souvent utilisé lorsqu'on observe une résistance du virus à l'aciclovir ou au ganciclovir par perte d'activité de la thymidine kinase. L'aciclovir a montré une bonne efficacité sur l'inhibition de la réplication d'EBV en culture cellulaire (Datta *et al.*, 1980). En revanche les essais cliniques n'ont pas montré de bénéfice significatif de l'aciclovir par rapport à un placebo dans le traitement de la mononucléose infectieuse (Torre *et al.*, 1999, Van der Horst *et al.*, 1991). Si bien qu'en pratique clinique, l'aciclovir n'est utilisé que pour soigner la leucoplasie orale chevelue (Resnick *et al.*, 1988).

D'autres molécules ont été testées pour leur efficacité à inhiber la réplication des herpesvirus par d'autres modes d'action que l'inhibition de l'ADN polymérase (Gershburg *et al.*, 2005). Par exemple, le maribavir est un ribonucléoside utilisé pour le traitement des infections à CMV et EBV, dont le mécanisme d'action n'est pas complètement élucidé. Il semble inhiber les protéines kinases virales et intervenir dans la maturation des virions. Les 4-oxo-dihydroquinolines sont des composés non nucléosidiques qui ont montré un large spectre d'activité contre les herpesvirus. Elles semblent affecter l'ADN polymérase virale, mais par un mode d'action différent de celui de l'aciclovir. Malheureusement, aucun de ces composés n'a pu dépasser les essais cliniques de phase III (Gershburg *et al.*, 2005).

La protéase virale d'EBV sert à la maturation de la capside et à l'encapsidation de l'ADN viral. Elle est nécessaire à la production de particules virales infectieuses. Un travail réalisé dans notre laboratoire a montré que l'utilisation d'ARN interférant (siRNA) ciblant le gène de la protéase virale est capable d'inhiber *in vitro* la réplication d'EBV (Larrat *et al.*, 2009). Le ciblage

de cette enzyme pourrait donc être une nouvelle stratégie thérapeutique dans les pathologies associées à l'EBV impliquant une réplication de l'EBV.

Mises à part la MNI et la leucoplasie orale chevelue, les autres pathologies associées à l'EBV sont caractérisées par une infection latente. La réplication de l'épisome viral est alors assurée par une ADN polymérase cellulaire aidée d'autres enzymes de la machinerie cellulaire. Ces enzymes ne sont pas affectées par les molécules antivirales dirigées contre le cycle lytique qui ne sont donc pas efficaces dans ce contexte. L'induction du cycle lytique dans les cellules tumorales associées à l'EBV a alors été envisagée comme stratégie thérapeutique, basée sur le fait que la réplication virale cause la lyse de la cellule infectée et pourrait donc détruire les cellules EBV-positives. Quelques approches sont rapportées avec l'utilisation de produits de chimiothérapie comme la doxorubicine (Feng *et al.*, 2002a et 2004) et des radiations qui induisent la réactivation du cycle lytique. La combinaison de ces inducteurs avec du ganciclovir a montré des progrès dans le traitement de modèles animaux (Feng *et al.*, 2002a, Roychowdhury *et al.*, 2003) et sont en phase d'étude clinique I et II.

D'autres approches pharmacologiques s'attachent à cibler une à une les protéines de latence d'EBV afin de diminuer leur effet. La suppression d'expression de LMP1 par des nucléotides antisens dans des lignées lymphoblastoïdes EBV-positives a montré une inhibition de la prolifération cellulaire, une stimulation de l'apoptose et une sensibilité accrue aux agents de chimiothérapie comme l'étoposide (Kenney *et al.*, 1998). Cela suggère que la diminution de l'expression de LMP1 dans les pathologies associées à l'EBV pourrait avoir un effet thérapeutique et synergique avec des agents antitumoraux. D'autres recherches sont menées sur le même principe pour inhiber les effets d'EBNA1 et EBNA-2.

La thérapie génique a également été envisagée pour exprimer des protéines cytotoxiques ou inhibitrices ou pour induire le cycle lytique dans les cellules tumorales EBV-positives. Ainsi, des constructions contenant l'origine de réplication OriP, répondant à EBNA1 endogène dans les cellules EBV-positives, ont été utilisées pour exprimer des protéines cytotoxiques comme le FAS-ligand ou des protéines anti-tumorales comme la protéine p53 dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de cancer du nasopharynx (Li *et al.*, 2002, Li *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'injection d'un vecteur adénoviral recombinant comportant les gènes BZLF1 et BRLF1 dans une tumeur de NPC induite chez la souris SCID a entraîné une régression de la tumeur alors que le vecteur contrôle n'avait aucun effet (Feng *et al.*, 2002b).

Encore aujourd'hui il n'existe pas de vaccin préventif ni curatif contre l'EBV. En revanche, l'immunothérapie cellulaire dans le cadre des pathologies associées à l'EBV est une voie en développement. Les premières études ont été menées sur des lymphoproliférations post-transplantation. Des patients ayant reçu une greffe de moelle osseuse ont été transfusés avec des lymphocytes T effecteurs sensibilisés aux antigènes de latence de l'EBV, préparés à partir de la moelle osseuse du donneur par stimulation autologue des lignées cellulaires lymphoblastoïdes et expansion *in vitro* (Rooney *et al.*, 1995). Cette stratégie s'est montrée très efficace en prévention et pour le traitement des lymphoproliférations. Depuis, cette technique a été adaptée pour des lymphoproliférations lors de transplantations d'organes, pour le traitement de lymphome de Hodgkin et des cancers du nasopharynx. La limite de l'immunothérapie réside dans le temps nécessaire pour produire les lymphocytes T effecteurs et dans la lourdeur de ces procédures. De plus, les lymphocytes ainsi préparés sont souvent dirigés contre les protéines immunodominantes EBNA3A, EBNA3B et EBNA3C qui ne sont pas exprimées dans toutes les tumeurs associées à l'EBV. Les récentes améliorations portent sur la préparation de lymphocytes T enrichis en CD8+ et CD4+ dirigés contre LMP2a et EBNA1 (Wagner *et al.*, 2003, Paludan *et al.*, 2002), et sur l'immunisation des patients avec des constructions antigéniques pour amplifier ces réponses *in vivo* (Taylor *et al.*, 2004).

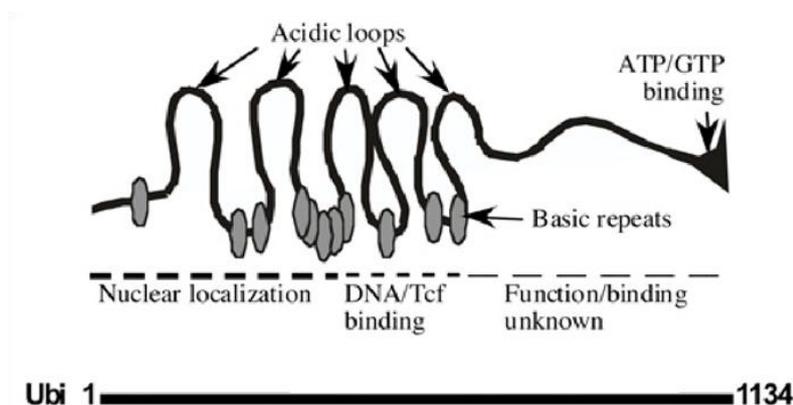
## II. L'Ubinucléine ou UBN-1

### A. Découverte d'une nouvelle protéine nucléaire interagissant avec ZEBRA

La recherche systématique de partenaires cellulaires de la protéine virale ZEBRA par criblage d'une banque de cDNA a permis à l'équipe d'E. Manet et H. Gruffat (INSERM U758, Lyon) de décrire l'ubinucléine ou Ubn-1, en collaboration avec des chercheurs américains (Aho *et al.*, 2000).

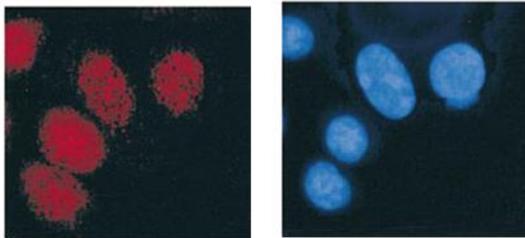
Le gène codant pour l'ubinucléine, *UBN1*, est situé sur le bras court du chromosome 16. Il se répartit en 18 exons couvrant environ 70kb. La protéine encodée possède 1134 acides aminés avec une masse moléculaire théorique de 121 529Da. C'est une protéine basique avec un pI de 9,34 riche en sérines et lysines. Les prédictions de structure secondaires suggèrent que la partie N-terminale de l'Ubn, riche en acides aminés chargés, forme plusieurs hélices  $\alpha$ , tandis que la partie C-terminale plus riche en acides aminés polaires et non polaires serait plus favorable à la formation de feuillets  $\beta$  (Fig.3).

On retrouve dans la partie N-terminale de l'Ubn une alternance de sites acides et basiques, favorisant la formation de structures secondaires connues pour interagir avec l'ADN. Elle est d'ailleurs un homologue de Hpc2c, une protéine chaperonne d'histone faisant partie du complexe HIRA, qui régule les histones et la transcription (Banumathy *et al.*, 2008, Balaji *et al.*, 2008). L'Ubn possède plusieurs séquences signal de localisation nucléaire, et de nombreux sites potentiels de phosphorylation, cibles de plusieurs kinases comme les protéines kinases A et C, la caséine kinase II et l'AMPcyclophosphokinase, avec une région particulièrement riche en sérines dans le domaine C-terminal (866-932).



**Figure 3 : Représentation schématique de l'ubinucléine** (Aho *et al.*, 2009) La partie N-terminale est responsable de la localisation nucléaire de l'Ubn et un regroupement de sites basiques crée un domaine favorable à la liaison avec l'ADN. La partie C-terminale de l'Ubn n'a pas de fonction connue mais possède un site de liaison à l'ATP ou au GTP.

L'Ubn est exprimée dans de nombreux tissus et a été mise en évidence initialement dans des noyaux de kératinocytes en culture (Fig.4). Elle est fortement conservée entre les espèces. L'usage de deux promoteurs alternatifs (détectés dans la population d'ARNm par RT-PCR) suggère la possibilité d'une expression des transcrits spécifique des tissus et constitutive ou inductible.

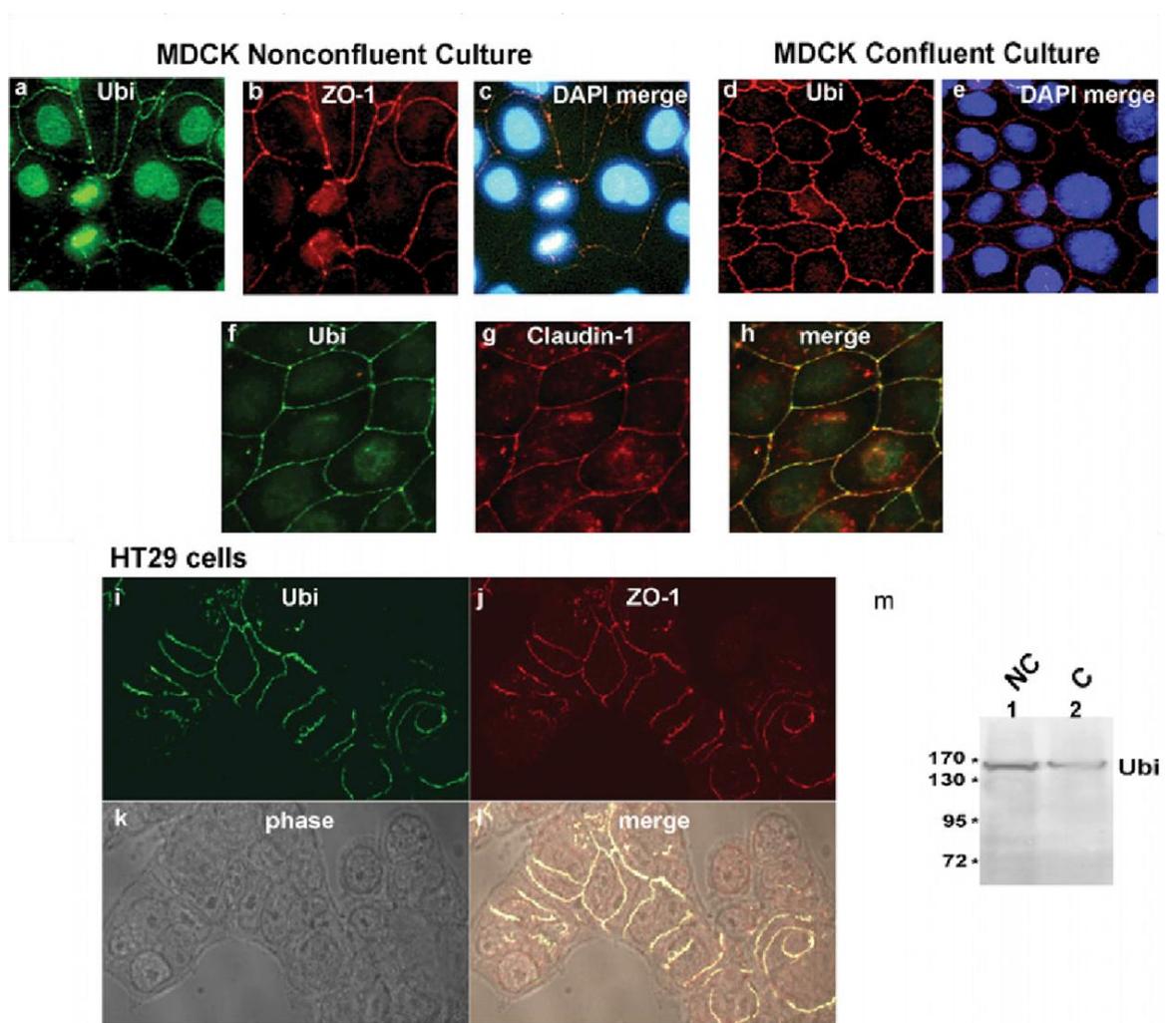


**Figure 4 : Localisation nucléaire de l'ubinucléine visualisée en microscopie à fluorescence** (Aho *et al.*, 2000) en rouge le marquage immunofluorescent de l'Ubn, en bleu les noyaux marqués au DAPI dans des kératinocytes de prépuce en culture

## **B. Double localisation cellulaire de l'Ubn et interaction avec les protéines ZO**

Par la suite, des travaux menés dans notre laboratoire ont permis de montrer une double localisation de l'Ubn dans les cellules épithéliales. En effet, celle-ci est retrouvée dans le noyau mais aussi au niveau des jonctions serrées, l'Ubn appartient donc à la famille des protéines NACos (Nuclear and Adhesion Complex proteins) qui ont la particularité d'avoir cette double localisation cellulaire (Aho *et al.*, 2009).

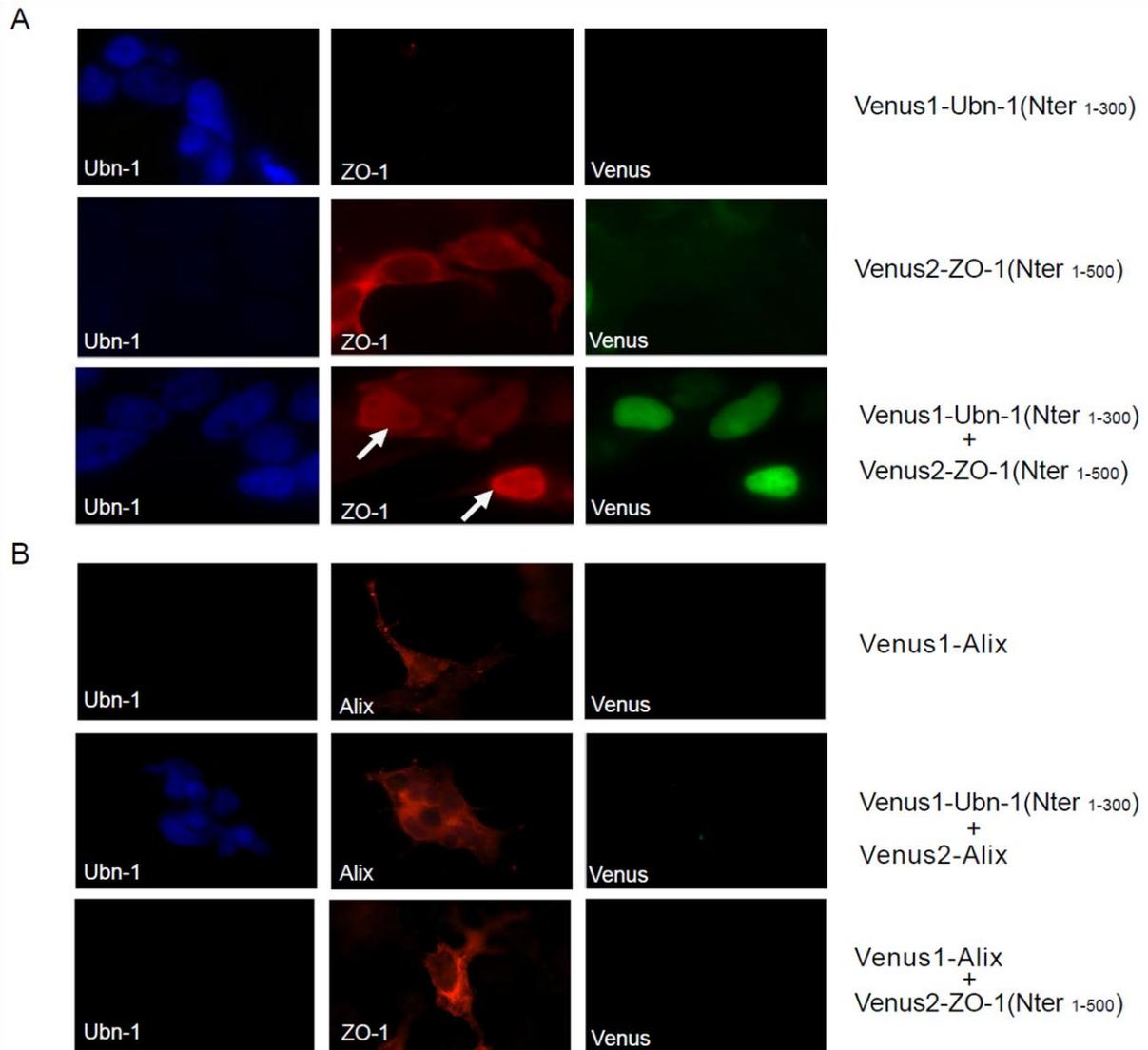
Des études microscopiques sur des cellules MDCK et HT29 montrent que l'Ubn endogène colocalise avec ZO-1, l'occludine et claudine-1 qui sont trois protéines principales des jonctions serrées (Fig.5). Par ailleurs, à faible confluence des MDCK (cellules cancéreuses de rein indifférenciées), l'Ubn est principalement nucléaire, alors que dans des MDCK à confluence, elle est présente exclusivement au niveau des jonctions serrées. Dans les cellules HT29 (cellules cancéreuses de colon différenciées en monocouche polarisée), l'Ubn n'a jamais été détectée dans le noyau, mais toujours au niveau des jonctions serrées en colocalisation avec ZO-1. Ces observations suggèrent que la localisation de l'Ubn dépend à la fois du degré de confluence et du niveau de différenciation des cellules épithéliales (Fig.5).



**Figure 5 : L'ubinucléine endogène colocalise au niveau des jonctions cellulaires avec ZO-1 et claudine-1.** (Aho *et al.*, 2009) Culture de MDCK non confluentes avec un double immunomarquage pour l'Ubn (vert, a) et ZO-1 (rouge, b). Les noyaux sont visualisés par un marquage au DAPI et on peut voir la superposition de ces trois marquages en (c). Culture de MDCK confluentes immunomarquées pour l'Ubn (rouge, d) et superposition avec le marquage au DAPI (e). Culture de MDCK confluentes immunomarquées pour l'Ubn (vert, f) et la claudine-1 (rouge, g). La superposition des images montre leur colocalisation (h). L'Ubn et ZO-1 colocalisent dans les jonctions serrées de cellules HT29. Culture de HT29 doublement marquées pour l'Ubn (vert, i) et ZO-1 (rouge, j) L'image en contraste de phase (k) et la superposition (l) montrent la correspondance exacte des marquages Ubn et ZO-1. (m) Western blot anti-Ubn de MDCK non confluentes (NC) ou confluentes (C).

