



HAL
open science

Inhibition du cycle lytique du Virus Epstein-Barr par ARN interférence

Sylvie Larrat

► **To cite this version:**

Sylvie Larrat. Inhibition du cycle lytique du Virus Epstein-Barr par ARN interférence. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2010. Français. NNT : . tel-00502326

HAL Id: tel-00502326

<https://theses.hal.science/tel-00502326v1>

Submitted on 13 Jul 2010

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

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

UNIVERSITE DE GRENOBLE
Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant (EDCSV)
Spécialité : Virologie Microbiologie Immunologie

Pour l'obtention
Du GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

**Inhibition du cycle lytique du Virus
Epstein-Barr par ARN interférence**

Présentée par
Sylvie LARRAT

Soutenue publiquement le 18 mai 2010

Directeur de thèse : Professeur Patrice Morand
Co-directeur de thèse : Docteur Raphael Germe

Jury :

Docteur Corinne Amiel (Paris), rapporteur
Docteur Raphael Germe (Grenoble), examinateur
Docteur Henri Gruffat (Lyon), rapporteur
Professeur Patrice Morand (Grenoble), examinateur
Professeur Hélène Peigue-Lafeuille (Clermont Ferrand), présidente du jury
Professeur Bertrand Toussaint (Grenoble), examinateur

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	5
PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS ASSOCIEES	7
RESUME.....	8
ABSTRACT.....	9
LISTE DES FIGURES & TABLEAUX.....	10
LISTE DES ABREVIATIONS	12
INTRODUCTION GENERALE	14
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	16
I-Biologie du virus Epstein Barr et implication de la réplication virale dans les pathologies associées à EBV.....	17
1-Structure du virus	17
2-Le génome de l'EBV	18
3-Les protéines virales :.....	19
3-1- Protéines de latence.....	20
3-2- Protéines du cycle lytique	22
4-Cycle viral	22
4-1- Entrée du virus dans la cellule hôte.....	22
4-2- Etablissement d'une infection latente	25
4-3- Persistance virale.....	26
4-4- Réplication virale.....	27
5-Rôle de la réplication virale dans les principales pathologies associées à EBV	34
5-1- Primo-infection, mononucléose infectieuse.....	35
5-2- Le Carcinome du cavum (CC)	39
5-3- Le Lymphome de Burkitt.....	41
5-4- Le Lymphome de Hodgkin	46
5-5-Syndrome lymphoprolifératif post-transplantation (SLPT)	50
6-Traitements antiviraux des pathologies associées au virus Epstein Barr	53
II-La protéase du virus Epstein Barr	57
1-Du gène à la structure.....	58
2-De la structure à la fonction.....	64
2-1- La protéolyse	64
2-2- Rôle fonctionnel	66
3-Inhibiteurs des protéases des herpesvirus.....	68
3-1- Inhibiteurs généraux des sérine-protéases	69
3-2- Les inhibiteurs peptidiques.....	69
3-3- Les « peptidyl activated carbonyl inhibitors ».....	70
III-ARN interférence dans le traitement des virus associés à des cancers.....	71
1-Historique de la découverte de l'ARN Interférence	71
2-Mécanisme de l'ARN interférence dans une cellule de mammifère	73
3-Fonctions naturelles de l'ARN interférence	77
4-ARN interférence et infections virales localisées	78
5-ARN interférence et infections virales associées à des cancers	81
5-1-Papillomavirus humain (HPV)	82
5-2- Hépatite C.....	83
5-3- Hépatite B.....	84
5-4- Human T-cell leukemia virus (HTLV)	89
5-5- Herpes virus humain de type 8 (HHV8)	89
6- ARN interférence et Epstein Barr Virus.....	90

6-1- EBV et l'ARN interférence : un déséquilibre naturel ?	90
6-2- L'ARN interférence : un outil pour mieux comprendre les interactions entre EBV et les protéines cellulaires	93
6-3- L'ARN interférence comme traitement des maladies associées à EBV	96
6-4-Utilisation d'EBV comme vecteur pour de l'ARN interférence thérapeutique	100
PARTIE EXPERIMENTALE	103
I-MATERIEL & METHODES	104
1-Matériel	104
1-1-Lignées cellulaires	104
1-2-Echantillons cliniques	107
1-3-siRNAs	107
1-4-Fabrication de short hairpin RNA (shRNA) anti-protéase EBV	108
1-5-Fabrication de particules rétrovirales GFP positives	111
2-Méthodes	113
2-1-Séquençage et sous-typage	113
2-2-Essais d'inhibition	113
2-3-Quantification des particules virales infectieuses	115
2-4-Western Blot	116
2-5-Immunofluorescence	116
2-6-PCR et RT-PCR quantitatives en temps réel	117
II-RESULTATS	120
1-Expression des ARNm Protéase dans les cancers associés à EBV	120
2-Caractérisation de la cible protéase	121
3-Optimisation des conditions expérimentales d'inhibition par les siRNA	123
3-1-Choix du réactif de transfection	123
3-2-Induction du cycle lytique viral	125
3-3-Test de différents protocoles d'administration des siRNA	129
4-Inhibition de la réplication virale de l'EBV par les siRNA anti-protéase	130
4-1-Effet inhibiteur du mélange des 4 siRNA anti-protéase « siPR »	130
4-2-Inhibition obtenue avec chaque siRNA anti-protéase pris individuellement	133
4-3- Inhibition dose-dépendante du siRNA PR1	134
4-4- Effet du siRNA anti-protéase PR1 sur la synthèse d'ADN viral	136
4-5- Comparaison de l'inhibition de la réplication virale obtenue avec le siRNA PR1 et celle des antiviraux anti-herpesvirus traditionnels	137
4-6- Evaluation de shRNAs anti-protéase construits sur le modèle des siRNA anti-protéase n°1 et 2	140
5-Inhibition de la réplication de l'EBV par une association de siRNA dirigés contre le cycle lytique	141
5-1- Inhibition de la réplication de l'EBV par 6 siRNA anti-gp350	141
5-2- Inhibition de la réplication de l'EBV par un siRNA anti-ZEBRA	143
5-3- Inhibition de la réplication de l'EBV par le mélange des siRNA dirigés contre la gp350, ZEBRA et la protéase	144
6-Expériences préliminaires : infection d'un lymphocyte B EBV positif par des particules rétrovirales	147
6-1- Estimation de l'expression du cycle répliatif viral dans des lignées lymphocytaires B	147
6-2- Estimation de l'expression, par des lignées lymphocytaires B EBV positives, d'un plasmide test exprimant la GFP transmis par infection rétrovirale	149
III DISCUSSION	151
BIBLIOGRAPHIE	157
ANNEXES	185

REMERCIEMENTS

Un grand MERCI...

-à ma co-directrice de thèse, R. Germe sans qui rien de tout ça n'aurait pu être possible. Elle est l'instigatrice de ce projet et m'a plus qu'aidée dans la mise au point et la réalisation des expériences ainsi que dans leur interprétation. Elle a également grandement participé à l'écriture de l'article issu de ce travail ainsi qu'à la rédaction de ce document. Si le courant a été un peu difficile à établir au démarrage, la collaboration a été fructueuse et j'espère qu'elle ne s'arrêtera pas là...

-à P. Morand qui a encadré ce travail. Il m'a encouragée dans mes nombreux moments de doutes et je le remercie de m'avoir soutenue et guidée lors de ma candidature au poste de MCU-PH en Virologie. Je lui dois une grande partie de ma formation en Virologie Médicale et la tâche est encore longue !

-à J.M. Seigneurin pour m'avoir accueillie dès 2001 comme interne dans son service et m'avoir poussée à réaliser ce travail de doctorat sur ce virus trop méconnu qu'est l'EBV.

-à A. Signori-Schmuck, B. Gratacap-Cavallier, N. Dutertre, C. Morel-Baccard et M. Baccard-Longère pour m'avoir formée au diagnostic virologique et pour les échanges que nous avons au quotidien au sein du laboratoire de Virologie du CHU de Grenoble

-à J. Lupo pour avoir été le meilleur des co-internes et pour m'avoir beaucoup aidée au laboratoire afin de me dégager du temps pour la rédaction de ce travail.

-à Y. Rechoum pour l'assistance technique à la mise en forme de ce document

-à L. Grossi qui m'a été d'une grande assistance technique pour la réalisation de la plupart des expériences décrites ici et également un grand merci pour sa bonne humeur communicative et que peu de choses peuvent altérer

-à S. Nicod pour son amitié, son soutien dans les moments difficiles et ses compétences en séquençage

-à J. Guimet pour m'avoir initié aux mystères de la culture cellulaire

-à M.J. Bourgeat pour son expertise en culture cellulaire et ses remarques pleines de bon sens

- à tous les techniciens et cadres du laboratoire de Virologie avec qui j'ai plaisir à travailler au quotidien

-à V. Boyer qui, grâce à son expertise en biologie cellulaire, m'a beaucoup aidée pour le clonage des siRNA et la production de particules rétrovirales. La collaboration ayant été très agréable et intéressante, j'espère également qu'elle se poursuivra.

-à S. Vigne et J.M. Crance pour leur aide lors de la mise au point des expériences d'ARN interférence et parce qu'il a été particulièrement intéressant et formateur d'échanger avec eux à propos des résultats obtenus

-à H. Gruffat et E. Manet qui m'ont fourni le plasmide dans lequel ont été clonés les shRNA et parce qu'il a été également très intéressant de discuter avec eux de nos expériences au vu de leur grande expertise sur EBV

-à D. Nègre qui nous a fourni les cellules 293T et les plasmides nécessaires à la fabrication des particules rétrovirales

-à W. Hammerschmidt qui nous a fourni les cellules 293/EBV-GFP utilisées dans ce travail

-à A. Bas, qui a réalisé un M2R sur ce sujet, pour son efficacité et sa disponibilité.

-à D. Maubon et F. Solly pour leur amitié et les intenses moments de partage de la difficile condition d'AHU...

Egalement MERCI à

-à mon conjoint, Alban Caporossi, pour m'avoir supportée et pour m'avoir réinstallé mon ordinateur portable à des moments critiques de la rédaction de ce manuscrit

-à mon fils, Maxime, qui n'a absolument rien fait pour participer à la rédaction de ce manuscrit mais qui est là et ça suffit...

-à mes parents, Monique et Jean-Claude Larrat, pour leur soutien. Merci tout particulièrement à ma mère, professeur de lettres, pour avoir corrigé plus vite que son ombre l'orthographe de ce document...

-à ma sœur, Viviane Larrat, pour son soutien et pour son assistance technique à la rédaction de ce manuscrit

PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS ASSOCIEES

PUBLICATIONS:

Larrat S, Morand P, Bas A, Vigne S, Crance JM, Boyer V, Nicod S, Grossi L, Buisson M, Burmeister WP, Seigneurin JM, Germe R. "Inhibition of Epstein-Barr virus replication by small interfering RNA targeting the Epstein-Barr virus protease gene." *Antiviral Therapy*, **2009**;14(5):655-62.

Larrat S, Germe R, Baganizi D, Grossi L, Cleret A, Morand P. "Comparative efficiency of anti-protease siRNA and anti-DNA polymerase drugs in EBV replication inhibition". Manuscrit en préparation.

S. Vigne, R. Germe, S. Duraffour, **S. Larrat**, G. Andrei, R. Snoeck, D. Garin & J.M. Crance. "Specific inhibition of orthopoxviruses replication by a small interfering RNA targeting the *D5R* gene", *Antiviral Therapy*. **2008**;13(3):357-68.

COMMUNICATIONS AFFICHEES:

The Epstein-Barr Virus protease: sequence variability, mRNA expression and inhibition by small interfering RNA. **S. Larrat**, P. Morand, A. Bas, S. Vigne, JM. Crance, V. Boyer, S. Nicod, L. Grossi, M. Buisson, W. Burmeister, JM. Seigneurin, R. Germe. EBV Symposium, Guangzhou, China, **2008**.

Three Dimensional Structure of the Epstein-Barr Virus Capsid. R. Germe, P. Morand, **S. Larrat**, G. Guy, R. Ruigrok, G. Schoehn. EBV Symposium, Guangzhou, China, **2008**.

Etude *in vitro* de l'effet de siRNA dirigés contre la protéase de l'Epstein Barr Virus. **S. Larrat**, R. Germe, A. Bas, S. Vigne, J. Guimet, S. Nicod, JM. Crance, JM. Seigneurin et P. Morand. IX^{èmes} journées Francophones de Virologie, Paris, **2007**.

Etude *in vitro* de l'effet de siRNA dirigés contre la protéase de l'Epstein Barr Virus. **S. Larrat**, R. Germe, A. Bas, S. Vigne, J. Guimet, S. Nicod, JM. Crance, JM. Seigneurin et P. Morand. Journées de la recherche médicale, Grenoble, **2007**.

Inhibition de la réplication de plusieurs orthopoxvirus pathogènes par le phénomène d'ARN interférence. S. Vigne, R. Germe, S. Duraffour, **S. Larrat**, G. Andrei, R. Snoeck, D. Garin and J.M. Crance, IX^{èmes} journées francophones de virologie, 26-27 avril **2007**, Paris.

Effet antiviral de deux siRNAs ciblant les gènes D5R et B1R du complexe de réplication des orthopoxvirus. S. Vigne, R. Germe, S. Duraffour, **S. Larrat**, G. Andrei, R. Snoeck, D. Garin and J.M. Crance. X^{èmes} journées francophones de virologie, 27-28 mars **2008**, Paris.

Anti-orthopoxviral potency of small interfering RNA targeting two genes of the vaccinia virus replication complex. S. Vigne, R. Germe, S. Duraffour, **S. Larrat**, G. Andrei, R. Snoeck, D. Garin and J.M. Crance. 18th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), 18-22 avril **2008**, Barcelone.

Anti-orthopoxviral potency of small interfering RNAs targeting three genes of the vaccinia virus. S. Vigne, R. Germe, S. Duraffour, **S. Larrat**, G. Andrei, R. Snoeck, D. Garin and J.M. Crance. XVIIth International Poxvirus and Iridovirus Conference, 7-12 juin **2008**, Munich, Allemagne.

RESUME

Le cycle lytique de l'EBV joue un rôle important dans les pathologies associées à ce virus. Participant à la fabrication de la capsid virale, la protéase (PR) est essentielle à la production de virions infectieux. Elle représente ainsi une cible de choix pour une stratégie thérapeutique visant à inhiber la réplication virale.

Dans ce travail, l'efficacité thérapeutique de siRNA ciblant EBV-PR a été évaluée sur des cellules épithéliales 293 transfectées avec le génome d'EBV B95-8. La diminution de l'ARNm PR a été mesurée par RT-PCR quantitative, la quantité de protéine exprimée, par Western blot, et le nombre de particules virales infectieuses produites, par sur-infection de cellules Raji. L'efficacité du meilleur siRNA anti-PR a été comparée à celle de drogues anti-ADN polymérase anti-CMV puis évaluée en combinaison avec des siRNA ciblant d'autres protéines du cycle lytique d'EBV.

Les siRNA anti-PR testés ici permettent d'obtenir une diminution de 70% de l'ARNm PR, de 35% de la protéine et de 95% du nombre de particules virales infectieuses. Comparés aux anti-ADN polymérase, seul le siRNA anti-PR permet d'obtenir une diminution significative de nombre de particules virales infectieuses et son association au ganciclovir permet encore d'augmenter cette efficacité ($p < 0,05$). De même, l'association avec des siRNA ciblant d'autres protéines du cycle lytique permet d'améliorer l'inhibition de la production de particules virales infectieuses.

L'ARNi ciblant EBV-PR semble une piste thérapeutique intéressante, éventuellement en association aux thérapeutiques conventionnelles et/ou avec d'autres siRNA anti-EBV, pour limiter la réplication virale dans les pathologies associées à EBV.

MOTS CLES

Virus Epstein-Barr, ARN interférence, protéase, cycle lytique

ABSTRACT

The lytic cycle of EBV plays an important role in pathologies associated with this virus. Involved in manufacturing of the viral capsid, protease (PR) is essential for infectious virions production. It represents thereby a prime target for a therapeutic strategy to inhibit viral replication.

In this work, the therapeutic efficiency of siRNA targeting EBV-PR was tested on 293 epithelial cells transfected with EBV B95-8 genome. The decrease of PR mRNA was measured by quantitative RT-PCR, the amount of expressed protein by Western blot, and the number of produced infectious viral particles by super-infection of Raji cells. The efficiency of the best siRNA anti-PR was compared to that of anti-DNA polymerase anti-CMV drug and then assessed in combination with siRNA targeting other lytic cycle proteins of EBV.

The anti-PR siRNA tested here allow getting a 70% decrease of PR mRNA, 35% of protein and 95% of infectious viral particles number. Compared to anti-DNA polymerase, only the siRNA anti-PR enables a significant reduction of infectious viral particles number and its association with ganciclovir increases even more its effectiveness ($p < 0.05$). Similarly, the association with siRNA targeting other lytic cycle proteins allows raising the inhibition of infectious viral particles production.

RNAi targeting EBV-PR seems an interesting therapeutic way, possibly in combination with conventional therapeutics and / or with other siRNA anti-EBV, to limit viral replication in EBV associated diseases.

ENGLISH TITLE

Epstein-Barr Virus Lytic Cycle Inhibition using RNA interference

KEY WORDS

Epstein-Barr Virus, RNA interference, protease, lytic cycle

LISTE DES FIGURES & TABLEAUX

Figures

Figure 1 : Structure du virus EBV en microscopie électronique (coloration négative).	18
Figure 2 : Infection par EBV d'une cellule B.	24
Figure 3 : Modèle d'infection de l'épithélium muqueux par EBV.	24
Figure 4 : Schématisation de la façon dont EBV utilise la biologie des cellules B afin d'établir et de maintenir son infection dans le compartiment mémoire.	26
Figure 5 : Modélisation de la façon dont EBV utilise la biologie d'un lymphocyte B pour se répliquer et libérer des virions infectieux dans la salive.	32
Figure 6 : Modèle d'infection EBV <i>in vivo</i> adapté de Faulkner et al. (Faulkner et al., 2000).	37
Figure 7 : 3 grands lymphocytes T CD8+ activés (lymphocytes atypiques) dans le sang périphérique d'un patient atteint de MNI (coloration wright-giemsa; objectif: 400x).	38
Figure 8 : Lymphomes associés à EBV : stade de différenciation lymphocytaire et virale.	42
Figure 9 : Cytologie d'un lymphome de Burkitt (Kutok and Wang, 2006)	43
Figure 10 : Hypothèses pour expliquer le rôle de l'infection EBV dans la formation des LB (Kutok and Wang, 2006)	45
Figure 11 : Histologie d'un lymphome de Hodgkin.	47
Figure 12 : Hypothèses sur le rôle de l'EBV dans la formation des lymphomes de Hodgkin D'après (Kutok and Wang, 2006)	49
Figure 13 : Traitement par injections intra-tumorales de cidofovir de CC xénotreffés chez des souris athymiques.	55
Figure 14 : Représentation schématique des produits des gènes BVRF2 et BdrF1 (Donaghy and Jupp, 1995).	59
Figure 15 : Conservation des sites de clivages de relargage (R) et de maturation (M) parmi la famille des herpesviridae.	59
Figure 16 : Structure cristallographique du domaine dimérique de la protéase d'EBV (Buisson et al., 2002).	61
Figure 17 : Alignement des séquences en acides aminés des protéases des herpesvirus humains (Buisson et al., 2002).	62
Figure 18 : Hypothèse d'activation de la protéase (Buisson et al., 2002).	63
Figure 19 adaptée de (Lazic et al., 2007): Modèle pour la régulation allostérique des protéases des herpesvirus.	64
Figure 20 : Le site actif de la protéase d'EBV (Buisson et al., 2002).	65
Figure 21 : Mécanisme catalytique général des sérine-protéases (Leung et al., 2000).	66
Figure 22 : Représentation schématique de la formation de la capsid e d'EBV et du rôle de la protéase.	68
Figure 23 : Découverte de l'ARN interférence.	72
Figure 24 : Schéma des voies d'ARN interférence endogènes d'après Ma et al. (Ma et al., 2007).	75
Figure 25 : Voies exogènes pour provoquer un phénomène d'ARN interférence d'après Chen et al. (Chen et al., 2008)	76
Figure 26 : Représentation schématique des différents ARN messagers (ARNm) transcrits à partir du génome du VHB. adaptée de Chen et al. (Chen et al., 2008)	85
Figure 27 : Modélisation des interactions virus-cellule hôte dans l'oncogénèse viro-induite et place de l'ARNi d'après Scaria et al. (Scaria and Jadhav, 2007).	90
Figure 28 : Emplacement des miRNA de EBV (extrait de (Kim do et al., 2007)).	91
Figure 29 : Figure extraite de Hettich et al. (Hettich et al., 2006).	101
Figure 30 : Conception des cellules 293 EBV/GFP. Figure adaptée de (Delecluse et al., 1999).	106
Figure 31 : Exemple de fabrication d'un « short hairpin RNA »	110
Figure 32 : Schéma du protocole expérimental	115
Figure 33 : Variabilité de la séquence en acides aminés de la protéase EBV.	122
Figure 34 : Comparaison des réactifs pour la transfection de cellules 293/EBV-GFP avec des siRNA anti-MAPK1 (100nM).	124
Figure 35 : Comparaison de la lipofectamine (LPF : 1,5µl/puits) et du JetSi ENDO (JetSi : 1µl/puits) pour la co-transfection des plasmides inducteurs et des siRNA anti-protéase.	125
Figure 36 : Optimisation de la concentration de plasmides inducteurs.	128
Figure 37 : Cinétique du taux d'ARNm protéase post-induction.	128
Figure 38 : Inhibition de l'ARNm protéase obtenus avec différents protocoles mimant une administration prophylactique des siRNA avant induction.	129

Figure 39 : Inhibition de l'ARNm protéase par un mélange de 4 si RNA anti-protéase (siPR)	131
Figure 40 : Inhibition de la protéase d'EBV par un mélange de 4 si RNA anti-protéase (siPR).	132
Figure 41 : Inhibition du titre viral infectieux par un mélange de 4 siRNA anti-protéase (100nM).	133
Figure 42 : Inhibition de l'ARNm protéase par chaque siRNA anti-protéase (100 nM) pris séparément.	134
Figure 43 : Effet dose-dépendant du siRNA anti-protéase PR1.	135
Figure 44 : Comparaison de l'inhibition de la réplication virale obtenue avec le siRNA PR1 et celle des antiviraux anti-herpesvirus traditionnels	139
Figure 45 : Séquence des clones shRNA.	140
Figure 46 : Inhibition de l'ARNm gp350 par 6 siRNA anti-gp350 siGP1, siGP2, siGP3, siGP4, siGP5 et siGP6.	142
Figure 47 : Inhibition de la fabrication de virions infectieux par les siRNA siGP5 et siGP6.	142
Figure 48 : Inhibition de l'ARNm ZEBRA (A) et de la fabrication de virions infectieux (B) par siRNA anti ZEBRA (siZB).	144
Figure 49 : Comparaison de l'effet des 3 siRNA anti-Protéase, anti-gp350 et anti-ZEBRA et de leur association.	146
Figure 50 : Quantification par cytométrie de flux des antigènes de capsid (VCA) dans des cellules Akata 72h00 après induction par des Immunoglobulines.	148
Figure 51 : Evolution du taux de cellules Akata fluorescentes après infection par des particules rétrovirales exprimant la GFP et sélection par la puromycine (0,5µg/ml) pendant 45 jours.	150

TABLEAUX

Tableau 1 : Gènes de l'infection latente par EBV :	20
Tableau 2 : Profils d'infection latente des cellules infectées par l'EBV	22
Tableau 3 : Principales maladies associées à EBV.	35
Tableau 4 : Pourcentage d'homologies entre les séquences en acides aminés des protéases des herpesvirus.....	58
Tableau 5 : Constantes d'inhibition de différents composés sur la protéase d'EBV.	70
Tableau 6 : Etudes in vivo d'ARN interférence anti-VHB	87
Tableau 7 : siRNAs anti-EBV utilisés dans le but d'élucider des interactions entre le virus et ces cellules hôtes.	94
Tableau 8 : Séquence des oligonucléotides synthétisés pour fabriquer les shRNAs	109
Tableau 9 : Séquences des amorces et sondes utilisées pour les RT-PCR quantitatives temps réel	119
Tableau 10 : RT-PCR quantitative de l'ARNm Protéase EBV, de l'ARNm gp350/220, de l'ARNm Zebra et charges virales EBV dans des biopsies de cancers associés à EBV.	121
Tableau 11: Quantification par PCR de l'ADN intra et extra-cellulaire après inhibition par le siRNA anti-protéase PR1.	136
Tableau 12 : Quantification par PCR et RT-PCR de l'ADN viral intra (IC), extracellulaire (EC) et de l'ARNm protéase après induction de cellules Akata par des immunoglobulines (0,2% (v/v)).	148
Tableau 13 : Pourcentage d'infection des lignées cellulaires B par des particules rétrovirales GFP positives mesuré au cytomètre de flux.	149

LISTE DES ABREVIATIONS

AAV : Virus associé aux adénovirus (Adenovirus-Associated Virus)
ADN : Acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
ARNi :ARN interférence
ARNm :ARN messenger
CDV : cidofovir
CMV : Cytomegalovirus
CC : carcinome Indifférencié du Cavum
DFP: diisopropylfluorophosphate
EA : Early Antigen
EBERs : Epstein-Barr Encoded small RNAs
EBNAs : protéines nucléaires
EBV : Epstein-Barr virus
GCV : ganciclovir
GFP : green fluorescent protein
HHV-8 : herpesvirus humain de type 8
HPV Papillomavirus humain (Human Papillomavirus)
HSV : Herpes Simplex Virus
HTLV : Human T-cell leukemia virus
IR (Internal Repeats) : répétitions internes
JEV : virus de l'encéphalite japonaise
KDa : kilodalton
LANA : latency-associated nuclear antigen
LB : lymphome de Burkitt
LCL : lignées lymphoblastoïdes
LHc : lymphome de Hodgkin classique
LMPs : protéines membranaires
Long Terminal Repeat (LTR)
miRNA : micro ARN
MNI : mononucléose infectieuse
MMLV: Moloney Murine Leukemia Virus
MSCV: Murine Embryonic Stem Cell virus
Nt : nucléotide
NK : natural killer
OMS: organisation mondiale de la santé
ORF : Open Reading Frame
Ori-Lyt : origine de réplication lytique
Ori-P : origine de réplication plasmidique
Pb : paires de bases
PBS : tampon phosphate
PCR : Polymerase Chain Reaction
PK : Protein Kinase
RISC: RNA induced silencing complex
RS : Reed Sternberg
RT-PCR : reverse transcriptase Polymerase Chain Reaction
SCID: severe combined immunodeficiency
shRNA small haipin RNA
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
siRNA: Petits ARN interférents (Small interfering RNA)
SLAM : signaling lymphocyte activation molecule

SLPT : Syndrome lymphoprolifératif post-transplantation
TGS : transcriptional gene silencing
TK : Thymidine Kinase
TR (Terminal Repeats) : répétitions terminales
UL (Unique Long) : unique long
US (Unique Short) : unique court
VCA : Viral Capsid Antigen
VHB Virus de l'hépatite B
VHC Virus de l'hépatite C
VIH : virus de l'immunodéficience humaine
VRS Virus respiratoire syncytial (Respiratory Syncytial Virus)
VSV-G: Vesicular Stomatitis Virus
VZV : Varicella Zoster Virus
WB : Western Blot
WNV : virus West Nile

INTRODUCTION GENERALE

Le virus Epstein Barr est un *herpesviridae* à fort potentiel oncogène. Agent causal de la mononucléose infectieuse, il est fréquemment associé à des pathologies cancéreuses comme le carcinome indifférencié du cavum ou de nombreux lymphomes, essentiellement B, comme le lymphome de Burkitt ou le syndrome lymphoprolifératif post-transplantation. Le rôle du virus dans le déclenchement et l'extension de ces tumeurs reste mal connu, cependant son existence à l'état clonal dans la plupart des cellules cancéreuses laisse penser que sa présence est loin d'être fortuite. Comme tous les *herpesviridae*, le virus EBV peut exister sous 2 formes : une forme latente qui permet sa persistance dans l'organisme et une forme lytique qui assure sa réplication. L'équilibre entre ces deux états est un paramètre fondamental de la biologie du virus mais les mécanismes en sont encore mal maîtrisés. De plus, aucun anti-viral disponible à ce jour n'est réellement efficace en prévention ou en traitement de ces pathologies.

L'objectif de ce travail de thèse a été d'étudier une nouvelle voie thérapeutique : l'ARN interférence, pour inhiber le cycle répliatif de l'EBV. Le premier chapitre de ce manuscrit est une revue bibliographique divisée en trois grandes parties. La première partie concerne la biologie du virus Epstein Barr, plus particulièrement centrée sur son cycle lytique et l'impact de cette réplication virale dans les pathologies associées à EBV. La deuxième partie se focalise sur une des protéines fondamentales de la réplication virale : la protéase d'EBV : sa structure et son rôle fonctionnel dans la fabrication de nouveaux virions. La dernière partie détaille le phénomène d'ARN interférence et s'intéresse à son utilisation thérapeutique dans les virus associés à des cancers.

Le deuxième chapitre est consacré aux résultats expérimentaux et comporte également trois parties. La première détaille le matériel et les méthodes utilisées. La deuxième présente les résultats obtenus en commençant par les expérimentations préliminaires qui ont été nécessaires à

la mise en place du projet : caractérisation de la cible et mise au point des conditions expérimentales. Puis sont détaillés les résultats d'inhibition du cycle lytique d'EBV par des siRNAs anti-protéase sur un modèle de cellule épithéliale infectée par EBV, ainsi que les résultats obtenus en associant ces siRNAs avec d'autres siRNAs inhibant d'autres protéines du cycle lytique. Enfin, sont présentés les résultats des expériences préliminaires visant à tester la stratégie d'ARN interférence anti-EBV dans un modèle lymphocytaire B. La troisième partie est une discussion sur l'apport des résultats présentés dans ce travail par rapport à ce qui est actuellement connu.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Le virus d'Epstein-Barr est un herpesvirus humain de la famille des *herpesviridae* (Herpesvirus humain type 4), sous-famille des *gammaherpesvirinae*, genre lymphocryptovirus. Il est le premier virus humain à avoir été associé à un cancer et a d'ailleurs été découvert par ce biais. En effet, Denis Burkitt, chirurgien britannique travaillant en Afrique équatoriale, a décrit pour la première fois, au début des années 60, ce lymphome B agressif qui depuis porte son nom (Burkitt, 1962a; Burkitt and O'Conor, 1961). Sur la base de la distribution climatique et géographique de ce lymphome, Burkitt a longtemps suspecté une étiologie environnementale ou infectieuse mais n'a pas réussi à en identifier l'agent (Burkitt, 1962b; Burkitt and Wright, 1966). Ce seront donc Anthony Epstein, Yvonne Barr et Bert Achong, qui en 1964, arriveront à cultiver des cellules B issues de ces lymphomes de Burkitt et à identifier, dans ces cellules, par microscopie électronique, un nouvel herpesvirus qui prendra par la suite leurs noms (Epstein et al., 1964; Epstein and Barr, 1964).

I-Biologie du virus Epstein Barr et implication de la réplication virale dans les pathologies associées à EBV

1-Structure du virus

La structure générale de l'EBV (Figure 1) est celle des herpesvirus. De l'intérieur vers l'extérieur, un nucléoïde, une capsid, un tégument et une enveloppe. Le nucléoïde est constitué d'un ADN bicaténaire, linéaire, enroulé autour d'une structure protéique. Composée de 162 capsomères, la capsid icosaédrique recouvrant le nucléoïde est elle-même entourée d'un ensemble fibrillaire asymétrique : le tégument. Enfin, l'enveloppe, issue des membranes nucléaires ou intracytoplasmiques, porte en surface une dizaine de glycoprotéines virales sous forme de spicules.

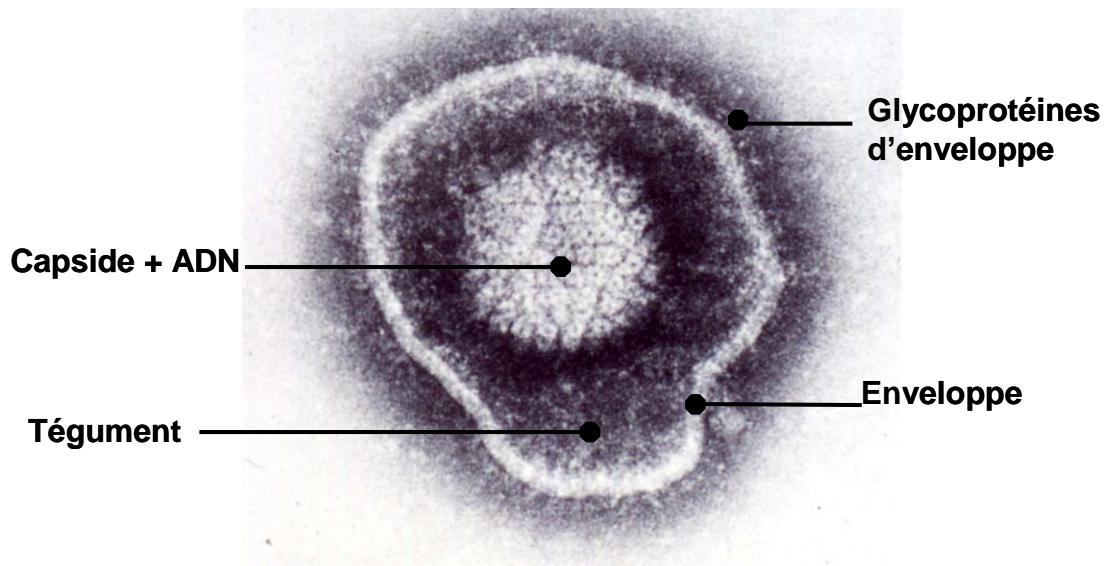


Figure 1 : Structure du virus EBV en microscopie électronique (coloration négative).
Cliché Centre International de Recherche sur le Cancer, J.M. Seigneurin

2-Le génome de l'EBV

Le génome de l'EBV se présente sous la forme d'un ADN double brin d'environ 172 kb. Il est constitué de deux domaines uniques : un domaine court de 15000 pb (US, short unique region), et un domaine long de 150000 pb (UL, long unique region). Ces deux domaines sont séparés par des séquences répétées en tandem de 3071 pb constituant la région répétée interne 1 (IR1, internal repeat 1). Dans le domaine UL, il existe trois autres séquences répétées internes, IR2, IR3 et IR4, qui divisent le domaine UL en quatre domaines uniques U1, U2, U3 et U4.

Le génome viral, sous forme linéaire dans la particule virale, est flanqué à ses deux extrémités de deux séquences répétitives (TR, terminal repeat) constituées suivant les souches de 4 à 12 répétitions en tandem d'une séquence de 550 pb. La circularisation du virus en épisode dans le noyau cellulaire se fait grâce à la fusion de ces deux TR ; c'est sous cette forme épisomale que le virus persiste dans la cellule de manière latente. Pendant la phase de latence, l'EBV se réplique de façon synchrone avec la cellule infectée lors de la phase S du cycle cellulaire, en utilisant l'origine de répllication latente : Ori-P. A proximité des régions IR2 et IR4, existent deux régions homologues nommées DR et DL, ayant la même orientation et composées de séquences répétitives. Ces séquences sont les deux origines de répllication lytique (*oriLyt*) de l'EBV.

L'analyse de la séquence des clones obtenus par digestions avec BamHI de la souche B95-8 a permis l'identification d'une centaine de cadres de lectures ouverts (*open reading frame ORF*) désignés par leur ordre dans le sens de transcription droite ou gauche (*leftward* ou *rightward*) au sein de chaque fragment de BamHI. Ainsi BARFI est le premier ORF du fragment Bam A dans le sens d'une transcription partant vers la droite.

Schématiquement, on distingue les gènes codant pour les protéines de latence et les gènes codant pour les protéines du cycle lytique. Les premières sont exprimées lors de l'infection dite latente, qui permet la persistance du virus dans la cellule, en absence de synthèse de nouvelles particules virales. Les protéines du cycle lytique sont principalement des protéines de structure et des enzymes de transcription et de réplication virale.

3-Les protéines virales :

Le virus EBV peut exécuter deux programmes distincts d'expression génique. Le premier, lytique ou productif, correspond à l'expression en cascade des différentes protéines virales permettant la fabrication de nouveaux virions. Le second, appelé latence, n'aboutit pas à la production de virus mais permet la persistance virale dans les lymphocytes B avec une expression d'antigène viraux réduite. L'ancienne distinction tranchée entre protéines de latence et protéines du cycle lytique a été récemment remise en cause par des études montrant que des gènes dits « lytiques » comme les homologues du facteur cellulaire anti-apoptotique Bcl-2, BHRF1 et BALF1 ou le transactivateur EB1/ZEBRA/Zta/Z étaient exprimés et probablement nécessaires à la mise en place de la latence sans pour autant qu'il y ait production de particules virales (Altmann and Hammerschmidt, 2005; Kalla et al., 2009). Pour des raisons de clarté, les protéines du virus Epstein-Barr sont présentées selon leur ancienne classification.

3-1- Protéines de latence

L'infection latente dans les cellules B immortalisées par EBV est associée avec l'expression de :

- 6 antigènes nucléaires ([Epstein Barr Nuclear Antigen] EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C et EBNA-LP [leader protein])
- 3 protéines de membrane ([latent membrane protein] LMP1, LMP2A et LMP2B)
- 2 petits ARN non polyadénylés codés par EBV (EBER1 et EBER2)
- Des transcrits de la région BamHI A (BARTs)

Le rôle de ces différentes protéines, transcrits et mi-RNA est résumé dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Gènes de l'infection latente par EBV :

Gènes associés à la latence	Fonction
EBNA1	-Relie le génome d'EBV aux chromosomes permettant ainsi le maintien de l'épisome viral via sa liaison à oriP (Lee et al., 1999; Lindner et al., 2008). -Pourrait inhiber l'apoptose dans les lymphomes de Burkitt (Kennedy et al., 2003) -Influence la transcription d'un certain nombre de gènes cellulaires : augmente l'expression de STAT1, diminue celle de TGFbeta1 (Wood et al., 2007) et viraux (Altmann et al., 2006) favorisant ainsi la tumorigénèse
EBNA2	-Transactivateur de plusieurs gènes viraux (LMP1 et LMP2A) et cellulaires (CD21, cFGR, c-myc, CD23) essentiels pour la transformation cellulaire (Boccellato et al., 2007; Cohen et al., 1989; Cordier et al., 1990; Wang et al., 1987). -Interagit avec le facteur de transcription RBP-JK pour promouvoir la conversion des lymphocytes B en cellules lymphoblastoïdes (Pegman et al., 2006; Yalamanchili et al., 1994).
EBNA3A, 3B, 3C	-EBNA3A et EBNA3C ont un rôle important dans la croissance des cellules lymphoblastoïdes et leur survie. Elles interagissent avec RBP-JK (Maruo et al., 2005; Maruo et al., 2006; Maruo et al., 2009). -EBNA3B ne semble pas essentielle pour l'infection latente (Tomkinson and Kieff, 1992) mais aurait peut être un rôle dans la réponse immunitaire (Gottschalk et al., 2001).
EBNA-LP	-Rôle clé dans la régulation positive de l'expression des gènes cellulaires importante pour la croissance des cellules B lymphoblastoïdes (Allan et al., 1992; Mannick et al., 1991) -Augmente la capacité de EBNA2 à transactiver LMP1 (Harada and Kieff, 1997; Nitsche et al., 1997; Peng et al., 2005)
LMP1	-Transformation cellulaire (Wang et al., 1985) -Mime le signal transmis par le CD40 (récepteur d'activation et de différenciation

	<p>des cellules B) (Kilger et al., 1998; Uchida et al., 1999) et active ainsi les voies NFkB qui favorisent la survie de la cellule (Mosialos et al., 1995).</p> <p>-Rôle cytotoxique en induisant une activation de CD95/Fas indépendante du ligand aboutissant à une apoptose (ambiguïté de LMP1 : survie cellulaire + mort programmée) (Le Cloennec et al., 2008).</p> <p>-Favorise la formation de lymphomes B chez la souris transgénique exprimant ce gène (Kulwichit et al., 1998).</p>
LMP2	<p>-Régulation de la réactivation via un effet négatif sur les protéines Tyrosine kinases (Miller et al., 1995) : diminue l'entrée en cycle lytique lors d'une stimulation antigénique en bloquant la transduction du signal (Rechsteiner et al., 2008).</p> <p>-Favorise la survie des cellules B qui n'expriment pas via l'activation des mêmes tyrosines kinases et ce même en l'absence de signal à travers le récepteur cellulaire (Merchant et al., 2001).</p>
EBER 1&2	<p>-Petits ARN non polyadénylés représentant les ARN les plus abondants dans les cellules avec une infection latente.</p> <p>-Ils sont très conservés parmi les différentes souches virales.</p> <p>-Dans le lymphome de Burkitt ils confèrent une résistance à l'apoptose induite par l'IFN-α en se liant à la PKR et en inhibant sa phosphorylation (Nanbo and Takada, 2002).</p> <p>-Ils stimulent la croissance cellulaire en induisant la production d'un certain nombre de cytokines (Samanta et al., 2008; Yajima et al., 2005).</p>

Les transcrits BART sont exprimés quelque soit la forme d'infection (latente ou lytique) à bas niveau dans les lymphocytes B mais à un niveau plus élevé dans les cellules épithéliales. L'ARNm BART code pour les protéines BARF0, RK-BARF0, A73 et RPMS1. La fonction de ces protéines reste encore mal connue et leur présence n'est pas détectable dans les cellules humaines infectées par EBV. Les introns BART codent eux pour des mi-RNAs. Ces derniers permettraient une régulation du cycle viral. Certains ciblant la région 3' UTR de LMP1, et d'autres LMP2A, régulent négativement l'expression de ces protéines (Lo et al., 2007; Lung et al., 2009). Mi-BART2 inhiberait également le cycle lytique viral en se liant à la région 3'UTR de BALF5 (Barth et al., 2008).

Différents profils d'expression des gènes de l'infection latente ont été décrits *in vivo* et *in vitro* (tableau 2). L'expression du répertoire complet est définie comme étant la latence de type III.

Tableau 2 : Profils d'infection latente des cellules infectées par l'EBV

Programme de latence	Gènes exprimés
0	EBERs, (LMP2A)
I	EBERs, EBNA1, BARTs
II	EBERs, EBNA1, LMP2A, LMP1, BARTs
III	EBERs, EBNA1, LMP2A, LMP1, EBNA2, EBNA3C, EBNA-LP, BARTs

3-2- Protéines du cycle lytique

L'expression des gènes du cycle lytique est séquentielle : les produits des gènes très précoces activent l'expression des gènes précoces qui induisent la réplication du génome viral nécessaire la transcription des gènes tardifs. Les produits des gènes tardifs sont essentiels à l'assemblage et à la maturation des particules virales infectieuses.

4-Cycle viral

Le virus EBV a la capacité d'infecter différents types cellulaires *in vivo* : lymphocytes B, cellules épithéliales, cellules mésenchymateuses et lymphocytes T comme le prouve son implication dans des tumeurs dérivées de ces différents types cellulaires : lymphomes B, carcinome du cavum, leiomyosarcome, lymphome T (Kutok and Wang, 2006). Cependant chez l'individu sain, les principales cellules cibles sont les lymphocytes B et les cellules épithéliales.

4-1- Entrée du virus dans la cellule hôte

In vivo le virus pénètre dans l'organisme par voie salivaire. Il traverse ensuite la couche épithéliale amygdalienne pour arriver au niveau du tissu lymphoïde sous-épithélial. L'étude *in vitro*, du cycle viral de l'EBV a montré que l'infection des lymphocytes B par l'EBV commence par l'attachement d'une glycoprotéine de l'enveloppe virale, la gp350/220 au récepteur du fragment C3d du complément : CR2 (également appelé CD21) (Nemerow et al., 1985). Le site d'interaction gp350/220/ CR2 a été récemment caractérisé (Young et al., 2007). Cependant, des

virus génétiquement modifiés n'exprimant pas les protéines gp350/220 peuvent infecter à la fois les lymphocytes B et les cellules épithéliales, ce qui semble indiquer que d'autres molécules du virus doivent pouvoir permettre l'entrée dans ces cellules (Janz et al., 2000). De plus, les cellules épithéliales n'expriment pas le CD21. Par exemple, les cellules épithéliales HEK 293, pourtant infectables par EBV, ne semblent pas avoir ce récepteur (Imai et al., 1998). Ceci suggère également l'existence d'autres molécules cellulaires permettant l'adhésion du virus.

Après l'étape d'attachement, d'autres molécules sont nécessaires pour permettre la fusion et l'internalisation du virus. La fusion cellulaire entre EBV et une cellule épithéliale est la co-expression des glycoprotéines d'enveloppe gH (gp85), gL (gp25) et gB (gp110). De plus, EBV a besoin de la gp42 pour entrer dans les lymphocytes B. La gp42 se lie aux protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) exprimées par les cellules B pour permettre la fusion virale. En revanche, la fusion de la membrane avec la cellule épithéliale est inhibée par une forme soluble de la gp42 et probablement par la formation d'un trimère gH/gL/gp42 incapable de médier la fusion membranaire avec les cellules épithéliales. Le niveau d'expression de la gp42 permettrait donc de guider le tropisme du virus *in vivo* (Kirschner et al., 2007). L'entrée de l'EBV dans les cellules épithéliales, qui n'expriment pas le HLA de classe II, pourrait également être le fruit d'une interaction avec des cellules B portant le virus à leur surface (Shannon-Lowe et al., 2006). Il semblerait que les cellules épithéliales soient davantage impliquées dans la dissémination virale que dans la primo-infection. En effet, le virus pénètre dans ces cellules par les faces basolatérales. Il pourrait être amené des capillaires sanguins vers l'épithélium muqueux par les lymphocytes B sous épithéliaux, mais surtout par les monocytes devenus macrophages et cellules de Langerhans en arrivant au niveau des couches supérieures de l'épithélium, comme cela a été démontré chez des patients VIH positifs atteints de leucoplasie orale chevelue (Tugizov et al., 2007).

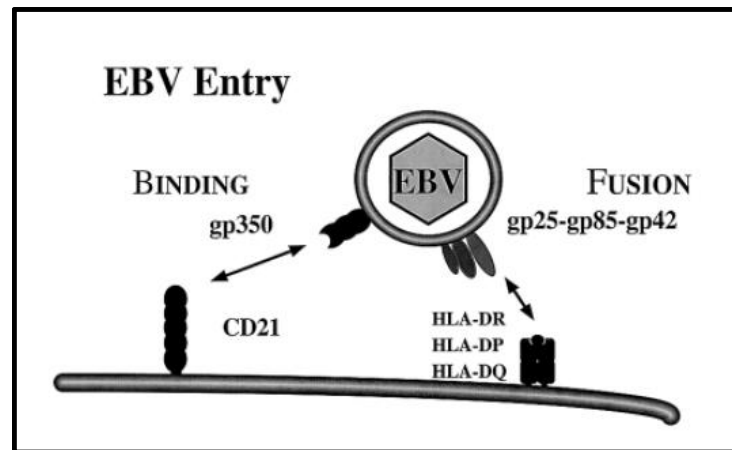


Figure 2 : Infection par EBV d'une cellule B.
Schéma extrait de (Speck et al., 2000)

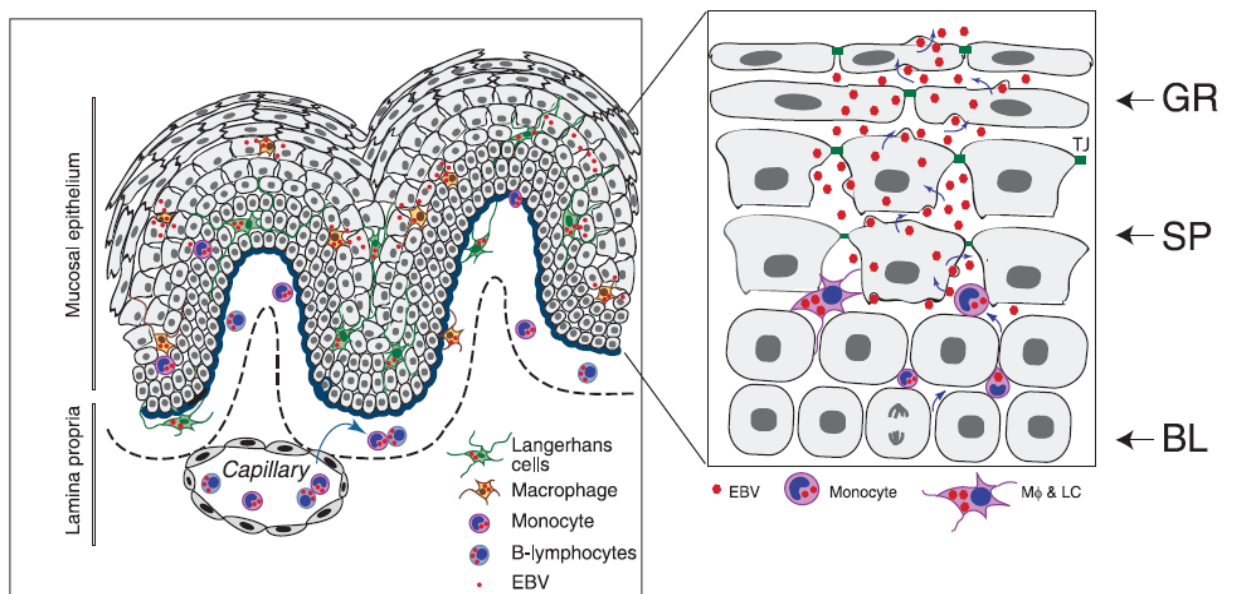


Figure 3 : Modèle d'infection de l'épithélium muqueux par EBV.

Figure extraite de (Tugizov et al., 2007) : EBV se réactive au niveau des lymphocytes B et le virus fabriqué alors va pouvoir à son tour infecter des monocytes. Ces monocytes vont ensuite se différencier en macrophages et cellules de Langerhans qui vont migrer dans l'épithélium muqueux et transmettre ainsi le virus aux cellules épithéliales différenciées des couches supérieures. Ces cellules vont alors multiplier le virus en grande quantité et produire ainsi de nombreux virions infectieux. TJ : Tight junction, Mφ : macrophage, GR : stratum granulosum, SP : stratum spinosum, BL : stratum basale.

4-2- Etablissement d'une infection latente

Les lymphocytes B sont les cellules clefs pour l'établissement de la latence virale. En effet, les patients présentant une hypogammaglobulinémie liée à l'X et qui manquent de lymphocytes B ne présentent pas d'infection EBV persistante (Faulkner et al., 1999). Suite à l'infection par EBV, D Thorley-Lawson et A Gross (Thorley-Lawson and Gross, 2004) décrivent une activation et une prolifération des lymphocytes B naïfs infectés similaire à celle obtenue avec une stimulation antigénique. C'est en fait l'expression des protéines virales de latence III (dit également « programme de croissance » cf. tableau 2) qui permet ce phénomène mimant ainsi une stimulation naturelle. La cellule ainsi stimulée migre ensuite vers le ganglion lymphatique où le programme d'expression virale change. Seules 3 protéines virales EBNA1, LMP1 et LMP2 sont exprimées. EBNA1 permet le maintien du génome viral sous forme d'épisome et sa réplication par l'ADN polymérase cellulaire. Le génome viral est ainsi également réparti entre les cellules filles lorsqu'une cellule infectée par EBV se divise. LMP2 pousse la cellule à former un centre germinal. LMP1, en mimant le signal émis par le CD40, et LMP2, en mimant celui du BCR, vont permettre la mutation des gènes des immunoglobulines ainsi que le switch isotypique. LMP1 réprime *in vitro* l'expression du facteur de transcription régulateur du centre germinal : bcl-6 (Panagopoulos et al., 2004), favorisant ainsi la transformation en cellule B mémoire et le départ de ces cellules du centre germinal. Des observations récentes (Roughan et al., 2010) laissent cependant penser que ce rôle de LMP1 pourrait être différent *in vivo*. Une seconde hypothèse est fondée sur l'infection préférentielle des lymphocytes B mémoire et non naïfs (Rowe et al., 2009). Ces cellules subiraient une expansion clonale dirigée par le programme de croissance viral. Cette hypothèse a été émise pour expliquer l'absence de marqueurs phénotypiques du centre germinal sur les cellules infectées par EBV identifiées par microdissection et présentes dans les centres germinatifs des amygdales (Kurth et al., 2003). Cependant, une étude récente (Roughan and Thorley-Lawson, 2009) montre que le programme de latence II (dit « de défaut ») est compatible avec le maintien de la fonctionnalité du centre germinal et offre ainsi un argument de poids pour

penser que le centre germinal est un nœud crucial pour le développement de pathologies lymphoïdes associées à EBV comme les lymphomes de Hodgkin et de Burkitt (Figure 4).

