

Immunomodulation induite par le trans-activateur zebra du virus d'Epstein-Barr

Ségolène Mahot

▶ **To cite this version:**

Ségolène Mahot. Immunomodulation induite par le trans-activateur zebra du virus d'Epstein-Barr. Sciences pharmaceutiques. 2000. dumas-01260651

HAL Id: dumas-01260651

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01260651

Submitted on 22 Jan 2016

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.

Université Joseph Fourier
GRENOBLE
PHARMACIE

SICD1
Bibliothèques
de l'UJF et de Grenoble INP

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

B.U.M. GRENOBLE
D 115 051938 0

1er exemplaire

Université Joseph Fourier- Grenoble I
U.F.R.de PHARMACIE
Domaine de la Merci- La Tronche

Année : 2000 **N° D'ordre :** 7047

IMMUNOMODULATION INDUITE PAR LE *TRANS*-ACTIVATEUR ZEBRA DU VIRUS D'EPSTEIN-BARR

THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE
DIPLÔME D 'ETAT

Thèse soutenue le 14 décembre

Par Mademoiselle Ségolène MAHOT

Née le 18 décembre 1975 à Douala

JURY :

Monsieur le Professeur E. DROUET	**Président du jury**
Monsieur le Professeur J.-M. SEIGNEURIN	
Monsieur le Professeur P. DEMENGE	
Mademoiselle le Docteur C. VERNIOL	

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE
GRENOBLE
MÉDECINE - PHARMACIE

Université Joseph Fourier- Grenoble I
U.F.R.de PHARMACIE
Domaine de la Merci- La Tronche

Année : 2000 **N° D'ordre :**

IMMUNOMODULATION INDUITE PAR LE *TRANS*-ACTIVATEUR ZEBRA DU VIRUS D'EPSTEIN-BARR

THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU DOCTORAT EN PHARMACIE
DIPLÔME D 'ETAT

Thèse soutenue le 14 décembre

Par Mademoiselle Ségolène MAHOT

Née le 18 décembre 1975 à Douala

JURY :

Monsieur le Professeur E. DROUET **Président du jury**
Monsieur le Professeur J.-M. SEIGNEURIN
Monsieur le Professeur P. DEMENGE
Mademoiselle le Docteur C. VERNIOL

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
GRENOBLE
MÉDECINE - PHARMACIE

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté — M. le Professeur P. DEMENGE

Vice Doyen — M. le Professeur J. CALOP

PROFESSEURS DE PHARMACIE

ALARY	*Josette*	*Chimie Analytique*
BAKRI	*Abdelaziz*	*Pharmacie Galènique*
BENOIT-GUYOD	*Jean-Louis*	*Chimie Toxicologie et Eco-toxicologie*
CALOP	*Jean*	*Pharmacie Clinique et Bio-technique*
CUSSAC	*Max*	*Chimie Thérapeutique*
DECOUT	*Jean-Luc*	*Chimie Générale*
DEMENGE	*Pierre*	*Physiologie/Pharmacologie*
DROUET	*Emmanuel*	*Microbiologie-Immunologie*
FAVIER	*Alain*	*Biochimie*
GOULON	*Chantal*	*Physique-Pharmacie*
GRILLOT	*Renée*	*Parasitologie*
MARIOTTE	*Anne-Marie*	*Pharmacognosie*
RIBUOT	*Christophe*	*Physiologie-Pharmacologie*
ROUSSEL	*Anne-Marie*	*Biochimie*
SEIGLE-MURANDI	*Françoise*	*Botanique et Cryptogamie*
STEIMAN	*Régine*	*Biologie Cellulaire*
WOUESSIDJEWE	*Denis*	*Pharmacie Galénique*

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE

Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté	M. le Professeur J. L. DEBRU
Vice-Doyen	M. le Professeur J. P. CHIROSSEL
Assesseurs	M. le Professeur J. LEBEAU
	M. le Professeur J.P. ROMANET
	M. le Professeur B. SELE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

AMBLARD	Pierre	Dermato. Vénéréologie
AMBROISE-THOMAS	Pierre	Parasitologie et Mycol.
BACHELOT	Ivan	Endocrinologie et Maladies Métaboliques
BACONNIER	Pierre	Biostatistiques et Informatique Méd.
BARGE	Michel	Neurochirurgie
BARRET	Luc	Médecine Légale
BAUDAIN	Philippe	Radiologie et Imag. Méd.
BEANI	J.-Claude	Dermatologie,Vénéréologie
BENABID	Al.-Louis	Biophys. et Trait. de l'image
BENSA	J. Claude	Immunologie
BERNARD	Pierre	Gynéco et Obstétrique
BESSARD	Germain	Pharma. Fondamentale
BLIN	Dominique	Chir. Thor.et Cardio Vascul.
BOLLA	Michel	Radiothérapie
BOST	Michel	Pédiatrie
BOUCHARLAT	Jacques	Pédo Psychiatrie
BOUGEROL	Thierry	Psychiatrie d'adultes
BRAMBILLA	Christian	Pneumologie
BRAMBILLA	Elisabeth	Anatomie et Cyto. Pathol.
BRICHON	P.Yves	Chir. Thor. et Cardio.Vasc.
CARPENTIER	Françoise	Thérapeutique
CARPENTIER	Patrick	Méd.Interne
CESBRON	Jean-Yves	Immunologie
CHAMBAZ	Edmond	Biologie Cellulaire
CHARACHON	Robert	O.R.L.
CHIROSSEL	J. Paul	Anatomie
CINQUIN	Philippe	Biostatistique et Inf. Méd.
COLOMB	Maurice	Immunologie
CORDONNIER	Daniel	Néphrologie
COULOMB	Max	Radiologie et Imagerie Méd.
DEBRU	Jean-Luc	Médecine Interne
DE GAUDEMARIS	Régis	Méd. du Trav. et des risques professionnels.
DEMONGEOT	Jacques	Biostatistique et Inf. Med.
DESCOTES	Jean-Luc	Urologie
DUPRE	Alain	Chirurgie Générale
DYON	J.François	Chirurgie Infantile
FAGRET	Daniel	Bioph et Trait. Image
FAURE	Claude	Anatomie
FAVROT	Marie C.	Cancerologie CLB Lyon
FERRETTI	Gilbert	Radiologie centrale
FEUERSTEIN	Claude	Physiologie
FOURNET	Jacques	Hépato-Gastro-Entéro.
FRANCO	Alain	Médecine. Interne
FRANCOIS	Patrice	Épidém., Écon. de la Sant. et Prévention.
GARNIER	Philippe	Pédiatrie
GIRARDET	Pierre	Anesthé. et Réa. Chir.
GOULLIER-FLEURET	Andree	Parasitologie et Mycologie
GUIDICELLI	Henri	Chirurgie Vasculaire
GUIGNIER	Michel	Réanimation Médicale
HADJIAN	A.-Jean	Biochimie et biol.Mol
HALIMI	Serge	Nutrition
HOMMEL	Marc	Neurologie.
HOSTEIN	Jean	Hépato-Gastro-Entérol.
JOUK	Pierre-Simon	Biologie du Dévelop.. et de la reproduction.
JUVIN	Robert	Rhumatologie
LAVIEILLE	Jean-Pierre	O.R.L.
LE BAS	François	Biophys.et Trait. de l'Image.
LEBEAU	Jacques	Stomat. et Chirurgie Maxillo-Faciale
LEROUX	Dominique	Génétique
LETOUBLON	Christian	Chirurgie Générale
LEVERVE	Xavier	Thérapeutique
LEVY	Patrick	Physiologie
LUNARDI	Joël	Biochimie et Bio. Molécu.
MACHECOURT	Jacques	Cardio. et Maladie Vascu.
MAGNE	Jean-Luc	Chir. Vasculaire
MALLION	J. Michel	Méd.du Trav. et Risques Prof.
MASSOT	Christian	Médecine Interne
MERLOZ	Philippe	Chir. Ortho. et Traumato.
MICOUD	Max	Maladies Infect. et Trop.
MOREL	Françoise	Bioch. et Biol. Moléculaire
MOUILLON	Michel	Ophtalmologie
MOUSSEAU	Mireille	Cancérologie
MOUTET	François	Chir. Plast.Reconst. et Esth.
PASQUIER	Basile	Anat. et Cyto.Patho
PASSAGIA	J.-Guy	Anatomie.
PAYEN de LA GARANDERIE	J. François	Anesthésiologie
PELLAT	Jacques	Neurologie
PHELIP	Xavier	Rhumatologie
PISON	Christophe	Pneumologie
POLACK	Benoît	Hématologie
POLLAK	Pierre	Neurologie
PONS	Jean-Claude	Gynécologie et Obstétrique
RAMBAUD	Pierre	Pédiatrie
RAMBEAUD	J. Jacques	Urologie
RAPHAEL	Bernard	Stomato. et Chirurgie Maxillo-faciale
REYT	Emile	O.R.L.
ROMANET	J. Paul	Ophtalmologie
SARAGAGLIA	Dominique	Chir. Orthopédique et Traumatologique
SCHAERER	René	Cancérologie
SEIGNEURIN	Daniel	Histo.embryo.cytogénét. Reproduction
SEIGNEURIN	J. Marie	Bactério-Viro - Hygiène.
SELE	Bernard	Biologie du Développement et de la Reproduction
SOTTO	J. Jacques	Hématologie et Transfusion
STAHL	J. Paul	Maladies Infect. et Trop.
VANZETTO	Gérald	Clin./Urgences Cardio.
VIALTEL	Paul	Néphrologie
VROUSOS	Constantin	Radiothérapie
VUILLEZ	J.-Philippe	Biophys./Méd. Nucléaire
ZARSKI	J.Pierre	Hépato-Gastro-Entérol.

A mes parents,
A mon frère, Armelle et ma petite nièce Agnès,
A Bertrand

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu le Professeur Emmanuel Drouet pour m'avoir accueillie dans son laboratoire il y a déjà deux ans, pour m'avoir proposée un thème de recherche passionnant et pour son encadrement scientifique.

Je remercie messieurs les Professeurs Jean-Marie Seigneurin et Pierre Demenge pour avoir accepté de juger ce travail ; je remercie également Cécile Verniol pour sa participation au jury de ma thèse et pour son amitié.

Merci à Valérie pour sa fidélité et son soutien très précieux.

Sans oublier Cécile, Jocelyne, Mireille et Edwige, Pierre et Jocelyne pour leur bonne humeur et leur aide, ainsi que tous les membres du laboratoire de Virologie pour la sympathie qu'ils m'ont témoignée.

SOMMAIRE

Partie Bibliographique

A- EBV et IL-10 9

I- Le virus d 'Epstein-Barr 9
1-Généralités 9
2-Le cycle viral 10
2-1-La phase de latence 10
2-2-Le cycle lytique 11
3-Pathologies associées à EBV 15
3-1-La primo-infection 15
3-2-Cancers associés à EBV 15
3-2-1-Atteintes épithéliales 15
3-2-2-Lymphoprolifération 16
3-3-Co-infection EBV-VIH 17
II- La protéine ZEBRA 19
1- Le gène BZLF1 19
2- La protéine ZEBRA 20
3- Activité de transcription de ZEBRA 23

III- L'interleukine-10 humaine (hIL-10) 26
1- Le gène de l 'hIL-10 26
2- Production de l 'hIL-10 26
3- Le récepteur de l 'hIL-10 (RIL-10) 27
4- Effets biologiques de l 'IL-10 27
4-1- *In vitro* 27
4-2- *In vivo* 28
5- Pathologies associées à l'EBV : implication de l'hIL-10 31

B- Immunosubversion virale 33
1- Inhibition de la présentation d 'antigènes 33
2- Inhibition de l'activité Natural Killer (NK) 34
3- Inhibition de la réponse humorale 35
4- Inhibition de l'apoptose 35
5- Modulation des cytokines 36

C- La thérapie protéique 42
1- *Antennapedia* 42
2- VP22 44
3- Tat 44

Partie Expérimentale

Objectifs du travail expérimental 47

Matériel et Methodes 49

I-Lignées cellulaires 50

II-Techniques développées 51

1-Transfections 51

1-1 Plasmides 51

1-2 Transfection au phosphate de calcium (CaPO3) 53

1-3 Electroporation 53

1-4 Dosage de l'activité luciférase 54

2-Purification des protéines 54

2-1 GST-ZEBRA 54

2-2 GST 55

3-Incubation des cellules avec GST-ZEBRA 55

4-ELISA hIL-10 55

5-Western Blot (WB) anti-ZEBRA 56

6- Détection des ARNm de l'hIL-10 56

Résultats 58

A-Action de ZEBRA sur le promoteur de l'hIL-10 (pIL-10) 59

1-ZEBRA sauvage 59

2-Mutants de ZEBRA 62

2-1 Mutants du domaine de fixation 62

2-2 Mutants du domaine d'activation. 62

B-Action de ZEBRA sur la production cellulaire d'hIL-10 66

1-Sur la sécrétion 66

2-ARNm de l'hIL-10 66

Discussion-Perspectives 68

Conclusion 73

Références bibliographiques 76

Annexe 86

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :Représentation schématique des 3 types de latence de l'EBV.....13

Figure 2 : Représentation schématique des étapes du cycle productif d'EBV.....14

Figure 3 : Voies d'activation du gène BZLF1.....21

Figure 4 : Représentation schématique des domaines fonctionnels de ZEBRA.....22

Figure 5 : Dichotomie Th1/Th2 chez la souris 30

Figure 6 : Niveaux d'action des virus sur la présentation d'antigènes classe I 39

Figure 7 : Niveaux d'action des virus sur le processus apoptotique.....40

Figure 8 : Niveaux d'action des virus au cours de l'activation de l'interféron (IFN).....41

Figure 9 : Représentation schématique des mutants de ZEBRA utilisés.....52

Figure 10 : Structure schématique de pIL-10 et des fragments insérés dans un plasmide rapporteur.....52

Figure 11 : Activation de pIL-10 par ZEBRA dans les cellules HeLa.....60

Figure 12 : Activation de pIL-10 par ZEBRA dans les cellules BL70.....61

Figure 13 : Analyse de l 'expression de ZEBRA en Western Blot.....64

Figure 14 : Incidence des mutations du domaine de fixation de ZEBRA sur l'activité du pIL-10 dans les cellules BL70.....64

Figure 15 : Activation du pIL-10 (P1) par ZEBRA dans les cellules BL70. 65

Figure 16 : Incidence des mutations du domaine d 'activation de ZEBRA sur l 'activité du pIL-10 dans les cellules BL70.....65

Figure 17 : Sécrétion d'hIL-10 par les BJAB après dépôt de GST-ZEBRA.....67

Figure 18 : Détection des ARNm hIL-10 dans les cellules BJAB.....67

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principaux cancers associés à EBV.....18

Tableau 2 : Comparaison des sites de fixation des transactivateurs ZEBRA et fos/jun 25

Tableau 3 : Lignées lymphocytaires B utilisées.....50

LISTE DES ABREVIATIONS

Ac : Anticorps

ADN : Acide DesoxyriboNucléique

Antp : *Antennapedia*

ARN : Acide RiboNucléique

BL : Lymphome de Burkitt

BRLF1 : *Bam*H1 R Left Frame

BZLF1 : *Bam*H1 Z Left Frame

CAT : Chloramphénicol AcétylTransférase

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes

CTL : Lymphocyte T Cytotoxique

EBER : Epstein-Barr Encoded RNA

EBNA : Epstein-Barr Nuclear Antigen

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

GST : Glutathion S Transférase

HHV-8 : Human Herpesvirus 8

HLA : Human Lymphocyte Antigen

HRP : Horse Raifort Peroxidase

HSV : Herpes Simplex Virus

hIL-10 : Interleukine-10 humaine

IFN : Interféron

Ig : Immunogobuline

LCL : Lymphoblastoid Cell Line

LMP : Latent Membrane Protein

LNH : Lymphome Non Hodgkinien

LPPT : Lymphoprolifération Post-Transplantation

MH : Maladie de Hodgkin

LISTE DES ABREVIATIONS (suite)

MNI : Mononucléose Infectieuse

NK : Natural Killer

NPC : Carcinome du Nasopharynx

PBS : Phosphate Buffer Saline

RE : Reticulum Endoplasmique

SVF : Sérum de Veau Foetal

TA : Température Ambiante

TGF-β : Transforming Growth Factor beta

Th : T Helper

TNF-α : Tumor Necrosis Factor alpha

TPA : Tetradecanoylphorbolacetate

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Wt : Wild Type

ZEBRA : *Bam*H1 Z Fragment Epstein-Barr Replication Activator

ZRE : ZEBRA Responsive Element

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

A-EBV et IL-10

I- Le virus d'Epstein-Barr

1-Généralités

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) fut découvert par Denis Burkitt, dans les années 60, au cours d'une étude sur une pathologie tumorale infantile en Afrique (appelée *a posteriori* le lymphome de Burkitt) (pour revue Rickinson and Kieff, 1996). La coopération avec Tony Epstein et le progrès de la microscopie électronique ont abouti à l'observation des particules virales.

Ainsi, un nouvel herpesvirus fut isolé, ayant une caractéristique nouvelle : son implication dans les processus tumoraux humains.

L'EBV appartient à la sous-famille des *γ-Herpesvirinae*. Il possède un génome ADN double brin de 172 kpb contenu dans une capside. La culture cellulaire a permis d'étudier le tropisme de l'EBV et sa capacité de transformation. L'analyse des prélèvements de patients séropositifs a permis de mettre en évidence deux compartiments permissifs à l'infection : l'épithélium oropharyngé où le virus établit une infection productive et le système hématopoïétique (au sein d'une fraction minime de la population lymphocytaire B) où le virus établit une infection latente. Ainsi, après la phase de primo-infection (le plus souvent asymptomatique ou sous forme de mononucléose infectieuse (MNI) chez l'adulte) l'EBV persiste dans la population lymphocytaire B et très vraisemblablement aussi dans les lymphocytes T (Raphaël, 1995).

In vitro, le virus induit la prolifération et la transformation des lymphocytes B en lignées lymphoblastoïdes (LCLs : Lymphoblastoid Cell Lines). A partir de ces lignées immortelles, deux sous-types viraux ont été mis en évidence : EBV-1 et EBV-2 ; le sous-type 1 faisant proliférer les cellules plus rapidement *in vitro* que le 2. D'autre part, 90% des sujets infectés par EBV sont porteurs du sous-type 1 (pour revue Rickinson and Kieff, 1996).

S.U. MED. GRENOBLE

2- Le cycle viral

2-1-La phase de latence

Les cellules B immortalisées *in vitro* et les lignées issues de lymphome de Burkitt constituent un modèle d'étude de l'infection latente.

L'EBV établit 3 phases de latence différentes selon le panel de protéines exprimées (figure 1).

L'infection des lymphocytes B conduit dans un premier temps à l'expression du *programme de croissance* : c'est la latence type III, caractéristique des LCLs, dans laquelle sont exprimés (figure 2) :

- les EBNAs (Epstein-Barr Nuclear Antigen) : EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP
- les LMPs (Latent Membrane Protein) : LMP-1, -2A, -2B
- les EBERs (Epstein-Barr Encoding RNA) : EBER-1, EBER-2.

Ce *programme de croissance* permettrait d'amplifier le génome viral au cours de la primo-infection avant la mise en place d'une infection latente définitive. Le *programme unique EBNA-1*, ou latence type I, a été décrit dans les cellules malignes de lymphome de Burkitt associé à l'EBV : ce programme est caractérisé par l'expression unique de la protéine EBNA-1 (Seigneurin, 1997). Enfin, la latence type II correspond à l'expression des protéines EBNA-1 et LMPs.

Six des protéines virales (EBNA-1, -2, -3A, -3C, -LP et LMP-1) participent à l'immortalisation des B *in vitro.*

- Parmi ces protéines, seule EBNA-1 est indispensable au maintien de la forme épisomale de l'EBV. Cette protéine est connue en tant que facteur de transcription et possède la capacité d'activer l'origine de réplication du génome viral.
- EBNA-2 est un facteur de transcription qui active l'expression de gènes viraux et cellulaires, sans se fixer à l'ADN, par l'intermédiaire d'un cofacteur cellulaire.

- EBNA-LP permet la transition de G0 à G1 et participe ainsi à l'immortalisation.
- LMP-1 est une protéine membranaire qui a un rôle dominant dans la prolifération et la transformation des cellules. En effet, elle induit un signal de transduction qui conduit à l'activation du facteur de transcription NF-κB (Sergeant, 1996).

2-2-Le cycle lytique

Dans certaines lignées, *in vitro,* le virus se réactive spontanément (par exemple, la lignée B de marmouset infectée par la souche virale 95-8). L'utilisation d'inducteurs chimiques sur d'autres lignées permet la levée de la latence virale. Parmi ceux-ci, les esters de phorbol, les ionophores calciques, le traitement anti-IgG ou encore le TGF-β1 déclenchent le cycle lytique du virus (figure 2).

- Cette activation du cycle lytique est liée à l'expression de 2 facteurs de transcription viraux qui constituent les protéines très précoces : **ZEBRA** (*Bam*H1 Z Fragment Epstein-Barr Replication Activator), encore appelée Zta ou EB1, produit du gène BZLF1 et **R** (ou Rta), produit du gène BRLF1. **ZEBRA,** dont les propriétés seront détaillées dans la partie II, est également impliquée dans la réplication de l'ADN viral.
- Les protéines précoces sont ensuite exprimées : ce sont les **EA**s (Early Antigen). Parmi celles-ci, EB2 (produit du gène BMLF1) possède des capacités transactivatrices et agit en synergie avec ZEBRA et R. Le gène BHRF1 code pour une protéine homologue de la protéine humaine bcl-2, qui joue un rôle important dans la protection de la cellule contre l'apoptose. Les autres protéines précoces sont des enzymes impliquées dans la réplication de l'ADN viral.

  Enfin, les protéines tardives sont principalement des protéines de capside, les **VCAs** (Viral Capsid Antigen) et les **MAs** (Membrane Antigen). Ces protéines interviennent dans l'interaction virus-cellule (pour revue Rickinson and Kieff, 1996).

Une attention plus particulière est accordée à la protéine virale vIL-10, homologue de l'interleukine-10 humaine (hIL-10) que nous détaillerons dans la partie III ; elle possède les mêmes propriétés immunosuppressives que cette dernière et faciliterait ainsi la dissémination virale.