Afin de mieux caractériser l'interaction entre l'Ubn et ZO-1, nous avons utilisé une technique de complémentation de fluorescence montrant *in vivo* que la région N-terminale de l'Ubn (acides aminés 1-300) interagit avec la région N-terminale de ZO-1 (acides aminés 1-500). L'Ubn-N-ter et ZO-1-N-ter ont toutes deux été fusionnées à une partie N-ter ou C-ter d'une protéine fluorescente, Vénus. Lorsque ces constructions sont exprimées dans des cellules, si les protéines étudiées interagissent, la protéine Vénus entière se reconstitue et émet un signal fluorescent. C'est le cas ici entre l'Ubn et ZO-1, alors qu'en présence d'une protéine contrôle, Alix, aucune fluorescence n'est observée (Fig.6). Cela prouve la spécificité de l'interaction entre l'Ubn et ZO-1 *in vivo*. Il est à noter que la co-expression de l'Ubn-N-ter avec ZO-1-N-ter a induit la relocalisation de ZO-1-N-ter du cytoplasme vers le noyau suggérant une interaction fonctionnelle entre l'Ubn et ZO-1. ZO-1 a déjà été décrit dans les noyaux de certaines cellules et sous des conditions spécifiques. Ainsi, nos résultats suggèrent que l'Ubn serait un partenaire de ZO-1 influençant sa localisation nucléaire.

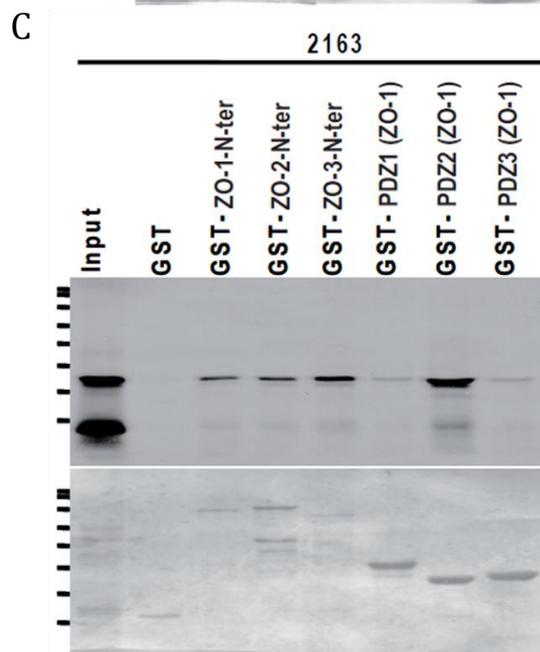
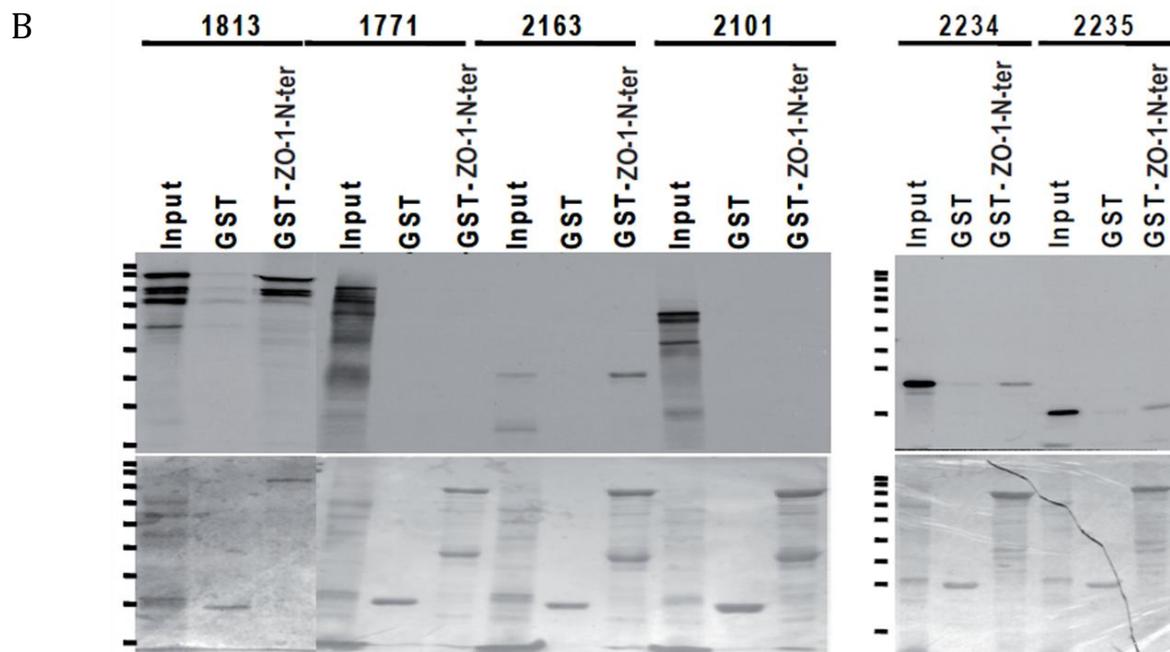
Les domaines d'interaction entre les deux protéines ont ensuite été précisés grâce à des expériences de GST-pulldown. En incubant différentes constructions d'Ubn *in vitro* avec la protéine recombinante GST-ZO-1 incluant les 3 domaines PDZ de ZO-1 ou chacun de ses domaines PDZ, nous avons pu montrer que l'Ubn interagit spécifiquement avec le domaine PDZ2 de ZO-1. De même, nous avons pu réduire la région de l'Ubn responsable de l'interaction avec ZO-1 à une région de 38 acides aminés (résidus 39 à 77) (Fig.7) (Lupo *et al.*, article en révision).



**Figure 6 : Interaction in vivo entre les parties N-terminales de l'ubiquitine et de ZO-1 visualisée par une technique de complémentation de fluorescence.** (Lupo *et al.*, article en révision) A. La cotransfection de Vénus1\_Ubn-1(N-ter1-300) et Vénus2\_ZO-1(N-ter1-500) dans des cellules 293 provoque un signal fluorescent vert, absent avec les constructions exprimées séparément. Lorsque Vénus2\_ZO1(N-ter1-500) est surexprimé seul, il montre un signal cytosolique et périnucléaire, alors qu'en cotransfection avec Venus1\_Ubn-1(N-ter1-300), le signal de ZO-1 est restreint au noyau (flèches). B. Les expériences menées avec des protéines contrôle Vénus1\_Alix et Vénus2\_Alix montrent qu'il n'y a pas de signal non spécifique entre les protéines Vénus1 et Vénus2. L'Ubn est marquée en bleu, ZO-1 et Alix sont marqués en rouge, la fluorescence de Vénus apparaît en vert.

**A Ubn-1 constructs:**

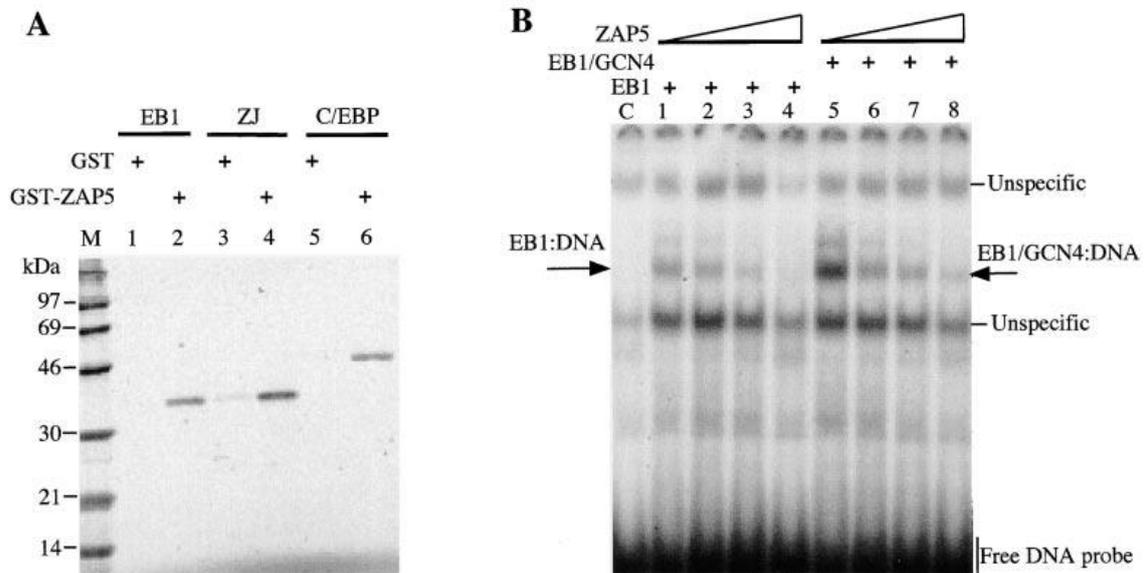
Construct	aa	Interaction
p1813	1134	+
p1771	887	-
p2163	249	+
p2101	693	-
p2234	163	+
p2235	77	+



**Figure 7 : Définition des domaines d'interaction de l'ubiquitine et de ZO-1.** (Lupo *et al.*, en révision) A. Description des différentes constructions de l'Ubn. Pour chaque mutant est indiqué le nombre d'acides aminés (aa) ainsi que la présence (+) ou l'absence (-) d'interaction avec la GST-ZO-1-N-ter. B. Expériences de GST-pull-down. Les constructions d'Ubn marquées par de la méthionine<sup>[35S]</sup> ont été incubées avec la GST ou GST-ZO-1Nter (contenant les trois domaines PDZ de ZO-1 fusionnés à la GST) (panneau supérieur). La quantité de GST et GST-ZO-1Nter utilisée est contrôlée par coloration de la membrane au rouge ponceau (panneau inférieur). C. Expérience de GST-pull-down avec la construction d'Ubn p2163 marquée à la méthionine<sup>[35S]</sup> incubée avec la GST, GST-ZO-1, ZO2 ou ZO3 (N-terminal) ou chaque domaine PDZ de ZO-1 fusionné à la GST.

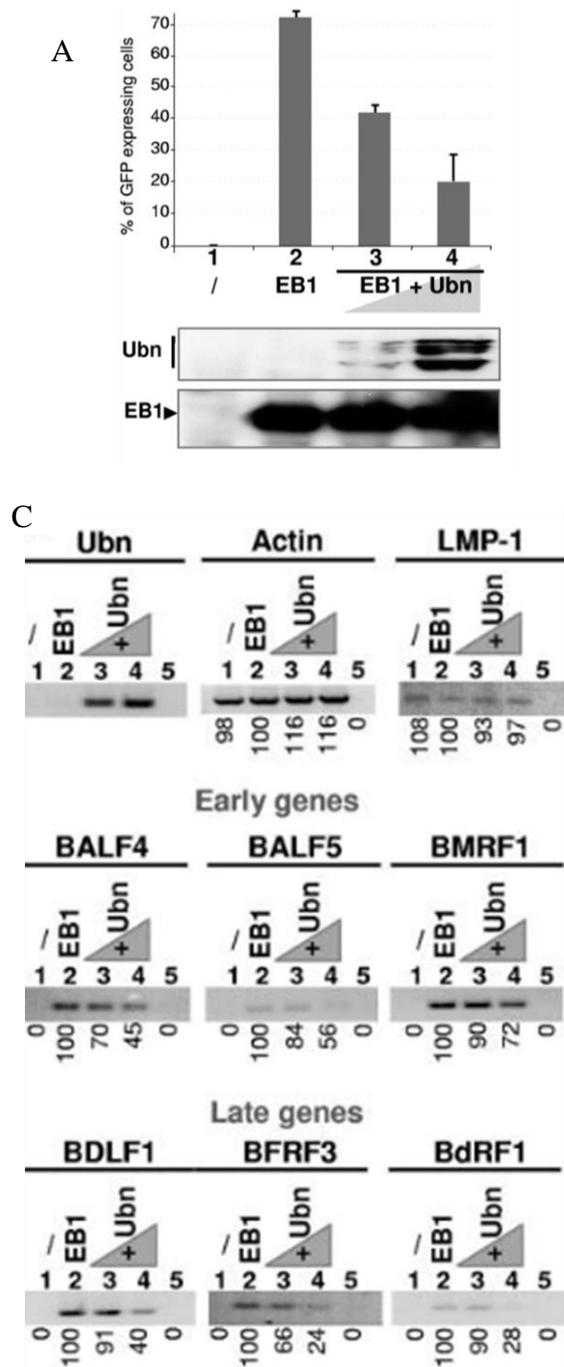
### C. Rôle de l'ubinucléine dans la régulation du cycle lytique de l'EBV

L'Ubn a été découverte initialement en étudiant les partenaires cellulaires du facteur de transcription viral ZEBRA. Les premières études ont montré qu'elle interagit avec des facteurs de transcription de la famille des protéines bZIP, il peut s'agir de facteurs de transcription viraux comme ZEBRA ou de facteurs de transcription cellulaires tels que c-Jun et C/EBP. L'interaction de l'Ubn avec ZEBRA empêche ce dernier de se dimériser et de se fixer à ses séquences d'ADN cibles, contenant une séquence consensus AP1, suggérant un rôle de l'Ubn dans la régulation des fonctions de ce facteur de transcription (Fig.8) (Aho *et al.*, 2000).



**Figure 8 : Interaction de l'ubinucléine avec le domaine basique de différents facteurs de transcription.** (Aho *et al.*, 2000) A. Expérience de GST-pull-down entre la partie 204-1134 de l'Ubn fusionnée à la GST (=GST-ZAP5) et ZEBRA (=EB1), ZI (le domaine basique de ZEBRA a été remplacé par le domaine basique de c-Jun), et C/EBP. B. Les expériences de mobilité de l'ADN(EMSA) montrent que l'Ubn-ZAP5 se lie à ZEBRA et à la construction de ZEBRA EB1/GCN4 correspondant à ZEBRA dont le domaine de dimérisation a été remplacé par le domaine de dimérisation d'un facteur de transcription de levure. Cela empêche alors leur liaison à un oligonucléotide contenant la séquence consensus AP1.

Nous avons collaboré ensuite avec l'équipe d'Evelyne Manet et d'Henri Gruffat pour étudier plus spécifiquement le rôle de l'Ubn dans les cellules infectées par l'EBV. Dans les cellules 293 infectées de manière stable par l'EBV, la surexpression de ZEBRA induit une forte réplication de l'ADN viral, l'expression des gènes précoces et tardifs du cycle lytique et permet la production de particules virales infectieuses capables d'infecter un autre type cellulaire, les cellules Raji. Lorsque dans ces mêmes cellules, l'Ubn est surexprimée, on observe une diminution de l'expression des gènes précoces et tardifs du cycle lytique, une nette diminution

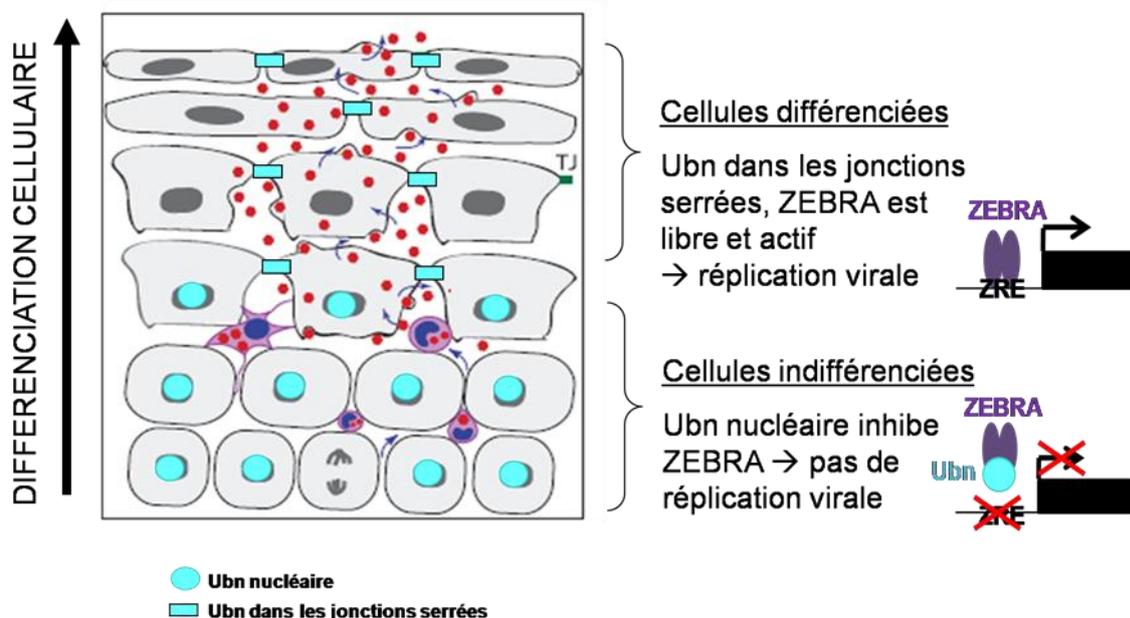


**Figure 9 : Effet de l'ubiquitine sur le cycle lytique d'EBV.** (Gruffat *et al.*, 2011) A. La surexpression d'Ub diminue la production de particules virales. Cellules Raji incubées avec 1ml de surnageant de culture de 293EBV-GFP transfectées ou non par ZEBRA (EB1) et co-transfectées avec des quantités croissantes d'Ub. Le panneau inférieur confirme l'expression de ZEBRA et Ub dans les 293EBV-GFP par western blot. La quantité de cellules Raji exprimant la GFP a été déterminée par cytométrie de flux. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard observée sur cinq expériences. B. La surexpression d'Ub diminue la réplication de l'ADN viral. ADN viral extrait de 293EBV-GFP transfectées ou non par ZEBRA et co-transfectées avec des quantités croissantes d'Ub a été quantifié par southern blot en utilisant l'amorce BRRF1 (panneau inférieur). La quantification des southern blots est présentée dans le graphique supérieur comme une quantité relative d'ADN viral observé en prenant pour référence unitaire la quantité d'ADN présent dans les

cellules avant l'activation du cycle lytique. Les barres d'erreurs représentent la déviation standard observée au cours de trois expériences. C. La surexpression d'Ub diminue l'expression des gènes précoces et tardifs du cycle lytique. Des cellules 293EBV-GFP ont été soit non transfectées (1), soit transfectées par ZEBRA (2) soit co-transfectées par ZEBRA et une quantité croissante d'Ub (3 et 4). L'ARN total a été purifié, rétro-transcrit et analysé par PCR en utilisant des amorces spécifiques pour l'actine (utilisées pour contrôler la qualité de la purification des ARNm et pour normaliser la quantité d'ARNm utilisé à chaque condition), Ub, la gène de latence LMP-1, les gènes précoces BALF4, BALF5, et BMRF1, et les gènes tardifs BDLF1, BFRF3, and BdRF1. La colonne 5 représente le résultat de l'amplification par PCR en l'absence de reverse-transcriptase. Les résultats de la quantification de PCR sont indiqués sous chaque panneau et sont exprimés relativement à la quantité d'ADN amplifié en (2).

du nombre de particules virales produites ainsi qu'une diminution de la réplication de l'ADN viral et cela de manière dose-dépendante (Fig.9). A l'inverse, l'inhibition de l'expression de l'Ubn par shARN est associée à une augmentation de la production de particules virales infectieuses. Par ailleurs, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine ont mis en évidence qu'*in vivo* l'Ubn diminue la quantité de ZEBRA lié sur ses promoteurs habituels et sur l'origine de réplication lytique oriLyt (Gruffat *et al.*, 2011).

Enfin, l'étude de l'expression de ZEBRA dans des cellules MDCK et des cellules AGS a montré que l'expression de ZEBRA augmente en même temps que le niveau de confluence des cellules. Cela est corrélé avec la relocalisation de l'Ubn au niveau des jonctions serrées. Tous ces résultats démontrent l'existence d'une relation étroite entre la densité cellulaire, la localisation de l'Ubn et l'expression de ZEBRA dans les cellules épithéliales infectées par l'EBV et nous permettent de proposer un modèle de contrôle du cycle lytique dans les cellules épithéliales. Dans les cellules indifférenciées, l'Ubn est nucléaire et elle interagirait avec le facteur de transcription viral ZEBRA afin d'inhiber le cycle viral productif de l'EBV. En revanche, dans les cellules différenciées, condition où l'Ubn est séquestrée dans les jonctions serrées, l'Ubn ne compromettrait pas le déroulement normal du cycle lytique (Fig.10). Comme d'autres virus oncogènes interférant avec des protéines des jonctions serrées (Nakagawa *et al.*, 2000, Glaunsinger *et al.*, 2000) l'EBV pourrait déréguler les fonctions de l'Ubn dans le but d'assurer son cycle lytique et persister chez l'hôte infecté.