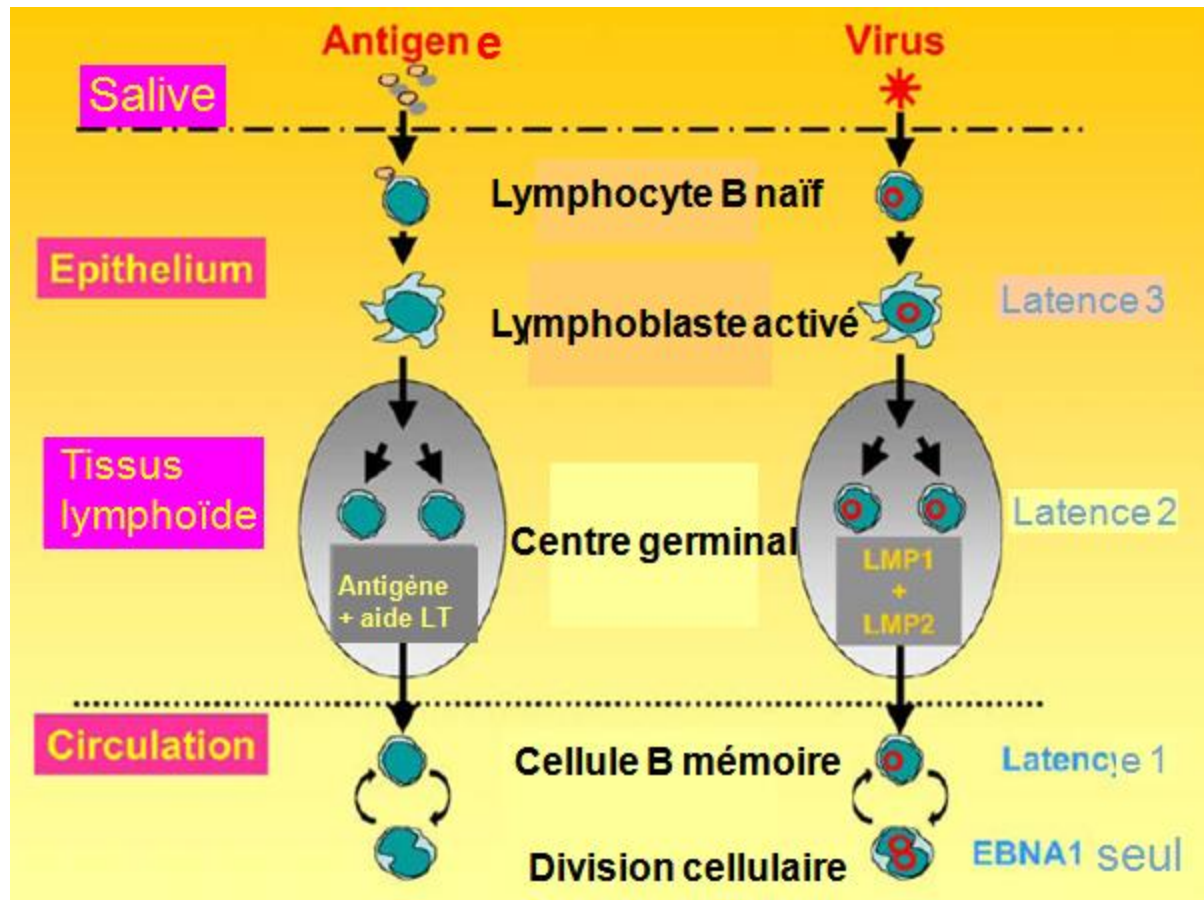


Figure 4 : Schématisation de la façon dont EBV utilise la biologie des cellules B afin d'établir et de maintenir son infection dans le compartiment mémoire.

Figure extraite de (Thorley-Lawson, 2005)

4-3- Persistance virale

Une fois en périphérie, les cellules B mémoire infectées par du virus latent vont arrêter toute production de protéines virales. C'est la latence de type I ou 0. Immédiatement après l'infection aiguë, la proportion de cellules de ce type dans le sang peut atteindre 50% des cellules B mémoires d'un individu (Hochberg et al., 2004). Mais ce nombre diminue rapidement et un an après l'épisode infectieux aigu, on retrouve 1 cellule infectée par EBV sur 10^5 à 10^6 lymphocytes B mémoires (Khan et al., 1996). Il semble alors que ce nombre se stabilise reflétant certainement l'équilibre entre les lymphocytes B mémoires qui se divisent, les nouveaux lymphocytes B mémoires infectés et ceux qui vont être détruits par la reprise de la multiplication virale. La

division cellulaire est vraisemblablement le fait de l'homéostasie cellulaire car aucune protéine produite par le virus ne permet de provoquer cette division. En revanche, lorsque la cellule mémoire se divise, la protéine virale EBNA1 est produite permettant une multiplication du génome viral et sa division entre les cellules filles (Yates et al., 1985). EBNA1 est très peu immunogène et ne déclenche donc pas de réaction contre ces cellules mémoires en division. La capacité de la région répétée glycine-alanine d'EBNA1 d'inhiber la dégradation par le protéasome et la présentation des peptides d'EBNA1 par les molécules du CMH contribue également certainement à cet échappement au système immunitaire (Levitskaya et al., 1997).

Le virus persiste dans le compartiment B mémoire à l'abri du système immunitaire.

4-4- Réplication virale

Afin de pouvoir infecter de nouveaux hôtes et également renforcer le pool de cellules B mémoires porteuses du virus, EBV doit pouvoir aboutir à une excrétion de particules virales infectieuses. Les signaux naturellement à l'origine de la différenciation des cellules B mémoires en plasmocytes sécréteurs vont également permettre au virus de se réactiver. La capacité des cellules B mémoires infectées à se transformer en plasmocytes où le virus se réplique vient récemment d'être confirmée par les travaux d'Al Tabaa et al. (Al Tabaa et al., 2009).

La connaissance du cycle lytique est limitée car il n'existe pas de système de culture permettant l'étude de ce cycle complet. De plus, le cycle lytique aboutit la plupart du temps à la mort de la cellule hôte (du moins lymphoïde). Les données actuellement disponibles viennent de lignées cellulaires porteuses de formes latentes d'EBV et dans lesquelles la multiplication virale est induite par un phénomène extérieur (agent chimique, liaison avec des immunoglobulines...). Lors de son cycle répliatif, le virus, dont le génome est alors linéaire et extrachromosomique, utilise la machinerie enzymatique virale et celle de la cellule infectée pour exprimer les protéines du cycle lytique, se répliquer et produire de nouveaux virions. L'expression des gènes du cycle lytique se fait de manière séquentielle. Les produits des gènes très précoces activent l'expression des gènes

précoces, qui induisent la réplication du génome viral nécessaire à la transcription des gènes tardifs. Les produits de ces gènes tardifs sont essentiels à l'assemblage et à la maturation des particules virales infectieuses.

- **Les protéines très précoces « *immediate early* : IE » :**

Selon la définition donnée par Israel et Kenney, la transcription de ces gènes très précoces doit pouvoir avoir lieu même en présence d'inhibiteurs de la synthèse protéique. Cependant Miller et al. (Miller et al., 2007) affirment que Rta et ZEBRA nécessitent une synthèse *de novo* de protéines avant la réactivation et ne sont donc pas de vrais « *immediate early* » comme, par exemple, l'ORF50 de HHV8. Dans le modèle lymphocytaire, les facteurs de transcription reliés au promoteur permettant l'expression de BZLF1, Zp, seraient déjà présents pendant la latence mais ne seraient activés que lors du déclenchement de la réplication par des modifications épigénétiques de type méthylation du promoteur ou modification de l'acétylation des histones (McDonald et al., 2009; Takacs et al., 2010). Quoi qu'il en soit, les protéines Zebra (BamH1 Z EBV Replication Activator, également appelé Zta, Z ou EB1) et Rta (également appelée R) codées respectivement par les gènes *BZLF1* et *BRLF1* sont des transactivateurs qui induisent l'expression de plusieurs gènes viraux précoces. Zebra peut se lier à l'origine de réplication *oriLyt*, et suffit à elle seule pour lever la latence du virus dans les lymphocytes B et le faire entrer dans le cycle lytique. Elle peut également interagir avec NF- κ B, réguler négativement le promoteur Cp des EBNA, ce qui semble faciliter la commutation entre la latence et le cycle lytique. ZEBRA altère également le cycle cellulaire, le bloquant en G1/S (Israel and Kenney, 2005) via l'inhibition de la cycline A et de c-myc. Cette inhibition de la réplication de l'ADN cellulaire permet certainement de diminuer la compétition pour les substrats nécessaires à la réplication génomique entre le virus et son hôte. Rta apparaît très tôt durant le cycle lytique grâce à l'activation de son expression par Zebra. Elle se lie également à l'*oriLyt* (Gruffat and Sergeant, 1994) bien que semblant ne pas être indispensable à la réplication génomique. Elle joue aussi un rôle dans la commutation latence-cycle lytique. Dans les cellules épithéliales, Rta peut rompre à elle seule la latence virale. De façon

intéressante, Rta ainsi que la protéine précoce Na (codée par le gène BRRF1 situé sur le brin opposé au premier intron de Rta) peuvent être activées par ZEBRA via la méthylation de leur promoteur puis induire à leur tour la transcription de ZEBRA dans un phénomène de boucle positive (Dickerson et al., 2009).

- **Les protéines précoces : « *early antigens (EA)* »**

Les gènes précoces sont transcrits avant la réplication lytique du génome viral mais leur transcription est arrêtée par la présence d'inhibiteurs de synthèse protéique. Les protéines de cette phase sont donc induites par les transactivateurs Zebra et Rta. Au moins deux protéines précoces sont également des facteurs de transcription. Il s'agit du produit des gènes BMRF1 et de BRRF1. Depuis longtemps, sur des images d'immunofluorescence, les antigènes précoces ont été divisés en deux catégories, EA-R (restricted) présents dans le cytoplasme, et EA-D (diffuse) situés dans le noyau et dans le cytoplasme. Les produits des gènes précoces comprennent des protéines régulant le transport des ARNs et assurant leur stabilité. En effet, la plupart des gènes lytiques d'EBV sont dépourvus d'introns et les ARNm non épissés sont souvent instables dans les cellules. A ce titre on distingue : la protéine EB2 (appelée également SM), codée par le cadre de lecture BMLF1, très abondante dans le noyau. Elle se lie aux ARN non épissés, améliore leur stabilité (Gruffat et al., 2002), entraîne leur transport du noyau vers le cytoplasme (Juillard et al., 2009) et favorise leur traduction (Ricci et al., 2009). EB2 inhibe également l'activation de la PKR permettant ainsi au virus d'échapper à l'effet négatif de la PKR sur la traduction protéique. D'autre part, la protéine codée par le cadre de lecture BHRF1 localisée dans le noyau et dans le cytoplasme, possède des homologies avec bcl2 y compris son pouvoir protecteur sur l'apoptose. Elle permet ainsi une meilleure réplication virale en prévenant la mort de la cellule hôte. De même, BARF1 qui code pour un récepteur soluble du colony stimulating factor 1 protège le virus des monocytes macrophages en empêchant ces cellules de sécréter de l'interféron (Cohen and Lekstrom, 1999) ainsi qu'en bloquant leur prolifération induite par les cytokines (Strockbine et al., 1998).

Dans les protéines précoces on trouve également de nombreuses protéines impliquées dans la réplication de l'ADN viral, comme l'ADN polymérase (*BALF5*) et son facteur de processivité (*BMRF1*), une protéine majeure de liaison à l'ADN (*BALF2*), la ribonucléotide réductase (*BarF1*), la thymidine kinase (*BXLF1*), l'exonucléase alcaline (*BGLF5*), le complexe hélicase/primase (*BBLF4/BSLF1*), un composant épissé du complexe hélicase/primase (*BBLF2/3*) et l'uracyl ADN glycosylase (*BKRF3*). La réplication lytique de l'EBV implique la formation de concatémères tête-queue et se produit vraisemblablement selon un mode de cercle roulant. Après la réplication, l'ADN viral est coupé au niveau de la région répétée terminale aboutissant ainsi à un génome linéaire de taille complète prêt à être encapsidé dans les virions. Les souches d'EBV contiennent 2 *oriLyt* à l'exception de la souche B95-8 qui pourtant semble se répliquer de façon équivalente. *OriLyt* comprend les promoteurs de *BHRF1* et de *BHLF1*, de même que des sites de liaison pour ZEBRA et Rta (Hammerschmidt and Sugden, 1988). 2 domaines de l'*oriLyt* sont essentiels à la réplication. Il s'agit du domaine « amont » qui contient 2 éléments de réponse à ZEBRA et dont la liaison à ZEBRA est indispensable pour assurer une réplication complète (Schepers et al., 1996), et du domaine « aval » qui peut former une structure d'ADN en triple hélice, ce qui pourrait être important pour la réplication virale.

- **Les protéines tardives :**

L'expression des gènes tardifs est fortement diminuée en présence d'inhibiteurs de la réplication virale ciblant l'ADN polymérase. Les promoteurs des gènes tardifs ne comprennent pas d'élément de réponse à ZEBRA ou à Rta. Les protéines exprimées lors de la phase tardive sont des protéines de structure comprenant des antigènes de capsid (VCA) et des antigènes de membrane (MA). La capsid est composée essentiellement de la protéine majeure de la capsid, codée par le cadre de lecture *BcLF,1* mais également d'autres protéines : la protéine triplex 7 *BORF1*, la protéine triplex *BDLF1*, la petite protéine de capsid *BFRF3*, la protéine interne de la charpente ou assemblage *BdRF1*, et la protéase *BVRF2*. Les glycoprotéines de l'enveloppe virale sont codées par les cadres de lectures suivants : *BLLF1* (gp350/220), *BALF4* (gp110), *BXLF2* (gp85), *BILF2*

(gp55/80) et *BDLF3* (gp42). La protéine virale vIL-10 codée par le gène *BCLF1* appartient également aux protéines tardives et son homologie à l'interleukine 10 cellulaire joue un rôle important pour protéger le virus de la réponse immunitaire (Salek-Ardakani et al., 2002). Le virus met donc en jeu différents mécanismes pour prévenir l'apoptose cellulaire durant la phase de réplication virale.

L'ensemble de ce phénomène de réplication virale se produit donc essentiellement dans le lymphocyte B mémoire qui se différencie en plasmocyte. Cette différenciation cellulaire en plasmocyte conduit les cellules vers les épithéliums muqueux comme les amygdales. Si la cellule est infectée par EBV, il y a un relargage de particules virales dans la salive à la place des anticorps et ainsi la contagion est possible (Figure 5).

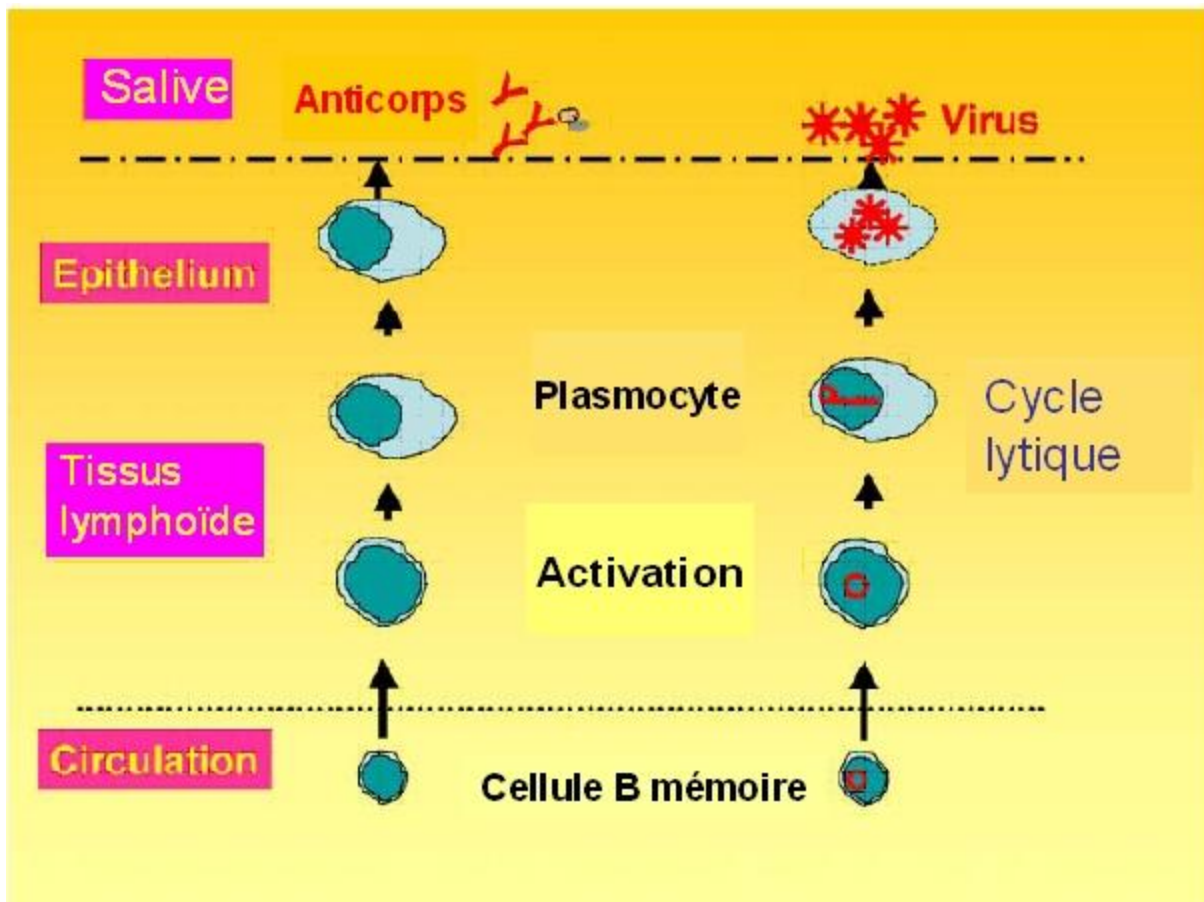


Figure 5 : Modélisation de la façon dont EBV utilise la biologie d'un lymphocyte B pour se répliquer et libérer des virions infectieux dans la salive.

Figure extraite de (Thorley-Lawson, 2005)

Cependant si le lymphocyte B est la cellule qui permet la persistance de l'EBV dans l'organisme, les cellules épithéliales peuvent également être porteuses du virus (Shannon-Lowe et al., 2009). En effet, EBV est associé à différentes pathologies dans lesquelles sa présence a été montrée dans des cellules épithéliales. Il s'agit notamment du carcinome du cavum, de la leucoplasie orale chevelue, ainsi que d'autres cancers épithéliaux comme le carcinome gastrique. La présence d'EBV dans le cavum de sujets sains avait été remise en question (Karajannis et al., 1997). Il semble maintenant clair que les cellules épithéliales peuvent être infectées *in vitro* (Tugizov et al., 2003) et le sont *in vivo* (Pegtel et al., 2004). De plus elles permettent une multiplication active du virus (Shannon-Lowe et al., 2009). Plusieurs arguments font pencher pour cette hypothèse. Comme les récepteurs viraux ne se situent que sur les faces baso-latérales des

cellules épithéliales, le virus pourrait les infecter via le relargage de particules virales par les lymphocytes sous-jacents plutôt que directement par la salive (Shannon-Lowe et al., 2009). Les cellules épithéliales auraient donc plutôt un rôle dans la dissémination virale que dans la primo-infection. Comme viennent de le démontrer Hadinoto et al. (Hadinoto et al., 2009), les cellules épithéliales amplifieraient ainsi le nombre de virions passant dans la salive, ce qui pourrait expliquer la discordance entre le nombre de lymphocytes produisant de l'EBV dans les amygdales et les taux viraux salivaires (Fafi-Kremer et al., 2005a; Laichalk and Thorley-Lawson, 2005). Ainsi, la production dans la salive de virions infectieux permet la contamination d'autres individus mais le rôle de ces virions dans la réinfection de cellules B naïves du même individu reste peu clair. Une réponse T cytotoxique massive ainsi que la production d'anticorps neutralisants sont initiés lors de la primo-infection par EBV. Cette réponse immunitaire cible essentiellement les antigènes de latence d'EBNA3A, 3B et 3C et le transactivateur du cycle lytique *BZLF1*. La réponse immunitaire secondaire à une ré-infection est donc très rapide. Il n'est pas sûr que les lymphocytes B naïfs nouvellement infectés et exprimant les antigènes viraux du programme de croissance puissent arriver jusqu'à la différenciation en cellules B mémoires. D'autre part, bien que le virus puisse infecter aussi bien les lymphocytes B mémoires que les cellules naïves *in vitro* (Ehlin-Henriksson et al., 2003), il semblerait que, *in vivo*, l'infection directe des cellules B mémoires soit très rare (Babcock et al., 2000; Joseph et al., 2000). Lorsque cela arrive, il semblerait que cela aboutisse à une prolifération clonale et non à une différenciation (Kurth et al., 2000). Une explication possible est que l'activation de cellules B naïves à travers le centre germinal a pour résultat la production de cellules mémoires alors que l'activation de cellules B mémoire aboutit davantage à la production de plasmocytes, ce qui n'est pas favorable à la persistance virale. L'autre hypothèse (cf. p25) est étayée par une étude récente de patients souffrant d'un syndrome lymphoprolifératif du à l'X, chez qui les centres germinatifs ne se forment pas correctement et le switch isotypique ne peut avoir lieu (Chaganti et al., 2008). Ces patients ont survécu à la primo-infection EBV. Ce résultat remet en cause le rôle fondamental des

centres germinaux et étaye l'hypothèse d'une infection des cellules B non naïves (Rowe et al., 2009).

5-Rôle de la réplication virale dans les principales pathologies associées à EBV

Le virus EBV dont le cycle viral alterne entre latence et réplication a, par les propriétés de ses protéines, un fort potentiel oncogène et a été décrit comme étant associé à de nombreuses pathologies malignes. La plupart du temps le lien est évoqué lorsque l'on retrouve du virus à l'état clonal dans la plupart des cellules tumorales. Cependant le rôle joué par le virus dans le déclenchement et l'évolution de ces pathologies reste mal connu. Le tableau ci-dessous reprend les principales pathologies associées à EBV. L'implication du cycle lytique sera plus particulièrement étudié dans les pathologies suivantes : la mononucléose infectieuse, les lymphomes de Burkitt et de Hodgkin ainsi que le syndrome lymphoprolifératif post-transplantation.

Tableau 3 : Principales maladies associées à EBV.

Une référence de revue récente est donnée pour chaque pathologie.

Patient immunocompétent	Patient immunodéprimé
Mononucléose infectieuse (Fafi-Kremer, 2005)	Syndrome de Purtilo (Purtilo, 1981)
Carcinome du cavum (Tao and Chan, 2007)	Lymphome à grandes cellules (Carbone et al., 2009a)
Lymphome de Burkitt (Thorley-Lawson and Allday, 2008)	Lymphomes immunoblastiques (Carbone et al., 2009a)
Maladie de Hodgkin (Caporaso et al., 2009)	Lymphomes cérébraux (Cingolani et al., 2005)
Lymphomes T (Suzuki et al., 2008)	Maladie de Hodgkin (Carbone et al., 2009b)
Carcinome gastrique (Truong et al., 2009)	Léiomyosarcome (Nur et al., 2007)
Carcinomes pulmonaires (Castro et al., 2001)	Leucoplasie orale chevelue ((Mendoza et al., 2008)
Maladies auto-immunes (Niller et al., 2008)	

5-1- Primo-infection, mononucléose infectieuse

La primo-infection à EBV acquise par voie salivaire dans la petite enfance est ubiquitaire et le plus souvent asymptomatique. Chez l'adolescent ou l'adulte jeune, elle est souvent symptomatique, et se manifeste dans 50% des cas, sous forme d'une mononucléose infectieuse (MNI). Il s'agit d'une lymphoprolifération autocontrôlée caractérisée par une angine, de la fièvre, et une polyadénopathie souvent associé avec une fatigue prolongée.

La MNI a servi de témoin de la primo-infection EBV et a permis d'étudier les événements précoces suivant l'exposition au virus. Cependant le modèle n'est pas parfait car on ne sait pas si les primo-infections asymptomatiques se déroulent exactement sur le même modèle. De plus, la MNI n'est détectée cliniquement qu'après plusieurs semaines d'incubation. De ce fait, les événements les plus précoces suivant le contact initial oropharyngé avec la salive contaminante restent mal connus. Lorsque les symptômes de MNI sont détectés, on retrouve des titres très élevés de virus infectieux libre dans les prélèvements de gorge et de salive (Fafi-Kremer et al., 2005b; Gerber et al., 1972), ce qui démontre l'existence d'une répllication virale active. Cette

multiplication virale intense se poursuit pendant plus de 6 mois après l'apparition des signes cliniques. En effet, des virions infectieux ont pu être mis en évidence par infection de sang de cordon 180 jours après le diagnostic de la maladie, associés à la persistance d'un taux élevé d'ADN viral salivaire (4,6 à 7,2 log copies/ml) (Fafi-Kremer et al., 2005a). Cela signifie que les patients présentant une MNI restent très longtemps contagieux après la disparition des symptômes cliniques et que la transmission de l'EBV pourrait avoir lieu majoritairement par l'intermédiaire d'individus récemment infectés par l'EBV plus que par un partenaire sain. La persistance de virus infectieux dans la salive 6 mois après le début des symptômes suggère que le contrôle immunitaire dans ce compartiment est faible voire absent, ou que le virus a développé une stratégie lui permettant d'échapper à la réponse immune. La quantité de virus peut être aussi importante que son élimination nécessite un délai plus long. Concernant le contrôle immunitaire dans le compartiment oropharyngé, Chen et al. (Chen et al., 2001) ont montré par l'analyse *ex vivo* de lymphocytes T CD8 dirigés contre EBV, que ceux-ci sont 3 à 4 fois moins nombreux dans les organes lymphoïdes secondaires, en particulier les amygdales, par rapport au sang périphérique. De manière intéressante, EBV peut inhiber la réponse immune primaire et favoriser le développement et le maintien de l'immunotolérance, en exprimant des cytokines telles que vIL10 (Levitsky and Masucci, 2002). Cette protéine est capable d'inhiber l'expression des récepteurs CCR7 et L-selectine, qui sont nécessaires à la migration des CTL dans les organes lymphoïdes secondaires (Takayama et al., 2001).

Les premières études ont montré que la réplication virale dans l'épithélium de l'oropharynx était une étape importante pour la primo-infection EBV, les virus pénétrant ensuite dans les lymphocytes B sub-épithéliaux par contact direct (Sixbey et al., 1984; Sixbey et al., 1983). Il semble effectivement reconnu qu'EBV puisse infecter et se répliquer dans des cellules épithéliales, du moins à partir du réservoir de lymphocytes B pour permettre une dissémination du virus mais cela est-il également le cas dans l'autre sens ? D'autres études n'ont pu mettre en évidence d'infection par EBV des cellules épithéliales amygdaliennes chez des patients ayant une

MNI (Anagnostopoulos et al., 1995; Niedobitek et al., 1997). Ceci a suggéré que les cellules épithéliales n'étaient peut-être pas une cible directe du virus lors de la primo-infection mais permettaient seulement son passage (Karajannis et al., 1997) (Figure 6).

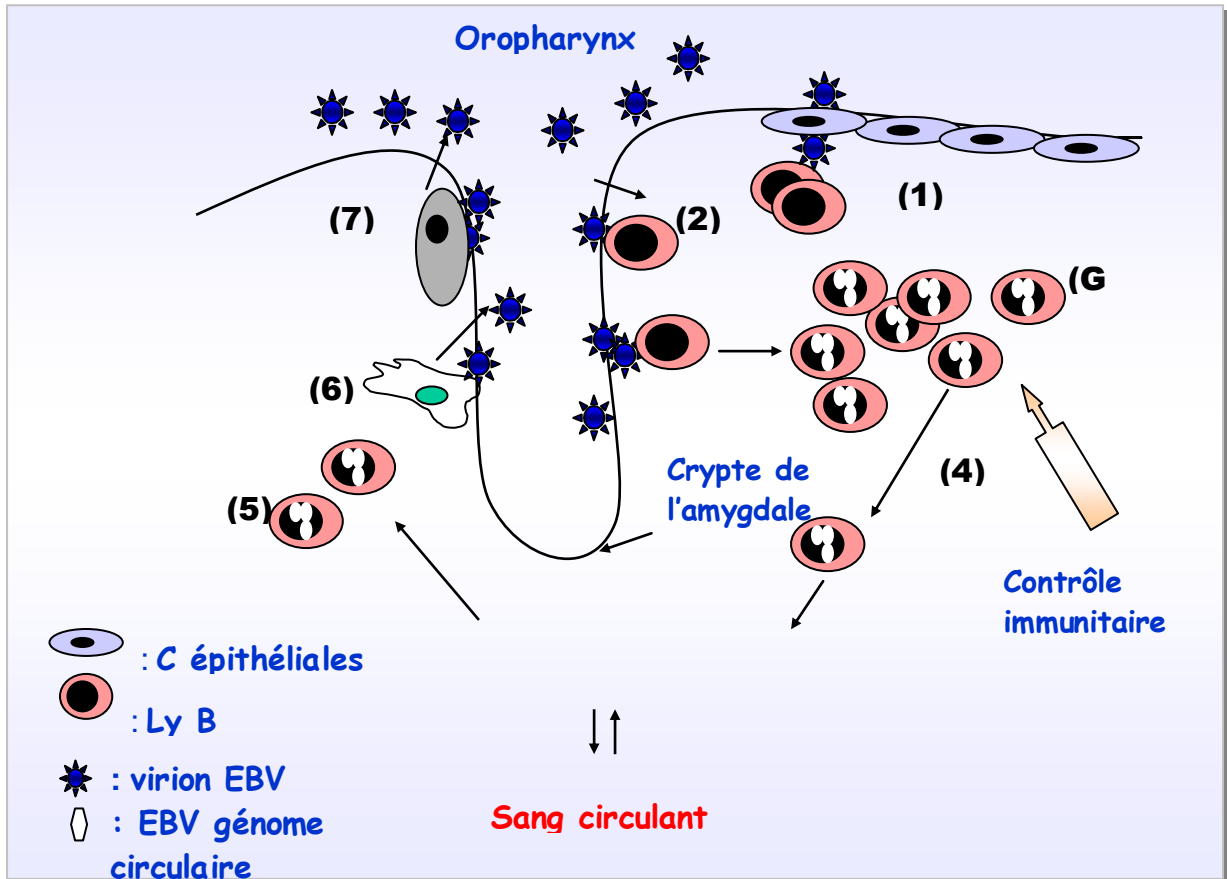


Figure 6 : Modèle d'infection EBV *in vivo* adapté de Faulkner et al. (Faulkner et al., 2000).
 (1) L'EBV traverse l'épithélium par transcytose ; (2) ou infecte directement les lymphocytes B à travers la crypte ; (3) prolifération des cellules infectées contrôlée par le système immunitaire ; (4) l'EBV se met en latence stricte dans les cellules mémoires qui migrent dans le sang circulant ; (5) les Lymphocytes B mémoires retournent dans les amygdales (6) se différencient et produisent des virions puis meurent ; (7) les virions sont relargués dans la salive

Malgré cette ambiguïté dans le rôle que jouent les cellules épithéliales lors de la primo-infection par EBV, les cellules cibles principales du virus restent les lymphocytes B. Lorsque la MNI est sous sa forme clinique complète, entre 0,1 et 1% des lymphocytes B périphériques contiennent du virus (Klein et al., 1976) et ces cellules sont infectées par un virus exprimant un programme de latence de type III, ce qui suggère que la prolifération viro-induite des lymphocytes B contribue à la croissance des cellules infectées. Les ganglions lymphatiques

ainsi que les biopsies d'amygdales prélevés pendant la MNI montrent des follicules secondaires réactifs avec une expansion marquée paracorticale diffuse de lymphoblastes proliférants (Childs et al., 1987). De grands lymphoblastes mono ou binucléaires d'aspect étrange et qui peuvent ressembler aux cellules de Reed-Sternberg du lymphome de Hodgkin, sont également fréquemment retrouvées (Lukes et al., 1969). L'invasion du système immunitaire par l'infection EBV des lymphocytes B stimule une importante réponse des lymphocytes T CD8+. Ces lymphocytes T activés sont retrouvés dans le sang périphérique et sont caractéristiques de la MNI (Figure 7).

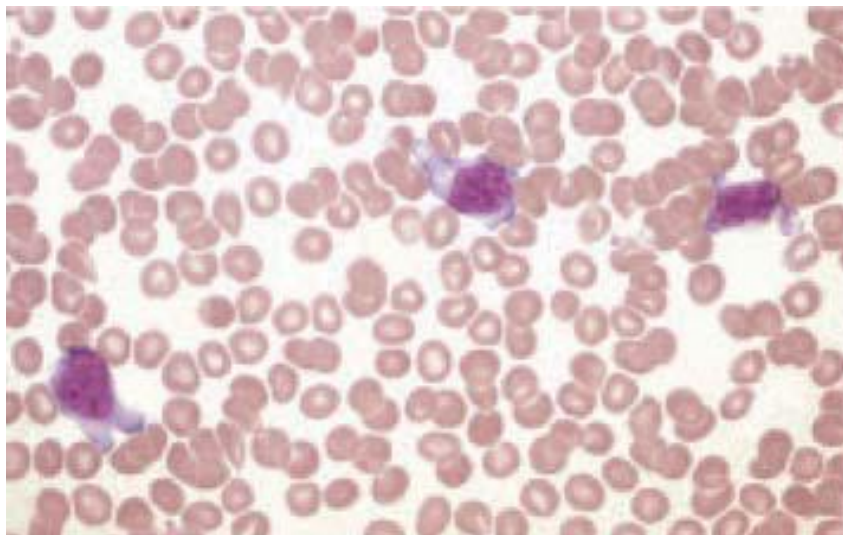


Figure 7 : 3 grands lymphocytes T CD8+ activés (lymphocytes atypiques) dans le sang périphérique d'un patient atteint de MNI (coloration wright-giemsa; objectif: 400x).

La lymphocytose périphérique, la lymphadénopathie et la splénomégalie sont davantage le résultat de cette prolifération de lymphocytes T spécifiques que de celle des cellules infectées par le virus. Le diagnostic biologique de la primo-infection EBV repose sur la mise en évidence de la réponse humorale précoce (IgM voire IgG) dirigée contre un antigène de capsid (VCA) puis secondairement l'apparition d'anticorps dirigés contre les protéines nucléaires EBNA. Le rôle de cette immunité humorale dans le contrôle de la primo-infection reste mal connu.

Une maladie génétique, le syndrome de Purtillo ou lymphoprolifération due à l'X, met en évidence le rôle fondamental d'une réponse immunitaire adaptée dans le contrôle de la primo-infection à EBV. En effet, le système immunitaire des jeunes hommes atteints est incapable de

contrôler cette primo-infection à EBV alors qu'il réagit normalement face à d'autres pathogènes. La plupart des patients présentent des mutations du gène SAP ou SLAM (signaling lymphocyte activation molecule). Le produit de ce gène est exprimé dans les lymphocytes T et les cellules NK (natural killer) et participe à la régulation de la réponse immunitaire. Certains de ces patients vont mourir d'une prolifération incontrôlée des lymphocytes B, ce qui laisse penser que leur réponse immunitaire est insuffisante; mais d'autres vont développer une pancytopenie ou une hypogammaglobulinémie, ce qui suggère à l'inverse une réaction excessive et/ou incontrôlée du système immunitaire.

5-2- Le Carcinome du cavum (CC)

Les CC représentent environ 20% de l'ensemble des cancers en Chine et à Taiwan (Yu and Yuan, 2002) et on les retrouve également en Arctique et chez les populations d'Afrique du Nord (Nicholls et al., 1997). Les explications concernant l'augmentation du risque dans ces régions sont basées sur la culture, l'alimentation et les prédispositions génétiques. On classe les CC en 2 sous-types : les non kératinisés et les kératinisés. Les CC non kératinisés sont de loin les plus fréquents et 100% des tumeurs sont infectées par EBV (Klein et al., 1974; Niedobitek et al., 1996). Dans ce sous-type, les cellules tumorales sont cytologiquement uniformes avec un noyau rond à ovale et des nucléoles de taille moyenne. On retrouve souvent une forte réponse cellulaire T associée. Le virus EBV est présent de façon clonale dans chaque cellule tumorale mais pas dans l'infiltrat lymphocytaire.

Afin de comprendre le rôle potentiel d'EBV dans cette pathologie, il faudrait savoir comment et quand le virus infecte les cellules épithéliales. La cavité orale est la porte d'entrée d'EBV et la dispersion du virus par la salive le mode de transmission. Une infection permanente des cellules épithéliales est controversée car on n'arrive pas à mettre en évidence d'infection EBV dans les cellules épithéliales buccales d'individus sains. Le CC pourrait survenir chez une cellule épithéliale infectée de façon persistante par l'EBV dans laquelle surviendrait un second événement

génétique. A l'inverse, l'infection EBV de cellules épithéliales chez des individus « à risque » pourrait arriver plus tard dans la vie. Certaines études suggèrent, en effet, que l'exposition précoce du cavum à certains carcinogènes environnementaux pourrait rendre l'épithélium sensible à l'infection par EBV (Knox et al., 1996). Le virus pourrait alors faciliter le développement d'une cellule ayant déjà des altérations génomiques. On ne sait donc pas à quel moment EBV intervient dans la formation des CC, en revanche sa présence systématique et clonale dans toutes les cellules tumorales atteste son rôle primordial dans la formation de ces carcinomes. Le profil d'expression du virus dans ces CC est majoritairement entre la latence I et II. En effet, EBNA1 et les EBERs sont exprimés dans tous les cas mais on a également mis en évidence un effet de LMP2A pour stimuler la croissance des cellules épithéliales et les transcrits de LMP2A et 2B sont amplifiables dans la plupart des tumeurs (Morrison and Raab-Traub, 2005) et la protéine LMP2A est détectée dans environ 50% des cas (Heussinger et al., 2004). LMP1 est parfois retrouvée, surtout dans les lésions pré-invasives suggérant un rôle plus important pour les lésions précoces que pour l'établissement du carcinome (Pathmanathan et al., 1995). La prolifération des cellules épithéliales induite par l'EBV pourrait augmenter le risque de survenue d'autres événements génétiques contribuant au processus cancéreux. Cependant, les cellules épithéliales sont vraisemblablement un site de multiplication important pour le virus favorisant sa dissémination à travers une population (Hadinoto et al., 2009). Le cycle lytique viral pourrait donc également avoir un impact sur le développement des CC. En effet, dès les années 80, du virus infectieux a été isolé à partir de cellules tumorales de CC (Trumper et al., 1977) ainsi que du génome linéaire (Raab-Traub and Flynn, 1986) attestant de la réplication du virus dans ces cellules. D'autre part, il est connu que lors d'un CC, les patients présentent des taux élevés d'IgA dirigés contre des antigènes du cycle lytique comme les EA et les VCA (Henle and Henle, 1976). Cet élément peut même participer au diagnostic d'un CC. Récemment la présence d'IgG anti ZEBRA a également été démontrée dans le sérum de patients d'origine marocaine atteints de CC. Le taux de ces Ac décroît chez les patients en rémission et augmente chez les patients qui meurent ou développent des métastases

(Dardari et al., 2008). De l'ADN EBV extra-cellulaire est également détecté dans le sang de la plupart des patients ayant un CC (Lo et al., 1999) indiquant la présence d'un relargage viral dans le sang. Feng et al. (Feng et al., 2000) rapportent la présence d'ARNm du cycle lytique (*BZLF1*, *BALF2* et *BCLF1*) dans des biopsies du cavum, y compris chez des individus sains, ce qui reflète une répllication complète virale car *BCLF1* est un gène tardif. Cependant, il n'est pas exclu que ces ARNm proviennent des lymphocytes B présents dans les biopsies. En revanche, les auteurs détectent de l'ARNm *BRLF1* uniquement dans les biopsies de CC (n=53). Or il a été décrit que Rta pouvait à elle seule rompre la latence dans les cellules épithéliales (Zalani et al., 1996). Des protéines du cycle lytique (d'EA-D et de gp350/220) ont également été retrouvées par immunohistochimie dans des biopsies de CC (Zhang et al., 1998). Dernièrement, Fang et al. (Fang et al., 2009) ont également montré que l'accumulation récurrente de réactivation du virus EBV par des agents chimiques entraînait une instabilité génomique et favorisait, par là même, l'émergence de CC. L'ensemble de ces éléments plaide en faveur d'un rôle, même s'il reste encore à préciser à ce jour, du cycle lytique d'EBV dans la formation et/ou l'évolution des CC.

5-3- Le Lymphome de Burkitt

Le lymphocyte B restant la cellule hôte majoritaire du virus EBV, de nombreuses pathologies lymphoïdes ont été associées à la présence du virus dans les lymphocytes en prolifération. Cependant la question de savoir si le virus joue un rôle (i) déclenchant, (ii) facilitant ou (iii) de simple passager dans ces pathologies, reste entière. Deux types de lymphomes rencontrés chez les individus immunocompétents seront étudiés: le lymphome de Burkitt et le lymphome de Hodgkin et un lymphome rencontré chez les individus dont la réponse immunitaire a été inhibée dans le cadre d'une greffe ou d'une transplantation. Ces 3 proliférations lymphoïdes dérivent de dérèglements à différents niveaux de la maturation lymphocytaire B. Le virus EBV infectant les cellules tumorales s'y trouve donc à différents stades, essentiellement des phases de latence

(Figure 8). Cependant, l'existence d'une multiplication virale dont le rôle a peut-être été jusqu'à maintenant sous-estimé, a été rapportée dans chacune de ces 3 pathologies.

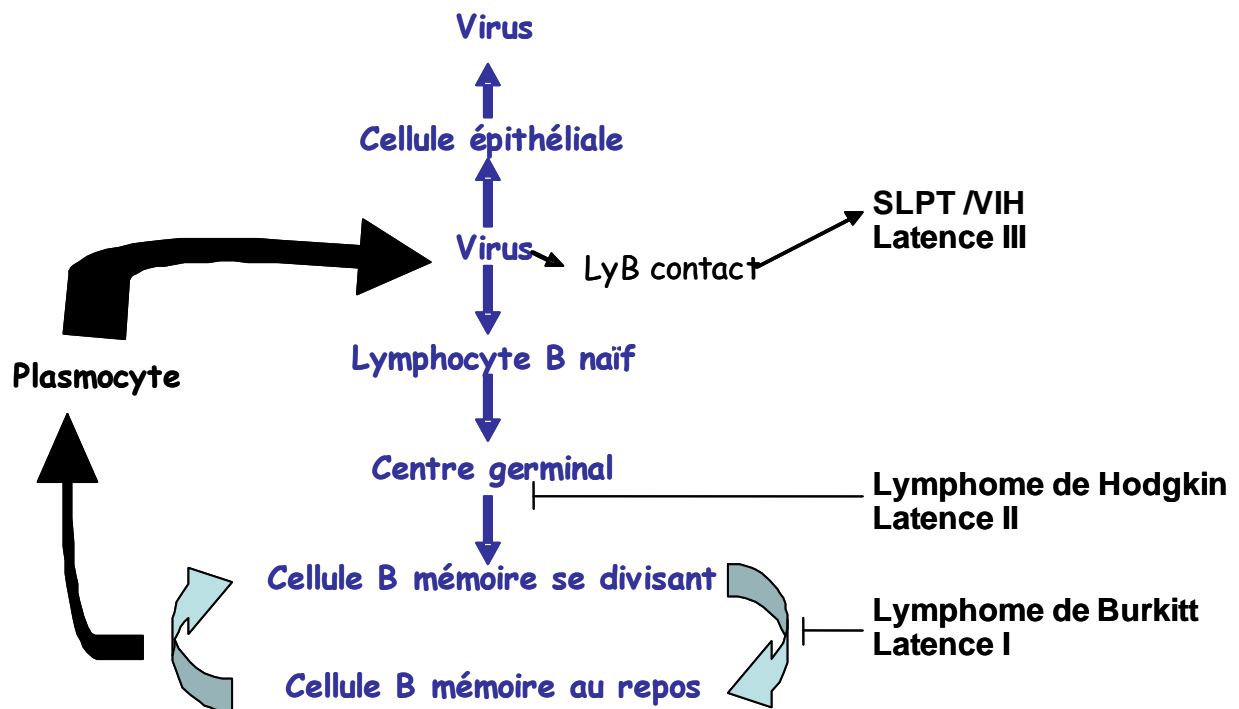


Figure 8 : Lymphomes associés à EBV : stade de différenciation lymphocytaire et virale.
Schéma adapté de (Thorley-Lawson, 2005)

Il existe 3 formes cliniques du lymphome de Burkitt (LB) qui diffèrent dans leur présentation, leur biologie et leur association à EBV. Il s'agit des formes endémique, sporadique et associée à l'immunodépression. La forme endémique est celle décrite à l'origine par Burkitt, qui arrive fréquemment (50-100 cas pour 1 000 000 d'individus) dans les régions équatoriales d'Afrique et de Papouasie- Nouvelle Guinée. Dans ce type de lymphome, 100% des cellules tumorales sont infectées par EBV. A l'inverse la forme sporadique du LB est rencontrée essentiellement chez les enfants et les adultes jeunes sans distribution géographique particulière. Son incidence est beaucoup plus faible et on compte environ 2-3 cas pour 1 000 000 d'individus. Aux Etats Unis et en Europe où les cas de LB sporadiques sont rares, son association avec EBV reste faible : de l'ordre de 15 à 30% des cas (Gutierrez et al., 1992; Hecht and Aster, 2000) chez les patients immunocompétents et de 30 à 60% chez les patients sidéens (Carbone et al., 2009a).

En histologie, un LB se présente sous forme d'un infiltrat diffus, monomorphe de lymphocytes atypique de taille intermédiaire avec des nucléoles ronds et légèrement irréguliers, une chromatine mottée et un cytoplasme vacuolé parfois hyperbasophile (Figure 9).

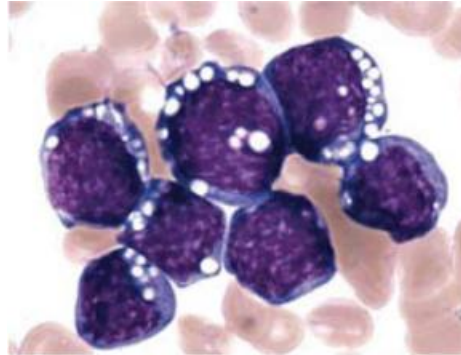


Figure 9 : Cytologie d'un lymphome de Burkitt (Kutok and Wang, 2006)

La classification de l'OMS définit le LB par la présence systématique de la translocation c-MYC qui aboutit à la dérégulation de l'expression de la protéine c-MYC. Cette translocation consiste en un échange de matériel génétique entre l'oncogène c-MYC situé sur la bande chromosomique 8q24 et :

- la chaîne lourde des Ig sur la bande q32 du chromosome 14 [t(8 ;14)] (80% des cas),
- la chaîne légère kappa au loci 2p11 [t(8 ;2)] (15% des cas),
- la chaîne légère lambda au loci 22q11 [t(8 ;22)] (5% des cas).

Dans le LB endémique, le point de cassure sur le chromosome 8 dans la région 5' non codante de l'exon 1 de c-MYC et le point de cassure sur le chromosome 14 sur la région de jonction des chaînes lourdes sont à des sites susceptibles d'hypermutation somatique (lors du développement des cellules B dans le centre germinale). Dans les BL sporadiques ou associés au SIDA, le point de cassure de la translocation t(8 ;14) se situe entre les exons 1 et 2 de c-MYC sur le chromosome 8 et dans la région de « switch » des chaînes lourdes qui est impliquée dans le changement d'isotype lors de la maturation des lymphocytes B. Ceci suggère que ces translocations sont des erreurs qui surviennent lors des phénomènes de maturation des lymphocytes B. Ces translocations dérèglent l'expression de c-MYC et activent ainsi des mécanismes d'apoptose.

Malgré la forte association entre infection EBV et LB, la présence du virus ne semble pas être suffisante ni indispensable au développement d'un LB. EBV pourrait agir tôt dans le processus lymphomateux en augmentant la fréquence de l'instabilité génomique à l'intérieur des lymphocytes B infectés, augmentant ainsi la probabilité d'apparition d'une translocation c-MYC (Figure 10). Le virus pourrait également participer à la formation de LB en favorisant le potentiel lymphomateux d'un lymphocyte B ayant acquis une translocation c-MYC (Figure 10). Il a, par exemple, été récemment démontré que la protéine virale LMP2A favorisait la prolifération des cellules qui ont une translocation c-myc et auraient dû par conséquent mourir (Bultema et al., 2009). Ce mécanisme permet d'expliquer pourquoi EBV, lorsqu'il est impliqué, est présent dans toutes des cellules du lymphome. De façon surprenante, le profil d'expression des gènes d'EBV rencontré dans les LB est une latence de type I dans laquelle les gènes viraux favorisant la croissance sont réprimés. De plus EBNA1 et les EBERs ne sont pas indispensables à l'immortalisation des lymphocytes B dans les tissus mais certaines expériences suggèrent qu'ils pourraient avoir un effet sur la croissance cellulaire.

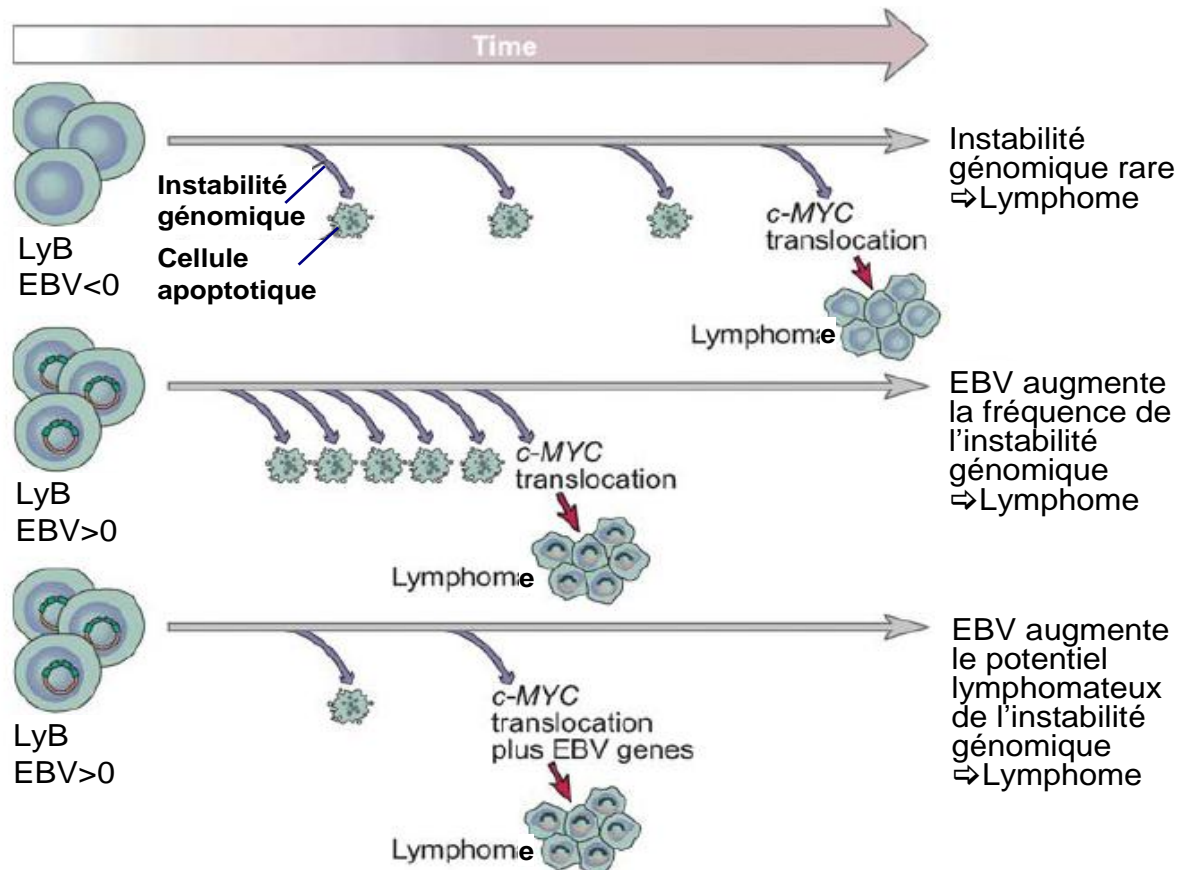


Figure 10 : Hypothèses pour expliquer le rôle de l'infection EBV dans la formation des LB (Kutok and Wang, 2006)

Enfin, comme le lymphome de Burkitt prédomine dans les zones où le paludisme est endémique, l'infection aiguë malarique pourrait inhiber la réponse immunitaire spécifique d'EBV aboutissant ainsi à une augmentation du nombre de virus circulants (Lam et al., 1991).