Après synthèse de ces protéines, les virions sont formés et bourgeonnent à la surface cellulaire.

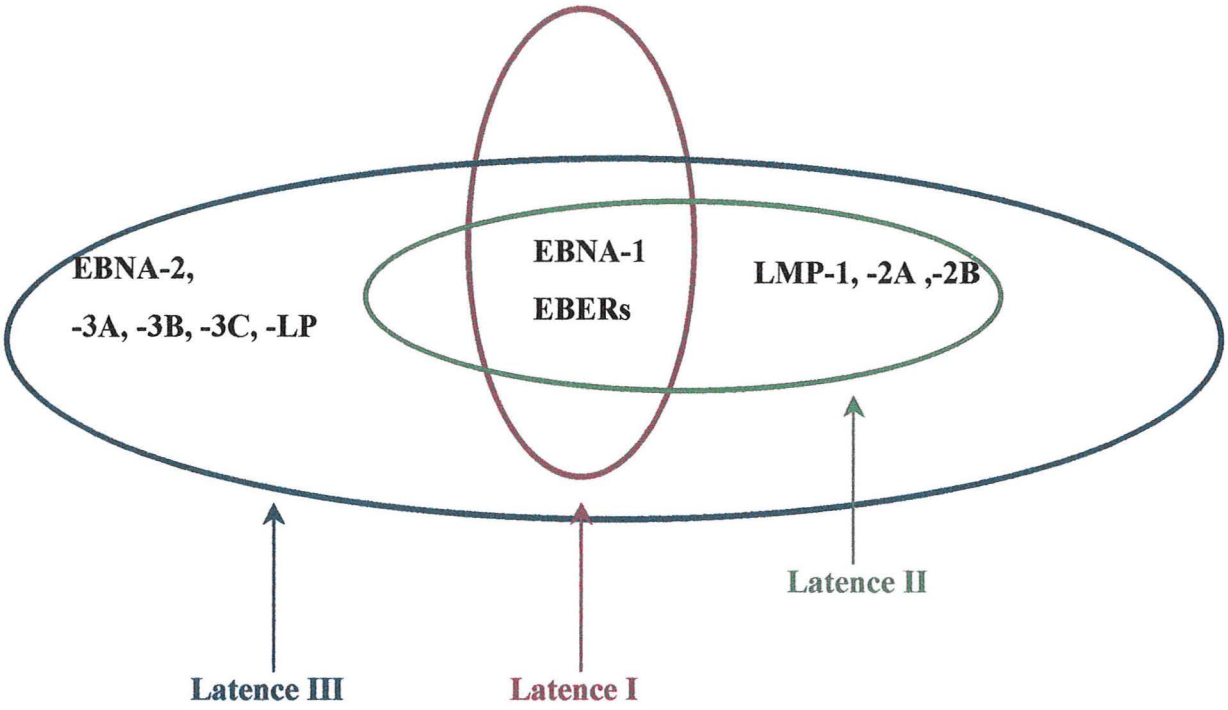


Figure 1 : Représentation schématique des 3 types de latence de l'EBV

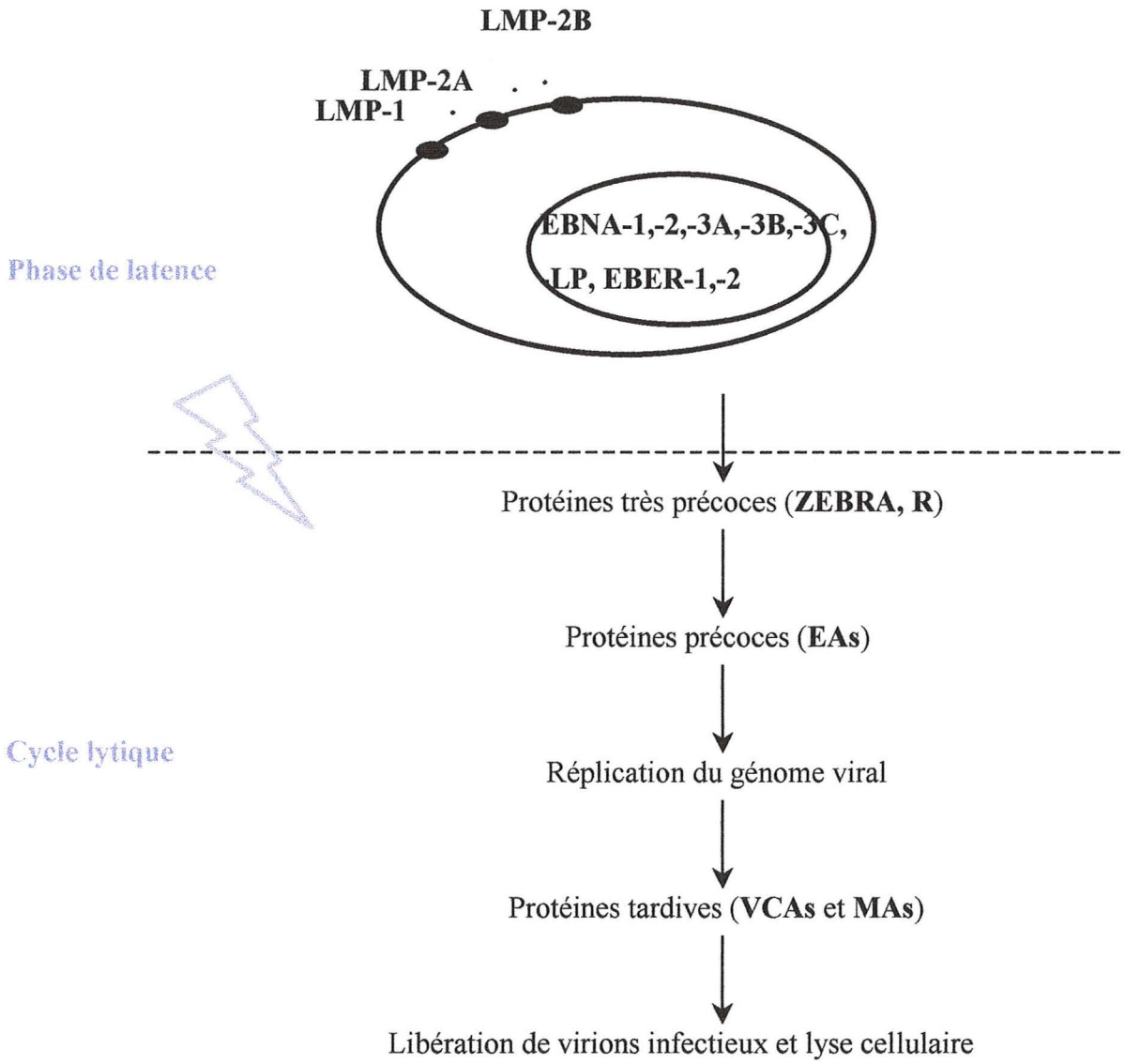


Figure 2 : Représentation schématique des étapes du cycle productif d'EBV.

EA : Early Antigen. **EBER** : Epstein-Barr Encoding RNA. **EBNA** : Epstein-Barr Nuclear Antigen.. **LMP** : Latent Membrane Protein. **MA** : Membrane Antigen. **VCA** : Viral Capsid Antigen.

3- Pathologies associées à l'EBV

L'objectif de cette partie est de décrire succintement les pathologies dans lesquelles l'EBV est impliqué. Le tableau 1 résume les principaux cancers associés au virus.

3-1-La primo-infection

La mononucléose infectieuse

Le premier contact avec l'EBV se fait en général pendant l'enfance, par voie salivaire ; cette infection est alors asymptomatique. Si cette infection survient chez l'adolescent ou le jeune adulte, elle se traduit par une mononucléose infectieuse (MNI) dont les signes cliniques particuliers sont liés à une réponse immunitaire intense de l'hôte : fièvre, lymphoadénopathie et pharyngite (pour revue Rickinson and Kieff, 1996). A la suite de cette primo-infection, un équilibre hôte-virus s'installe.

3-2-Cancers associés à l'EBV

3-2-1-Atteintes épithéliales

Le carcinome du nasopharynx

Le carcinome du nasopharynx (NPC) est une tumeur d'origine épithéliale, localisée dans la partie postérieure du rhinopharynx, qui présente un fort taux de dissémination métastatique. Ce type de cancer est peu rencontré en Europe et aux USA ; en revanche, son incidence est particulièrement élevée en Asie de Sud Est, en Afrique du Nord et dans la population esquimaude (pour revue Rickinson and Kieff, 1996). La répartition géographique des cas de NPC a suggéré le rôle de facteurs génétiques et environnementaux dans la maladie.

3-2-2-Lymphoprolifération

Chez le sujet immunocompétent

➢ Le lymphome de Burkitt

Le lymphome de Burkitt (BL) se présente sous trois formes distinctes : endémique, sporadique ou associé au SIDA ; cette dernière sera développée plus loin. La forme endémique constitue une pathologie infantile dont l'incidence est particulièrement élevée en Afrique. Les cellules malignes contiennent une translocation chromosomique entre les chromosome 8 et les chromosomes 14, 22 ou 2. Ces translocations conduisent à une dérégulation du gènes c-myc. La forme sporadique de la maladie présente ce même type de translocation et a été décrite dans les pays occidentaux. L'expression d'antigènes viraux est limitée à celle de la protéine EBNA-1, ce qui permet à la tumeur d'échapper au contrôle des lymphocytes T cytotoxiques (pour revue Rickinson and Kieff, 1996).

➢ La maladie de Hodgkin (MH)

Cette pathologie maligne, d'origine lymphoïde, est principalement rencontrée dans les pays occidentaux et constitue le lymphome malin le plus fréquent. L'incidence de ce type de cancer est élevée chez les patients de 25-30 ans et au-delà de 45 ans. Les individus ayant des antécédents de MNI ont 2 à 4 fois plus de risques de développer une MH par rapport à ceux dont la primo-infection fut asymptomatique (pour revue Rickinson and Kieff, 1996)

➢ Lymphomes T

Bien que l'interaction entre EBV et les lymphocytes T reste mal connue, les observations montrant la présence de l'EBV dans les lymphomes T humains sont de plus en plus nombreuses. En effet, certains lymphomes T nasaux ou lymphomes à moyennes/grandes cellules pléomorphes sont associés au virus (Montpellier et al., 1998).

Chez le sujet immunodéprimé

➢ Lympoprolifération post-transplantation (LPPT)

Le rôle des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) est prépondérant dans le maintien de l'équilibre hôte-virus. La perte des réponses T spécifiques au cours des déficits immunitaires intervient dans la lymphomagénèse des lymphoprolifération associées à l'EBV ; ainsi, lors de l'allègement des traitements immunosuppresseurs, on observe une régression spontanée du lymphome. Les LPPT sont le plus souvent de type B, le type T étant moins fréquemment observé. Ces lymphomes sont caractérisés par une grande hétérogénéité clinique, histologique et évolutive (pour revue Cohen, 2000).

➢ Le syndrome lymphoprolifératif lié au chomosome X

L'immunodéficience liée au chromosome X touche essentiellement les garçons et les prédispose aux pathologies associées à EBV ; en effet, le système immunitaire de ces patients est incapable de contrôler l'infection à EBV (pour revue Rickinson and Kieff, 1996).

3-3- Co-infection EBV-VIH

Les patients atteints du Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA) ont un système immunitaire moins efficace vis-à-vis des lymphocytes infectés par EBV. Ces lymphoprolifération sont de type BL, lymphome immunoblastique ou lymphome à grandes cellules (pour revue Cohen, 2000).

PATHOLOGIE	EBV+	GENES EXPRIMES	DUREE DE LATENCE	TYPE DE LATENCE
Carcinome du nasopharynx	100%	EBNA-1, LMP-1, -2, EBER	>30 ans	II
Lymphome de Burkitt		EBNA-1, EBER	3-8 ans	I
Endémique	100%			
Sporadique	15-85%			
HIV	30-40%			
Maladie de Hodgkin	80-90%	EBNA-1, LMP-1, LMP-2, EBER	>10 ans	II
Lymphomes T	40-100%	EBNA-1, LMP-1, LMP-2, EBER	>30 ans	II
Lymphome immunoblastique		EBNA-1, -2, -3, LMP-1, -2, EBER	variable	III
Post-transplantation	100%			
HIV	70-80%			

Tableau 1 : Principaux cancers associés à EBV (pour revue Rickinson and Kieff, 1996). **EBV+** correspond à l'incidence de l'EBV dans la pathologie décrite. **La durée de la latence** correspond au nombre d'années écoulées depuis la primo-infection EBV, lors de l'apparition du cancer.

II-La protéine ZEBRA

Le gène BZLF1 code pour la protéine virale très précoce ZEBRA. ZEBRA est une protéine nucléaire phosphorylée de 35kDa dont l'expression suffit à déclencher le cycle lytique du virus. De nombreux travaux ont montré qu'elle active des gènes viraux et cellulaires, induit la réplication de l'ADN viral en se fixant sur les origines de réplication DR et DL (Lieberman et al., 1990) et provoque l'arrêt du cycle cellulaire (Speck et al., 1997).

1-Le gène BZLF1

Le gène BZLF1 est transcrit à partir du promoteur proximal Zp ou à partir du promoteur distal Rp. Ce promoteur distal Rp contrôle l'expression des deux protéines, ZEBRA et R. Certains signaux extracellulaires, déjà cités, induisent l'expression de ZEBRA et le déclenchement du cycle lytique (figure 3).

Parmi ceux-ci :

- Les esters de phorbols (TPA), le taux de calcium intracellulaire et les anti-IgG activent préférentiellement les sites ZI et ZII par l'intermédiaire de facteurs cellulaires comme Sp1 ou les protéines AP-1.

- Le TGF-β1 emprunte la voie des MAPK (mitogen-activated protein kinase) pour induire l'expression de ZEBRA (Fahmi et al., 2000).

ZEBRA, elle-même, entraîne son autoactivation en se fixant sur les sites ZIIIA et ZIIIB.

2-La protéine ZEBRA

ZEBRA possède un domaine basique homologue à celui du facteur de transcription cellulaire c-fos. c-fos, c-jun et GCN4 constituent la superfamille des protéines à domaine basique associé à un motif leucine zipper (LZ) : les protéines bZIP. ZEBRA est considérée comme un membre de cette famille. Ces protéines se fixent sur les sites AP-1 au niveau de l'ADN (consensus TGAGTCA ou TGACTCA). Cette activité AP-1 est présente dans de nombreuses lignées cellulaires et est augmentée suite à l'induction au TPA (Chang et al., 1990).

Le domaine basique de ZEBRA (reconnu par l'anticorps monoclonal AZ130, figure 4) est composé de deux régions BRA et BRB, ce dernier incluant le signal de localisation nucléaire (NLS). En revanche, elle ne possède pas, au niveau de son domaine de dimérisation, de répétition de sept leucines comme les autres bZIP. Ce domaine comporte des acides aminés hydrophobes qui permettent néanmoins une interaction de type coiled-coil entre deux monomères pour former un homodimère. L'homologie entre ZEBRA et les facteurs fos/jun laisse imaginer que l'EBV ait capturé un gène activateur pour pouvoir fonctionner indépendamment de la cellule (Lieberman et al., 1990). Cependant, des différences importantes entre ZEBRA et fos/jun suggèrent que les protéines ont des rôles déterminés et distincts.

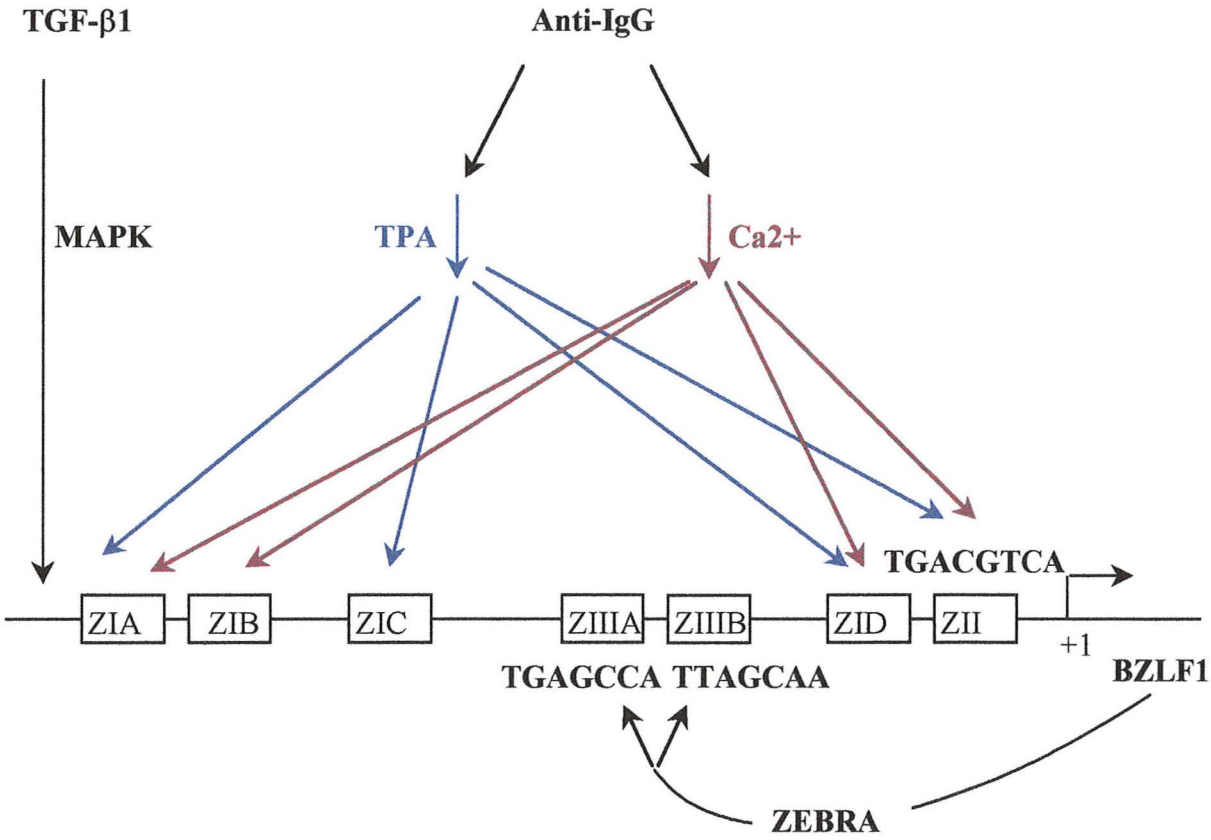


Figure 3 : Voies d'activation du gène BZLF1 (Speck et al., 1997).

Les régions du promoteur sur lesquelles se fixent les différents activateurs sont indiquées par ZI, ZII et ZIII. Le traitement anti-IgG induit la transduction d'un signal biologique qui aboutit à l'expression de la protéine ZEBRA. Deux cascades d 'activations sont induites : celle qui conduit à la fixation des facteurs de transcription Sp1 et ATF-1 sur les sites ZI et ZII est également déclenchée par le TPA (en bleu) ; la voie qui conduit à la fixation des facteurs MEF2D et ATF-1 sur les sites ZI et ZII est par ailleurs déclenchée par l'élévation du taux de calcium intracellulaire. Le TGF-β1, quant à lui, emprunte la voie des MAPK (mitogen-activated protein kinase).

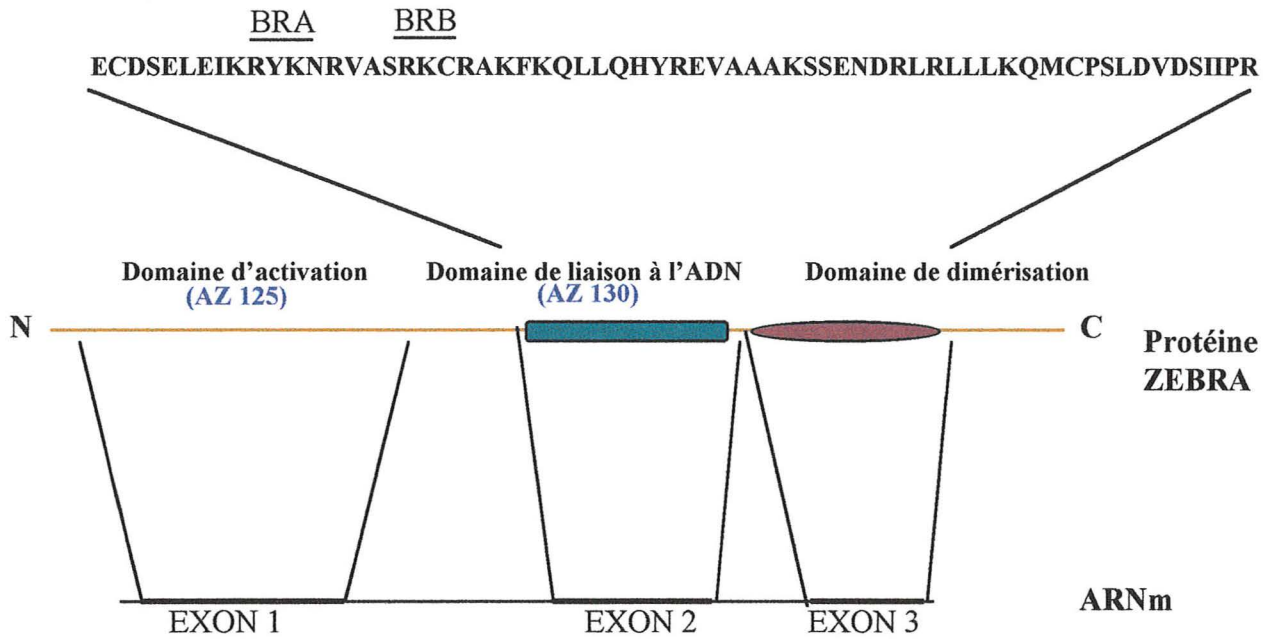


Figure 4 : Représentation schématique des domaines fonctionnels de ZEBRA

3- Activité de transcription de ZEBRA

La capacité de ZEBRA à se fixer sur les sites ZREs (ZEBRA Responsive Element) est largement documentée. Ces différentes études ont permis d'établir une séquence consensus ZRE de type **T G/T T/A G T/C G/C/A A** (Speck et al., 1997). Les ZREs sont des sites AP-1 dégénérés sur lesquels les facteurs de transcription cellulaires fos/jun sont incapables de se fixer. Ces sites sont présents sur les promoteurs viraux suggérant un contrôle des gènes viraux indépendant de la machinerie cellulaire (tableau 2). Il s'agit d'une part des gènes très précoces comme BZLF1 et BRLF1, d'autre part des gènes précoces comme BMLF1 (qui code pour EB2), BHRF1 (qui code pour l'homologue bcl-2), BHLF1 et BMRF1. Etant donné l'inductibilité du gène BZLF1 par le TPA et la capacité de ZEBRA à se fixer sur les ZREs, l'hypothèse suivante est admise : l'activation de BZLF1 par le TPA conduit à l'expression de ZEBRA qui s'autoactive et augmente sa propre concentration ; elle induit ensuite l'expression des protéines transactivatrices EB2 et R, avec lesquelles ZEBRA coopère pour exprimer la totalité des protéines du cycle lytique (Farrell et al., 1989; Giot et al., 1991). Lieberman et al. (Lieberman et al., 1989) ont montré que l'action de ZEBRA par l'intermédiaire des ZREs dépend de la distance de ceux-ci à la boîte TATA et du type cellulaire ; en effet, cette action dépendrait des séquences flanquantes des ZREs, donc de la participation éventuelle d'autres facteurs cellulaires.