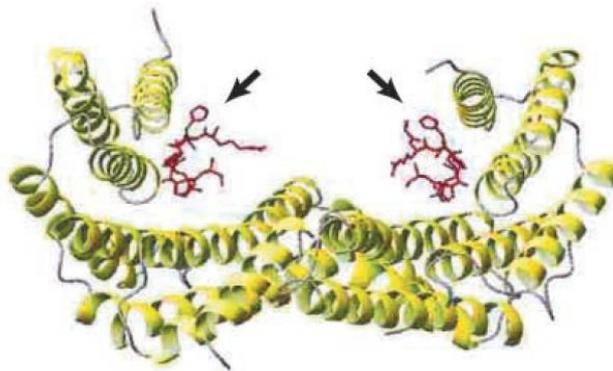
**Figure 10 : Modèle du contrôle du cycle productif de l'EBV dans les cellules épithéliales.** (D'après Gruffat *et al.*, 2011) Dans les cellules indifférenciées, l'Ubn est localisée au niveau du noyau et contrôle la réactivation du cycle productif de l'EBV en inhibant l'expression des gènes activés par ZEBRA. Tandis que dans les cellules différenciées, l'Ubn est séquestrée au niveau des jonctions serrées si bien que ZEBRA est libre d'activer le cycle productif en se fixant sur ses ZRE (ZEBRA Responsive Elements)

### III. 14-3-3 $\epsilon$ et la famille des protéines 14-3-3

#### A. Généralités sur les protéines 14-3-3

Les protéines 14-3-3 appartiennent à une grande famille de petites protéines de 28 à 33kDa, hautement conservées, présentes chez tous les Eucaryotes. Chez l'homme, il en existe 7 isoformes  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\sigma$ ,  $\tau$  et  $\zeta$ , codées par 7 gènes différents, exprimées dans tous les tissus, à l'exception de 14-3-3 $\sigma$  dont l'expression se limite aux cellules épithéliales. Initialement, la famille de protéines 14-3-3 a été identifiée dans les années 60 lors d'une classification systématique des protéines cérébrales. Leur première fonction décrite était l'activation de la synthèse de neurotransmetteurs. Depuis elles ont été impliquées dans de nombreuses autres fonctions cellulaires, elles contribuent à la régulation de processus cellulaires cruciaux tels que le métabolisme, la transduction de signaux, le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose, le trafic protéique, la transcription, la réponse au stress et la transformation maligne.

Les protéines 14-3-3 se regroupent en homo- ou hétérodimères et fonctionnent comme des adaptateurs modulant l'interaction entre les composants de différentes voies de signalisation et de régulation (Fig.11). Aujourd'hui, plus de 200 protéines ont été identifiées pouvant s'associer aux protéines 14-3-3 et deux motifs consensus ont pu être déterminés, RSXpSXP et RXXXpSXP, où pS représente une phosphosérine. Ces motifs conditionnent la fixation des protéines 14-3-3 à leurs ligands, à quelques exceptions près (Dougherty *et al.*, 2004).



**Figure 11 : Structure d'un dimère 14-3-3** (Dougherty *et al.*, 2004) En jaune, un dimère de protéine 14-3-3. Chaque monomère est composé de 9 hélices  $\alpha$  antiparallèles formant un L et dont l'angle forme une poche basique qui va accueillir les peptides présentant un site consensus avec une sérine phosphorylée (en rouge)

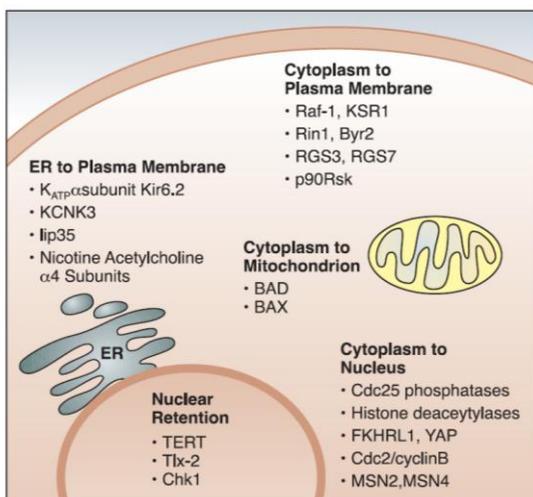
## B. Fonction des protéines 14-3-3

Grâce à leur nature dimérique et à leur capacité à se lier à diverses protéines cellulaires, les protéines 14-3-3 sont impliquées dans de nombreuses fonctions cellulaires. Plusieurs modèles existent pour décrire le rôle des protéines 14-3-3 en biologie cellulaire. Un des modèles serait que 14-3-3 agit comme un « étai moléculaire », causant le changement conformationnel de la protéine à laquelle il se lie, ce qui pourrait altérer son activité enzymatique, masquer ou révéler une fonction régulant sa localisation, son activité, son état de phosphorylation ou sa stabilité (Yaffe *et al.*, 2002). Un autre modèle présente 14-3-3 comme un adaptateur, favorisant des interactions entre deux partenaires différents liés chacun à un monomère de 14-3-3.

### 1. Régulation de la localisation subcellulaire

Une des propriétés fonctionnelles importantes des protéines 14-3-3 est la régulation de la localisation des protéines intracellulaires. 14-3-3 peut séquestrer une protéine ciblée dans un compartiment subcellulaire particulier en masquant sur cette protéine une séquence signal de localisation. La plupart du temps la protéine ciblée est alors incapable d'effectuer sa fonction. La fin de l'interaction avec 14-3-3 permet à la cible de se relocaliser et d'être à nouveau fonctionnelle (Fig.12).

Plusieurs partenaires de 14-3-3 ont une fonction nucléaire. C'est le cas par exemple de Cdc25, une phosphatase impliquée dans la mitose, de plusieurs histones désacétylases HDAC-4, -5 et -7 et d'autres facteurs de transcription. La liaison de ces molécules à 14-3-3 conduit à leur séquestration dans le cytoplasme, empêchant leur fonction au niveau du noyau (Brunet *et al.*, 2002). De la même manière, les protéines 14-3-3 peuvent séquestrer au niveau du cytoplasme des protéines ayant un rôle au niveau mitochondrial, comme la protéine pro-apoptotique Bad. Elles ont été également impliquées avec des protéines qui naviguent du cytoplasme ou du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique.



**Figure 12 : Régulation de la localisation cellulaire des protéines par les protéines 14-3-3 (Dougerthy *et al.*, 2004)** Ce schéma indique les principales protéines dont la localisation subcellulaire est régulée par une protéine 14-3-3

Inversement, les protéines 14-3-3 peuvent contribuer à la localisation d'une protéine sans empêcher son activité enzymatique. Ainsi, elles permettent la rétention nucléaire de protéines comme la transcriptase reverse de la télomérase humaine (hTERT) (Seimiya *et al.*, 2000). Des recherches ont également établi le rôle essentiel des protéines 14-3-3 dans le contrôle de la localisation et du fonctionnement des canaux ioniques tels que les canaux potassiques KCNK au niveau du cerveau (Rajan *et al.*, 2002). Les protéines KCNK, également appelées canaux de fuite, sont fortement exprimées dans le système nerveux central où elles régulent les courants membranaires et donc contrôlent l'excitabilité. Des expériences avec des mutants de la sous-famille TASK ont révélé que seuls les canaux ayant la capacité de se lier à des protéines 14-3-3 étaient localisés à la membrane cellulaire et pouvaient induire des flux potassiques externes significatifs, alors que la plupart des protéines mutées restent dans le cytoplasme. Ceci implique que l'interaction spécifique de protéines 14-3-3 avec des protéines TASK régule l'assemblage et le transfert des canaux à la surface membranaire, régulant ainsi l'excitabilité neuronale.

Cette propriété des protéines 14-3-3 de réguler la localisation subcellulaire de ses partenaires est particulièrement intéressante dans le cadre de notre travail. En effet, nous avons mis en évidence que l'Ubn est une protéine NACos qui peut être localisée dans le noyau et/ou au niveau des jonctions serrées des cellules, mais le mode de transport de l'Ubn entre le noyau et les jonctions serrées n'est pas connu, ni le mode de régulation de cette localisation. Dans ce manuscrit, nous montrons que la protéine 14-3-3 $\epsilon$  interagit avec l'Ubn. Elle pourrait donc réguler la localisation cellulaire de l'Ubn et intervenir dans le complexe avec la protéine virale ZEBRA.

## 2. Régulation de l'activité enzymatique

La régulation de l'activité enzymatique par les protéines 14-3-3 a été largement étudiée et elle peut intervenir aussi bien dans le sens d'une altération de l'activité de l'enzyme ciblée, lorsque celle-ci est séquestrée dans un autre compartiment que celui dans lequel s'effectue sa fonction biologique, que dans le sens d'une augmentation de l'activité de l'enzyme.

Par exemple l'activité enzymatique de la sérotonine N-acétyl-transférase (AANAT) augmente de 60% après la liaison à 14-3-3, qui induit vraisemblablement un changement conformationnel dans le centre catalytique de l'enzyme et stabilise le complexe avec son substrat (Obsil *et al.*, 2001). Un autre exemple d'une enzyme régulée par sa liaison avec 14-3-3 est la kinase oncogène Raf1. Le dimère de 14-3-3 est nécessaire à la fois pour maintenir Raf1 sous forme inactive en l'absence de son substrat et pour stabiliser la conformation active de

Raf1. Raf1 possède trois sites consensus de liaison à 14-3-3, un dans sa région régulatrice, un deuxième dans son domaine catalytique et le dernier dont l'intérêt est encore étudié (Tzivion *et al.*, 1998).

Par ailleurs, l'importance de l'activation de la phosphokinase C (PKC) pour le fonctionnement neuronal est bien connue. Une activation persistante de PKC est requise pour la plasticité, l'apprentissage et la mémoire synaptique. Il a été montré récemment que l'association de l'isoforme 14-3-3 $\zeta$  avec différentes sous-classes de PKC active constitutivement et de manière autonome cette kinase dans le cerveau de rongeurs, soulevant la possibilité que le complexe 14-3-3 $\zeta$ /PKC ait un rôle dans la transmission et la plasticité synaptique (Berg *et al.*, 2003).

### 3. Régulation du cycle cellulaire - apoptose

Le contrôle des protéines 14-3-3 sur la localisation subcellulaire de leurs partenaires ainsi que leur capacité à stimuler des interactions entre protéines sont cruciaux lors de la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose (Hermeking *et al.*, 2003).

Dans le but d'assurer que la mitose ne soit pas activée prématurément avant que la réplication de l'ADN lors de l'interphase ne soit totale, 14-3-3 va en parallèle séquestrer au niveau du cytoplasme la phosphatase Cdc25, principal activateur de la kinase pro-mitotique CDC2, et favoriser l'activation de la tyrosine kinase WEE1, inhibitrice de CDC2. De même, des dommages causés à l'ADN par des radiations ou des agents chimiques induisent la liaison de protéines 14-3-3 à WEE1 et CHK1 pour bloquer le cycle cellulaire en phase G2/M et activer les points de contrôle de l'ADN.

Différents isotypes de protéines 14-3-3 sont capables de séquestrer des protéines pro-apoptotiques. Plusieurs isoformes sont capables de se lier à Bad et la protéine X associée à Bcl-2 (Bax), et l'isotype  $\zeta$  se lie à Ask1, kinase régulant les signaux d'apoptose. Habituellement la liaison de Bad aux protéines Bax et Bcl-2 inactive cette dernière, induisant la mort cellulaire. Cependant, phosphorylée, Bad est complexée à 14-3-3 dans le cytoplasme, prévenant son association au niveau des mitochondries avec Bax et Bcl-2 et inhibant ainsi l'apoptose. Par ailleurs, alors que 14-3-3 favorise souvent la localisation de ses partenaires au niveau du cytoplasme, l'interaction de 14-3-3 avec la reverse transcriptase de la télomérase (hTERT) favorise sa rétention au niveau du noyau et prévient ainsi l'apoptose.

Dans tous ces exemples, l'association d'une protéine 14-3-3 à son ligand contribue à inhiber la progression du cycle cellulaire ou l'apoptose. Les protéines 14-3-3 agiraient comme un frein pour laisser le temps à la cellule de contrôler le bon déroulement de toutes les étapes du cycle cellulaire ou de réparer les dommages cellulaires en supprimant les signaux précoces d'apoptose.

### C. 14-3-3 $\epsilon$

En ce qui concerne l'isoforme 14-3-3 $\epsilon$ , qui nous intéresse plus particulièrement, des travaux ont identifié YWHAE, le gène codant pour 14-3-3 $\epsilon$ , comme un gène qui protègerait contre la schizophrénie (Ikeda *et al.*, 2008). D'autres expériences ont pu montrer l'effet neuroprotecteur de l'augmentation d'expression de 14-3-3 – particulièrement les isoformes  $\theta$ ,  $\epsilon$  et  $\gamma$  dans différents modèles cellulaires et animaux de maladie de Parkinson (Yacoubian *et al.*, 2010). Il a été décrit que ce gène possède toujours une délétion chez les patients atteints du syndrome de Miller-Dieker, entraînant alors un défaut de développement du cerveau ainsi que de la migration des neurones (Toyo-Oka *et al.*, 2003). Pour ces études, des souris ont été modifiées génétiquement puis croisées pour obtenir des individus YWHAE $^{-/-}$ , mais presque toutes les souris sont mortes à la naissance, moins de 1% ont survécu jusqu'à l'âge adulte. Les études ont donc été menées sur les embryons de souris YWHAE $^{-/-}$ . La plupart du temps, plusieurs isoformes 14-3-3 occupent la même fonction et peuvent se remplacer mutuellement, le déficit d'une des isoformes peut donc être compensé par une autre et n'aura pas de conséquence fonctionnelle. Mais certaines fois, comme c'est le cas ici avec 14-3-3 $\epsilon$ , une isoforme a une fonction spécifique et sa délétion est létale pour l'organisme.

14-3-3 $\epsilon$  a pu être impliquée dans d'autres processus cellulaires régulant la survie cellulaire. Une équipe taïwanaise a observé sur des lignées cellulaires endothéliales que les récepteurs PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) activés, notamment PPAR- $\delta$ , augmentent la transcription de 14-3-3 $\epsilon$  qui va alors séquestrer la protéine Bad dans le cytosol et empêcher son action pro-apoptotique mitochondriale (Liou *et al.*, 2006). Dans une première série d'expériences, ils ont démontré sur des modèles animaux de rat que l'utilisation d'un activateur de PPAR- $\delta$ , une thiazolidinedione ou glitazone, augmente la quantité de 14-3-3 $\epsilon$  transcrite et protège contre les infarctus cérébraux ischémiques et contre l'apoptose neuronale (Wu *et al.*, 2009). Dans une deuxième série d'expériences, ils ont détourné ce phénomène contre des cellules de cancer colorectal. En effet, les anti-inflammatoires non-stéroïdiens et les inhibiteurs de la cyclo-oxygénase-2 ont la propriété d'empêcher la synthèse de prostacycline qui est un activateur des PPARs. Leur utilisation sur des cultures cellulaires de cancer colorectal HT29 a eu pour conséquence de diminuer l'expression de 14-3-3 $\epsilon$  et de favoriser l'apoptose des cellules cancéreuses par relocalisation de Bad au niveau mitochondrial (Liou *et al.*, 2007, Wu *et al.*, 2009).

L'intervention de la protéine 14-3-3 $\epsilon$  a également été mise en évidence dans l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire en réponse à un stress. Après une irradiation par des UVB, la liaison des protéines Cdc25A et B à une protéine 14-3-3 augmente et résulte en l'arrêt du

cycle cellulaire (Petrocelli *et al.*, 2000). L'isoforme 14-3-3 $\epsilon$  a été trouvée significativement surexprimée dans les dermes exposés aux UV et dans les dermes âgés protégés du soleil, suggérant que 14-3-3 $\epsilon$  joue un rôle dans le vieillissement physiologique de la peau ainsi que le vieillissement induit par le soleil (Choi *et al.*, 2005). Pareillement, le niveau de transcription de 14-3-3 $\epsilon$  a été montré augmenté chez les embryons d'oursins après exposition aux UV-B, montrant l'implication de 14-3-3 $\epsilon$  lors de la réponse à un stress causé par les UV-B (Russo *et al.*, 2010). 14-3-3 $\epsilon$  participerait donc à la survie cellulaire en aménageant une pause dans le cycle cellulaire afin de laisser le temps à la cellule de contrôler l'intégrité de son matériel génétique.

Par ailleurs, deux équipes chinoises et américaines ont mis en évidence que la stimulation par le TNF- $\alpha$ , cytokine pro-inflammatoire, favorise les interactions entre 14-3-3 $\epsilon$  et de nombreux partenaires parmi lesquels des composants essentiels du système des MAP kinases, situé directement en amont de la cascade NF- $\kappa$ B. Ces études montrent que 14-3-3 $\epsilon$  permet la communication entre le système des MAP kinases et d'autres processus biologiques incluant le métabolisme et la synthèse protéique, la réparation de l'ADN et la régulation du cycle cellulaire (Zuo *et al.*, 2010).

Finalement, toutes ces études montrent que 14-3-3 $\epsilon$  intervient dans de nombreux processus de régulation de la survie cellulaire et est une cible potentielle intéressante pour la prévention et le traitement de plusieurs pathologies.

#### **D. 14-3-3 et pathogénicité**

Les cibles des protéines 14-3-3 sont trouvées dans tous les compartiments subcellulaires avec une grande diversité fonctionnelle ; on trouve aussi bien des facteurs de transcription, des protéines du cytosquelette, des molécules de signalisation, des facteurs d'apoptose ou encore des suppresseurs de tumeur. La liaison d'une protéine 14-3-3 va altérer la localisation, la stabilité, l'état de phosphorylation, l'activité ou les interactions moléculaires de sa cible. La conséquence fonctionnelle de ces interactions peut se traduire par un blocage du cycle cellulaire, le contrôle de l'apoptose, de la transcription, de la transduction des signaux, du trafic intracellulaire, et de la régulation des canaux ioniques. Ainsi il n'est pas surprenant que leur rôle ait été montré dans plusieurs pathologies neuro-dégénératives et dans l'étiologie de certains cancers humains.

## 1. 14-3-3 dans les maladies neuro-dégénératives

Les protéines 14-3-3 ont été découvertes lors d'une classification systématique de toutes les protéines cérébrales. On sait depuis qu'elles contribuent au développement neuronal et à certaines neuropathologies. Le tissu cérébral contient la plus haute concentration en protéines 14-3-3, cela représente environ 1% des protéines cérébrales solubles totales. Ces hautes concentrations expliquent la fuite d'isoformes de 14-3-3 dans le liquide céphalo-rachidien d'hommes et d'animaux lors de certaines pathologies neurodégénératives. Le taux de protéines 14-3-3 dans le liquide céphalo-rachidien lors des pathologies neurodégénératives est de l'ordre du ng/ml, alors qu'il est considérablement plus élevé chez les patients atteints de la maladie de Creutzfeldt Jacob. Cela laisse penser que les protéines 14-3-3 seraient impliquées dans l'étiologie de cette maladie, sans que le mécanisme ne soit réellement compris. Comme ce dosage a une très haute sensibilité et spécificité, la détection des protéines 14-3-3 dans le liquide céphalo-rachidien fait partie des critères de diagnostic standard pour la maladie de Creutzfeldt-Jacob sporadique. Actuellement, de nombreuses études sont en cours pour déterminer si certains isotopes de 14-3-3 détectés dans le liquide céphalo-rachidien sont spécifiquement impliqués dans la pathogenèse de la maladie de Creutzfeldt Jacob ou d'autres désordres neurodégénératifs (Berg *et al.*, 2003).

Plusieurs études suggèrent que les protéines 14-3-3 contribuent directement au développement de la maladie d'Alzheimer et à la maladie de Parkinson. Des protéines 14-3-3 ont été identifiées dans des lésions neurofibrillaires caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. L'isoforme 14-3-3 $\zeta$  se lie à la protéine Tau, protéine régulant la formation des microtubules, et provoque sa phosphorylation par la kinase GSK3 $\beta$ . Cette phosphorylation cause une perte d'activité de Tau, une désorganisation des microtubules, la formation de lésions neurofibrillaires et finalement la neurodégénérescence (Agarwal-Mawal *et al.*, 2003). D'autres études ont révélé l'altération des protéines 14-3-3 dans la maladie de Parkinson et la capacité des protéines 14-3-3 à interagir avec l' $\alpha$ -synucléine, une protéine centrale dans la physiopathologie de la maladie de Parkinson. Des expériences complémentaires ont pu montrer l'effet neuroprotecteur de l'augmentation d'expression de 14-3-3 – particulièrement les isoformes  $\theta$ ,  $\epsilon$  et  $\gamma$  dans différents modèles cellulaires et animaux de maladie de Parkinson (Yacoubian *et al.*, 2010).

D'autres pathologies neurodégénératives existent, pour le développement desquelles les protéines 14-3-3 ont pu être impliquées, comme l'ataxie cérébelleuse de type 1 ou le syndrome de Miller-Dieker.