En revanche, on ne sait pas si cette augmentation reflète la prolifération de cellules B anciennement infectées ou l'augmentation de la production de nouveaux virus et par conséquent l'infection de nouvelles cellules. Les enfants qui vivent dans des zones infestées par la malaria ont des charges virales EBV statistiquement plus élevées que ceux vivant dans une zone non infestée (Rasti et al., 2005) et le traitement anti-malarique fait baisser cette charge virale (Donati et al., 2006). Il a récemment été rapporté qu'une protéine de *Plasmodium falciparum* CIDR1 α stimulait la réplication de l'EBV dans une lignée cellulaire issue d'un LB (lignée Akata) mais également dans des PBMC issus de donneurs sains (Chene et al., 2007). Ces résultats suggèrent que des

antigènes de *Plasmodium falciparum* pourraient être à l'origine d'une réactivation EBV qui augmenterait le risque de développement d'un LB. La réactivation de la multiplication virale semble donc bien être un facteur de risque pour une maladie associée à EBV.

5-4- Le Lymphome de Hodgkin

Le lymphome de Hodgkin classique (LHc) est un néoplasme caractérisé par la présence de cellules de Reed Sternberg (RS) clonales, malignes et multinucléées sur un fond de cellules inflammatoires incluant des granulocytes, des lymphocytes, des plasmocytes et des histiocytes. Les ganglions lymphatiques, la rate, la moelle osseuse sont le plus souvent touchés lors des LHc. La prolifération massive dans ces tissus est due aux cellules de la réaction inflammatoire qui accompagnent les cellules RS. Les cellules RS elles-mêmes ne représentent que moins de 1% de l'ensemble des cellules. Quand il y a une infection à EBV associée, le virus est présent de façon clonale dans les cellules RS. Il exprime un profil de latence de type II.

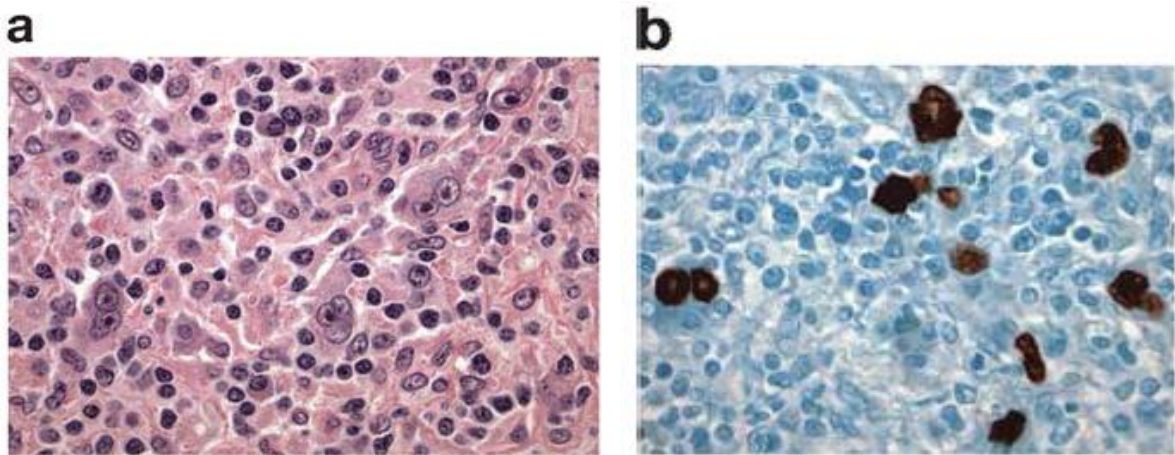


Figure 11 : Histologie d'un lymphome de Hodgkin.

Figure extraite de (Kutok and Wang, 2006)

a) Biopsie d'un ganglion lymphatique dans un LHc, type à cellularité mixte où on peut voir des cellules multinuclées de RS sur un fond de cellules inflammatoires (coloration hématoxyline, eosine objectif x400). b) Hybridation in situ pour les EBERs de EBV sur cette même biopsie (Chromogène : diaminobenzidine, fond : hématoxyline, objectif X400)

Le classement histologique établi par Rye en 1965 permet de classer la maladie de Hodgkin

classique en quatre types :

- 1. le **type 1** riche en lymphocytes ou à prédominance lymphocytaire;
- 2. le **type 2** scléro-nodulaire associé à la présence de sclérose ;
- 3. le **type 3** à cellularité mixte;
- 4. le **type 4** à déplétion lymphocytaire.

Le type 1 ne fait pas partie des formes dites « classiques » et n'est pas associé à la présence d'EBV. L'association à l'EBV se retrouve dans environ 40% des cas de LHc (Glaser et al., 1997) et atteint 100% chez les lymphomes Hodgkiniens des patients sidéens (Glaser et al., 2003), et cette fréquence est plus importante pour les types 3. Ce type est rencontré plus fréquemment chez les hommes et se répartit essentiellement dans 2 classes d'âge : <10 ans ou >50 ans. Les LHc EBV négatifs, sont eux plus fréquents chez les adolescents et adultes jeunes sans prédisposition due au genre. Il est admis que les cellules RS viennent du centre germinal B et ont acquis des mutations délétères dans les gènes des Ig. Ces mutations relèvent d'un processus normal lorsque les

lymphocytes B mûrent dans le centre germinatif et ceci dans le but d'augmenter l'affinité entre l'Ig et les antigènes rencontrés. Une Ig ayant une forte affinité pour l'antigène est d'ailleurs requise pour éviter au lymphocyte B l'entrée en apoptose. Les lymphocytes B présentant des Ig de faible affinité ou non fonctionnelles vont être éliminés par apoptose. Les cellules RS ont des Ig non fonctionnelles et ne sont pourtant pas éliminées. La plupart du temps, elles expriment un haut niveau de NFκB. Ces cellules porteuses de mutation délétère des Ig peuvent être sauvées par l'activation de ce facteur de transcription et l'induction qui s'ensuit des gènes cellulaires antiapoptotiques. On a d'ailleurs retrouvé des mutations du gène IκB dans les cellules RS non infectées par EBV (Jungnickel et al., 2000). La protéine LMP1 de EBV est un activateur potentiel de NFκB et l'activation de NFκB est une étape importante dans l'immortalisation des lymphocytes B infectés par EBV. De plus, LMP2A peut mimer le signal reçu grâce au récepteur Ig (Caldwell et al., 1998). Ainsi l'infection par EBV pourrait fournir un mécanisme alternatif pour permettre aux lymphocytes B anormaux d'échapper à l'apoptose. Ceci illustre comment les produits des gènes du virus EBV peuvent se substituer aux gènes cellulaires pour provoquer des changements qui sont critiques dans le phénomène de cancérisation.

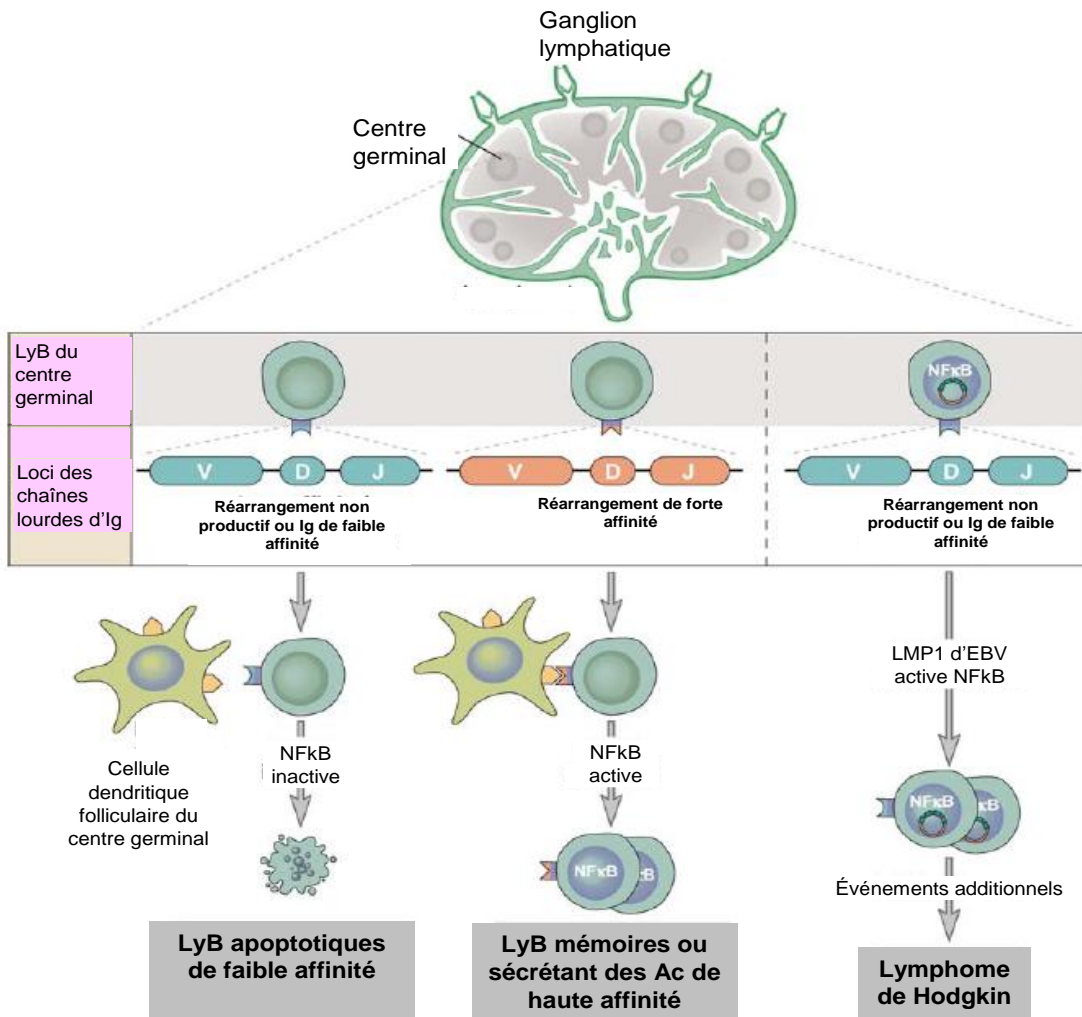


Figure 12 : Hypothèses sur le rôle de l'EBV dans la formation des lymphomes de Hodgkin
 D'après (Kutok and Wang, 2006)
 V : variable, D : diversity, J : joining

5-5-Syndrome lymphoprolifératif post-transplantation (SLPT)

Le SLPT comprend un groupe varié de prolifération de lymphocytes la plupart du temps B qui s'échelonne de la simple prolifération spontanément résolutive aux proliférations B clonales mortelles très proches de lymphomes non Hodgkiniens (LNH). Ces proliférations lymphoïdes ont été classées en quatre grandes catégories par l'OMS :

- Hyperplasies bénignes réactives plasmocytaires ou hyperplasies lymphoïdes MNI-like
- SLPT polymorphe
- SLPT monomorphe B ou T (rares), LNH
- Lymphome de Hodgkin ou assimilé.

Au lieu d'être localisées au niveau du tissu nodal, ces tumeurs sont souvent multifocales et extranodales, fréquemment proches de l'organe greffé ou du tube digestif. Les SLPT peuvent apparaître dans les transplantations d'organes ou lors des greffes de moelle osseuse; leur incidence étant directement liée au degré et à la durée de l'immunosuppression. Les protocoles d'immunosuppression étant plus intensifs et plus prolongés lors des transplantations, la fréquence des SLPT est d'environ 1 % après transplantation de rein à 3-8% après transplantation cœur-poumon. L'importance de l'infiltrat lymphocytaire présent dans l'organe transplanté pourrait également avoir un impact sur la probabilité d'apparition du SLPT. Lors des greffes de moelle osseuse, la fréquence des SLPT est moindre (environ 1%) mais peut augmenter considérablement si le receveur est séronégatif pour EBV et le donneur séropositif. En effet, ces lymphoproliférations sont essentiellement dues aux lymphocytes B infectés du donneur, le receveur ayant la plupart du temps subi un conditionnement myeloablatif. Lors de ces pathologies, les lymphocytes B EBV positifs expriment majoritairement le programme de latence III incluant la production de protéines comme LMP1 et EBNA2 qui sont très importantes pour la croissance et la transformation cellulaire. Pour qu'un lymphocyte B

exprimant le programme viral de croissance survive et évolue en néoplasme, il faut (i) que la cellule soit incapable de répondre aux signaux la conduisant à se différencier en cellule B mémoire et (ii) que la réponse immunitaire soit diminuée de façon à ce que ces lymphoblastes puissent continuer à proliférer. Cela peut arriver si une cellule B non naïve est infectée par le virus de façon fortuite ou si une cellule du centre germinal ou un lymphocyte B mémoire reçoit des signaux qui les poussent à relancer le programme de croissance. Ces cellules n'étant pas des cellules naïves ne peuvent pas se différencier en cellules B mémoires et vont donc continuer à proliférer. Normalement un tel phénomène est rapidement enrayé par la réponse T cytotoxique. Cette hypothèse permet d'expliquer pourquoi, sur le grand nombre de patients immunodéprimés infectés par EBV, seuls quelques uns vont développer un SLPT et rend également compte de la diversité des SLPT observés (Timms et al., 2003). Le rôle de l'immunité cellulaire dans ce processus est attesté par le fait que lorsque l'immunodépression est levée ou diminuée ou que les patients reçoivent des lymphocytes T spécifiques d'EBV du donneur, ces expansions polyclonales régressent (Rooney et al., 1998). Dans certains cas, des modifications génétiques peuvent apparaître dans ces lymphocytes B infectés par EBV, peut-être favorisées par la croissance des cellules infectées ou par l'action des gènes viraux. Ces modifications touchent notamment les gènes de p53 (Knowles et al., 1995), c-MYC (Polack et al., 1996) ou BCL-6 (Cesarman et al., 1998). On aboutit alors à des proliférations clonales plus agressives qui ne régressent pas lorsque l'immunodépression est levée.

Récemment de nombreuses preuves s'accumulent en faveur d'un rôle du cycle lytique viral dans le phénomène de lymphomatogénèse des SLPT. Depuis déjà longtemps, on a rapporté la présence de la protéine ZEBRA, des antigènes précoces ainsi que des ARNm *BZLF1* ou gp350/220 dans une majorité de biopsies de lymphomes (d'autant plus que les maladies étaient disséminées) (Montone et al., 1996). Des ARNm de protéines tardives comme gp 350/220 ont également été retrouvés dans des biopsies de SLPT et de CC suggérant l'existence d'un cycle réplicatif complet (Germi et al., 2004). Plus récemment, Altman et al. ont montré que

l'immortalisation des lymphocytes B par EBV requérait l'expression de deux protéines du cycle lytique *BALF1* et *BHRF1* qui miment Bcl-2 et bloquent ainsi l'apoptose de la cellule (Altmann and Hammerschmidt, 2005). En parallèle, Hong et al. ont démontré que les transactivateurs ZEBRA et Rta favorisaient la production du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et étaient nécessaires au développement d'une tumeur lymphoïde chez une souris SCID (Hong et al., 2005a; Hong et al., 2005b). Enfin en 2009, Gargouri et al. ont montré que la réplication virale d'EBV générait un stress oxydatif dans les cellules B, stress qui pouvait être à l'origine de la transformation maligne de la cellule (Gargouri et al., 2009). L'expression du cycle lytique d'EBV pourrait donc favoriser la survenue de mutations cellulaires via une augmentation du stress oxydant, puis favoriser la survie des cellules atteintes en mimant l'action de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et enfin faciliter l'implantation et l'extension de la tumeur en stimulant la production de VEGF.

Il est donc de plus en plus vraisemblable que le cycle lytique, en parallèle des protéines virales de latence III joue un rôle dans les phénomènes de lymphomato-genèse associés à EBV.

De façon plus générale, une conclusion importante se dégage. Le cycle lytique et les phases de latences virales alternent plus fréquemment que ce que l'on pensait initialement et ces deux états viraux peuvent participer au déclenchement de phénomènes cancéreux ainsi que favoriser leur extension.

6-Traitements antiviraux des pathologies associées au virus

Epstein Barr

Il n'existe pas à ce jour de traitement antiviral ayant une autorisation de mise sur le marché dans le traitement des pathologies associées à EBV. De nombreuses molécules montrent pourtant une efficacité *in vitro* sur EBV. Récemment encore il a été montré que le maribavir (Gershburg et al., 2004a) ou un nouveau dérivé tétrahydrocarbazole le GSK 983 (Harvey et al., 2009) inhibaient la réplication virale en culture cellulaire. Mais les tests *in vitro* ne sont pas standardisés, leur reproductibilité sur différentes lignées cellulaires et avec différents modes d'évaluation (diminution de l'ADN, des ARNm, ...) est imparfait. Au final, très peu de molécules atteignent le stade des essais cliniques. Les seules drogues pour lesquelles de nombreuses données cliniques sont publiées sont les analogues acycliques de nucléosides (aciclovir, ganciclovir et leurs dérivés) ou de nucléotides (cidofovir) et l'analogue de pyrophosphate (foscarnet) qui sont disponibles pour d'autres indications et sont utilisés pour lutter contre les infections herpétiques ou dues au cytomegalovirus (CMV). L'ensemble de ces drogues agit sur l'ADN polymérase virale en inhibant la synthèse d'ADN viral néoformé. Elles ciblent donc le cycle lytique.

De nombreux essais cliniques ont été menés afin d'évaluer l'intérêt du traitement de la MNI par l'aciclovir. Il s'agit, en effet, d'une molécule très peu toxique, qui pourrait donc être utilisée lors des MNI graves ou pour atténuer la clinique des MNI bénignes. En 1999, Torre et Tambini (Torre and Tambini, 1999) publient une méta-analyse de ces essais et concluent à l'absence de bénéfice du traitement des MNI par l'aciclovir. Deux éléments pourraient être à l'origine de cet échec. D'abord, les signes cliniques n'apparaissent qu'après plusieurs semaines de réplication virale et sont le reflet de l'intense réponse immunitaire mise en place pour y faire face. Avec une drogue agissant sur la réplication virale, il faudrait donc idéalement agir beaucoup plus en amont dans le développement de la pathologie. Ensuite les concentrations d'aciclovir retrouvées dans l'oropharynx après une administration orale sont très faibles et pourraient suffire à expliquer la persistance d'une charge virale élevée dans la salive des patients traités (Gershburg

and Pagano, 2005). Pour pallier ces deux inconvénients, Balfour et al. (Balfour et al., 2005) ont réalisé une étude cas contrôle sur 10 patients présentant une MNI qui sont traités 14 jours par valaciclovir dès les 7 premiers jours suivant l'apparition des symptômes. Le valaciclovir est une prodrogue de l'aciclovir qui possède une biodisponibilité 3 à 5 fois meilleure que cette dernière (Soul-Lawton et al., 1995). Ils obtiennent une négativation de la charge virale EBV salivaire chez les patients traités tant que le médicament est administré, les charges virales salivaires remontant dès l'arrêt du traitement pour rejoindre les valeurs obtenues chez les contrôles. Ils observent aussi une diminution significative du nombre de symptômes rapportés et de la sévérité de la maladie. Dans la leucoplasie orale chevelue, on observe également une très bonne réponse au traitement par aciclovir ou valacyclovir avec une disparition des lésions mais les rechutes sont fréquentes à l'arrêt du traitement (Resnick et al., 1988; Walling et al., 2003).

Le cidofovir a été évalué sur un modèle murin de carcinome du cavum (Neyts et al., 1998). Des souris nude étaient xéno greffées avec des CC puis traitées par des injections intra-tumorales ou sous cutanées de cidofovir pendant 5 jours. Dans les deux protocoles, les auteurs montrent que le cidofovir entraîne un arrêt de l'extension tumorale voire permet sa régression (Figure 13). Cependant, l'effet antiviral du cidofovir sur l'ADN polymérase s'additionne peut-être à un effet pro-apoptotique de la molécule qui agirait également en restaurant la fonction de la protéine anti-tumorale p53 dans les cellules infectées (Abdulkarim et al., 2002; Yoshizaki et al., 2008).

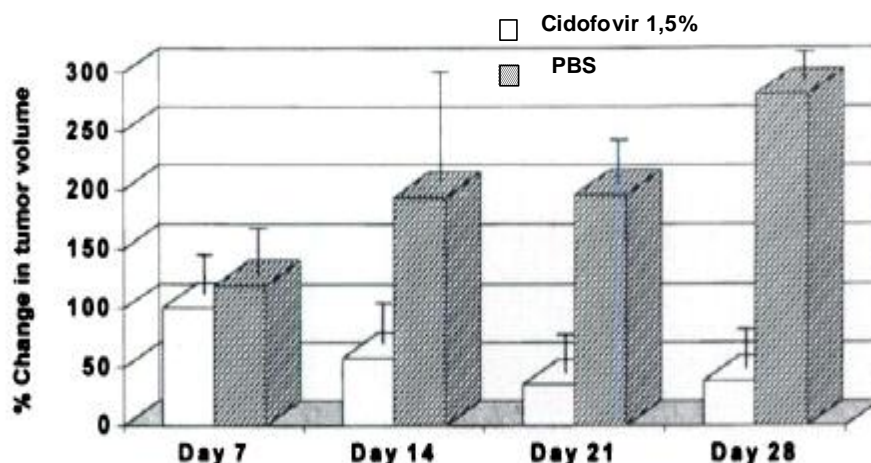


Figure 13 : Traitement par injections intra-tumorales de cidofovir de CC xéno greffés chez des souris athymiques.

Le traitement est initié lorsque les tumeurs atteignent la taille de 0,5 à 1 cm³ et est poursuivi 5 jours. Le groupe cidofovir comprend 7 souris et le groupe témoin PBS 6. Résultat extrait de (Neyts et al., 1998).

Le ganciclovir a également montré son activité dans le traitement de lymphomes cérébraux chez des patients VIH positifs. Bossolasco et al. (Bossolasco et al., 2006) rapportent le cas de huit patients qui ont été traités par ganciclovir comparés à un groupe témoin de 15 patients non traités. La charge virale EBV dans le liquide céphalo-rachidien est significativement plus basse dans le groupe traité et leur médiane de survie est meilleure. Il semblerait donc que là encore le traitement bloquant la réplication virale d'EBV ait une efficacité sur l'évolution de la tumeur.

Dans les lymphomes post-transplantation, le ganciclovir semble également montrer une certaine efficacité. Une étude multicentrique cas témoin sur 100 patients greffés rénaux a étudié les facteurs de risque de développement d'un SLPT. Un traitement prophylactique de 30 jours par ganciclovir (donné en prévention du CMV) diminue de 38% le risque d'apparition d'un SLPT dans la première année suivant la greffe (Odds ratio =0,62 ; Intervalle de confiance = 0,38-1) (Funch et al., 2005). Récemment, Hierro et al. (Hierro et al., 2008) ont rapporté l'utilisation pré-emptive du ganciclovir chez des enfants ayant subi une transplantation hépatique. 34 d'entre eux (/47) étaient séronégatifs pour l'EBV avant transplantation. Dans cette étude un seul patient (2%) développe un SLPT sur un an de suivi alors que le taux est habituellement de l'ordre de 10% dans la population pédiatrique.

L'efficacité de la prévention des pathologies lymphoïdes associées à EBV par des traitements ciblant le cycle lytique plaide en faveur d'un rôle de la réactivation virale dans l'initiation de ces pathologies. De plus, la diminution de l'extension tumorale obtenue avec le même type de thérapeutique montre bien que la réplication de l'EBV joue également un rôle dans le maintien et l'extension des phénomènes cancéreux qui lui sont associés. Enfin, dernier argument, l'immunothérapie adjuvante anti-EBV utilisée avec succès pour traiter ces lymphomes contenait majoritairement des lymphocytes T dirigés contre des antigènes du cycle lytique (Adhikary et al., 2007).

Si les protéines de latence carcinogènes d'EBV jouent certainement un rôle fondamental dans la carcinogénèse associée au virus, le cycle lytique semble également y participer activement. De fait, il constitue une cible thérapeutique intéressante. Les antiviraux actuels ont une cible unique : la polymérase virale et une structure chimique mimant ses substrats. Il reste donc une grande place pour de nouvelles thérapeutiques antivirales basées sur des mécanismes d'action différente et ciblant d'autres protéines du cycle lytique.

II-La protéase du virus Epstein Barr

Les protéases sont des enzymes catalysant spécifiquement l'hydrolyse des liaisons peptidiques. Il en existe 4 classes, les aspartic-protéases, les sérine-protéases, les cystéine-protéases et les métallo-protéases. Mises en évidence au début des années 80, les protéases virales constituent une des cibles privilégiées de la recherche antivirale car elles interviennent dans le cycle de multiplication de nombreux virus. Ainsi, la caractérisation structurale tridimensionnelle de la protéase du VIH a permis l'élaboration de médicaments de type anti-protéase contre ce virus. Tous les inhibiteurs de la protéase du VIH ciblent le site actif de l'enzyme en se liant comme un substrat au niveau du sillon de l'enzyme homodimérique. Il s'agit d'une cavité cylindrique qui lie 6 à 7 acides aminés via des liaisons non covalentes de type ionique, de Van der Waals ou des liaisons hydrogène. Deux aspartates situées au milieu de cette cavité catalysent l'hydrolyse de la liaison amide (Leung et al., 2000). Le saquinavir a été le premier inhibiteur élaboré en fonction de la structure tridimensionnelle d'une protéase virale et a abouti à son utilisation clinique chez l'homme en 1996 (Patick and Potts, 1998). La protéase du virus de l'hépatite C est également une cible thérapeutique pour des antiviraux actuellement en phase d'essais cliniques. Il s'agit cette fois-ci d'une sérine-protéase qui est un monomère constitué de deux domaines : un « trypsine-like » et un « structural zinc-binding site » (Leung et al., 2000). Les protéases des herpesvirus constituent une autre famille de sérine-protéases virales avec des caractéristiques structurales et fonctionnelles communes. Elles sont indispensables à l'infectiosité du virus en permettant l'assemblage de la capsidie à l'intérieur du noyau de la cellule infectée.

1-Du gène à la structure

Même si les protéases de la famille des herpesvirus présentent des caractéristiques, notamment fonctionnelles, communes, leur homologie ne reste importante qu'au sein d'une même sous-famille. A titre d'exemple la protéase du VZV présente 50% d'homologie avec les protéases d'HSV1 et 2 (α herpesvirus) mais seulement 26% avec les CMV (β herpesvirus) (Tableau 4) (Qiu et al., 1997).

Tableau 4 : Pourcentage d'homologies entre les séquences en acides aminés des protéases des herpesvirus.

D'après (Qiu and Abdel-Meguid, 1999)

(%)	HSV-1	HSV-2	VZV	CMV	HHV-6	HHV-7	EBV	HHV-8
EBV	31	31	26	34	29	29	_	45
HHV-8	30	30	30	37	35	30	45	_

La protéase du virus EBV est une polyprotéine de 605 acides aminés codée par le gène BVRF2. Cette polyprotéine a une activité protéase en N-terminal et assemble en C-terminal. Deux sites de clivage existent : l'un situé après l'alanine en position 235 (release site) relarguant la partie protéase N-terminale et l'autre après l'alanine en position 568 (maturation-site) relarguant la forme mature de l'assemble, lui permettant ainsi de quitter la capsid.

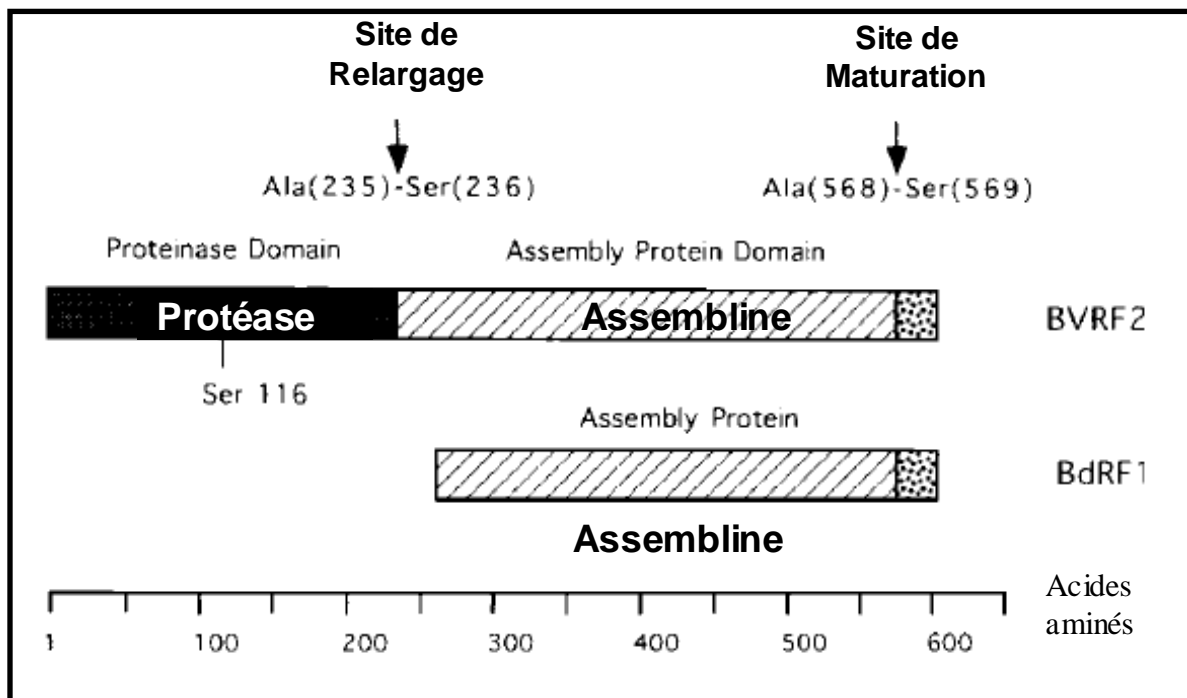


Figure 14 : Représentation schématique des produits des gènes BVRF2 et BdRF1 (Donaghy and Jupp, 1995).

Les sites de clivages sont indiqués en haut de la figure.

	Release site (R)	Maturation site (M)
γ	↓	↓
EBV	ESYLK AS DAPDLQ	<u>KKL</u> VQ AS ASGVAQ
KSHV	PAYLK AS QFPAGI	SNRLE AS SRSSPK
β	ESYVK AS VSPEAA	AGVVN AS CRLLATA
Herpes6	CTYIK AS EPPVEI	PSILN AS SLAPETV
Herpes7	STYIK AS ENLTAN	PSVVN AS LTPGQD
α	HTYLQ AS EKFKMW	GALVN AS SAAHVD
HSV2	HTYLQ AS EKFKIW	GALVN AS SAAHVN
VZV	HVYLQ AS TGYGLA	VNAVE AS SKAPLI

Figure 15 : Conservation des sites de clivages de relargage (R) et de maturation (M) parmi la famille des herpesviridae.

La séquence minimale nécessaire pour le clivage du site M par la protéase d'EBV est soulignée. (Buisson et al., 2002).

Donaghy et al. (Donaghy and Jupp, 1995) montrent que ces clivages sont réalisés par la protéase elle-même. L'assemblin est codée par le gène *BdRF1* qui peut-être directement transcrit et on trouve d'ailleurs 9 fois plus d'ARNm codant pour l'assemblin seule que d'ARNm précurseur de

la polyprotéine (Buisson et al., 2001). Les protéases des herpesvirus catalysent donc une hydrolyse entre une Alanine et une Sérine. Les motifs des sites M et R sont relativement bien conservés parmi les protéases de cette famille de virus et l'acide aminé en amont de l'alanine bien que variable doit être un résidu hydrophile X (Figure 15). Le motif reconnu est donc (V, L, I)-X-A-S. Bien que partageant le même site M, la protéase du HSV1 n'est pas capable de cliver le site M du CMV ; à l'inverse la protéase du CMV peut cliver le site M de HSV1 (Welch et al., 1995). De même la protéase d'EBV peut protéolyser le site M des protéines d'EBV et de CMV mais celle du CMV ne peut protéolyser celle d'EBV (Donaghy and Jupp, 1995). Ceci démontre l'importance des acides aminés se situant en amont et en aval du site de coupure pour la prise en charge du substrat.

La protéase d'EBV a été caractérisée au niveau fonctionnel (Buisson et al., 2001). Comme les protéases des autres herpesvirus humains (Waxman and Darke, 2000), il s'agit d'une sérine-protéase qui a besoin d'être sous forme dimérique pour être active. Il semblerait que la formation de dimère, bien qu'elle ne serve ni à positionner le substrat ni à composer le site actif, permette la stabilisation du site actif de chacun des monomères. Sa structure primaire a été comparée avec celle des autres herpesvirus humains (Figure 17) et sa structure tridimensionnelle a également été résolue (Buisson et al., 2002) (Figure 16). Toutes les protéases des herpesvirus présentent une structure commune comprenant un tonneau β à 7 feuillets entourés par 6 ou 7 hélices α (Nomura et al., 2006). La protéase d'EBV présente une reconnaissance spécifique de sa propre extrémité C-terminale, via une poche de liaison comprenant le résidu Phe210, se situant dans l'autre monomère, et qui interagit via l'interface dimérique. Cela suggère l'existence d'un changement conformationnel du domaine protéasique après le relargage de la partie assemblée suivi par un enfouissement de la nouvelle extrémité C-terminale et d'un possible effet sur l'équilibre monomère-dimère. L'importance de cette partie C terminale a d'ailleurs été confirmée par des expériences de mutagenèse dirigée qui ont montré une activité enzymatique très réduite lorsque cette partie était déléetée. Une hypothèse sur le mécanisme d'activation de la protéase d'EBV via le

relargage de la partie assemblé et sa dimérisation est également proposée par Buisson et al. et est décrite Figure 18.

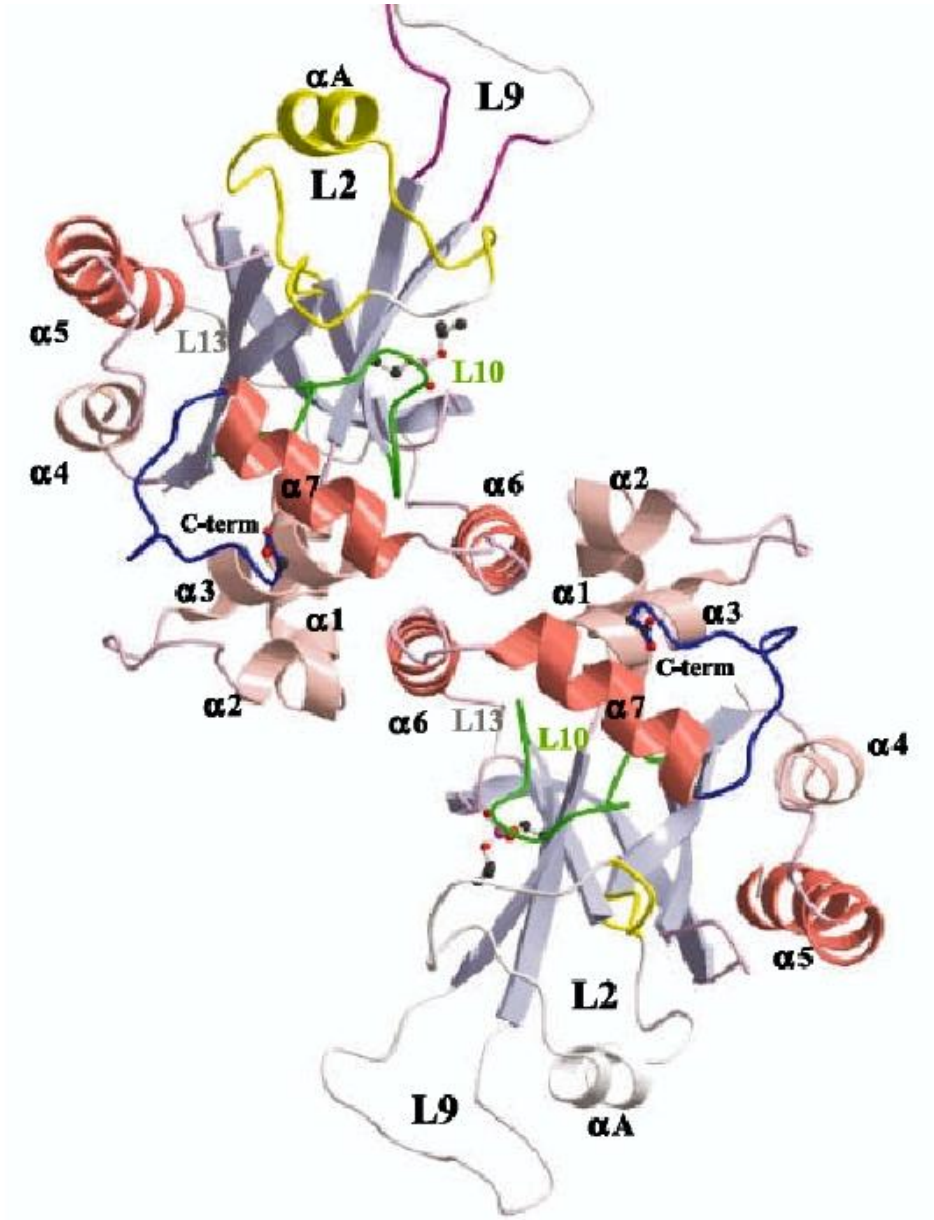


Figure 16 : Structure cristallographique du domaine dimérique de la protéase d'EBV (Buisson et al., 2002).

Le tonneau β central est représenté en gris le groupe oxyanion est représenté en vert.

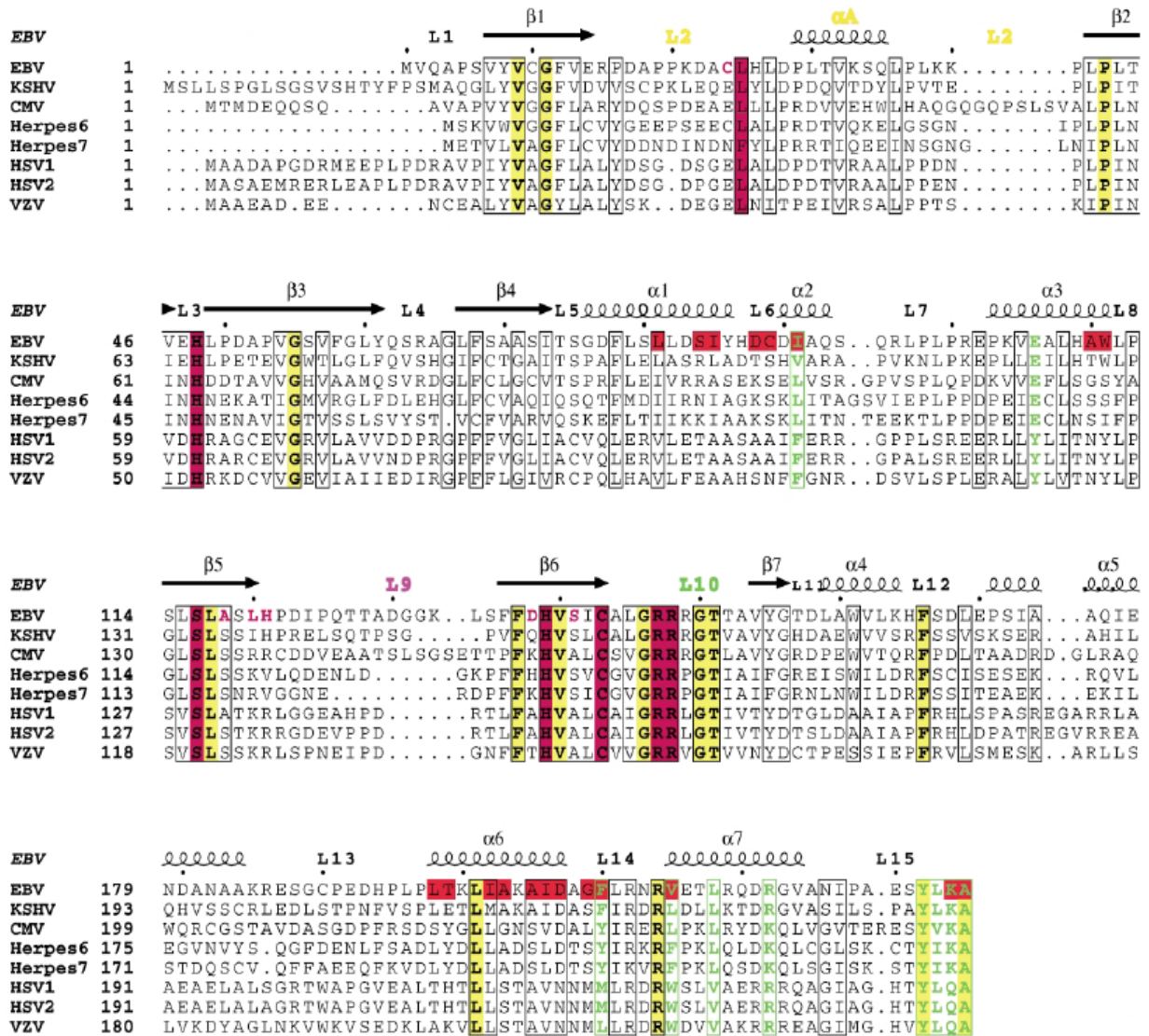


Figure 17: Alignement des séquences en acides aminés des protéases des herpesvirus humains (Buisson et al., 2002).

La structure secondaire est indiquée au dessus. Surlignés en jaune se trouvent les résidus parfaitement conservés, dans les boîtes noires, ceux qui sont conservés. Les résidus constituant le site actif sont représentés en rouge. Les AA de l'interface dimérique sont surlignés en rouge et les résidus impliqués dans la reconnaissance de la partie C-term sont en vert.

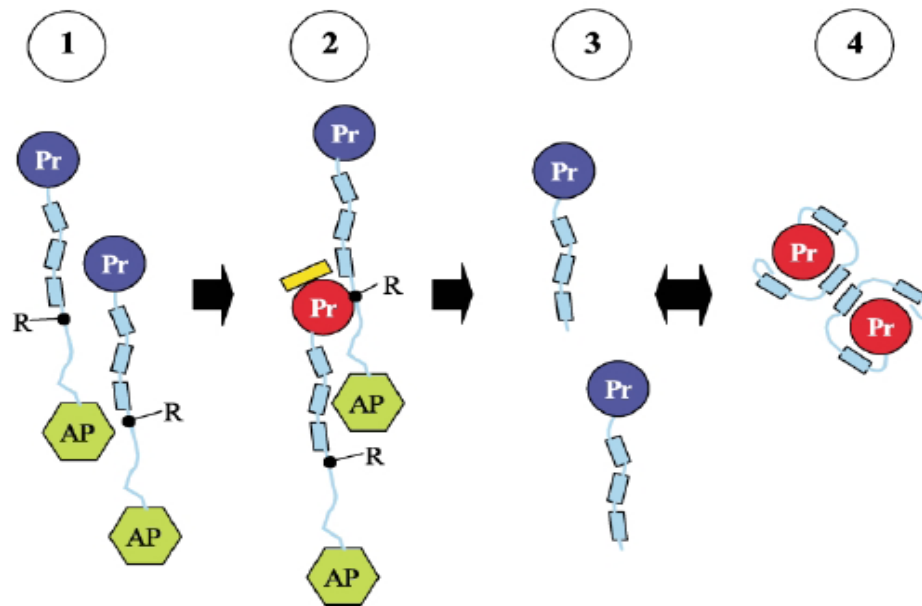


Figure 18 : Hypothèse d'activation de la protéase (Buisson et al., 2002).

R : release site ; 1 : la protéase-assemble est inactive. 2 : un facteur d'activation inconnu (représenté ici en jaune) se lie à la protéase. 3 : la protéase inactive monomérique est libérée après clivage de l'assemble. 4 : c'est cette forme protéase seule qui s'associe alors sous forme de dimère.

Des études portant sur la protéase de HHV8 (Marnett et al., 2004; Nomura et al., 2006) montrent que l'induction de la dimérisation permet une activation concentration-dépendante de l'enzyme. Ce modèle de structure induite diffère de ceux classiquement décrits dans le sens où l'énergie libre provoquée par la dimérisation est utilisée pour organiser le site actif. Dans ce modèle, la dimérisation induit la formation de l'hélice 5 qui contribue majoritairement à l'interface du dimère, et de l'hélice 6 qui est cruciale pour la stabilisation du trou oxyanion, l'ensemble stabilisant ainsi les éléments essentiels à l'activité catalytique. Récemment, via la co-cristallisation d'un substrat hexapeptide diphenylphosphonate avec la protéase de HHV8 (de façon similaire au diisopropylfluorophosphate (DFP) utilisé par Buisson et al. pour la cristallisation de la protéase d'EBV), Lazic et al. (Lazic et al., 2007) montrent que la liaison du substrat à la protéase fournit un autre niveau de régulation de l'activité de la protéase se sur-rajoutant au mécanisme concentration-dépendant décrit précédemment (Figure 19). En effet, ils notent une diminution de 20 fois du K_M entre un substrat tétramérique et un heptamérique. Quel serait l'avantage d'un tel

phénomène pour le virus ? Il a été estimé que la concentration totale de protéase dans les capsides immatures était d'environ $100\mu\text{M}$ (Nomura et al., 2005), ce qui correspond donc à la concentration de substrat pour la catalyse du site R. Cette concentration est de l'ordre du K_M obtenu avec un substrat térapeptidique. Or pour avoir une activité enzymatique suffisante, la concentration du substrat doit être plusieurs fois supérieure au K_M . Ce serait donc pour dépasser ce problème de basse concentration en substrat que les protéases des herpesvirus auraient acquis une spécificité étendue de substrat, en abaissant ainsi le K_M et en augmentant l'efficacité de la catalyse du site R.

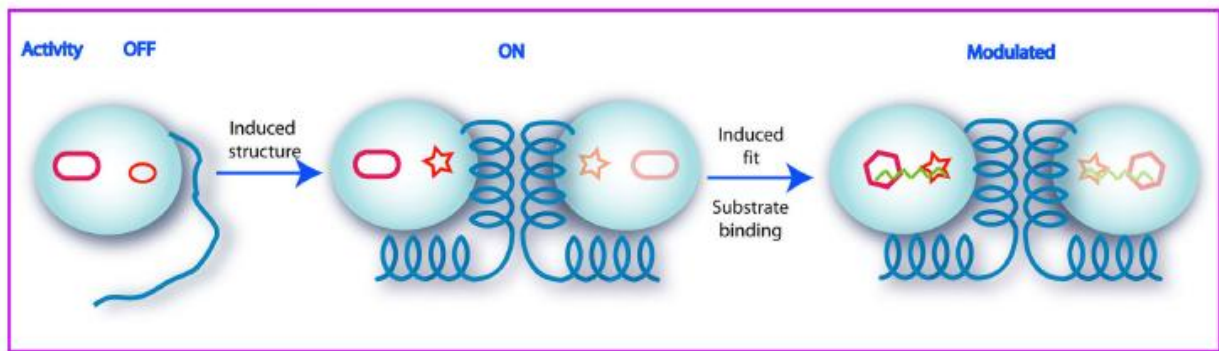


Figure 19 adaptée de (Lazic et al., 2007): **Modèle pour la régulation allostérique des protéases des herpesvirus.**

Les protéases des herpesvirus sont exprimées sous forme de monomères inactifs fusionnés avec la protéine d'assemblage. La dimérisation concentration-dépendante active la protéase via une structure induite aboutissant à la stabilisation du trou oxyanion catalytique. L'activité de la protéase peut ensuite être modulée par la liaison avec des substrats plus étendus via une induction de sites de liaison étendus.

2-De la structure à la fonction

2-1- La protéolyse

Comme on vient de le voir les protéases des herpesvirus sont des sérine-protéases. Leur site actif consiste en une triade catalytique comprenant l'association sérine-histidine-histidine (pour EBV Ser116_His48_His139) au lieu d'une asparagine comme classiquement dans les sérine-protéases. On peut supposer que ce changement d'acide aminé a un effet défavorable sur l'efficacité catalytique des protéases herpesvirus. En effet, lors de l'état de transition, l'histidine en position 48 acquerrait un proton devenant ainsi chargée positivement, mais, à l'inverse d'un acide

aspartique, une histidine n'est pas capable de compenser cette charge positive : elle peut seulement la délocaliser. Le fait que les protéases des herpesvirus soient des enzymes relativement lentes (Hall and Darke, 1995; Margosiak et al., 1996) semble conforter cette hypothèse. Un autre élément important du site actif est le trou oxyanion qui stabilise l'oxygène chargé négativement du substrat lors de l'état de transition.

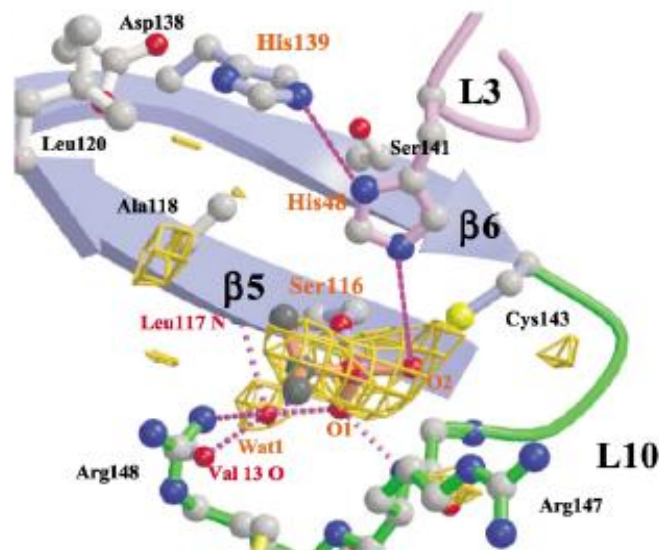


Figure 20 : Le site actif de la protéase d'EBV (Buisson et al., 2002).
La triade catalytique Ser-His-His est représentée en orange et le trou oxyanion en vert.

Le mécanisme protéolytique de ce type d'enzyme est présenté sur la figure 21. Le substrat se lie au site actif en formant un complexe de Michaelis, exposant le groupe carbonyle de la liaison amide à protéolyser à l'attaque nucléophile de l'hydroxyle de la sérine du site actif.

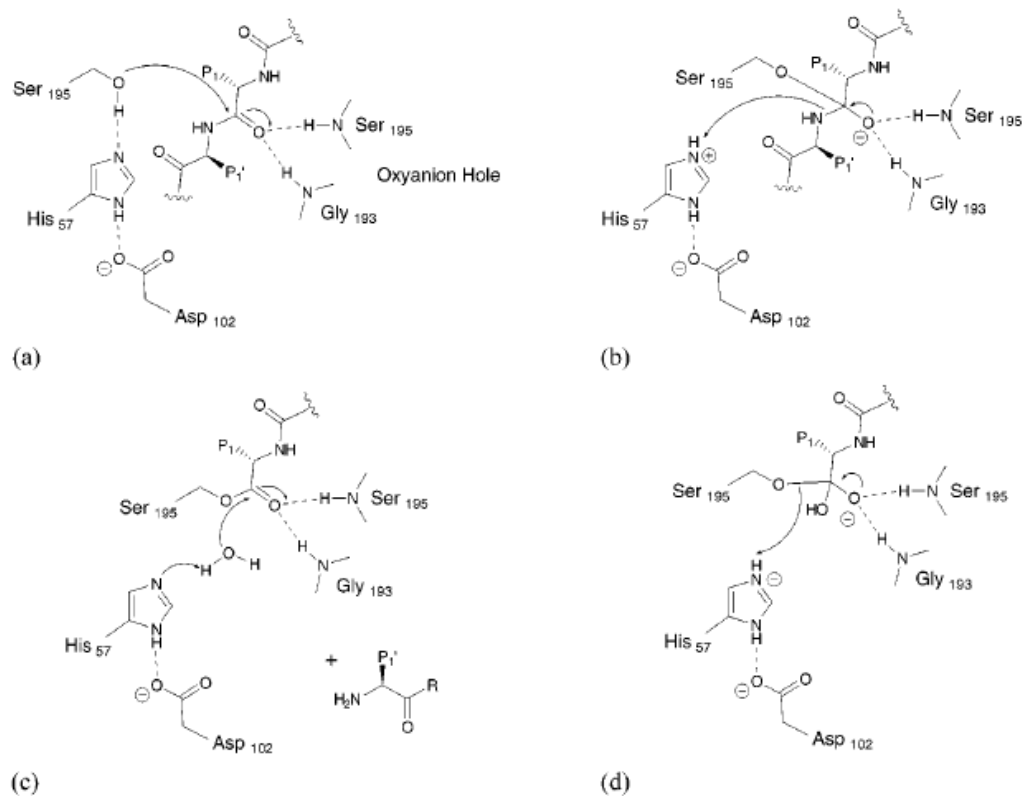


Figure 21 : Mécanisme catalytique général des sérine-protéases (Leung et al., 2000).

(a) La liaison hydrogène avec l'histidine et l'aspartate de la triade catalytique active l'hydroxyle de la sérine permettant l'attaque nucléophile de la liaison amide et formant le premier intermédiaire hémiacétal tétrahédrique. (b) Transfert de proton entre His57 et l'amine du complexe intermédiaire tétrahédrique: cela va favoriser l'expulsion du fragment C terminal du substrat et donne un complexe acyl covalent. (c) L'eau attaque le complexe pour former le deuxième intermédiaire tétraédrique (d) qui va disparaître via la catalyse acide de His57 afin de régénérer la Ser195 et le fragment N-terminal du substrat clivé.