ZEBRA se fixe également sur les sites AP-1 canoniques de type TGAGTCA (tableau 2). Ces sites AP-1 sont retrouvés dans les promoteurs viraux, mais également dans les promoteurs des gènes cellulaires où ils ont été initialement découverts. Ceci implique que la protéine virale ait la capacité d'induire des gènes cellulaires. Ainsi, Gstaiger et al. (Gstaiger et al., 1996) ont montré que ZEBRA active la transcription de l'IgH (chaîne lourde de l'immunoglobuline) et participerait ainsi à l'état de différenciation des lymphocytes B ZEBRA induit également le TGF-β1, puissant immunosuppresseur, en augmentant de 16 fois l'activité de son promoteur (Cayrol and

Flemington, 1995). Le virus modulerait ainsi son environnement en induisant une immunosuppression locale favorable à sa dissémination. Le TGF-β1 augmente par ailleurs la production d'IgA (en coopération avec vIL-10) ; ces IgA facilitent l'entrée de l'EBV dans les cellules épithéliales. Enfin, ZEBRA active le gène de c-fos en augmentant son activité basale de 7 à 9,5 fois (Flemington and Speck, 1990). L'induction de c-fos peut permettre l'expression d'autres gènes viraux ou cellulaires. Il existe donc une relation étroite entre ZEBRA et les facteurs fos/jun. Comme ceux-ci se fixent également sur les sites AP-1, cette relation peut se traduire par une compétition.

Par contre, ZEBRA est incapable de se fixer sur les sites AP-1 octamère présents sur les promoteurs de gènes cellulaires ou sur Zp (tableau 2). ZEBRA ne peut donc se substituer aux facteurs cellulaires fos/jun (Taylor et al., 1991).

Les travaux de Lieberman et al. (Lieberman et al., 1997) ont mis en évidence un autre mode d'activation des gènes par ZEBRA. Au niveau des promoteurs viraux, ZEBRA recrute et stabilise le complexe TFIID-TFIIA et interagit donc avec la machinerie transcriptionnelle cellulaire. Cette interaction protéine-protéine, par le biais du domaine d'activation (reconnu par l'anticorps monoclonal AZ 125, figure 4), interviendrait pour activer certains promoteurs viraux faibles ou pour contourner l'action de répresseurs.

Sites de fixation	ZEBRA	Fos/jun
Sites AP-1 (type **TGAGTCA**)	+ (promoteurs cellulaires et viraux)	+ (promoteurs cellulaires)
Sites AP-1 octamère	-	+ (Zp, promoteurs cellulaires)
Sites AP-1 dégénérés (**ZREs**)	+ (Zp, autres promoteurs viraux)	-

Tableau 2 : Comparaison des sites de fixation des transactivateurs ZEBRA et fos/jun

III-L'interleukine 10 humaine (hIL-10)

L'hIL-10 est une cytokine pléiotropique impliquée dans différentes pathologies lymphoprolifératives, dont les pathologies EBV-induites. C'est une protéine de 18 kDa, active sous forme dimérisée.

1-Le gène de l'hIL-10

Le gène de l'hIL-10 est localisé sur le chromosome 1 chez l'homme. La régulation du gène de l'hIL-10 est mal connue. Son expression semble influencée par d'autres cytokines. Le séquençage de la région 5' flanquante du gène (Eskdale et al., 1997) a permis de mettre en évidence différents sites par l'intermédiaire desquels des cytokines exerceraient leur action régulatrice. Parmi ceux-ci, neuf sites de fixation pour NF-κB ont été identifiés, voie qui serait empruntée par le TNF-α (Tumor Necrosis Factor alpha) pour augmenter l'expression de l'hIL-10 (Wanidworanun and Strober, 1993). Quatre sites STAT-1 seraient impliqués dans l'autorégulation de l'hIL-10 ; une séquence consensus AP-1 et des séquences de réponse à l'interféron gamma (IFN-γ), l'IL-6 et le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor), ont également été identifiées (Eskdale et al., 1997). L'étude du niveau d'expression du gène de l'hIL-10 dans deux lignées EBV positives (BLs et LCLs) a montré que le virus a une action sur l'activité du promoteur (Klein et al., 1996).

2-Production de l'hIL-10

Les cellules productrices d'IL-10 sont : les lymphocytes B activés ou infectés par EBV, les kératinocytes, les monocytes/macrophages et certains lymphocytes T (pour revue Moore et al., 1993). En effet, les lymphocytes T Th2 sécrètent l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6, l'IL-10 et l'IL-13, favorisant

la réponse humorale. L'IL-10 régule négativement la voie Th1 qui conduit à la sécrétion de l'IL-2 et de l'IFN-γ. Cette réponse Th1 est habituellement sollicitée lors d'une infection virale (figure 5). L'IL-10 est également produite par les monocytes : une activation par le lipopolysaccharide (LPS) induit une production rapide de TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF et G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor), suivie d'une production tardive d'IL-10 (de Waal Malefyt et al., 1991). Celle-ci régule négativement sa propre production et celle des cytokines citées ci-dessus. L'IL-10 virale, vIL-10, est une protéine tardive du cycle lytique de l'EBV (codée par le gène BCRF1). Elle possède 84% d'homologie avec l'hIL-10. vIL-10 présente les mêmes fonctions que l'hIL-10, mais son effet est 3 à 10 fois plus faible (Khatri and Caligiuri, 1998).

3-Le récepteur de l'hIL-10 (RIL-10)

Cette glycoprotéine de 110 kDa fixe hIL-10 et vIL-10. Des études structurales ont avancé une homologie entre le RIL-10 et la famille des récepteurs à l'IFN-α, β, γ. Dans les lymphocytes T humains et les monocytes, le complexe hIL-10/RIL-10 entraînerait une phosphorylation des protéines du signal de transduction : TYK (Tyrosine Kinase) et JAK (Janus Kinase) ; cette phosporylation est suivie d'une activation des protéines STAT capables de se fixer au niveau des régions régulatrices des gènes (Khatri and Caligiuri, 1998).

4-Effets biologiques de l'hIL-10

4-1-In vitro

L'hIL-10 exerce un effet immunosuppresseur sur les lymphocytes T *in vitro*. La cytokine module directement l'activité des lymphocytes T et réduit la prolifération des Th0, Th1 et Th2, en partie en inhibant la production d'hIL-2 (Taga et al., 1993). L'hIL-10 réduit par ailleurs l'activité

présentatrice d'antigènes des monocytes et des macrophages en diminuant l'expression membranaire des molécules HLA de classe II ; par conséquent, elle altère l'activation spécifique des lymphocytes T (de Waal Malefyt et al., 1991). Cependant, l'hIL-10 favorise la survie de ces lymphocytes T en limitant l'apoptose.

L'effet de l'hIL-10 sur les lymphocytes B est inverse : elle stimule leur croissance et leur prolifération. La cytokine stimule la synthèse d'ADN de cellules B naïves, germinales et cellules mémoires (Rousset et al., 1992). L'hIL-10 stimule par ailleurs la différenciation des lymphocytes B : elle induit une production d'immunoglobulines de type G1-3, A et M par les cellules costimulées avec de l'antigène CD40 (Briere et al., 1994).

L'hIL-10 possède, *in vitro,* des propriétés anti-inflammatoires. Comme nous l'avons vu, l'hIL-10 inhibe la production de cytokines par les monocytes activés par le LPS ; ainsi, les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF-α, IL-1, IL-6, IL-8, G-CSF et GM-CSF sont diminuées (de Waal Malefyt et al., 1991).

4-2-In vivo

Un modèle de souris déficiente en IL-10 a permis d'observer le développement d'une entérocolite chronique inflammatoire. Dans cette pathologie intestinale, la production de cytokines pro-inflammatoires est anormalement augmentée ; l'administration d'IL-10 a entraîné une réduction de la gravité de l'entérocolite chez ce type de souris. Dans un cas de choc septique dû au LPS chez la souris, l'administration d'IL-10 avant celle de la toxine bactérienne a permis d'observer une diminution de la production de TNF et de limiter les symptômes de la maladie. Chez l'homme, l'hIL-10 sérique semble participer au contrôle de la réponse inflammatoire ; en effet, un taux élevé d'hIL-10 a été observé dans le cas de choc septique (pour revue Voorzanger and Blay, 1996). L'hIL-10 administrée *in vivo* semble donc exercer son effet anti-inflammatoire et réduire la gravité de certaines pathologies.

Récemment, l'équipe d'Alain Tedgui (Tedgui and Mallat, 2000) a suggéré un rôle protecteur de l'IL-10 dans les pathologies cardio-vasculaires : ils ont observé que les agents infectieux (bactéries et virus) induisent de l'athérosclérose chez les souris déficientes en IL-10. L'IL-10 semble prévenir d'une part la formation des plaques d'athérome, d'autre part la rupture de celles-ci.

Cependant, par ses effets immunosuppressifs sur les lymphocytes T, la production d'hIL-10 est favorable à la dissémination de l'agent infectieux, bactérien ou viral.

Mycobacterium leprae est, à l'instar d'un virus, un pathogène intracellulaire. Il a été montré, chez les patients malades, que cette mycobactérie induit la sécrétion d'hIL-10 ; l'hIL-10 à son tour inhibe la production de TNF-α, IFN-γ et GM-CSF, qui interviennent normalement dans la réponse immunitaire contre l'agent pathogène. De même, *Mycobacterium tuberculosis* induit la synthèse d'hIL-10 dans les macrophages. La cytokine augmente alors la permissivité des macrophages à l'infection par la mycobactérie et réduit leur capacité à éliminer le pathogène (pour revue Moore et al., 1993). Chez les patients VIH positifs asymptomatiques, une forte expression d'ARNm et de protéine hIL-10 a été détectée ; les travaux de Clerici et al. (Clerici et al., 1994) ont suggéré que l'hIL-10 est en partie responsable de l'inhibition de la réponse immunitaire cellulaire.

La sécrétion d'hIL-10 par les lymphocytes B tumoraux a également été observée chez les patients immunocompétents atteints de lymphome non hodgkinien (LNH) : 46% des patients présentent un taux élevé d'hIL-10 sérique contre 6% des patients en rémission complète ou partielle, alors que la cytokine est indétectable chez les patients sains (Blay et al., 1993).

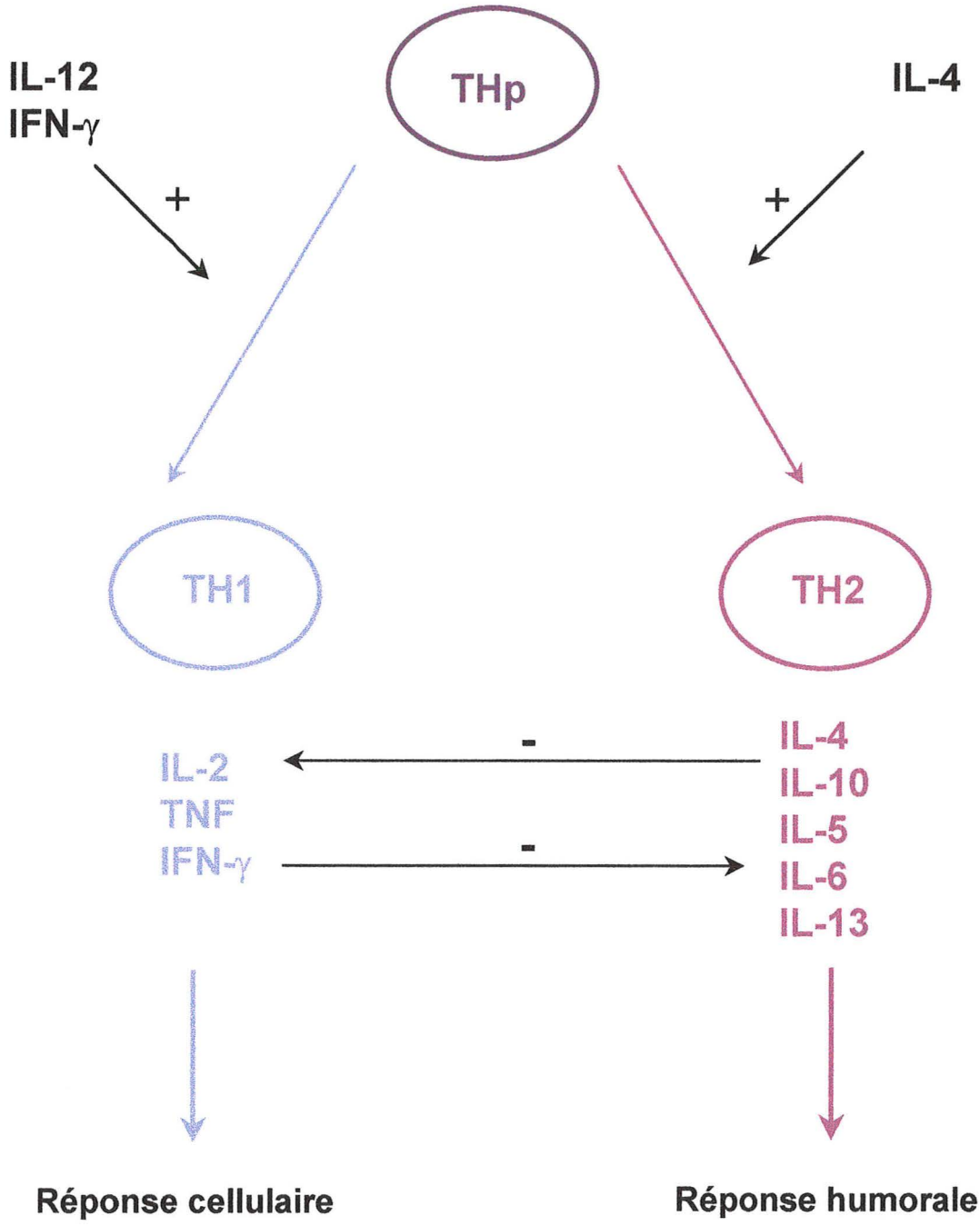


Figure 5 : Dichotomie Th1/Th2 chez la souris

5-Pathologies associées à EBV : implication de l'hIL-10

La culture de cellules infectées par EBV a permis de détecter une sécrétion d'IL-1, IL-6, TNF-α, IL-10 et IL-12. Ces cytokines semblent être des facteurs de croissance pour ces cellules, agissant selon un mode autocrine ou paracrine (Tosato et al., 1998). Burdin et al. (Burdin et al., 1993) ont montré que l'hIL-10, déposée sur des lignées lymphoblastoïdes B, favorise leur prolifération et que l'addition d'Ac anti-hIL-10 ralentit cette croissance.

Alors que l'hIL-10 est indétectable dans le sérum ou le plasma des sujets non infectés par EBV, l'hIL-10 circulante est retrouvée chez la plupart des patients présentant les symptômes de MNI (Taga et al., 1995).

L'hIL-10 est également associée à un certain nombre de pathologies lymphoprolifératives. En effet, la production d'hIL-10 semble d'une part favoriser la prolifération et la survie des cellules tumorales, d'autre part induire une immunosuppression visant les macrophages et les lymphocytes T. Voorzanger et al. (Voorzanger et al., 1994) ont étudié la corrélation entre l'infection à EBV et l'expression d'hIL-10 dans le LNH de patients immunocompétents. Les biopsies ont permis de détecter la présence de (h+v)IL-10 par immunofixation dans 63% des cas contre 21% pour vIL-10. Les cellules malignes semblent donc principalement exprimer de l'hIL-10 et cette expression est corrélée à la détection de la cytokine dans le sérum des patients. La détection de la cytokine au moment du diagnostic de la maladie semble être un facteur de mauvais pronostic (Blay et al., 1993).

Les LPPT constituent une complication sévère des transplantations d'organes. La majorité (80%) de ces proliférations lymphoïdes est associée à EBV. Au cours d'une étude sur les LPPT, Garnier et al. (Garnier et al., 1999) ont observé un lien entre l'évolution de la maladie et la sécrétion

d'hIL-10 : 14 patients parmi 19 présentant un LPPT associé à EBV ont une hIL-10 sérique détectable et les taux sériques les plus élevés correspondent à la forme agressive de la maladie.

Une étude sur des lignées B EBV positives issues de patients présentant un lymphome associé au SIDA ou un lymphome de Burkitt a montré que ces lignées expriment et sécrètent constitutivement de l'hIL-10 ; par contre, la plupart (85%) des lignées EBV négatives n'expriment pas d'hIL-10. Les auteurs ont observé que les cellules qui sécrètent de l'hIL-10 sécrètent également l'hIL-6. Les deux cytokines favorisent la croissance et la prolifération de lymphocytes B. Ces résultats ont suggéré que l'hIL-10 participe au développement du lymphome du SIDA. Ces résultats confortent par ailleurs l'hypothèse d'une synergie entre l'EBV et l'HIV pour le développement de ce type de lymphome (Benjamin et al., 1992).

B-IMMUNOSUBVERSION VIRALE

Les virus ont développé différentes stratégies pour maintenir leur génome dans la cellule infectée et assurer leur réplication à l'insu du système immunitaire de leur hôte. Ces agents pathogènes sont capables de moduler la réponse immune et, de ce fait, de bloquer l'activation de la réponse cellulaire et humorale (pour revue Tortorella et al., 2000).

1-Inhibition de la présentation d'antigènes

Les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) sont localisées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) ; elles présentent les peptides de 8 à 9 acides aminés (Rock and Goldberg, 1999), issus de protéines virales synthétisées dans le cytosol, aux lymphocytes T CD8+, ou lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Ces protéines cytosoliques sont dans un premier temps hydrolysées en peptides au niveau du protéasome, puis importées dans le réticulum endoplasmique (RE) selon un processus ATP-dépendant qui implique les protéines TAP (Transporter Associated with Antigen Processing). Ces peptides sont alors couplés aux molécules classe I. Le complexe peptide-CMH I gagne ensuite l'appareil de Golgi puis la surface cellulaire (figure 6). Les γ-herpesvirus (EBV, herpesvirus murin 68 HV-68 et herpesvirus humain 8 HHV-8), l'herpes simplex (HSV), le cytomégalovirus humain (CMV), le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et l'adénovirus ont, dans leur génome, certaines séquences qui codent pour des protéines capables d'interférer avec cette voie de présentation classe I. La protéine EBNA-1 de l'EBV est résistante à l'hydrolyse du protéasome. Les peptides issus de cette protéine n'engendreront donc pas de réponse CTL spécifique (Levitskaya et al., 1997). Le virus HSV possède une protéine (ICP 47) capable d'interagir avec le complexe TAP et d'inhiber le transport de peptides d'origine virale dans le RE (York et al., 1994). Les protéines

E19 de l'adénovirus et US3 du CMV limitent l'expression des molécules CMH I en les maintenant dans le cytosol de la cellule (Ahn et al., 1996; Cox et al., 1990) ; la protéine K3 de l'HV-68 accélère la dégradation de ces molécules du CMH ; la protéine de l'HHV-8, homologue de K3, déclenche leur endocytose et favorise leur dégradation (Stevenson et al., 2000). Enfin, le virus VIH possède deux protéines, Nef et Vpu, qui destabilisent et accélèrent la dégradation des molécules classe I (Piguet et al., 1999). Les virus ont ainsi développé divers moyens pour échapper à la réponse CTL qui est prépondérante dans la défense immunitaire antivirale.

Les protéines virales phagocytées ou endocytées par les CPA sont hydrolysées en peptides de 14 à 17 acides aminés qui sont présentés aux lymphocytes T CD4+ sous forme de complexe CMH classe II-peptide viral (Rock and Goldberg, 1999). Cette présentation d'antigènes classe II est également détournée par les protéines virales. Le virus VIH interagit avec le récepteur CD4 des lymphocytes T et pénètre dans la cellule. L'infection induit une diminution de l'expression des molécules CD4 à la surface cellulaire et, de ce fait, inhibe la présentation classe II. La protéine Nef est en grande partie responsable de cette diminution des molécules CD4 puisqu'elle favorise leur endocytose et leur dégradation par les lysosomes (Piguet et al., 1999).

2-Inhibition de l'activité Natural Killer (NK)

Les cellules NK, autres acteurs de la réponse immunitaire cellulaire, sont activées en l'absence de molécules classe I à la surface cellulaire et prennent le relais des CTL lorsque ceux-ci ne sont pas activés. Certains virus contournent également cette réponse immunitaire cellulaire. *Molluscum Contagiosum* (MCV) appartient à la famille des poxvirus. Son génome code pour une protéine homologue aux molécules classe I, mais inapte à la fixation de peptides antigéniques (Senkevich et al., 1996). Certains herpesvirus possèdent aussi des protéines homologues aux CMH I. La protéine UL-18 du CMV protège ainsi la cellule infectée contre la lyse causée par les cellules NK (Reyburn et al., 1997).

3-Inhibition de la réponse humorale

En marge de la réponse immunitaire cellulaire, les anticorps (en particulier les anticorps neutralisants) contribuent à la défense antivirale ; dans ce cas, les immunoglobulines se fixent sur l'enveloppe des virus et empêchent leur interaction avec les récepteurs cellulaires. Les anticorps fixés à la surface de cellules infectées déclenchent également une lyse de la cellule causée par les cellules NK. Le virus HSV possède deux protéines, gE et gI, capables de neutraliser les IgG dirigées contre le virus. Ces protéines seraient à l'origine de l'inefficacité de la réponse humorale lors de l'infection par HSV (Favoreel et al., 1997).