## 2. 14-3-3 $\sigma$ et les cancers

Le rôle des protéines 14-3-3 dans la pathogénicité des cancers n'est pas étonnant étant donné leur interaction avec des molécules intervenant à la fois dans la transduction des signaux, dans la régulation du cycle cellulaire et dans le contrôle de l'apoptose. L'isoforme  $\sigma$  a été particulièrement impliquée dans l'étiologie des cancers. 14-3-3 $\sigma$  est le seul membre de la famille 14-3-3 exprimé uniquement dans les cellules épithéliales et qui semble avoir des fonctions spécifiques de son isotype. L'expression de 14-3-3 $\sigma$  est régulée positivement par p53 et BRCA1 et contribue au contrôle du cycle cellulaire induit par des dommages sur l'ADN. 14-3-3 $\sigma$  induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M en se liant au complexe CDC2-cyclinB et en le séquestrant dans le cytoplasme. Le taux de protéine 14-3-3 $\sigma$  est significativement diminué voire négligeable dans différentes lignées cellulaires transformées et dans les tumeurs primaires d'origine épithéliale à cause de la forte méthylation de son promoteur.

Il a été remarqué que dans certains cas le niveau d'expression de 14-3-3 $\sigma$  corrèle avec le stade de la maladie. Par exemple, 14-3-3 $\sigma$  est détecté dans les tissus hyperplasiques du sein, mais le niveau d'expression diminue dans les tissus avec une hyperplasie atypique et est totalement absent dans les tissus cancéreux. Des études montrent que la diminution d'expression de 14-3-3 $\sigma$  suffit à immortaliser des cellules épithéliales primaires. 14-3-3 $\sigma$  agit donc comme un suppresseur de tumeur et la perte de sa fonction est une étape cruciale dans la progression de certains cancers (Dougherty *et al.*, 2004, Hermeking *et al.*, 2003).

Isoforme	Gène	Localisation chromosomique	Pathologies impliquant les protéines 14-3-3	Fonction connue dans la pathologie
$\beta$ et son isoforme phosphorylée $\alpha$	YWHAB	20q13.1	maladie d'Alzheimer maladie de Creutzfeldt-Jacob ataxie cérébrospinale de type I	liaison à la protéine Tau pas de fonction connue mais détecté dans le LCR stabilisation de la forme pathogène de l'ataxine-1 [1]
$\gamma$	YWHAG	7q11.23	maladie d'Alzheimer maladie de Parkinson maladie de Creutzfeldt-Jacob ataxie cérébrospinale de type I	taux élevé dans le cerveau présence dans les corps de Lewy, liaison à l' $\alpha$ -synucléine [2] pas de fonction connue mais détecté dans le LCR inconnue
$\epsilon$	YWHAE	17p13.3	maladie d'Alzheimer maladie de Parkinson syndrome de Miller-Dieker schizophrénie maladie de Creutzfeldt-Jacob ataxie cérébrospinale de type I	taux élevé dans le cerveau présence dans les corps de Lewy, liaison à l' $\alpha$ -synucléine [2] délétion hémizygote du gène [3] gène délété [4] pas de fonction connue mais détecté dans le LCR stabilisation de la forme pathogène de l'ataxine-1 [1]
$\zeta$ et son isoforme phosphorylée $\delta$	YWHAZ	8q23.1	maladie d'Alzheimer maladie de Parkinson ataxie cérébrospinale de type I	liaison à la protéine Tau présence dans les corps de Lewy stabilisation de la forme pathogène de l'ataxine-1 [1]
$\eta$	YWHAH	22q12.3	maladie de Creutzfeldt-Jacob ataxie cérébrospinale de type I	pas de fonction connue mais détecté dans le LCR inconnue
$\sigma$	SFN	1p35.3	cancers épithéliaux (sein, gastrique, autres)	isoforme exprimée uniquement dans les cellules épithéliales participe au point de contrôle G2/M du cycle cellulaire expression réduite lors des cancers par méthylation de son promoteur [5]
$\tau/\theta$	YWHAQ	2p25.1	maladie de Parkinson	présence dans les corps de Lewy, liaison à l' $\alpha$ -synucléine [2]

**Tableau 2 : Les différentes isoformes de 14-3-3 et leurs implications en pathologie.** D'après Berg *et al.*, 2003. [1] Chen *et al.*, 2003, [2] Yacoubian *et al.*, 2010, [3] Toyono-Oka *et al.*, 2003, [4] Ikeda *et al.*, 2008, [5] Hermeking *et al.*, 2003

### 3. 14-3-3 et les virus

Les protéines 14-3-3 ont été impliquées avec certains virus, notamment le virus de l'hépatite C (VHC), le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et le virus d'Epstein-Barr (EBV).

#### a. Virus de l'hépatite C

La protéine core du VHC possède un motif consensus de liaison à 14-3-3 et plusieurs études décrivent qu'elle interagit avec une protéine 14-3-3 lorsque sa sérine 53 est phosphorylée, ceci ayant différentes conséquences sur le fonctionnement des hépatocytes. Aoki *et al* (2000) ont montré que l'interaction de la protéine core avec 14-3-3 active la kinase oncogène Raf-1 et contribue à la régulation de la croissance des hépatocytes. Une autre équipe de chercheurs, a mis en évidence que l'interaction de la protéine core du VHC avec l'isoforme 14-3-3 $\epsilon$  cause la dissociation de Bax du complexe Bax/14-3-3 $\epsilon$ . La protéine Bax est alors libre de provoquer l'apoptose au niveau mitochondrial (Lee *et al.*, 2007). Dans ces deux exemples le VHC utilise une protéine 14-3-3 pour déréguler la croissance et la survie normale des hépatocytes.

L'équipe de Banerjee *et al* (2010) s'est intéressée au phénomène d'insulinorésistance accompagnant généralement l'infection des hépatocytes par le VHC. Habituellement, l'insuline induit la translocation du facteur de transcription Fox du noyau vers le cytosol en faisant intervenir une protéine 14-3-3. La protéine core du VHC est capable d'inhiber par compétition l'interaction de FoxO1 et 14-3-3, empêchant sa translocation vers le cytosol et affectant ainsi la régulation par l'insuline de gènes métaboliques.

Par ailleurs, il a été mis en évidence que CD81, le récepteur cellulaire du VHC, possède une séquence consensus de liaison à 14-3-3 et interagit avec la protéine 14-3-3 $\epsilon$  (Clark *et al.*, 2007). Dans cette étude, ils proposent que 14-3-3 $\epsilon$  servirait d'adaptateur pour favoriser l'interaction entre CD81 et la phosphokinase C ou la phosphoinositide-3-kinase pour influencer la signalisation cellulaire. Il serait intéressant de vérifier si 14-3-3 $\epsilon$  n'interviendrait pas également dans la régulation de la localisation de CD81 au niveau de la membrane cellulaire.

Toutes ces études montrent que les protéines 14-3-3 font de bonnes cibles thérapeutiques pour prévenir ou traiter les conséquences de l'infection par le VHC.

#### b. Virus de l'immunodéficience humaine

Le VIH implique des protéines 14-3-3 à de nombreuses étapes lors de la progression de son infection dans l'organisme. Avant même son entrée, les protéines 14-3-3 favorisent la relocalisation de la protéine GPR15, co-récepteur cellulaire du VIH, du réticulum endoplasmique vers la surface cellulaire et augmentent sa stabilité (Okamoto *et al.*, 2011). Ensuite, la protéine Vpr du VIH de type 1 se lie à une protéine 14-3-3 et facilite la formation d'un complexe avec

Cdc25C, entraînant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M (Kino *et al.*, 2005). Cette pause dans le cycle cellulaire faciliterait la propagation du virus.

Dans plusieurs modèles de cellules endothéliales, une équipe japonaise a remarqué que la protéine gp120 du VIH augmente l'expression de l'isoforme 14-3-3 $\tau$ . Ils ont montré dans un premier temps que cette augmentation de 14-3-3 $\tau$ , en séquestrant la protéine pro-apoptotique Bad dans le cytosol, permet de contrôler l'apoptose induite par la gp120 (Yano *et al.*, 2007). Par la suite, ils ont observé que c'est par l'intermédiaire de 14-3-3 $\tau$  que la gp120 provoque la dégradation des protéines des jonctions serrées ZO-1 et ZO-2 par le protéasome. Il en résulte une fragilisation de la barrière hémato-encéphalique, favorisant le passage des lymphocytes infectés par le VIH vers le cerveau. Cette infiltration est une manifestation pathologique caractéristique des démences associées au VIH (Nakamuta *et al.*, 2008). D'ailleurs, la même équipe avait déjà observé l'augmentation de la concentration des trois isoformes 14-3-3  $\epsilon$ ,  $\gamma$  et  $\zeta$  dans le LCR de patients VIH-positifs ayant une destruction neuronale, suggérant que ces 3 isoformes pourraient être de bons marqueurs du taux de destruction neuronal et de la gravité de l'atteinte neuronale (Wakabayashi *et al.*, 2001).

Les isoformes de protéines 14-3-3 identifiées dans ces travaux pourraient, comme avec le VHC, servir de cible thérapeutique pour empêcher la progression du VIH.

### c. Virus d'Epstein-Barr

Des travaux montrent que la surexpression des protéines 14-3-3 $\zeta$  (ayant une activité de phospholipase A2, PLA2) et S-adenosyl-homocystéine augmente l'expression des protéines virales EA-D, ZEBRA et BHRF1. De plus, cet effet a pu être inhibé par des inhibiteurs spécifiques de PLA2. Ceci indique que 14-3-3 $\zeta$  est capable d'initier le cycle lytique d'EBV (Maas *et al.*, 2006). Il serait intéressant de voir si la diminution de l'expression de 14-3-3 $\zeta$  par des siRNA ou l'utilisation des inhibiteurs de PLA2 seraient capable de bloquer le cycle lytique induit d'une autre manière, avec du TPA ou en surexprimant ZEBRA.

Les protéines 14-3-3 ont également été associées aux propriétés transformantes d'EBV. Par exemple, 14-3-3 $\sigma$  est plus fréquemment méthylée (>90%) dans les carcinomes EBV-positifs qu'EBV-négatifs. Ces résultats démontrent une relation entre la présence d'EBV et une méthylation aberrante des îlots CpG et suggère que cette méthylation aberrante soit un important mécanisme de la carcinogenèse gastrique associée à EBV (Kang *et al.*, 2002). Par ailleurs, EBNA-LP, protéine de latence nucléaire d'EBV, coactive des promoteurs avec EBNA2 et joue un rôle dans l'immortalisation des lymphocytes B par EBV. Des investigations du rôle des histone-désacétylases (HDAC) dans la régulation des promoteurs de EBNA-LP et EBNA2 ont identifié que HDAC4 réprime l'activation de EBNA-LP et EBNA2 en se fixant sur leurs promoteurs. Une série d'expériences montre qu'EBNA-LP est capable de coactiver la

transcription d'EBNA2 en délocalisant HDAC4 de son promoteur, par l'intermédiaire d'une protéine 14-3-3 qui va séquestrer HDAC4 dans le cytoplasme (Portal *et al.*, 2006).

La protéine de latence EBNA3C est également essentielle pour la transformation de lymphocytes B primaires *in vitro* et peut réguler la transcription d'un grand nombre de gènes cellulaires ou viraux importants pour le processus d'immortalisation. L'interaction directe d'EBNA3C avec Chk2, protéine kinase impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, conduit à la phosphorylation de la serine 216 de Cdc25c qui est alors séquestrée dans le cytoplasme par une protéine 14-3-3, influençant ainsi le passage du point de contrôle de la phase G2/M (Choudhuri *et al.*, 2007). La perturbation des mécanismes de contrôle de l'ADN est un processus commun dans les cellules cancéreuses et dans les cellules infectées par des virus transformants.

D'autres exemples pourraient être cités où une protéine 14-3-3 intervient avec les coronavirus, les papillomavirus, les virus associés aux adénovirus ou encore le poliomavirus dans le but de réguler la localisation cellulaire des protéines virales, d'assurer une bonne réplication du virus ou d'interférer dans le déroulement normal du cycle cellulaire.

## OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Notre équipe de recherche s'intéresse aux interactions de ZEBRA avec les protéines cellulaires, dans des modèles cellulaires issus de différents cancers. Des travaux antérieurs ont décrit une protéine cellulaire, l'ubinucléine, capable d'empêcher la fixation de ZEBRA sur ses séquences cibles d'ADN (Aho *et al.*, 2000). Il a été montré dans notre laboratoire que l'Ubn possède une double localisation cellulaire, nucléaire et dans les jonctions serrées (Aho *et al.*, 2009) mais le mécanisme de régulation de cette localisation cellulaire reste méconnu.

Les protéines 14-3-3 ont été décrites plusieurs fois comme nécessaires à la régulation de l'import/export nucléaire de certaines protéines (Sakiyama *et al.*, 2008, Aguilera *et al.*, 2006) et l'Ubn possède un motif consensus permettant la liaison à ces protéines. Par ailleurs, l'équipe d'Irène Joab (Inserm UMR542, Villejuif) a mis en évidence par double hybride que ZEBRA est capable d'interagir avec l'isoforme 14-3-3 $\epsilon$  (résultats non publiés). L'ensemble de ces observations laisse penser que la protéine 14-3-3 $\epsilon$  régulerait la localisation cellulaire de l'Ubn, impactant ainsi le cycle viral.

L'objectif de mon travail de thèse a été d'étudier la relation qu'ont entre elles les trois protéines ZEBRA, Ubn et 14-3-3 $\epsilon$  dans le but d'améliorer notre compréhension de la régulation du cycle lytique d'EBV et de la pathogénie des cancers épithéliaux associés à l'EBV.

## MATERIELS ET METHODES

### Cultures cellulaires :

Les cellules 293 (cellules épithéliales embryonnaires de rein humaines), HT29 (cellules d'adénocarcinome de colon humaines) et MDCK (cellules épithéliales différenciées de rein canines) sont cultivées en milieu DMEM avec 10% SVF, un mélange pénicilline-streptomycine (100UI/mL) et de l'ofloxacine à 1µg/mL. Les cellules AGS (cellules de carcinome gastrique humaines) sont cultivées en milieu Ham F12 avec 10% SVF, un mélange pénicilline-streptomycine (100UI/mL), ces même cellules portant le bacmide EBV-GFP sont cultivées avec en plus de l'hygromycine à 200µg/mL. Toutes les cellules sont cultivées dans une étuve à 37°C avec une atmosphère contenant 5%CO<sub>2</sub>.

### Anticorps utilisés :

L'anticorps anti-Ubn monoclonal (surnageant d'hybridome, H. Gruffat, Lyon) est utilisé pur pour les IF, au 1/3 pour les IP, au 1/20 pour les WB. L'anticorps anti-ZEBRA monoclonal (surnageant d'hybridome, E. Drouet, Grenoble) est utilisé au 1/50 pour les IF, 1/3 pour les IP et au 1/50 pour les WB. L'anticorps anti-14-3-3ε polyclonal (Santa Cruz) est utilisé au 1/100 pour les IF, et au 1/200 pour les WB. L'anticorps anti-ZO-1 polyclonal (Zymed) est utilisé au 1/50 pour les IF. L'anticorps contrôle de souris utilisé pour les IP est une immunoglobuline IgG1κ (Gentaur). Les anticorps secondaires utilisés pour les WB sont un anticorps de chèvre anti-souris couplé à la peroxydase (Jackson ImmunoResearch), utilisé au 1/20000, et la protéine A couplée à la peroxydase (Calbiochem), utilisée au 1/10000. Pour les IF, les anticorps secondaires utilisés (Molecular Probe) sont des anticorps anti-souris ou anti-lapin, couplé à un Alexa fluorescent A350 (bleu), A488 (vert) ou A594 (rouge).

### Plasmides utilisés :

Pour l'expression de protéines en cellules eucaryotes, nous avons à notre disposition les plasmides codant pour l'Ubn et ZEBRA sous le contrôle du promoteur CMV fournis par H.Gruffat, ENS Lyon, ainsi que le plasmide pcDNA codant pour la protéine 14-3-3ε avec les deux étiquettes Myc et Histidine, sous le contrôle du promoteur CMV, préparé par Xavier Brazzolotto, post-doctorant à l'UVHCI.

Pour l'expression de protéines en bactérie, le gène codant pour la protéine ZEBRA fusionnée à la GST est cloné dans un vecteur pGEX, fourni par H. Gruffat, ENS Lyon, le gène codant pour la protéine 14-3-3ε fusionnée à une étiquette poly-histidine est cloné dans un vecteur pRSET, fourni par X. Brazzolotto, UVHCI Grenoble, et le domaine d'interaction de l'Ubn avec ZEBRA

fusionné à l'étiquette poly-histidine a été cloné dans le vecteur d'expression pHAR1201 qui nous a été fourni par D. Haart, EMBL, Grenoble.

#### Transfection de cellules :

Les cellules 293 sontensemencées en boîte de Petri de 35mm (BP35) et sont transfectées quand elles atteignent 80% de confluence. Les réactifs de transfection utilisés sont le polyéthylèneimine (PEI) à raison de 5µg d'ADN et 10µl de PEI dans 100µl de NaCl 150mM par BP35 ou la lipofectamine 2000 (Invitrogène) à raison de 4µg d'ADN et 10µl de lipofectamine dans 100µl de milieu de culture sans antibiotique ni SVF par BP35. Elles sont ensuite incubées à 37°C pendant 24h.

#### Western Blot (WB) :

La membrane PVDF est hydratée dans de l'éthanol 95% 1min puis rincée dans du TBS, 0,1% Tween. Elle est mise à saturer dans du TBS, 0,1% Tween, 5% lait au minimum 30min puis mise en contact avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt dilué dans du TBS, 0,1% Tween, 5% lait pendant 1h. La membrane est rincée dans du TBS, 0,1% Tween deux fois 10min puis mise en contact avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase dilué dans du TBS, 0,1% Tween, 5% lait pendant 1h et rincée une nouvelle fois dans TBS, 0,1% Tween quatre fois 15min. La membrane est finalement mise dans une solution contenant le substrat chimioluminescent de la peroxydase (Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Fischer Scientific) et la présence de protéines est révélée par exposition d'un film photographique.

#### Immunofluorescence (IF) :

Les cellules sontensemencées sur des cover-slips puis fixées après 48 à 96h de culture et les traitements désirés par une solution de PBS à 4% de PFA 20min à +4°C ou par du méthanol pur 10min à -20°C. Elles sont ensuite mises à saturer dans une solution TBS, 0,1% Triton, 3% GPI pendant 30min, puis mises en contact avec l'anticorps primaire dans du TBS, 0,1% Triton, 1% GPI pendant 1h. Les cover-slips sont rincées trois fois avec du TBS, 0,1% Triton et mises alors en contact avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome dans du TBS, 0,1% Triton, 1% GPI et en présence de Hoechst 33342 à 50µg/mL qui va marquer les noyaux en bleu et cela pendant 1h. Les cover-slips sont encore rincées deux fois avec du TBS, 0,1% Triton puis une dernière fois avec de l'eau distillée. Elles sont finalement montées dans du Mowiol sur une lame de microscope et observées au microscope à fluorescence ou au microscope confocal.

### Production et purification de protéines de fusionnées à des étiquettes GST ou Histidine :

Des bactéries transformées avec le plasmide d'intérêt et conservées à -80°C sont remises en pré-culture dans du milieu LB avec ampicilline (50µg/ml) pendant une nuit à 37°C sous agitation. Le lendemain cette pré-culture est diluée au 1/100 dans du milieu LB avec ampicilline et laissée à agiter à 37°C jusqu'à ce que la densité optique mesurée à 600nm soit comprise entre 0,6 et 0,8. Les bactéries sont alors dans leur phase de croissance exponentielle. De l'IPTG est alors ajoutée dans le milieu à une concentration de 0,1mM pour induire la production de la protéine d'intérêt par les bactéries, pendant 4h sous agitation à 37°C. Les suspensions bactériennes sont ensuite centrifugées 15min à 5000rpm. La suite du protocole diffère selon l'étiquette à laquelle la protéine d'intérêt est fusionnée.

- Pour les protéines fusionnées à la GST, le culot est resuspendu dans du tampon de lyse (NaCl 150mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 16mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4mM, EDTA 100mM, triton 1%, pH 7,3) avec 20µg/mL de lysozyme et des inhibiteurs de protéases, homogénéisé et laissé à refroidir dans de la glace 30 min. Pour lyser les bactéries, la suspension est soniquée dans de la glace 2 fois 2,5 min (cycle 0,5 amplitude 80), centrifugée 15min à +4°C, 20 000rpm et le surnageant est récupéré. Des billes de sépharose couplées à la GSH (GE Healthcare) sont lavées quatre fois avec du tampon de lyse et sont incubées en présence du lysat bactérien pendant 1h à +4°C, sur une roue. La GSH fixée sur les billes et la GST fusionnée à la protéine vont alors s'assembler en formant des liaisons de faible énergie. Les billes de sépharose sont centrifugées 2min à 2000rpm et rincées deux fois avec le tampon de lyse puis une fois avec un tampon de rinçage, identique au tampon de lyse mais avec une concentration en NaCl élevée à 0,5M. Après le dernier rinçage, les billes sont reprises dans un tampon de conservation, identique au tampon de lyse avec en plus 20% de glycérol, et conservées en aliquots de 100µl à -80°C.