2-2- Rôle fonctionnel

Les protéases des herpesvirus sont essentielles pour la production de virions infectieux (Gao et al., 1994) : elles jouent un rôle fondamental dans l'assemblage de la capside virale qui se passe au niveau du noyau de la cellule infectée. La coque de la capside est essentiellement composée de la protéine majeure de capside qui est liée sous forme de trimère avec les deux protéines triplex (*BORF1* et *BDLF1*). Comme pour les autres herpesvirus, 6 protéines virales semblent requises pour arriver à reformer la capside d'EBV *in vitro* dans un système de cellules d'insecte infectées par des baculovirus (Henson et al., 2009): la protéine majeure de capside *BcLF1*, de protéine triplex 7 *BORF1*, de protéine triplex *BDLF1*, la petite protéine de capside *BFRF3*, la protéine interne de la charpente ou assembline *BdRF1*, et la protéase *BVRF2*.

La participation de la protéase à cet assemblage est complexe. Dans l'étude de Henson et al., les cellules contenant des capsides étaient plus abondantes sur les coupes fines étudiées en microscopie électronique lorsque le baculovirus exprimant la protéase n'était pas inclus dans la co-infection. Ceci pourrait être expliqué par l'activité de la protéase et sa capacité à cliver l'assemblage de sa partie C-terminale, ce qui diminuerait l'efficacité du processus d'assemblage. Ceci avait déjà été montré avec HSV1 dont on a expérimentalement enlevé la partie C terminale correspondant à l'assemblage (Kennard et al., 1995). Lorsque le virus exprimant la protéase est présent, le peu de cellules contenant des capsides sont plus difficiles à voir en microscopie électronique, mais les capsides sont plus faciles à identifier une fois concentrées par sédimentation. D'ailleurs, pour isoler les capsides avec cette technique, l'infection avec le baculovirus-protéase est requise. Les capsides peuvent donc se former en l'absence de protéase comme cela avait été démontré pour HSV (Newcomb et al., 2000; Rixon and McNab, 1999). D'autres éléments montrent pourtant qu'elle participe à toutes les étapes de formation de la capside. Ce sont les interactions protéines-protéines qui dirigent l'auto-assemblage de la capside virale. L'assemblage de cette capside démarrerait dans le cytoplasme. Les études de localisation cellulaire montrent que la protéine majeure de capside (*BcLF1*) est transportée dans le noyau grâce à l'assemblage encore liée à la protéase et que la protéine triplex 2 (*BDLF1*) est transportée efficacement en présence de protéine triplex 1 (*BORF1*) (Adamson et al., 2006; Nicholson et al., 1994; Rixon et al., 1996). Cette interaction de la protéase complète avec la protéine majeure de capside pourrait être un des mécanismes permettant de localiser le complexe de pré-assemblage. La concentration nucléaire de la petite protéine de capside (*BFRF3*) semble également être dépendante de la protéine majeure de capside et de l'assemblage. C'est ce complexe pré-assemblé qui pénétrerait dans le noyau pour former la coque de la capside. On est alors face à une structure fermée qui peut-être qualifiée de pro-capside. C'est à ce niveau qu'a lieu la protéolyse de l'assemblage via la coupure des sites R puis M, permettant ainsi l'encapsidation de l'ADN (Figure 22).

La question est alors de savoir si les capsides fabriquées en l'absence de protéase sont bien fonctionnelles et si elles ont la capacité d'encapsider de l'ADN.

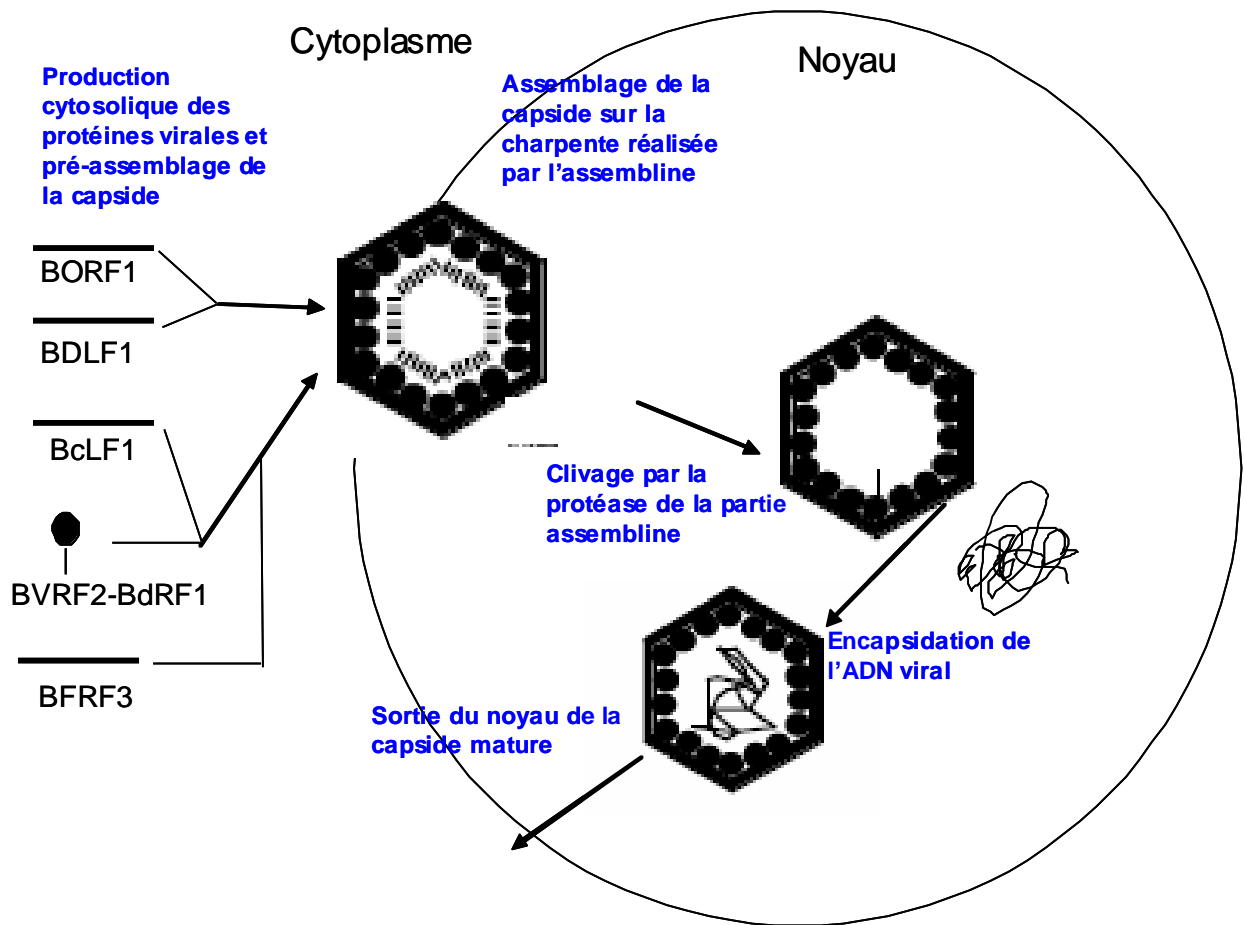


Figure 22 : Représentation schématique de la formation de la capside d'EBV et du rôle de la protéase.

3-Inhibiteurs des protéases des herpesvirus

Une meilleure connaissance du mécanisme et des structures tridimensionnelles des protéases des herpesvirus permet d'envisager le développement d'inhibiteurs de ces enzymes. La plupart du temps ils ont été choisis pour avoir une homologie avec le substrat naturel ou dérivent de molécules connues comme étant des inhibiteurs des sérine-protéases et agissent alors en se liant de façon covalente à l'hydroxyle de la sérine.

3-1- Inhibiteurs généraux des sérine-protéases

Le diisopropyl fluorophosphate (DFP) utilisé pour cristalliser les protéases de HSV1 (DiIanni et al., 1994), du CMV (Stevens et al., 1994) et d'EBV (Buisson et al., 2002) se lie de façon covalente au site actif de ces enzymes et les inhibe, bien que de façon moins importante qu'il n'inhibe la chymotrypsine. D'autres composés utilisés pour inhiber les sérine-protéases sont des hétérocycles comme les benzoxazinones qui sont connues comme des inhibiteurs de l'élastase des leucocytes humains (Uejima et al., 1993). Ils inhibent la sérine du site actif par acylation via leur groupe carbonyle. Les chlorométhylcétones inhibent les sérine-protéases par alkylation de l'histidine du site actif. Beaucoup d'inhibiteurs testés sur la protéase du CMV contiennent un groupement carbonyle activé, comme les α -ketoamides testés également contre la protéase d'EBV par Buisson et al. (Buisson et al., 2006) pour valider leur test enzymatique chromogénique et/ou fluorogénique d'activité de la protéase.

3-2- Les inhibiteurs peptidiques

Des études ont été menées pour définir le substrat minimal pouvant agir par compétition qui se lie à l'enzyme mais n'est pas protéolysé. En se basant sur la séquence du site M du CMV, LaFemina et al. 1996 identifient le peptide VVNA comme étant l'élément minimal. En effet, bien que les protéases requièrent l'occupation d'un site de clivage étendu pour avoir une bonne efficacité, il semblerait que l'essentiel de l'interaction ait lieu au niveau des acides aminés P4-P1 (LaPlante et al., 1998), et des térapeptides seraient donc suffisants pour l'inhiber.

Holskin et al. (Holskin et al., 1995) ont décrit le premier inhibiteur peptidomimétique de la protéase du CMV. A partir de la structure du site M mais pour diminuer la liaison peptidique, ils ont utilisé une amine secondaire dans laquelle le groupe carbonyle est réduit en un groupe méthylène.

3-3- Les « peptidyl activated carbonyl inhibitors »

Bonneau et al. (Bonneau et al., 1997) ont émis l'hypothèse qu'un changement conformationnel était requis pour positionner correctement les résidus du site actif et faciliter l'attaque nucléophile sur le carbonyle qui conduit à la formation du premier intermédiaire tétrahédrique. Cette propriété est différente des sérine-protéases classiques qui agissent sur un mode « clé et serrure ». Cette idée a été reprise par Laplante et al. (Laplante et al., 1999) qui utilisent des techniques de résonance magnétique nucléaire pour étudier la conformation d'inhibiteurs cétone-peptidiques. La partie peptidique induirait la transition vers la forme active de l'enzyme et le groupe cétonique électrophile réagirait en formant une liaison covalente mimant l'état de transition. Les constantes d'inhibition sur la protéase d'EBV de certains de ces composés ont été rapportées par Buisson et al. (Buisson et al., 2006) grâce à l'utilisation de leur test enzymatique (Tableau 5).

Tableau 5 : Constantes d'inhibition de différents composés sur la protéase d'EBV.
Résultats extraits de (Buisson et al., 2006).

Inhibitor	Definition	K_i (μM)
1 Ac-KLVQASA-NH ₂	M-site, positions P5-P2'	24 ^a
2 Aca-LVQA-NH ₂	M-site, positions P5-P1	4100 ^a
3 Ac-SYLKA-OH	R-site, positions P5-P1	1200 ^a
4 Aca-LVQA-CONH ₂	α -Keto-amide inhibitor based on M-site, positions P5-P1	3.7 ^a , 4 ^b
5 Aca-LVQA-CO-D-Phe-NH ₂	α -Keto-amide inhibitor based on M-site, positions P5-P1', with an hydrophobic side chain at P1' position	20 ^b
6 Aca-LVQA-CO-Phe-NH ₂	α -Keto-amide inhibitor based on M-site, positions P5-P1', with an hydrophobic side chain at P1' position	5 ^b
7 Aca-LVQA-CO-Ser-NH ₂	α -Keto-amide inhibitor based on M-site, positions P5-P1'	200 ^b
8 Aca-LVQA-CO-Ser-Ala-NH ₂	α -Keto-amide inhibitor based on M-site, positions P5-P2'	65 ^b
ZnSO ₄	Cysteine-histidine ligand	1700 ^a

^aObtained with the chromogenic assay.

^bObtained with the fluorogenic assay.

III-ARN interférence dans le traitement des virus associés à des cancers

La découverte au début des années 1990 du phénomène naturel d'ARN interférence, d'abord chez les plantes (Napoli et al., 1990; van der Krol et al., 1990) puis, fin 1990, chez les mammifères (Elbashir et al., 2001), a rapidement débouché sur son utilisation comme outil de laboratoire mais également comme moyen thérapeutique. Le potentiel antiviral de l'ARN interférence a été vite pressenti, puis confirmé par de nombreuses études. En effet, les cellules humaines utilisent ce mécanisme de façon naturelle pour se protéger des virus.

1-Historique de la découverte de l'ARN Interférence

La première manifestation du phénomène d'ARNi fut observée de manière fortuite par l'équipe de Richard Jorgensen en 1990 (Napoli et al., 1990). Ce chercheur travaillait sur les mécanismes de coloration des pétunias et souhaitait intensifier la couleur des pétales. Pour cela, il introduisit dans l'organisme par transgénèse une copie du gène CHS (chalcone synthase), responsable de la coloration des fleurs. Il eut la surprise de constater qu'au lieu d'obtenir la couleur pourpre attendue, certaines plantes exprimaient des fleurs blanches : non seulement le transgène ne s'était pas exprimé, mais il avait en plus inhibé l'expression du gène endogène (Figure 23). On parla alors de « co-suppression » consistant à inhiber l'expression d'un gène endogène par l'introduction d'un transgène. Il a alors été démontré que cette co-suppression pouvait s'exprimer au niveau transcriptionnel (TGS : *transcriptional gene silencing*) par altération ou modification de l'ADN, par exemple par méthylation (Vaucheret et al., 1998), et au niveau post-transcriptionnel (PTGS) par dégradation rapide des transcrits homologues dans le cytoplasme (Sijen et al., 2001).



Figure 23 : Découverte de l'ARN interférence.

L'introduction dans des pétunias du gène de la chalcone synthetase aboutit à la co-suppression réversible de l'expression des gènes homologues. extraite de (Napoli et al., 1990)

Cinq ans plus tard, des chercheurs de l'université Cornell (Ithaca, Etat de New York) qui travaillaient sur le ver nématode *Caenorhabditis elegans*, furent à leur tour confrontés à un phénomène curieux d'extinction de gènes. Afin de comprendre la fonction d'une protéine du ver, les généticiens Su Guo et Ken Kemphues avaient entrepris d'en bloquer la synthèse en visant l'ARN messenger (ARNm). Ils avaient utilisé pour cela un ARN anti-sens, de séquence complémentaire à celle de l'ARNm, et capable de s'hybrider avec lui pour empêcher la synthèse de la protéine. En guise de contrôle, ils avaient administré au ver de l'ARN sens, identique à l'ARNm. De façon tout à fait inattendue, ce contrôle positif produisit la même inhibition que l'ARN antisens (Guo and Kemphues, 1995). L'explication de ce phénomène fut enfin fournie en 1998 par Fire et Mello (Fire et al., 1998), ce qui leur a valu le prix Nobel de physiologie et de médecine en 2006. Avec leur équipe, ils testèrent un mélange de plusieurs ARN sens et anti-sens pour éteindre la fonction d'une protéine chez le nématode *C.elegans* (Fire et al., 1998). Leurs observations montrèrent que ce mélange était plus efficace que l'ARN anti-sens seul. En effet, le grand nombre de séquences présentes dans l'échantillon avait favorisé l'association entre brins complémentaires. Et c'est cet ARN double brin présent à l'état de trace qui interférait avec la fonction du gène endogène en réduisant spécifiquement l'expression des protéines (Timmons et al., 2003). Identifié sous le nom de *post transcriptionnal gene silencing* (PTGS) chez les plantes, ce

phénomène d'extinction de l'expression d'un gène par l'introduction d'ARN homologue, fut alors appelé « ARN Interférence » (Klein et al., 2003) dans le règne animal.

2-Mécanisme de l'ARN interférence dans une cellule de mammifère

Au premier abord, il semblait peu probable que le mécanisme de l'ARNi fonctionne chez les vertébrés. En effet, l'introduction d'ARN dans les cellules de mammifères déclenche une forte réaction antivirale non spécifique, appelée réponse interféron de type I, induite par des mécanismes de protection cellulaire associés à l'activation des TLR. Il fallut attendre 2001 pour montrer que l'ARNi existait chez les mammifères (Elbashir et al., 2001). Ces observations permirent de démontrer que la réaction de protection de la cellule était dépendante de la taille de l'ARN. Ce mécanisme d'extinction d'expression de gènes par des ARNdb, d'une taille identique, quelle que soit l'espèce considérée, atteste d'un mécanisme très conservé.

L'ARNi est un phénomène qui se déroule en 2 étapes. Lors de l'étape d'initiation, des boucles ou épingles à cheveux d'ARN partiellement double brin appelées pri-miRNA sont générées au niveau du noyau cellulaire. Ces pri-miRNA sont d'abord clivés par une RNase II Droscha au niveau du noyau (Lee et al., 2003). Les pré-miRNA d'environ 60 à 70 nucléotides qui en résultent ne présentent pas obligatoirement une homologie de séquence parfaite. Ils sont alors exportés du noyau vers le cytoplasme puis pris en charge par une nucléase de type RNase III appelée Dicer (Bernstein et al., 2001) (Figure 24). On peut également faire artificiellement fabriquer l'équivalent de ces pré-miRNA en introduisant dans la cellule un vecteur codant pour un ARN se repliant sous forme d'une épingle à cheveux partiellement double brin. On parle alors d'un « short hairpin RNA » shRNA. Dicer peut également prendre en charge de grands ARN double brin produits par des gènes endogènes, par l'entrée d'un virus, ou introduits artificiellement sous forme d'un transgène (Figure 25). Dicer va alors cliver ces ARN et générer des duplex d'ARN de 21 à 23 nucléotides (nt) avec une extrémité 3' monobrin, appelés miRNA s'ils dérivent

des pré-miRNA ou « small interfering RNA » (siRNA) s'ils dérivent d'un grand ARN double brin. Les siRNA peuvent également être directement transfectés dans une cellule (Figure 25). La protéine DICER est une protéine très conservée lors de l'évolution : on la retrouve chez la levure, dans les plantes, chez *Caenorhabditis elegans*, chez la drosophile, chez la souris et chez l'homme. Ceci souligne l'importance du phénomène d'ARN interférence.

La deuxième étape est celle de clivage. Les siRNA ou miRNA sont incorporés dans un complexe nucléasique le « RNA-induced silencing complex » (RISC) grâce à une protéine liant l'ARN double brin : R2D2 (Liu et al., 2003). Le brin antisens du duplex dirige le complexe RISC pour reconnaître puis cliver les ARN complémentaires présents dans la cellule. Ceci aboutit à la dégradation des ARN complémentaires simple brin non protégés. Le complexe formé par le RISC avec un miRNA se lie à la région 3' non codante des ARNm spécifiques et provoque le clivage de cet ARN par spécificité de base ou par une répression traductionnelle si l'homologie est imparfaite.

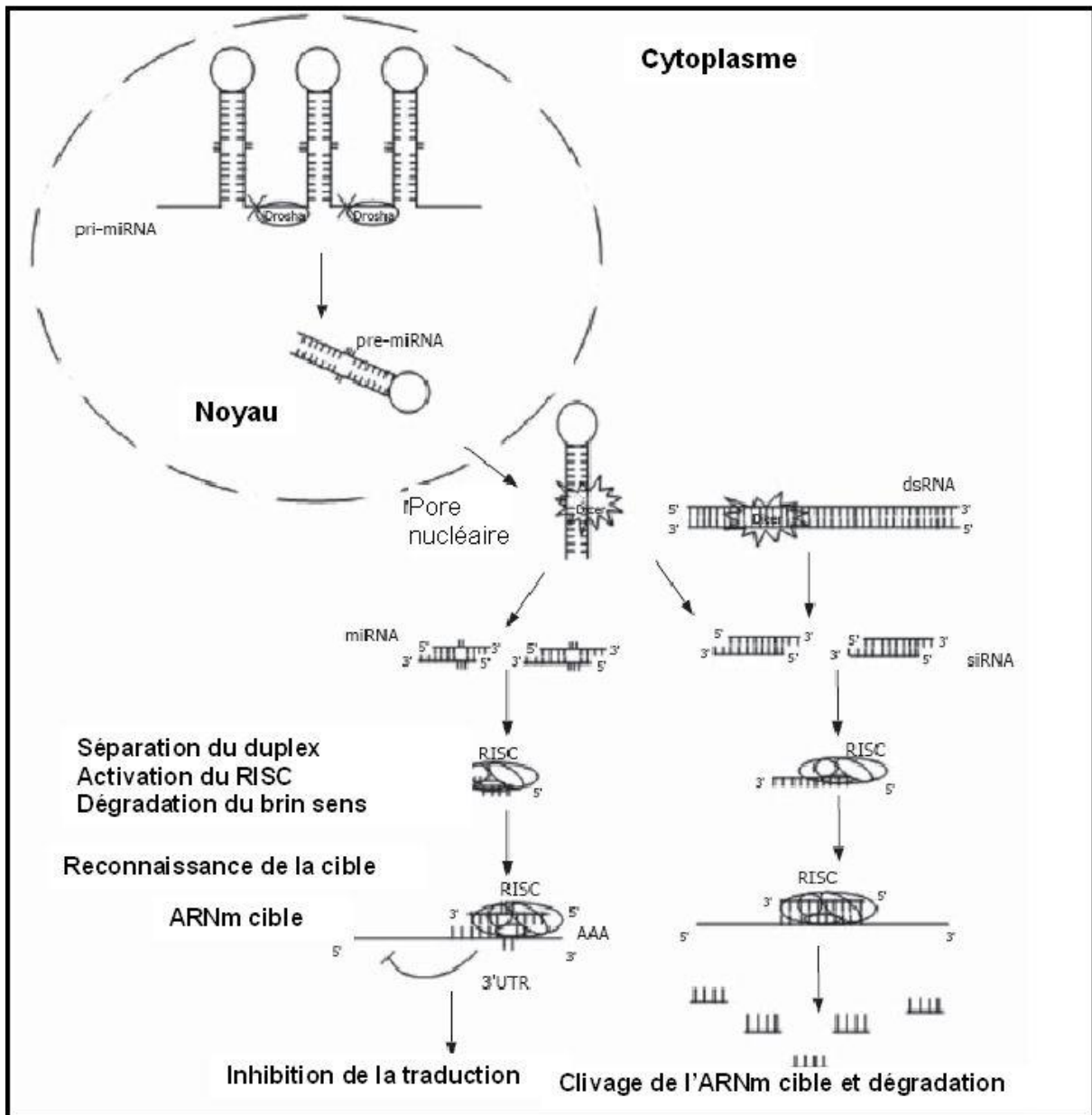


Figure 24 : Schéma des voies d'ARN interférence endogènes d'après Ma et al. (Ma et al., 2007).

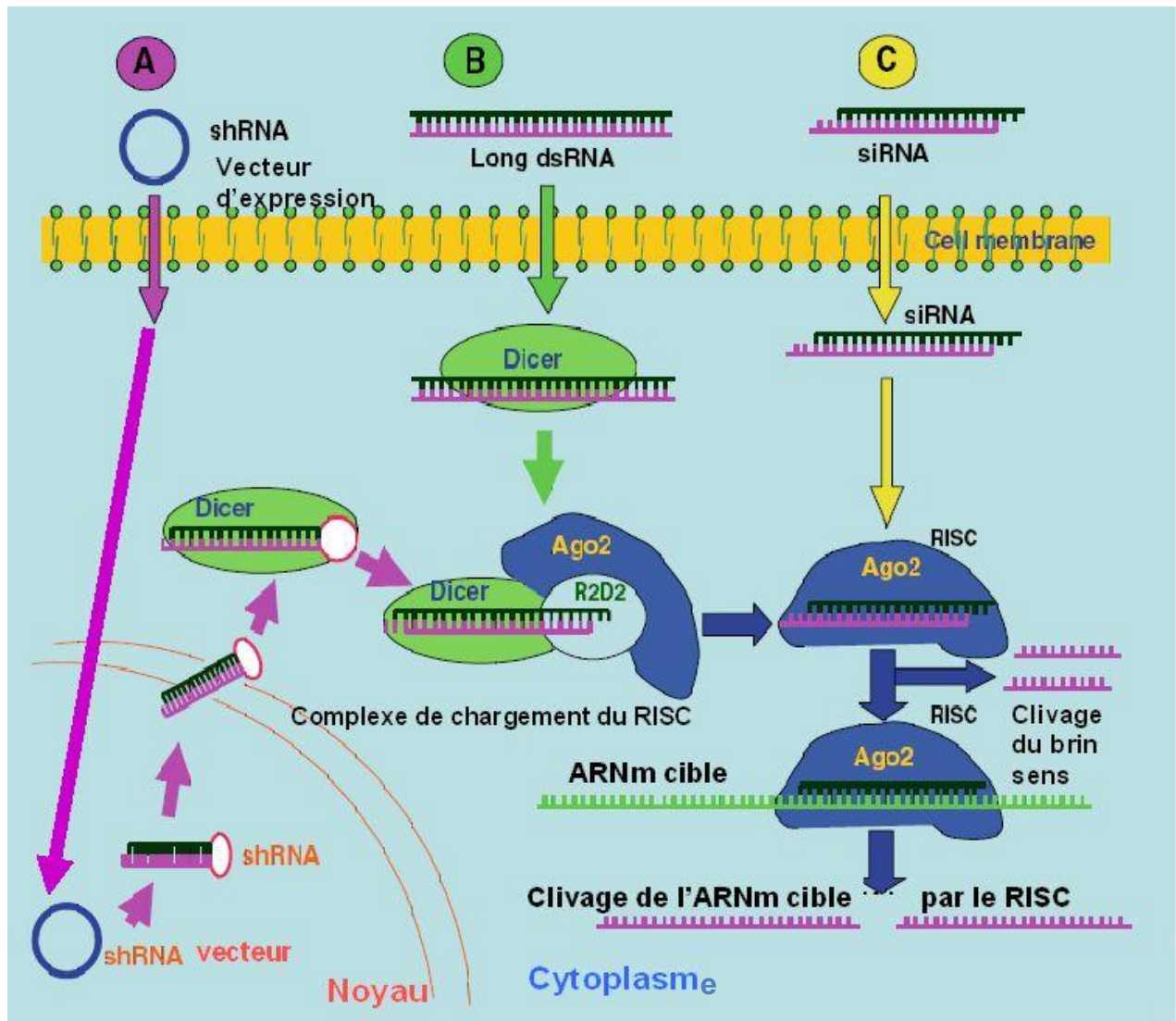


Figure 25 : Voies exogènes pour provoquer un phénomène d'ARN interférence d'après Chen et al. (Chen et al., 2008)

A) le short hairpin RNA (shRNA) est inclus dans un plasmide d'expression. Une fois transfecté dans la cellule, le vecteur va permettre la traduction de la région clonée donnant ainsi le shRNA : épingle à cheveux avec une partie double brin obtenue par complémentarité de séquence. Cet ARN double brin va être pris en charge par l'endonucléase DICER qui va cliver la région non double brin fabriquant ainsi un siRNA. B) Le même phénomène se produit avec un grand ARN double brin (long dsRNA) qui sera également clivé en petits ARN d'une dizaine de nucléotides par DICER. R2D2 est une petite protéine liant l'ARN double brin et permettant le passage du siRNA de DICER au RISC (RNA induced silencing complex) C) Une fois transfectés ou obtenus via DICER, les 2 brins des siRNA vont être séparés par une hélicase associée au RISC : la protéine Argonaute 2 (Ago2). Le brin anti-sens guide le complexe vers l'ARNm apparenté. L'ARN cible est clivé par une ribonucléase du RISC via un mécanisme de reconnaissance par homologie et aboutit à la dégradation de l'ARNm.

3-Fonctions naturelles de l'ARN interférence

S'il peut être mimé de façon artificielle, le phénomène d'ARNi est, à la base, un phénomène naturel. Ainsi l'ARNi semble impliquée dans les processus cellulaires visant à assurer le maintien de l'intégrité du génome, dans la régulation de la transcription et dans la défense antivirale. Le nombre de miRNA décrit ne cesse d'augmenter et de grands efforts sont actuellement entrepris pour comprendre comment, quand, et où les microRNA sont produits et fonctionnent dans les cellules, les tissus et les organismes. Plusieurs groupes ont démontré que les microRNA peuvent être des régulateurs clés dans des processus aussi divers que les étapes précoces de l'embryogenèse (Reinhart et al., 2000), la prolifération, la mort cellulaire (Brennecke et al., 2003), dans la différenciation cellulaire (Chen et al., 2004). Chaque microRNA régulerait l'expression de plusieurs gènes, et comme il existerait des centaines de microRNA chez les eucaryotes supérieurs (Lim et al., 2003; Miranda et al., 2006), le réseau de régulation potentiellement offert par les microRNA est très vaste. Certains auteurs considèrent que chez les eucaryotes supérieurs, le mode de régulation de l'expression des gènes par les microRNA pourrait être d'une importance aussi grande que la régulation exercée par les facteurs transcriptionnels (Filipowicz et al., 2005). D'autre part, il a été démontré chez les plantes que lorsque la machinerie cellulaire impliquée dans l'ARN interférence est déficiente, la réplication des virus de plantes augmente (Mourrain et al., 2000). Cette fonction antivirale a été, par la suite, découverte chez les insectes (Li et al., 2002). Ces mécanismes ont d'ailleurs favorisé une évolution des virus de plantes et d'insectes en faveur de ceux ayant développé des stratégies leur permettant d'inhiber le phénomène d'ARNi de l'hôte par le biais de suppresseurs viraux du *RNA silencing* (SVR) qui permettent à ces virus de se répliquer malgré le mécanisme d'interférence (Voinnet, 2005). Parmi les stratégies utilisées par certains virus pour échapper à la voie de l'ARNi, notons : l'expression de protéines virales suppressives qui interagissent et inactivent certaines composantes de la machinerie de la voie de l'ARNi, la production d'ARN viral résistant à l'action des ribonucléases

et formant des structures secondaires et tertiaires, la séquestration de leur ARN par des protéines virales, et enfin un mécanisme d'édition de l'ARN viral où l'enzyme « *adenosine deaminase that acts on RNA* » (ADAR) convertit l'adénosine en inosine, modifiant ainsi la structure de l'ARN et sa susceptibilité à la voie de l'ARNi. Bien qu'il soit possible d'utiliser les siRNA pour inhiber artificiellement la réplication virale dans les cellules humaines après leur transfection, on ne sait toujours pas si la réponse antivirale de type ARNi est sollicitée de façon naturelle chez les vertébrés et il n'existe pas de données expérimentales solides qui appuieraient l'idée d'un rôle antiviral par ARNi. Il est possible que l'émergence de réponses immunitaires spécialisées qui ne sont pas séquence spécifique (telle que la réponse interféron) aient remplacé ou rendu indétectable le rôle de l'ARNi dans la défense antivirale chez les mammifères (Pfeffer et al., 2005).

4-ARN interférence et infections virales localisées

Les applications antivirales thérapeutiques de l'ARN interférence les plus avancées concernent les infections virales aiguës. Des résultats très intéressants ont été rapportés sur un modèle murin d'infection par l'herpes simplex virus de type 2 (HSV-2) (Palliser et al., 2006). Les souris chez qui l'HSV-2 est inoculé en intra-vaginal développent une maladie symptomatique parfois paralytique voire létale. Un siRNA ciblant une protéine d'HSV-2 liant l'ADN, l'UL29, a été administré mélangé à des lipides à 20 souris en intra-vaginal. Deux ou quatre heures après, les souris ont été infectées par l'HSV-2. Dans le groupe ayant reçu le siRNA, 25% des souris meurent contre 75% dans le groupe contrôle (n=37). De plus, les souris traitées qui survivent arrivent à éliminer le virus dans les 11 jours suivant l'infection, ce qui suggère fortement que le traitement par siRNA a réduit la pathogénicité du virus et a prévenu sa dispersion. Sur cette courte période d'infection, aucune mutation de résistance aux siRNA n'a été mise en évidence.

Les infections respiratoires virales sont également la cible de nombreux traitements par ARN interférence, testés *in vivo*, et souvent dispensés par voie intra-nasale. Des souris infectées par le virus respiratoire syncytial (VRS) ou par un virus parainfluenza (PIV) par voie intra-nasale

ont une multiplication virale maximale dans les poumons 5 à 6 jours plus tard, se manifestant par une fréquence respiratoire augmentée, une sécrétion de mucus, une inflammation importante et une bronchoconstriction. L'instillation intra-nasale d'une souris avec un siRNA contre la protéine P du VRS dilué dans du réactif de transfection 4 heures avant le contact avec le virus, empêche le développement d'une infection. Si le siRNA est donné après le contact viral, l'infection est moins symptomatique et s'élimine plus rapidement. Des expériences mixant un siRNA anti-VRS et un anti-PIV ont également été menées montrant une protection commune contre ces deux virus qui existent souvent en co-infection (Bitko et al., 2005). Un siRNA anti-VRS dirigé contre l'ARNm de la protéine N du VRS : l'ALN-RSV01 développé par Alnylam Pharmaceuticals est actuellement en essai clinique de phase II. La phase I (DeVincenzo et al., 2008) réalisée chez 101 volontaires sains (65 recevant l'ALN-RSV01 à différentes doses et 36 recevant un placebo) a montré que l'instillation intra-nasale d'ALN-RSV01 jusqu'à 150mg 5 fois par jour ne présentait pas d'effet secondaire. Un des essais de phase II (GEMINI) a consisté à tester ALN-RSV01 versus placebo administré une fois par jour pendant 5 jours chez 85 volontaires sains infectés expérimentalement par le VRS. 24 des 43 sujets ayant reçu l'ALN-RSV01 n'ont pas développé d'infection contre 12/42 dans le groupe contrôle. Les patients traités par l'ALN-RSV01 infectés ont des taux de virus circulant environ 40% plus faibles que ceux traités par le placebo. Un deuxième essai de phase II est actuellement en cours et vise à étudier l'effet thérapeutique du siRNA chez des patients transplantés de poumon et ayant une infection à VRS confirmée.

D'autres virus respiratoires ont fait l'objet d'études d'inhibition *in vivo* par ARN interférence. Une étude sur le virus de la grippe (Ge et al., 2004) a utilisé de l'ARN interférence ciblant la nucléoprotéine et la polymérase A du virus, via des siRNA dans un complexe cationique injecté en rétro-orbital à des souris ou via des shRNA dans un vecteur lentiviral administré en intra-thécal ou en rétro-orbital. Les deux techniques montrent une bonne efficacité prophylactique et en post-infection, augmentant la survie et diminuant les titres viraux pulmonaires. Des essais d'injection intra-nasale de siRNA anti-coronavirus-SRAS dilués dans une solution de glucose ont

également été réalisés en prophylactique, simultanément avec l'infection virale et en post-exposition, chez le macaque, et ont montré une bonne efficacité des 3 stratégies (Li et al., 2005a).

Enfin, un dernier type d'infection virale aiguë a été investigué dans un modèle murin : il s'agit des encéphalites dues à deux *flaviviridae* : le virus West Nile (WNV) et le virus de l'encéphalite japonaise (JEV) (Kumar et al., 2006). Un shRNA anti-JEV cloné dans un vecteur lentiviral injecté de façon prophylactique en intracrânien montre 100% d'efficacité (n=10) sur la survie des souris à 21 jours contre 100% de mortalité à 5 jours dans le groupe témoin (n=10). La séquence de ce shRNA présente 5 bases différentes par rapport à la séquence cible du WNV et, de fait, ne protège pas contre l'infection par ce virus. En revanche, des siRNA ciblant une zone de la protéine d'enveloppe virale très conservée entre les deux virus, montrent une bonne efficacité sur les deux virus lorsqu'ils sont injectés en intracrânien sous forme de complexe cationique en post-infection. L'efficacité semble d'autant plus importante que l'injection de siRNA est précoce.

Dans toutes ces études, l'absence de déclenchement d'une réaction inflammatoire ou de production d'interféron a été contrôlée.

L'ensemble de ces essais thérapeutiques réalisés chez l'animal et même, pour certains, chez l'homme, attestent de l'efficacité de la stratégie d'ARN interférence pour lutter contre les infections virales aiguës. La diffusion des siRNA complexés avec des lipides ou des particules cationiques semble suffisante pour protéger des muqueuses ou le système nerveux central suite à une injection locale. L'effet obtenu est cependant plus marqué lors des injections prophylactiques qu'en post-exposition. Il semblerait ainsi que les siRNA agissent au niveau des cellules à proximité desquelles ils ont été administrés mais perdent de leur efficacité dès que l'infection virale s'est propagée. Afin de pouvoir utiliser cette stratégie thérapeutique prometteuse dans les infections virales chroniques, il faudra donc obtenir une diffusion systémique de ces siRNA et voir s'ils restent actifs *in vivo* dans ce contexte.

5-ARN interférence et infections virales associées à des cancers

Le traitement par ARN interférence des infections virales chroniques soulève un certain nombre de questions. L'infection chronique s'établit souvent dans un compartiment différent de celui par lequel le virus est entré dans l'organisme. Il faut donc faire pénétrer les siRNA dans le ou les compartiments souhaités. De plus, le traitement d'un certain nombre d'infections virales chroniques bute sur le fait que les molécules antivirales utilisées permettent de limiter la multiplication du virus sans pour autant éradiquer le virus et il ne semble pas que l'ARN interférence soit en mesure de faire beaucoup mieux. Une approche très intéressante concernant le VIH a été publiée récemment (Anderson et al., 2007). Dans cette étude, les chercheurs s'attachent à rendre résistants à l'infection par le VIH les lymphocytes et les monocytes /macrophages en ciblant les cellules souches hématopoïétiques CD34+ à l'origine de ces cellules. De plus, pour éviter l'apparition de mutations de résistance, très fréquentes avec ce virus, ils multiplient les cibles (cellulaires et virales) et les moyens d'intervention thérapeutique. Pour cela, ils utilisent un vecteur lentiviral codant pour des shRNA ciblant une protéine cellulaire (CCR5) et deux virales (tat et rev), un ARN antisens diminuant la transcription de l'ARNm de tat et un ribozyme anti-CCR5. Les auteurs confirment *in vivo* chez la souris SCID que les cellules CD34 modifiées se différencient correctement en cellules fonctionnelles qui, *in vitro*, montrent une résistance à l'infection par le VIH (Li et al., 2005b). Ces résultats devraient permettre le démarrage d'un essai clinique de phase I aux Etats-Unis. Les auteurs démontrent ici une utilisation commune de différentes techniques d'inhibition transcriptionnelle et post-transcriptionnelle contre des cibles virales et cellulaires avec une vectorisation permettant de réduire l'impact thérapeutique au compartiment cellulaire souhaité. L'utilisation conjointe d'une cible cellulaire et de cibles virales est intéressante, néanmoins, quelques réserves persistent sur le risque encouru en détruisant un récepteur endogène et notamment le CCR5 (Khan et al., 2006; Lim et al., 2008).

Dans les infections virales chroniques ayant un potentiel cancérigène, l'ARNi paraît une voie thérapeutique prometteuse. En effet, dans le cas d'un phénomène cancéreux viro-induit, les protéines oncogènes sont exogènes et il semble alors plus facile de les cibler car cela n'interférera pas avec la fonction physiologique des protéines endogènes. Cependant, la conjugaison de cibles virales et de cibles cellulaires est de plus en plus souvent envisagée et peut permettre de contourner d'autres problèmes liés à l'ARNi antivirale, comme l'apparition de mutation de résistance. Dans le contexte des pathologies malignes associées à l'EBV, des études explorent effectivement ces deux voies. Un résumé des essais d'ARN interférence ciblant d'autres virus associés à des cancers chez l'homme est présenté ci-dessous.

5-1-Papillomavirus humain (HPV)

Les papillomavirus sont des virus à ADN double brin ayant un tropisme spécifique pour les épithéliums malpighiens. La responsabilité des HPV dits à haut risque oncogène (HPV16, 18, 31, 33...) dans la survenue des dysplasies et cancers épidermoïdes du col de l'utérus est maintenant bien établie (Mougin et al., 2009; Walboomers et al., 1999). La capacité transformante des HPV vient de la sur-expression des gènes précoces E6 et E7 qui résulte de l'intégration du génome viral dans la cellule hôte via la coupure de E2, régulateur négatif de la transcription de E6 et E7. La sur-expression de ces protéines E6 et E7 semble une cible intéressante pour l'ARN interférence. En effet, il a été démontré que l'inhibition de E6 et E7 par ARNi aboutissait à une croissance ralentie (Yoshinouchi et al., 2003) et à l'apoptose ou à la sénescence de la cellule hôte (Butz et al., 2003; Hall and Alexander, 2003). L'inhibition par ARNi de ces 2 protéines aboutit également à une sensibilité quatre fois plus importante des cellules Hela au traitement traditionnel de ce cancer qu'est le cis-platine (Putral et al., 2005). En effet, l'inhibition par ARNi des protéines E6 et E7 provoque une augmentation du taux de p53 et de pRb (phosphorylated retinoblastoma protein) (Lea et al., 2007; Sima et al., 2008). Niu et al. montrent *in vivo* chez des souris nude que l'inhibition par ARNi des protéines virales E6 et E7 aboutit à une diminution de plus de 50% du

volume des tumeurs (Niu et al., 2006). Ces résultats sont confirmés par Yamato et al. chez la souris SCID (Yamato et al., 2008). Jonson et al., en utilisant une injection de siRNA anti-E6 tous les 3 jours pendant 35 jours, montrent une éradication de la tumeur chez 70% des souris traitées (n=10) 30 jours après l'arrêt du traitement (Jonson et al., 2008).

5-2- Hépatite C

Le virus de l'hépatite C (VHC) appartient à la famille des *Flaviviridae* et son génome est un ARN positif de 9,6kb. L'infection chronique par le VHC est un facteur de risque majeur pour le développement d'un carcinome hépatocellulaire via la prolifération cellulaire et la régénération dans un contexte d'inflammation et de stress oxydatif qui facilite l'apparition d'altérations génétiques et épigénétiques. Certaines protéines du VHC ont un spectre d'activité étendu et peuvent perturber la signalisation cellulaire, la transcription des gènes, la transformation, l'apoptose, des réarrangements membranaires, le trafic de vésicules de la régulation de la traduction. Des siRNA ou shRNA ciblant l'ARN de la région 5'NC, le core, NS3, NS4b et NS5b ont montré, seuls ou en association, leur efficacité sur la réplication des réplicons dans des cellules Huh-7 [pour revue voir Ma et al., 2007]. Afin d'éviter le problème de l'émergence de virus résistants, certaines équipes ont préféré cibler des gènes cellulaires co-facteurs potentiels régulant la réplication du VHC (Nakagawa et al., 2005; Zhang et al., 2004). Enfin, la combinaison de l'inhibition de l'expression de gènes viraux et cellulaires a été envisagée. Korf et al. utilisent des siRNA antiviraux ciblant les régions non traduites conservées 5'et 3'UTR et antigène cellulaire visant la sous-unité 7 du protéasome et l'antigène HuR (Korf et al., 2005). Toujours sur un système de réplicons, ils démontrent un effet additif de ces deux groupes de siRNA. Henry et al. ont également montré l'efficacité du double ciblage de la région 5'UTR et de la polymérase NS5b ainsi que du récepteur cellulaire CD81 par des shRNA vectorisés avec un lentivirus (Henry et al., 2006). Enfin, deux essais chez la souris visant la polymérase virale et la région 5'UTR, ont apporté la preuve de l'efficacité *in vivo* de la stratégie d'ARN interférence anti-VHC (McCaffrey

et al., 2002) (Wang et al., 2005). Dans ces deux essais, les siRNA ont été délivrés, vectorisés ou non par une injection hydrodynamique dans la queue de la souris.

5-3- Hépatite B

Le virus de l'hépatite B (VHB) appartient à la famille des *Hepadnaviridae* et son génome est un ADN partiellement double brin de 3,2kb qui contient quatre cadres de lectures qui se chevauchent : l'un codant pour la polymérase (P), le second pour la protéine du Core (C), un pour la glycoprotéine de surface (S) et le dernier pour la protéine X (HBX). Les études épidémiologiques, virologiques et vaccinales ont démontré depuis longtemps qu'il existe une relation entre l'infection chronique par le VHB et le CHC. Le fait que le VHB soit un virus à ADN comportant une étape de réplication ARN en fait un bon candidat pour l'inhibition par ARN interférence. En effet, dans le noyau de la cellule hôte, une fois le double brin complété, l'ADN circularisé du VHB sert de matrice à la transcription en ARN pré-génomique de 3,5kb et de 3 ARN messagers sub-génomiques. L'ARN pré-génomique permet la traduction des protéines du Core, de l'antigène HBe et de la polymérase mais il sert également de matrice pour la reverse transcription du brin négatif d'ADN du VHB permettant ainsi la réplication du génome viral. Les ARNm de 2,4 et 2,1 kb codent pour les protéines d'enveloppe et l'ARNm de 0,7kb pour la protéine X (Figure 26). Tous ces transcrits utilisent le même signal de polyadénylation situé à l'intérieur de la région codant pour la protéine du Core.

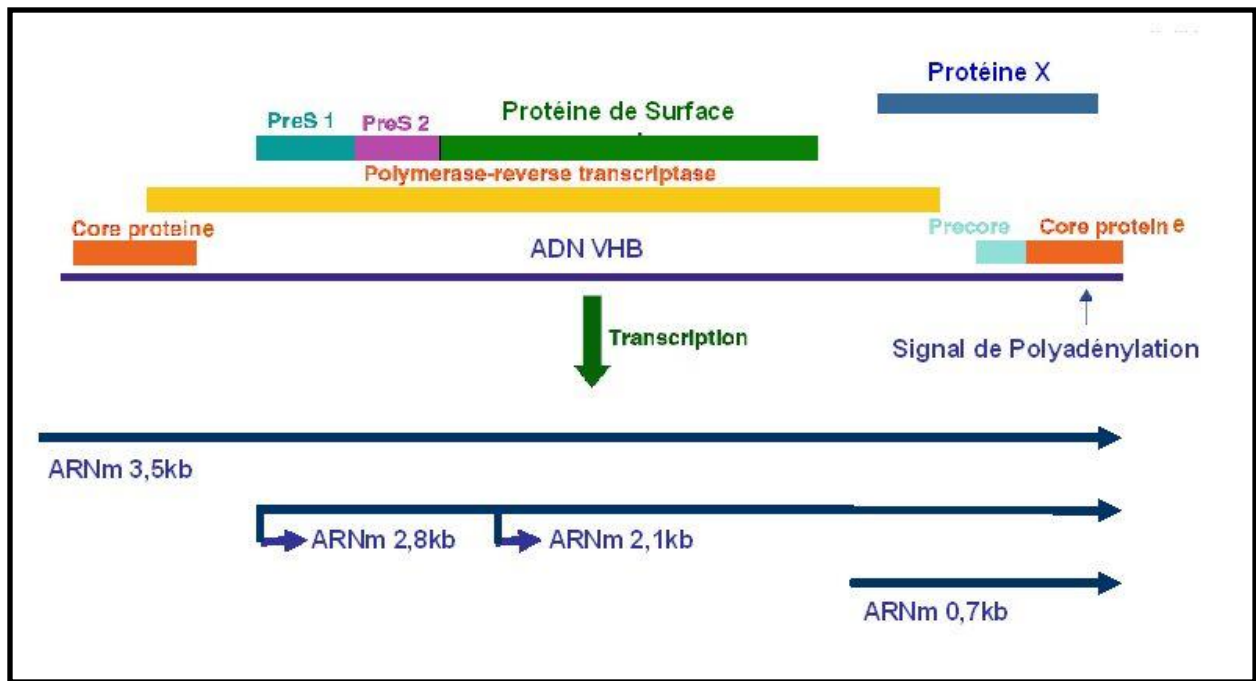


Figure 26 : Représentation schématique des différents ARN messagers (ARNm) transcrits à partir du génome du VHB. adaptée de Chen et al. (Chen et al., 2008)

Tous les transcrits des gènes du VHB ont été ciblés par ARN interférence notamment la région préC/C, l'AgHBs et l'HBx. Avec des siRNA transfectés dans des cellules de type HepG2 2.2.15 ou Huh7 exprimant le VHB, les différentes études montrent une diminution séquence spécifique de l'ARN et une chute de la production d'ADN viral. Ceci s'accompagne d'une baisse de la sécrétion d'AgHBs et/ou HBe dans le milieu de culture [pour revue voir Chen et al. (Chen et al., 2008)]. De façon intéressante, Hamasaki et al., en ciblant avec des siRNA l'ARN pré-génomique de 3,5kb, montrent sa diminution, ainsi que celle de la sécrétion d'AgHBe mais pas des ARNm de 2,4 et 2,1 kb ni du taux d'AgHBs (Hamasaki et al., 2003). La présence d'un site commun de polyadénylation (PA) en 3' des quatre intermédiaires de réplication en fait une cible intéressante pour l'ARN interférence. Konishi et al. montrent une diminution de 78% de l'AgHBs avec le siRNA anti-PA, contre seulement respectivement 67% et 42% des siRNA anti-preC et anti-S (Konishi et al., 2003).

Même si le taux de mutation du VHB, virus à ADN, est moins élevé que celui de virus à ARN comme le VIH ou le VHC, sa réplication caractérisée sur la retro-transcription d'un ARN pré-génomique le rend sensible aux mutations induites par l'absence d'activité correctrice de la

reverse-transcriptase. Ce virus présente donc différents génotypes et une certaine capacité à développer des mutations de résistance aux traitements antiviraux. Cette relative variabilité amène à sélectionner les cibles pour l'ARN interférence dans des régions stables communes aux différents génotypes et peu soumises aux mutations. Cependant l'utilisation concomitante de différentes cibles virales semble la meilleure solution. Chen et al. rapportent une inhibition plus importante avec un mélange de siRNA ayant différentes cibles qu'avec des siRNA individuels (Chen et al., 2005). La combinaison d'un siRNA anti-VHB avec un analogue nucléosidique visant la polymérase virale (lamivudine) a également montré un effet puissant de diminution de la réplication virale : la sécrétion de l'AgHBs est diminuée de 92% 96h après traitement par siRNA + lamivudine contre 23% avec la lamivudine seule (Li et al., 2007b). A l'inverse des antiviraux actuels basés sur l'inhibition de la polymérase virale, l'ARN interférence anti-VHB présente l'avantage de ne pas nécessiter la synthèse d'ADN et ouvre ainsi la voie à un traitement possible du réservoir d'ADN superenroulé intra-hépatocytaire (Arbutnot et al., 2007). Cependant l'effet obtenu avec des siRNA en culture cellulaire est transitoire et difficilement reproductible *in vivo*. C'est pourquoi il est important de vectoriser ces siRNA sous forme d'un plasmide codant pour des shRNA. Le Tableau 6 présente un certain nombre d'études récentes testant des shRNAs anti-VHB *in vivo*.