Par ailleurs, l'activation du complément aboutit à une lyse de l'enveloppe du virus ou facilite l'élimination de l'agent pathogène par d'autres cellules. Les orthopoxvirus, herpesvirus et retrovirus possèdent des protéines capables de mimer les protéines régulatrices de l'activation du complément (RCA). Le génome du virus de la vaccine code notamment pour une protéine qui module l'inflammation (IMP) induite au niveau des sites de l'infection. En l'absence de cette IMP, une activation importante du complément a lieu, aboutissant à la formation des peptides chimiotactiques C3a et C5a (Miller et al., 1997). Ces peptides recrutent alors les macrophages au site de l'infection. Ainsi, l'inhibition de la voie du complément participe à la protection des virus contre le système immunitaire.

4-Inhibition de l'apoptose

La réplication virale, qui utilise la machinerie cellulaire, peut induire le suicide de la cellule infectée ou recruter des cellules aux fonctions cytotoxiques (CTL ou cellules NK). Ces cellules "tueuses" induisent l'apoptose de la cellule infectée en sécrétant des cytokines cytotoxiques comme le TNF ou en relarguant les perforines, granzymes ou FasL (figure 7). Cette mort cellulaire limite la réactivation virale et la production de virions. Mais certaines protéines virales interviennent pour bloquer ce processus d'apoptose. Le génome de l'adénovirus code pour un

complexe de protéines : le complexe RID induit l'internalisation et la digestion de la molécule Fas et du récepteur au TNF (TNFR). Ces deux récepteurs membranaires sont impliqués dans le signal d'apoptose : la diminution de leur expression à la surface de la cellule infectée est donc un moyen pour l'adénovirus de limiter la mort cellulaire (Elsing and Burgert, 1998).

Les caspases sont des enzymes qui interviennent dans la transduction du signal apoptotique. Le signal induit par le TNFR ou par la molécule Fas aboutit à l'intéraction de la portion cytosolique de ces deux récepteurs avec les caspases (figure 7). Plusieurs herpesvirus comme l'HHV-8 possèdent des protéines capables de bloquer cette interaction et donc de bloquer la transduction du signal. L'adénovirus code également pour une protéine qui inhibe directement l'activité enzymatique des caspases. D'autres virus, comme l'EBV ou l'HHV-8, possèdent des protéines homologues à bcl-2. Cette protéine est un élément-clé dans la régulation de l'apoptose. Les homologues viraux apparaissent au moment de la réplication virale. L'EBV par exemple possède deux homologues de bcl-2, BHRF1 et BALF1, dont l'effet anti-apoptotique est renforcé par la protéine LMP-1 qui augmente l'expression de bcl-2 cellulaire (pour revue Tortorella et al., 2000).

5-Modulation des cytokines

Les cytokines coordonnent l'induction et le maintien de la réponse immunitaire antivirale naturelle et acquise. Ces polypeptides contrôlent l'inflammation et le chimiotactisme, l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules effectrices de la réponse immunitaire. Ce sont de puissants médiateurs antiviraux. Cependant, les virus ont développé différentes stratégies pour contrôler ce réseau. L'infection d'une cellule par un virus entraîne une production d'IFN-α et β. En effet, l'infection induit l'expression de l'IRF-3, un transactivateur qui stimule la transcription des gènes de l'IFN-α et β. La fixation de l'IFN à son récepteur induit un signal de transduction impliquant les protéines JAK/STAT (figure 8). Ce signal aboutit à l'activation de facteurs de transcription et, par conséquent, à l'activation de gènes codant pour les effecteurs de la réponse

antivirale. Ainsi, l'IFN-α et β induisent un blocage de la synthèse protéique et de la prolifération cellulaire ainsi que l'expression d'enzymes qui dégradent l'ARN viral. La protéine E1A de l'adénovirus bloque l'action de l'IRF-3 donc la synthèse d'IFN-α et β (Juang et al., 1998). Le virus de la vaccine code pour un récepteur soluble à l'IFN : la protéine B18R fixe l'IFN-α et limite son action sur les cellules infectées (Symons et al., 1995). Les herpesvirus (EBV et HHV-8) ont la capacité d'intervenir dans le signal de transduction induit par l'IFN et de bloquer l'activation de gènes utiles pour le contrôle de l'infection (Kanda et al., 1992; Li et al., 1998). Le CMV et l'adénovirus bloquent également ce signal de transduction en diminuant le taux intracellulaire de protéines JAK/STAT (Leonard and Sen, 1996; Miller et al., 1998).

Le TNF-α, sécrété par les macrophages activés et les lympocytes T, possède de puissants effets antiviraux. Les herpesvirus et poxvirus codent pour des protéines homologues aux récepteurs du TNF-α. Ce "virocepteur" entre en compétition avec les récepteurs cellulaires et limite l'action du TNF-α (pour revue Tortorella et al., 2000).

Les chémokines sont des cytokines pro-inflammatoires qui activent et régulent la migration des leucocytes ; elles facilitent, par exemple, le recrutement rapide de leucocytes au site de l'inflammation. Les virus codent également pour des récepteurs membranaires de chémokines. La protéine US 28 du CMV fixe et internalise les chémokines RANTES, MIP α/β (Macrophage Inflammatory Protein) et MCP-1 (Monocyte Chemotractant Protein) (Bodaghi et al., 1998). L'environnement de la cellule infectée se trouve ainsi appauvri en chémokines : la migration de leucocytes au site de l'infection est limitée.

L'HHV-8 et l'HSV codent pour une protéine transmembranaire homologue au récepteur de l'IL-8. Ce récepteur est activé constitutivement et mime le signal induit par les cytokines inflammatoires (Bais et al., 1998). Les virus tirent profit de cette activité puisqu'elle contribue à l'hypervascularisation environnante, favorable à la tumorigénèse (Kledal et al., 1997).

Les virus sécrètent également des cytokines appelées "virokines" qui bloquent les récepteurs des cytokines humaines. Par exemple, la protéine vMIP-II de l'HHV-8 bloque les récepteurs de chemokines. Ainsi, l'activation des monocytes consécutive à la fixation de RANTES, MIP α/β n'a pas lieu (Kledal et al., 1997). Ces "virokines" inhibent le recrutement de neutrophiles, macrophages et lymphocytes, normalement induit par ces chemokines.

Enfin, l'infection virale aboutit à l'expression de protéines homologues aux cytokines humaines et qui exercent le même effet. L'HHV-8 code pour l'IL-6 virale (vIL-6). Cette vIL-6 contribuerait à la pathogénèse des maladies associées à l'HHV-8, en partie en limitant l'apoptose (Neipel et al., 1997). L'EBV, comme l'herpesvirus équin et les poxvirus, code pour l'IL-10 virale (vIL-10). vIL-10 antagonise la réponse lymphocytaire T de type Th1, alors que ce type de réponse est essentiel pour la défense antivirale (pour revue Tortorella et al., 2000).

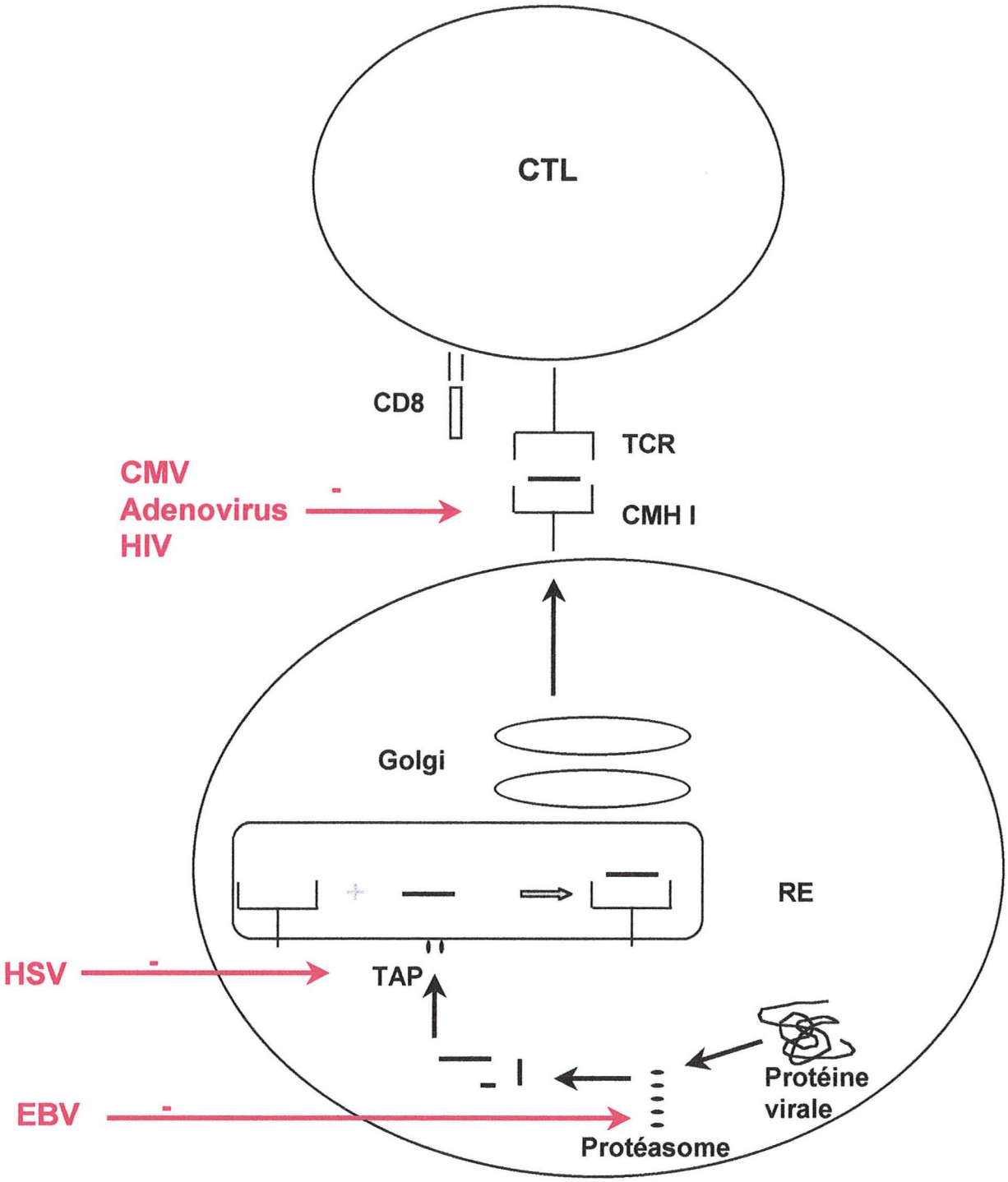
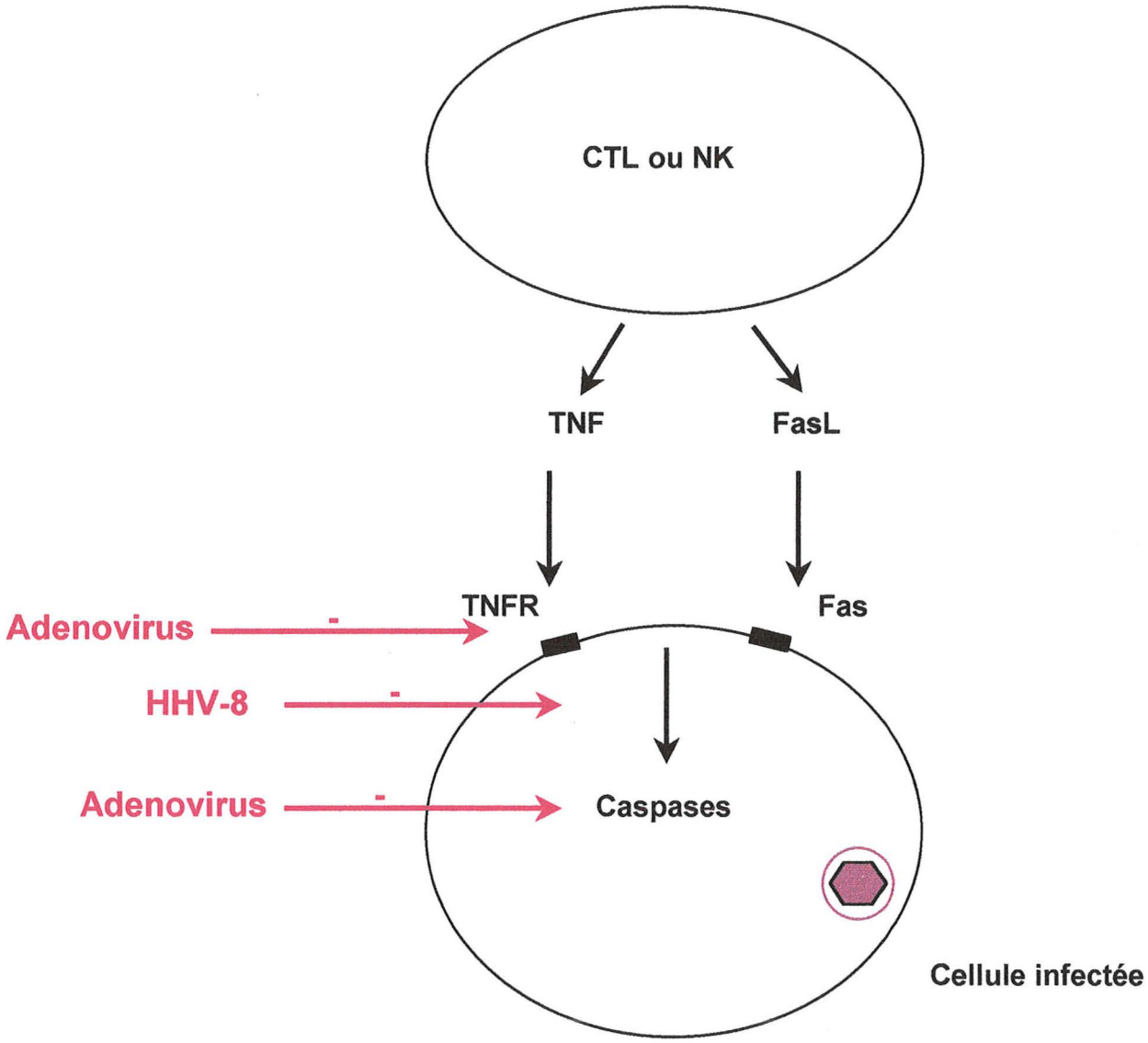


Figure 6 : Niveaux d'action des virus sur la présentation d'antigènes classe I
(d'après Tortorella et al., 2000)
Les protéines virales sont dégradées dans le cytosol de la cellule au niveau du protéasome. Les peptides sont importés dans le reticulum endoplasmique (**RE**) où ils s 'associent aux molécules de classe I (**CMH I**). Le complexe peptide-CMH I gagne ensuite la surface cellulaire.
CTL : Lymphocyte T Cytotoxique. **TAP** : Transporter Associated with Antigen Presentation.
TCR : T-Cell Receptor.



<u>Figure 7</u> : Niveaux d'action des virus sur le processus apoptotique
Les **CTL** ou **NK** induisent l'apoptose de la cellule infectée en sécrétant des cytokines cytotoxiques comme le **TNF** ou en relarguant le **FasL**. Le signal apoptotique implique, dans la cellule infectée, les enzymes **caspases**.

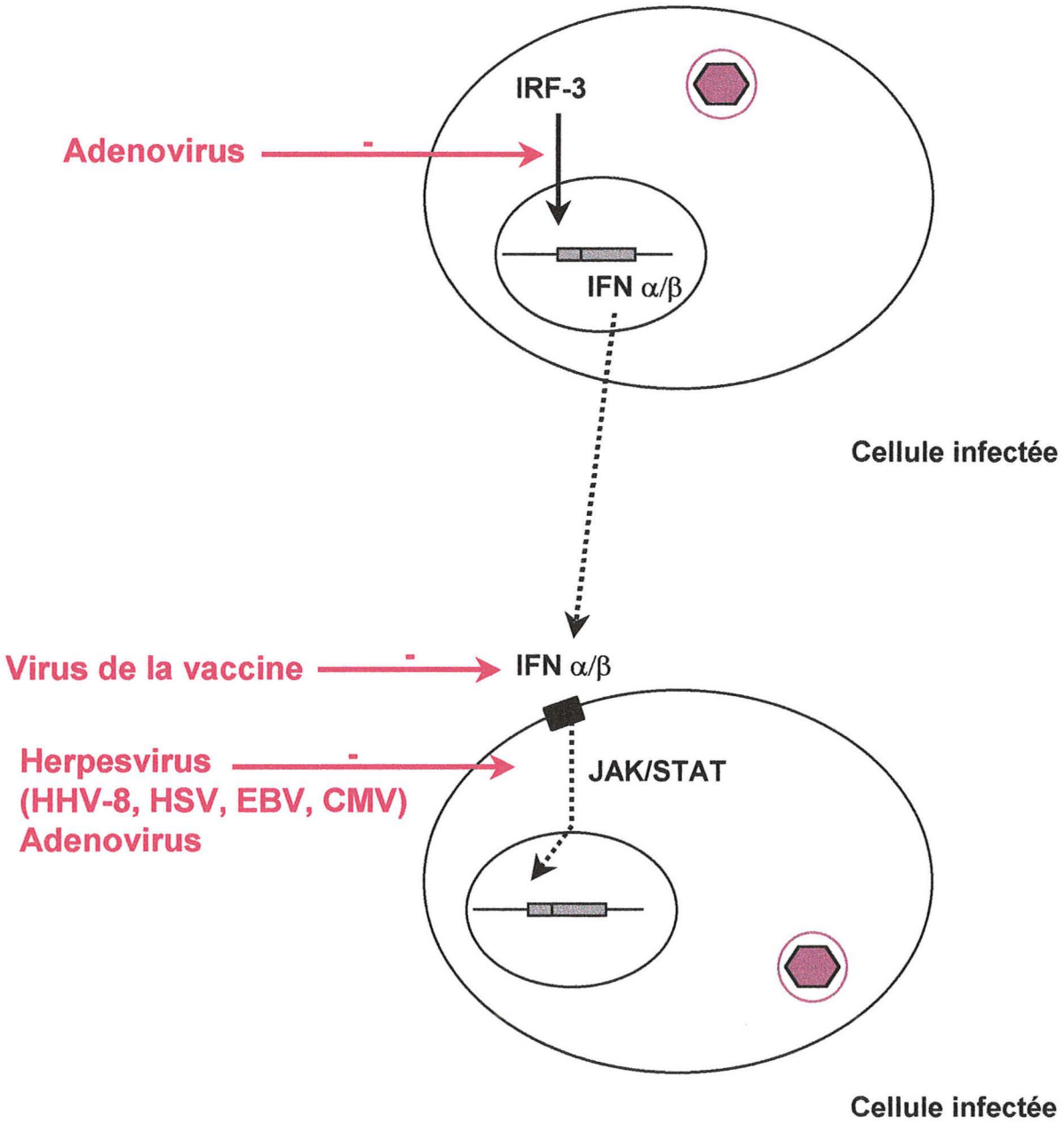


Figure 8 : Niveaux d'action des virus au cours de l'activation de l'interféron (IFN)
L'infection virale de la cellule induit l'expression du transactivateur **IRF-3** qui stimule la transcription des gènes de l'**IFN-α** et β. La fixation de l'IFN à son récepteur induit un signal de transduction impliquant les protéines **JAK/STAT**.

C-La thérapie protéique : un nouveau concept

Malgré la connaissance moléculaire des maladies héréditaires et acquises, la thérapie génique doit faire face à un problème majeur : la délivrance d'acides nucléiques ou de protéines dans la cellule-cible n'est pas assez efficace pour observer l'effet thérapeutique attendu. La capacité naturelle de certaines protéines à traverser la membrane de la cellule offre une alternative à la thérapie génique : la thérapie protéique. Ainsi, les molécules thérapeutiques, appelées aussi "cargos", peuvent être importées efficacement dans la cellule lorsqu'elles sont couplées aux vecteurs doués d'activité de translocation.

Les toxines bactériennes, comme l'adénylcyclase de *Bordetella Pertussis*, peuvent être utilisées pour délivrer des antigènes hétérologues dans les CPA et activer une réponse CTL spécifique. Elles représentent des vecteurs potentiels particulièrement intéressants pour les essais d'immunothérapie anticancéreuse (pour revue Guermonprez et al., 2000).

Par ailleurs, certaines protéines traversent spontanément la membrane plasmique de cellules eucaryotes. Contrairement aux toxines, ces vecteurs potentiels ne nécessitent pas de détoxification préalable. Ces protéines, d'origine animale (Antennapedia) ou virale (VP22 ou Tat), peuvent être des outils pour la vaccination ou la thérapie antitumorale.

1-*Antennapedia*

Antennapedia (Antp) est une homéoprotéine découverte chez la Drosophile. Les homéoprotéines sont retrouvées chez les insectes et l'ensemble des vertébrés. Ce sont des transactivateurs qui se fixent à l'ADN par l'intermédiaire de leur homéodomaine ; ce domaine est composé de 60 acides aminés qui forment une structure secondaire de type triple hélice ; la troisième boucle α est

particulièrement conservée parmi les nombreuses espèces où les homéoprotéines sont exprimées. Derossi et al. (Derossi et al., 1994) ont étudié le passage membranaire de Antp ; la protéine est capable de traverser la membrane des neurones et d'être importée jusqu'au noyau. La synthèse de peptides dérivés de la troisième hélice a permis d'identifier la région de la protéine impliquée dans le passage de la membrane cellulaire. Le domaine impliqué dans cette translocation est localisé dans la troisième hélice. Cette région étant conservée parmi les différentes homéoprotéines, le passage membranaire semble être une propriété commmune : les homéoprotéines pourraient être des messagers intercellulaires (Derossi et al., 1996). Les peptides dérivés de Antp sont transloqués *in vitro* à +4°C, suggérant un mécanisme énergie-indépendant. Ils ne sont pas hydrolysés : le mécanisme de translocation est donc différent de l'endocytose. Les peptides interagiraient directement avec les phospholipides membranaires pour former une micelle « véhicule ».