- Pour les protéines fusionnées à l'étiquette poly-histidine (6His), le culot bactérien est resuspendu dans un tampon de lyse (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50mM, NaCl 300mM, imidazole 10mM, pH8) avec 20µg/mL de lysozyme et des inhibiteurs de protéases, homogénéisé et laissé à refroidir dans de la glace 30min. Pour lyser les bactéries, la suspension est soniquée dans de la glace six fois 20 secondes (cycle 0,5, amplitude 50), centrifugée 15 min à +4°C, 20 000rpm et le surnageant est récupéré. Des billes de résine Ni-NTA Superflow (Qiagen) sont rincées quatre fois avec du tampon de lyse, rajoutées dans le surnageant contenant la protéine d'intérêt et le mélange est laissé à tourner sur une roue à +4°C. Fixé sur des billes d'agarose, le complexe du nickel avec l'acide nitriloacétique (Ni-NTA) reconnaît et fixe sélectivement les sites protéiques contenant l'étiquette poly-histidine. Après 20 min, les billes sont centrifugées 2 min à 2000 rpm et rincées quatre fois avec le tampon de rinçage, identique au tampon de lyse mais avec une concentration d'imidazole augmentée à 20mM. On peut augmenter la quantité de protéine

récupérée en rajoutant de nouvelles billes Ni-NTA dans le surnageant pendant 20 min, suivi de quatre rinçages. Les billes sont conservées à +4°C dans le tampon de rinçage.

Pour obtenir une protéine recombinante purifiée grâce à son étiquette histidine, elle est éluée des billes d'agarose Ni-NTA grâce à un tampon d'éluion (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 250mM imidazole pH 8). Après 10min dans la glace, la suspension est centrifugée 2min à 2000rpm et la protéine d'intérêt est récupérée dans le surnageant. L'éluion peut être répétée une deuxième fois sur les billes d'agarose pour augmenter la quantité de protéine purifiée.

La quantité de protéine purifiée est dosée par la méthode de Bradford et la pureté et l'intégrité de la protéine d'intérêt sont vérifiées en faisant migrer le produit final sur un gel de polyacrylamide, coloré ensuite au bleu de coomassie pour révéler les protéines.

#### GST pull-Down, histidine pull-down et peptide pull-down :

Des cellules, transfectées ou non, sont amenées à confluence dans une BP100 pour les HT29 et dans 2BP35 pour les 293. Elles sont rincées avec du PBS, lysées dans un volume approprié de tampon de lyse auquel sont ajoutés des inhibiteurs de protéases et des inhibiteurs de phosphatases, collectées dans un tube Eppendorf puis centrifugées à 13 000rpm 15min à +4°C. Le tampon de lyse et son volume varient selon le type cellulaire. Pour les HT29, la lyse s'effectue avec le tampon Tris 20mM, NaCl 200mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, triton 0,2%, SDS 0,01%, glycérol 1%, 900 µl par BP100. Pour les 293, le tampon TBS 1X, NaCl 2mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, NP40 1% est utilisé à raison de 150µl par BP35. Après quantification par la méthode de Bradford, 30 à 50 µg du lysat ou une quantité appropriée de protéine recombinante sont mis en contact avec des billes de sépharose sur lesquelles sont accrochées soit la GST fusionnée à une protéine, soit la GST seule dans un volume final de 300µl de tampon Hepes 20mM, NaCl 50mM, EDTA 0,1mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5mM, et Triton 0,05% avec des inhibiteurs de protéases et des inhibiteurs de phosphatases, en tournant sur une roue à +4°C. Après 1h30, les billes sont récupérées par centrifugation à 2000rpm 2min, rincées quatre fois avec le tampon de rinçage, identique au tampon de contact avec une quantité de triton augmentée à 0,5%, et dénaturées par du réactif de Laemmli. La révélation des protéines entraînées se fait par western-blot après migration sur un gel de polyacrylamide.

#### Immunoprécipitation (IP) :

Un lysat de cellules, transfectées ou non, est préparé comme décrit pour les pull-down. Le surnageant récupéré après la centrifugation contient les protéines solubles. Il est récupéré et clarifié par 20µl de protéines A/G couplées à des billes d'agarose (Santa Cruz), 2h en tournant sur une roue à +4°C. Une portion du lysat cellulaire clarifié est prélevée pour faire un dosage des protéines totales par la méthode de Bradford et servir de contrôle positif pour le western blot

(input). Le reste du lysat cellulaire clarifié est séparé en deux volumes identiques. Dans le premier, est ajouté l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt, dans le deuxième, est ajouté en quantité comparable un anticorps contrôle de même espèce (et de même sous type pour les anticorps monoclonaux). Les solutions sont ainsi laissées toute une nuit à tourner sur une roue, à +4°C. Le lendemain sont ajoutés entre 4 et 8µl de protéines A/G couplées à des billes d'agarose qui fixent alors l'anticorps primaire, pendant 2h en tournant sur une roue à +4°C. Les billes sont récupérées par centrifugation à 13 500rpm, 30sec et rincées trois fois avec un tampon de lavage TBS 1X, NaCl 2mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM. Les billes d'agarose et toutes les protéines qui s'y sont fixées sont dénaturées par du réactif de Laemmli, chauffé à 95°C pendant 5min. La séparation des protéines se fait par migration de l'échantillon final sur un gel de polyacrylamide dénaturant qui sera transféré sur une membrane PVDF par transfert semi-sec. Les protéines sont finalement révélées par Western-Blot.

#### Traitement des cellules par des inhibiteurs ou activateurs de la protéine kinase A (PKA) :

Les cellules sont portées à 60% de confluence dans une BP35. L'inhibiteur (KT5720, Sigma) ou l'activateur (forskoline, Sigma) de PKA sont conservés dissous dans du DMSO et dilués extemporanément dans 1ml de milieu de culture à des concentrations finales de 10µM et 50µM respectivement. Des cellules contrôle sont traitées parallèlement avec uniquement 0,5% de DMSO. Après une nuit de traitement par le KT5720 ou après 3h de traitement par la forskoline, les cellules sont fixées au méthanol et immunomarquées.

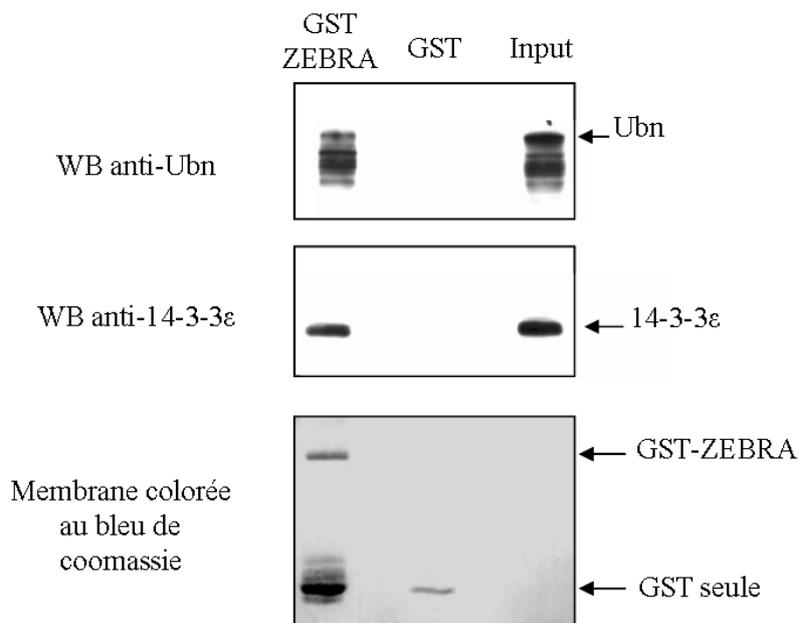
## RESULTATS

Mon travail a consisté à mettre en évidence l'existence d'un complexe tripartite ZEBRA-Ubn-14-3-3 $\epsilon$  pour préciser les conditions dans lesquelles l'Ubn inhibe les fonctions de ZEBRA et donc le cycle lytique d'EBV. Notamment, cela a consisté à déterminer si la protéine 14-3-3 $\epsilon$  interviendrait comme régulateur de l'interaction entre ZEBRA et l'Ubn en contrôlant la localisation cellulaire de cette dernière. Nous avons cherché à mettre en évidence ce complexe *in vitro* et *in vivo* puis nous nous sommes intéressés plus spécifiquement aux interactions entre les protéines deux à deux, tout cela en utilisant différentes techniques de pull-down, immunoprécipitation et microscopie à fluorescence. Nos travaux nous ont amenés à étudier plus précisément l'importance de la phosphorylation de l'Ubn pour son interaction avec 14-3-3 $\epsilon$  et l'influence de la phosphorylation sur sa localisation cellulaire.

### I. Mise en évidence d'une interaction entre ZEBRA, 14-3-3 $\epsilon$ et l'ubinucléine *in vitro*

#### A. Mise en évidence du complexe tripartite *in vitro* par GST-pulldown

Nous avons vérifié la capacité de ZEBRA à fixer l'Ubn et 14-3-3 $\epsilon$  dans un même lysat cellulaire par des expériences de GST-pulldown. L'Ubn et 14-3-3 $\epsilon$  sont révélés par western-blot dans le même puits que la protéine ZEBRA fusionnée à la GST, alors qu'aucun signal n'est détecté avec la GST seule. Ceci a pu être mis en évidence aussi bien avec la protéine 14-3-3 $\epsilon$  endogène (Fig.13) qu'avec la protéine 14-3-3 $\epsilon$  surexprimée (non montré). Il existe donc bien un complexe mettant en jeu ces trois partenaires.



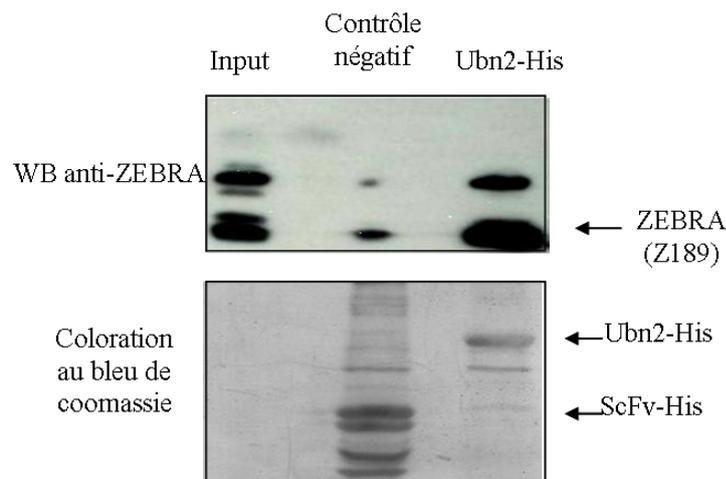
**Figure 13 : Interaction *in vitro* de ZEBRA avec l'Ubn et 14-3-3 $\epsilon$**  GST pull-down réalisé avec la GST-ZEBRA ou la GST seule et un lysat de 293 transfectées par un vecteur codant l'Ubn, 14-3-3 $\epsilon$  étant endogène.

Afin de préciser la disposition de ZEBRA, l'Ubn et 14-3-3 $\epsilon$  dans ce complexe tripartite, nous avons étudié l'interaction de chacune de ces protéines deux à deux en faisant l'analyse des interactions entre protéines recombinantes produites par des bactéries ou à partir de lysats cellulaires.

## B. Analyse des interactions entre protéines *in vitro*

### 1. Etude de l'interaction ZEBRA-Ubn

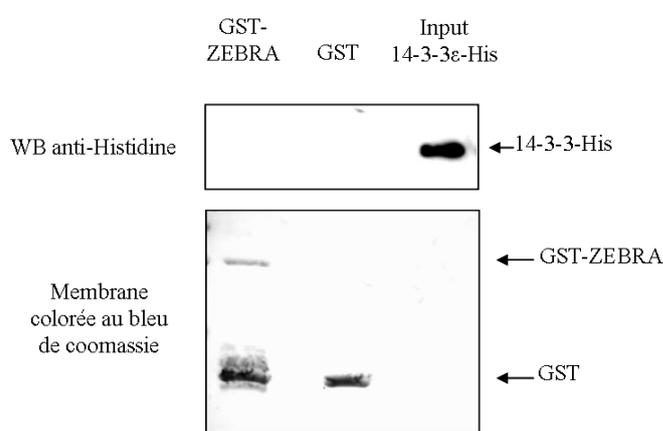
Des expériences d'histidine pull-down ont montré que ZEBRA et l'Ubn interagissent bien de manière directe (Fig.14). De plus, nous avons précisé leurs domaines d'interaction respectifs, qui s'étendent des acides aminés 355 à 693 pour l'Ubn, et des acides aminés 178 à 233 pour ZEBRA. C'est un étudiant EPHE du laboratoire, P-A. Coly, qui a produit en bactéries la série de mutants de ZEBRA et de l'Ubn avec une étiquette histidine.



**Figure 14 : Interaction directe *in vitro* entre ZEBRA et l'Ubn** L'histidine pull-down est réalisé entre le domaine 355-693 de l'Ubn fusionné à une étiquette histidine (=Ubn2-His) et le domaine 178-233 de ZEBRA (Z189) selon le même protocole que le GST pull-down. Le contrôle négatif est la protéine recombinante ScFv portant une étiquette histidine (single chain variable fragment anti-Tat).

## 2. Etude de l'interaction ZEBRA-14-3-3 $\epsilon$

Un pull-down a été réalisé avec la GST-ZEBRA et la protéine 14-3-3 $\epsilon$  recombinante, produites par des bactéries et purifiées grâce à leur étiquette respective GST ou Histidine. Cette expérience montre que la protéine 14-3-3 $\epsilon$  n'a pas été reconnue et fixée ni par la GST-ZEBRA ni par la GST seule (Fig. 15). Il n'y aurait donc pas d'interaction directe entre ZEBRA et 14-3-3 $\epsilon$ . Il est à noter que ZEBRA ne possède pas de motif consensus de liaison à 14-3-3, et s'il interagissait avec 14-3-3 $\epsilon$  cela serait indépendant de l'état de phosphorylation. L'étude de l'interaction de ZEBRA et 14-3-3 $\epsilon$  avec des protéines recombinantes produites par des bactéries, qui ne font pas de modifications post-traductionnelles, ne devrait donc pas être un facteur limitant.



**Figure 15 : Interaction *in vitro* entre ZEBRA et 14-3-3 $\epsilon$**  GST pull-down réalisé avec la GST-ZEBRA, la GST seule et 14-3-3 $\epsilon$ -His, toutes trois produites par des bactéries. 50ng de protéine 14-3-3 $\epsilon$ -His ont été utilisés pour réaliser le pull-down et chargés dans le puits correspondant à l'input.

## 3. Etude de l'interaction Ubn-14-3-3 $\epsilon$

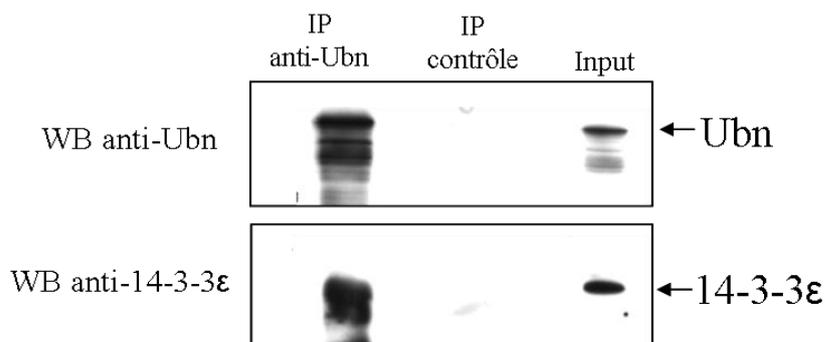
Pour étudier la fixation de la protéine 14-3-3 $\epsilon$  endogène à l'Ubn, des expériences de GST-pulldown ont été réalisées avec la GST-Ubn et un lysat cellulaire (HT29, cellules d'adénocarcinome de colon humaines). Plusieurs tampons de stringence différente ont été testés, mais aucune fois nous n'avons pu observer la fixation de 14-3-3 $\epsilon$  à la GST-Ubn (résultats non montrés). La GST-Ubn est produite dans un système procaryote. Il y a donc absence de modifications post-traductionnelles, notamment de phosphorylation. Nous reviendrons sur l'importance de la phosphorylation de l'Ubn pour la fixation de 14-3-3 $\epsilon$  dans le chapitre III.

## II. Mise en évidence d'une interaction entre ZEBRA, 14-3-3 $\epsilon$ et l'ubiquitine *in vivo*

Afin de confirmer les expériences de pull-down *in vitro* et de mettre en évidence les interactions entre ZEBRA, 14-3-3 $\epsilon$  et l'Ub $\epsilon$  *in vivo*, nous avons réalisé des immunoprécipitations (IP) sur des cellules 293 transfectées. De plus, leur localisation cellulaire a été étudiée en microscopie confocale.

### A. Etude de l'interaction Ub $\epsilon$ -14-3-3 $\epsilon$

Dans un premier temps, il a été possible de vérifier l'interaction entre l'Ub $\epsilon$  et 14-3-3 $\epsilon$  *in vivo* par une immunoprécipitation sur un lysat de cellules 293 transfectées par l'Ub $\epsilon$ , 14-3-3 $\epsilon$  étant endogène. L'immunoprécipitation avec l'anticorps anti-Ubn entraîne la protéine 14-3-3 $\epsilon$ , alors que ce n'est pas le cas avec l'anticorps contrôle. Il y a donc bien une interaction entre l'Ub $\epsilon$  et 14-3-3 $\epsilon$  *in vivo* et qui ne fait pas intervenir ZEBRA (Fig.16).



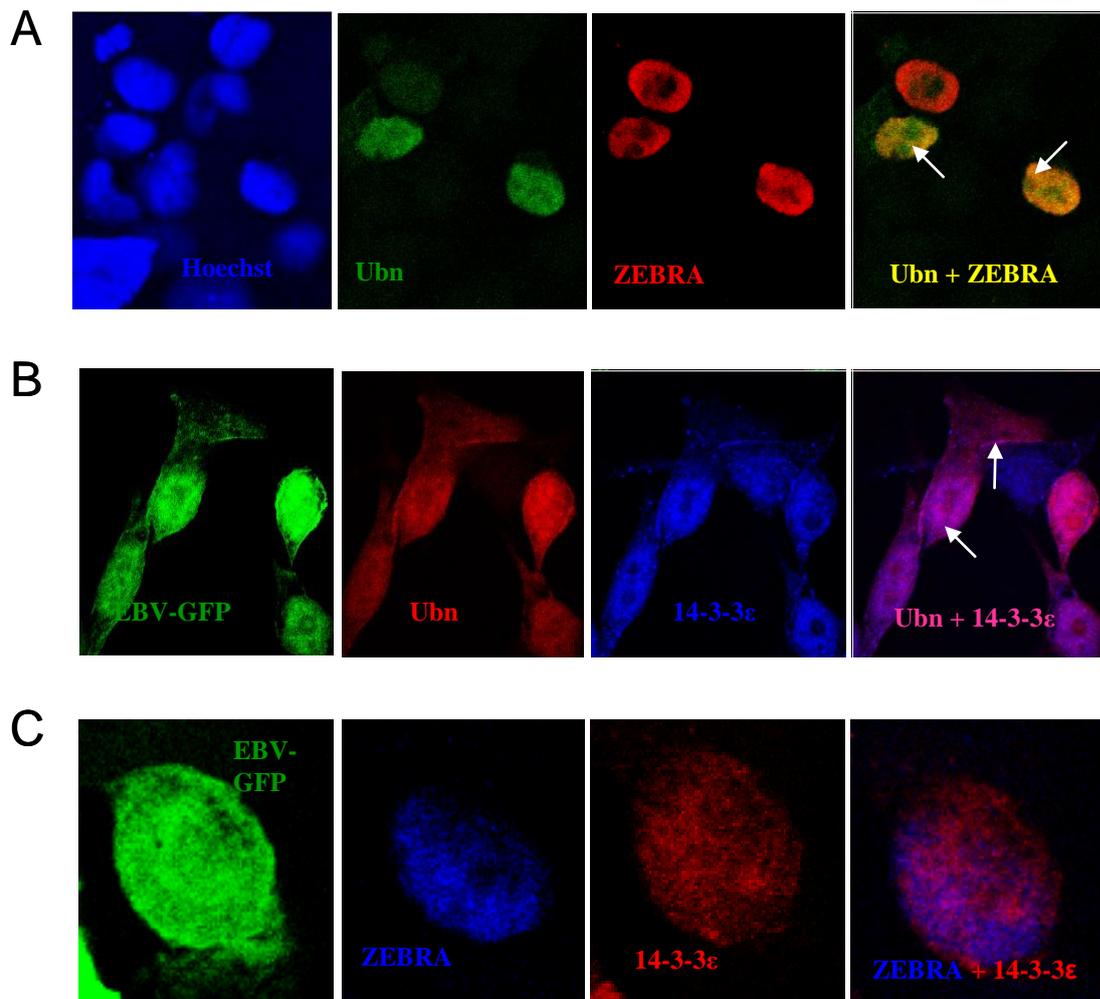
**Figure 16 : Interaction *in vivo* entre l'Ub $\epsilon$  et 14-3-3 $\epsilon$ .** Immunoprécipitation anti-Ubn réalisée sur des cellules 293 transfectées par un vecteur codant l'Ub $\epsilon$ , 14-3-3 $\epsilon$  étant endogène. L'anticorps contrôle utilisé est une immunoglobuline IgG1k de souris.