Tableau 6 : Etudes in vivo d'ARN interférence anti-VHB

Gène cible	Promoteur	Vecteur	Hôte	Mode d'administration	Résultats	Référence
C, S, P, X	HumU6	Plas mide	Souris IC et ID (NOD/SCID) ¹	IHVC	77-92% ↘ ARN et ADN VHB	(McCaffrey et al., 2003)
C, S	-	siRNA	Souris NMRI ¹	IHVC	65% ↘ AgHBs 80% ↘ AgHBe pour le anti-S	(Klein et al., 2003)
S	Hum H1 et U6	Plas mide	Souris BALB/c et transgéniques VHB	IHVC	↘ >99% AgHBs Après co-injection chez Balb-c ² ↘ 75% AgHBs En souris transgéniques ²	(Cheng et al., 2005)
S, P, X	Hum H1	Plas mide	Souris transgéniques VHB	IHVC	95-99% ↘ AgHBs et AgHBe (foie)	(Wu et al., 2005)
S, P, X	Mouse U6	Adénovirus	Souris transgéniques VHB	IHVC	>90% ↘ ARN et ADN VHB >80% ↘ AgHBs >70% ↘ AgHBe	(Uprichard et al., 2005)
C, S, P, X	Hum H1	dsAAV2/8	Souris transgéniques VHB	Injection intrasplénique	>80% ↘ AgHBs et AgHBe	(Chen et al., 2007)
	-	siRNA complexés par apoA1	Souris BALB/c	IHVC	75% ↘ AgHBs	(Kim et al., 2007)
C, S, P	Hum H1	Plas mide	Souris BALB/c	IHVC	>90% ↘ AgHBs >60% ↘ ADN VHB 76% ↘ AgHBe (foie)	(Ying et al., 2007)
S	polIII	AAV8	Souris transgéniques VHB	IHVC	85% ↘ AgHBs 94% ↘ ADN VHB	(Giering et al., 2008)
C, S, P, X	HumU6	Adénovirus	Souris transgéniques VHB	IHVC	68% ↘ AgHBs	(Rauschhuber et al., 2008)
S	Hum H1	dsAAV7, 8 et 9	Souris transgéniques VHB	Injection intraveineuse	83% ↘ ARN 94% ↘ ADN	(Chen et al., 2008)

IHVC : Injection hydrodynamique veine caudale

Hum : humain, IC : immunocompétente, ID : immunodéprimée,

¹ : Injection d'un plasmide codant pour le VHB simultanément au traitement par ARN interférence

dsAAV2/8 : adenoassociatedvirus2 pseudotypé avec la protéine d'enveloppe du sérotype AAV8 et un génome double brin facilitant la pénétration puis la multiplication dans les hépatocytes

² : inhibition également constatée au niveau du foie par western et northern blot

L'ensemble de ces travaux démontre l'efficacité de l'ARN interférence anti-VHB dans un modèle murin. Afin de se rapprocher du modèle humain, il faudrait avoir une infection de la quasi-totalité des hépatocytes. Hors, Klein C et al., en traitant des souris par injection hydrodynamique d'un

plasmide contenant le génome du VHB, montrent qu'à peine plus de 10% des hépatocytes expriment le transgène (Klein et al., 2003). Les travaux réalisés sur souris transgéniques permettent d'avoir une expression virale plus importante au niveau du foie et ainsi d'explorer le modèle thérapeutique de façon plus réaliste. Afin d'améliorer également le taux d'expression intra-hépatocytaire des shRNAs, certaines équipes ont utilisé des complexes avec l'apolipoprotéine A1 (Kim et al., 2007), d'autres ont utilisé un promoteur de la polymérase II spécifique du foie (Giering et al., 2008), et enfin, de nombreuses équipes ont développé des vecteurs viraux basés sur des adénovirus qui ont un tropisme naturel pour le foie. Ainsi, Uprichard et al. (Uprichard et al., 2005) et Carmona et al. (Carmona et al., 2006), ont démontré que des shRNAs délivrés par un adénovirus recombinant pouvaient supprimer la réplication du VHB dans un modèle de souris transgénique infectée par le VHB. D'autres virus comme l'« Adeno Associated Virus » (AAV), non pathogène et moins immunogène, (Chen et al., 2007) ou le « Human Foamy Virus » (Sun et al., 2007) ont également été utilisés. Leur pouvoir d'infecter des hépatocytes peut être augmenté par modification des protéines de surface. Par exemple, Chen et al. utilisent un AAV2 pseudotypé avec la protéine d'enveloppe du sérotype AAV8 facilitant la pénétration dans les hépatocytes. La même équipe a également testé la possibilité d'utiliser des AAV de différents sérotypes (AAV8, 7 et 9) afin de pouvoir réaliser plusieurs injections de shRNA chez un même individu sans déclencher de réponse immunitaire (Chen et al., 2009). Sur un modèle de souris transgénique, ils obtiennent ainsi une diminution de l'ADN du VHB sur plus de 22 semaines. Cependant, l'importance de maîtriser la dose de siRNA a été soulignée par la mort de souris transgéniques traitées par un AAV8 délivrant un shRNA anti-VHB à forte dose alors que des doses plus faibles supprimaient efficacement la réplication virale (Grimm et al., 2006). Le phénomène impliqué serait une compétition avec les miRNA endogènes.

Enfin, un essai clinique de phase I sur 15 patients atteints d'hépatite B chronique non cirrhotiques a débuté en 2008 et utiliserait des shRNA ciblant les régions pré-C, pré-S1, préS2/S et HBx (Haasnoot et al., 2007).

5-4- Human T-cell leukemia virus (HTLV)

Pour ce rétrovirus associé à des leucémies et des lymphomes chez l'homme, l'ARNi n'a pas été utilisée à notre connaissance comme outil thérapeutique mais davantage comme moyen de compréhension de mécanisme d'interaction entre le virus et les protéines cellulaires favorisant les phénomènes de cancérisation. Ainsi, l'équipe de Waldele et al. a pu montrer l'importance du rôle d'une protéine inhibitrice de l'apoptose (HIAP-1) dont l'expression est stimulée par la protéine Tax du HTLV dans l'immortalisation des lymphocytes transformés (Waldele et al., 2006).

5-5- Herpes virus humain de type 8 (HHV8)

L'herpes virus de type 8 est un *gamma-herpesviridae* dont le cycle viral se divise en une phase de latence et un cycle lytique répliatif. Les gènes exprimés pendant la phase de latence semblent directement impliqués dans la prolifération cellulaire, l'échappement immunitaire et la prévention de l'apoptose [pour revue voir Schulz, 2006]. Un ensemble de gènes appelé le cluster oncogénique comprenant vFLIP, vcyclin, LANA (latency-associated nuclear antigen), exprimé pendant cette phase de latence semble regrouper l'essentiel des protéines oncogéniques de HHV8 (Boshoff et al., 1998). vFLIP active la voie NFkB et son inhibition dans les cellules issues de lymphome des séreuses et aboutit à l'apoptose. Vcyclin favorise la progression cellulaire vers les phases G1 et S en agissant comme une cycline de type D. LANA permet le maintien de l'épisome viral et interfère avec p53, pRb, etc. pour prévenir l'apoptose. Godfrey et al. montrent une inhibition de ce complexe par des shRNA vectorisés avec un lentivirus en culture cellulaire et *in vivo* dans un modèle de souris immunodéprimée infectée par le virus HHV8 *via* des cellules JSC-1 injectées en intrapéritonéal (Godfrey et al., 2005). Plus récemment, une autre équipe a mis en évidence par ARNi le rôle du *viral interferon-regulatory factor-3* (vIRF-3) dans la prolifération cellulaire de cellules de lymphome des séreuses (Wies et al., 2008).

L'ARN interférence, notamment grâce à l'utilisation de vecteurs viraux, semble donc pouvoir avoir une place dans la thérapeutique des infections virales chroniques oncogènes.

6- ARN interférence et Virus Epstein Barr

6-1- EBV et l'ARN interférence : un déséquilibre naturel ?

Les microRNAs constituent une couche encore peu explorée des interactions entre virus et cellules. Ils pourraient cependant avoir un rôle très important dans la régulation cellulaire induite par les virus.

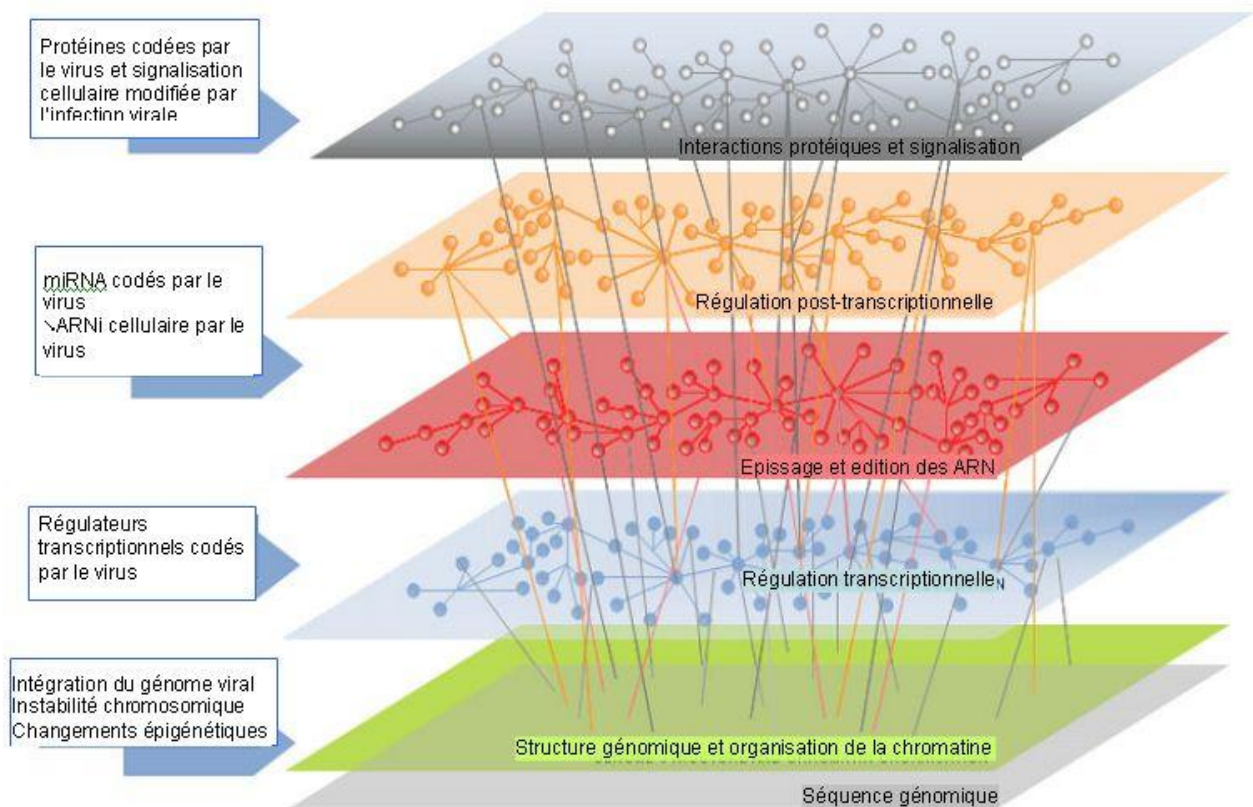


Figure 27 : Modélisation des interactions virus-cellule hôte dans l'oncogenèse viro-induite et place de l'ARNi d'après Scaria et al. (Scaria and Jadhav, 2007).

Les plans schématisent les différents niveaux de régulation cellulaire et les interconnexions entre ces niveaux sont indiquées par des lignes fines. Les encarts sur la gauche indiquent les mécanismes par lesquels les virus interfèrent avec ces mécanismes de régulation.

La découverte de miRNA viraux notamment chez des virus oncogènes humains comme HHV8 ou EBV laisse penser qu'ils pourraient intervenir dans les phénomènes d'oncogenèse viro-induite

(Figure 27) [pour revue voir Moens, 2009]. Le virus Epstein Barr code lui-même pour au moins 23 miRNA (Grundhoff et al., 2006; Pfeffer and Voinnet, 2006). La majorité de ces miRNA dérive des clusters de gènes *BART* et *BHRF* (Figure 28). L'importance du rôle de ces miRNA semble soulignée par le fait que 16 d'entre eux sont retrouvés avec très peu de modifications chez le lymphocryptovirus rhésus qui est séparé de l'EBV par plus de 13 millions d'années d'évolution (Cai et al., 2006).

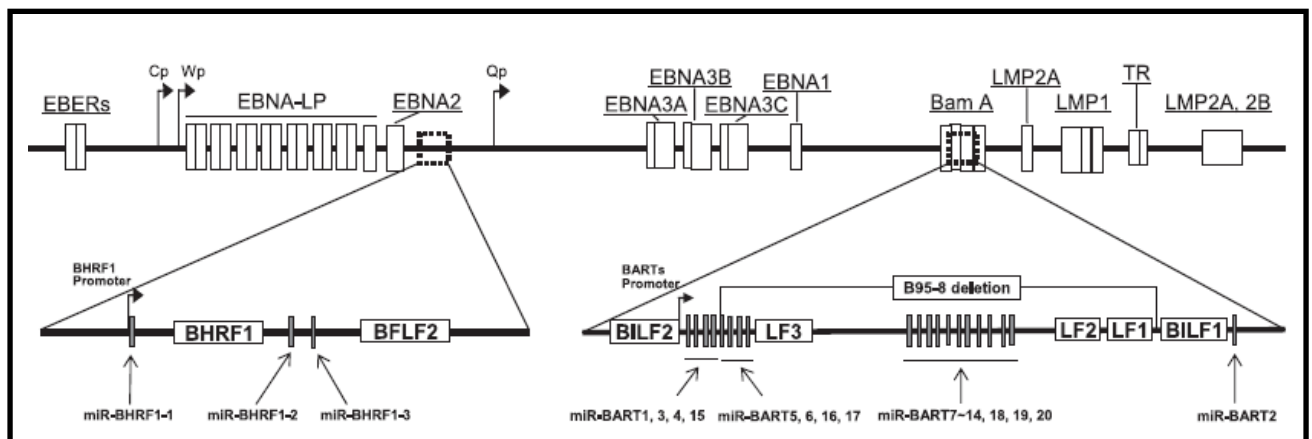


Figure 28 : Emplacement des miRNA de EBV (extrait de (Kim do et al., 2007)).

En haut sont représentés les gènes de latence et leurs promoteurs (sous forme de flèches). En bas sont agrandis les sites où se trouvent les miRNA. La zone de délétion de B95-8 est représentée entre crochets.

Cependant, la plupart des miRNA *BART* se situent dans la zone délétée du virus B95-8 qui est pourtant transformant et permet la réplication virale. Dans les carcinomes gastriques, le cluster de miRNA dérivant de *BART* est induit contrairement à celui dérivant de *BHRF* (Kim do et al., 2007). Le même phénomène est observé dans le carcinome du cavum (Cosmopoulos et al., 2009; Zhu et al., 2009). Les miRNA *BART* pourraient avoir un rôle important dans la transformation cellulaire EBV induite des cellules épithéliales mais pas dans celle des lymphocytes B. Les miRNA *BART* pourraient aussi être essentiels à la survie de la cellule infectée *in vivo* et non *in vitro*, étant donné que ces miRNA semblent pouvoir jouer un rôle dans l'échappement des cellules infectées au système immunitaire. Ces miRNA pourraient aussi supporter la prolifération cellulaire et diminuer l'apoptose dans les conditions de mauvais approvisionnement en oxygène que l'on trouve au

niveau des tissus tumoraux. Comme pouvait le laisser supposer la localisation des miR-*BHRF1*-2 et 3 à l'intérieur de la région 3' non codante de l'ARNm codant pour *BHRF1*, la plupart des miRNAs codés par EBV augmentent lors de l'induction du cycle lytique à l'exception de miR-*BHRF1*-1 (Cai et al., 2006). Outre ceux diminuant la réponse immunitaire antivirale (Pedersen et al., 2007; Yeung et al., 2007), les transcrits ciblés par ces miRNA sont souvent des gènes associés à l'apoptose ou des suppresseurs de tumeur (Scaria and Jadhav, 2007).

Il a été récemment démontré que lors de l'établissement de la phase de latence de l'EBV, le virus inhibait de façon importante (environ 20x) 99,5% des miRNA présents sur une puce présentant l'essentiel des miRNA cellulaires (Godshalk et al., 2008). De nombreux miRNA suppresseurs de tumeurs étaient très fortement diminués dans les lymphocytes en cours d'immortalisation par EBV alors qu'ils restaient inchangés dans ceux activés avec des immunoglobulines. L'évaluation du taux de miRNA cellulaire a également été réalisée sur des cellules épithéliales portant le génome d'EBV dans lesquelles le cycle lytique d'EBV a été induit par transfection du transactivateur ZEBRA. Un nombre beaucoup moins important de miRNA cellulaires semble affecté par cette réactivation virale mais de façon intéressante les auteurs retrouvent une nette augmentation des miRNA miR-146a et b (x112 vs contrôle) qui avaient déjà été décrits comme étant induits par LMP1 (Motsch et al., 2007). Ces miRNA interviennent dans les voies de signalisation lymphocytaire et leur cible pourrait être les « toll-like » récepteurs et les voies de signalisation des cytokines. L'inhibition du miR-146a aboutit à une légère augmentation de l'expression de ZEBRA suggérant peut-être un effet inhibiteur du miR-146a sur la progression du cycle lytique. D'autre part, Navarro et al. (Navarro et al., 2008) ont récemment mis en évidence sur des biopsies ganglionnaires, un groupe de 25 miRNA dont l'augmentation ou la diminution permet de distinguer le lymphome de Hodgkin classique d'une hyper-réactivité du ganglion lymphatique. La présence de l'EBV dans les cellules étudiées influence l'expression d'une dizaine de miRNA dont un appartenant au groupe de 25 décrit ci-dessus. Les auteurs en concluent qu'EBV n'est pas un élément transformant primaire dans le lymphome de Hodgkin classique. Au

total, les interactions entre les miRNA viraux et les transcrits cellulaires, de même qu'entre les miRNA cellulaires et les transcrits viraux, semblent très complexes mais leur équilibre et leur déséquilibre sont peut-être la clé de phénomènes de régulations fines entre les virus et leur cellules hôtes.

6-2- L'ARN interférence : un outil pour mieux comprendre les interactions entre EBV et les protéines cellulaires

Si des miRNA naturellement synthétisés par le virus ou par la cellule hôte peuvent jouer un rôle important dans la régulation de l'interaction virus-hôte, l'ARNi peut également être utilisée comme outil de biologie cellulaire afin de caractériser des interactions entre des protéines virales et des facteurs cellulaires. L'EBV est souvent incriminé dans la régulation positive ou négative des voies de signalisation cellulaire. L'ARNi se positionne alors comme une technique d'exploration fonctionnelle. En effet, la mise en évidence de protéines cellulaires interagissant avec des protéines virales peut-être réalisée par des techniques de sur-expression ou abolition du gène viral (Gruhne et al., 2009; Horikawa et al., 2007; Kim et al., 2008; Kondo et al., 2007; Li et al., 2007a; Peng et al., 2007), de co-immunoprécipitation (Le Clorennec et al., 2008; Wiedmer et al., 2008), de puces (Pan et al., 2008; Spender et al., 2006), ou autres... De même, l'impact de la protéine virale incriminée sur le promoteur du gène cible putatif est souvent étudié via la co-transfection d'un plasmide codant pour un gène rapporteur comme la luciférase sous le contrôle du promoteur à étudier et d'un plasmide codant pour la protéine virale (Bhende et al., 2007; Pan et al., 2008; Terrin et al., 2008; Wiedmer et al., 2008). L'ARNi vient ensuite confirmer le rôle de la protéine cellulaire, le plus souvent en l'inhibant via des siRNA. L'inhibition de la protéine cellulaire abolit l'effet observé une fois le virus EBV induit, attestant ainsi du rôle de cette protéine dans les phénomènes cellulaires déclenchés par l'infection à EBV.

La protéine LMP1 d'EBV a un rôle majeur dans les phénomènes de transformation induits par le virus. C'est pourquoi de nombreuses études s'attachent à mieux comprendre son fonctionnement et ses interactions avec la cellule hôte. Un certain nombre de ces études récentes utilisant l'ARNi comme outil de compréhension du rôle de LMP1 dans la transformation cellulaire sont résumées dans le Tableau 7. Les protéines virales LMP2A, EBNA1, EBNA2, EBNALP, Zta et Rta ont fait également l'objet d'études, sur leurs interactions cellulaires, utilisant des siRNA, elles sont également résumées dans le Tableau 7.

Tableau 7 : siRNAs anti-EBV utilisés dans le but d'élucider des interactions entre le virus et ces cellules hôtes.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Protéine virale	Protéine cellulaire	ARNi	Modèle cellulaire	Résultat	Ref
LMP1	GSK3β	siRNA anti-GSK3β	BJAB, LB Plasmide LMP1	↗ induction IL10 LMP1 induite ↳ LMP1 active l'IL10 via PI3K	(Lambert and Martinez, 2007)
	CXCR4	siRNA anti-LMP1	C666 (CC)	↳ LMP1 régule positivement CXCR4 et favorise sa translocation dans le noyau des cellules tumorales	(Li et al., 2007b)
	Twist	siRNA anti-Twist	MDCK Plasmide LMP1	Réversion de l'activation de la transition épithéliale-mésenchymateuse induite par LMP1 ↳ LMP1 augmente la mobilité cellulaire et l'invasibilité via Twist	(Horikawa et al., 2007)
	MUC1	siRNA anti-MUC1	Ad-AH (CC EBV<0) + plasmide LMP1	Restauration de l'adhésion cellulaire ↳ LMP1 diminue l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire en activant MUC1	(Kondo et al., 2007)
	SNARK	siRNA anti-SNARK	MCF7 (cancer du sein) + plasmide LMP1	Inhibe l'augmentation de la survie cellulaire induite par LMP1 ↳ LMP1 augmente la survie cellulaire via la sérine/thréonine kinase SNARK	(Kim et al., 2008)
	hTERT	siRNA anti-LMP1	LCL	↘ du nombre de transcrit hTERT ↳ LMP1 induit le promoteur du domaine catalytique hTERT augmentant ainsi l'activité télomérase dans les LyB et facilitant leur survie	(Terrin et al., 2008)
	Fas	siRNA anti-Fas	LCL	Abolition de l'apoptose des LyB induits par LMP1 ↳ rôle de Fas comme médiateur de la cytotoxicité induite par LMP1	(Le Clorenec et al., 2008)
	TRAF6	shRNA anti-TRAF6	Raji	↘ ubiquitination et activité d'IRF7 (interferon regulatory factor) ↳ TRAF6 est essentielle pour permettre l'induction de l'IRF7 par LMP1 : cette induction se fait grâce à un mécanisme d'ubiquitination	(Ning et al., 2008)
LMP2A	Sp1	siRNA anti-Sp1	HEK 293 + plasmide LMP2A	↘ l'augmentation de la mobilité cellulaire induite par LMP2A ↳ LMP2A augmente l'expression de l'UDP-glucose déshydrogénase via la liaison de Sp1 à son promoteur	(Pan et al., 2008)
EBNA1	NOX2 (NADPH oxydase)	siRNA anti-NOX2	BJAB (LyB) + plasmide EBNA1	↘ de la production de radicaux libres de l'oxygène (RLO) et dommages de l'ADN induits par EBNA1 ↳ EBNA1 augmente la production de RLO et produit des dommages de l'ADN via l'activation de la NADPH oxydase NOX2	(Gruhne et al., 2009)
EBNALP & EBNA2	Hsp72	siRNA anti-Hsp72	BJAB + plasmides EBNALP et EBNA2	↘ la co-activation d'EBNALP et d'EBNA2 ↳ Hsp72 chaperonne EBNALP augmentant ainsi les effets de la régulation transcriptionnelle positive par EBNALP des promoteurs induits par EBNA2	(Peng et al., 2007)
EBNA2	p55α	siRNA anti-p55α	LCL EREB 2.5	↘ de la prolifération cellulaire et ↗ de l'apoptose ↳ p55α est la cible fonctionnelle d'EBNA2 dans PI3K	(Spender et al., 2006)
Zta	mtSSB	siRNA anti-mtSSB	ZKO-293 (s 293 KO pour BZLF1) + plasmide Zta	↘ la réplication lytique d'EBV mais effet faible sur l'activation de la transcription ↳ L'interaction de Zta avec mtSSB facilite la réplication lytique d'EBV et bloque la réplication mitochondriale	(Wiedmer et al., 2008)
Zta et Rta	XBP-1	siRNA anti-XBP-1	LCL	↘ l'expression du cycle lytique viral ↳ XBP1 permet la réactivation d'EBV en liaison avec la différenciation plasmocytaire	(Bhende et al., 2007)
BKRF3	UNG	siRNA anti-BKRF3 et siRNA anti-UNG	NA(CC EBVpositive)+ plasmide BKRF3	Faible ↘ de la réplication de l'ADN avec siRNA anti-BKRF3 et forte ↘ avec siRNA anti-UNG ↳ l'activité UNG de BKRF3 peut-être complétée par les UNG cellulaires	(Lu et al., 2007)

GSK3β: glycogène synthase kinase 3β PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase : son activation est nécessaire à la répression de GSK3 : une de ces sous-unité catalytique est p55α

Twist : régulateur transcriptionnel fondamental de l'embryogénèse

MUC1 : glycoprotéine mucinogène exprimée à la surface des cellules épithéliales et de leurs carcinomes : elle joue un rôle dans l'invasion tumorale et la formation de métastases en s'opposant à l'adhésion cellulaire

hTERT : domaine catalytique « télomère-spécifique reverse transcriptase »

TRAF6 : Tumor Necrosis Factor Receptor associated factor 6

mtSSB : human mitochondrial single-stranded DNA binding protein

XBP1 : X-Box binding protein 1 : facteur de transcription cellulaire essentiel pour la différenciation des plasmocytes

6-3- L'ARN interférence comme traitement des maladies associées à EBV

Etant donné la faible efficacité sur EBV des molécules visant la polymérase des *herpesviridae* (Ballout et al., 2007), de nouvelles voies thérapeutiques sont investiguées pour traiter les pathologies associées à EBV et notamment les pathologies cancéreuses. L'ARNi présente un potentiel thérapeutique intéressant pour les infections virales, y compris chroniques. De la meilleure connaissance acquise, parfois grâce à l'ARNi, des relations entre EBV et ses cellules hôtes, découlent un certain nombre de cibles potentielles tant au niveau cellulaire qu'au niveau viral. Contrairement à la plupart des études décrites ci-dessus qui utilisaient des cellules EBV négatives transfectées avec la protéine virale d'intérêt, les travaux présentés ici sont réalisés sur des cellules exprimant constitutivement l'EBV. On se rapproche ainsi davantage du modèle physiologique d'infection chronique par ce virus et les auteurs de ces études envisagent tous une application thérapeutique des techniques d'ARNi rapportées.

Gao et al. (Gao et al., 2004) ont ainsi exploré le mécanisme de réactivation de l'EBV induit par le tetradecanoylphorbol 13 acétate (TPA) dans les cellules épithéliales de carcinome gastrique GT38 et ont montré une activation de p38, protéine kinase activée en présence d'agents mitogènes et du proto-oncogène c-myc. L'inhibition de ces 2 protéines cellulaires par des siRNA supprime l'induction de ZEBRA (Western Blot) et des antigènes précoces (IF) et les auteurs concluent à la possibilité d'utiliser ces siRNA en thérapeutique pour traiter des maladies comme le carcinome gastrique quand il est associé à EBV.

L'ensemble des autres études envisageant l'ARNi comme thérapeutique de l'infection à EBV s'est focalisé sur des protéines virales et notamment sur la protéine oncogène LMP1. Ainsi Li et al. ont étudié l'impact de LMP1 sur le potentiel prolifératif et métastatique d'une lignée issue de CC : les cellules C666 (Li et al., 2004). Ils ont démontré que l'inhibition de

LMP1 par des shRNA altèrait significativement la mobilité cellulaire, l'adhésion à la sous-couche et la capacité d'invasion transmembranaire ainsi que la prolifération cellulaire. Ils suggèrent une utilisation de ce shRNA anti-LMP1 dans les CC liés à EBV exprimant LMP1 (60% des CC invasifs, mais 100% des CC pré-invasifs (Pathmanathan et al., 1995)). Ces résultats concordent avec ceux de Kondo et al. qui décrivaient une diminution de l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire via la glycoprotéine mucinogène MUC1 (Kondo et al., 2007) et ceux de Horikawa T, qui montraient que LMP1 augmentait la mobilité cellulaire et l'invasibilité via un régulateur transcriptionnel Twist (Horikawa et al., 2007). La même équipe (Li et al., 2006) a poursuivi son étude de l'ARNi anti-LMP1 en réalisant des essais *in vivo* chez la souris nude grâce à la vectorisation du plasmide codant pour le shRNA dans un adeno-associated virus de type 2. Des cellules C666 étaient infectées par l'AAV2 portant ou non le shRNA anti-LMP1, puis après quarante huit heures, ces cellules étaient greffées dans le foie des souris nude. Quatorze jours après l'inoculation de la tumeur, malgré la suppression de l'expression de LMP1, il n'y a pas de diminution significative de la taille de la tumeur chez les souris traitées par le shRNA, en revanche, les auteurs rapportent une diminution du nombre de métastases dans le foie comme dans le poumon. Il s'agit, à notre connaissance, du premier essai *in vivo* d'ARNi anti-EBV. Plus récemment, toujours sur un modèle de cellules C666, il a été démontré que des siRNA anti-LMP1 augmentait la sensibilité des cellules à la cytotoxicité de la bléomycine et du cis-platine via l'inhibition de la protéine kinase B suggérant la possibilité d'une association positive de l'ARNi aux chimiothérapies actuellement utilisées avec la radiothérapie pour traiter les CC associés à l'EBV (Mei et al., 2007).

D'autres travaux ont été réalisés sur le potentiel thérapeutique de l'ARNi anti-LMP1 cette fois ci sur des cellules lymphoïdes. Mei et al. montrent que l'inhibition de LMP1 par des siRNA inhibe la prolifération cellulaire et l'apoptose via une diminution de l'expression de la

téломérase cellulaire (Mei et al., 2006). Ces résultats ont en effet été confirmés et précisés ultérieurement par l'équipe italienne de Terrin et al. qui a montré que LMP1 induisait le promoteur du domaine catalytique hTERT augmentant ainsi l'activité téломérase dans les LyB et facilitant leur survie (Terrin et al., 2008). Les auteurs (Mei et al.) démontrent une efficacité plus élevée de leurs siRNA par rapport à des oligonucléotides antisens décrits par Song et al. (Song et al., 2003) et concluent également à une possible utilisation thérapeutique de l'ARNi anti-LMP1 dans les tumeurs associées à EBV.

La protéine de latence EBNA1, retrouvée dans la plupart des pathologies cancéreuses associées à EBV, a également fait l'objet d'études visant à l'inhiber par ARNi. Yin et Flemington démontrent sur la lignée épithéliale EBV positive CC-KT, l'inhibition de la croissance et de la survie cellulaire par transfection de siRNA anti-EBNA1 et suggèrent également une application thérapeutique de l'inhibition de EBNA1 par ARNi (Yin and Flemington, 2006). L'équipe de Hong montre l'efficacité d'un shRNA anti-EBNA1 sur la lignée lymphocytaire B Raji issue d'un lymphome de Burkitt (Hong et al., 2006). Ils mettent en évidence sur les cellules traitées une inhibition de la prolifération cellulaire, une régulation négative de EBNA2 et une augmentation du nombre de cellules en phase G0/G1 mais pas une augmentation de l'apoptose. Récemment, Ian et al. observent le même type d'effet sur des cellules HANK1 EBV positives issues de lymphomes NK/T et trouvent aussi un arrêt de ces cellules en phase G1 après traitement par ARNi anti-EBNA1 (Ian et al., 2008). A notre connaissance, l'association des siRNA ciblant simultanément différentes protéines de la latence virale n'a pas encore été étudiée.

Bien que l'impact du cycle lytique dans la pathogenèse des maladies cancéreuses associées à EBV soit encore controversé, certaines équipes, dont la nôtre, se sont engagées dans l'inhibition de cette répllication virale par ARNi en essayant notamment de bloquer la réactivation virale. Ainsi, Chang et al. se sont intéressés à l'étape initiale de la réactivation

virale en utilisant des shRNA anti-Zta. Ils montrent, par mesure du taux d'ADN EBV cellulaire, sur des cellules épithéliales EBV positives issues d'un CC, que les shRNA anti-Zta bloquent la réactivation induite par le TPA, ou par la transfection de Rta (Chang et al., 2004). Par rapport aux drogues anti-polymérase herpétique classiques, l'ARNi présente ici l'avantage de pouvoir cibler des ARNm qui sont produits même en l'absence de synthèse d'ADN et ouvre ainsi une voie thérapeutique intéressante. Gershburg et al., quant à eux, ciblent la protéine kinase d'EBV codée par le gène *BGLF4* (Gershburg et al., 2007). Il s'agit d'une protéine exprimée de façon précoce dans le cycle lytique et qui reste à des niveaux élevés pendant toute la phase de réplication virale (Gershburg et al., 2004b). Son inhibition semble intéressante au niveau thérapeutique, étant donné son impact sur un grand nombre de cibles virales : elle aurait une action sur les produits des gènes *BMRF1*, *EBNA2*, *EBNALP*, *BZLF1* et serait un élément structural du tégument viral. En utilisant des siRNA anti-*BGLF4* sur des cellules épithéliales 293 porteuses du génome EBV B95-8 (Delecluse et al., 1999), Gershburg et al. montrent une diminution de la synthèse d'ADN viral extracellulaire et de l'infectivité des surnageants de culture (Gershburg et al., 2007). En revanche, le taux d'ADN EBV intracellulaire semble peu affecté par l'inhibition de *BGLF4*. Les auteurs confirment, en microscopie électronique, que la protéine codée par *BGLF4* intervient dans la maturation de la particule virale au moment de sa sortie du noyau et que son inhibition par ARNi entraîne une rétention nucléaire des capsides virales.

L'ARNi semble donc présenter un potentiel thérapeutique intéressant pour prévenir les phénomènes cancéreux liés à l'infection par EBV. Le choix des cibles est orienté par les recherches encore en cours sur le rôle précis de chaque protéine virale dans ces phénomènes pathogènes. A ce jour, seules des cibles uniques ont été investiguées, il semblerait intéressant de pouvoir combiner de l'ARNi visant différentes protéines virales du cycle lytique ou de la latence, voire une combinaison des deux. D'autre part, la majorité de ces études (à l'exception

de Hong (Hong et al., 2006)) ont été effectuées sur des lignées épithéliales, il serait intéressant d'étendre ces résultats à des lignées de lymphocyte B infectées par EBV afin de pouvoir envisager une application thérapeutique sur les proliférations lymphoïdes EBV induites. Afin de s'engager pleinement dans la voie de la thérapie anti-EBV par ARNi, il faut également mettre au point des techniques de vectorisation des siRNA sélectionnées qui permettent des applications *in vivo*. L'étude de Hong, comme celles de Le Clorenec et de Benhde qui portent sur des lignées lymphocytaires, utilisent une électroporation avec un système Amaxa pour faire pénétrer le plasmide codant pour le shRNA dans les lymphocytes B, cette technique n'est pas utilisable *in vivo*, il faut donc vraisemblablement se tourner vers la vectorisation virale. L'utilisation de particules rétrovirales sur des cellules Raji a été très récemment décrite par Ning et al. (Ning et al., 2008) et ouvre une perspective intéressante.

6-4-Utilisation d'EBV comme vecteur pour de l'ARN interférence thérapeutique

Si la vectorisation de l'ARNi par des virus est le plus souvent réalisée à l'aide de virus de la famille des adénovirus ou des rétrovirus, le virus Epstein Barr lui-même peut être utilisé dans ce but. En effet, si on veut envisager une application clinique de l'ARNi anti-EBV, il va falloir, de façon systémique, faire parvenir les siRNA dans les cellules où se trouvent majoritairement le virus, à savoir les lymphocytes B mémoire. Les lymphocytes B sont des cellules difficilement transfectables, ils ne sont pas non plus infectables par les virus de la famille des adénovirus car ils ne possèdent pas ou peu de récepteur membranaire pour les coxsakie et adénovirus (CAR) (Richardson et al., 2005). De plus, les lymphocytes B mémoires se répliquent très peu et sont, de ce fait, difficilement infectables. Les rétrovirus semblent pouvoir infecter les lymphocytes B (Ning et al., 2008). Cependant une autre piste pour cibler les cellules infectées par EBV est d'utiliser l'EBV lui-même étant donné qu'il

reste le virus le plus adapté à infecter des lymphocytes B mémoires. C'est pourquoi Hellebrand et al. ont travaillé sur un modèle d'EBV délété des gènes LMP1 et EBNA2 pour éviter la transformation cellulaire et de *BZLF1* afin d'avoir un virus infectieux non répliatif (Hellebrand et al., 2006). Ce modèle a montré son efficacité pour faire exprimer le facteur de croissance GM-CSF dans des lignées cellulaires B, des lymphocytes B mémoires et des lymphocytes B tumoraux venant d'un patient présentant une leucémie lymphoïde chronique B. La même équipe a amélioré le modèle en fabricant une lignée de cellules épithéliales 293 porteuse de façon stable d'un virus EBV dit « helper » délété de *EBNA2*, *LMP1*, *EBNA3A-B* et C, de *BZLF1* et des séquences répétées terminales, ce qui rend le virus incapable d'être empaqueté dans une capsid virale (Hettich et al., 2006). La cellule 293 doit ensuite être triplement transfectée avec les plasmides *BZLF1*, *BALF4* et le plasmide codant pour le gène d'intérêt, pour exprimer de l'EBV capable d'infecter des lymphocytes B mémoires et de leur transmettre le gène souhaité (Figure 29).

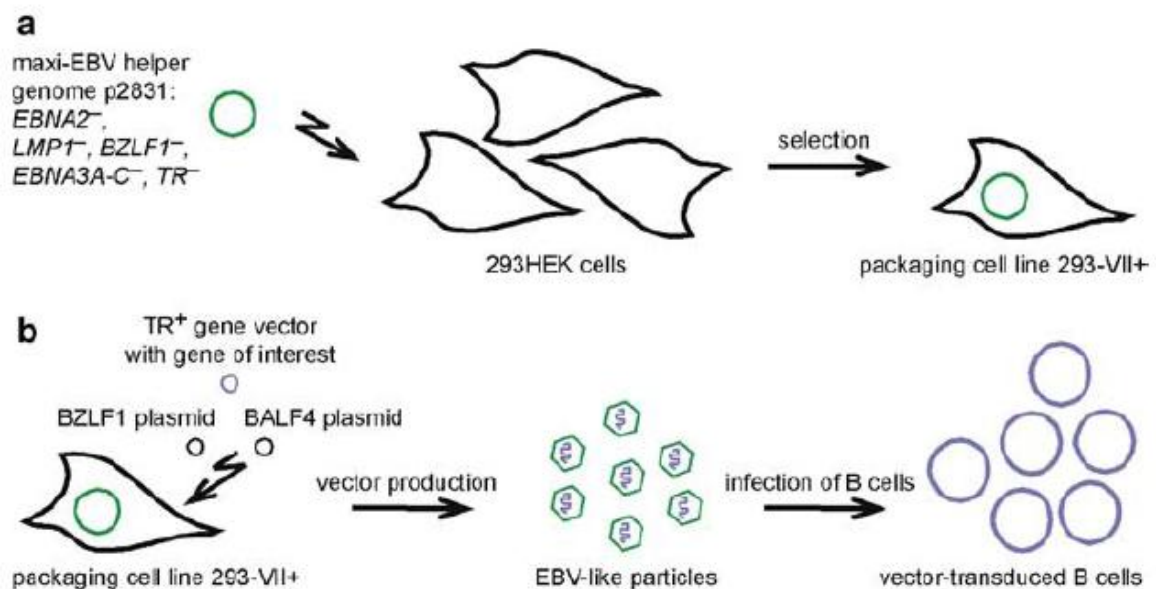


Figure 29 : Figure extraite de Hettich et al. (Hettich et al., 2006).

(a) Schéma de l'établissement d'une lignée « packaging » EBV et (b) fabrication d'un stock d'EBV porteur du gène à transférer dans des lymphocytes B.

De leur côté, l'équipe française Biard et al. avait démontré en 2005 la possibilité d'utiliser l'EBV comme vecteur pour l'ARN interférence afin d'inhiber un système de réparation des excisions de nucléotides l'ADN (Biard et al., 2005). Enfin, récemment l'équipe chinoise de Choy et al. a montré que le promoteur viral des EBER permettait la transcription via la polymérase III des shRNA de façon plus efficace que les promoteurs classiquement utilisés H1 et U6 et suggère ainsi l'utilisation de ce nouveau promoteur notamment dans les cellules infectées par EBV(Choy et al., 2008). On pourrait ainsi envisager l'utilisation d'un vecteur EBV modifié pour faire exprimer, sous le contrôle du promoteur des EBER, dans des lymphocytes B, de façon systémique, des siRNA exogènes et pourquoi pas des siRNA anti-EBV.

PARTIE EXPERIMENTALE

I-MATERIEL & METHODES

1-Matériel

1-1-Lignées cellulaires

⇒ La caractérisation de la protéase du virus Epstein-Barr a été réalisée sur des lignées lymphocytaires B connues, porteuses du virus :

- une lignée lymphoblastoïde de singe marmoset : la lignée B95-8 dérivant d'un virus isolé chez un patient ayant eu une mononucléose infectieuse acquise par transfusion. Ce virus est immortalisant et présente une délétion de 7.6 mégadaltons (Skare et al., 1982) supprimant notamment une *OriLyt* et une grande partie de miRNA *BART*. Cette lignée est faiblement productrice (de l'ordre de 3%) mais peut être induite notamment par des agents chimiques.

- des lignées lymphoïdes issues de lymphomes de Burkitt EBV positifs : les cellules Raji, Namalwa, AG876, Jijoye et P3HR1. Les cellules Raji possèdent également un virus défectif (régions manquantes dans *BARF1*, *BALF1* et surtout *BALF2* : (Decaussin et al., 1995)) qui ne peut aboutir à un cycle répliatif complet qu'en présence d'un autre virus EBV non défectif qui apporte en *trans* les gènes manquants. Les cellules Namalwa, quant à elles, contiennent 2 copies du génome viral sous forme intégrée et ne sont pas productrices. La lignée P3HR1 est productrice (environ 10%) mais le virus n'est pas transformant car délété en *EBNA2*.

- des lignées lymphoblastoïdes (LCLs) établies spontanément à partir du sang de patients présentant une mononucléose infectieuse (MNI), un syndrome lymphoprolifératif post-transplantation (SLPT), une infection asymptomatique par le VIH ou un lymphome non hodgkinien associé au SIDA (BBG1) (Morand et al., 1999).

⇒ La lignée lymphocytaire B infectée par EBV, Akata, a été utilisée pour la mise au point du marquage intra-cellulaire de l'antigène de capsid d'EBV (VCA : Viral Capsid

Antigen). La lignée Akata est une lignée productrice issue du lymphome de Burkitt d'un patient japonais et portant la translocation t(8q- ; 14q+). Dans ces cellules, le cycle viral est inductible par liaison avec des immunoglobulines (Ig) (0,2% (v/v) Polyclonal Rabbit Anti-Human, IgG, Dako, Trappes, France).

⇒ Les expériences d'ARN interférence ont été réalisées avec des cellules embryonnaires épithéliales de rein HEK 293 (HEK : human embryonic kidney) transfectées stablement avec le génome complet du virus EBV, souche B95-8, lié au gène d'une protéine fluorescente, la « green fluorescent protein (GFP) », sous forme de bacmide portant le facteur « F » bactérien ainsi qu'une cassette de résistance à l'hygromycine (Delecluse et al., 1998; Delecluse et al., 1999) (Figure 30). Cette lignée cellulaire appelée 293/EBV-GFP dans ce travail nous a été fournie par le Pr Hammerschmidt (Munich, Allemagne). Les cellules HEK 293 ont été obtenues à partir d'un fœtus avorté et cultivées initialement par Alex Van der Eb à Leyde en Hollande. En 1977, Frank Graham les a transformées avec l'adénovirus de type 5 (souche Ad 75) (Graham et al., 1977). En 1997 l'équipe de Graham (Louis et al., 1997) a montré que la transformation de la cellule avait été obtenue grâce à une insertion des nucléotides 1-4344 du génome viral de l'Ad75 dans le chromosome 19 cellulaire. Plus récemment, la même équipe a suggéré que les cellules transformées pourraient être d'origine neuronale (Shaw et al., 2002). La transfection stable du génome de l'EBV dans ces cellules a été décrite par Delecluse en 1998 (Figure 30). Pour remédier à une perte progressive du bacmide EBV-GFP dans la population cellulaire, les cellules ont été clonées à une cellule par puits sur 3 plaques 96 puits et au cours de ce travail, un clone cellulaire a été sélectionné pour sa croissance en milieu additionné d'hygromycine et son expression importante d'EBV-GFP. Les cellules issues de ce clone ont été nommées EGC.

Dans les cellules 293/EBV-GFP l'EBV est majoritairement sous forme latente mais son cycle répliatif peut-être induit en transfectant les cellules avec 2 plasmides d'expression

codant pour le transactivateur viral de l'EBV : ZEBRA (gène *BZLF1*) et la glycoprotéine d'enveloppe gp110 (gène *BALF4*) (Figure 29). Dans ce travail l'ensemble de ces 2 plasmides est appelé : « plasmides inducteurs ».

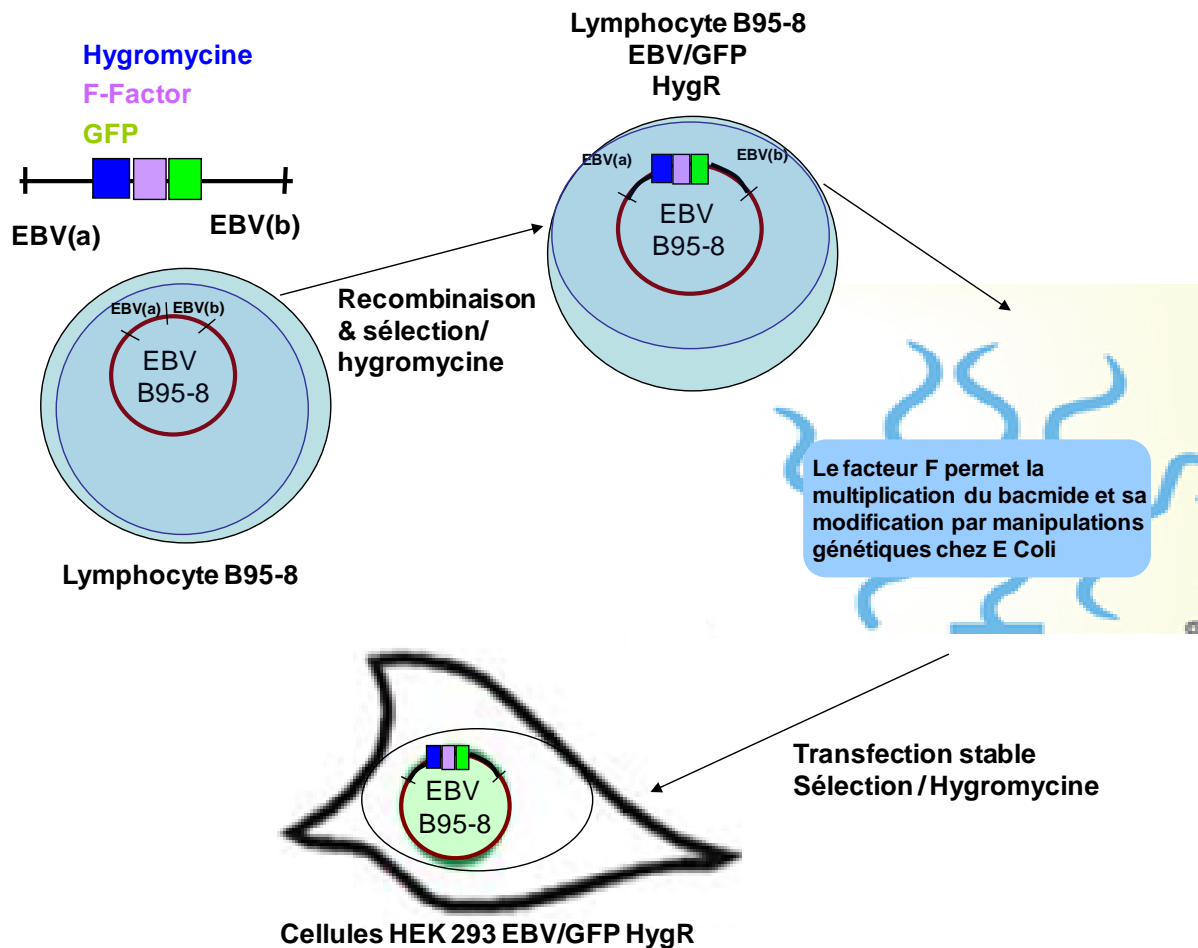


Figure 30 : Conception des cellules 293 EBV/GFP. Figure adaptée de (Delecluse et al., 1999).

Toutes ces cellules sont cultivées dans du RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) additionné de 10% de sérum de veau fœtal, 1% de solution antibiotique (pénicilline, streptomycine) et 1% de L-glutamine et incubées à 37°C sous une atmosphère comprenant 5% de CO₂.

1-2-Echantillons cliniques

Des échantillons cliniques ont été utilisés pour poursuivre la caractérisation génotypique de la protéase d'EBV. Il s'agit de 5 biopsies de carcinomes du cavum (CC) histologiquement confirmés et de 20 échantillons de cellules mononucléées sanguines obtenues à partir de

- 4 porteurs sains du virus EBV
- 6 patients présentant une primo-infection EBV (symptomatique ou non)
- 7 patients infectés par le VIH
- 3 patients présentant un lymphome associé à EBV.

L'expression des ARNm protéase a été étudiée dans 6 biopsies de lymphomes non Hodgkiniens reliés à l'EBV et 5 de CC.

1-3-siRNAs

Quatre siRNAs (appelés PR1, PR2, PR3, PR4) ciblant la protéase d'EBV (codée par le gène *BVRF2*) ont été modélisés et synthétisés par la société Qiagen (Courtaboeuf, France) à partir de la séquence de référence B95-8 NCBI GenBank NC_007605.1. Le choix de ces siRNA est détaillé ci-après. Les séquences cibles ont été soumises à un BLASQT dans GENBANK afin de vérifier leur caractère unique.

Six siRNAs (appelés siGP1, siGP2, siGP3, siGP4, siGP5 et siGP6) ciblant la glycoprotéine d'enveloppe gp 350/220 (codée par le gène *BLLF1*) ont été modélisés et synthétisés de façon similaire. Ils ont été choisis dans une région présentant peu de polymorphisme (*BLLF1* étant peu variable : 97% homologie entre les souches) et dont la séquence a été publiée et validée par une étude cristallographique de la protéine produite (Szakonyi et al., 2006). La séquence nucléotidique du gène *BLLF1* (2661pb) d'EBV permet la transcription d'un ARNm non épissé qui sera traduit en protéine gp350 (l'ORF correspondante va du nt 79865 au nt 77142 sur la carte génomique complète d'EBV) et d'un ARNm qui sera épissé et aboutira à la transcription de la protéine gp220, les bornes de l'intron étant nt 78364-nt 77774.

Un siRNA ciblant le transactivateur ZEBRA dont la séquence est décrite par Chang et al. (Chang et al., 2004) a également été synthétisé.

La localisation de l'ensemble de ces siRNA ainsi que celle des amorces et sondes utilisées pour l'amplification et la détection de ces différentes régions du génome d'EBV sont présentées en annexe 1.

Un siRNA contrôle négatif (appelé siNT pour « non targeting »), également fourni par Qiagen, a été utilisé afin de s'assurer de la spécificité des effets observés. Ce siNT ne présente aucune homologie de séquence avec le génome d'EBV ou avec des gènes humains, de souris ou de rat connus.

1-4-Fabrication de short hairpin RNA (shRNA) anti-protéase EBV

Trois shRNAs ont été fabriqués. Le premier correspond au siRNA non targeting « siNT » et les 2 autres aux siRNAs anti-protéase ayant démontré leur efficacité, PR1 et PR2. Des oligonucléotides basés sur la structure de ces 3 siRNAs et permettant un repliement sous forme « tige-boucle » ont été synthétisés. Leurs séquences sont présentées dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Séquence des oligonucléotides synthétisés pour fabriquer les shRNAs

Nom	Séquence
shRNAPR1	5'-GATCCCCGCACTTTAGTGACCTGGAA TTCAA GAGA TTCCAGGTCCTAAAGTGC TTTTAA-3' 3'-GGGCGTGAAATCACTGGACCTT AAGTTCTCTAAGGTCAGTGATTCACGAAAAATCGA-5'
shRNAPR2	5'-GATCCCCGGCAATCGATGCTGGA TTTTCAAGA GAAAAATCCAGCATC GATTGCC TTTTAA-3' 3'-GGGCGTTAGCTAC GACCTAAAAAAGTTCTCTTTTA GGTCTAGCTAACGGAAAAATCGA-5'
shRNANT	5'-GATCCCC TTCTCCGAACGTGTCACGTTTCAAGA GAACGTGACACGTTCCGAGAA TTTTAA-3' 3'-GGGAAGA GGCTTGCACAGTGCA AAGTTCTCTTGCACACTGTGCAAGCCTCTTAAAAATCGA-5'

En noir sont représentés les nt codant pour les brins sens et anti-sens du futur siRNA. Les sites de restriction pour le clonage ainsi que la partie non complémentaire permettant de former une boucle sont représentés en bleu.

⇒ Principe : Leur extrémité 5' correspond au site de restriction BamHI et leur extrémité 3' à celui de HindIII. Elles ont permis de les cloner dans le vecteur plasmidique pRETROSUPER (OligoEngine, Seattle WA, USA). Ce vecteur possède, en amont du site de clonage des oligonucléotides, le promoteur de la RNA polymérase de type III H1 qui permet la transcription de petits ARN ne comportant pas de queue polyA. La transcription par la polymérase H1 est également arrêtée par la présence de 5 thymidines (T) en 3' du brin sens des oligonucléotides (en amont du site de clivage de HindIII) : l'enzyme coupe alors le transcrit après incorporation de 2 uridines (U) permettant ainsi la formation d'un transcrit similaire aux siRNA synthétiques qui contiennent 2 T ou U non hybridés en 3'.

En outre ce plasmide est dérivé du Murine Embryonic Stem Cell virus (MSCV) et contient donc les éléments nécessaires à la fabrication d'une particule rétrovirale défective ainsi que 2 cassettes de résistance, une à l'ampicilline et l'autre à la puromycine, qui vont permettre la sélection des bactéries puis des cultures cellulaires ayant intégré le plasmide.

Les shRNAs seront transcrits par l'ARN polymérase H1 et la partie centrale non complémentaire favorisera leur repliement et leur prise en charge par le complexe enzymatique endonucléasique DICER afin de pouvoir aboutir dans la cellule à des petits ARN double brin : les siRNAs (Figure 31).