Schutze et al. (Schutze-Redelmeier et al., 1996) ont montré que cette capacité de translocation de Antp est conservée pour les protéines de fusion Antp-peptide exogène. Ils ont montré aussi que le peptide exogène est efficacement transloqué, *in vitro*, dans les neurones, astrocytes, macrophages, myocytes et fibroblastes. Après internalisation, le peptide exogène est distribué dans le cytoplasme et dans le noyau, sans transiter par le compartiment lysosomal. Ainsi, toutes les fonctions intracellulaires peuvent être atteintes. Lorsque la cellule-cible du vecteur Antp est une CPA, le peptide fusionné est normalement présenté aux CTLs en association aux molécules de classe I. L'immunisation induite par la protéine de fusion Antp-peptide immunogène a confirmé, *in vivo*, que la protéine est capable de traverser la membrane des CPA et de générer une réponse CTL spécifique. Cependant, l'utilisation de Antp en vaccination est limitée puisqu'elle requiert la présence de détergents (pour revue Guermonprez et al., 2000).

2-VP22

VP22 est une protéine structurale de HSV-1. Lors de l'infection d'une cellule par le virus, VP22 est exportée hors de la cellule infectée et pénètre dans les cellules voisines. Le mécanisme de ce transport est mal connu. Il semble cependant être indépendant de l'appareil de Golgi et faire intervenir le cytosquelette. Phelan et al. (Phelan et al., 1998) ont fusionné VP22 à la protéine p53 impliquée dans de nombreux processus tumoraux comme le cancer du poumon. Les auteurs ont observé que la protéine de fusion VP22-p53, exprimée dans les cellules Cos-1, pénètre jusqu'au noyau des cellules Vero, voisines dans le milieu de culture. Cette protéine de fusion déclenche également l'apoptose des cellules voisines dans lesquelles elle pénètre.

Ainsi, VP22 peut être utilisée en thérapie antitumorale comme vecteur de protéines biologiquement actives.

3-Tat

La protéine Tat du virus VIH-1 est un transactivateur capable de traverser la membrane cellulaire lorsqu'elle est ajoutée au milieu de culture de cellules adhérentes (cellules HeLa) ou de cellules en suspension (cellules U937). La protéine gagne le noyau et transactive le promoteur viral LTR transfecté. Mann et Frankel (Mann and Frankel, 1991) ont étudié cette translocation : Tat entre dans les cellules par endocytose en se fixant de façon non spécifique à la membrane ; quelques acides aminés seulement du domaine basique sont impliqués dans cette interaction.

Ce passage membranaire est aboli à +4°C ; son rôle dans l'infection VIH reste mal connu. Cependant, Tat peut être utilisée comme vecteur de protéines hétérologues.

En effet, lorsque Tat est conjuguée chimiquement aux enzymes comme la β-galactosidase (β-gal), l'HRP ou la RiboNucléase A (RNase A), on observe l'importation de ces protéines en 30 minutes dans le cytoplasme et le noyau des cellules en culture (Fawell et al., 1994). Les protéines importées conservent leur activité biologique : la présence et l'activité des enzymes β–gal et

HRP ont été confirmées par la formation d'un précipité coloré. Tat semble être un vecteur de protéines efficace et rapide *in vitro*. Lorsque la protéine de fusion Tat-β-gal est injectée chez la souris par voie intraveineuse, Fawell et al. (Fawell et al., 1994) ont montré une distribution au niveau du cœur, du foie, de la rate et dans une moindre mesure, dans les poumons et le muscle squelettique. Les cellules qui endocytent la protéine Tat-β-gal semblent être les cellules endothéliales et les macrophages à proximité des vaisseaux sanguins. Récemment, l'équipe de Schwarze (Schwarze et al., 1999) a montré que la protéine fusion Tat-β–gal traverse la barrière encéphalique chez la souris.

Kim et al. (Kim et al., 1997) ont fusionné un peptide dérivé de Tat avec une protéine immunogène. Lorsque ce conjugué est déposé sur les CPA, *in vitro*, la protéine immunogène induit une activation spécifique des CTL : l'antigène immunogène importé dans la cellule emprunte donc la voie de présentation classe I. Chez la souris, des CTLs spécifiques ont été générés suite à une injection de cellules dendritiques chargées avec le conjugué Tat-peptide antigénique.

La protéine Tat peut être utilisée comme vecteur de protéines biologiquement actives (antigènes, inhibiteurs d'enzymes ou facteurs de transcription) vers le milieu intracellulaire. La protéine virale peut ainsi être employée à des fins thérapeutiques.

Par ailleurs, il n'est pas impossible que les protéines Tax du virus HTLV-1 et ZEBRA du virus d'Epstein-Barr soient douées de cette capacité de translocation.

PARTIE EXPERIMENTALE

OBJECTIFS DU TRAVAIL EXPERIMENTAL

Comme nous l'avons vu, de nombreux travaux ont mis en évidence un lien entre l'infection des lymphocytes B par EBV et la production de l'hIL-10 (Burdin et al., 1993). Cette cytokine favorise la prolifération et la différenciation des lymphocytes B, alors qu'elle régule négativement la réponse cellulaire T. L'augmentation de l'hIL-10 par l'EBV faciliterait ainsi la dissémination virale.

Nagakomi et al. (Nakagomi et al., 1994) ont montré que la protéine LMP-1 est suffisante pour induire l'hIL-10 au cours de la latence virale dans une lignée de lymphome de Burkitt. Par ailleurs, la réactivation virale est liée à l'augmentation significative de la production d'hIL-10 dans des lignées B où l'EBV est en phase de latence (Sairenji et al., 1998). Les travaux de Voorzanger et al. (Voorzanger et al., 1994) sur des biopsies de patients atteints de LNH ont permis de corréler la présence de ZEBRA avec l'expression de l'hIL-10.

Ces résultats nous ont suggéré que ZEBRA induit l'hIL-10 au cours du cycle lytique du virus. Le virus prolongerait ainsi l'immunosuppression locale induite lors de la phase de latence par LMP-1 et favoriserait la prolifération et la survie des cellules tumorales.

Afin d'étudier cette hypothèse, nous avons analysé l'effet de ZEBRA sur les différentes étapes de la production d'hIL-10 : son effet sur l'activité du promoteur de l'hIL-10 (pIL-10) en expression transitoire dans des lignées lymphocytaires B, sur la sécrétion d'hIL-10 de ces lignées ainsi que sur le taux d'ARNm hIL-10.

Nous montrons que la protéine ZEBRA active ces trois étapes, qu'elle soit surexprimée dans les cellules ou ajoutée dans le milieu de culture. Ce dernier point impliquerait un passage transmembranaire de ZEBRA, ce que nous avons commencé à étudier.

MATERIEL ET METHODES

I-Lignées cellulaires

Les cellules adhérentes de la lignée HeLa sont issues de carcinome utérin. Elles sont cultivées dans du milieu DMEM 5% SVF dans des flacons de 75 cm2 (FALCON, Polylabo, Strasbourg). Le milieu est supplémenté avec 2mM L-glutamine et 1% penicilline/streptomycine. Les lymphocytes B sont des cellules en suspension cultivées dans du milieu RPMI 1640 10% SVF dans des flacons de 25 ou 75 cm2. Le milieu est enrichi en 0,25mM β–mercaptoéthanol, 1% (v/v) MEM, 1mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 1% (v/v) Antibiotiques-Antimycotiques. Tous les réactifs de culture sont fournis par GIBCO (Cergy-Pontoise, France). Les lignées B utilisées sont détaillées dans le tableau ci-dessous.

Lignée cellulaire	origine	EBV	hIL-10 ARNm
BJAB	LNH	-	+
BL70	BL	-	-

Tableau 3 : Lignées lymphocytaires B utilisées

II-Techniques développées

1-Transfections

1-1 Plasmides

- Les vecteurs d'expression de ZEBRA sauvage sont les plasmides pSG-Z41 et pKSV-Z41 qui contiennent le promoteur SV40. Les mutants de la protéine ZEBRA sont clonés dans le vecteur pKSV-10, comme le pKSV-Z41. Les mutants du domaine de fixation, Z311 et ZJ, contiennent respectivement une mutation ponctuelle et un domaine substitué par celui du transactivateur c-jun (figure 9). Les mutants du domaine d'activation (d2-25, d25-42, d42-59, d59-93, d93-132, d59-132) sont des mutants de délétion (figure 9). Ces plasmides ont été gracieusement fournis par A. Sergeant (INSERM U412, Lyon) (Giot et al., 1991). Le plasmide pSG5 est utilisé pour standardiser la quantité totale de promoteur SV40 transfectée.
- Les différentes constructions du promoteur de l'hIL-10 (pIL-10) ont été obtenues grâce à la collaboration avec D. Kube (Tuebingen, Allemagne). La structure du promoteur de l'hIL-10 est accessible sur GenBank/EMBL sous le numéro X78437 (annexe). La figure 10 est une représentation schématique du pIL-10 et des différentes constructions utilisées, de la plus grande à la plus petite: P1, P2, P3, P4. Le promoteur est placé en amont du gène de la luciférase et cloné dans le vecteur pGL2.

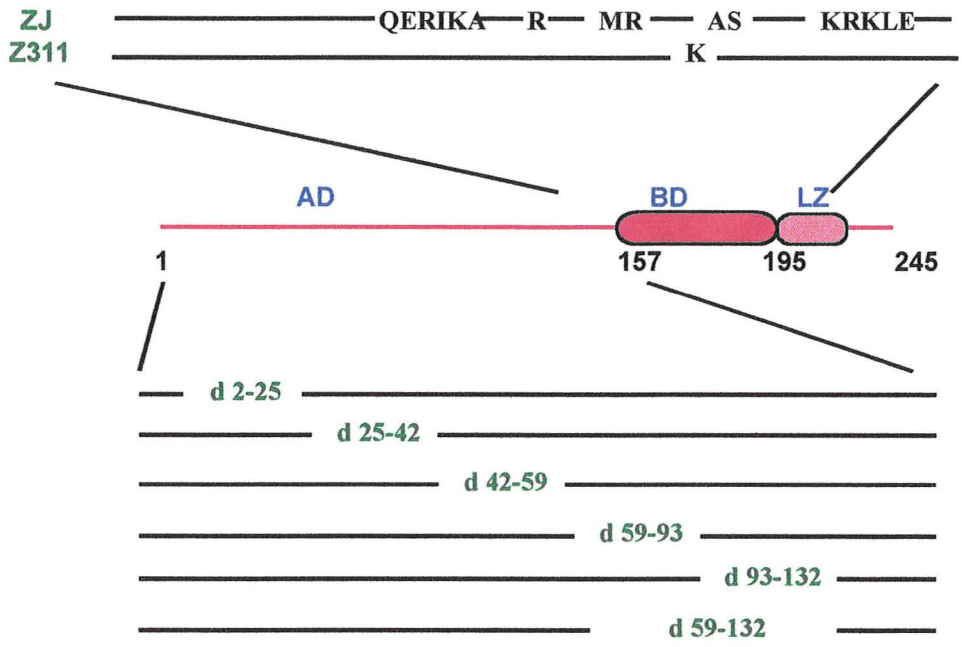


Figure 9 : Représentation schématique des mutants de ZEBRA utilisés

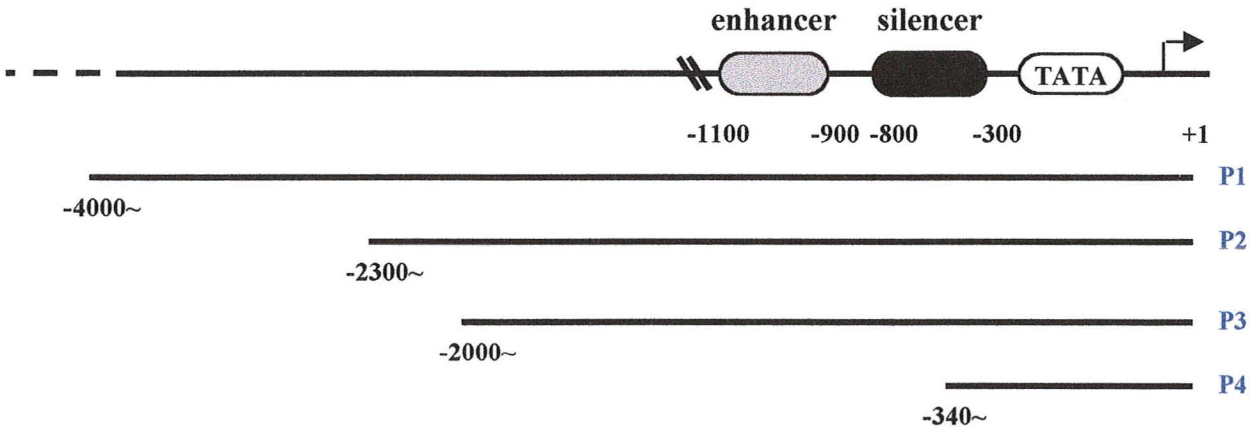


Figure 10 : Structure schématique de pIL-10 et des fragments insérés dans un plasmide rapporteur.

1-2 Transfection au phosphate de calcium (CaPO3)

Principe: l'ADN plasmidique est précipité par le CaPO3 et pénètre ainsi dans les cellules adhérentes.

Les cellules HeLa sont ensemencées dans des boîtes de culture de 35mm (FALCON, Polylabo, Strasbourg) à raison de 200.000 cellules / boîte dans 2 ml de DMEM 5% SVF. Le mélange de plasmides est préparé dans un tube Eppendorff et le volume total est ajusté à 52,5µl avec de l'eau ultrapure.

Après ajout de 60µl de 2X HBS (Hepes Buffer Saline) dans chaque tube et de 7,5µl de 2M CaCl2, le mélange plasmidique repose 30 min à température ambiante (TA). Puis, ce mélange est déposé sur les cellules; 16 à 20 heures plus tard, les cellules sont lavées et du milieu neuf est ajouté dans chaque boîte. Le lendemain, les cellules sont lysées avec le tampon du kit de détection de la luciférase (Luciferase Assay System™, PROMEGA, Madison, USA).

1-3 Electroporation

Principe: la décharge électrique (200-250V) entraîne des trous dans la membrane cellulaire ; l'ADN chargé négativement migre dans le champ électrique et pénètre dans la cellule. Cette technique est utilisée pour les cellules en suspension. Les cellules sont réparties dans les cuvettes BIORAD 0,4 cm à raison de 10^7 / cuvette. Le mélange ADN est déposé dans la cuvette. Après 10min d'incubation dans la glace, la cuvette est placée dans l'électroporateur (Gene Pulser Apparatus, BIORAD, Marnes la Coquette, France) et le voltage est appliqué. Les cellules sont à nouveau placées dans la glace 10min puis remises en culture dans 10 ml de RPMI 10% SVF pendant 24H. Le lendemain, les cellules sont lysées avec le tampon luciférase.

1-4 Dosage de l'activité luciférase

D'après les indications du kit PROMEGA, les cellules sont lavées avec du tampon 1X PBS (GIBCO, Cergy-Pontoise) refroidi à +4°C, puis lysées pendant 15 min à 37°C. Après centrifugation, 20µl du surnageant sont mélangés à 100µl de substrat luciférine. La réaction enzymatique est à l'origine d'émission de lumière quantifiée par un luminomètre (BERTHOLD).

2-Purification des protéines

2-1 GST-ZEBRA

Les bactéries compétentes (JM 109) sont transformées avec le plasmide PGEX-EB1 qui code pour la protéine de fusion GST-ZEBRA. Ces bactéries sont ensemencées dans 10ml de 1X LB (Luria-Broth) supplémenté avec de l'ampicilline au 1/1000 pendant 18 à 20H à 37°C. Le lendemain, le volume de culture est ajusté à 250 ml de LB. Lorsque la DO atteint 0,4, 0,1mM final d'IPTG (inositolphosphate thiogalactoside) est ajouté pour induire le promoteur qui contrôle l'expression de la GST-ZEBRA et l'incubation se prolonge pendant 3H à 37°C. Après centrifugation, les culots bactériens sont traités avec 2,5ml de tampon de lyse (25mM NaHPO4, 5mM KH2PO4, 200mM EDTA, 1mM DTT, 2µl/ml de PMSF et 0,1mg/ml de lysosyme) et soniqués.

Le lysat est dilué (1/3) avec du tampon 50 mM Tris pH8 et passé sur une colonne échangeuse d'ions Q10. La chromatographie est assistée par l'appareil Biologic (BIORAD). La protéine GST-ZEBRA est éluée à l'aide d'un gradient linéaire de 2M NaCl dans le tampon 50mM Tris pH8. Les fractions collectées sont analysées en gel de protéines et en Western Blot anti-ZEBRA. Après dialyse contre 500 ml de 1X PBS pH7,3 à +4°C, les fractions sont passées sur une colonne d'affinité (Billes glutathion-Sepharose 4B, PHARMACIA, Orsay). La protéine est éluée avec du

20mM glutathion 50mM Tris pH8. La présence de ZEBRA est contrôlée et les fractions sont dialysées contre du 1X PBS.

2-2 GST

La protéine GST est utilisée comme contrôle. La production de la protéine en bactéries est identique à celle de GST-ZEBRA. Le lysat est passé sur 1ml de suspension de billes placées dans un Eppendorff de 1,5ml. Après 10 min d'incubation à +4°C, la colonne est lavée et la protéine est éluée avec du 20mM glutathion 100mM Tris pH8. La purification est contrôlée avec un gel de protéines et GST est dialysée contre 1l de 1X PBS à +4°C.

3-Incubation des cellules avec GST-ZEBRA

Les cellules BJAB sont réparties dans une plaque 24 puits (FALCON, Polylabo, Strasbourg) à raison de 10^6 / puits de 2 ml de RPMI 10% SVF. La protéine GST-ZEBRA est déposée à une concentration de 5, 10 ou 20µg/ml. La protéine GST est systématiquement utilisée en contrôle aux mêmes concentrations. Les cellules sont mises à l'étuve et récupérées après 24, 48 ou 72H. Les surnageants sont prélevés pour un ELISA hIL-10 et les culots sont traités pour quantifier les ARNm hIL-10.

4-ELISA hIL-10

Le taux d'hIL-10 dans le surnageant des cellules BJAB a été quantifié selon les indications du kit ELISA hIL-10™ (IMMUNOTECH, Marseille). Brièvement, 50µl de surnageant sont déposés dans un puits recouvert d'un Ac monoclonal anti-hIL-10; après 2H d'incubation à TA sous

agitation, les puits sont lavés et un Ac monoclonal anti-hIL-10 biotinylé ainsi que son conjugué streptavidine marqué à la peroxydase (HRP) sont déposés. Suite à une incubation de 30min à TA et à un lavage, 100µl de substrat puis 50µl de solution d'arrêt sont successivement ajoutés avant lecture à 450nm au spectrophotomètre.

5-Western Blot (WB) anti-ZEBRA

Les transfections sont contrôlées en Western Blot pour vérifier l'expression de la protéine ZEBRA. 10µl de lysat (tampon de lyse du kit Promega) sont déposés sur un gel à 12% d'acrylamide. Les Ac monoclonaaux AZ125 (1/400) ou AZ130 (1/10000) sont utilisés comme Ac primaire ; l'Ac anti-souris couplé à l'HRP est utilisé comme Ac secondaire (dilué au 1/3000). La réaction immunologique est ensuite révélée par chimioluminescence (kit Western Blotting Reagents™, AMERSHAM).

6- Détection des ARNm de l'hIL-10

Les cellules BJAB dont les surnageants ont été prélevés pour le dosage de l'hIL-10 par ELISA sont lysées selon les indications du kit High Pure RNA Isolation Kit™ (ROCHE, Meylan). Les extraits sont ensuite filtrés. Les ARNs sont retenus sur la colonne puis élués avec 100 µl de tampon d'élution. Après dosage au spectrophotomètre, 3.6 mg d'ARNs totaux de chaque échantillon sont congelés à -80°C. Le kit RiboQuant™ (PHARMINGEN, Belgique) permet la détection et la quantification des ARNm de l'hIL-10. Brièvement, la première étape consiste à synthétiser une sonde ARN anti-sens marqué au phosphore 32 ($1,6.10^5$ cpm/µl de sonde) spécifique de l'ARNm de l'hIL-10. La sonde est ensuite placée en excès dans le mélange

d'ARNs totaux des échantillons. Après hybridation et traitement à la RNAse, les ARNs double brin sont purifiés (phenol-Tris, choroforme- alcool isoamylique) et déposés sur un gel à 5% d'acrylamide. Après migration, la quantité d'ARNm d'hIL-10 est évaluée par rapport à l'intensité des bandes, en autoradiographie.

RESULTATS

A-Action de ZEBRA sur le promoteur de l'hIL-10 (pIL-10)

1-ZEBRA sauvage

ZEBRA ayant la capacité d'activer des gènes, nous avons étudié son action sur le pIL-10. Dans ce but, nous avons cotransfecté les cellules HeLa et BL70 par un gène rapporteur (luciférase) sous contrôle de différentes constructions de pIL-10 avec un vecteur d'expression de ZEBRA. Les constructions de pIL-10 sont P1 (-4000/+1), P2 (-2300/+1), P3 (-2000/+1) et P4 (-340/+1) (figure 10). Nous avons donc comparé l'effet de ZEBRA sur celles-ci.

Nous avons dans un premier temps testé les cellules HeLa, modèle cellulaire classiquement utilisé pour les essais de transcription en gène rapporteur. Pour une quantité de vecteur d'expression de ZEBRA transfectée variant de 0 à 1000ng, aucune activation n'est observée sur les 3 constructions de pIL-10 : P2, P3, P4 (figure 11). Cependant, ce type cellulaire ne constitue pas un modèle de l'infection à EBV. C'est pourquoi nous avons effectué une expérience similaire dans une lignée B permissive à l'EBV.

Les cellules BL70 sont des lymphocytes B EBV négatifs issus de lymphome de Burkitt. La protéine ZEBRA active dans ces cellules la plus grande construction P1. En effet, l'activité de P1 est multipliée par 2 pour 25µg de vecteur d'expression de ZEBRA transfectés, sur la figure 12. Selon les expériences, cette activation par ZEBRA a pu être supérieure, mais jamais au delà d'un facteur 5. Cette variabilité serait dûe à la phase de croissance cellulaire au moment de la transfection. L'expression de ZEBRA est systématiquement contrôlée en Western Blot (figure 13). Nous observons une expression de ZEBRA qui augmente en fonction de la quantité de plasmide transfectée. Les autres constructions P2 et P4 sont également activées par ZEBRA de façon dose-dépendante, jusqu'à 3,5 fois pour P4 qui correspond à la forme la plus courte du promoteur (figures 12A et 12B). Ainsi, toutes les constructions testées dans les cellules BL70 sont activées par ZEBRA ; la plus petite (P4) est suffisante pour cette activation.