### B. Colocalisation cellulaire de 14-3-3 $\epsilon$ , ZEBRA et l'ubiquitine visualisée par microscopie confocale

Afin de confirmer les interactions entre nos trois protéines d'intérêt, des marquages immunofluorescents ont été réalisés sur différentes lignées cellulaires. La microscopie confocale permet de visualiser la colocalisation de deux protéines dans le même plan focal en observant simultanément différentes sondes fluorescentes et en superposant les images obtenues. Ainsi, nous avons montré que l'Ub $\epsilon$  et ZEBRA transfectées dans des cellules 293 colocalisent au niveau du noyau (Fig.17A, flèche). Par ailleurs, le marquage immunofluorescent de cellules AGS portant le bacmide EBV-GFP et exprimant ZEBRA constitutivement montre la colocalisation de 14-3-3 $\epsilon$  et Ub $\epsilon$  dans le noyau et aussi au niveau des jonctions serrées (Fig.17B, flèches). Cela va bien dans le sens de nos travaux précédents selon lesquels dans les cellules indifférenciées, comme

c'est le cas pour les 293, l'Ubn est nucléaire et empêche ZEBRA de se fixer à ses séquences cibles d'ADN, alors que dans les cellules différenciées, comme les AGS, l'Ubn se retrouve dans le noyau et au niveau des jonctions serrées, ce qui lui vaut de faire partie de la famille des protéines NACos. De plus, il est intéressant de voir que 14-3-3 $\epsilon$  colocalise avec l'Ubn aussi bien dans le noyau qu'au niveau des jonctions serrées car cela corrobore notre hypothèse que 14-3-3 $\epsilon$  régulerait la localisation cellulaire de l'Ubn.

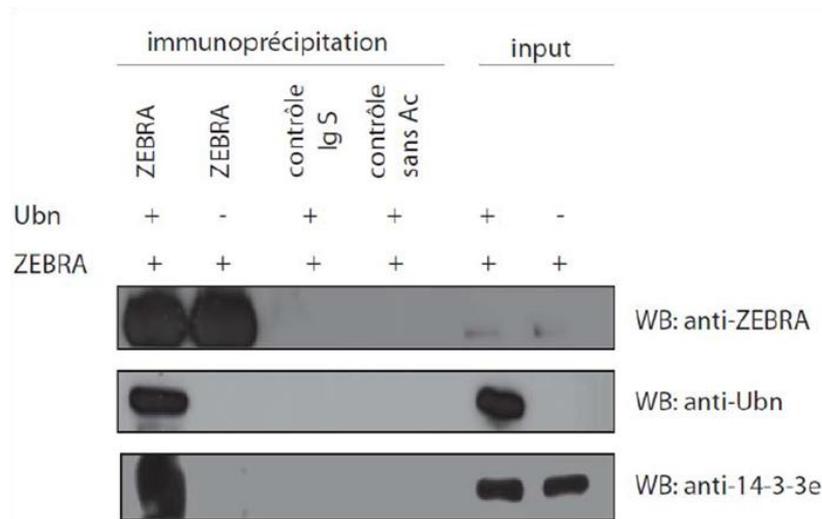
L'immunomarquage avec des anticorps anti-ZEBRA et anti-14-3-3 $\epsilon$  sur les AGS portant le bacmide EBV-GFP montre que ZEBRA et 14-3-3 $\epsilon$  ne colocalisent pas (Fig,17C). Cela confirme les résultats obtenus avec les GST Pull-down où ZEBRA et 14-3-3 $\epsilon$  n'interagissent pas.



**Figure 17 : Colocalisation cellulaire de 14-3-3 $\epsilon$ , ZEBRA et l'ubinucléine visualisée par microscopie confocale** A. Colocalisation de ZEBRA (rouge) et l'Ubn (vert) dans les noyaux de 293 transfectées avec ZEBRA et l'Ubn, les noyaux sont marqués avec du Hoechst. B. Colocalisation de 14-3-3 $\epsilon$  (bleu) et l'Ubn (rouge) dans le noyau et au niveau des jonctions serrées d'AGS portant le bacmide EBV-GFP (vert). C. Localisation de ZEBRA (bleu) et 14-3-3 $\epsilon$  (rouge) dans des AGS avec le bacmide EBV-GFP (vert)

### C. Mise en évidence du rôle d'intermédiaire de l'Ubn dans le complexe tripartite

Afin de déterminer le rôle de l'Ubn dans ce complexe tripartite, des expériences d'immunoprécipitation de ZEBRA ont été réalisées, sur des cellules 293 transfectées par ZEBRA avec ou sans co-transfection de l'Ubn. Comme le montre la figure 18, l'immunoprécipitation de ZEBRA est capable d'entraîner l'Ubn et 14-3-3 $\epsilon$ . Cela confirme *in vivo* l'existence d'un complexe mettant en jeu ces trois protéines. En revanche, la co-immunoprécipitation de 14-3-3 $\epsilon$  n'est possible que si l'Ubn est co-transfectée. En l'absence d'Ubn, ZEBRA n'interagit pas avec 14-3-3 $\epsilon$ .

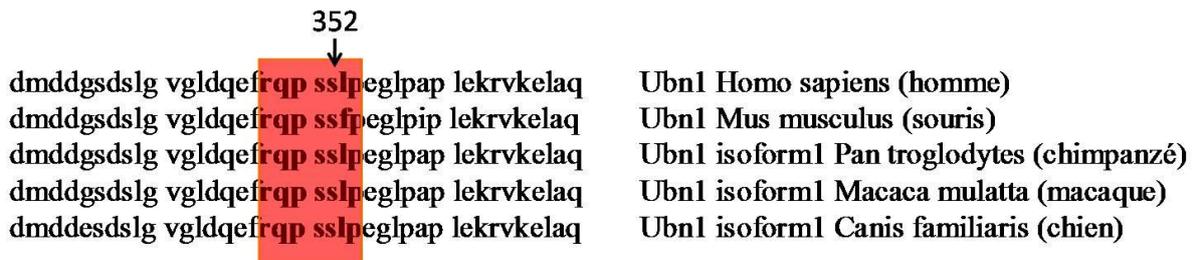


**Figure 18 : Interaction *in vivo* de ZEBRA avec l'Ubn et 14-3-3 $\epsilon$ .** Immunoprécipitation de ZEBRA dans des cellules 293 transfectées par ZEBRA +/- l'Ubn ; 14-3-3 $\epsilon$  est endogène. L'anticorps contrôle est une immunoglobuline de souris (Ig S)

Toutes nos expériences *in vitro* et *in vivo* ont finalement permis de mettre en évidence une interaction directe entre ZEBRA et l'Ubn et entre l'Ubn et 14-3-3 $\epsilon$ . En revanche nous n'avons pas mis en évidence d'interaction directe entre 14-3-3 $\epsilon$  et ZEBRA et même la co-immunoprécipitation de 14-3-3 $\epsilon$  par ZEBRA n'est possible qu'en présence de l'Ubn. Cela suggère que l'Ubn se placerait en intermédiaire entre ZEBRA et 14-3-3 $\epsilon$  dans ce complexe tripartite.

### III. Importance de la phosphorylation de l'Ubn pour sa liaison à 14-3-3ε

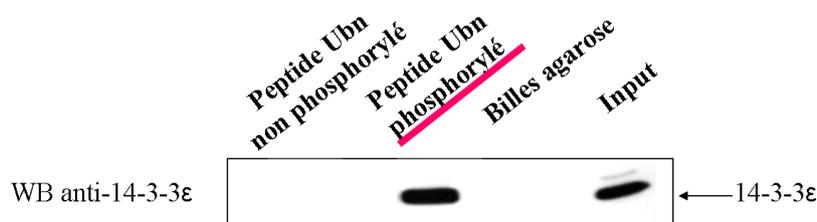
Les protéines 14-3-3 se fixent sur leurs ligands, à quelques exceptions près, au niveau d'un site consensus RSXpSXP (motif de type 1) ou RXXXpSXP (motif de type 2) contenant une sérine phosphorylée (pS) (Muslin *et al.*, 1996). L'Ubn contient dans sa séquence le motif de type 2 au niveau des acides aminés 348-354, avec une sérine phosphorylée en position 352, et on peut voir que ce motif est très conservé à travers différentes espèces de mammifères (Fig.19).



**Figure 19 : Séquence protéique de l'Ubn (331-370) chez différentes espèces de mammifères.** L'encadré rouge indique le motif consensus de liaison à 14-3-3, très conservé entre les espèces. La flèche indique la sérine 352.

#### A. Etude de la liaison entre un peptide de l'Ubn et 14-3-3ε

Afin de vérifier l'importance de la phosphorylation de l'Ubn pour son interaction avec 14-3-3ε, nous avons fait synthétiser des peptides fixés sur des billes d'agarose (Biotem), correspondants à 16 acides aminés de l'Ubn contenant le motif consensus de liaison à 14-3-3ε, la sérine étant phosphorylée ou non. Les expériences de pull-down réalisées avec des lysats de différents types cellulaires (293, HT29) montrent clairement que la protéine 14-3-3ε se fixe sur la séquence peptidique de l'Ubn uniquement lorsque la sérine est phosphorylée (Fig.20). Cela confirme que l'interaction entre l'Ubn et 14-3-3ε est directe, sans intervention de ZEBRA puisqu'il n'était pas présent dans le lysat cellulaire, et cela souligne l'importance de l'état de phosphorylation de l'Ubn. Toutefois il ne s'agit que d'un fragment de 16 acides aminés de l'Ubn et il serait intéressant de pouvoir confirmer cette interaction avec l'Ubn entière.

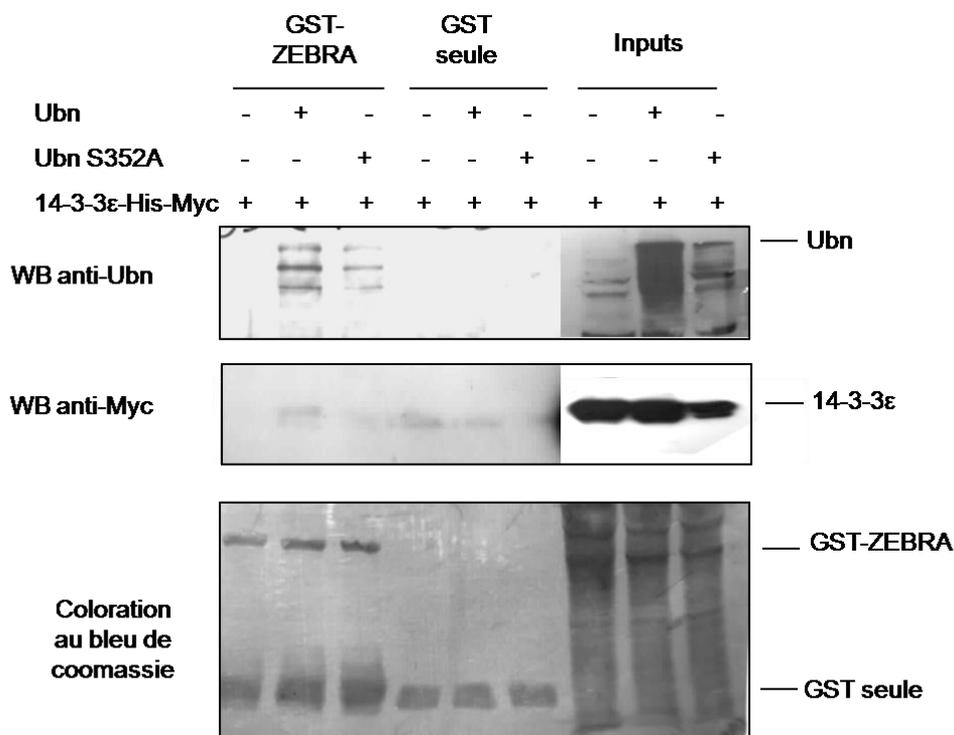


**Figure 20 : 14-3-3ε se fixe sur l'Ubn au niveau d'un site consensus contenant une sérine phosphorylée.** Pull-down réalisé à partir de lysat de cellules HT29 sur différents peptides de l'Ubn, phosphorylés ou non, fixés sur des billes d'agarose, ou des billes d'agarose seules. Le même protocole que les GST pull-down est utilisé.

## B. Etude de la liaison de mutants de l'Ubn avec 14-3-3ε

Pour démontrer l'importance de la sérine 352 de l'Ubn dans l'interaction avec 14-3-3ε, des expériences de GST pull-down ont été réalisées avec des mutants de l'Ubn faits par H. Gruffat, ENS Lyon. Par mutagenèse dirigée, la sérine 352 a été remplacée soit par une alanine qui empêche toute phosphorylation (=UbnS352A), soit par un acide glutamique qui mime stériquement la présence d'un groupement phosphate (=UbnS352E).

La figure 21 montre que la GST-ZEBRA interagit avec le mutant UbnS352A aussi bien qu'avec l'Ubn sauvage. De plus, dans un lysat de cellules 293 où 14-3-3ε et l'Ubn sont surexprimées, le pull-down avec la GST-ZEBRA révèle la présence d'Ubn et de 14-3-3ε, alors qu'aucun signal n'est détecté avec la GST seule. En revanche, sans transfection d'Ubn ou en présence du mutant UbnS352A, la GST-ZEBRA n'est pas capable d'interagir avec 14-3-3ε surexprimée (Fig.21). Cette même expérience sera réalisée également avec le mutant UbnS352E. Comme avec l'Ubn phosphorylée, on s'attend à ce que la GST-ZEBRA retienne à la fois UbnS352E et 14-3-3ε. Ces résultats montrent que l'Ubn est un intermédiaire nécessaire pour l'interaction entre ZEBRA et 14-3-3ε et que la fixation de 14-3-3ε est dépendante de la phosphorylation de la sérine 352 de l'Ubn.



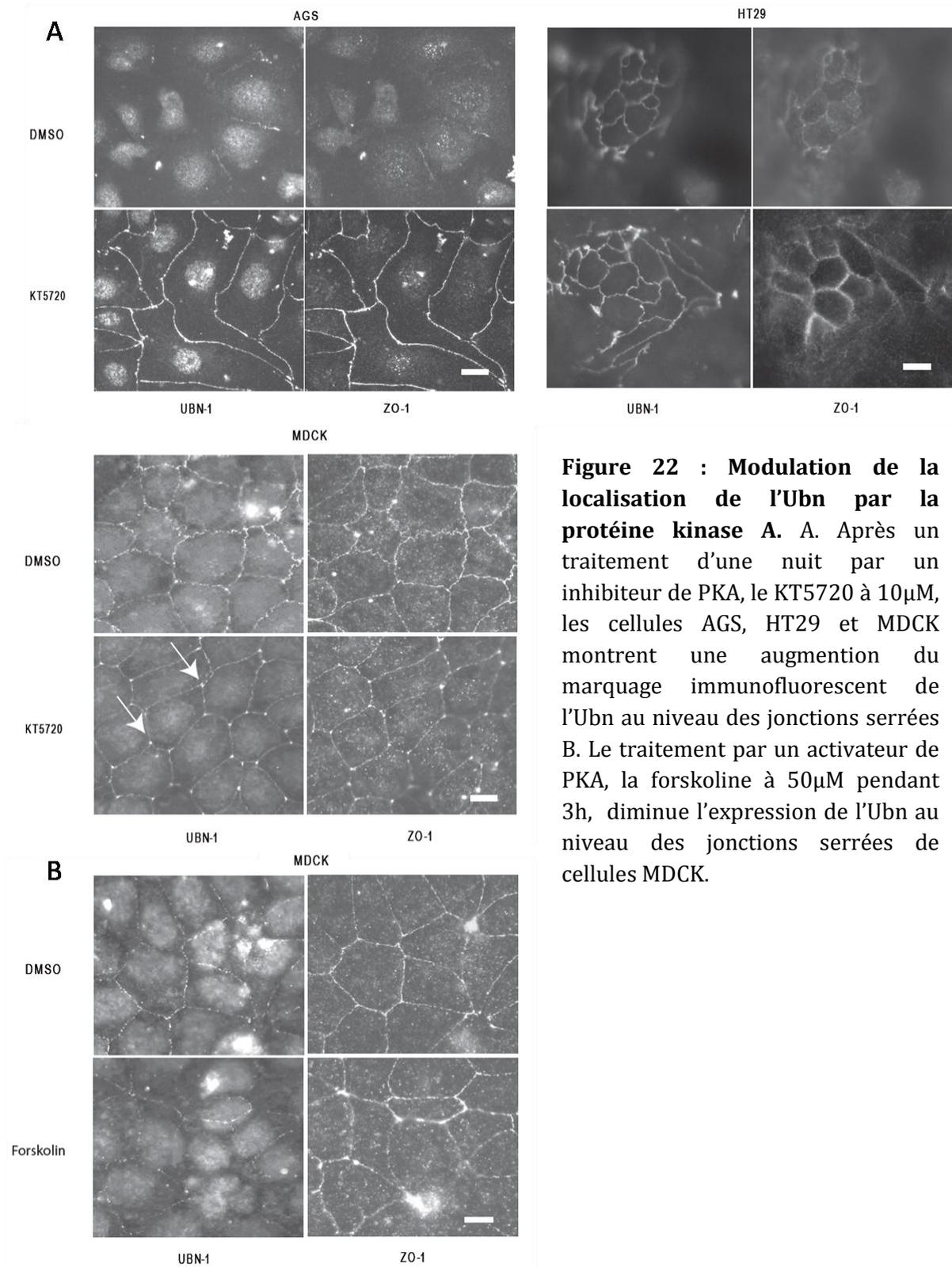
**Figure 21 : La liaison de 14-3-3ε à ZEBRA se fait par l'intermédiaire de l'Ubn selon son état de phosphorylation.** GST-pulldown réalisé à partir de lysats cellulaires de 293 transfectées par l'Ubn ou son mutant UbnS352A et 14-3-3ε avec les étiquettes histidine et myc.

### C. Impact de la phosphorylation de l'Ubn sur sa localisation cellulaire

La sérine 352 de l'Ubn dans le site consensus de liaison à 14-3-3 est un site de phosphorylation potentiel de plusieurs kinases dont la protéine kinase A (PKA). Nous avons utilisé un inhibiteur ou un activateur de la PKA afin d'en observer les effets sur la localisation de l'Ubn. Ce travail a été réalisé par Audrey Conti, doctorante dans notre laboratoire. Un marquage par immunofluorescence montre l'Ubn et ZO-1 dans les jonctions serrées de différents types de cellules épithéliales (Fig.22A). Après traitement par l'inhibiteur de PKA, le KT5720, le marquage de l'Ubn s'intensifie au niveau des jonctions serrées des cellules gastriques (AGS) et de colon (HT29). Dans les MDCK, où l'Ubn est déjà bien marquée au niveau des jonctions serrées, le traitement par KT5720 concentre l'Ubn dans les zones correspondant aux intersections entre les cellules (Fig.22A, flèches). Le marquage de ZO-1 montre une intensification sur les cellules AGS traitées par KT5720 mais peu ou pas de différence avec les cellules HT29 et MDCK.

Le traitement des cellules MDCK par la forskoline, activateur de la PKA, montre également une différence de marquage immunofluorescent de l'Ubn par rapport aux cellules contrôle (Fig.22B). En effet, la forskoline diminue l'intensité du marquage de l'Ubn au niveau des jonctions serrées alors que le marquage de ZO-1 ne montre pas de différence. Aucune différence significative n'a été observée pour le marquage de l'Ubn et ZO-1 avec les AGS ou les HT29 pour lesquelles le marquage de l'Ubn au niveau des jonctions serrées est déjà faible en temps normal.