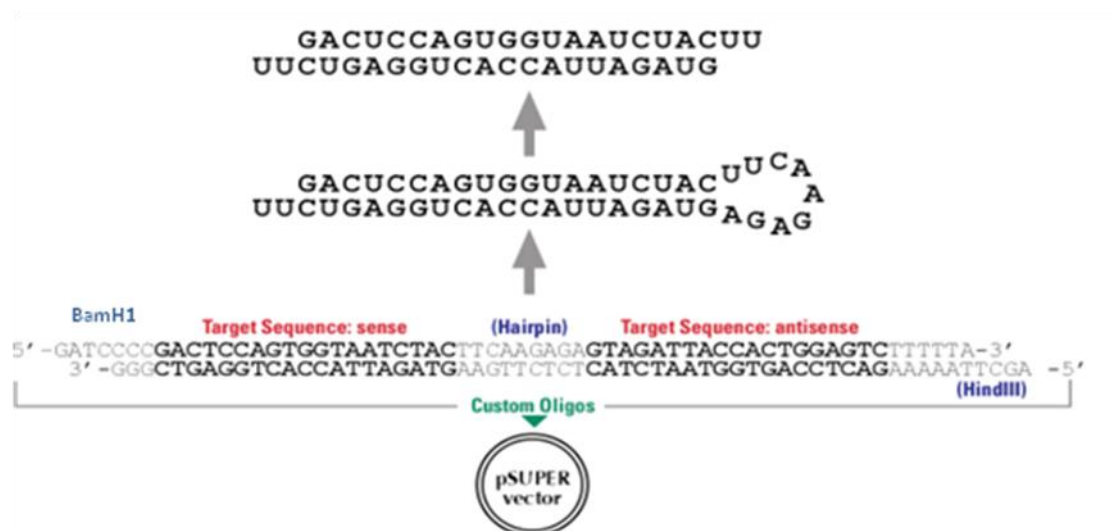


Figure 31 : Exemple de fabrication d'un « short hairpin RNA »

⇒ Fabrication : Dans un premier temps, les 2 oligonucléotides (3 mg/ml) de chaque siRNA ont été hybridés entre eux dans un tampon acétate de potassium 100 mM, acétate de magnésium 2 mM, hepes KOH pH 7,4 30mM en chauffant 90°C 4 min puis en refroidissant progressivement à 70°C 10 min puis 37°C 20 min jusqu'à température ambiante (au moins 20 min). Les oligonucléotides double brin ont ensuite été phosphorylés par la T4 polynucléotide kinase (30 min à 37°C puis 15 min à 70°C), et en parallèle, le vecteur plasmidique a été linéarisé à l'aide des enzymes de restriction BglII et HindIII et déphosphorylé par la Shrimps Alkaline Phosphatase (SAP) (1h00 à 37°C). Après inactivation des enzymes 10 min à 70°C. L'insert (3ng) est ensuite ligué dans le vecteur (80ng) avec de la T4 Ligase à température ambiante sur une nuit. Lorsque les oligonucléotides double brin s'insèrent correctement dans le vecteur, le site BglII est détruit. Afin d'éliminer les plasmides n'ayant pas intégré l'insert, une deuxième étape de clivage par BglII est réalisée.

Les plasmides ainsi fabriqués ont ensuite été clonés dans des bactéries E Coli chimiquement compétentes (TurboCells®, Gentaxis, San Diego CA, USA) selon le protocole indiqué par le fabricant. Les clones bactériens ainsi obtenus ont ensuite été prélevés et la séquence de leur insert vérifiée par séquençage. Pour cela, l'ADN bactérien a été extrait avec le kit QIAamp

DNA Mini Kit (Qiagen) selon le protocole indiqué par le fabricant, puis une PCR a été réalisée avec des amorces s'hybridant sur le vecteur en amont et en aval des sites de clonage (5'-GGAAGCCTTGGCTTTTG-3' [1241-1257] et 5'-GATGACGTCAGCGTTCG-[2645-2629]). Les produits de PCR ont ensuite été purifiés sur les plaques Montage PCR₉₆ (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France) et séquencés sur le CEQ™ 2000XL DNA analysis System (Beckman Coulter Roissy, France).

1-5-Fabrication de particules rétrovirales GFP positives

La fabrication de particules rétrovirales est possible à partir de plasmides comprenant 2 séquences Long Terminal Repeat (LTR) et une séquence dite de « packaging » : ψ . Le pRETROSUPER dérive du Murine Embryonic Stem Cell virus (MSCV) qui est un rétrovirus murin et contient donc tous ces éléments. De plus, par rapport au Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) fréquemment utilisé, le MSCV possède des LTR plus longs et légèrement différents qui lui confèrent une meilleure activité transcriptionnelle notamment dans les cellules embryonnaires, ce qui permet une production plus importante de particules virales (Hawley 1994). Ce vecteur permet donc la formation de virions infectieux mais incapables de se répliquer car il comprend d'importantes délétions dans le promoteur du 3'LTR. La fabrication de particules rétrovirales a été obtenue en triple-transfectant des cellules 293T avec le plasmide pRETROSUPER, un plasmide codant pour gag et pol et un plasmide codant pour l'enveloppe virale. Dans ce travail, l'enveloppe du Vesicular Stomatitis Virus (VSV-G) a été choisie car elle permet un attachement non spécifique du rétrovirus à la cellule cible par fusion avec les lipides membranaires de la cellule hôte.

Dans un premier temps, afin de pouvoir visualiser l'infection des cellules cibles par les particules rétrovirales, un vecteur pRETROSUPER codant pour la GFP a été utilisé. La triple-transfection a été réalisée avec du phosphate de calcium en mettant en contact le mélange de

plasmides (9 µg de pRETROSUPER-GFP, 9 µg du plasmide gag/pol, 2,7 µg du plasmide env dans un volume de 403,2 µl d'eau) avec 10,8 µl de CaCl₂. Le mélange a été vortexé puis ajouté goutte à goutte dans une solution comprenant 100 µl HBS 10X (Hepes : 5,96 g/50ml + NaCl 8,18 g/50ml), 20 µl solution phosphate (Na₂HPO₄ : 2,49 g/100ml+ Na₂H₂PO₄ : 2,18 g/100ml), 15 µl de NaOH 1N et 885 µl d'eau. La solution obtenue a été vortexée 10 sec et immédiatement ajoutée sur les cellules 293T. Après une incubation de 48h00 à 37°C sous 5% CO₂, le surnageant est prélevé et son pouvoir infectieux évalué. Si le surnageant n'était pas utilisé immédiatement, il était congelé à -80°C.

2-Méthodes

2-1-Séquençage et sous-typage

Le séquençage du gène de la protéase a été réalisé après amplification par PCR de la totalité du gène en utilisant le kit Hot Star Taq[®] DNA Polymerase (Qiagen, Courtaboeuf, France) et les amorces sens 5'-GTCATTCGCGCGTCATCCC-3' et anti-sens 5'-GCTCCTTCTCCTGCGTTACCTG-3'. Les conditions de PCR étaient les suivantes : 10 µl d'ADN extrait, 1.5 mM de MgCl₂, 0.5 µM de chaque amorce, 400 µM de dNTP et 2.5 U de l'enzyme avec 5 µl de tampon (10x), pour un volume final de 50 µl (eau QSP). Les étapes de PCR consistaient en une dénaturation 95°C 15 min, puis 35 cycles 94°C 30sec, 56°C 30 sec, 72°C 40 sec, et enfin une étape d'élongation finale à 72°C 10 min. Un amplicon de 857 pb a été obtenu puis purifié sur les plaques Montage PCR₉₆ (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France) et séquencé sur le CEQ[™] 2000XL DNA analysis System (Beckman Coulter Roissy, France). Le sous typage EBV-1 / EBV-2 a été obtenu grâce une PCR spécifique de la région EBNA3-C, comme décrit par Sample et al. (Sample et al., 1990). Brièvement des amorces sont situées dans une région d'EBNA3-C qui varie en fonction du sous type viral permettant l'obtention d'un amplicon de 153 pb pour le sous-type1 et de 246 pb pour le sous-type 2 qui sont caractérisés sur un gel d'électrophorèse à 1,5% d'agarose et visualisés par révélation avec du SYBR Green.

2-2-Essais d'inhibition

Les essais d'inhibition du cycle viral par les siRNAs ont été réalisés de la façon suivante. Le jour précédent la transfection, les cellules 293/EBV-GFP sont réparties dans des plaques de culture 24 puits à la densité de 10⁵ cellules/puits pour 500 µl de milieu RPMI + 10% SVF afin d'atteindre 60-70% de confluence lors de la transfection. Différentes

concentrations de siRNA et/ou de plasmides inducteurs sont complexées avec du JetSi-ENDO (Polyplus transfection, Ozyme, St Quentin en Yvelines, France) dans du milieu OptiMEM (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) selon le protocole préconisé par le fabricant. Le volume final de JetSi-ENDO est de 1 µl par puits et la concentration finale de plasmides inducteurs a été optimisée à 0.5 µg/puits. Cent microlitres du milieu de culture de chaque puits sont enlevés et remplacés par 100 µl des complexes siRNA +/- plasmides inducteurs + JetSi-ENDO. La plaque est ensuite centrifugée 30 min à 800 rpm afin de favoriser le contact entre les complexes et les cellules 293/EBV-GFP et incubée 5h00 à 37°C sous CO₂. Après cette 1^{ère} incubation, le milieu est remplacé par du RPMI 10% SVF afin d'éliminer le réactif de transfection délétère pour la quantification des particules virales infectieuses. Après 72h00 d'incubation à 37°C, les surnageants sont prélevés et les culots cellulaires sont lavés deux fois dans le PBS puis congelés à -80°C.

Les protocoles expérimentaux utilisés pour les essais avec les shRNA et avec les antiviraux comportent quelques modifications. Les shRNA sont transfectés avec la LipofectamineTM 2000 (LPF) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) (1 µl/puits) ou du PolyEthylèneImmine 1 µg/µl (PEI) (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) (4 µl /puits) 15h00 avant la transfection des plasmides inducteurs, avec le même réactif de transfection que celui utilisé pour les shRNA, afin de permettre la synthèse des siRNA dans les cellules. Les antiviraux: ganciclovir (Cymevan 500mg, Roche Pharma, Neuilly-sur-Seine, France), cidofovir (Vistide 75mg/ml, Pfizer, Paris, France), foscarnet (Foscavir 6g, AstraZeneca, Rueil-Malmaison, France) sont maintenus dans le milieu de culture après l'élimination du réactif de transfection et ce jusqu'à la récolte des cellules et des surnageants.

Les différents modes d'analyse de ces essais d'inhibition sont résumés sur la figure 32 et sont détaillés dans les chapitres suivants.

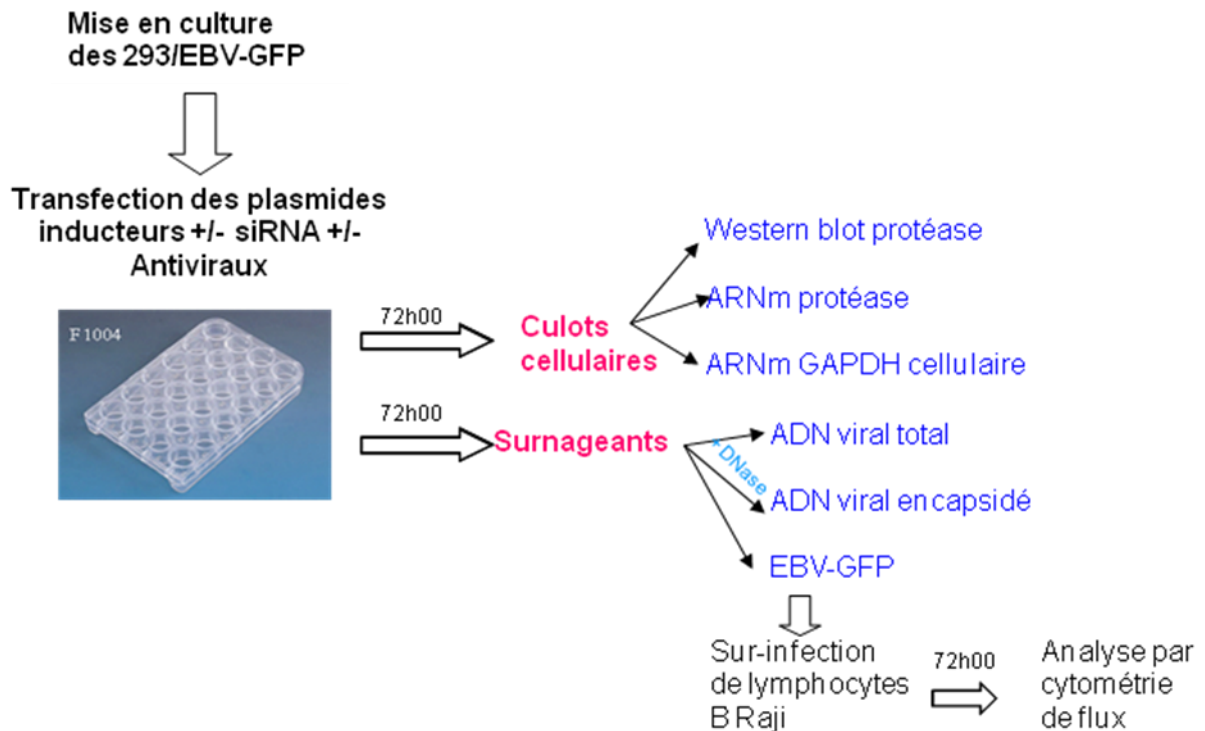


Figure 32 : Schéma du protocole expérimental

2-3-Quantification des particules virales infectieuses

Afin de pouvoir visualiser la production de particules virales infectieuses et leur quantification, des cellules Raji sont sur-infectées par les particules virales EBV-GFP produites grâce à l'activation du cycle viral sur des cellules 293/EBV-GFP. Lorsqu'elles sont sur-infectées avec ces particules virales GFP positives, les Raji émettent à leur tour de la fluorescence verte et ceci de façon proportionnelle au nombre de particules EBV-GFP qui les ont infectées (Delecluse and Hammerschmidt, 2000). On obtient ainsi une estimation quantitative du nombre de particules virales infectieuses produites dans les surnageants des 293/EBV-GFP. Un total de 200 000 cellules Raji sont inoculées avec 1ml de surnageant de culture des cellules 293/EBV-GFP et centrifugées 30 min à 800rpm afin de favoriser l'infection. Les cellules Raji sont ensuite incubées 72h à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Les cellules Raji sont ensuite observées au microscope à fluorescence

(Axiovert, Carl Zeiss Microimaging Inc) et/ou analysées en cytométrie de flux (Cytomics FC 500, Beckman Coulter, Roissy, France).

2-4-Western Blot

Afin d'évaluer la diminution du taux de protéase virale suite aux essais d'inhibition par les siRNA anti-protéase, un western blot a été réalisé. Les culots cellulaires de 1 à 2 millions de cellules sont lysés par 100µL de tampon de lyse (10% sucrose, 62.5mM tris pH 6.8, 2mM EDTA, 2% SDS, complété extemporanément par 2% de β-mercaptoéthanol et 10% de glycérol avec 0.1% de pyronine G). L'ensemble est mis à bouillir 10 minutes puis centrifugé rapidement. Vingt microlitres de l'extrait cellulaire obtenu est ensuite utilisé pour le gel de séparation SDS-PAGE (12%) et les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinylidène fluoride (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France). La membrane est saturée durant 1h00 avec du lait écrémé en poudre à 5% dans du PBS (phosphate buffered saline) puis hybridé pendant une heure avec un anticorps monoclonal murin anti-protéase d'EBV au 1/200^{ème} (0.7mg/ml, BioMérieux, Marcy-L'étoile, France) ou un anticorps monoclonal murin anti-GAPDH au 1/4000^{ème} (4mg/ml, Ambion, Austin, TX, USA). La révélation est réalisée avec un anticorps caprin anti-IgG de souris marqué à la peroxydase. Les blots sont révélés par chimiluminescence (ECL WESTER blotting detection reagent kit, Amersham Orsay, France). Trente nanogrammes de protéase purifiée sont utilisés comme témoin positif. La densité des bandes est mesurée avec le logiciel Scion Image pour Windows (Frederick, Maryland, USA).

2-5-Immunofluorescence

Afin de pouvoir visualiser l'effet antiviral obtenu sur des lignées lymphocytaires B porteuses du virus EBV, un marquage intracellulaire de l'antigène viral de capsid (VCA)

avec des anticorps marqués à l'Alexa Fluor 647 permettant un comptage des cellules positives au cytomètre de flux a été mis au point. Les culots cellulaires d'environ un million de cellules sont repris par 100µl de RPMI 2% SVF. Les cellules sont ensuite reprises par 100µl du réactif de fixation du kit Fix and Perm (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) puis lavées 2 fois dans une solution de PBS + 0.1%NaN₃ + 5% SVF. Cent microlitres du réactif de perméabilisation du kit Fix and Perm sont ensuite ajoutés aux cellules avec l'anticorps I^{te} anti-VCA IgG1-k de souris (Argene, Varilhes, France) au 1/40^{ème}. Un lavage est réalisé avec du SVF 5%, puis l'anticorps secondaire caprin anti-IgG de souris marqué à l'Alexa Fluor 647 (2mg/ml) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) est rajouté au 1/30^{ème}. Après 20 min d'incubation au noir à température ambiante, les cellules ont été rincées 2 fois dans du RPMI SVF 5% puis une dernière fois avec du PBS + 0.1%NaN₃ + 5% SVF. Le marquage cellulaire ainsi obtenu est ensuite analysé au cytomètre de flux.

2-6-PCR et RT- PCR quantitatives en temps réel

2-6-1 Extraction

⇒Extraction ADN : Les échantillons sont extraits avec le kit QIAmp DNA Mini Kit® (Qiagen). Pour cela, les culots cellulaires sont repris dans 200µL de PBS et les surnageants traités ou non à la DNase (pour éliminer l'ADN non encapsidé) sont directement extraits.

⇒Extraction ARN total : Les culots cellulaires (environ 10⁶ cellules) sont repris dans 200µL de « Phosphate Buffered Saline : PBS » puis sont extraits avec le kit High Pure RNA Isolation Kit® (Roche Diagnostics, Meylan, France). L'ADN résiduel est éliminé par 2 traitements de 20 minutes avec 180 UI de DNase I (Roche Diagnostics). L'ARN extrait (50µl) est conservé à -80°C.

2-6-2 qRT-PCR protéase/GP350/ZEBRA/GAPDH

Dans cette étude, des amplifications quantitatives temps réel de 3 ARNm du cycle lytique viral : celui de la protéase, celui du transactivateur ZEBRA et celui de la glycoprotéine de surface GP350 ont été réalisées. L'amplification de l'ARNm de la Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) a été utilisée comme contrôle de l'expression des ARNm cellulaires. Les reverse-transcriptase PCR quantitatives en temps réel sont réalisées sur un Light Cycler 2.0 avec le kit Light Cycler[®]-RNA Master Hybridization Probe (Roche Diagnostics, Meylan, France) en utilisant des sondes d'hydrolyse. Brièvement, le mix de RT-PCR comprend, 1 µg d'ARN extrait, 3.25mM de Mn(OAC)₂, 0.3 µM de chaque amorce et 0.2 µM de sonde Taqman. Les cycles de température étaient les suivants : reverse transcription : 61°C 30 min, dénaturation : 95°C 3 min, PCR : 95°C 10 sec, 62°C pour l'ARNm protéase et 60°C pour les ARNm gp350 et ZEBRA 1 min 30 sec, 45 cycles.

Les amorces et sondes utilisées pour chacune des reverse-transcriptase PCR quantitatives en temps réel sont décrites dans le tableau ci-dessous et leur localisation est représentée en annexe 1.

Tableau 9 : Séquences des amorces et sondes utilisées pour les RT-PCR quantitatives temps réel

ARNm amplifié	Nom	Séquence	Localisation
Protéase	MPR1	5'-CCA CGG CAG TCT ACG GTA CA -3'	136 089-136 108 ^a
	MPR2 (antisens)	5'-ACG ACT CGG CTG GGA TAT TG -3'	136 312-136 331 ^a
	PRq (sonde)	5'- (6Fam)-ACC TTG CGT GGG TCC TGA AGC ACT T (Tamra)-3'	136 110-136 134 ^a
ZEBRA	Z1b (sens)	5'-GCG CAG CCT GTC ATT TTC AG-3'	90 015-90 034 ^a
	Z2b (antisens)	5'-ACG ACG CAC ACG GAA ACC ACA AC -3'	90 378-90 400 ^a
	Zq	5'- (6Fam)-TTA AAC TTG GCC CGG CAT TTT CT (Tamra)-3'	90 161- 90 183 ^a
GP350	GP _s (Le Clorennec et al.)	5'-AGA ATC TGG GCT GGG ACG TT-3'	77 297-77 317 ^a
	GP _{as} (antisens)	5'-ACA TGG AGC CCG GAC AAG T-3'	77 478- 77 496 ^a
	GP _q	5'- (6Fam)-AGC CCA CCA CAG ATT ACG GCG GT (Tamra)-3'	77 451- 77 473 ^a
GAPDH	GAPDH sens	5'CGT GTG AAC CAT GAG AAG TAT GAC-3'	
	GAPDH antisens	5'-TGG CAT GGA CTG TGG TCA TG-3'	
	GAPDH sonde	5'- (6Fam)-AGC CTC AAG ATC ATC AGC AAT GCC TCC T (Tamra)-3'	

^aSouche de référence B95-8 GenBank NC_007605.1

Afin d'obtenir une quantification précise de ces ARNm, des transcrits de chaque ARN ont été réalisés en utilisant le kit MEGAscript (Ambion, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fabricant et en partant d'ADN complémentaire obtenu après extraction de l'ARN total de cellules B95-8 et RT-PCR des gènes viraux concernés avec une amorce sens contenant en 3' le promoteur T7. L'ARN transcrit est ensuite extrait et dosé par spectrophotométrie, et le résultat est converti en nombres de copies. Une gamme de transcrits est obtenue par dilutions successives.

2-6-3 PCR quantitative Thymidine kinase

La quantification de l'ADN viral été évaluée par la mesure du gène de la thymidine kinase selon la technique de Brengel-Pesce (Brengel-Pesce et al., 2002).

II-RESULTATS

1-Expression des ARNm Protéase dans les cancers associés à EBV

Afin d'attester la présence de notre cible thérapeutique dans des échantillons cliniques de pathologies cancéreuses associées à EBV, des RT-PCR en temps réel quantifiant l'ARNm protéase mais également l'ARNm gp350/220 et l'ARNm ZEBRA ont été réalisées. La recherche d'ARNm de la protéase d'EBV était positive dans 3 des 6 biopsies de lymphomes B non hodgkiniens associés à EBV chez des patients atteints du SIDA et dans 2 des 5 biopsies de carcinomes du cavum (Tableau 10).

L'efficacité de la détection d'ARNm dans ces prélèvements a été vérifiée grâce à une RT-PCR GAPDH qui s'est révélée positive pour tous ces échantillons. L'absence de contamination ADN a été vérifiée en réalisant une PCR sans étape de reverse transcription sur tous les extraits ARN. Tous les échantillons positifs pour la présence d'ARNm protéase l'étaient également pour la présence d'ARNm ZEBRA et gp350/220. Le taux d'ARNm protéase le plus important a été observé dans un échantillon de lymphome B non Hodgkinien (L6) qui présentait également la charge virale ADN la plus élevée.

Tableau 10 : RT-PCR quantitative de l'ARNm Protéase EBV, de l'ARNm gp350/220, de l'ARNm Zebra et charges virales EBV dans des biopsies de cancers associés à EBV.

	Taux d'ARNm (copies/μg d'ARN total)			Taux d'ADN#
	Protease	Zebra	gp350/220	
Lymphomes B non Hodgkiniens chez des patients sidéens				
L1	-	-	-	1100
L2	d*	d*	d*	12650
L3	-	-	-	575
L4	d*	d*	d*	56500
L5	-	-	d*	d*
L6	1122	6982	77	32,250,000
Carcinome du cavum				
N1	-	-	ND	ND
N2	12400	d*	ND	ND
N3	-	-	ND	ND
N4	-	-	ND	ND
N5	2430	281	ND	ND

#copies/μg ADN total

*détectable < seuil de quantification (200 copies/ml) = positif faible

ND = Non déterminé

2- Caractérisation de la cible protéase

Les séquences nucléotidiques de la protéase d'EBV des différents échantillons cliniques ainsi que de lignées cellulaires porteuses du virus ont été déterminées et alignées afin de pouvoir être comparées. Une homologie de 96% entre les séquences a été retrouvée, ce qui a permis de choisir des séquences cibles pour les siRNA dans des zones les plus conservées. En prenant pour référence la séquence en acides aminés de la protéase de la souche EBV B95-8, 15 échantillons sur 39 présentaient 2 mutations associées de façon constante : D77V et V105L. Les produits de PCR obtenus à partir de 4 échantillons de PBMC dont 3 sur 4 présentaient les mutations associées, ont été clonés dans un vecteur pCR[®]2.1-TOPO[®]3.9 kb (TOPO TA Cloning[®], Invitrogen, France). Dix clones dérivant de chaque échantillon de PBMC ont été séquencés et leur analyse a montré une homogénéité de la population virale.

Le site actif, le site de reconnaissance C-terminal, ainsi que la zone de dimérisation de l'enzyme (Buisson et al., 2002) ne sont pas concernés par ces mutations. Comme le montre la

Figure 33, ces 2 mutations associées ne sont associées ni au sous-type d'EBV ni à la situation clinique des patients.

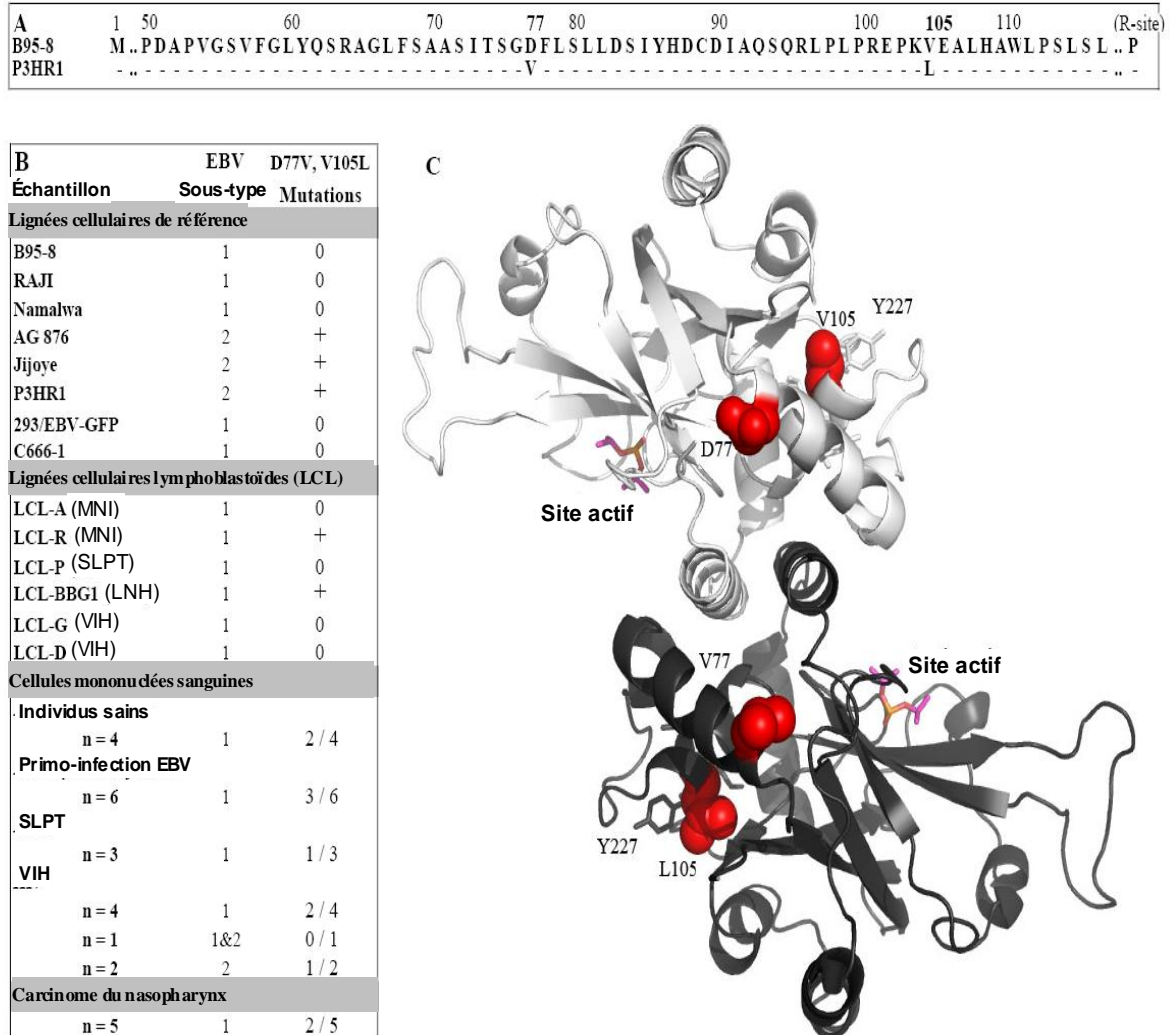


Figure 33 : Variabilité de la séquence en acides aminés de la protéase EBV.

A/ Séquence en acides aminés de la protéase d'EBV de la lignée cellulaire de références B95-8 et de la lignée P3HR1 porteuse de 2 mutations. Les acides aminés identiques sont représentés en pointillés. B/ Dans ce tableau sont présentés : le sous-type EBV ainsi que la présence (+) ou l'absence (0) des 2 mutations retrouvées constamment associées ou le nombre d'échantillons présentant ces mutations / total des séquences analysées. C/ Localisation des mutations D77V et V105L. Les atomes mutés sont représentés sous forme de sphères rouges sur la structure de la protéase d'EBV (Buisson 2002). Les 2 sous-unités du dimère sont colorées en noir et blanc, la molécule blanche correspondant à la forme sauvage et la noire à la forme mutée. Le logiciel PyMol (Delano 2002) a été utilisé pour l'analyse structurale ainsi que pour la génération de l'illustration. SLPT : syndrome lymphoprolifératif post-transplantation.

3-Optimisation des conditions expérimentales d'inhibition par les siRNA

3-1-Choix du réactif de transfection

Différents réactifs de transfection ont été testés. Leur efficacité à faire pénétrer des siRNA dans les cellules 293/EBV-GFP a été évaluée en utilisant un siRNA dirigé contre le gène cellulaire ubiquitaire de la Mitogen-Activated Protein Kinase 1 (MAPK1) puis en mesurant la quantité d'ARNm MAPK1 restant dans les cellules après traitement. La lipofectamineTM 2000 (Invitrogen) qui est un liposome cationique classiquement utilisé (Dalby, Methods, 2004) a été testée à 0,5 ; 1 et 1,5 µl/puits (seuls les essais à 1,5 µl sont rapportés ici). Le HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen, Courtaboeuf, France) qui est un mélange de lipides cationiques et neutres a également été testé à 1,5 ; 3 et 4,5 µl (3 µl étant la quantité recommandée par le fabricant). Le JetSi-ENDO (Polyplus transfection, Ozyme) est un nouveau réactif composé de lipides cationiques, spécifiquement optimisé pour la co-transfection de plasmides et de siRNA. Il a été utilisé à 1 µl par puits conformément aux recommandations du fabricant. Le JetSi (1 µl/puits) et la lipofectamine (1,5 µl/puits) permettent d'obtenir respectivement 85 et 90% d'inhibition de l'ARNm MAPK1 après 72h00 d'action (Figure 33).

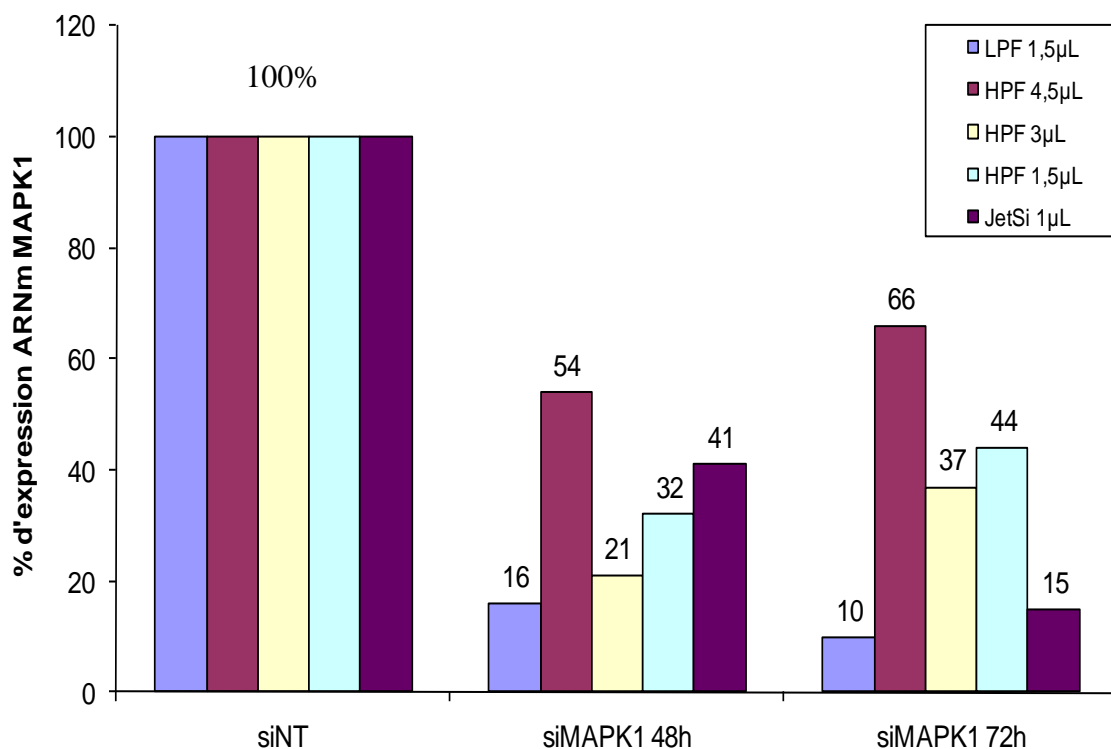


Figure 34 : Comparaison des réactifs pour la transfection de cellules 293/EBV-GFP avec des siRNA anti-MAPK1 (100nM).

Taux d'ARNm MAPK1 mesurés par RT-PCR quantitative 48 ou 72h00 après transfection de siRNA anti-MAPK1 ou du siRNA contrôle négatif (NT). Les valeurs sont exprimées en pourcentage par rapport au taux d'ARNm MAPK1 obtenu avec le siRNA NT. L'expérience a été réalisée 1 fois avec 2 puits de chaque condition. Chacun des réactifs de transfection a été utilisé à des concentrations identiques dans au moins une autre expérience qui a montré des résultats similaires. LPF : lipofectamine, HPF : HiPerFect, JetSi : JetSi ENDO

Le système cellulaire utilisé nécessite l'induction du cycle répliatif de l'EBV par transfection de plasmides inducteurs de façon concomitante à la transfection des siRNA. La co-transfection de plasmides avec des siRNA a donc été évaluée avec la lipofectamine et le JetSi.

Le JetSi ENDO permet une induction plus forte de la multiplication virale, ce qui offre une meilleure lisibilité de l'effet inhibiteur du siRNA anti-protéase par rapport au témoin siNT. En effet on observe une inhibition de 84% de l'ARNm par rapport au témoin siNT avec le JetsiENDO alors qu'elle n'est que de 40% avec la lipofectamine (Figure 34). Cette différence est vraisemblablement due à une meilleure co-transfection des plasmides et des siRNA dans les cellules épithéliales 293/EBV-GFP avec le JetSi ENDO.

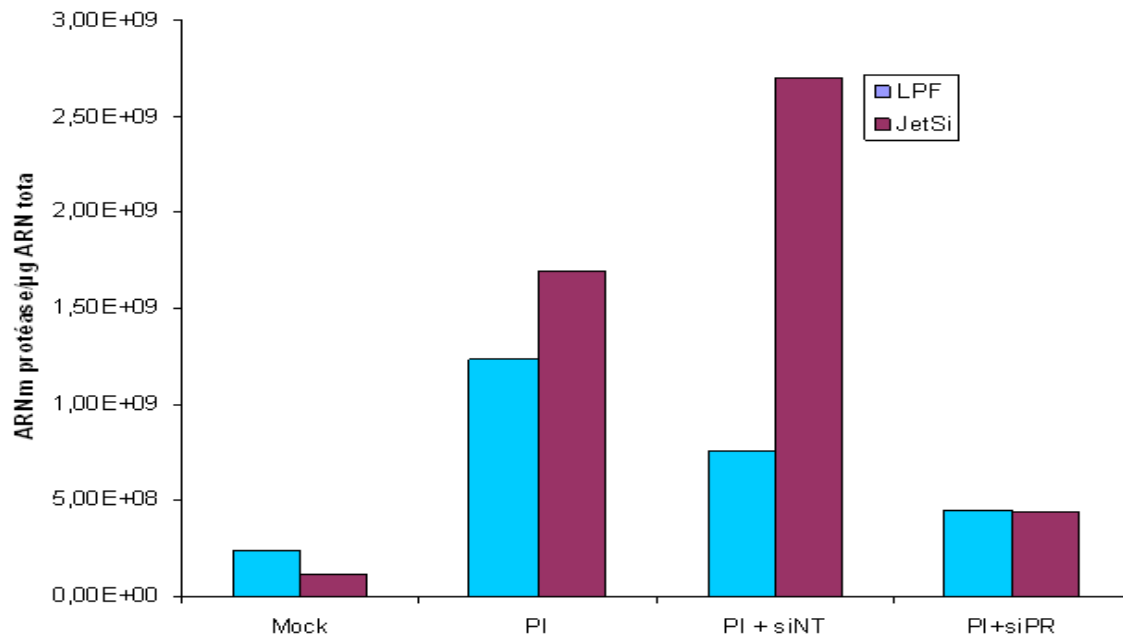


Figure 35 : Comparaison de la lipofectamine (LPF : 1,5 μ l/puits) et du JetSi ENDO (JetSi : 1 μ l/puits) pour la co-transfection des plasmides inducteurs et des siRNA anti-protéase.

Taux d'ARNm protéase viral mesuré par RT-PCR quantitative 72h00 après co-transfection des deux plasmides inducteurs (PI= *BZLF1* et *BALF4*, 0,5 μ g/puits) et d'un mélange de siRNA (100nM) dirigés contre la protéase d'EBV (siPR). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne de deux puits. L'expérience a été réalisée 2 fois.

Le JetSi ENDO (1 ml /puits) sera donc utilisé pour la suite des expériences.

3-2-Induction du cycle lytique viral

Pour pouvoir visualiser un effet des siRNA anti-protéase sur le cycle lytique, il faut, dans un premier temps, être capable d'induire la réplication virale de façon satisfaisante dans le système cellulaire 293/EBV-GFP. Différentes concentrations de plasmides inducteurs (0,5, 1 et 1,5 μ g de chaque plasmide) (*BZLF1* et *BALF4*) ont donc été testées pour l'induction du cycle lytique d'EBV. Cette induction a été évaluée au niveau transcriptionnel par RT-PCR quantitative de l'ARNm protéase, au niveau protéique par western blot avec un anticorps anti-protéase. Enfin, l'induction de la production de particules virales infectieuses dans le surnageant a été évaluée par sur-infection de cellules Raji et visualisation de leur fluorescence au microscope à fluorescence.

La meilleure induction de l'ARNm est observée à 72h00 avec 0,5 µg de chaque plasmide inducteur/puits (Figure 35-A). On obtient un taux d'ARNm protéase 24 fois supérieur à celui retrouvé dans des cellules 293/EBV-GFP dans lesquelles la multiplication virale n'a pas été induite. Ces résultats ont été également confirmés au niveau protéique par le Western Blot de la protéase d'EBV (Figure 35-B). La bande se situant à 26kDa qui correspond à la protéase n'est pas détectable sur le blot lorsque le cycle viral n'est pas induit, elle devient légèrement visible 48h00 après activation par 0,5 µg de plasmide mais est surtout visible 72h00 après induction. La bande la plus intense est donc obtenue avec 0,5 µg de plasmides après 72h00 après induction. Cette augmentation maximale de l'ARNm et de la protéase virale obtenue 72h00 après induction par 0,5 µg de chaque plasmide inducteur aboutit également à une induction maximale de la production de virions infectieux. En effet, la sur-infection de cellules Raji, visualisées au microscope à fluorescence 72h00 post-sur-infection, avec les surnageants issus de ces conditions de culture montre le plus grand nombre de cellules fluorescentes (Figure 35-C).

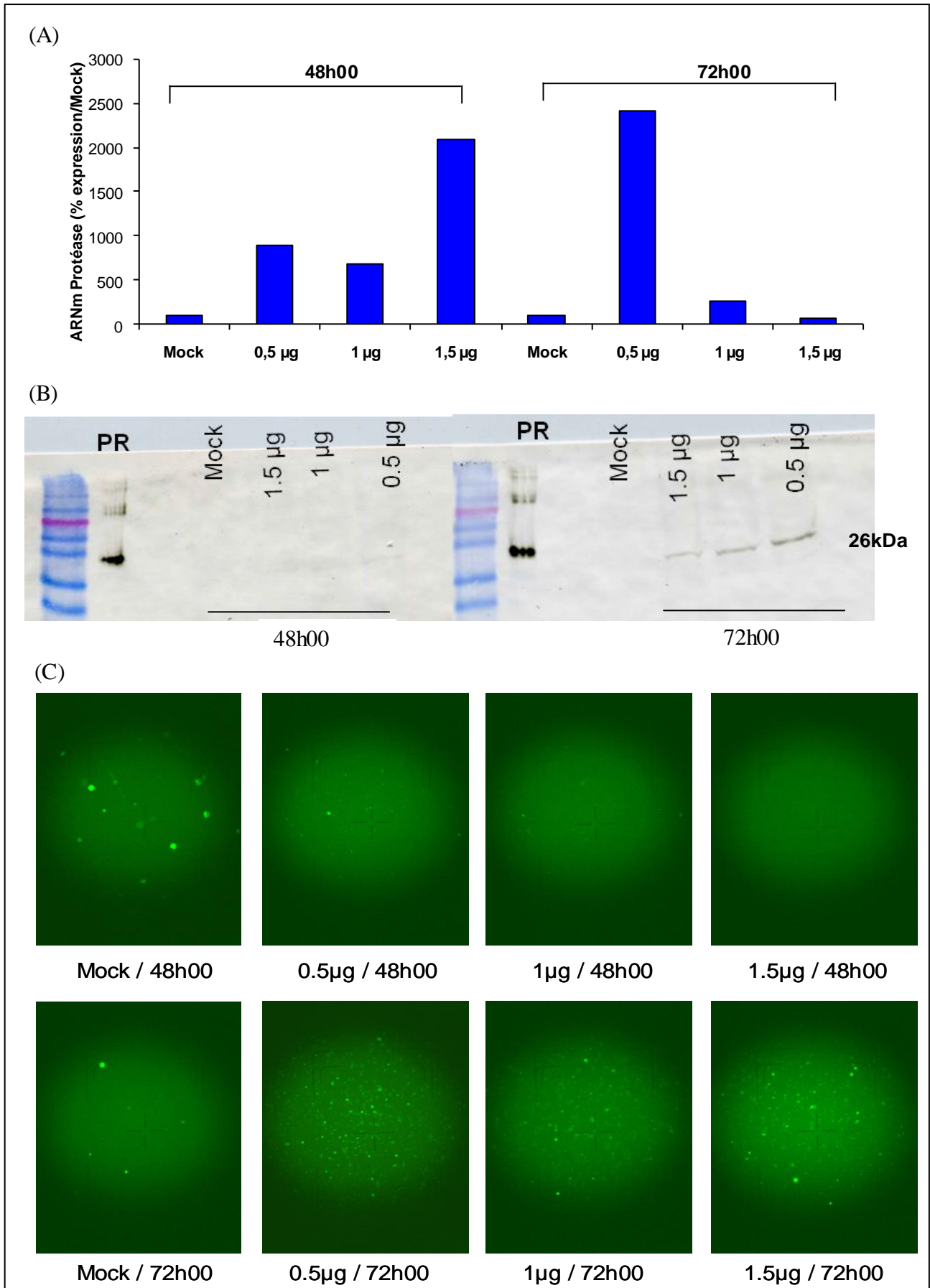
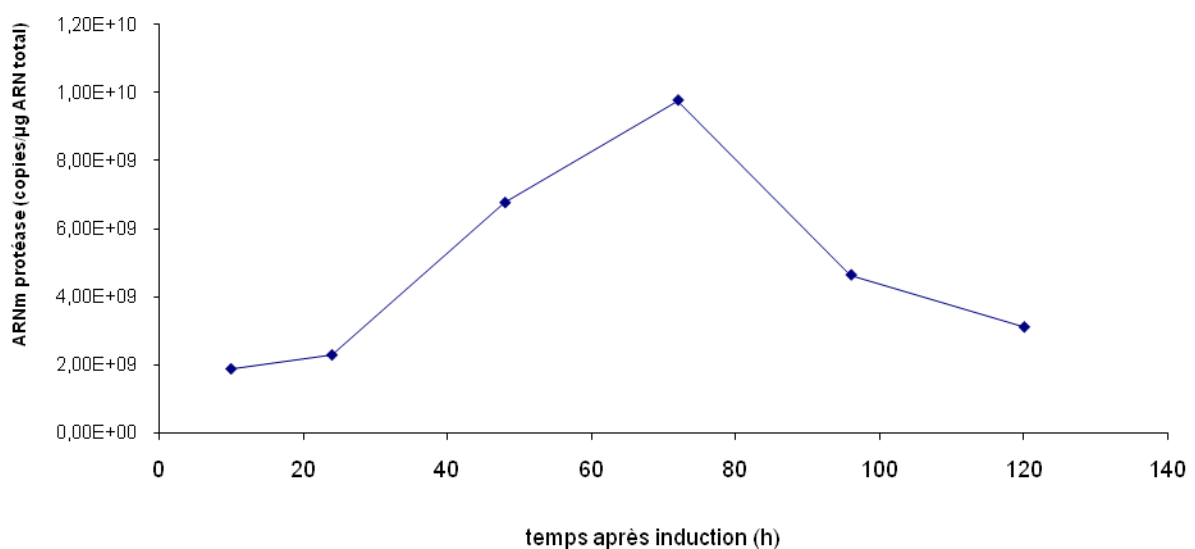


Figure 36 : Optimisation de la concentration de plasmides inducteurs.

La multiplication virale a été induite en utilisant différentes concentrations de plasmides inducteurs : 0,5 ; 1 et 1,5 μ g/puits (les deux plasmides étant présents en quantité équivalente dans le mélange). Les cellules 293/EBV-GFP et les surnageants de culture sont récoltés 48 et 72h00 après transfection. Les culots cellulaires sont analysés (A) par RT-PCR pour leur quantité d'ARNm protéase : le taux d'ARNm protéase est exprimé en pourcentage par rapport au témoin cellule (Mock) (B) par western Blot protéase. PR = 30ng de protéase purifiée. (C) Le surnageant de culture est analysé par surinfection de cellules Raji pour déterminer la quantité de virions infectieux dans les surnageants issus des cultures de cellules 293/EBV-GFP. Après 72h00 d'incubation les cellules Raji sont observées au microscope à fluorescence et les cellules fluorescentes sont numérées au cytomètre de flux.

Afin de mesurer plus précisément le pic d'expression de l'ARNm protéase lors de l'induction du cycle lytique, une cinétique a été réalisée en induisant les cellules 293/EBV-GFP avec 0,5 μ g de plasmide inducteurs transfectés avec du JetSi (Figure 36).

Cette cinétique confirme que l'induction maximale est obtenue 72h00 après transfection des plasmides inducteurs.

**Figure 37 : Cinétique du taux d'ARNm protéase post-induction.**

La multiplication virale a été induite par 0,5 μ g de plasmides inducteurs transfectés dans les cellules 293/EBV-GFP avec du JetSiENDO. Les cellules sont récoltées à 10, 24, 48, 72, 96, 120h00 après induction. Les résultats de la RT-PCR quantitative de l'ARNm protéase sont exprimés en copies/ μ g ARN total.

3-3-Test de différents protocoles d'administration des siRNA

Différents protocoles d'administration des siRNA ont été évalués. Dans le but de mimer un modèle d'administration médicamenteuse prophylactique, le mélange de siRNA a été transfecté avant l'induction selon différents protocoles de temps, l'induction étant ou non associée à une deuxième administration de siRNA et ces protocoles ont été comparés au protocole de transfection en une étape. Les siRNA utilisés ici sont un pool de siRNA anti-protéase (siPR) correspondant à un mélange en quantité équivalente des 4 siRNA pour obtenir une concentration finale de 100 nM.

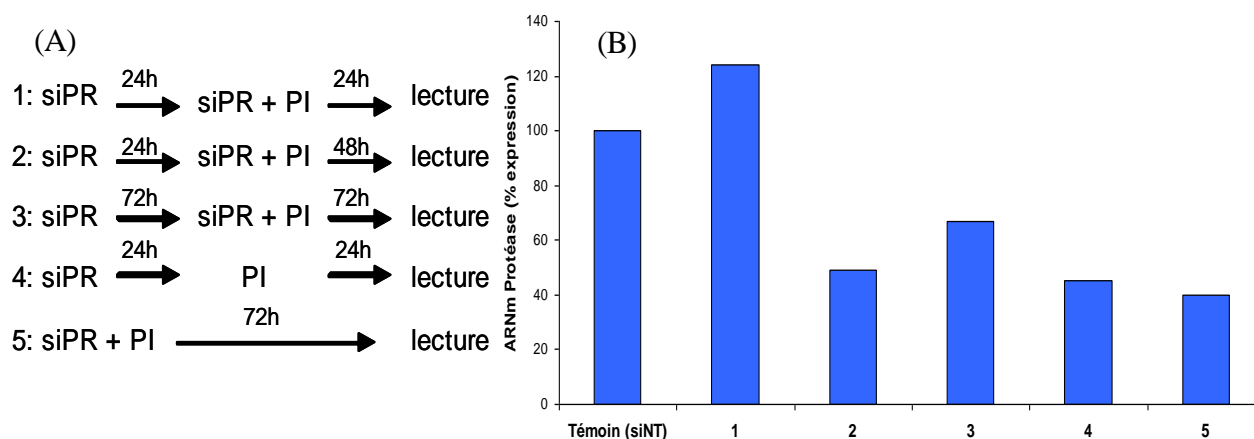


Figure 38 : Inhibition de l'ARNm protéase obtenus avec différents protocoles mimant une administration prophylactique des siRNA avant induction.

(A) Protocoles utilisés (B) Quantification par RT-PCR des ARNm protéase dans les différents protocoles. Les résultats sont exprimés en % par rapport à la valeur d'ARNm protéase obtenue en transfectant le siRNA témoin négatif (siNT). PI : plasmides inducteurs.

L'administration préventive de siRNA anti-protéase avant l'induction du cycle lytique n'entraîne pas de bénéfice par rapport à l'administration simultanée des siRNA et des plasmides inducteurs. Par conséquent toutes les expériences suivantes ont été réalisées avec un protocole en une étape avec une analyse 72h00 après transfection. De façon générale, sur l'ensemble des expériences réalisées dans ces conditions, le mélange de siRNA anti-protéase permet d'obtenir une inhibition comprise entre 55 et 84% ($m = 70\% \pm 12\%$) de l'expression d'ARNm.

Les conditions de transfection et d'induction choisies ont ensuite été appliquées dans toutes les expériences détaillées ci-après.

4-Inhibition de la réplication virale de l'EBV par les siRNA anti-protéase

Les conditions expérimentales ayant été fixées, l'efficacité des siRNA anti-protéase, dans un premier temps en mélange, a été évaluée.

4-1-Effet inhibiteur du mélange des 4 siRNA anti-protéase « siPR »

Le mélange de siRNA anti-protéase (siPR) et les plasmides sont transfectés dans les cellules 293/EBV-GFP de façon simultanée. Le recueil se fait 72h post transfection et l'effet des siRNA est évalué par la quantification de l'ARNm de la protéase. L'ARNm protéase induit diminue de 71% lors de la transfection du mélange de siRNA anti-protéase. En parallèle, l'ADN EBV a été quantifié. Il est intéressant de noter que l'inhibition importante de l'ARNm ne s'accompagne pas d'une inhibition de l'ADN intracellulaire viral qui, lui, reste stable (Figure 38).