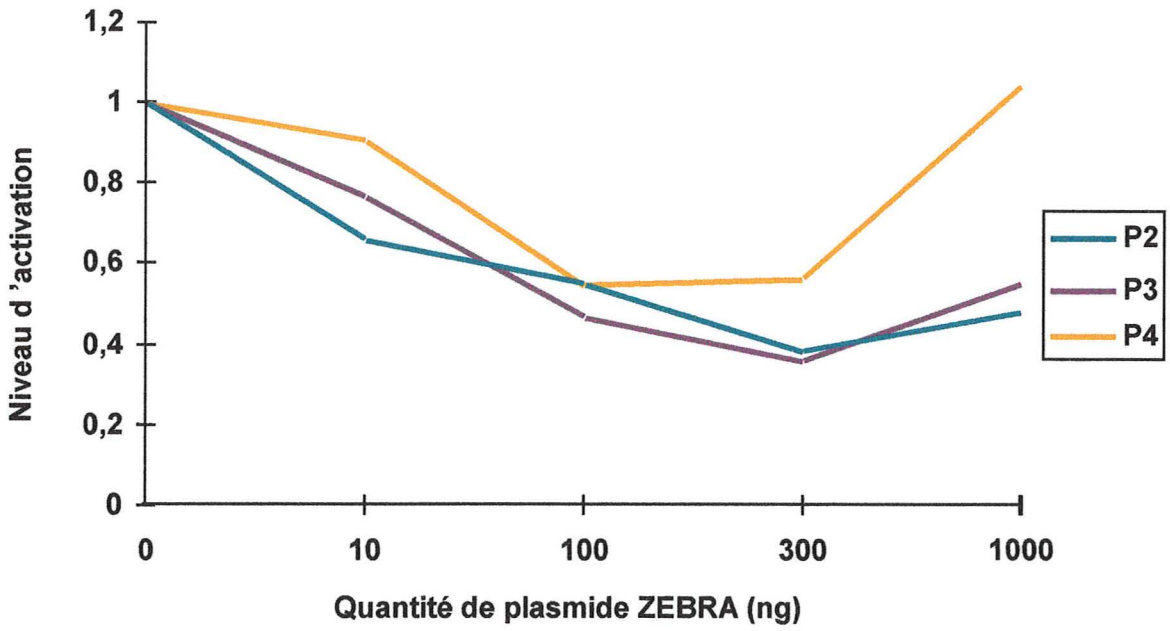


Figure 11 : Activation de pIL-10 par ZEBRA dans les cellules HeLa.

200.000 cellules ont été cotransfectées au CaPO3 avec le vecteur d 'expression de ZEBRA pSG-Z41 (0 à 1000ng) et un plasmide contenant le pIL-10 cloné en amont du gène rapporteur luciférase. Les 3 constructions du pIL-10, P2, P3 et P4 ont été testées (1000ng). 48H après transfection, l 'activité luciférase pour chaque construction est dosée et convertie en niveau d 'activation par rapport à l 'activité basale du promoteur (en l 'absence de ZEBRA).

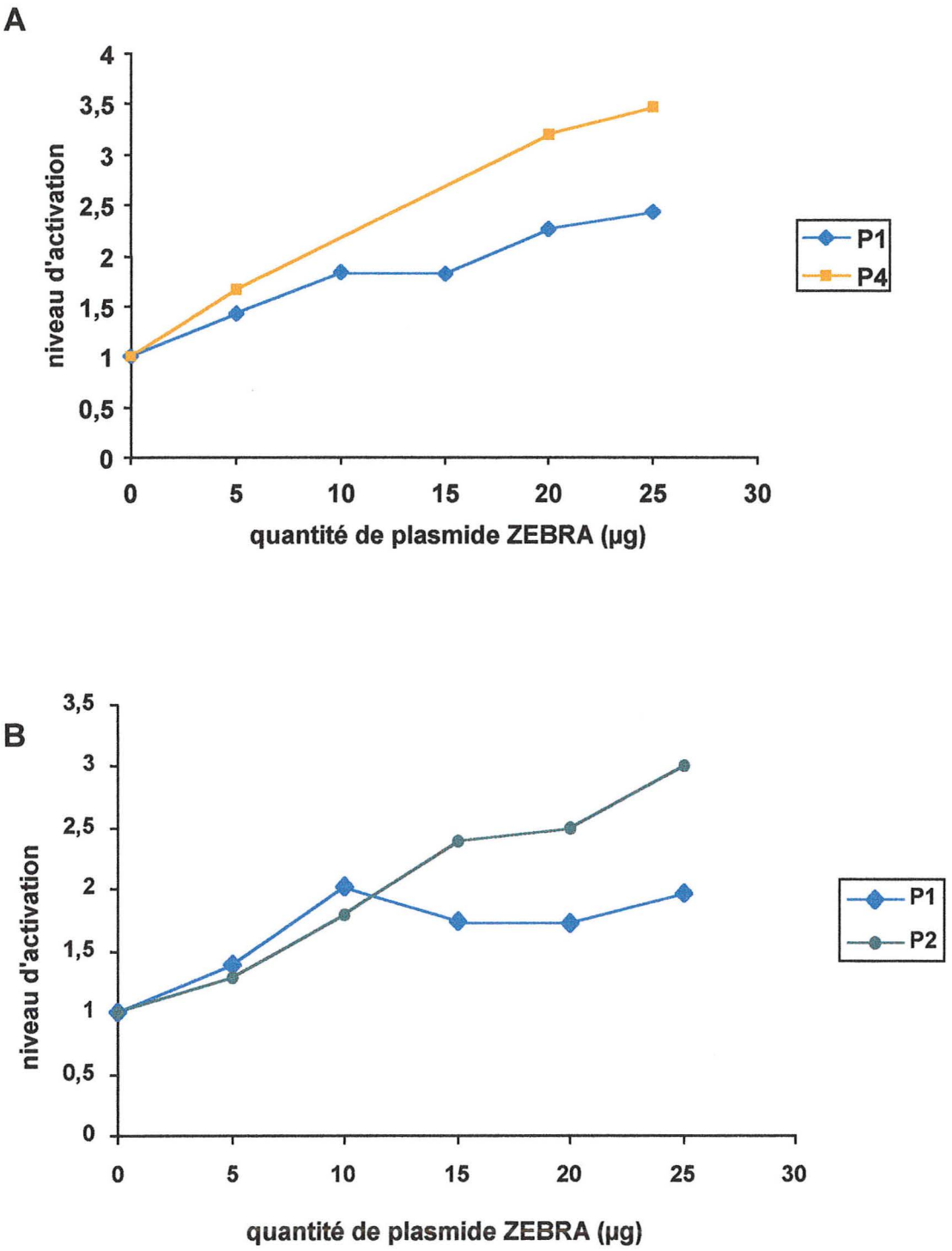


Figure 12 : Activation de pIL-10 par ZEBRA dans les cellules BL70.

10^6 cellules sont électroporées avec le vecteur d 'expression de ZEBRA pKSV-Z41 (0 à 25 µg) et le plasmide rapporteur contenant pIL-10 (5µg). L 'activité luciférase dosée à 24H est convertie en niveau d 'activation par rapport à l 'activité basale du promoteur. Ici, l 'activité de ZEBRA a été comparée sur les différentes constructions de pIL-10.**(A)** La grande construction P1 est comparée à la plus petite P4.**(B)** P1 est également comparée à la moyenne construction P2.

2-Mutants de ZEBRA

Nous avons reproduit ces transfections avec les mutants de substitution et de délétion de la protéine ZEBRA.

2-1 Mutants du domaine de fixation

Dans le but de savoir si ZEBRA transactive l'hIL-10 par fixation directe sur son promoteur, nous avons testé les mutants du domaine de fixation de la protéine. Le mutant Z311 correspond à une mutation ponctuelle du domaine de fixation de ZEBRA tandis que le mutant ZJ a pour domaine de fixation celui du transactivateur cellulaire c-jun (figure 9). Dans les 2 cas, les mutants Z311 et ZJ n'induisent pas d'activation de P1, ni de P4 (figure 14) : ZEBRA semble activer le pIL-10 par fixation directe sur l'ADN au niveau de sites différents de ceux occupés par c-jun.

2-2 Mutants du domaine d'activation

Pour déterminer la portion de ZEBRA impliquée dans l'activation de pIL-10, nous avons répété les transfections dans les cellules BL70 avec les mutants délétés de certaines portions du domaine d'activation de la protéine ZEBRA.

Nous avions à notre disposition six mutants de délétion du domaine d'activation de ZEBRA (figure 9). Nous avons dans un premier temps comparé l'activité de ZEBRA sauvage par rapport à celle du mutant délété de la portion 59-93 (d59-93) sur P1. En effet, le mutant d59-93 n'est pas délété de la portion qui supporte l'essentiel de l'activité transactivatrice de ZEBRA sur les gènes viraux (Giot et al., 1991). Nous observons que le mutant d59-93 présente une activité comparable à celle de ZEBRA sauvage, ceci quelques soient les quantités transfectées (figure 15). Le niveau d'activation atteignant 4 avec 30µg transfectés, nous avons choisi cette quantité pour tester les autres mutants. Les mutants d42-59, d59-93, d93-132 et d59-132 conservent une activité sur les 2 constructions P1 et P4 (figure 16). Par contre, les mutants d2-25 et d25-42 n'ont pas la capacité

d'activer ces constructions. L'expression des différents mutants a systématiquement été contrôlée en Western Blot (résultats non présentés). La région 2-42 du domaine d'activation de ZEBRA est donc indispensable à son action sur le pIL-10.



Figure 13 : Analyse de l 'expression de ZEBRA en Western Blot.

Après transfection de différentes quantités du vecteur d 'expression de ZEBRA, pSG-Z41, dans les cellules BL70 par électroporation, les cellules sont lysées. 10µl d 'extrait sont déposés sur un gel d 'acrylamide à 12%. L'Ac primaire est l'Acm AZ125 dilué au 1/400. L'anti-IgG de souris conjugué à la peroxydase est utilisé comme Ac secondaire au 1/3000. La réaction immunologique est révélée en ECL.

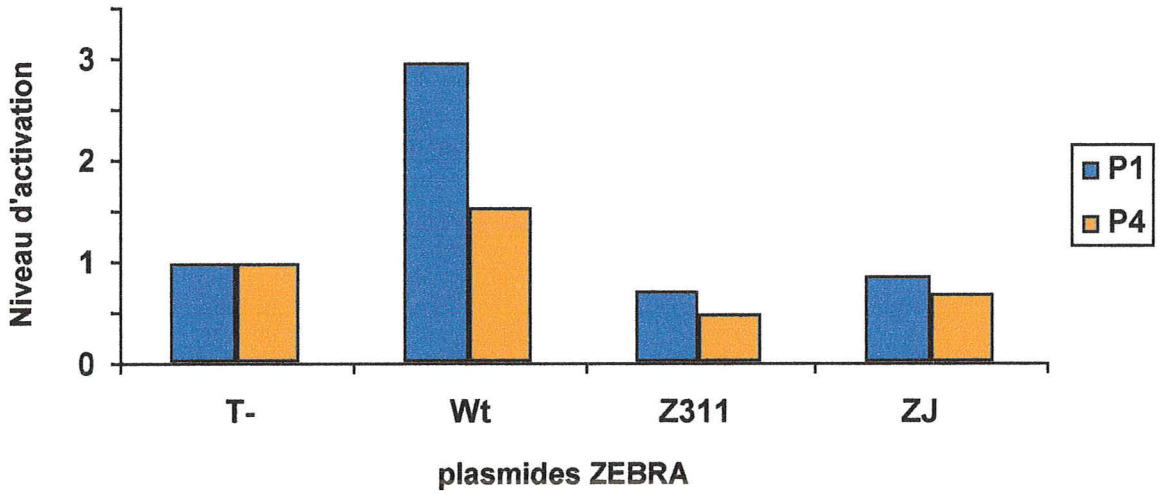


Figure 14 : Incidence des mutations du domaine de fixation de ZEBRA sur l'activité du pIL-10 dans les cellules BL70.

10^6 cellules sont électroporées avec d 'une part 30µg d 'un vecteur d 'expression de ZEBRA sauvage (pKSV-Z41 ou Wt) ou mutée au niveau de son domaine de fixation (Z311 ou ZJ); les plasmides rapporteurs sont la grande construction P1 ou la petite P4 (5µg). L 'activité luciférase est dosée à 24H et convertie en niveau d 'activation par rapport à l 'activité basale de P1 et P4.

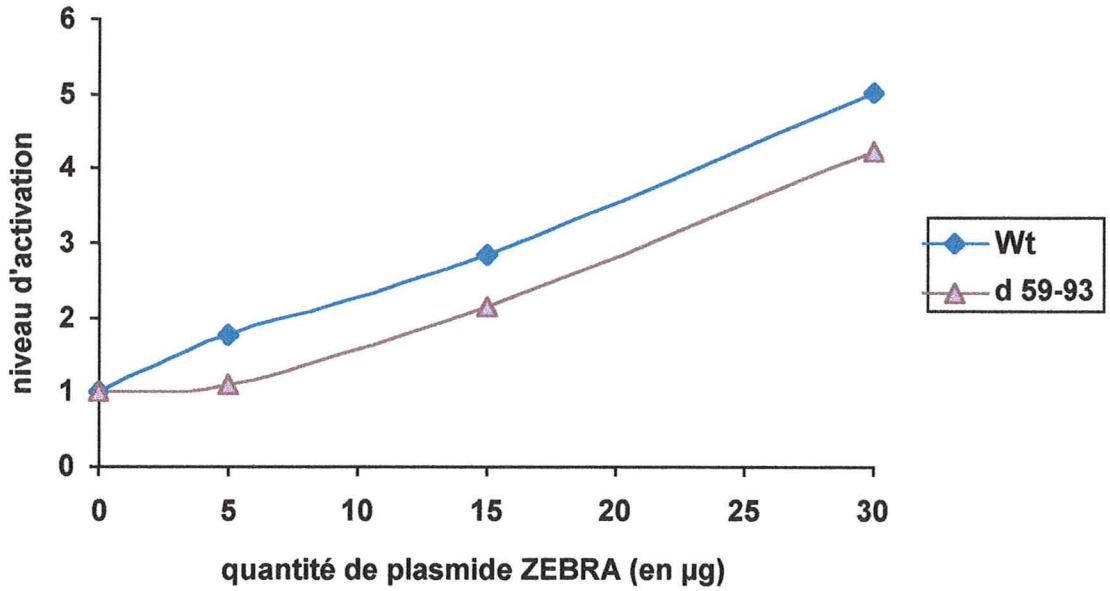


Figure 15 : Activation du pIL-10 (P1) par ZEBRA dans les cellules BL70.

10^6 cellules sont électroporées avec d 'une part un vecteur d 'expression de ZEBRA sauvage pKSV-Z41 (Wt) ou avec le vecteur d 'expression de ZEBRA délétée en 59-93 (d59-93); d 'autre part, le plasmide rapporteur est la plus grande construction de pIL-10 P1 (5µg). L 'activité luciférase est dosée à 24H, puis convertie en niveau d 'activation par rapport à l 'activité basale de P1.

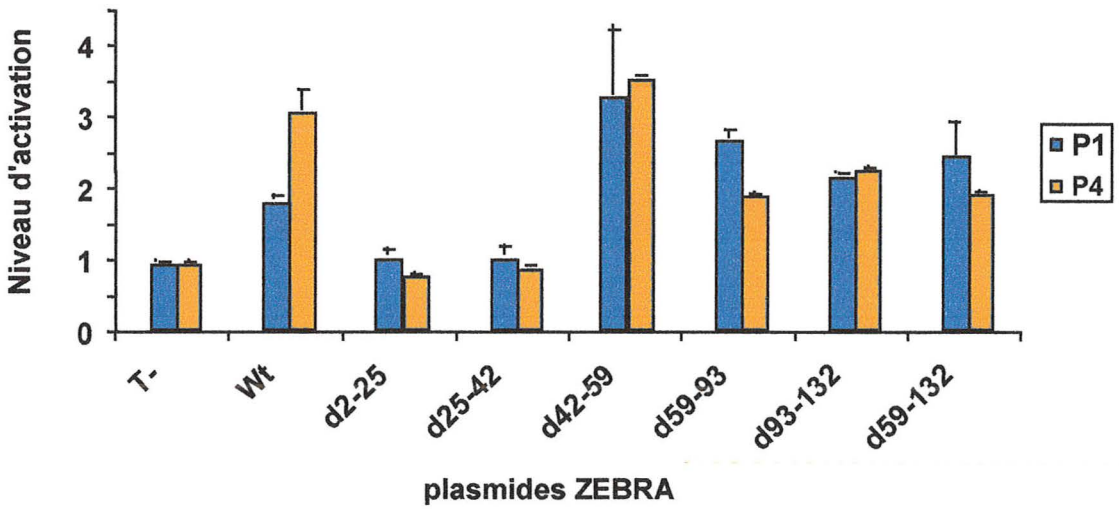


Figure 16 : Incidence des mutations du domaine d 'activation de ZEBRA sur l 'activité du pIL-10 dans les cellules BL70.

10^6 cellules sont électroporées avec d 'une part 30µg d 'un vecteur d 'expression de ZEBRA, sauvage (pKSV-Z41 ou Wt) ou délétée au niveau de son domaine d 'activation (d2-25, d25-42, d42-59, d59-93, d93-132, d59-132); les plasmides rapporteurs sont la grande construction P1 ou la petite P4 (5µg). L 'activité luciférase est dosée à 24H et convertie en niveau d 'activation par rapport à l 'activité basale de P1 et P4.

B-Action de ZEBRA sur la production cellulaire d'hIL-10

Nous avons ensuite voulu vérifier si l'action de ZEBRA sur le promoteur de l'hIL-10 avait effectivement une conséquence sur la production cellulaire d'hIL-10.

1-Sur la sécrétion

Nous avons utilisé la lignée BJAB. Ce sont des lymphocytes B qui produisent et sécrètent de l'hIL-10 de façon constitutive. Ces cellules ont été incubées avec la protéine de fusion GST-ZEBRA, produite en bactéries et purifiée, déposée dans le milieu de culture. Afin de vérifier la spécificité de la partie ZEBRA de GST-ZEBRA, nous avons testé parallèlement la protéine GST dans les mêmes conditions.

La sécrétion basale de l'hIL-10 est fortement augmentée en présence de GST-ZEBRA (jusqu'à un facteur 30) et peu en présence de GST seule (un facteur 2 à 3) (figure 17). Cette sécrétion augmente d'une part avec la concentration de GST-ZEBRA déposée et d'autre part avec le temps (ici jusqu'à 72H). Des dosages réalisés pour des temps plus courts d'incubation montrent une augmentation de la sécrétion visible dès 11H de traitement (résultats non présentés).

2-ARNm de l'hIL-10

Nous avons voulu savoir si l'augmentation de la sécrétion pouvait être la conséquence d'une augmentation des ARNm de l'hIL-10. Nous avons donc analysé les culots des cellules BJAB après dépôt de GST-ZEBRA à différents temps et plusieurs concentrations. Le niveau d'ARNm 6H après dépôt de GST-ZEBRA sur les BJAB est supérieur à celui détecté dans ces mêmes cellules traitées par GST (figure 18).

Les résultats concernant l'action de ZEBRA sur la sécrétion d'hIL-10 sont donc corrélés à l'augmentation des ARNm hIL-10.

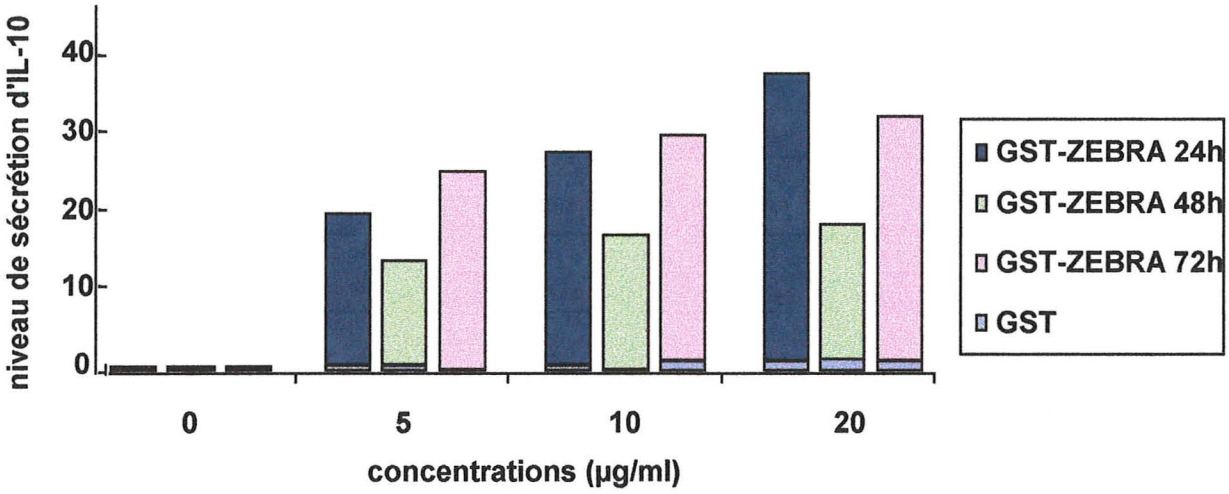


Figure 17 : Sécrétion d'hIL-10 par les cellules BJAB après dépôt de GST-ZEBRA.

La protéine est déposée aux concentrations 5, 10 ou 20µg/ml sur 10^6 cellules et les surnageants sont récupérés après 24, 48 et 72H. Le taux d 'hIL-10 dans les surnageants est dosé par ELISA. La protéine GST (en bleu clair) est utilisée comme contrôle.