Ces expériences montrent qu'il est possible de moduler l'activité de la PKA avec des composés chimiques et de modifier ainsi la localisation de l'Ubn au niveau des jonctions serrées. L'Ubn n'interagissant avec la protéine 14-3-3 $\epsilon$  que lorsqu'elle est phosphorylée, il est raisonnable de penser que l'inhibiteur de PKA KT5720 empêche la liaison de 14-3-3 $\epsilon$  sur l'Ubn et qu'au contraire la forskoline, activateur de la PKA, renforce leur liaison. Cela suggère que l'interaction de l'Ubn avec 14-3-3 $\epsilon$  diminuerait sa localisation au niveau des jonctions serrées des cellules épithéliales. Au contraire, cela favoriserait sa localisation nucléaire, permettant à l'Ubn d'interagir avec ZEBRA et d'empêcher le cycle lytique d'EBV. Il serait intéressant d'étudier cela plus en détail avec des expériences de pull-down et de microscopie confocale.



**Figure 22 : Modulation de la localisation de l'Ubn par la protéine kinase A.** A. Après un traitement d'une nuit par un inhibiteur de PKA, le KT5720 à  $10\mu\text{M}$ , les cellules AGS, HT29 et MDCK montrent une augmentation du marquage immunofluorescent de l'Ubn au niveau des jonctions serrées B. Le traitement par un activateur de PKA, la forskoline à  $50\mu\text{M}$  pendant 3h, diminue l'expression de l'Ubn au niveau des jonctions serrées de cellules MDCK.

## DISCUSSION - PERSPECTIVES

Ce travail a consisté à mettre en évidence l'existence d'un complexe entre la protéine virale ZEBRA et les protéines cellulaires Ubn et 14-3-3 $\epsilon$ , à préciser de quelle manière l'Ubn et 14-3-3 $\epsilon$  interagissent avec ZEBRA et quelle est leur influence sur le cycle lytique du virus d'Epstein-Barr. Nous avons tout d'abord démontré *in vivo* et *in vitro* qu'il existe bien un complexe entre ces trois protéines. Puis, nous avons étudié les interactions entre ces protéines deux à deux.

Grâce à l'utilisation de protéines recombinantes et à des observations en microscopie confocale nous avons prouvé que l'Ubn interagit de manière directe avec ZEBRA. Nous avons pu déterminer les domaines d'interaction entre ZEBRA et l'Ubn des acides aminés 355 à 693 pour l'Ubn, et des acides aminés 178 à 233 pour ZEBRA. Il serait intéressant de faire d'autres mutants de délétion pour définir encore plus précisément ces domaines d'interaction. Il est à noter que le domaine défini sur ZEBRA correspond à son site de liaison à l'ADN (178-195) et à son site de dimérisation (196-233). Cela explique la capacité de l'Ubn à empêcher ZEBRA de se fixer sur ses zones d'ADN cibles (Aho *et al.*, 2000).

En ce qui concerne l'interaction entre l'Ubn et 14-3-3 $\epsilon$ , nous avons pu vérifier *in vivo*, par immunoprécipitation et par microscopie confocale, qu'elle existe et qu'elle ne nécessite pas l'intervention de ZEBRA. En revanche, nous ne pouvons pas encore totalement exclure la possibilité qu'il y ait un intermédiaire supplémentaire entre ces deux protéines cellulaires. Nous n'avons pas encore pu vérifier *in vitro* avec des protéines recombinantes purifiées que cette interaction est directe. En effet, l'Ubn produite par des systèmes bactériens n'est pas phosphorylée et ne peut donc pas interagir avec 14-3-3 $\epsilon$ . La sérine 352 de l'Ubn dans le site consensus de liaison à 14-3-3 est un site de phosphorylation potentiel de plusieurs kinases dont la protéine kinase A (PKA). Nous sommes en train de mettre au point la phosphorylation de la GST-Ubn par la PKA, afin de vérifier qu'elle est capable de fixer la protéine 14-3-3 $\epsilon$  recombinante purifiée et de confirmer que cette interaction est bien directe.

Les différentes expériences *in vivo* et *in vitro* que nous avons réalisées ne nous ont pas permis de mettre en évidence une interaction directe entre ZEBRA et 14-3-3 $\epsilon$ . En revanche, nous avons montré que ZEBRA est capable de retenir 14-3-3 $\epsilon$  dans un lysat cellulaire uniquement en présence de l'Ubn, de façon dépendante de la sérine 352 phosphorylée de l'Ubn. Des mutants de l'Ubn mimant (UbnS352E) ou invalidant (UbnS352A) la phosphorylation ont été créés. Nous

avons pu observer que la capacité de la GST-ZEBRA à retenir 14-3-3 $\epsilon$  dans un lysat cellulaire est effectivement dépendante de la présence d'Ubn phosphorylée dans ce lysat. Sans transfection d'Ubn ou en présence du mutant UbnS352A, la GST-ZEBRA n'est pas capable de retenir 14-3-3 $\epsilon$  surexprimée. Il sera intéressant de réaliser cette même expérience avec le mutant UbnS352E pour vérifier que la GST-ZEBRA retient à la fois UbnS352E et 14-3-3 $\epsilon$ . Ces résultats montrent que dans le complexe tripartite, l'Ubn se place en intermédiaire entre ZEBRA et 14-3-3 $\epsilon$  et que la fixation de 14-3-3 $\epsilon$  est dépendante de la phosphorylation de la sérine 352 de l'Ubn.

Dans notre modèle de contrôle du cycle productif de l'EBV dans les cellules épithéliales, quand ZEBRA est exprimée dans le noyau d'une cellule, l'Ubn l'empêche de se fixer sur ses séquences cibles d'ADN (Gruffat *et al.*, 2011). Sous l'influence de la différenciation cellulaire et éventuellement d'autres signaux, l'Ubn est délocalisée au niveau des jonctions serrées, ZEBRA est alors libre d'initier le cycle lytique et de produire de nouveaux virions. Il existe deux hypothèses concernant l'intervention de la protéine 14-3-3 $\epsilon$  dans ce modèle. La première est que 14-3-3 $\epsilon$  maintiendrait l'Ubn phosphorylée dans le noyau pour qu'elle interagisse avec ZEBRA. Un signal de déphosphorylation provoquerait alors la libération de l'Ubn par 14-3-3 $\epsilon$  et sa relocalisation au niveau des jonctions serrées. La seconde hypothèse est que l'Ubn interviendrait avec ZEBRA alors qu'elle est non phosphorylée et un signal de phosphorylation permettrait l'interaction de 14-3-3 $\epsilon$  avec l'Ubn et provoquerait sa relocalisation au niveau des jonctions serrées. Il nous faut déterminer laquelle de ces hypothèses correspond à la réalité.

Afin de vérifier ces hypothèses, il est important d'approfondir l'étude de la phosphorylation de l'Ubn et les conséquences sur sa localisation cellulaire. Ce travail a été poursuivi par Audrey Conti, doctorante dans notre laboratoire à l'UVHCI. Nous avons traité différentes lignées cellulaires avec des inhibiteurs ou des activateurs spécifiques de la PKA et observé la conséquence sur la localisation cellulaire de l'Ubn par microscopie à fluorescence. L'utilisation d'un inhibiteur de la PKA, le KT5720, la relocalise au niveau des jonctions serrées. Ceci est vraisemblablement dû à une diminution de la phosphorylation de l'Ubn. A l'inverse, un activateur de la PKA, la forskoline, induit une diminution de la présence d'Ubn au niveau des jonctions serrées, favorisant sans doute sa phosphorylation et donc sa liaison à 14-3-3 $\epsilon$ . Ces résultats montrent que la PKA est impliquée dans la régulation de la localisation cellulaire de l'Ubn. Par ailleurs, d'autres études démontrent que la PKA est importante dans la régulation de la localisation cellulaire de certaines protéines associées aux jonctions serrées comme l'occludine et la claudine (Kawedia *et al.*, 2008, French *et al.*, 2009). Par exemple, la claudine est généralement trouvée au niveau des jonctions serrées, mais sa localisation subcellulaire peut être altérée lors du développement de cancers. Dans les lésions bénignes et les mélanomes les

moins agressifs, la claudine est exprimée dans le noyau, alors que dans les mélanomes agressifs, la claudine est abondante au niveau du cytoplasme. Des études ont prouvé que la phosphorylation de la claudine par la PKA est nécessaire pour sa sortie du noyau et sa translocation vers le cytosol (French *et al.*, 2009).

Nos expériences montrent donc que l'interaction de l'Ubn phosphorylée avec 14-3-3 $\epsilon$  diminue sa localisation au niveau des jonctions serrées des cellules épithéliales et sont en faveur de la première hypothèse de notre modèle. 14-3-3 $\epsilon$  favoriserait la localisation nucléaire de l'Ubn et son interaction avec ZEBRA. Par la suite, pour confirmer plus certainement notre hypothèse, nous devons poursuivre l'étude de la phosphorylation de l'Ubn dans les différents compartiments cellulaires. Après un fractionnement subcellulaire, nous pourrions confirmer par une révélation de western-blot avec un anticorps anti-phosphosérine si l'Ubn est bien plus phosphorylée dans le noyau qu'au niveau des jonctions serrées. Il serait intéressant de pouvoir observer par microscopie confocale la localisation cellulaire des mutants UbnS352A et UbnS352E et leur interaction avec 14-3-3 $\epsilon$ . Mais l'Ubn transfectée s'exprimant systématiquement dans le noyau, il sera particulièrement difficile d'observer les mutants de l'Ubn au niveau des jonctions serrées.

La structure des protéines 14-3-3 forme un « L » avec une poche basique contenant quatre acides aminés identifiés comme étant responsables de l'interaction avec la phosphosérine sur les ligands potentiels (Yaffe *et al.*, 1997). Xavier Brazzolotto, post doctorant à l'UVHCI, a construit un mutant dominant négatif pour trois de ces acides aminés en transformant les trois arginines 57, 61 et 132 de 14-3-3 $\epsilon$  en alanine. De la même manière que nous avons étudié les mutants de l'Ubn, nous referons les expériences de pulldown avec la GST-ZEBRA ou les peptides de l'Ubn phosphorylés ou non, avec le mutant de 14-3-3 $\epsilon$  pour vérifier si la liaison à l'Ubn est abolie. Ainsi, nous aurons réellement mis en évidence les acides aminés impliqués dans l'interaction entre l'Ubn et 14-3-3 $\epsilon$ . Nous pourrions également transfecter le mutant dominant négatif de 14-3-3 $\epsilon$  dans différents types cellulaires et observer par microscopie si la localisation de l'Ubn s'en trouve affectée. Etant donné que 14-3-3 $\epsilon$  est fortement exprimé de manière endogène, il n'est pas certain que la transfection du mutant dominant négatif nous montre un changement de localisation de l'Ubn. Il faudrait préalablement à la transfection du mutant, éteindre l'expression de 14-3-3 $\epsilon$  endogène avec des ARN interférants.

Par ailleurs, plusieurs équipes ont récemment décrit l'Ubn comme un composant du complexe d'assemblage de la chromatine indépendant de la réplication, contenant le variant d'histone H.3.3 et les protéines HIRA et ASF1a (Banumathy *et al.*, 2009, Balaji *et al.*, 2009).

Lorsque l'Ubn est nucléaire, elle se fixe sur l'ADN et peut réprimer la transcription de certains gènes, tel que le gène de la cycline A2. On pourrait imaginer que l'Ubn, en participant à l'organisation des nucléosomes au niveau des promoteurs viraux activés par ZEBRA, bloquerait la fixation de ZEBRA à l'ADN et inhiberait la transcription des gènes ZEBRA-dépendants. 14-3-3 $\epsilon$  pourrait interagir avec l'Ubn pour favoriser la fixation de l'Ubn sur la chromatine. Nous vérifierons tout d'abord la fixation de l'Ubn aux promoteurs activés par ZEBRA par des expériences de Chromatin-ImmunoPrecipitation (ChIP). Nous pourrions, par la suite, comparer la capacité de fixation de l'Ubn à l'ADN en présence de 14-3-3 $\epsilon$  endogène ou surexprimé, ou bien encore après la transfection de 14-3-3 $\epsilon$  dominant négatif, créé au laboratoire.

Les expériences réalisées et à venir permettront de mieux comprendre les mécanismes de régulation du cycle lytique de l'EBV, comment ce virus utilise les protéines cellulaires pour se propager et quel est son rôle dans l'induction des cancers.

THESE SOUTENUE PAR : Charlotte Sueur

TITRE :

**IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES PARTENAIRES CELLULAIRES DE ZEBRA, FACTEUR DE TRANSCRIPTION DU VIRUS EPSTEIN-BARR**

Mise en évidence d'un complexe tripartite entre la protéine virale ZEBRA et les protéines cellulaires Ubinucléine et 14-3-3 $\epsilon$

## CONCLUSION

Le virus Epstein-Barr (EBV) est un virus présent à l'état latent chez 95% de la population adulte. C'est pourtant un virus oncogène pouvant être associé à des cancers lymphoïdes et épithéliaux. La protéine ZEBRA est un facteur de transcription viral clé dans la réactivation virale et l'oncogenèse associée à l'EBV. L'équipe de recherche dans laquelle j'effectue mon internat de Pharmacie Spécialisée s'intéresse aux interactions de ZEBRA avec les protéines cellulaires, dans des modèles issus de différents cancers. De précédents travaux ont décrit une protéine cellulaire, l'Ubinucléine (Ubn), capable d'empêcher la fixation de ZEBRA sur ses séquences cibles d'ADN. Notre laboratoire a montré que l'Ubn possède une double localisation cellulaire, nucléaire et dans les jonctions serrées. Le transport de l'Ubn entre ces deux sites fait très certainement intervenir d'autres partenaires cellulaires et notre attention s'est portée particulièrement sur les protéines 14-3-3 connues pour réguler l'import/export nucléaire de certaines protéines.

L'objectif de mon travail est de mettre en évidence un éventuel complexe tripartite ZEBRA-Ubn-14-3-3 $\epsilon$  afin de comprendre dans quelles conditions l'Ubn inhibe les fonctions de ZEBRA et donc le cycle lytique d'EBV. Cela nous a amené à étudier l'hypothèse que la protéine 14-3-3 $\epsilon$ , en contrôlant la localisation cellulaire de l'Ubn, interviendrait comme régulateur de l'interaction entre l'Ubn et ZEBRA.

Des techniques *in vivo* et *in vitro* (immunoprécipitation, pull-down, immunofluorescence) nous ont permis de mettre en évidence le complexe ZEBRA-Ubn-14-3-3 $\epsilon$  et de préciser que l'Ubn interagit de manière directe avec ZEBRA d'une part et avec 14-3-3 $\epsilon$  d'autre part. Plus précisément, 14-3-3 $\epsilon$  se fixe sur l'Ubn au niveau d'un motif consensus contenant la sérine 352 qui doit être phosphorylée. En revanche, aucune interaction directe entre ZEBRA et 14-3-3 $\epsilon$  n'a pu être démontrée. L'Ubn se place donc en intermédiaire entre ses deux partenaires. L'étude de la phosphorylation de l'Ubn a montré que l'Ubn non phosphorylée se retrouve plus fortement au niveau des jonctions serrées.

Cela suggère que 14-3-3ε favoriserait la localisation nucléaire de l'Ubn, lui permettant ainsi d'interagir avec ZEBRA et d'empêcher l'initiation du cycle lytique de l'EBV.

Il sera intéressant de poursuivre l'étude de l'état de phosphorylation de l'Ubn dans le noyau ou au niveau des jonctions serrées afin de déterminer précisément comment la protéine 14-3-3ε régule sa localisation cellulaire et quels sont les signaux cellulaires impliqués. L'ensemble de ce travail permettra de mieux comprendre les mécanismes de régulation du cycle lytique de l'EBV et l'induction des cancers.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER  
Grenoble, le 20/10/2011

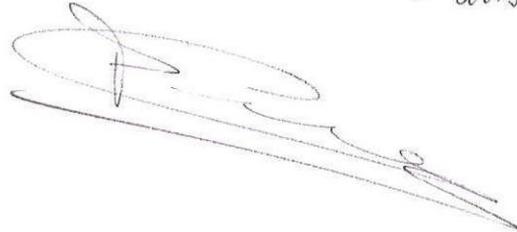
LE DOYEN



(\*) Professeur Christophe RIBUOT



LE PRESIDENT DE LA THESE

*Christine Pined*  


## RÉFÉRENCES

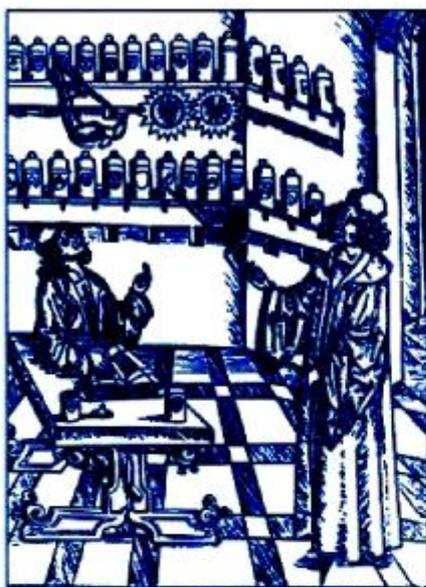
- Agarwal-Mawal A., H. Qureshi, P. Cafferty Z. Yuan, D. Han, R. Lin, H. Paudel (2003) 14-3-3 connects Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  to Tau within a brain microtubule-associated Tau phosphorylation complex. *J Biol Chem*, 278(15):12722–12728
- Aguilera C., V. Fernandez-Majada, J. Ingles-Esteve, V. Rodilla, A. Bigas, L. Espinosa (2006) Efficient nuclear export of p65-IB complexes requires 14-3-3 proteins. *J Cell Sci*, 119(17):3695-704
- Aho S., Buisson M., Pajunen T., *et al.* (2000) Ubinuclein, a novel nuclear protein interacting with cellular and viral transcription factors. *J Cell Biol*, 148(6):1165-1176
- Aho S., Lupo J., Coly P.A., *et al.* (2009) Characterization of the ubinuclein protein as a new member of the nuclear and adhesion complex components (NACos). *Biol Cell*, 101(6):319-334
- Aoki H., Y. Arakawa, J. Hayashi, M. Moriyama, O. Hino (2000) Hepatitis C Virus core protein interacts with 14-3-3 protein and activates the kinase Raf-1. *J Virol*, 74(4):1736–1741
- Arbach H., I. Joab (2005) EBV and breast cancer: questions and implications. In Robertson, E.S. (ed.), *Epstein Barr Virus*. Caister Academic Press, Philadelphia, 139-156
- Balaji S., Lakshminarayan M. Iyer and L. Aravind (2009) HPC2 and ubinuclein define a novel family of histone chaperones conserved throughout eukaryotes. *Mol Biosyst*, 5(3): 269-275
- Banerjee A, Meyer K, Mazumdar B, Ray RB, Ray R. (2010) Hepatitis C virus differentially modulates activation of forkhead transcription factors and insulin-induced metabolic gene expression. *J Virol*, 84(12):5936-46
- Banumathy G., Somaiah N., Zhang R., *et al.* (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(3):758-770
- Berg D., Holzmann C., Riess O. (2003) 14-3-3 Proteins in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*, 4(9):752-762
- Bhende PM, Seaman WT, Delecluse HJ, Kenney SC. (2004) The EBV lytic switch protein, Z, preferentially binds to and activates the methylated viral genome. *Nat Genet*, 36(10):1099-104
- Borza C.M. and Hutt-Fletcher L.M. (2002) Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med*, 8(6):594-599
- Brunet A, Kanai F, Stehn J, *et al.* (2002) 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol*. 156(5):817-828
- Chen C., Li D. and Guo N. (2009) Regulation of cellular and viral protein expression by the Epstein-Barr virus transcriptional regulator Zta: implications for therapy of EBV associated tumors. *Cancer Biol Ther*, 8(11):987-995
- Chen H-K, Fernandez-Funez P, Acevedo SF, Lam YC, Kaytor MD, Fernandes MH (2003) Interaction of Akt-phosphorylated ataxin-1 with 14-3-3 mediates neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type. *Cell*, 113(4):457–468
- Chêne A, Donati D, Guerreiro-Cacais AO, *et al.* (2007) A molecular link between malaria and Epstein-Barr virus reactivation. *PLoS Pathog*, 3(6):e80
- Choi KC, Lee S, Kwak SY, *et al.* (2005) Increased expression of 14-3-3varepsilon protein in intrinsically aged and photoaged human skin in vivo. *Mech Ageing Dev*, 126(6-7):629-36
- Choudhuri T, Verma SC, Lan K, Murakami M, Robertson ES. (2007) The ATM/ATR signaling effector Chk2 is targeted by Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C to release the G2/M cell cycle block. *J Virol*, 81(12):6718-30
- Clark KL, Oelke A, Johnson ME, Eilert KD, Simpson PC, Todd SC. (2007) CD81 associates with 14-3-3 in a redox-regulated palmitoylation-dependent manner. *J Biol Chem*, 279(19):19401-6
- Datta A.K., Colby B.M., Shaw J.E. and Pagano J.S. (1980) Acyclovir inhibition of Epstein-Barr virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(9):5163-5166