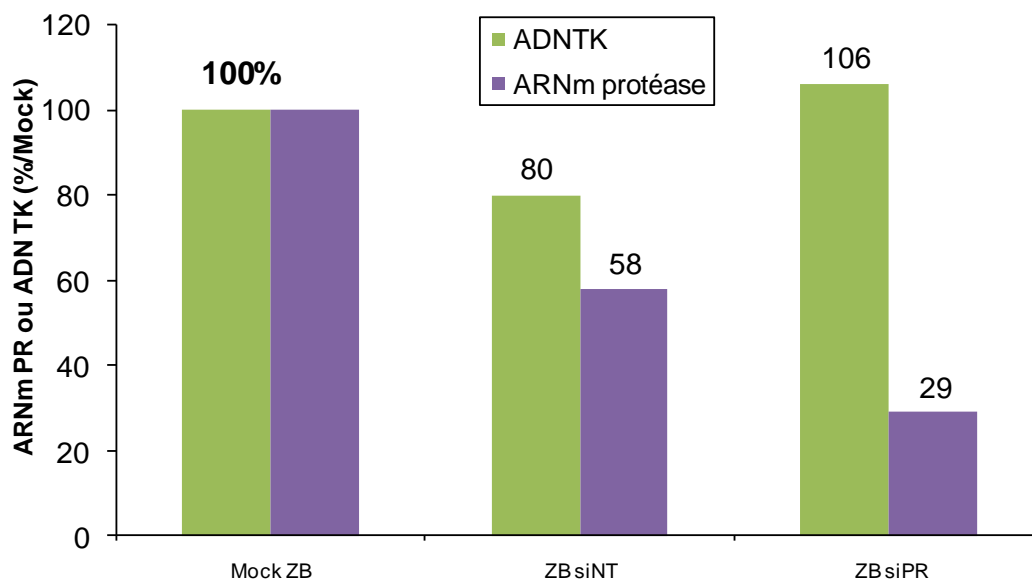


Figure 39 : Inhibition de l'ARNm protéase par un mélange de 4 si RNA anti-protéase (siPR)
 La RT-PCR quantitative de l'ARNm protéase et la PCR quantitative de l'ADN du gène de la thymidine kinase (Bitko et al.) sont réalisées sur les culots de cellules 293/EBV-GFP transfectées ou non par des siRNA (100nM) et 0,5µg de plasmides inducteurs (ZB). Les résultats sont exprimés en % par rapport aux valeurs respectives du taux d'ARNm protéase ou d'ADN thymidine kinase du témoin mock (293/EBV-GFP induites avec les plasmides inducteurs sans ajout de siRNA). L'expérience a été réalisée en duplicate et reproduite deux fois.

Les résultats obtenus en western blot confirment cette inhibition de la protéase virale au niveau protéique (Figure 40). La bande à 26kDa correspond à la forme monomérique de la protéase et elle diminue de 35% dans les cellules transfectées avec les siRNA anti-protéase (densité mesurée avec le logiciel Scion Image). Deux bandes supérieures situées légèrement en dessous des 82kDa sont également observées. La plus haute diminue de 30% dans les cellules traitées par les siRNA anti-protéase alors que la seconde disparaît totalement. Ce doublet correspond probablement à la polyprotéine complète et à sa forme clivée en C-terminal au niveau du site de maturation M.

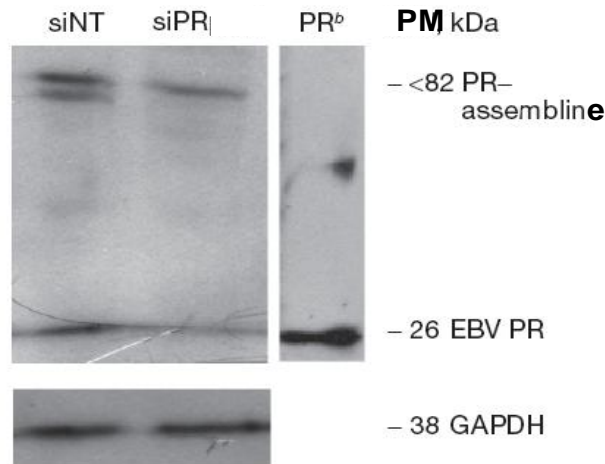


Figure 40 : Inhibition de la protéase d'EBV par un mélange de 4 si RNA anti-protéase (siPR).

Western blot réalisé à partir de culots lysés de cellules 293/EBV-GFP dans lesquelles la multiplication virale a été induite par la transfection des plasmides inducteurs en parallèle du traitement avec le siRNA témoin (siNT) ou anti-protéase (siPR). Le blot est révélé à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-protéase ou anti-glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH). PR = 30ng de protéase purifiée.

Enfin la quantité de virions infectieux produits dans les surnageants de cellules 293/EBV-GFP est également diminuée de 99% par la transfection de ce mélange de siRNA anti-protéase (Figure 41).

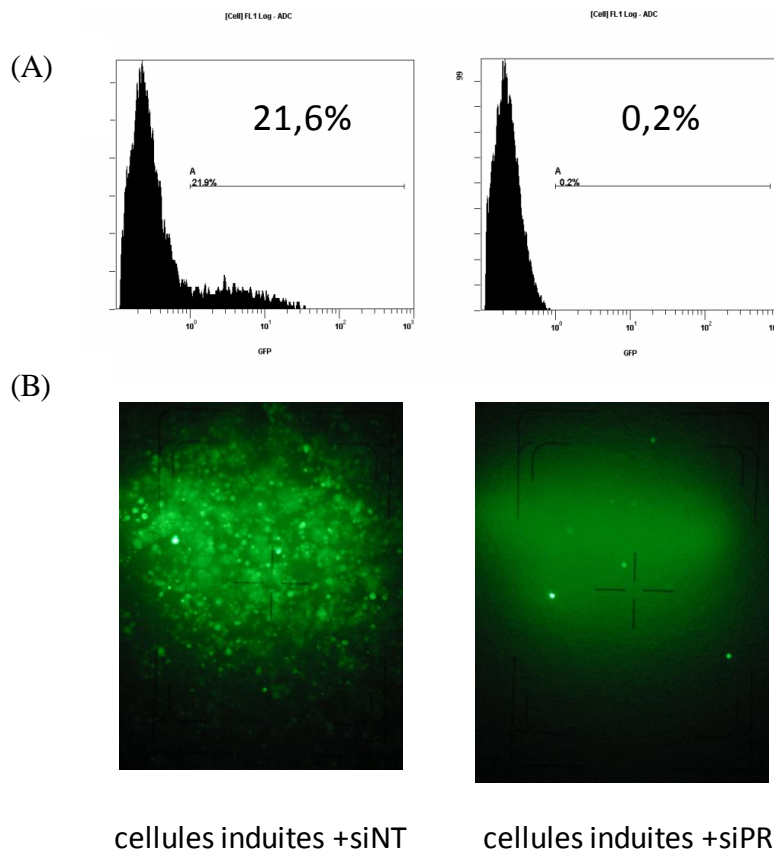


Figure 41 : Inhibition du titre viral infectieux par un mélange de 4 siRNA anti-protéase (100nM).

(A) Mesure par cytométrie en flux et (B) photos de microscopie à fluorescence du nombre de cellules Raji sur-infectées avec le surnageant des cellules 293/EBV-GFP transfectées par 0,5 μ g de plasmides inducteurs et 100 nM de siPR après 72h00 d'incubation.

4-2-Inhibition obtenue avec chaque siRNA anti-protéase pris individuellement

Les 4 siRNA (PR1, PR2, PR3, PR4) constituant le mélange siPR ont été utilisés séparément, afin d'évaluer leur efficacité respective. Ces expériences ont montré qu'à 100 nM, PR1 et PR2 étaient les plus efficaces, avec une inhibition significative (student t-test, $p < 0,05$) de 54,3 et 63,7% respectivement par rapport au témoin traité par les siNT (100 nM). En revanche, PR3 et PR4 n'ont pas entraîné de diminution significative de l'expression de l'ARNm de la protéase (Figure 42).

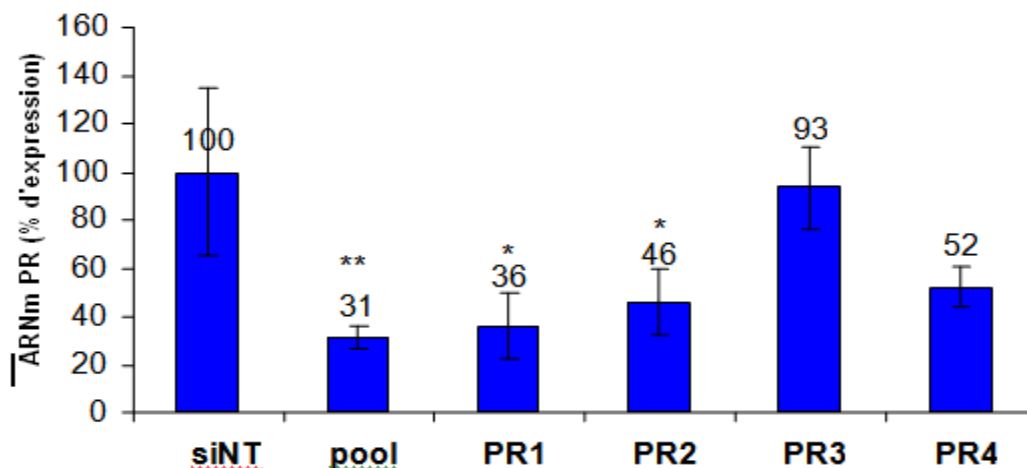


Figure 42 : Inhibition de l'ARNm protéase par chaque siRNA anti-protéase (100 nM) pris séparément.

Le taux d'ARNm protéase mesuré par RT-PCR quantitative est exprimé en pourcentage par rapport au siRNA témoin (siNT). Les résultats représentent une moyenne de 4 puits de culture +/- écart type. Les astérisques signalent une inhibition significative (* : $p < 0,05$; ** : $p < 0,02$ avec le test de Student). Cette expérience a été reproduite 3 fois avec des résultats similaires.

Le siRNA PR1 étant le plus efficace sur l'inhibition de l'ARNm protéase, l'ensemble des expériences suivantes a été réalisé avec ce siRNA.

4-3- Inhibition dose-dépendante du siRNA PR1

Des expériences ont ensuite été menées avec des dilutions du siRNA PR1 allant de 0,01 à 10 nM. Comparées à une concentration de 100 nM de siRNA témoin (siNT), l'ARNm protéase est diminué de 13% avec 0,01 nM et de 73% avec 10 nM de PR1. Cette inhibition de l'ARNm est statistiquement significative ($p < 0,05$) pour des concentrations de 1 nM et de 10 nM (Figure 43-A). L'utilisation de concentrations plus élevées de PR1 ne permet pas d'obtenir une inhibition plus importante : les concentrations de 50 et de 100 nM donnent des résultats similaires à ceux obtenus avec 10 nM de PR1 ($p < 0,05$). Aucune variation significative n'est observée sur l'ARNm du gène cellulaire témoin de la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) mesuré sur les mêmes extraits ($p > 0,05$). Le taux de virions infectieux dans le surnageant montre une réduction significative de 32% avec 0,01 nM jusqu'à 95% à 10 nM ($p < 0,05$) comparé au siNT contrôle (Figure 43-B). Il existe une

corrélation linéaire entre le pourcentage d'ARNm ou de particules virales infectieuses et la concentration de PR1 exprimée en logarithme pour une plage allant de 0,001 à 10 nM montrant que l'effet obtenu est dose dépendant. Dans cette expérience la concentration inhibitrice 50 (CI₅₀) de PR1 est de 0,55 nM pour l'ARNm et de 0,09 nM pour la production de virions infectieux.

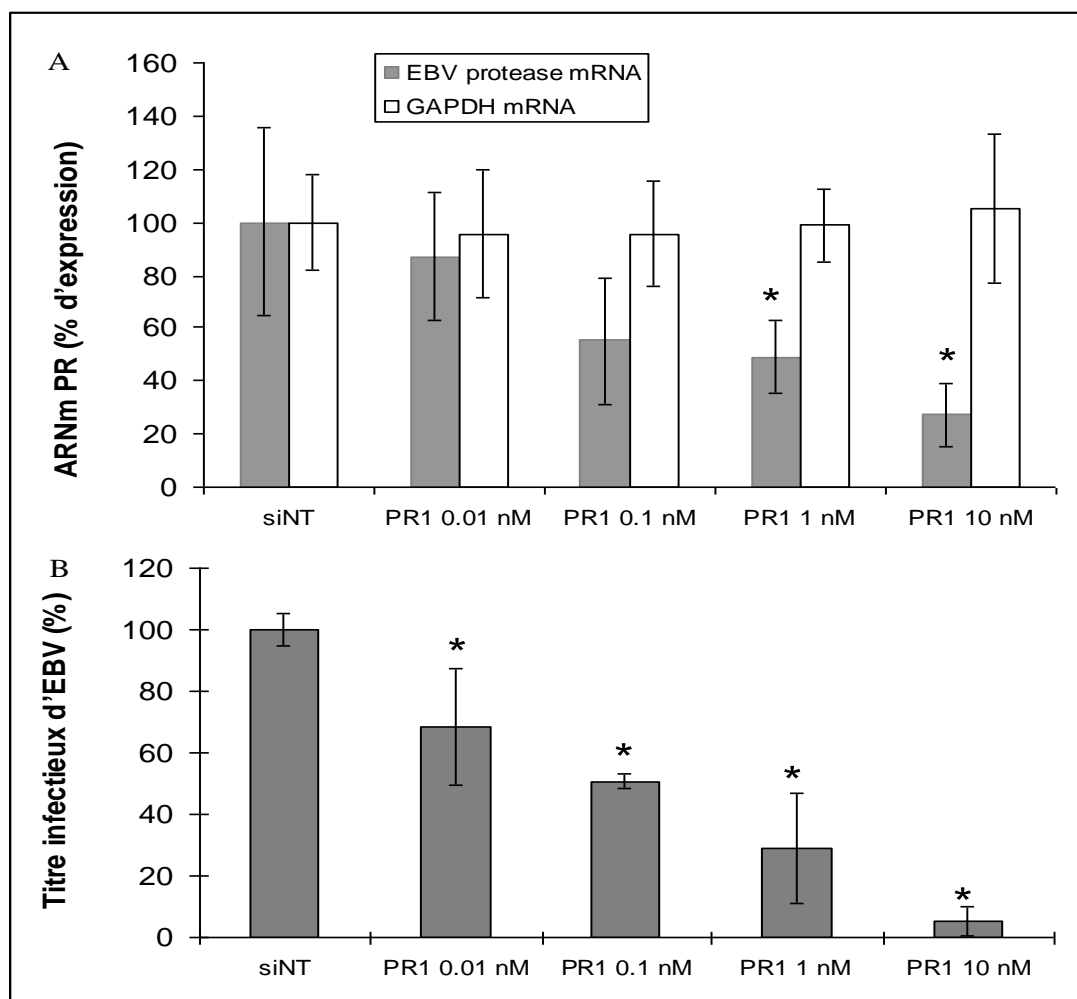


Figure 43 : Effet dose-dépendant du siRNA anti-protéase PR1.

Les cellules 293/EBV-GFP ont été transfectées avec les plasmides inducteurs et 100nM de siNT ou une concentration variable de PR1. (A) Quantification de l'ARNm de la protéase ou de l'ARNm du gène témoin de la GAPDH dans les culots cellulaires. (B) Mesure du taux de particules virales infectieuses dans les surnageants cellulaires. L'ensemble des résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au siNT. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne +/- écart type. Les astérisques signalent une différence significative ($p < 0,05$ avec le test de Student). Cette expérience a été reproduite 3 fois avec des résultats similaires.

4-4- Effet du siRNA anti-protéase PR1 sur la synthèse d'ADN viral

Au vu des résultats précédents et afin de mieux comprendre le mécanisme d'inhibition de la production virale engendré par la transfection des siRNA anti-protéase nous avons regardé leur effet sur l'ADN viral intra et extra-cellulaire après induction de la multiplication virale. Afin de faire la part, dans les surnageants de culture cellulaire, de l'ADN viral libre et de l'ADN viral encapsidé et donc susceptible de donner des virions infectieux, nous avons, dans un deuxième temps, traité les surnageants obtenus avec de la DNase (40 U/ml) pour éliminer les ADN nus. A l'état basal, les cellules 293/EBV-GFP contiennent environ $5,17 \times 10^5$ copies d'ADN/ng d'ADN total. L'activation du cycle lytique obtenue par transfection des plasmides inducteurs permet de multiplier ce chiffre par 10. La transfection de PR1 à 100nM dans les cellules diminue de 13 % cette quantité d'ADN viral intra-cellulaire obtenu après induction (par rapport au siNT) et de 17% celle retrouvée dans le surnageant cellulaire. En revanche, la quantité d'ADN viral dans les surnageants traités avec 40 U/ml de DNase diminue lui de 86% (Tableau 11). La chute importante de l'ADN viral encapsidé correspond à la diminution du nombre de virions infectieux rapporté ci-dessus par sur-infection de Raji.

Tableau 11: Quantification par PCR de l'ADN intra et extra-cellulaire après 72h00 d'inhibition par le siRNA anti-protéase PR1.

ADN EBV	ADN EBV (nombre de copies)			
	Mock	I-plasmids	I-plasmids + siNT	I-plasmids + PR1
Extra-cellulaire ^a	3.58×10^5	7.01×10^6	3.15×10^6	2.61×10^6
Extra-cellulaire ^a +DNase	6.10×10^3	4.13×10^5	2.05×10^5	2.89×10^4
Intra-cellulaire ^b	5.17×10^5	3.77×10^6	2.61×10^6	2.28×10^6

a ADN EBV, copies /ml de surnageant

b ADN EBV, copies/ng d'ADN total

I-plasmids = plasmids inducteurs, siNT = siRNA non-targeting, PR1 = siRNA anti-protéase n°1

4-5- Comparaison de l'inhibition de la réplication virale obtenue avec le siRNA PR1 et celle des antiviraux anti-herpesvirus traditionnels

Afin de pouvoir comparer, sur un même système cellulaire, l'efficacité de nos siRNA avec les drogues anti-herpesvirus traditionnelles qui visent la polymérase virale, nous avons, dans la même expérience, testé l'efficacité du ganciclovir, du foscarnet et du cidofovir par rapport à notre siRNA le plus efficace, c'est à dire le PR1.

Ces expériences ont été menées sur un clone re-sélectionné à partir des cellules 293/EBV-GFP nommé EGC5.

Une expérience préliminaire (résultats non montrés) basée sur les travaux de Mirvatt Ballout (Ballout, 2005) nous a permis de tester différentes concentrations de ces antiviraux sur notre modèle cellulaire. Les plus efficaces ont été retenues pour la suite. Le ganciclovir qui s'était montré être la drogue la plus efficace lors d'une expérience précédente a également été associé au PR1 à la recherche d'une synergie d'action entre siRNA et antiviraux « conventionnels ».

Comparées au siRNA témoin (siNT : 100nM), l'ARNm protéase est diminué de façon significative que ce soit avec le siRNA PR1 (100nM) ou avec les drogues anti-polymérase : ganciclovir (10 µg/ml), cidofovir (6 µg/ml) et foscarnet (150 µg/ml). Cette inhibition s'échelonne entre 66 et 87% de diminution d'ARNm protéase mesuré par RT-PCR quantitative (Figure 43-A). L'association siRNA anti-protéase et ganciclovir permet même d'obtenir une diminution de l'ARNm protéase de 96% statistiquement plus importante que celle obtenue avec PR1 seul ($p < 0,01$). Aucune variation significative n'est observée sur l'ARNm du gène cellulaire témoin de la glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase

(GAPDH) mesuré sur les mêmes extraits ($p > 0,05$) à l'exception de la condition avec le ganciclovir seul où on note une diminution significative du gène cellulaire signant une toxicité cellulaire.

En revanche, seuls les surnageants des cultures de cellules 293/EBV-GFP transfectées par le siRNA PR1 (100nM), seul ou en association avec le ganciclovir, montrent une diminution significative ($p < 0,001$) de leur infectivité (Figure 43-B).

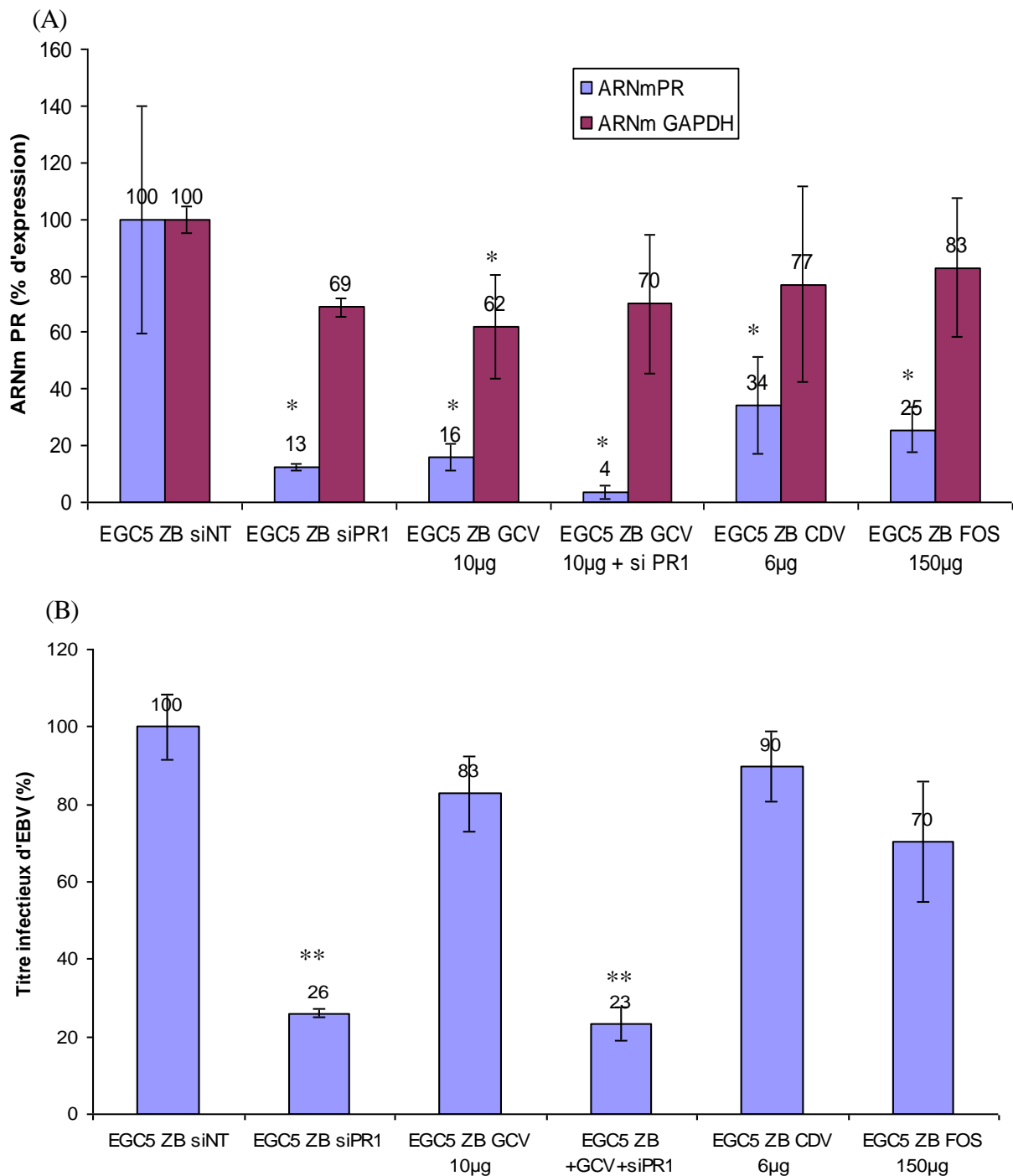


Figure 44 : Comparaison de l'inhibition de la réplication virale obtenue avec le siRNA PR1 et celle des antiviraux anti-herpesvirus traditionnels

Les siRNA (100nM) ou les antiviraux ont été co-transfectés avec des plasmides inducteurs (ZB) (0,5µg/puits) dans des cellules EGC5. 72h00 après la transfection les cellules sont récoltées et l'ARNm protéase est mesuré par RT-PCR quantitative (A). (B) Les surnageants sont inoculés sur des cellules Raji afin de mesurer le nombre de virions infectieux obtenu. Après 72h00 d'incubation, le nombre de Raji fluorescentes est estimé au cytomètre de flux. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne de 4 puits de culture indépendants +/- écart type en % par rapport au siRNA témoin (siNT). Les astérisques signalent une différence significative (* $p < 0.05$ et ** $p < 0,001$ avec le test de Student). Cette expérience a été reproduite 2 fois avec des résultats similaires. GCV : ganciclovir, CDV : cidofovir, FOS : foscarnet.

4-6- Evaluation de shRNAs anti-protéase construits sur le modèle des siRNA anti-protéase n°1 et 2

Afin de pouvoir envisager l'évaluation de notre stratégie d'ARN interférence anti-EBV sur des lymphocytes B (cellules hôtes principales de l'EBV), nous avons souhaité renforcer la stabilité physique de nos siRNAs. La fabrication de short hairpin RNA (« shRNA ») permet également d'obtenir une expression intracellulaire plus durable des siRNA. Nous avons construit par clonage 3 shRNA codant l'un pour un siRNA « non targeting » servant de témoin négatif et les deux autres pour les siRNA anti-protéase d'EBV donc l'activité a été précédemment démontrée PR1 et PR2. La séquence des régions clonées dans le plasmide pRETROSUPER (cf. matériel et méthodes chapitre 10) a été contrôlée par séquençage (Figure 45).

```
pRETRO  TCGATAAGCT TA----- ----- -----GA TCTGTGGTCT
NTc1    TCGATAAGCT TAAAAATTCT CCGAACGTGT CACGTCTCT CTTGAAACGT GACACGTTTCG GAGAAGGGGA TCTGTGGTCT
PR1C2  TCGATAAGCT TAAAAAGCAC TTTAGTGACC TGGAAATCT CTTGAAATTC AGGTCACTAA AGTGC GGGGA TCTGTGGTCT
PR2c4  TCGATAAGCT TAAAAAGGCA ATCGATGCTG GATTTTCT CTTGAAAAAT CCAGCATCGA TTGCC GGGGA TCTGTGGTCT
```

Figure 45 : Séquence des clones shRNA.

Alignement des bases séquencées pour 3 clones bactériens porteurs respectivement des plasmides pRETROSUPER-shNT, pRETROSUPERshPR1 et pRETROSUPERshPR2.

En rouge sont représentées les bases similaires pour les 4 séquences, en bleu, celles similaires aux 3 clones de shRNA et en noir les bases différentes entre les 3 clones.

Ces shRNAs ont été testés selon le protocole décrit précédemment sur le modèle de cellules EGC5. Avec shPR2 (le clone shPR1 n'ayant été obtenu que plus tard), une diminution de 40% du nombre de virions infectieux et de 65% de l'ARNm protéase était observée. Les conditions expérimentales ont été adaptées à l'utilisation des shRNA (temps d'expression des siRNA) et 2 réactifs de transfection différents du JetSi ont été testés. Les shRNA (0,5 µg/puits) ont été transfectés 15h00 avant les plasmides inducteurs avec de la Lipofectamine (1 µl/puits) ou du PolyEthylèneImmine (PEI). Dans les cellules traitées par shPR2, on obtient alors une

diminution respective de 84 et 80% de l'ARNm protéase avec la LPF ou le PEI ainsi qu'une chute de 62 et 80% du titre viral infectieux respectivement.

5-Inhibition de la réplication de l'EBV par une association de siRNA dirigés contre le cycle lytique

Afin de rechercher une synergie d'action de plusieurs siRNA dirigés contre le cycle lytique d'EBV, nous avons testé des siRNA dirigés contre la glycoprotéine d'enveloppe gp350 et contre le transactivateur ZEBRA sur le système cellulaire EGC5.

5-1- Inhibition de la réplication de l'EBV par 6 siRNA anti-gp350

L'effet des siRNA gp350 sur l'ARNm cible a été évalué par la quantification en RT-PCR temps réel de l'ARNm gp350.

Les quatre premiers siRNA anti-gp350 (siGP1, siGP2, siGP3 et siGP4) transfectés à 100nM dans des conditions identiques à celles utilisée pour le siRNA anti-protéase n'ont pas permis d'obtenir de diminution significative de l'ARNm gp350. En revanche, le siGP5 et siG6, utilisés également à 100nM entraînent une diminution significative ($p < 0,01$) de, respectivement, 96 et 92% de l'ARNm gp350 par rapport au siNT (100 nM) (Figure 46). Leur impact sur le nombre de particules virales infectieuses présentes dans le surnageant a alors été évalué (Figure 47). La baisse obtenue (36% par rapport au siNT) n'est pas statistiquement significative ($0,05 < p < 0,1$) mais est reproductible sur 2 expériences en quadruplicate. Le siGP5 est donc sélectionné pour les essais d'association.

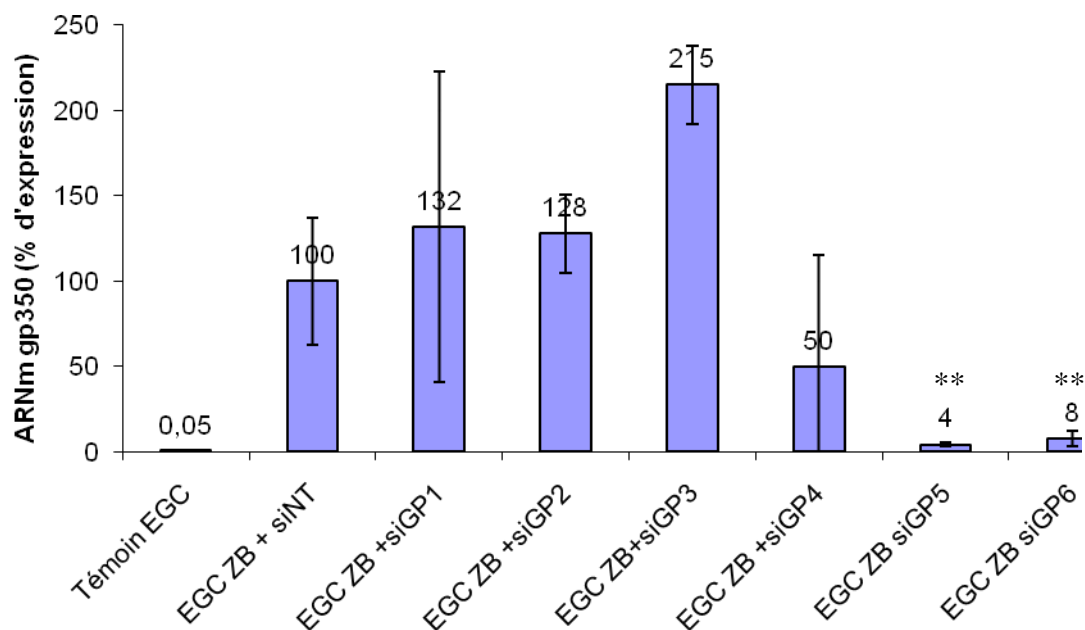


Figure 46 : Inhibition de l'ARNm gp350 par 6 siRNA anti-gp350 siGP1, siGP2, siGP3, siGP4, siGP5 et siGP6.

Les siRNA anti-gp350 (100nM) ont été co-transfectés avec les plasmides inducteurs (ZB) (0,5µg/puits) dans des cellules EGC5. 72h00 après la transfection, les cellules sont récoltées et l'ARNm gp350 extrait est analysé par RT-PCR quantitative. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne de 4 puits +/- écart type en % par rapport au siRNA témoin (siNT). Les astérisques signalent une différence significative (**p<0,001 avec le test de Student). Cette expérience a été reproduite 3 fois avec des résultats similaires.

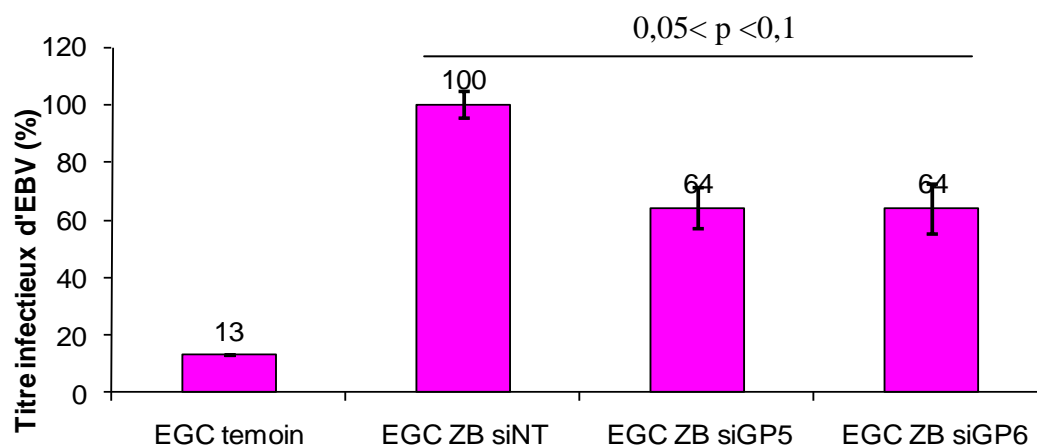


Figure 47 : Inhibition de la fabrication de virions infectieux par les siRNA siGP5 et siGP6.

Les siRNA siGP5 et siGP6 (100nM) ont été co-transfectés avec des plasmides inducteurs (ZB) (0,5µg/puits) dans des cellules EGC5. 72h00 après la transfection, les surnageants sont inoculés sur des cellules Raji afin de mesurer l'infectiosité des particules fabriquées. Après 72h00 d'incubation, le nombre de Raji fluorescentes est estimé au cytomètre de flux. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne de 4 puits +/- écart type en % par rapport au siRNA témoin (siNT). Cette expérience a été reproduite 2 fois avec des résultats similaires.

5-2- Inhibition de la réplication de l'EBV par un siRNA anti-ZEBRA

Nous avons également testé, selon le même protocole, le siRNA anti-ZEBRA décrit en 2004 par Chang et al. (2004). Sur une expérience reproduite 2 fois en quadruplicate, une diminution non statistiquement significative de l'ARN ZEBRA est observée après transfection de 100nM de siRNA anti-ZEBRA (Figure 48-A). En revanche, le nombre de virions infectieux dans les surnageants de culture subit une diminution significative ($p < 0.01$) de 47% par rapport au siNT (Figure 48-B).

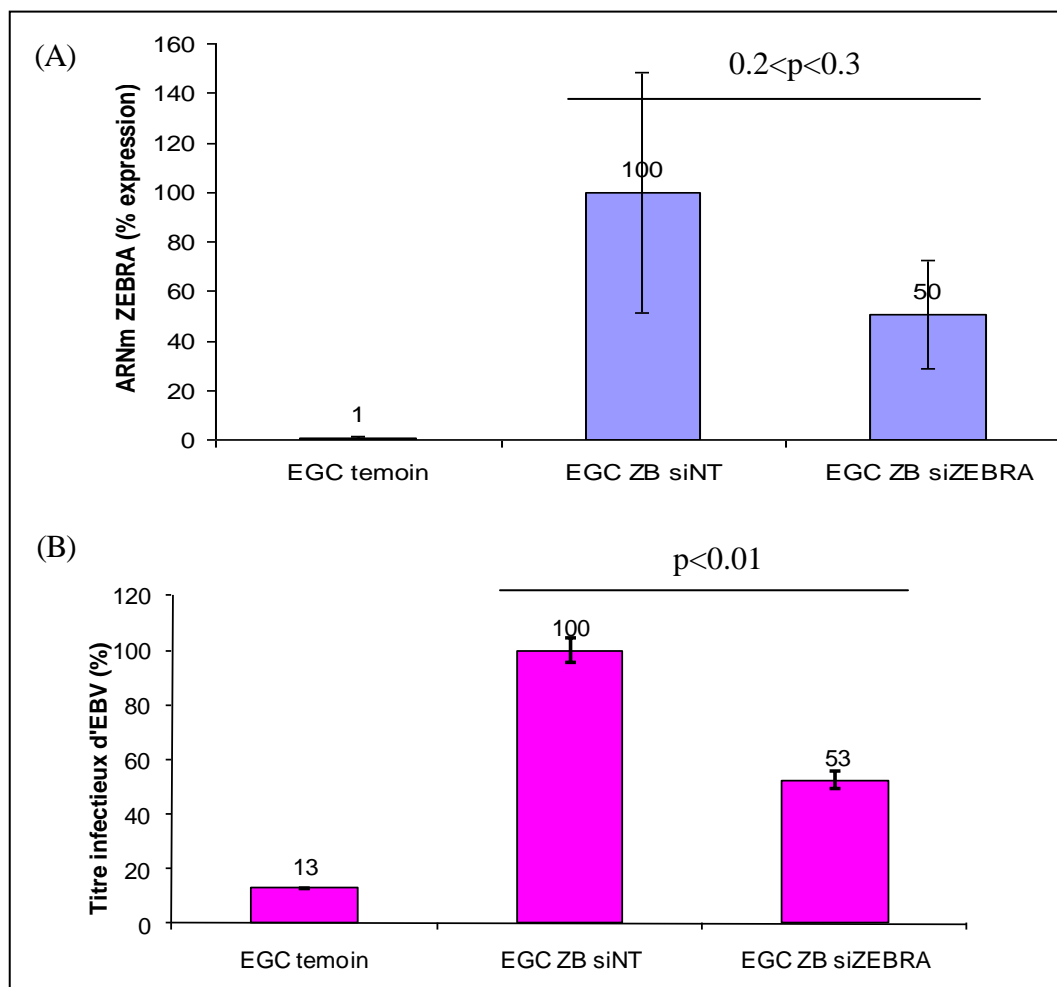


Figure 48 : Inhibition de l'ARNm ZEBRA (A) et de la fabrication de virions infectieux (B) par siRNA anti ZEBRA (siZB).

Le siZB (100nM) a été co-transfecté avec des plasmides inducteurs (ZB :0.5 μ g/puits) dans des cellules EGC5. 72h00 après la transfection les cellules sont récoltées et l'ARN extrait est analysé par RT-PCR quantitative (A). (B) Les surnageants sont inoculés sur des cellules Raji afin de quantifier le nombre de particules infectieuses produites. Après 72h00 d'incubation, le nombre de cellules Raji fluorescentes est estimé au cytomètre de flux. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne de 4 puits +/- écart type en % par rapport au siRNA témoin (siNT). Cette expérience a été reproduite 2 fois avec des résultats similaires.

5-3- Inhibition de la réplication de l'EBV par le mélange des siRNA dirigés contre la gp350, ZEBRA et la protéase.

Le siGP5 sélectionné et le siZB décrit dans la littérature ont été associés au PR1 afin de rechercher une éventuelle synergie d'effet. La quantification simultanée des messagers par RT-PCR quantitative protéase, gp350 et ZEBRA sur les cellules 293/EBV-GFP traitées avec

chacun des siRNA pris séparément a permis d'affirmer la sélectivité d'action de chaque siRNA pour sa cible (Figure 49-A). En effet, PR1 diminue sélectivement de 83% l'ARNm protéase mais n'a pas d'effet sur les ARNm gp350 et ZEBRA. De même, siGP5 diminue sélectivement l'ARNm gp350 et siZB l'ARNm ZEBRA. Le mélange des 3 siRNA « pool » permet d'obtenir une diminution significative ($p < 0,05$) des 3 ARNm protéase, gp350 et ZEBRA. Cette inhibition sur l'ARNm protéase n'est pas statistiquement différente ($p > 0,2$) de celle observée avec le siRNA PR1 seul. En revanche, l'effet sur la production de virions infectieux est significativement plus important pour le « pool » (77% d'inhibition par rapport au siNT), que celui obtenu avec chacun des siRNA pris séparément (52 % pour siPR1, 30% pour siGP5 et 18% pour siZB) (Figure 49-B).

Il semble donc qu'il y ait une synergie d'action de ces 3 siRNA quand ils sont utilisés en mélange.

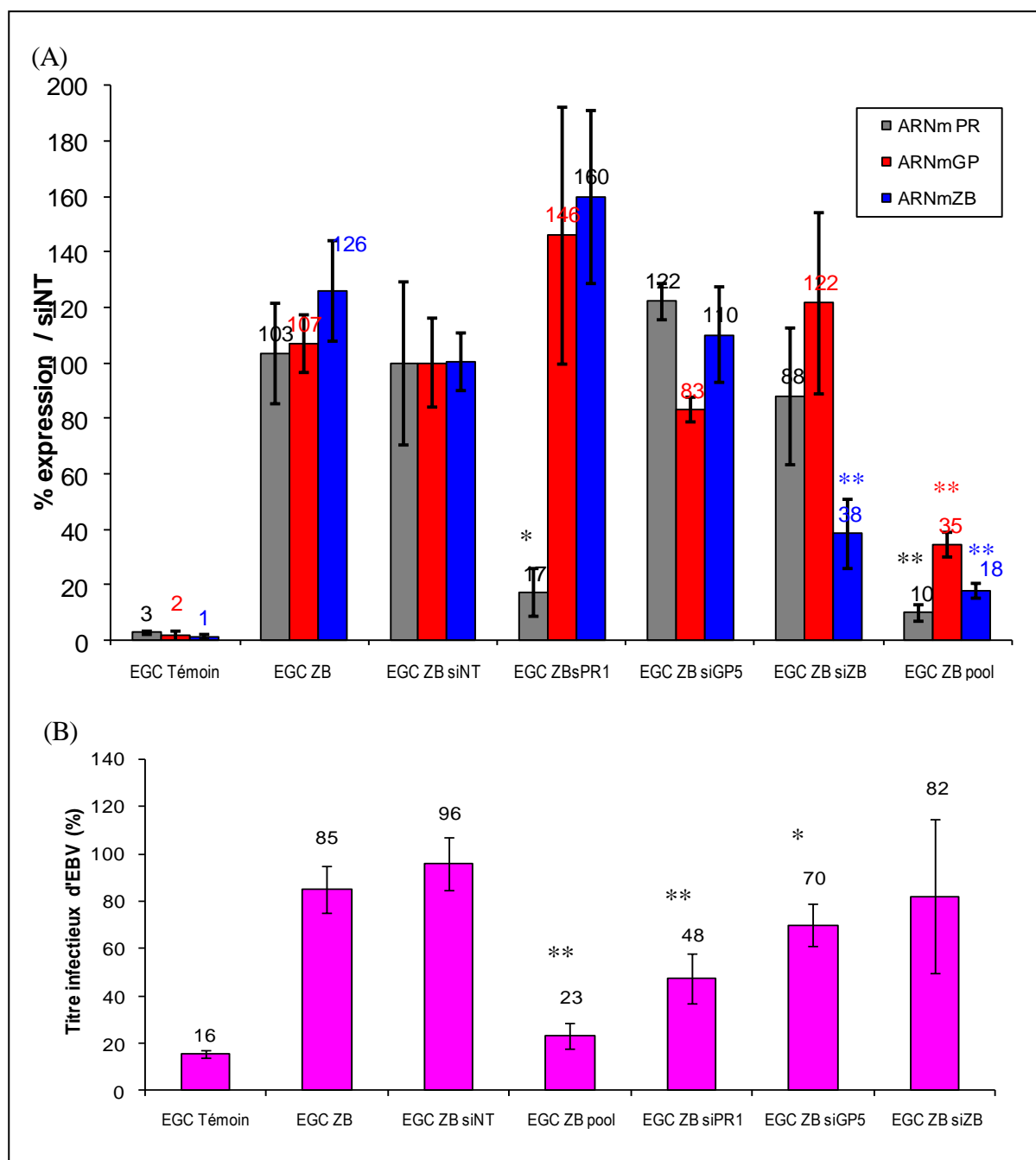


Figure 49 : Comparaison de l'effet des 3 siRNA anti-Protéase, anti-gp350 et anti-ZEBRA et de leur association.

Les siRNA (100nM chacun ou en mélange) ont été co-transfectés avec des plasmides inducteurs dans des cellules EGC5. 72h00 après la transfection, les cellules sont récoltées et l'ARN extrait est analysé avec 3 RT-PCR quantitatives protéase, gp350 et ZEBRA(A). (B) Les surnageants sont inoculés sur des cellules Raji afin de mesurer l'infectiosité des particules produites. Après 72h00 d'incubation, le nombre de Raji fluorescentes est estimé au cytomètre de flux. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne de 4 puits +/- écart type en % par rapport au siRNA témoin (siNT). Les astérisques signalent une différence significative (* : $p < 0,01$ et ** : $p < 0,001$ avec le test de Student). Cette expérience a été reproduite 3 fois avec des résultats similaires.

6-Expériences préliminaires : infection d'un lymphocyte B EBV positif par des particules rétrovirales

Devant les résultats d'inhibition du cycle lytique d'EBV obtenus avec un siRNA anti-protéase seul ou en association, sur le modèle cellulaire épithélial des 293/EBV-GFP (Delecluse), nous avons voulu vérifier s'il existait une inhibition similaire dans un modèle de lymphocyte B infecté par EBV. Cet objectif n'est pas encore atteint mais voici les résultats des expériences préliminaires réalisées dans ce but.

6-1- Estimation de l'expression du cycle répliatif viral dans des lignées lymphocytaires B

Afin de pouvoir visualiser l'impact de notre stratégie d'ARN interférence sur des lignées lymphocytaires B, nous avons mis au point un marquage intracellulaire de l'antigène viral de capsid VCA qui permet d'évaluer la quantité d'antigène exprimé par cytométrie de flux (cf. Matériel et méthodes). Ces essais ont donc été réalisés sur des cellules Akata induites ou non par liaison avec des immunoglobulines (0,2% (v/v)). On observe une induction de près de 14% de la quantité d'antigène VCA détectée en intracellulaire (Figure 50).

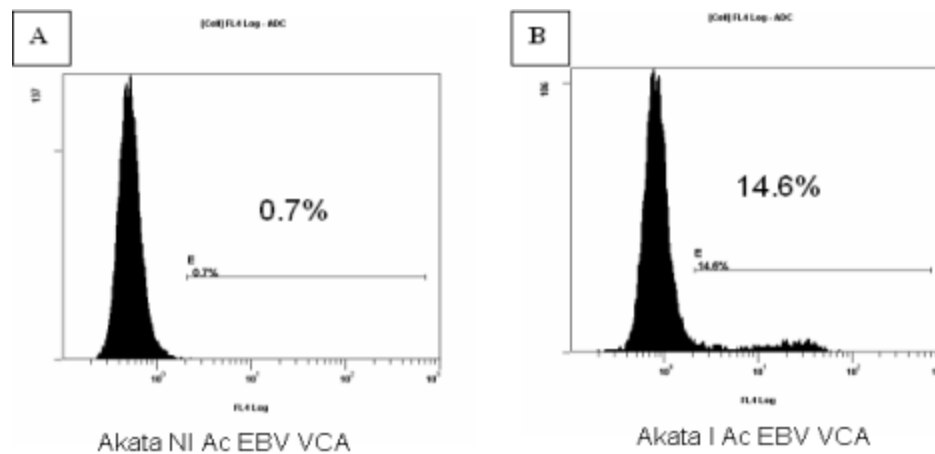


Figure 50 : Quantification par cytométrie de flux des antigènes de capside (VCA) dans des cellules Akata 72h00 après induction par des Immunoglobulines.

A) sans induction (NI) ou B) induites (I) par liaison à des immunoglobulines (0,2% (v/v)).

L'induction des cellules Akata par les immunoglobulines permet également d'obtenir une augmentation de plus de 2 log de l'ARNm protéase ainsi que de l'ADN extracellulaire (Tableau 12). On note que l'induction maximale de l'ARNm protéase est obtenue 72h00 après l'induction comme dans les cellules épithéliales 293/EBV-GFP.

Tableau 12 : Quantification par PCR et RT-PCR de l'ADN viral intra (IC), extracellulaire (EC) et de l'ARNm protéase après induction de cellules Akata par des immunoglobulines (0,2% (v/v)).

	48h00 post-induction		72h00 post-induction		96h00 post-induction	
	Non induit	Induit	Non induit	Induit	Non induit	Induit
ADN EBV EC ^a	1.20 x 10 ⁶	2.90 x 10 ⁸	1.43 x 10 ⁶	2.90 x 10 ⁸	1.10 x 10 ⁶	2.90 x 10 ⁸
ADN EBV IC ^b	6.94 x 10 ⁴	2.63 x 10 ⁶	5.79 x 10 ⁴	2.70 x 10 ⁶	4.88 x 10 ⁴	8.75 x 10 ⁵
ARNmPR ^c	2.50 x 10 ⁵	8.51 x 10 ⁶	2.41 x 10 ⁴	2.53 x 10 ⁶	3.67 x 10 ⁴	8.44 x 10 ⁴

^a : copies ADN thymidine kinase EBV/ml de surnageant

^b : copies ADN thymidine kinase EBV/ng ADN total

^c : copies ARNm protéase d'EBV/μg d'ARN total

6-2- Estimation de l'expression, par des lignées lymphocytaires B EBV positives, d'un plasmide test exprimant la GFP transmis par infection rétrovirale

Des particules rétrovirales porteuses d'un plasmide pRETROSUPER codant pour la GFP (PRS-GFP) ont été également synthétisées. Afin d'évaluer la capacité des particules ainsi formées à infecter des lymphocytes B, une expérience d'infection de différentes lignées lymphocytaires B porteuses du virus EBV a été réalisée. Sur une plaque 6 puits, 1ml ou 100µL (dilution 1/10) de surnageant ont été déposés sur 2 millions de cellules Akata, B95-8, P3HR1 et Raji dans 3ml de RPMI (sans SVF). Le nombre de lymphocyte B devenu fluorescent est évalué 24h00 post-infection au cytomètre de flux.

Vingt quatre heures après infection, on obtient entre 5 et 17% de cellules B exprimant le plasmide d'intérêt (Tableau 13).

Tableau 13 : Pourcentage d'infection des lignées cellulaires B par des particules rétrovirales GFP positives mesuré au cytomètre de flux.

Lignée cellulaire	Akata	B95-8	P3HR1	Raji
SN pur	17%	NR	12,4%	10,4%
SN 1/10ème	5%	11%	10,4%	7,8%

Résultats sur 200 000 cellules exprimés en pourcentage de cellules GFP positives par rapport au témoin cellule

SN= surnageant des 293T contenant les particules rétrovirales

NR= non réalisé

Cette expérience a été reproduite 2 fois pour les lignées P3HR1 et Akata avec des résultats similaires

Devant le faible pourcentage de cellules GFP positives obtenu, afin de mieux sélectionner la population lymphocytaire ayant acquis le plasmide d'intérêt, une sélection par la puromycine 0,5µg/µl a été entreprise sur les Akata et les P3HR1 pendant 45 jours. Durant ce temps, toutes les semaines un Ficoll est réalisé afin d'éliminer les cellules mortes et le milieu est changé et remplacé par du milieu frais (RPMI 10%SVF + 0,5µg/ml puromycine).

Après sélection, on obtient 79,5% des cellules porteuses du plasmides d'intérêt exprimant ici la GFP (Figure 51).

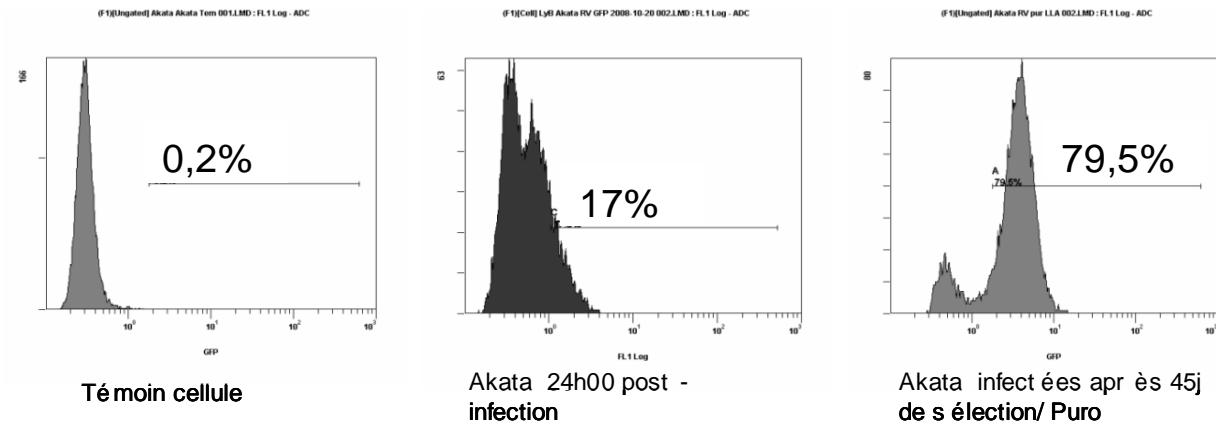


Figure 51 : Evolution du taux de cellules Akata fluorescentes après infection par des particules rétrovirales exprimant la GFP et sélection par la puromycine (0,5µg/ml) pendant 45 jours.

Mesure effectuée par passage de 200 000 cellules au cytomètre de flux.

Cette expérience n'a pas encore pu être réalisée avec les plasmides codant pour les shRNAs.

III DISCUSSION

Le virus Epstein Barr est l'agent causal de la mononucléose infectieuse et est associé à plusieurs cancers. Malheureusement, à ce jour, aucune molécule antivirale n'a suffisamment fait la preuve de son efficacité pour pouvoir être utilisée en clinique (Gershburg and Pagano, 2005; Greco et al., 2007). Dans ce contexte, de nouvelles stratégies thérapeutiques sont à envisager.