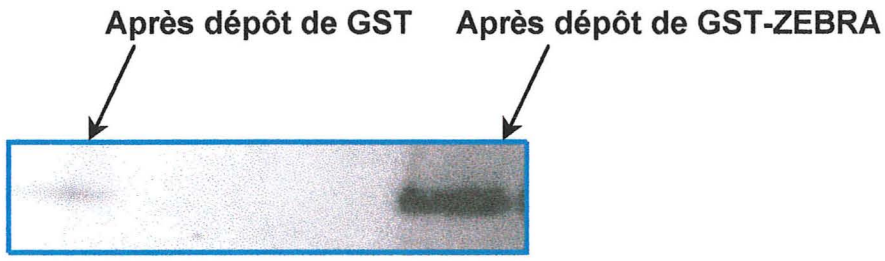


Figure 18 : Détection des ARNm hIL-10 dans les cellules BJAB.

La protéine GST-ZEBRA (5µg/ml) a été déposée sur les cellules BJAB (10^6). Les extraits cellulaires prélevés à 6H sont analysés pour l 'expression des ARNm de l 'hIL-10 par rapport au contrôle GST (5µg/ml). Les ARNm extraits sont détectés par le kit RiboQuant™.

DISCUSSION - PERSPECTIVES

Nous avons montré que ZEBRA active le promoteur de l'hIL-10 (pIL-10) en transfection transitoire, dans les lymphocytes B BL70. La protéine virale active 2 à 5 fois la plus grande construction du pIL-10 : P1. Cette activation est significative et reproductible mais reste faible par rapport à l'effet activateur de ZEBRA sur son propre promoteur et à l'effet activateur de nombreux facteurs de transcriptions en général. Les cellules sont transfectées par électroporation : cette technique nécessite un grand nombre de cellules (10^7) et une quantité importante de chaque plasmide (30µg) et le taux de cellules transfectées est faible. En conséquence, nous projetons de remplacer cette technique par celle du DEAE-Dextran. Le rendement de transfection étant plus important, l'expression de ZEBRA peut être meilleure donc entraîner une activation du pIL-10 supérieure. Par ailleurs, nous avons à notre disposition une lignée épithéliale transfectée de façon stable par le gène BZLF1 qui code pour ZEBRA. Il est prévu que nous reproduisions ces transfections dans cette lignée ; cette perspective n'est pas en contradiction avec les résultats négatifs obtenus dans les cellules HeLa d'origine épithéliale. En effet, Cayrol et al. (Cayrol and Flemington, 1995) ont montré que ZEBRA active les gènes cellulaires TGF-β1 et TGF-βigh3 lors de son expression dans une lignée stable HeLa. Ils ont également montré que ZEBRA active ces gènes (16 fois) dans une expérience de cotransfection transitoire, comme nous l'avons fait, dans une lignée EBV négative issue de lymphome de Burkitt (BL). Mais, ils n'ont pu reproduire cette activation en cotransfection transitoire dans les cellules HeLa. Par contre, Flemington et al. (Flemington and Speck, 1990) ont observé une activation de c-fos par ZEBRA en cotransfection transitoire dans une lignée B issue de BL, également dans les cellules HeLa.

Ces résultats négatifs que nous avons observé dans les cellules HeLa peuvent être attribués à un phénomène de spécificité cellulaire. En effet, les travaux de Lieberman et al. (Lieberman et al., 1989) sur l'activation du promoteur viral Not I repeat par ZEBRA ont avancé la notion de spécificité cellulaire. Selon la distance du ZRE au promoteur basal et selon l'environnement de

ce ZRE (c'est-à-dire les séquences régulatrices voisines), ZEBRA activerait un promoteur en coopération avec d'autres facteurs cellulaires spécifiques, qui pourraient être absents dans les cellules HeLa.

Nous avons également montré que les constructions P2 (-2300/+1) et P4 (-340/+1) sont activées de façon plus importante que P1 (-4000/+1) par ZEBRA. Dans l'hypothèse où ZEBRA active le pIL-10 par l'intermédiaire des sites AP-1, comme sur le promoteur de c-fos (Flemington and Speck, 1990), nous avons recherché ces sites. Il existe plusieurs sites AP-1 sur le pIL-10 mais leur position varie selon la banque de données consultée. C'est pourquoi, nous n'avons pas entrepris d'interpréter les résultats en fonction de la localisation des sites AP-1.

La petite construction P4 est activée par ZEBRA donc la région –340/+1 est suffisante pour l'effet du transactivateur viral ; ceci est en accord avec les travaux de Lieberman et al. (Lieberman et al., 1997) qui montrent que ZEBRA agit sur la machinerie transcriptionnelle cellulaire, au niveau du site d'initiation de la transcription (+1) en stabilisant certains complexes. Nous avons prévu de vérifier et de localiser la fixation de ZEBRA sur la construction P4 en gel retard. L'activation de P4 par ZEBRA est supérieure à celle de P1 : la délétion de la zone silencer (-800/-300) favoriserait l'action de ZEBRA, ce qui est en accord avec les travaux de Kube et al. (Kube et al., 1995) sur le séquençage de pIL-10.

Concernant les mutants du domaine de fixation, leur incapacité à activer P1 ou P4 suggère que ZEBRA active le pIL-10 par fixation directe sur l'ADN. La mutation ponctuelle du Z311 annule l'action de ZEBRA ; la substitution du domaine de fixation par celui de c-jun (mutant ZJ) annule également l'action de ZEBRA. Alors que ZEBRA occupe les sites AP-1 canoniques du promoteur viral PM (Giot et al., 1991), elle ne semble pas s'y fixer sur le pIL-10 ; son action semble donc se faire par l'intermédiaire de sites ZRE spécifiques.

Les mutations du domaine d'activation de ZEBRA ont montré que les régions 2-25 et 25-42 sont impliquées dans l'action sur le pIL-10. En effet, les mutants délétés de ces 2 régions perdent la capacité à activer P1 et P4. En revanche, les autres régions (42-59, 59-93, 93-132) ne semblent pas participer à cette activation. Ces résultats diffèrent de ceux de Giot et al. (Giot et al., 1991) qui montrent que seule la délétion du domaine 25-42 annule l'action de ZEBRA sur le promoteur viral DR. Les travaux de Flemington et al. (Flemington et al., 1992) ont montré que seule la portion 28-78 de la protéine est nécessaire à l'activation d'un promoteur induit par ZEBRA.

Ainsi, nous avons mis en évidence la participation du domaine 2-25 dans l'activation du gène cellulaire de l'hIL-10.

Nos résultats ont par ailleurs montré la corrélation entre l'action de ZEBRA endogène sur le promoteur de l'hIL-10 (en cotransfection) et l'action de ZEBRA exogène (sous forme de protéine de fusion GST-ZEBRA) sur la sécrétion et la transcription de l'hIL-10. Cette action de ZEBRA exogène suggère que la protéine traverse la membrane cellulaire.

Deux hypothèses se sont alors présentées :

- **ZEBRA agit au niveau de la membrane cellulaire pour augmenter la transcription et la sécrétion d'hIL-10**. Ceci implique que la protéine est libérée dans le milieu extracellulaire, phénomène observé à la fin du cycle lytique de l'EBV aboutissant à la lyse cellulaire. Cette action externe a été mise en évidence pour le transactivateur Tax du virus HTLV-1 : cette protéine, apportée de façon exogène dans le milieu de culture de cellules neuronales, induit la transcription et la sécrétion du TNF-α 4H après dépôt (Cowan et al., 1997). Egalement, l'induction du TGF-β1 par le transactivateur Tat du virus HIV-1 a été étudiée (Reinhold et al., 1999). La protéine virale se lierait à l'antigène de membrane CD26 et induirait la sécrétion de l'immunosuppresseur TGF-β1 . Cette action dépend

donc du type cellulaire et du nombre de récepteurs présents à la surface. Si ZEBRA exerce son effet de la même façon, c'est-à-dire par l'intermédiaire d'un récepteur, ceci expliquerait la différence observée entre les cellules BJAB et les BL70 (résultats non présentés). En effet, alors que la sécrétion induite d'hIL-10 par les cellules BJAB est significative, aucune sécrétion par les cellules BL70 n'est observée.

- **ZEBRA traverse la membrane cellulaire.**

Les travaux de Schwarze et al. (Schwarze et al., 1999) ont mis en évidence un passage membranaire de la protéine Tat du virus HIV-1. Tat est capable seule de passer la membrane mais également fusionnée à une autre protéine. Ceci peut aboutir à un nouveau concept de thérapie génique : la délivrance de protéines dans la cellule par un vecteur protéique d'origine virale.

Nos projets consistent à étudier cet éventuel passage membranaire. Nos travaux en cours consistent à incuber la protéine GST-ZEBRA avec les cellules Raji EBV positives et Raji DR-CAT (transfectées de façon stable avec le gène CAT sous contrôle du promoteur viral DR) et observer, dans le premier cas une réactivation virale, dans le second l'expression de la protéine CAT. Nous envisageons également d'analyser le trajet de ZEBRA dans la cellule en Immunofluorescence ; il sera très intéressant de rechercher les ligands membranaires et/ou cytosoliques de ZEBRA pour comprendre son action sur l'hIL-10, que cette action soit externe ou interne.

CONCLUSION

Thèse soutenue par : Ségolène MAHOT

Titre : Immunomodulation induite par le transacivateur ZEBRA du virus d'Epstein-Barr.

Conclusion :

L'étude des interactions hôte-virus contribue à une meilleure compréhension du fonctionnement du système immunitaire et de sa régulation. Dans un contexte de latence, le génome viral est maintenu dans les cellules infectées grâce à une expression antigénique limitée. Nombreux sont les virus qui ont développé différentes stratégies pour échapper au système immunitaire de l'hôte : on parlera alors d'immunosubversion virale. Le virus d'Epstein-Barr (EBV) a été le premier à être associé à des cancers humains. 90% de la population est infectée et il semble que cette "cohabitation" ait favorisé, tout au long de l'évolution humaine, une capture de certains gènes cellulaires par le virus. L'EBV s'est ainsi "armé" de protéines virales, homologues ou non aux protéines humaines, afin de moduler le système immunitaire de l'hôte. Ainsi, le virus est capable de bloquer les effets antiviraux de l'IFN, de limiter l'apoptose des cellules infectées, ou encore de bloquer la présentation d'antigènes aux cellules effectrices de la réponse immunitaire. Les pathologies associées à l'EBV, dans un contexte d'immunodépression ou d'immunocompétence, résultent d'un déséquilibre dans l'interaction hôte-virus. La détection d'interleukine-10 chez les patients présentant un lymphome post-transplantation, un lymphome de Burkitt ou encore un lymphome non hodgkinien a révélé une nouvelle stratégie du virus visant à favoriser sa dissémination : le virus possède une protéine homologue à l'interleukine-10 humaine (hIL-10), nommée vIL-10, synthétisée au cours de la phase productive de virions. Cette vIL-10, qui possède les mêmes propriétés que l'hIL-10 , exerce cependant des effets 3 à 10 fois plus faibles. Les travaux de Burdin et al. (Burdin et al., 1993) ont montré que l'infection de lymphocytes B par EBV entraîne une augmentation de l'hIL-10. Cette cytokine favorise d'une part la croissance et la prolifération des lymphocytes B et induit d'autre part une immunosuppression visant les monocytes/macrophages et les lymphocytes T. La protéine LMP-1 induirait le gène de l'hIL-10 au cours de la phase de latence du virus (Nakagomi et al., 1994). Lors de la réactivation virale, Sairenji et al. (Sairenji et al., 1998) ont observé que l'expression de

ZEBRA est associée à l'augmentation de la sécrétion d'hIL-10 par une lignée lymphocytaire B. Au vu des propriétés transactivatrices de ZEBRA sur des gènes viraux (Cox et al., 1990; Farrell et al., 1989; Urier et al., 1989) et cellulaires (Cayrol and Flemington, 1995; Flemington and Speck, 1990; Gstaiger et al., 1996), nous avons suggéré que ZEBRA est capable d'induire l'hIL-10. Nous avons donc étudié l'action de ZEBRA sur les différentes étapes de la production de l'hIL-10 en analysant son effet sur l'activité du promoteur de l'hIL-10 (pIL-10) en expression transitoire dans des lignées lymphocytaires B, sur la sécrétion d'hIL-10 et sur le taux d'ARNm hIL-10 dans ces mêmes lignées. Nous montrons que la protéine ZEBRA active ces trois étapes, qu'elle soit surexprimée dans les cellules (endogène) ou ajoutée dans le milieu de culture (exogène) ; ce dernier point impliquerait un passage transmembranaire de ZEBRA, ce qui reste à démontrer. Une application clinique peut être envisagée : une protéine ZEBRA recombinante (complète ou partielle) augmente, *in vitro*, la production d'hIL-10 qui peut être ensuite utilisée en thérapeutique. En effet, les propriétés immunosuppressives de l'hIL-10 peuvent être mises à profit pour induire une tolérance post-greffe ; par ailleurs, les propriétés anti-inflammatoires de la cytokine peuvent être exploitées dans la prévention de pathologies cardiovasculaires. D'autres modulateurs de l'expression de l'IL-10 ont été identifiés : parmi ceux-ci, la tétracycline augmente l'expression du gène entre 10 et 1600% (brevet anonyme : "Méthode utilisant des composés de tétracycline afin d'augmenter une production d'interleukine-10, WO0015235). Nous montrons ainsi comment une stratégie virale visant la modulation du système immunitaire peut être détournée à des fins thérapeutiques.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le

LE DOYEN :

P.DEMENGE

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER U.F.R. DE PHARMACIE GRENOBLE

LE PRESIDENT DE THESE :

Professeur :

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER SCIENCES-TECHNOLOGIE-MEDECINE
FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE
BACTÉRIOLOGIE - VIROLOGIE - IMMUNOLOGIE
Pr Emmanuel DROUET
Domaine de la Merci F 38706 LA TRONCHE Cedex

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Ahn, K., Angulo, A., Ghazal, P., Peterson, P. A., Yang, Y., and Fruh, K. (1996). Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. Proc Natl Acad Sci U S A *93*, 10990-5.

Bais, C., Santomasso, B., Coso, O., Arvanitakis, L., Raaka, E. G., Gutkind, J. S., Asch, A. S., Cesarman, E., Gershengorn, M. C., Mesri, E. A., and Gerhengorn, M. C. (1998). G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator [see comments] [published erratum appears in Nature 1998 Mar 12;392(6672):210]. Nature *391*, 86-9.

Benjamin, D., Knobloch, T. J., and Dayton, M. A. (1992). Human B-cell interleukin-10: B-cell lines derived from patients with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukin-10 [see comments]. Blood *80*, 1289-98.

Blay, J. Y., Burdin, N., Rousset, F., Lenoir, G., Biron, P., Philip, T., Banchereau, J., and Favrot, M. C. (1993). Serum interleukin-10 in non-Hodgkin's lymphoma: a prognostic factor. Blood *82*, 2169-74.

Bodaghi, B., Jones, T. R., Zipeto, D., Vita, C., Sun, L., Laurent, L., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J. L., and Michelson, S. (1998). Chemokine sequestration by viral chemoreceptors as a novel viral escape strategy: withdrawal of chemokines from the environment of cytomegalovirus-infected cells. J Exp Med *188*, 855-66.

Briere, F., Servet-Delprat, C., Bridon, J. M., Saint-Remy, J. M., and Banchereau, J. (1994). Human interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D+ (sIgD+) B cells to secrete IgG1 and IgG3. J Exp Med *179*, 757-62.

Burdin, N., Peronne, C., Banchereau, J., and Rousset, F. (1993). Epstein-Barr virus transformation induces B lymphocytes to produce human interleukin 10. J Exp Med *177*, 295-304.

Cayrol, C., and Flemington, E. K. (1995). Identification of cellular target genes of the Epstein-Barr virus transactivator Zta: activation of transforming growth factor beta igh3 (TGF-beta igh3) and TGF-beta 1. J Virol *69*, 4206-12.

Chang, Y. N., Dong, D. L., Hayward, G. S., and Hayward, S. D. (1990). The Epstein-Barr virus Zta transactivator: a member of the bZIP family with unique DNA-binding specificity and a dimerization domain that lacks the characteristic heptad leucine zipper motif. J Virol *64*, 3358-69.

Clerici, M., Wynn, T. A., Berzofsky, J. A., Blatt, S. P., Hendrix, C. W., Sher, A., Coffman, R. L., and Shearer, G. M. (1994). Role of interleukin-10 in T helper cell dysfunction in asymptomatic individuals infected with the human immunodeficiency virus. J Clin Invest *93*, 768-75.

Cohen, J. I. (2000). Epstein-Barr virus infection. N Engl J Med *343*, 481-92.

Cowan, E. P., Alexander, R. K., Daniel, S., Kashanchi, F., and Brady, J. N. (1997). Induction of tumor necrosis factor alpha in human neuronal cells by extracellular human T-cell lymphotropic virus type 1 Tax. J Virol *71*, 6982-9.

Cox, M. A., Leahy, J., and Hardwick, J. M. (1990). An enhancer within the divergent promoter of Epstein-Barr virus responds synergistically to the R and Z transactivators. J Virol *64*, 313-21.

de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G., and de Vries, J. E. (1991). Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J Exp Med *174*, 1209-20.

de Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M. G., te Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Yssel, H., and de Vries, J. E. (1991). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. J Exp Med *174*, 915-24.

Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1996). Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. J Biol Chem *271*, 18188-93.

Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. J Biol Chem *269*, 10444-50.

Elsing, A., and Burgert, H. G. (1998). The adenovirus E3/10.4K-14.5K proteins down-modulate the apoptosis receptor Fas/Apo-1 by inducing its internalization. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 10072-7.

Eskdale, J., Kube, D., Tesch, H., and Gallagher, G. (1997). Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. Immunogenetics *46*, 120-8.

Fahmi, H., Cochet, C., Hmama, Z., Opolon, P., and Joab, I. (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*, 5810-8.

Farrell, P. J., Rowe, D. T., Rooney, C. M., and Kouzarides, T. (1989). Epstein-Barr virus BZLF1 trans-activator specifically binds to a consensus AP-1 site and is related to c-fos. Embo J *8*, 127-32.

Favoreel, H. W., Nauwynck, H. J., Van Oostveldt, P., Mettenleiter, T. C., and Pensaert, M. B. (1997). Antibody-induced and cytoskeleton-mediated redistribution and shedding of viral glycoproteins, expressed on pseudorabies virus-infected cells. J Virol *71*, 8254-61.

Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., Moore, C., Chen, L. L., Pepinsky, B., and Barsoum, J. (1994). Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. Proc Natl Acad Sci U S A *91*, 664-8.

Flemington, E., and Speck, S. H. (1990). Epstein-Barr virus BZLF1 trans activator induces the promoter of a cellular cognate gene, c-fos. J Virol *64*, 4549-52.

Flemington, E. K., Borras, A. M., Lytle, J. P., and Speck, S. H. (1992). Characterization of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein transactivation domain. J Virol *66*, 922-9.

Garnier, J. L., Blanc-Brunat, N., Vivier, G., Rousset, F., and Touraine, J. L. (1999). Interleukin-10 in Epstein-Barr virus-associated post-transplant lymphomas. Clin Transplant *13*, 305-12.

Giot, J. F., Mikaelian, I., Buisson, M., Manet, E., Joab, I., Nicolas, J. C., and Sergeant, A. (1991). Transcriptional interference between the EBV transcription factors EB1 and R: both DNA-binding and activation domains of EB1 are required. Nucleic Acids Res *19*, 1251-8.

Gstaiger, M., Hovens, C., Georgiev, O., Knoepfel, L., and Schaffner, W. (1996). BZLF1 (ZEBRA, Zta) protein of Epstein-Barr virus selected in a yeast one-hybrid system by binding to a consensus site in the IgH intronic enhancer: a role in immunoglobulin expression? Biol Chem *377*, 669-73.

Guermonprez, P., Ladant, D., Fayolle, C., Ullmann, A., and Leclerc, C. (2000). Les toxines bactériennes recombinantes: de nouveaux vecteurs pour la vaccination? Médecine/Sciences *16*, 653-62.

Juang, Y., Lowther, W., Kellum, M., Au, W. C., Lin, R., Hiscott, J., and Pitha, P. M. (1998). Primary activation of interferon A and interferon B gene transcription by interferon regulatory factor 3. Proc Natl Acad Sci U S A *95*, 9837-42.

Kanda, K., Decker, T., Aman, P., Wahlstrom, M., von Gabain, A., and Kallin, B. (1992). The EBNA2-related resistance towards alpha interferon (IFN-alpha) in Burkitt's lymphoma cells effects induction of IFN-induced genes but not the activation of transcription factor ISGF-3 [published erratum appears in Mol Cell Biol 1993 Mar;13(3):1981]. Mol Cell Biol *12*, 4930-6.

Khatri, V. P., and Caligiuri, M. A. (1998). A review of the association between interleukin-10 and human B-cell malignancies. Cancer Immunol Immunother *46*, 239-44.

Kim, D. T., Mitchell, D. J., Brockstedt, D. G., Fong, L., Nolan, G. P., Fathman, C. G., Engleman, E. G., and Rothbard, J. B. (1997). Introduction of soluble proteins into the MHC class I pathway by conjugation to an HIV tat peptide. J Immunol *159*, 1666-8.

Kledal, T. N., Rosenkilde, M. M., Coulin, F., Simmons, G., Johnsen, A. H., Alouani, S., Power, C. A., Luttichau, H. R., Gerstoft, J., Clapham, P. R., Clark-Lewis, I., Wells, T. N. C., and Schwartz, T. W. (1997). A broad-spectrum chemokine antagonist encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. Science *277*, 1656-9.

Klein, S. C., Kube, D., Abts, H., Diehl, V., and Tesch, H. (1996). Promotion of IL8, IL10, TNF alpha and TNF beta production by EBV infection. Leuk Res *20*, 633-6.

Kube, D., Platzer, C., von Knethen, A., Straub, H., Bohlen, H., Hafner, M., and Tesch, H. (1995). Isolation of the human interleukin 10 promoter. Characterization of the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines. Cytokine *7*, 1-7.

Leonard, G. T., and Sen, G. C. (1996). Effects of adenovirus E1A protein on interferon-signaling. Virology *224*, 25-33.

Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A., and Masucci, M. G. (1997). Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. Proc Natl Acad Sci U S A *94*, 12616-21.

Li, M., Lee, H., Guo, J., Neipel, F., Fleckenstein, B., Ozato, K., and Jung, J. U. (1998). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor. J Virol *72*, 5433-40.

Lieberman, P. M., Hardwick, J. M., and Hayward, S. D. (1989). Responsiveness of the Epstein-Barr virus NotI repeat promoter to the Z transactivator is mediated in a cell-type-specific manner by two independent signal regions. J Virol *63*, 3040-50.