- Delecluse HJ, Feederle R, O'Sullivan B, Taniere P. (2007) Epstein Barr virus-associated tumours: an update for the attention of the working pathologist. *J Clin Pathol*, 60(12):1358-64
- Dolcetti R, Boiocchi M. (1998) Epstein-Barr virus in the pathogenesis of Hodgkin's disease. *Biomed Pharmacother*, 52(1):13-25
- Dougherty M., D. Morrisson (2004) Unlocking the code of 14-3-3. *J Cell Sci*, 117(10):1875,1884
- Epstein MA, Henlé G, Achong BG, Barr YM (1965) Studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *J Exp Med*, 121:761-70
- Fafi-Kremer S., Morand P., Brion J.P., et al. (2005) Long-term shedding of infectious epstein-barr virus after infectious mononucleosis. *J Infect Dis*, 191(6), 985-989
- Fahmi H., C. Cochet, Z. Hmama, P. Opolon, and I. Joab (2000) Transforming growth factor beta 1 stimulates expression of the Epstein-Barr virus BZLF1 immediate-early gene product ZEBRA by an indirect mechanism which requires the MAPK kinase pathway. *J. Virol*, 74(13):5810-5818
- Feng W.H., Hong G., Delecluse HJ., et al. (2004) Lytic induction therapy for Epstein-Barr virus-positive B-cell lymphomas. *J Virol*, 78(4):1893-1902
- Feng W.H., Israel B., Raab-Traub N., Busson P. and Kenney S.C. (2002a) Chemotherapy induces lytic EBV replication and confers ganciclovir susceptibility to EBV-positive epithelial cell tumors. *Cancer Res*, 62(6):1920-1926
- Feng W.H., Westphal E., Mauser A., Raab-Traub N., Gulley M.L., Busson P. and Kenney S.C. (2002b) Use of adenovirus vectors expressing Epstein-Barr virus (EBV) immediate-early protein BZLF1 or BRLF1 to treat EBV-positive tumors. *J Virol*, 76(21):10951-10959
- Forte E, Luftig MA. (2011) The role of microRNAs in Epstein-Barr virus latency and lytic reactivation. *Microbes Infect*, Sous presse
- French AD, Fiori JL, Camilli TC, et al. (2009) PKC and PKA phosphorylation affect the subcellular localization of claudin-1 in melanoma cells. *Int J Med Sci*, 6(2):93-101
- Gerber P, Whang-Peng J, Monroe JH (1969) Transformation and chromosome changes induced by Epstein-Barr virus in normal human leukocyte cultures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 63(3):740-747
- Gershburg E, Pagano JS. (2005) Epstein-Barr virus infections: prospects for treatment. *J Antimicrob Chemother*, 56(2):277-81
- Glaunsinger B.A., Lee S.S., Thomas M., Banks L. and Javier R. (2000) Interactions of the PDZprotein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. *Oncogene*, 19(46):5270-5280
- Gruffat H, Lupo J, Morand P, Boyer V, 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(2):784-94
- Hadinoto V., Shapiro M., Sun C.C. and Thorley-Lawson D.A. (2009) The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLoS Pathog*, 5(7):e1000496
- Hermeking H. (2003) The 14-3-3 cancer connection. *Nat Rev Cancer*, 3(12):931-943
- Hislop A.D., Taylor G.S., Sauce D. and Rickinson A.B. (2007) Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol*, 25:587-617
- Ikeda M., T Hikita, J Asaki, et al. (2008) Identification of YWHAE, a gene encoding 14-3-3epsilon, as a possible susceptibility gene for schizophrenia. *Hum Mol Genet*, 17(20):3212-3222
- Israel B.F., Shannon C.K. (2005) EBV lytic infection. In Robertson, E.S. (ed.), *Epstein Barr Virus*. Caister Academic Press, Philadelphia, 571-601.
- Jui-Sheng W., Wai-Mui C., Yau-Sheng T et al. (2009) Ligand-activated peroxysome proliferator-activated receptor-γ protects against ischemic cerebral infarction and neuronal apoptosis by 14-3-3ε upregulation. *Circulation*, 119(8):1124-1134
- Kang GH, Lee S, Kim WH, Lee HW, Kim JC, Rhyu MG, Ro JY. (2002) Epstein-barr virus-positive gastric carcinoma demonstrates frequent aberrant methylation of multiple genes and constitutes CpG island methylator phenotype-positive gastric carcinoma. *Am J Pathol*, 160(3):787-94

- Kawedia JD, Jiang M, Kulkarni A, Waechter HE, Matlin KS, Pauletti GM, Menon AG. (2008) The protein kinase A pathway contributes to Hg<sup>2+</sup>-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(3):829-37
- Kenney S.C., Holley-Guthrie E., Quinlivan E.B., *et al.* (1992) The cellular oncogene c-myc can interact synergistically with the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator in lymphoid cells. *Mol Cell Biol*, 12(1):136-146
- Kenney JL, Guinness ME, Curiel T, Lacy J. (1998) Antisense to the Epstein-Barr virus (EBV)-encoded latent membrane protein 1 (LMP-1) suppresses LMP-1 and bcl-2 expression and promotes apoptosis in EBV-immortalized B cells. *Blood*, 92(5):1721-7
- Kino T., A. Gragerov, A. Valentin, *et al.* (2005) Vpr protein of HIV type 1 binds to 14-3-3 proteins and facilitates complex formation with Cdc25C : implication for cell cycle arrest. *J Virol*, 79(5):2780-87
- Larrat S, Morand P, Bas A, *et al.* (2009) Inhibition of Epstein-Barr virus replication by small interfering RNA targeting the Epstein-Barr virus protease gene. *Antivir Ther*, 14(5):655-62
- Lee SK, Park SO, Joe CO, Kim YS. (2007) Interaction of HCV core protein with 14-3-3epsilon protein releases Bax to activate apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 352(3):756-62
- Li JH, Chia M, Shi W, Ngo D, Strathdee CA, Huang D, Klamut H, Liu FF (2002) Tumor-targeted gene therapy for nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*, 62(1):171-8
- Li JH, Shi W, Chia M, *et al.* (2003) Efficacy of targeted FasL in nasopharyngeal carcinoma. *Mol Ther*, 8(6):964-73
- Li Q, Spriggs MK, Kovats S, Turk SM, Comeau MR, Nepom B, Hutt-Fletcher LM. (1997) Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. *J Virol*, 71(6):4657-62
- Liou JY, Ghelani D, Yeh S, Wu KK. (2007) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce colorectal cancer cell apoptosis by suppressing 14-3-3epsilon. *Cancer Res*, 67(7):3185-91
- Liou JY, Lee S, Ghelani D, Matijevic-Aleksic N, Wu KK. (2006) Protection of endothelial survival by peroxisome proliferator-activated receptor-delta mediated 14-3-3 upregulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(7):1481-7
- Maas D, Maret C, Schaade L, Scheithauer S, Ritter K, Kleines M. (2006) Reactivation of the Epstein-Barr virus from viral latency by an S-adenosylhomocysteine hydrolase/14-3-3 zeta/PLA2-dependent pathway. *Med Microbiol Immunol*, 195(4):217-23
- Mannick J.B., Asano K, Izumi K, Kieff E. and Stamler J.S. (1994) Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell*, 79, 1137-1146
- Muslin A., J.Tanner, P.M. Allen, A.Shaw (1996) Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine *Cell*, 84(6):889-897
- Nakagawa, S. and Huibregtse, J.M. (2000) Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol*, 20(21):8244-8253
- Nakamuta S, Endo H, Higashi Y, Kousaka A, Yamada H, Yano M, 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(3):186-95
- Obsil T, Ghirlando R, Klein DC, Ganguly S, Dyda F. (2001) Crystal structure of the 14-3-3zeta:serotonin N-acetyltransferase complex. a role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell*, 105(2):257-67
- Okamoto Y, Shikano S. (2011) Phosphorylation-dependent C-terminal binding of 14-3-3 proteins promotes cell surface expression of HIV co-receptor GPR15. *J Biol Chem*, 286(9):7171-81
- Paludan C, Bickham K, Nikiforow S, *et al.* (2002) Epstein-Barr nuclear antigen 1-specific CD4(+) Th1 cells kill Burkitt's lymphoma cells. *J Immunol*, 169(3):1593-603
- 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(4):565-572

- Petrocelli T, Slingerland J. (2000) UVB induced cell cycle checkpoints in an early stage human melanoma line, WM35. *Oncogene*, 19(39):4480-90
- Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, *et al.* (2004) Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, 304(5671):734-6
- Portal D, Rosendorff A, Kieff E. (2006) Epstein-Barr nuclear antigen leader protein coactivates transcription through interaction with histone deacetylase 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(51):19278-83
- Rajan S, Preisig-Müller R, Wischmeyer E, *et al.* (2002) Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. *J. Physiol*, 545(1):13-26
- Resnick L, Herbst JS, Ablashi DV, Atherton S, Frank B, Rosen L, Horwitz SN. (1988) Regression of oral hairy leukoplakia after orally administered acyclovir therapy. *JAMA*, 259(3):384-8
- Rickinson, A.B. and Kieff, E. (2007) Epstein-Barr virus. In Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, B.D., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B. and Straus, S.E. (eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams et Wilkins, Philadelphia, Vol. 2, 2655-2700
- Rooney CM, Smith CA, Ng CY, *et al.* (1995) Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet*, 345(8941):9-13
- Rothe R, Liguori L, Villegas-Mendez A, Marques B, Grunwald D, Drouet E, Lenormand JL. (2010) Characterization of the cell-penetrating properties of the Epstein-Barr virus ZEBRA transactivator. *J Biol Chem*, 285(26):20224-33
- Roychowdhury S, Peng R, Baiocchi RA, *et al.* (2003) Experimental treatment of Epstein-Barr virus-associated primary central nervous system lymphoma. *Cancer Res*, 63(5):965-71
- Russo R, Zito F, Costa C, Bonaventura R, Matranga V. (2010) Transcriptional increase and misexpression of 14-3-3 epsilon in sea urchin embryos exposed to UV-B. *Cell Stress Chaperones*, 15(6):993-1001
- Sakiyama H., R.M. Wynn, W.R. Lee, *et al.* (2008) Regulation of nuclear import/export of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP). *J Biol Chem*, 283(36):24899-24908
- Seimiya H, Sawada H, Muramatsu Y, Shimizu M, Ohko K, Yamane K, Tsuruo T. (2000) Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase. *EMBO J*, 19(11):2652-61
- Shannon-Lowe C.D., Neuhierl B., Baldwin G., Rickinson A.B. and Delecluse H.J. (2006) Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(18):7065-7070
- Sinclair A. (2003) bZIP proteins of human gammaherpesviruses. *J Gen Virol*, 84(8):1941-1949
- Sista ND, Barry C, Sampson K, Pagano J. (1995) Physical and functional interaction of the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator with the retinoic acid receptors RAR alpha and RXR alpha. *Nucleic Acids Res*, 23(10):1729-36
- Speck, S.H., Chatila, T. and Flemington, E. (1997) Reactivation of Epstein-Barr virus: regulation and function of the BZLF1 gene. *Trends Microbiol*, 5(10):399-405
- Surjit M., R. Kumar, R. Mishra, M. Reddy, V. Chow, S. Lal (2005) The severe acute respiratory syndrome coronavirus nucleocapsid protein is phosphorylated and localizes in the cytoplasm by 14-3-3 mediated translocation, *J Virol*, 79(17):11476-11486
- Szakonyi G., Klein M.G., Hannan J.P., *et al.* (2006) Structure of the Epstein-Barr virus major envelope glycoprotein. *Nat Struct Mol Biol*, 13(11):996-1001
- Taylor GS, Haigh TA, Gudgeon NH, Phelps RJ, Lee SP, Steven NM, Rickinson AB. (2004) Dual stimulation of Epstein-Barr Virus (EBV)-specific CD4+ and CD8+ T-cell responses by a chimeric antigen construct: potential therapeutic vaccine for EBV-positive nasopharyngeal carcinoma. *J Virol*, 78(2):768-78
- Thorley-Lawson, D.A. (2005) EBV persistence and latent infection *in vivo*. In Robertson, E.S. (ed.), *Epstein Barr Virus*. Caister Academic Press, Wymondham, 309-357
- Torre, D. and Tambini, R. (1999) Acyclovir for treatment of infectious mononucleosis: a metaanalysis. *Scand J Infect Dis*, 31(66):543-547

- Toyo-Oka K., A. Shionoya, M. J. Gambello, *et al.* (2003) 14-3-3 $\epsilon$  is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome *Nat Genet*, 34(3):274-285
- Tran H, Nourse J, Hall S, Green M, Griffiths L, Gandhi MK. (2008) Immunodeficiency-associated lymphomas. *Blood Rev*, 22(5):261-81
- Tzivion G, Luo Z, Avruch J. (1998) A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature*, 394(6688):88-92
- van der Horst C, Joncas J, Ahronheim G, *et al* (1991) Lack of effect of peroral acyclovir for the treatment of acute infectious mononucleosis. *J Infect Dis*, 164(4):788-92
- Wagner HJ, Sili U, Gahn B, *et al.* (2003) Expansion of EBV latent membrane protein 2a specific cytotoxic T cells for the adoptive immunotherapy of EBV latency type 2 malignancies: influence of recombinant IL12 and IL15. *Cytotherapy*, 5(3):231-40
- Wakabayashi H, Yano M, Tachikawa N, Oka S, Maeda M, Kido H. (2001) Increased concentrations of 14-3-3 epsilon, gamma and zeta isoforms in cerebrospinal fluid of AIDS patients with neuronal destruction. *Clin Chim Acta*, 312(1-2):97-105
- Wang X., W. J. Kenyon, Q. Li, J. Mullberg, L. M. Hutt-Fletcher (1988) Epstein-Barr Virus uses different complexes of glycoproteins gH and gL to infect B lymphocytes and epithelial cells *J virol*, 72(7):5552-8
- Wu KK, Liou JY. (2009) Cyclooxygenase inhibitors induce colon cancer cell apoptosis Via PPARdelta --> 14-3-3epsilon pathway. *Methods Mol Biol*, 512:295-307
- Wu JS, Cheung WM, Tsai YS, *et al.*(2009) Ligand-activated peroxisome proliferator-activated receptor-gamma protects against ischemic cerebral infarction and neuronal apoptosis by 14-3-3 epsilon upregulation. *Circulation*, 119(8):1124-34
- Xu, J. *et al.* (2002) Dopamine-dependent neurotoxicity of  $\alpha$ -synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nature Med*, 8(6):600-606
- Yacoubian TA, Slone SR, Harrington AJ, Hamamichi S, Schieltz JM, Caldwell KA, Caldwell GA, Standaert DG. (2010) Differential neuroprotective effects of 14-3-3 proteins in models of Parkinson's disease. *Cell Death Dis*, 1:e2
- Yaffe M. B., Rittinger K, Volinia S, *et al.* (1997) The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell*, 91(7):961-71
- Yaffe, M. B. (2002) How do 14-3-3 proteins work? Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett*, 513(1)53- 57
- Yajima M., Kanda T., Takada K. (2005) Critical role of Epstein-Barr Virus (EBV)-encoded RNA in efficient EBV-induced B-lymphocyte growth transformation. *J Virol*, 79(7):4298-307
- Yano M, Nakamuta S, Shiota M, Endo H, Kido H. (2007) Gatekeeper role of 14-3-3tau protein in HIV-1 gp120-mediated apoptosis of human endothelial cells by inactivation of Bad. *AIDS*, 21(8):911-20
- Young L.S., P.G Murray (2003) Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene*, 22(33):5108-21
- Young L.S., A.B. Rickinson(2004) Epstein-Barr Virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*, 4(10):757-768
- Zannis-Hadjopoulos M., W. Yahyaoui, M. Callejo (2007) 14-3-3 Cruciform-binding proteins as regulators of eukaryotic DNA replication. *Trends Biochem Sci*, 33(1):44-50
- Zerby, D., Chen, C.J., Poon, E., Lee, D., Shiekhhattar, R. and Lieberman, P.M. (1999) The aminoterminal C/H1 domain of CREB binding protein mediates zeta transcriptional activation of latent Epstein-Barr virus. *Mol Cell Biol*, 19(3):1617-1626
- Zuo S, Xue Y, Tang S, Yao J, Du R, Yang P, 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(7):3465-78



# Serment

## des

### Apothécaires



Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

## IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DES PARTENAIRES CELLULAIRES DE ZEBRA, FACTEUR DE TRANSCRIPTION DU VIRUS EPSTEIN-BARR

Mise en évidence d'un complexe tripartite entre la protéine virale ZEBRA et les protéines cellulaires Ubinucléine et 14-3-3ε

Le virus Epstein-Barr (EBV) est un virus présent à l'état latent chez 95% de la population adulte. C'est pourtant un virus oncogène pouvant être associé à des cancers lymphoïdes et épithéliaux. La protéine ZEBRA est un facteur de transcription viral clé dans la réactivation virale et l'oncogenèse associée à l'EBV. L'équipe de recherche dans laquelle j'effectue mon internat de Pharmacie Spécialisée s'intéresse aux interactions de ZEBRA avec les protéines cellulaires, dans des modèles issus de différents cancers. De précédents travaux ont décrit une protéine cellulaire, l'Ubinucléine (Ubn), capable d'empêcher la fixation de ZEBRA sur ses séquences cibles d'ADN. Notre laboratoire a montré que l'Ubn possède une double localisation cellulaire, nucléaire et dans les jonctions serrées. Le transport de l'Ubn entre ces deux sites fait très certainement intervenir d'autres partenaires cellulaires et notre attention s'est portée particulièrement sur les protéines 14-3-3 connues pour réguler l'import/export nucléaire de certaines protéines.

L'objectif de mon travail est de mettre en évidence un éventuel complexe tripartite ZEBRA-Ubn-14-3-3ε afin de comprendre dans quelles conditions l'Ubn inhibe les fonctions de ZEBRA et donc le cycle lytique d'EBV. Cela nous a amené à étudier l'hypothèse que la protéine 14-3-3ε, en contrôlant la localisation cellulaire de l'Ubn, interviendrait comme régulateur de l'interaction entre l'Ubn et ZEBRA.

Des techniques *in vivo* et *in vitro* (immunoprécipitation, pull-down, immunofluorescence) nous ont permis de mettre en évidence le complexe ZEBRA-Ubn-14-3-3ε et de préciser que l'Ubn interagit de manière directe avec ZEBRA d'une part et avec 14-3-3ε d'autre part. Plus précisément, 14-3-3ε se fixe sur l'Ubn au niveau d'un motif consensus contenant la sérine 352 qui doit être phosphorylée. En revanche, aucune interaction directe entre ZEBRA et 14-3-3ε n'a pu être démontrée. L'Ubn se place donc en intermédiaire entre ses deux partenaires. L'étude de la phosphorylation de l'Ubn a montré que l'Ubn non phosphorylée se retrouve plus fortement au niveau des jonctions serrées. Cela suggère que 14-3-3ε favoriserait la localisation nucléaire de l'Ubn, lui permettant ainsi d'interagir avec ZEBRA et d'empêcher l'initiation du cycle lytique de l'EBV.

Il sera intéressant de poursuivre l'étude de l'état de phosphorylation de l'Ubn dans le noyau ou au niveau des jonctions serrées afin de déterminer précisément comment la protéine 14-3-3ε régule sa localisation cellulaire et quels sont les signaux cellulaires impliqués. L'ensemble de ce travail permettra de mieux comprendre les mécanismes de régulation du cycle lytique de l'EBV et l'induction des cancers.

**Mots clés** : EBV, ZEBRA, 14-3-3ε, Ubinucléine, phosphorylation, régulation, localisation cellulaire

Charlotte Sueur

53B, rue Pierre Sépard  
38000 GRENOBLE

charlotte.sueur@gmail.com

Thèse soutenue à Grenoble le 24 novembre 2011

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury : Mme Claudine PINEL, MCU-PH

Membres :

Mme Florence MORFIN, PU-PH

Mr Patrice MORAND, PU-PH, directeur de thèse

Mme Véronique BOYER, CR1 INSERM