Lieberman, P. M., Hardwick, J. M., Sample, J., Hayward, G. S., and Hayward, S. D. (1990). The zta transactivator involved in induction of lytic cycle gene expression in Epstein-Barr virus-

infected lymphocytes binds to both AP-1 and ZRE sites in target promoter and enhancer regions. J Virol *64*, 1143-55.

Lieberman, P. M., Ozer, J., and Gursel, D. B. (1997). Requirement for transcription factor IIA (TFIIA)-TFIID recruitment by an activator depends on promoter structure and template competition. Mol Cell Biol *17*, 6624-32.

Mann, D. A., and Frankel, A. D. (1991). Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein. Embo J *10*, 1733-9.

Miller, C. G., Shchelkunov, S. N., and Kotwal, G. J. (1997). The cowpox virus-encoded homolog of the vaccinia virus complement control protein is an inflammation modulatory protein. Virology *229*, 126-33.

Miller, D. M., Rahill, B. M., Boss, J. M., Lairmore, M. D., Durbin, J. E., Waldman, J. W., and Sedmak, D. D. (1998). Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the Jak/Stat pathway. J Exp Med *187*, 675-83.

Montpellier, C., Groux, H., Auriault, C., and Coll, J. (1998). Lymphoprolifératıons T associées au virus d'Epstein-Barr. Médecine/Sciences *14*, 690-7.

Moore, K. W., O'Garra, A., de Waal Malefyt, R., Vieira, P., and Mosmann, T. R. (1993). Interleukin-10. Annu Rev Immunol *11*, 165-90.

Nakagomi, H., Dolcetti, R., Bejarano, M. T., Pisa, P., Kiessling, R., and Masucci, M. G. (1994). The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) induces interleukin-10 production in Burkitt lymphoma lines. Int J Cancer *57*, 240-4.

Neipel, F., Albrecht, J. C., and Fleckenstein, B. (1997). Cell-homologous genes in the Kaposi's sarcoma-associated rhadinovirus human herpesvirus 8: determinants of its pathogenicity? J Virol *71*, 4187-92.

Phelan, A., Elliott, G., and O'Hare, P. (1998). Intercellular delivery of functional p53 by the herpesvirus protein VP22 [see comments]. Nat Biotechnol *16*, 440-3.

Piguet, V., Schwartz, O., Le Gall, S., and Trono, D. (1999). The downregulation of CD4 and MHC-I by primate lentiviruses: a paradigm for the modulation of cell surface receptors. Immunol Rev *168*, 51-63.

Raphaël, M. (1995). Virus d'Epstein-Barr et lymphomes. La lettre de l'infectiologue *10*, 202-5.

Reinhold, D., Wrenger, S., Kahne, T., and Ansorge, S. (1999). HIV-1 Tat: immunosuppression via TGF-beta1 induction [letter; comment]. Immunol Today *20*, 384-5.

Reyburn, H. T., Mandelboim, O., Vales-Gomez, M., Davis, D. M., Pazmany, L., and Strominger, J. L. (1997). The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells [see comments]. Nature *386*, 514-7.

Rickinson, A. B., and Kieff, E. (1996). Epstein-Barr Virus. In Fields Virology, B. N. Fiels, D. M. Knipe and P. M. Howley, eds. (Philadelphia: Raven Publishers), pp. 2397-446.

Rock, K. L., and Goldberg, A. L. (1999). Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. Annu Rev Immunol *17*, 739-79.

Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., Peronne, C., Vezzio, N., Hsu, D. H., Kastelein, R., Moore, K. W., and Banchereau, J. (1992). Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 1890-3.

Sairenji, T., Ohnishi, E., Inouye, S., and Kurata, T. (1998). Induction of interleukin-10 on activation of Epstein-Barr virus in EBV-infected B-cell lines. Viral Immunol *11*, 221-31.

Schutze-Redelmeier, M. P., Gournier, H., Garcia-Pons, F., Moussa, M., Joliot, A. H., Volovitch, M., Prochiantz, A., and Lemonnier, F. A. (1996). Introduction of exogenous antigens into the MHC class I processing and presentation pathway by Drosophila antennapedia homeodomain primes cytotoxic T cells in vivo. J Immunol *157*, 650-5.

Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A., and Dowdy, S. F. (1999). In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse [see comments]. Science *285*, 1569-72.

Seigneurin, J.-M. (1997). Infection à virus d'Epstein-Barr chez l'immunodéprimé : physiopatholgie et méthodes d'analyse. Virologie *1*, 391-402.

Senkevich, T. G., Bugert, J. J., Sisler, J. R., Koonin, E. V., Darai, G., and Moss, B. (1996). Genome sequence of a human tumorigenic poxvirus: prediction of specific host response-evasion genes. Science *273*, 813-6.

Sergeant, A. (1996). The Epstein-Barr virus latency and reactivation. In Cancer in Transplantation : Prevention and Treatment, J. L. Touraine, J. Traeger, H. Bétuel, J. M. Dubernard, J. P. Revillard and C. Dupuy, eds.: Kluwer Academic Publishers), pp. 189-99.

Speck, S. H., Chatila, T., and Flemington, E. (1997). Reactivation of Epstein-Barr virus: regulation and function of the BZLF1 gene. Trends Microbiol *5*, 399-405.

Stevenson, P. G., Efstathiou, S., Doherty, P. C., and Lehner, P. J. (2000). Inhibition of MHC class I-restricted antigen presentation by gamma 2-herpesviruses. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 8455-60.

Symons, J. A., Alcami, A., and Smith, G. L. (1995). Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species specificity. Cell *81*, 551-60.

Taga, H., Taga, K., Wang, F., Chretien, J., and Tosato, G. (1995). Human and viral interleukin-10 in acute Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis. J Infect Dis *171*, 1347-50.

Taga, K., Mostowski, H., and Tosato, G. (1993). Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth. Blood *81*, 2964-71.

Taylor, N., Flemington, E., Kolman, J. L., Baumann, R. P., Speck, S. H., and Miller, G. (1991). ZEBRA and a Fos-GCN4 chimeric protein differ in their DNA-binding specificities for sites in the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter. J Virol *65*, 4033-41.

Tedgui, A., and Mallat, Z. (2000). Athérosclérose : les pouvoirs de l'interleukine 10. In Inserm actualités, pp. 5.

Tortorella, D., Gewurz, B. E., Furman, M. H., Schust, D. J., and Ploegh, H. L. (2000). Viral subversion of the immune system. Annu Rev Immunol *18*, 861-926.

Tosato, G., Teruya-Feldstein, J., Setsuda, J., Pike, S. E., Jones, K. D., and Jaffe, E. S. (1998). Post-transplant lymphoproliferative disease (PTLD): lymphokine production and PTLD. Springer Semin Immunopathol *20*, 405-23.

Urier, G., Buisson, M., Chambard, P., and Sergeant, A. (1989). The Epstein-Barr virus early protein EB1 activates transcription from different responsive elements including AP-1 binding sites. Embo J *8*, 1447-53.

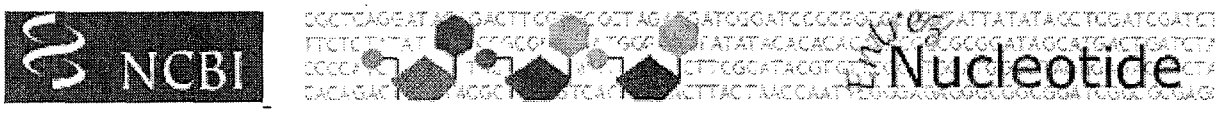
Voorzanger, N., and Blay, J.-Y. (1996). Interleukin 10 and non Hodgkin's lymphomas. In Cancer in Transplantation, J. L. Touraine, ed., pp. 229-241.

Voorzanger, N., Touitou, R., Favrot, M. C., Joab, I., Edelman, L., Rousset, F., Widjdenes, J., Drouet, E., and Blay, J. Y. (1994). Correlation between IL-10 expression and the presence of EBV in non Hodgkin's lymphoma. Blood *84*, 159a (Abstr.).

Wanidworanun, C., and Strober, W. (1993). Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis. J Immunol *151*, 6853-61.

York, I. A., Roop, C., Andrews, D. W., Riddell, S. R., Graham, F. L., and Johnson, D. C. (1994). A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8+ T lymphocytes. Cell *77*, 525-35.

ANNEXE



1: GI "1167482" [GenBank] H.sapiens IL-10 gene PubMed, Protein, Related Sequences,

```
LOCUS       HSINTL10     4181 bp    DNA             PRI       27-JAN-1997
DEFINITION  H.sapiens IL-10 gene.
ACCESSION   X78437
VERSION     X78437.1  GI:1167482
KEYWORDS    IL-10 gene; interleukin 10.
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Vertebrata; Mammalia; Eutheria;
            Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 4181)
  AUTHORS   Kube,D., Platzer,C., von Knethen,A., Straub,H., Bohlen,H.,
            Hafner,M. and Tesch,H.
  TITLE     Isolation of the human interleukin 10 promoter. Characterization of
            the promoter activity in Burkitt's lymphoma cell lines
  JOURNAL   Cytokine 7 (1), 1-7 (1995)
  MEDLINE   95267986
REFERENCE   2  (bases 1 to 4181)
  AUTHORS   Kube,D.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (21-MAR-1994) D. Kube, Medizinische Klinik I der
            Universitaet zu Koeln, LFI Ebene 4 Raum 508, Joseph-Stelzmann-Str
            9, 50924 Koeln, FRG
  REMARK    Revised by [3]
REFERENCE   3  (bases 1 to 4181)
  AUTHORS   Kube,D.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (26-APR-1995) D. Kube, Medizinische Klinik I der
            Universitaet zu Koeln, LFI Ebene 4 Raum 508, Joseph-Stelzmann-Str
            9, 50924 Koeln, FRG
  REMARK    Revised by [4]
REFERENCE   4  (bases 1 to 4181)
  AUTHORS   Kube,D.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (25-JAN-1996) D. Kube, Medizinische Klinik I der
            Universitaet zu Koeln, LFI Ebene 4 Raum 508, Joseph-Stelzmann-Str
            9, 50924 Koeln, FRG
REFERENCE   5  (bases 1 to 4181)
  AUTHORS   Eskdale,J., Kube,D. and Gallagher,G.
  TITLE     A second polymorphic dinucleotide repeat in the 5' flanking region
            of the human IL10 gene
  JOURNAL   Immunogenetics 45 (1), 82-83 (1996)
  MEDLINE   97045041
COMMENT     On Jan 26, 1996 this sequence version replaced gi:790448.
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..4181
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /tissue_type="placenta"
                     /clone_lib="pWe15 cosmid library"
     mRNA            4023..>4181
                     /gene="Il-10"
                     /evidence=experimental
```

gene 4023..4181
/gene="Il-10"
CDS 4051..>4181
/gene="Il-10"
/codon_start=1
/product="interleukin-10"
/protein_id="CAA55201.1"
/db_xref="GI:1177469"
/translation="MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDL
"

BASE COUNT 1181 a 1046 c 961 g 993 t
ORIGIN

```
   1 agatcttgta aactgtagaa tgcaccctcc aaaatctatt tgcataagca cacacacaca
  61 cacacacaca cacaccccag cagttcttgc ctgcccagat tcctctgcag ctaaagtgat
 121 gaaacttact gggcggagct tcctaaaaag attattaggg tctcctgggt tggtgtgcct
 181 ttaaaccttt ggactttacc acctcctatc tctcctatct ccttgcaaca aaggttagga
 241 gaacaagaat gcagaaaaaa cgggtcctgg atgacatctg agtgcctgct ttgggcttct
 301 tgatgagtga gacagaaaat aaaatacaac ccctctttt aaaagccatg cttactcagg
 361 ttttccttca tttgcagcta aatacagaaa tgagagaata ttttggagca gggatggaag
 421 aagagaggta ttcccttcc cacaaccttc tgatttccca gtacatcccc cactggaaaa
 481 attcatttaa aatcagtata ataagcattg attagatgcc tactatgcat ctgggcttga
 541 gggcaaactg gactcaggcc ttttggcctc aagaagctca cagtgtgaga gtggcatttg
 601 tgtcctcttg aaattcacag gactaaattg tgcccaggct gacattctat ccatccatag
 661 gtgcctgcct tctcacttcc ctctcttcat gggctcttgc cttgtaccaa aatccaaacc
 721 caaatctcct cacatgtgag tgttggcatt catgtctcag acatgaccta tgggcttggg
 781 acttttcccc gtggacccca gtgacttttc agatgaacag gtatcttcaa aaacttgaga
 841 aataggagtc ctgtttgttg ttcttgttgc tttgtcaata taaggcacag ggtctttatt
 901 caaatgttca tactatctct tgacagaaat actatgagac atattgatgg agaagccgtt
 961 atctccatat gctaaatgag gacttgcacc agggaacttg cccatggttc tctccaacca
1021 cttaaattct gaaattttga atgagagtgg acagtaattt caaatcaatg gggaaagaat
1081 caaatcttca gcaaatggct tgagataatt agctacacat ttcagaacaa ataaagaagt
1141 cagatccggg ccgggcacag tggctcatgc ctgtaatctc agcactctgg gaggccaagg
1201 cgggcggatc ataaggtcag gagatcgaga ccatcctggt taacacagtg aacccctctc
1261 taataaaaat acaaaaaaaa ataaaaaaac ttagccgggc gtggtgccag gcgcctgtag
1321 tcccagctac tcgggacgct gaggcaggag aatggcttga actcgggagg cagagcttgc
1381 aggtgagctg agatcatgcc actgcactcc agcctgggca acagagcgag actctgtctc
1441 aaaaaaaaaa aagaagtcag atcctaacct caaccctatt taacagatta tagatgaaag
1501 aaaggtacaa atggctttta catacctccc ttctccctga cattttgtat gtgtgtgtgt
1561 gtgtatttac acacacatct catataagga aattgaaggg aggctgcctg catccctgag
1621 tcactctccc tctccttctg aatgcttacc tgtgcccaga ccacctcctt agcctcgcac
1681 cctccaggct tacagggcac tcttctatgc ccatcccaag tatagctgaa ccttccaagg
1741 gccagacttg gtgctaagta ccaagtacgc aaagattaat aaaacaatgt cctgtttcag
1801 ggagctcaaa gctgattcgg cagggcatgg tgtgtacatg aatgataacc acgtagggtt
1861 gcaggtttcc tagtgaggta agcacaaggc aagatgggaa acaaaggaag gaggggttca
1921 cagcctcacc cagagtccag aacccctggc ctgcctggtg cccatgctga gtccacttct
1981 ggaacaccca gctcagagag ggggttagac ctgcaggcta acacagacac agcccagaaa
2041 acccaggagc cgaggggggaa ggagaaaggt gcaagaaggg gaaacccagg tcctggtccc
2101 cttctctctg cttcctggca gcagaactca gacagaaccc ttaagccagt ctaagtctgg
2161 caggaccagt aagttctgag ttagctccat actagtttct agcaggctct ttctcacttc
2221 ctgattctta ggtttctaca ttgacactcc ctgaagagtt gggaagagac accacagtcc
2281 cctgaccctg atccataggt cacacagcag gcatccacag ggtgggcgtg ggccctctca
2341 tccctccctc ccactcactt cacgctggct gggccccaag gtgtttgcac cccttgcagt
2401 gagtgacctt ctctagtgca gcaagctcag aacctgctgc cactggagtt gtcccattgc
2461 tgatgcagaa aggtgaagaa ctagcagaac actggaaatg ccctccatct gggtccatgg
2521 ctacttaatg ctccctggca ggcaggagga caggtgctat tccctgttgg gacagatgaa
2581 aaacagacac agggaggatg agtgatttgc cctgactata gagtggcagg gccaaggcag
2641 agcccaggcc tcctgcacct aggtcagtgt tcctcccagt tacagtctaa actggaatgc
2701 aggcaaagcc cctgtggaag gggaaggtga aggctcaatc aaaggatccc cagagacttt
2761 ccagatatct gaagaagtcc tgatgtcact gccccggtcc ttccccaggt agagcaacac
2821 tcctcgccgc aacccaactg gctcccctta ccttctacac acacacacac acacacacac
2881 acacacacac acacacacaa atccaagaca acactactaa ggcttctttg ggaaggggaa
2941 gtagggatag gtaagaggaa agtaagggac ctcctatcca gcctccatgg aatcctgact
3001 tcttttcctt gttatttcaa cttcttccac cccatctttt aaactttaga ctccagccac
3061 agaagcttac aactaaaaga aactctaagg ccaatttaat ccaaggtttc attctatgtg
3121 ctggagatgg tgtacagtag ggtgaggaaa ccaaattctc agttggcact ggtgtaccct
3181 tgtacaggtg atgtaacatc tctgtgcctc agtttgctca ctataaaata gagacggtag
3241 gggtcatggt gagcactacc tgactagcat ataagaagct ttcagcaagt gcagactact
3301 cttacccact tcccccaagc acagttgggg tgggggacag ctgaagaggt ggaaacatgt
3361 gcctgagaat cctaatgaaa tcggggtaaa ggagcctgga acacatcctg tgaccccgcc
3421 tgtcctgtag gaagccagtc tctggaaagt aaaatggaag ggctgcttgg gaactttgag
```

```
3481 gatatttagc ccacccccctc atttttactt ggggaaacta aggcccagag acctaaggtg
3541 actgcctaag ttagcaagga gaagtcttgg gtattcatcc caggttgggg ggacccaatt
3601 atttctcaat cccattgtat tctggaatgg gcaatttgtc cacgtcactg tgacctagga
3661 acacgcgaat gagaacccac agctgagggc ctctgcgcac agaacagctg ttctccccag
3721 gaaatcaact ttttttaatt gagaagctaa aaaattattc taagagaggt agcccatcct
3781 aaaaatagct gtaatgcaga agttcatgtt caaccaatca tttttgctta cgatgcaaaa
3841 attgaaaact aagtttatta gagaggttag agaaggagga gctctaagga gaaaaaatcc
3901 tgtgccggga aaccttgatt gtggcttttt aatgaatgaa gaggcctccc tgagcttaca
3961 atataaaagg gggacagaga ggtgaaggtc tacacatcag gggcttgctc ttgcaaaacc
4021 aaaccacaag acagacttgc aaaagaaggc atgcacagct cagcactgct ctgttgcctg
4081 gtcctcctga ctggggtgag ggccagccca ggccagggca cccagtctga gaacagctgc
4141 acccacttcc caggcaacct gcctaacatg cttcgagatc t
//
```

Restrictions on Use | Write to the HelpDesk
NCBI | NLM | NIH

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE
GRENOBLE
MÉDECINE - PHARMACIE

RESUME

L'étude des interactions hôte-virus contribue à une meilleure compréhension du fonctionnement du système immunitaire et de sa régulation. Dans un contexte de latence, le génome viral est maintenu dans les cellules infectées grâce à une expression antigénique limitée. Nombreux sont les virus qui ont développé différentes stratégies pour échapper au système immunitaire de l'hôte : on parlera alors d'immunosubversion virale. Le virus d'Epstein-Barr (EBV) a été le premier à être associé à des cancers humains. 90% de la population est infectée et il semble que cette "cohabitation" ait favorisé, tout au long de l'évolution humaine, une capture de certains gènes cellulaires par le virus. L'EBV s'est ainsi "armé" de protéines virales, homologues ou non aux protéines humaines, afin de moduler le système immunitaire de l'hôte. Ainsi, le virus est capable de bloquer les effets antiviraux de l'IFN, de limiter l'apoptose des cellules infectées, ou encore de bloquer la présentation d'antigènes aux cellules effectrices de la réponse immunitaire. Les pathologies associées à l'EBV, dans un contexte d'immunodépression ou d'immunocompétence, résultent d'un déséquilibre dans l'interaction hôte-virus. La détection d'interleukine-10 chez les patients présentant un lymphome post-transplantation, un lymphome de Burkitt ou encore un lymphome non hodgkinien a révélé une nouvelle stratégie du virus visant à favoriser sa dissémination : le virus possède une protéine homologue à l'interleukine-10 humaine (hIL-10), nommée vIL-10, synthétisée au cours de la phase productive de virions. Cette vIL-10, qui possède les mêmes propriétés que l'hIL-10 , exerce cependant des effets 3 à 10 fois plus faibles. L'infection de lymphocytes B par EBV entraîne une augmentation de l'hIL-10. Cette cytokine favorise d'une part la croissance et la prolifération des lymphocytes B et induit d'autre part une immunosuppression visant les monocytes/macrophages et les lymphocytes T. La protéine LMP-1 induirait le gène de l'hIL-10 au cours de la phase de latence du virus. Lors de la réactivation virale, l'expression de ZEBRA est associée à l'augmentation de la sécrétion d'hIL-10 par une lignée lymphocytaire B. Au vu des propriétés transactivatrices de ZEBRA sur des gènes viraux et cellulaires nous avons suggéré que ZEBRA est capable d'induire l'hIL-10. Nous avons donc étudié l'action de ZEBRA sur les différentes étapes de la production de l'hIL-10 en analysant son effet sur l'activité du promoteur de l'hIL-10 (pIL-10) en expression transitoire dans des lignées lymphocytaires B, sur la sécrétion d'hIL-10 et sur le taux d'ARNm hIL-10 dans ces mêmes lignées. Nous montrons que la protéine ZEBRA active ces trois étapes, qu'elle soit surexprimée dans les cellules (endogène) ou ajoutée dans le milieu de culture (exogène) ; ce dernier point impliquerait un passage transmembranaire de ZEBRA, ce qui reste à démontrer. Une application clinique peut être envisagée : une protéine ZEBRA recombinante (complète ou partielle) augmente, *in vitro*, la production d'hIL-10 qui peut être ensuite utilisée en thérapeutique. En effet, les propriétés immunosuppressives de l'hIL-10 peuvent être mises à profit pour induire une tolérance post-greffe ; par ailleurs, les propriétés anti-inflammatoires de la cytokine peuvent être exploitées dans la prévention de pathologies cardiovasculaires. D'autres modulateurs de l'expression de l'IL-10 ont été identifiés : parmi ceux-ci, la tétracycline augmente l'expression du gène entre 10 et 1600%. Nous montrons ainsi comment une stratégie virale visant la modulation du système immunitaire peut être détournée à des fins thérapeutiques.