Dans la plupart des pathologies associées à EBV, la réplication virale semble être présente et jouer un rôle dans l'initiation du phénomène cancéreux et/ou de l'extension tumorale. L'inhibition de cette réplication, de façon plus efficace que celle obtenue avec les drogues anti-ADN polymérase actuelles, pourrait ainsi avoir un intérêt thérapeutique. Parmi les protéines impliquées dans la réplication de l'EBV, la protéase (EBV PR) est essentielle à la formation de nouveaux virions infectieux (Donaghy and Jupp, 1995). Elle participe à l'assemblage de la capsidie et permet l'encapsidation de l'ADN viral (Henson et al., 2009). De ce fait, et comme c'est le cas avec des nombreuses protéases virales (Leung et al., 2000), elle constitue une cible thérapeutique intéressante (Waxman and Darke, 2000). L'utilisation de l'ARN interférence comme thérapeutique antivirale est de plus en plus souvent décrite en pré-clinique et même sur certains essais de phase I/II et semble, notamment de par son excellente spécificité, être une voie prometteuse (Haasnoot et al., 2007; Lopez-Fraga et al., 2008).

Ce travail a montré que des ARNm codant pour EBV PR étaient présents dans des biopsies de cancers associés à EBV, confirmant ainsi l'expression de cette cible dans des pathologies cancéreuses associées à EBV. La présence d'autres ARNm du cycle lytique comme ceux de *BZLF1*, *BRLF1*, *BMLF1*, *BLLF1*, *BHRF* ou de *BARF1* avait déjà été décrite dans des biopsies de CC (Feng et al., 2000; Germi et al., 2004; Martel-Renoir et al., 1995), dans des carcinomes gastriques (Luo et al., 2005) et dans des lymphomes (SLPT ou LB)

associés à EBV (Montone et al., 1996; Tao et al., 1998) ce qui confirme l'existence d'un cycle lytique dans ces pathologies.

Le séquençage du gène *BVRF2* codant pour la protéase d'EBV a montré que sa séquence nucléotidique présentait peu de variations quels que soient la cellule hôte ou le sous-type viral puisque l'on retrouve 96% d'homologie entre les différentes souches issues de lignées cellulaires de lymphocytes et d'échantillons cliniques de pathologies lymphoïdes ou épithéliales. Un pourcentage d'homologie similaire (91%) est décrit pour le domaine catalytique de la protéase du virus Herpes Simplex (Hoog et al., 1997) alors que ces protéases sont très différentes d'un virus à l'autre au sein de cette même famille (Qiu et al., 1997; Unal et al., 1997). Cette stabilité génomique d'EBV PR en fait une bonne candidate à l'inhibition par ARN interférence (de Fougerolles et al., 2007) et a permis le choix de 4 siRNA anti-protéase.

Le mélange de ces 4 siRNA anti-protéase a montré, sur un modèle de cellules épithéliales, sa capacité à diminuer de façon sélective la quantité de transcrits du gène de la protéase (*BVRF2*) d'environ 70%. Cette diminution au niveau transcriptionnel de l'expression de *BVRF2* aboutit à une diminution de la forme monomérique de la protéase mais également de la polyprotéine protéase-assembléine qui dérive du même transcrit. Enfin, l'inhibition de la protéase d'EBV a comme conséquence la diminution de plus de 95% de la production de virions infectieux dans les surnageants des cellules traitées. L'utilisation du siRNA le plus actif des 4 (PR1) permet d'obtenir des pourcentages d'inhibition similaires. La quantification, dans les surnageants de culture, de l'ADN viral encapsidé (non détruit par un traitement à la DNase) a confirmé la diminution de la production de ces particules virales (86%). L'absence d'inhibition de l'ADN EBV intracellulaire montre que cette stratégie n'affecte pas la réplication de l'ADN, mais plutôt les événements tardifs du cycle lytique. Des résultats similaires, obtenus sur le même modèle cellulaire, ont été décrits par Gershburg et al. avec des

siRNA ciblant la protéine kinase (PK) *BGLF4* d'EBV (Gershburg et al., 2007). A ce jour, peu d'études ont décrit l'inhibition du cycle lytique d'EBV par ARN interférence. Outre l'étude du siRNA anti-PK décrite par Gershburg et al., seule l'inhibition de ZEBRA a été rapportée par Chang et al. (Chang et al., 2004). Les auteurs ont montré une disparition en northern blot de l'ARNm ZEBRA lorsque le siRNA était co-transfecté avec un plasmide ZEBRA dans des cellules 293. Sur des cellules de NPC, ils ont également démontré une baisse de l'expression protéique mais n'ont pas évalué la diminution de la production de virions infectieux.

La réalisation d'une courbe dose-effet avec PR1 a montré une diminution dose-dépendante de l'ARNm protéase et des particules virales infectieuses produites dans le surnageant pour des concentrations de siRNA inférieures à 10nM. Les CI_{50} de PR1, ont été calculées à 0,55 nM pour l'inhibition de l'ARNm et à 0,09 nM, pour l'inhibition du nombre de particules virales infectieuses. Des CI_{50} similaires ont été rapportées par Vigne et al. dans le cadre de l'inhibition des poxvirus par des siRNA dirigés contre le complexe de réplication du virus (Vigne et al., 2008). Des CI_{50} légèrement supérieures (3 et 5 nM) ont également été rapportées par Pyrc et al. pour des siRNA dirigés contre le coronavirus humain NL-63. Des CI_{50} aussi faibles permettent d'envisager un passage *in vivo* (Pyrc et al., 2006).

Afin d'évaluer son potentiel thérapeutique, l'activité de PR1 a été comparée, sur le même modèle cellulaire épithélial, à celle des drogues anti-ADN polymérase (ganciclovir, cidofovir et foscarnet) utilisées contre le cytomégalovirus mais dont l'efficacité sur EBV n'a jamais été clairement démontrée. Les 3 drogues, utilisées respectivement à 10 μ g/mL pour le ganciclovir, 6 μ g/mL pour le cidofovir et 150 μ g/mL pour le foscarnet, et le siRNA PR1 à 100nM ont une action proche en terme de diminution des transcrits viraux protéase. En revanche, seul le siRNA anti-protéase permet d'obtenir une diminution du nombre de particules virales infectieuses dans le surnageant. A notre connaissance, peu d'études ont comparé, *in vitro*, sur un même système cellulaire, l'ARNi et les thérapeutiques

conventionnelles. Deux équipes ont montré une meilleure efficacité de siRNA anti-VHB par rapport la lamivudine sur un système de culture d'une lignée d'hépatocyte (Li et al., 2007a) ou sur souris transgéniques (Carmona et al., 2009).

Dans notre travail l'association siRNA anti-protéase et ganciclovir permet d'obtenir une meilleure inhibition de l'ARNm protéase que le ganciclovir ou le siRNA PR1 utilisés seuls. La synergie d'action entre l'ARNi antivirale et les traitements de référence a été déjà décrite dans différentes situations (Li et al., 2007a; Putral et al., 2005), y compris dans le cas du CC associé à EBV où l'équipe de Mei et al. a démontré une synergie d'action entre un siRNA anti-LMP1 et les traitements classiques du CC que sont la bléomycine et le cis-platine (Mei et al., 2007). Un résultat similaire a récemment été rapporté par Vigne et al. (Vigne et al., 2009). Ils démontrent en effet que l'association d'un siRNA contre le virus de la vaccine et du cidofovir permet d'obtenir de meilleurs résultats en termes de réduction du titre viral que le siRNA ou le cidofovir utilisés seuls. Une association entre siRNA anti-protéase et drogues ciblant l'ADN polymérase pourrait ainsi être envisagée chez les patients présentant des pathologies associées à EBV.

L'association de plusieurs siRNA dirigés contre différentes protéines précoce (le transactivateur ZEBRA) et tardives (la glycoprotéine d'enveloppe gp350/220 et la protéase) du cycle lytique d'EBV a montré une inhibition plus importante du nombre de particules virales infectieuses que le siRNA le plus efficace (PR1). L'association de siRNA dirigés contre différentes cibles d'un même microorganisme a été décrite par plusieurs équipes comme améliorant l'efficacité de l'ARNi (Kahana et al., 2004; Zheng et al., 2004). De plus, en thérapie antivirale, la démultiplication des cibles permet de limiter l'apparition de résistance (Leonard and Schaffer, 2006). Des résistances aux siRNA ont été décrites pour le VIH (Sabariegos et al., 2006; ter Brake et al., 2006) de même que pour le virus de l'hépatite C (Wilson and Richardson, 2005) et le poliovirus (Gitlin et al., 2005). A noter connaissance,

des résistances à l'ARNi n'ont pas encore été rapportés pour les virus à ADN, dans lesquels cette stratégie thérapeutique a été également moins utilisée. Cependant, les virus de la famille des *herpesviridae* comme HSV ou CMV peuvent développer des mutations de résistances aux thérapeutiques anti-polymérase. Il semble donc raisonnable d'envisager une combinaison de cibles différentes pour EBV.

Le siRNA anti-protéase PR1 présenté dans ce travail permet donc d'obtenir, sur des cultures de cellules épithéliales infectées par EBV, une inhibition de la production de particules virales du même ordre que celle obtenue par Gershburg et al. avec un siRNA anti-PK. Son action est dose dépendante jusqu'à 10nM, sa CI_{50} est de 0,55nM et il peut être utilisé en association avec d'autres siRNA ciblant d'autres protéines du cycle lytique et/ou avec le ganciclovir permettant ainsi une potentialisation de son action.

Dans les pathologies cancéreuses associées à EBV, les cellules tumorales infectées peuvent être de type épithélial dans les CC ou lymphoïdes dans les lymphomes. L'adressage des siRNAs jusqu'aux organes cibles et cellules cibles est certainement le plus gros challenge de l'ARN interférence antivirale (Stevenson, 2004). Dans le cas des CC associés à l'EBV, il est possible d'envisager une injection intra-tumorale des siRNA complexés avec des lipides cationiques (comme utilisés *in vitro* dans ce travail). Dans cette optique, les siRNAs peuvent être stabilisés par différentes modifications chimiques de leur squelette qui n'ont pas été envisagées ici (pour revue voir Manoharan, 2004). Concernant les pathologies lymphoïdes associées à EBV et notamment le SLPT, il serait intéressant de pouvoir envisager une intervention thérapeutique prophylactique ou anticipée afin d'empêcher une reprise de la multiplication virale favorisée par l'immunodépression. Dans cet objectif, il faudrait que les siRNA soient délivrés dans les lymphocytes B de façon sélective et qu'ils puissent y exercer une activité la plus durable possible. C'est pourquoi des shRNA anti-protéase permettant une expression plus durable et stable des siRNA ont été fabriqués. Le ciblage des lymphocytes B

sera réalisé grâce à des particules rétrovirales dont la spécificité d'infection pourra être renforcée en modifiant leur protéine d'enveloppe. Les essais préliminaires ont été présentés dans ce mémoire. Si les résultats obtenus en infectant des lignées de lymphocytes B EBV positives avec ces particules rétrovirales porteuses des shRNA anti-protéase sont satisfaisants, cette stratégie de vectorisation permettra de tester cette approche thérapeutique *in vivo* sur le modèle de SLPT développé chez la souris SCID par xéno greffe de lignées lymphoblastoïdes par l'équipe de Hong (Hong et al., 2005a).

BIBLIOGRAPHIE

- Abdulkarim, B., Sabri, S., Deutsch, E., Chagraoui, H., Maggiorella, L., Thierry, J., Eschwege, F., Vainchenker, W., Chouaib, S. and Bourhis, J., 2002. Antiviral agent Cidofovir restores p53 function and enhances the radiosensitivity in HPV-associated cancers. *Oncogene* 21, 2334-46.
- Adamson, W.E., McNab, D., Preston, V.G. and Rixon, F.J., 2006. Mutational analysis of the herpes simplex virus triplex protein VP19C. *J Virol* 80, 1537-48.
- Adhikary, D., Behrends, U., Boerschmann, H., Pfunder, A., Burdach, S., Moosmann, A., Witter, K., Bornkamm, G.W. and Mautner, J., 2007. Immunodominance of lytic cycle antigens in epstein-barr virus-specific CD4+ T cell preparations for therapy. *PLoS One* 2, e583.
- Al Tabaa, Y., Tuailon, E., Bollore, K., Foulongne, V., Petitjean, G., Seigneurin, J.M., Duperray, C., Desgranges, C. and Vendrell, J.P., 2009. Functional Epstein-Barr virus reservoir in plasma cells derived from infected peripheral blood memory B cells. *Blood* 113, 604-11.
- Allan, G.J., Inman, G.J., Parker, B.D., Rowe, D.T. and Farrell, P.J., 1992. Cell growth effects of Epstein-Barr virus leader protein. *J Gen Virol* 73 (Pt 6), 1547-51.
- Altmann, M. and Hammerschmidt, W., 2005. Epstein-Barr virus provides a new paradigm: a requirement for the immediate inhibition of apoptosis. *PLoS Biol* 3, e404.
- Altmann, M., Pich, D., Ruiss, R., Wang, J., Sugden, B. and Hammerschmidt, W., 2006. Transcriptional activation by EBV nuclear antigen 1 is essential for the expression of EBV's transforming genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14188-93.
- Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Kreschel, C. and Stein, H., 1995. Morphology, immunophenotype, and distribution of latently and/or productively Epstein-Barr virus-infected cells in acute infectious mononucleosis: implications for the interindividual infection route of Epstein-Barr virus. *Blood* 85, 744-50.
- Anderson, J., Li, M.J., Palmer, B., Remling, L., Li, S., Yam, P., Yee, J.K., Rossi, J., Zaia, J. and Akkina, R., 2007. Safety and efficacy of a lentiviral vector containing three anti-HIV genes--CCR5 ribozyme, tat-rev siRNA, and TAR decoy--in SCID-hu mouse-derived T cells. *Mol Ther* 15, 1182-8.
- Arbuthnot, P., Longshaw, V., Naidoo, T. and Weinberg, M.S., 2007. Opportunities for treating chronic hepatitis B and C virus infection using RNA interference. *J Viral Hepat* 14, 447-59.

- Babcock, G.J., Hochberg, D. and Thorley-Lawson, A.D., 2000. The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity* 13, 497-506.
- Balfour, H.H., Jr., Holman, C.J., Hokanson, K.M., Lelonek, M.M., Giesbrecht, J.E., White, D.R., Schmeling, D.O., Webb, C.H., Cavert, W., Wang, D.H. and Brundage, R.C., 2005. A prospective clinical study of Epstein-Barr virus and host interactions during acute infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 192, 1505-12.
- Ballout, M. 2005. Evaluation par PCR de l'activité antivirale des inhibiteurs de l'ADN polymérase du Virus d'Epstein-Barr, Faculté de Médecine, Université Joseph Fourier, Grenoble.
- Ballout, M., Germi, R., Fafi-Kremer, S., Guimet, J., Bargues, G., Seigneurin, J.M. and Morand, P., 2007. Real-time quantitative PCR for assessment of antiviral drug effects against Epstein-Barr virus replication and EBV late mRNA expression. *J Virol Methods* 143, 38-44.
- Barth, S., Pfuhl, T., Mamiani, A., Ehses, C., Roemer, K., Kremmer, E., Jaker, C., Hock, J., Meister, G. and Grasser, F.A., 2008. Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. *Nucleic Acids Res* 36, 666-75.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J., 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-6.
- Bhende, P.M., Dickerson, S.J., Sun, X., Feng, W.H. and Kenney, S.C., 2007. X-box-binding protein 1 activates lytic Epstein-Barr virus gene expression in combination with protein kinase D. *J Virol* 81, 7363-70.
- Biard, D.S., Despras, E., Sarasin, A. and Angulo, J.F., 2005. Development of new EBV-based vectors for stable expression of small interfering RNA to mimic human syndromes: application to NER gene silencing. *Mol Cancer Res* 3, 519-29.
- Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O. and Barik, S., 2005. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* 11, 50-5.
- Boccellato, F., Anastasiadou, E., Rosato, P., Kempkes, B., Frati, L., Faggioni, A. and Trivedi, P., 2007. EBNA2 interferes with the germinal center phenotype by downregulating BCL6 and TCL1 in non-Hodgkin's lymphoma cells. *J Virol* 81, 2274-82.
- Bonneau, P.R., Grand-Maitre, C., Greenwood, D.J., Lagace, L., LaPlante, S.R., Massariol, M.J., Ogilvie, W.W., O'Meara, J.A. and Kawai, S.H., 1997. Evidence of a conformational change in the human cytomegalovirus protease upon binding of peptidyl-activated carbonyl inhibitors. *Biochemistry* 36, 12644-52.
- Boshoff, C., Gao, S.J., Healy, L.E., Matthews, S., Thomas, A.J., Coignet, L., Warnke, R.A., Strauchen, J.A., Matutes, E., Kamel, O.W., Moore, P.S., Weiss, R.A. and Chang, Y., 1998. Establishing a KSHV+ cell line (BCP-1) from peripheral blood and characterizing its growth in Nod/SCID mice. *Blood* 91, 1671-9.

- Bossolasco, S., Falk, K.I., Ponzoni, M., Ceserani, N., Crippa, F., Lazzarin, A., Linde, A. and Cinque, P., 2006. Ganciclovir is associated with low or undetectable Epstein-Barr virus DNA load in cerebrospinal fluid of patients with HIV-related primary central nervous system lymphoma. *Clin Infect Dis* 42, e21-5.
- Brengele-Pesce, K., Morand, P., Schmuck, A., Bourgeat, M.J., Buisson, M., Barges, G., Bouzid, M. and Seigneurin, J.M., 2002. Routine use of real-time quantitative PCR for laboratory diagnosis of Epstein-Barr virus infections. *J Med Virol* 66, 360-9.
- Brennecke, J., Hipfner, D.R., Stark, A., Russell, R.B. and Cohen, S.M., 2003. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* 113, 25-36.
- Buisson, M., Hernandez, J.F., Lascoux, D., Schoehn, G., Forest, E., Arlaud, G., Seigneurin, J.M., Ruigrok, R.W. and Burmeister, W.P., 2002. The crystal structure of the Epstein-Barr virus protease shows rearrangement of the processed C terminus. *J Mol Biol* 324, 89-103.
- Buisson, M., Rivail, L., Hernandez, J.F., Jamin, M., Martinez, J., Ruigrok, R.W. and Burmeister, W.P., 2006. Kinetics, inhibition and oligomerization of Epstein-Barr virus protease. *FEBS Lett* 580, 6570-8.
- Buisson, M., Valette, E., Hernandez, J.F., Baudin, F., Ebel, C., Morand, P., Seigneurin, J.M., Arlaud, G.J. and Ruigrok, R.W., 2001. Functional determinants of the Epstein-Barr virus protease. *J Mol Biol* 311, 217-28.
- Bultema, R., Longnecker, R. and Swanson-Mungerson, M., 2009. Epstein-Barr virus LMP2A accelerates MYC-induced lymphomagenesis. *Oncogene* 28, 1471-6.
- Burkitt, D., 1962a. A children's cancer dependent on climatic factors. *Nature* 194, 232-4.
- Burkitt, D., 1962b. Determining the climatic limitations of a children's cancer common in Africa. *Br Med J* 2, 1019-23.
- Burkitt, D. and O'Connor, G.T., 1961. Malignant lymphoma in African children. I. A clinical syndrome. *Cancer* 14, 258-69.
- Burkitt, D. and Wright, D., 1966. Geographical and tribal distribution of the African lymphoma in Uganda. *Br Med J* 1, 569-73.
- Butz, K., Ristriani, T., Hengstermann, A., Denk, C., Scheffner, M. and Hoppe-Seyler, F., 2003. siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene* 22, 5938-45.
- Cai, X., Schafer, A., Lu, S., Bilello, J.P., Desrosiers, R.C., Edwards, R., Raab-Traub, N. and Cullen, B.R., 2006. Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS Pathog* 2, e23.
- Caldwell, R.G., Wilson, J.B., Anderson, S.J. and Longnecker, R., 1998. Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* 9, 405-11.

- Caporaso, N.E., Goldin, L.R., Anderson, W.F. and Landgren, O., 2009. Current insight on trends, causes, and mechanisms of Hodgkin's lymphoma. *Cancer J* 15, 117-23.
- Carbone, A., Cesarman, E., Spina, M., Gloghini, A. and Schulz, T.F., 2009a. HIV-associated lymphomas and gamma-herpesviruses. *Blood* 113, 1213-24.
- Carbone, A., Gloghini, A., Serraino, D. and Spina, M., 2009b. HIV-associated Hodgkin lymphoma. *Curr Opin HIV AIDS* 4, 3-10.
- Carmona, S., Ely, A., Crowther, C., Moolla, N., Salazar, F.H., Marion, P.L., Ferry, N., Weinberg, M.S. and Arbuthnot, P., 2006. Effective inhibition of HBV replication in vivo by anti-HBx short hairpin RNAs. *Mol Ther* 13, 411-21.
- Carmona, S., Jorgensen, M.R., Kolli, S., Crowther, C., Salazar, F.H., Marion, P.L., Fujino, M., Natori, Y., Thanou, M., Arbuthnot, P. and Miller, A.D., 2009. Controlling HBV replication in vivo by intravenous administration of triggered PEGylated siRNA-nanoparticles. *Mol Pharm* 6, 706-17.
- Castro, C.Y., Ostrowski, M.L., Barrios, R., Green, L.K., Popper, H.H., Powell, S., Cagle, P.T. and Ro, J.Y., 2001. Relationship between Epstein-Barr virus and lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung: a clinicopathologic study of 6 cases and review of the literature. *Hum Pathol* 32, 863-72.
- Cesarman, E., Chadburn, A., Liu, Y.F., Migliazza, A., Dalla-Favera, R. and Knowles, D.M., 1998. BCL-6 gene mutations in posttransplantation lymphoproliferative disorders predict response to therapy and clinical outcome. *Blood* 92, 2294-302.
- Chaganti, S., Ma, C.S., Bell, A.I., Croom-Carter, D., Hislop, A.D., Tangye, S.G. and Rickinson, A.B., 2008. Epstein-Barr virus persistence in the absence of conventional memory B cells: IgM+IgD+CD27+ B cells harbor the virus in X-linked lymphoproliferative disease patients. *Blood* 112, 672-9.
- Chang, Y., Chang, S.S., Lee, H.H., Doong, S.L., Takada, K. and Tsai, C.H., 2004. Inhibition of the Epstein-Barr virus lytic cycle by Zta-targeted RNA interference. *J Gen Virol* 85, 1371-9.
- Chen, C.C., Ko, T.M., Ma, H.I., Wu, H.L., Xiao, X., Li, J., Chang, C.M., Wu, P.Y., Chen, C.H., Han, J.M., Yu, C.P., Jeng, K.S., Hu, C.P. and Tao, M.H., 2007. Long-term inhibition of hepatitis B virus in transgenic mice by double-stranded adeno-associated virus 8-delivered short hairpin RNA. *Gene Ther* 14, 11-9.
- Chen, C.C., Sun, C.P., Ma, H.I., Fang, C.C., Wu, P.Y., Xiao, X. and Tao, M.H., 2009. Comparative study of anti-hepatitis B virus RNA interference by double-stranded adeno-associated virus serotypes 7, 8, and 9. *Mol Ther* 17, 352-9.
- Chen, C.Z., Li, L., Lodish, H.F. and Bartel, D.P., 2004. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303, 83-6.
- Chen, G., Shankar, P., Lange, C., Valdez, H., Skolnik, P.R., Wu, L., Manjunath, N. and Lieberman, J., 2001. CD8 T cells specific for human immunodeficiency virus, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus lack molecules for homing to lymphoid sites of infection. *Blood* 98, 156-64.

- Chen, Y., Cheng, G. and Mahato, R.I., 2008. RNAi for treating hepatitis B viral infection. *Pharm Res* 25, 72-86.
- Chen, Z., Xu, Z.F., Ye, J.J., Yao, H.P., Zheng, S. and Ding, J.Y., 2005. Combination of small interfering RNAs mediates greater inhibition of human hepatitis B virus replication and antigen expression. *J Zhejiang Univ Sci B* 6, 236-41.
- Chene, A., Donati, D., Guerreiro-Cacais, A.O., Levitsky, V., Chen, Q., Falk, K.I., Orem, J., Kironde, F., Wahlgren, M. and Bejarano, M.T., 2007. A molecular link between malaria and Epstein-Barr virus reactivation. *PLoS Pathog* 3, e80.
- Cheng, T.L., Chang, W.W., Su, I.J., Lai, M.D., Huang, W., Lei, H.Y. and Chang, W.T., 2005. Therapeutic inhibition of hepatitis B virus surface antigen expression by RNA interference. *Biochem Biophys Res Commun* 336, 820-30.
- Childs, C.C., Parham, D.M. and Berard, C.W., 1987. Infectious mononucleosis. The spectrum of morphologic changes simulating lymphoma in lymph nodes and tonsils. *Am J Surg Pathol* 11, 122-32.
- Choy, E.Y., Kok, K.H., Tsao, S.W. and Jin, D.Y., 2008. Utility of Epstein-Barr virus-encoded small RNA promoters for driving the expression of fusion transcripts harboring short hairpin RNAs. *Gene Ther* 15, 191-202.
- Cingolani, A., Fratino, L., Scoppettuolo, G. and Antinori, A., 2005. Changing pattern of primary cerebral lymphoma in the highly active antiretroviral therapy era. *J Neurovirol* 11 Suppl 3, 38-44.
- Cohen, J.I. and Lekstrom, K., 1999. Epstein-Barr virus BARTF1 protein is dispensable for B-cell transformation and inhibits alpha interferon secretion from mononuclear cells. *J Virol* 73, 7627-32.
- Cohen, J.I., Wang, F., Mannick, J. and Kieff, E., 1989. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9558-62.
- Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Zimmer, U., Rousselet, G., Pavlish, O., Banchereau, J., Tursz, T., Bornkamm, G. and Lenoir, G.M., 1990. Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23. *J Virol* 64, 1002-13.
- Cosmopoulos, K., Pegtel, M., Hawkins, J., Moffett, H., Novina, C., Middeldorp, J. and Thorley-Lawson, D.A., 2009. Comprehensive profiling of Epstein-Barr virus microRNAs in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* 83, 2357-67.
- Dardari, R., Menezes, J., Drouet, E., Joab, I., Benider, A., Bakkali, H., Kanouni, L., Jouhadi, H., Benjaafar, N., El Gueddari, B., Hassar, M. and Khyatti, M., 2008. Analyses of the prognostic significance of the Epstein-Barr virus transactivator ZEBRA protein and diagnostic value of its two synthetic peptides in nasopharyngeal carcinoma. *J Clin Virol* 41, 96-103.

- de Fougerolles, A., Vornlocher, H.P., Maraganore, J. and Lieberman, J., 2007. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6, 443-53.
- Decaussin, G., Leclerc, V. and Ooka, T., 1995. The lytic cycle of Epstein-Barr virus in the nonproducer Raji line can be rescued by the expression of a 135-kilodalton protein encoded by the BALF2 open reading frame. *J Virol* 69, 7309-14.
- Delecluse, H.J. and Hammerschmidt, W., 2000. The genetic approach to the Epstein-Barr virus: from basic virology to gene therapy. *Mol Pathol* 53, 270-9.
- Delecluse, H.J., Hilsendegen, T., Pich, D., Zeidler, R. and Hammerschmidt, W., 1998. Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8245-50.
- Delecluse, H.J., Pich, D., Hilsendegen, T., Baum, C. and Hammerschmidt, W., 1999. A first-generation packaging cell line for Epstein-Barr virus-derived vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5188-93.
- DeVincenzo, J., Cehelsky, J.E., Alvarez, R., Elbashir, S., Harborth, J., Toudjarska, I., Nechev, L., Murugaiah, V., Van Vliet, A., Vaishnav, A.K. and Meyers, R., 2008. Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV). *Antiviral Res* 77, 225-31.
- Dickerson, S.J., Xing, Y., Robinson, A.R., Seaman, W.T., Gruffat, H. and Kenney, S.C., 2009. Methylation-dependent binding of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein to viral promoters. *PLoS Pathog* 5, e1000356.
- DiIanni, C.L., Stevens, J.T., Bolgar, M., O'Boyle, D.R., 2nd, Weinheimer, S.P. and Colonno, R.J., 1994. Identification of the serine residue at the active site of the herpes simplex virus type 1 protease. *J Biol Chem* 269, 12672-6.
- Donaghy, G. and Jupp, R., 1995. Characterization of the Epstein-Barr virus proteinase and comparison with the human cytomegalovirus proteinase. *J Virol* 69, 1265-70.
- Donati, D., Espmark, E., Kironde, F., Mbidde, E.K., Kanya, M., Lundkvist, A., Wahlgren, M., Bejarano, M.T. and Falk, K.I., 2006. Clearance of circulating Epstein-Barr virus DNA in children with acute malaria after antimalaria treatment. *J Infect Dis* 193, 971-7.
- Ehlin-Henriksson, B., Gordon, J. and Klein, G., 2003. B-lymphocyte subpopulations are equally susceptible to Epstein-Barr virus infection, irrespective of immunoglobulin isotype expression. *Immunology* 108, 427-30.
- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T., 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-8.
- Epstein, M.A., Achong, B.G., Barr, Y.M., Epstein, M.A. and Barr, Y.M., 1964. Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma

- Cultivation in Vitro of Human Lymphoblasts from Burkitt's Malignant Lymphoma. *Lancet* 1, 702-3.
- Epstein, M.A. and Barr, Y.M., 1964. Cultivation in Vitro of Human Lymphoblasts from Burkitt's Malignant Lymphoma. *Lancet* 1, 252-3.
- Fafi-Kremer, S. 2005. Caractérisation moléculaire du Virus d'Epstein-Barr au décours de la Mononucléose Infectieuse: Etude Prospective, Faculté de Pharmacie de Grenoble, Université Joseph Fourier, Grenoble, France.
- Fafi-Kremer, S., Morand, P., Brion, J.P., Pavese, P., Baccard, M., Germe, R., Genoulaz, O., Nicod, S., Jolivet, M., Ruigrok, R.W., Stahl, J.P. and Seigneurin, J.M., 2005a. Long-term shedding of infectious epstein-barr virus after infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 191, 985-9.
- Fafi-Kremer, S., Morand, P., Germe, R., Ballout, M., Brion, J.P., Genoulaz, O., Nicod, S., Stahl, J.P., Ruigrok, R.W. and Seigneurin, J.M., 2005b. A prospective follow-up of Epstein-Barr virus LMP1 genotypes in saliva and blood during infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 192, 2108-11.
- Fang, C.Y., Lee, C.H., Wu, C.C., Chang, Y.T., Yu, S.L., Chou, S.P., Huang, P.T., Chen, C.L., Hou, J.W., Chang, Y., Tsai, C.H., Takada, K. and Chen, J.Y., 2009. Recurrent chemical reactivations of EBV promotes genome instability and enhances tumor progression of nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Cancer* 124, 2016-25.
- Faulkner, G.C., Burrows, S.R., Khanna, R., Moss, D.J., Bird, A.G. and Crawford, D.H., 1999. X-Linked agammaglobulinemia patients are not infected with Epstein-Barr virus: implications for the biology of the virus. *J Virol* 73, 1555-64.
- Faulkner, G.C., Krajewski, A.S., Crawford, D.H., Tower, P.A., Christianson, T.A., Peters, S.T., Ostroski, M.L., Hoatlin, M.E., Zigler, A.J., Heinrich, M.C., Rathbun, R.K., Keeble, W., Faulkner, G.R. and Bagby, G.C., Jr., 2000. The ins and outs of EBV infection
- Expression of the Fanconi anemia group C gene in hematopoietic cells is not influenced by oxidative stress, cross-linking agents, radiation, heat, or mitotic inhibitory factors. *Trends Microbiol* 8, 185-9.
- Feng, P., Ren, E.C., Liu, D., Chan, S.H. and Hu, H., 2000. Expression of Epstein-Barr virus lytic gene BRLF1 in nasopharyngeal carcinoma: potential use in diagnosis. *J Gen Virol* 81, 2417-23.
- Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F.A. and Pillai, R.S., 2005. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol* 15, 331-41.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C., 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-11.
- Funch, D.P., Walker, A.M., Schneider, G., Ziyadeh, N.J. and Pescovitz, M.D., 2005. Ganciclovir and acyclovir reduce the risk of post-transplant lymphoproliferative disorder in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 5, 2894-900.

- Gao, M., Matusick-Kumar, L., Hurlburt, W., DiTusa, S.F., Newcomb, W.W., Brown, J.C., McCann, P.J., 3rd, Deckman, I. and Colonno, R.J., 1994. The protease of herpes simplex virus type 1 is essential for functional capsid formation and viral growth. *J Virol* 68, 3702-12.
- Gao, X., Wang, H. and Sairenji, T., 2004. Inhibition of Epstein-Barr virus (EBV) reactivation by short interfering RNAs targeting p38 mitogen-activated protein kinase or c-myc in EBV-positive epithelial cells. *J Virol* 78, 11798-806.
- Gargouri, B., Van Pelt, J., El Feki Ael, F., Attia, H. and Lassoued, S., 2009. Induction of Epstein-Barr virus (EBV) lytic cycle in vitro causes oxidative stress in lymphoblastoid B cell lines. *Mol Cell Biochem* 324, 55-63.
- Ge, Q., Filip, L., Bai, A., Nguyen, T., Eisen, H.N. and Chen, J., 2004. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8676-81.
- Gerber, P., Lucas, S., Nonoyama, M., Perlin, E. and Goldstein, L.I., 1972. Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. *Lancet* 2, 988-9.
- Germi, R., Morand, P., Brengel-Pesce, K., Fafi-Kremer, S., Genoulaz, O., Ginevra, C., Ballout, M., Bargues, G. and Seigneurin, J.M., 2004. Quantification of gp350/220 Epstein-Barr virus (EBV) mRNA by real-time reverse transcription-PCR in EBV-associated diseases. *Clin Chem* 50, 1814-7.
- Gershburg, E., Hong, K. and Pagano, J.S., 2004a. Effects of maribavir and selected indolocarbazoles on Epstein-Barr virus protein kinase BGLF4 and on viral lytic replication. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 1900-3.
- Gershburg, E., Marschall, M., Hong, K. and Pagano, J.S., 2004b. Expression and localization of the Epstein-Barr virus-encoded protein kinase. *J Virol* 78, 12140-6.
- Gershburg, E. and Pagano, J.S., 2005. Epstein-Barr virus infections: prospects for treatment. *J Antimicrob Chemother* 56, 277-81.
- Gershburg, E., Raffa, S., Torrisi, M.R. and Pagano, J.S., 2007. Epstein-Barr virus-encoded protein kinase (BGLF4) is involved in production of infectious virus. *J Virol* 81, 5407-12.
- Giering, J.C., Grimm, D., Storm, T.A. and Kay, M.A., 2008. Expression of shRNA from a tissue-specific pol II promoter is an effective and safe RNAi therapeutic. *Mol Ther* 16, 1630-6.
- Gitlin, L., Stone, J.K. and Andino, R., 2005. Poliovirus escape from RNA interference: short interfering RNA-target recognition and implications for therapeutic approaches. *J Virol* 79, 1027-35.
- Glaser, S.L., Clarke, C.A., Gulley, M.L., Craig, F.E., DiGiuseppe, J.A., Dorfman, R.F., Mann, R.B. and Ambinder, R.F., 2003. Population-based patterns of human immunodeficiency virus-related Hodgkin lymphoma in the Greater San Francisco Bay Area, 1988-1998. *Cancer* 98, 300-9.

- Glaser, S.L., Lin, R.J., Stewart, S.L., Ambinder, R.F., Jarrett, R.F., Brousset, P., Pallesen, G., Gully, M.L., Khan, G., O'Grady, J., Hummel, M., Preciado, M.V., Knecht, H., Chan, J.K. and Claviez, A., 1997. Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. *Int J Cancer* 70, 375-82.
- Godfrey, A., Anderson, J., Papanastasiou, A., Takeuchi, Y. and Boshoff, C., 2005. Inhibiting primary effusion lymphoma by lentiviral vectors encoding short hairpin RNA. *Blood* 105, 2510-8.
- Godshalk, S.E., Bhaduri-McIntosh, S. and Slack, F.J., 2008. Epstein-Barr virus-mediated dysregulation of human microRNA expression. *Cell Cycle* 7, 3595-600.
- Gottschalk, S., Ng, C.Y., Perez, M., Smith, C.A., Sample, C., Brenner, M.K., Heslop, H.E. and Rooney, C.M., 2001. An Epstein-Barr virus deletion mutant associated with fatal lymphoproliferative disease unresponsive to therapy with virus-specific CTLs. *Blood* 97, 835-43.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. and Nairn, R., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59-74.
- Greco, A., Diaz, J.J., Thouvenot, D. and Morfin, F., 2007. Novel targets for the development of anti-herpes compounds. *Infect Disord Drug Targets* 7, 11-8.
- Grimm, D., Streetz, K.L., Jopling, C.L., Storm, T.A., Pandey, K., Davis, C.R., Marion, P., Salazar, F. and Kay, M.A., 2006. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 441, 537-41.
- Gruffat, H., Batische, J., Pich, D., Neuhierl, B., Manet, E., Hammerschmidt, W. and Sergeant, A., 2002. Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 is essential for production of infectious virus. *J Virol* 76, 9635-44.
- Gruffat, H. and Sergeant, A., 1994. Characterization of the DNA-binding site repertoire for the Epstein-Barr virus transcription factor R. *Nucleic Acids Res* 22, 1172-8.
- Gruhne, B., Sompallae, R., Marescotti, D., Kamranvar, S.A., Gastaldello, S. and Masucci, M.G., 2009. The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes genomic instability via induction of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2313-8.
- Grundhoff, A., Sullivan, C.S. and Ganem, D., 2006. A combined computational and microarray-based approach identifies novel microRNAs encoded by human gamma-herpesviruses. *Rna* 12, 733-50.
- Guo, S. and Kemphues, K.J., 1995. par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 81, 611-20.
- Gutierrez, M.I., Bhatia, K., Barriga, F., Diez, B., Muriel, F.S., de Andreas, M.L., Epelman, S., Risueno, C. and Magrath, I.T., 1992. Molecular epidemiology of Burkitt's lymphoma from South America: differences in breakpoint location and Epstein-Barr virus association from tumors in other world regions. *Blood* 79, 3261-6.

- Haasnoot, J., Westerhout, E.M. and Berkhout, B., 2007. RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nat Biotechnol* 25, 1435-43.
- Hadinoto, V., Shapiro, M., Sun, C.C. and Thorley-Lawson, D.A., 2009. The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLoS Pathog* 5, e1000496.
- Hall, A.H. and Alexander, K.A., 2003. RNA interference of human papillomavirus type 18 E6 and E7 induces senescence in HeLa cells. *J Virol* 77, 6066-9.
- Hall, D.L. and Darke, P.L., 1995. Activation of the herpes simplex virus type 1 protease. *J Biol Chem* 270, 22697-700.
- Hamasaki, K., Nakao, K., Matsumoto, K., Ichikawa, T., Ishikawa, H. and Eguchi, K., 2003. Short interfering RNA-directed inhibition of hepatitis B virus replication. *FEBS Lett* 543, 51-4.
- Hammerschmidt, W. and Sugden, B., 1988. Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell* 55, 427-33.
- Harada, S. and Kieff, E., 1997. Epstein-Barr virus nuclear protein LP stimulates EBNA-2 acidic domain-mediated transcriptional activation. *J Virol* 71, 6611-8.
- Harvey, R., Brown, K., Zhang, Q., Gartland, M., Walton, L., Talarico, C., Lawrence, W., Selleseth, D., Coffield, N., Leary, J., Moniri, K., Singer, S., Strum, J., Gudmundsson, K., Biron, K., Romines, K.R. and Sethna, P., 2009. GSK983: a novel compound with broad-spectrum antiviral activity. *Antiviral Res* 82, 1-11.
- Hecht, J.L. and Aster, J.C., 2000. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol* 18, 3707-21.
- Hellebrand, E., Mautner, J., Reisbach, G., Nimmerjahn, F., Hallek, M., Mocikat, R. and Hammerschmidt, W., 2006. Epstein-Barr virus vector-mediated gene transfer into human B cells: potential for antitumor vaccination. *Gene Ther* 13, 150-62.
- Henle, G. and Henle, W., 1976. Epstein-Barr virus-specific IgA serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 17, 1-7.
- Henry, S.D., van der Wegen, P., Metselaar, H.J., Tilanus, H.W., Scholte, B.J. and van der Laan, L.J., 2006. Simultaneous targeting of HCV replication and viral binding with a single lentiviral vector containing multiple RNA interference expression cassettes. *Mol Ther* 14, 485-93.
- Henson, B.W., Perkins, E.M., Cothran, J.E. and Desai, P., 2009. Self-assembly of Epstein-Barr virus capsids. *J Virol* 83, 3877-90.
- Hettich, E., Janz, A., Zeidler, R., Pich, D., Hellebrand, E., Weissflog, B., Moosmann, A. and Hammerschmidt, W., 2006. Genetic design of an optimized packaging cell line for gene vectors transducing human B cells. *Gene Ther* 13, 844-56.
- Heussinger, N., Buttner, M., Ott, G., Brachtel, E., Pilch, B.Z., Kremmer, E. and Niedobitek, G., 2004. Expression of the Epstein-Barr virus (EBV)-encoded latent membrane

- protein 2A (LMP2A) in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma. *J Pathol* 203, 696-9.
- Hierro, L., Diez-Dorado, R., Diaz, C., De la Vega, A., Frauca, E., Camarena, C., Munoz-Bartolo, G., Gonzalez de Zarate, A., Lopez Santamaria, M. and Jara, P., 2008. Efficacy and safety of valganciclovir in liver-transplanted children infected with Epstein-Barr virus. *Liver Transpl* 14, 1185-93.
- Hochberg, D., Souza, T., Catalina, M., Sullivan, J.L., Luzuriaga, K. and Thorley-Lawson, D.A., 2004. Acute infection with Epstein-Barr virus targets and overwhelms the peripheral memory B-cell compartment with resting, latently infected cells. *J Virol* 78, 5194-204.
- Holskin, B.P., Bukhtiyarova, M., Dunn, B.M., Baur, P., de Chastonay, J. and Pennington, M.W., 1995. A continuous fluorescence-based assay of human cytomegalovirus protease using a peptide substrate. *Anal Biochem* 227, 148-55.
- Hong, G.K., Gulley, M.L., Feng, W.H., Delecluse, H.J., Holley-Guthrie, E. and Kenney, S.C., 2005a. Epstein-Barr virus lytic infection contributes to lymphoproliferative disease in a SCID mouse model. *J Virol* 79, 13993-4003.
- Hong, G.K., Kumar, P., Wang, L., Damania, B., Gulley, M.L., Delecluse, H.J., Polverini, P.J. and Kenney, S.C., 2005b. Epstein-Barr virus lytic infection is required for efficient production of the angiogenesis factor vascular endothelial growth factor in lymphoblastoid cell lines. *J Virol* 79, 13984-92.
- Hong, M., Murai, Y., Kutsuna, T., Takahashi, H., Nomoto, K., Cheng, C.M., Ishizawa, S., Zhao, Q.L., Ogawa, R., Harmon, B.V., Tsuneyama, K. and Takano, Y., 2006. Suppression of Epstein-Barr nuclear antigen 1 (EBNA1) by RNA interference inhibits proliferation of EBV-positive Burkitt's lymphoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 132, 1-8.
- Hoog, S.S., Smith, W.W., Qiu, X., Janson, C.A., Hellmig, B., McQueney, M.S., O'Donnell, K., O'Shannessy, D., DiLella, A.G., Debouck, C. and Abdel-Meguid, S.S., 1997. Active site cavity of herpesvirus proteases revealed by the crystal structure of herpes simplex virus protease/inhibitor complex. *Biochemistry* 36, 14023-9.
- Horikawa, T., Yang, J., Kondo, S., Yoshizaki, T., Joab, I., Furukawa, M. and Pagano, J.S., 2007. Twist and epithelial-mesenchymal transition are induced by the EBV oncoprotein latent membrane protein 1 and are associated with metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 67, 1970-8.
- Ian, M.X., Lan, S.Z., Cheng, Z.F., Dan, H. and Qiong, L.H., 2008. Suppression of EBNA1 expression inhibits growth of EBV-positive NK/T cell lymphoma cells. *Cancer Biol Ther* 7, 1602-6.
- Imai, S., Nishikawa, J. and Takada, K., 1998. Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells. *J Virol* 72, 4371-8.
- Israel, B. and Kenney, S. 2005. EBV Lytic infection. In: E. Robertson (Ed), *Epstein-Barr Virus*, Caister Academic Press, Philadelphia, Pennsylvania, USA, pp. 571-613.

- Janz, A., Oezel, M., Kurzeder, C., Mautner, J., Pich, D., Kost, M., Hammerschmidt, W. and Delecluse, H.J., 2000. Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. *J Virol* 74, 10142-52.
- Jonson, A.L., Rogers, L.M., Ramakrishnan, S. and Downs, L.S., Jr., 2008. Gene silencing with siRNA targeting E6/E7 as a therapeutic intervention in a mouse model of cervical cancer. *Gynecol Oncol* 111, 356-64.
- Joseph, A.M., Babcock, G.J. and Thorley-Lawson, D.A., 2000. Cells expressing the Epstein-Barr virus growth program are present in and restricted to the naive B-cell subset of healthy tonsils. *J Virol* 74, 9964-71.
- Juillard, F., Hiriart, E., Sergeant, N., Vingtdeux-Didier, V., Drobecq, H., Sergeant, A., Manet, E. and Gruffat, H., 2009. Epstein-Barr virus protein EB2 contains an N-terminal transferable nuclear export signal that promotes nucleocytoplasmic export by directly binding TAP/NXF1. *J Virol* 83, 12759-68.
- Jungnickel, B., Staratschek-Jox, A., Brauning, A., Spieker, T., Wolf, J., Diehl, V., Hansmann, M.L., Rajewsky, K. and Kuppers, R., 2000. Clonal deleterious mutations in the IkappaBalpha gene in the malignant cells in Hodgkin's lymphoma. *J Exp Med* 191, 395-402.
- Kahana, R., Kuznetzova, L., Rogel, A., Shemesh, M., Hai, D., Yadin, H. and Stram, Y., 2004. Inhibition of foot-and-mouth disease virus replication by small interfering RNA. *J Gen Virol* 85, 3213-7.
- Kalla, M., Schmeinck, A., Bergbauer, M., Pich, D. and Hammerschmidt, W., 2009. AP-1 homolog BZLF1 of Epstein-Barr virus has two essential functions dependent on the epigenetic state of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 850-5.
- Karajannis, M.A., Hummel, M., Anagnostopoulos, I. and Stein, H., 1997. Strict lymphotropism of Epstein-Barr virus during acute infectious mononucleosis in nonimmunocompromised individuals. *Blood* 89, 2856-62.
- Kennard, J., Rixon, F.J., McDougall, I.M., Tatman, J.D. and Preston, V.G., 1995. The 25 amino acid residues at the carboxy terminus of the herpes simplex virus type 1 UL26.5 protein are required for the formation of the capsid shell around the scaffold. *J Gen Virol* 76 (Pt 7), 1611-21.
- Kennedy, G., Komano, J. and Sugden, B., 2003. Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14269-74.
- Khan, G., Miyashita, E.M., Yang, B., Babcock, G.J. and Thorley-Lawson, D.A., 1996. Is EBV persistence in vivo a model for B cell homeostasis? *Immunity* 5, 173-9.
- Khan, I.A., Thomas, S.Y., Moretto, M.M., Lee, F.S., Islam, S.A., Combe, C., Schwartzman, J.D. and Luster, A.D., 2006. CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection. *PLoS Pathog* 2, e49.

- Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M. and Hammerschmidt, W., 1998. Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *Embo J* 17, 1700-9.
- Kim do, N., Chae, H.S., Oh, S.T., Kang, J.H., Park, C.H., Park, W.S., Takada, K., Lee, J.M., Lee, W.K. and Lee, S.K., 2007. Expression of viral microRNAs in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *J Virol* 81, 1033-6.
- Kim, J.H., Kim, W.S. and Park, C., 2008. SNARK, a novel downstream molecule of EBV latent membrane protein 1, is associated with resistance to cancer cell death. *Leuk Lymphoma* 49, 1392-8.
- Kim, S.I., Shin, D., Choi, T.H., Lee, J.C., Cheon, G.J., Kim, K.Y., Park, M. and Kim, M., 2007. Systemic and specific delivery of small interfering RNAs to the liver mediated by apolipoprotein A-I. *Mol Ther* 15, 1145-52.
- Kirschner, A.N., Lowrey, A.S., Longnecker, R. and Jardetzky, T.S., 2007. Binding-site interactions between Epstein-Barr virus fusion proteins gp42 and gH/gL reveal a peptide that inhibits both epithelial and B-cell membrane fusion. *J Virol* 81, 9216-29.
- Klein, C., Bock, C.T., Wedemeyer, H., Wustefeld, T., Locarnini, S., Dienes, H.P., Kubicka, S., Manns, M.P. and Trautwein, C., 2003. Inhibition of hepatitis B virus replication in vivo by nucleoside analogues and siRNA. *Gastroenterology* 125, 9-18.
- Klein, G., Giovanella, B.C., Lindahl, T., Fialkow, P.J., Singh, S. and Stehlin, J.S., 1974. Direct evidence for the presence of Epstein-Barr virus DNA and nuclear antigen in malignant epithelial cells from patients with poorly differentiated carcinoma of the nasopharynx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 4737-41.
- Klein, G., Zeuthen, J., Terasaki, P., Billings, R., Honig, R., Jondal, M., Westman, A. and Clements, G., 1976. Inducibility of the Epstein-Barr virus (EBV) cycle and surface marker properties of EBV-negative lymphoma lines and their in vitro EBV-converted sublines. *Int J Cancer* 18, 639-52.
- Knowles, D.M., Cesarman, E., Chadburn, A., Frizzera, G., Chen, J., Rose, E.A. and Michler, R.E., 1995. Correlative morphologic and molecular genetic analysis demonstrates three distinct categories of posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Blood* 85, 552-65.
- Knox, P.G., Li, Q.X., Rickinson, A.B. and Young, L.S., 1996. In vitro production of stable Epstein-Barr virus-positive epithelial cell clones which resemble the virus:cell interaction observed in nasopharyngeal carcinoma. *Virology* 215, 40-50.
- Kondo, S., Yoshizaki, T., Wakisaka, N., Horikawa, T., Murono, S., Jang, K.L., Joab, I., Furukawa, M. and Pagano, J.S., 2007. MUC1 induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 causes dissociation of the cell-matrix interaction and cellular invasiveness via STAT signaling. *J Virol* 81, 1554-62.
- Konishi, M., Wu, C.H. and Wu, G.Y., 2003. Inhibition of HBV replication by siRNA in a stable HBV-producing cell line. *Hepatology* 38, 842-50.

- Korf, M., Jarczak, D., Beger, C., Manns, M.P. and Kruger, M., 2005. Inhibition of hepatitis C virus translation and subgenomic replication by siRNAs directed against highly conserved HCV sequence and cellular HCV cofactors. *J Hepatol* 43, 225-34.
- Kulwichit, W., Edwards, R.H., Davenport, E.M., Baskar, J.F., Godfrey, V. and Raab-Traub, N., 1998. Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11963-8.
- Kumar, P., Lee, S.K., Shankar, P. and Manjunath, N., 2006. A single siRNA suppresses fatal encephalitis induced by two different flaviviruses. *PLoS Med* 3, e96.
- Kurth, J., Hansmann, M.L., Rajewsky, K. and Kuppers, R., 2003. Epstein-Barr virus-infected B cells expanding in germinal centers of infectious mononucleosis patients do not participate in the germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4730-5.
- Kurth, J., Spieker, T., Wustrow, J., Strickler, G.J., Hansmann, L.M., Rajewsky, K. and Kuppers, R., 2000. EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: viral strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency. *Immunity* 13, 485-95.
- Kutok, J.L. and Wang, F., 2006. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol* 1, 375-404.
- Laichalk, L.L. and Thorley-Lawson, D.A., 2005. Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J Virol* 79, 1296-307.
- Lam, K.M., Syed, N., Whittle, H. and Crawford, D.H., 1991. Circulating Epstein-Barr virus-carrying B cells in acute malaria. *Lancet* 337, 876-8.
- Lambert, S.L. and Martinez, O.M., 2007. Latent membrane protein 1 of EBV activates phosphatidylinositol 3-kinase to induce production of IL-10. *J Immunol* 179, 8225-34.
- LaPlante, S.R., Aubry, N., Bonneau, P.R., Cameron, D.R., Lagace, L., Massariol, M.J., Montpetit, H., Plouffe, C., Kawai, S.H., Fulton, B.D., Chen, Z. and Ni, F., 1998. Human cytomegalovirus protease complexes its substrate recognition sequences in an extended peptide conformation. *Biochemistry* 37, 9793-801.
- LaPlante, S.R., Cameron, D.R., Aubry, N., Lefebvre, S., Kukulj, G., Maurice, R., Thibeault, D., Lamarre, D. and Llinas-Brunet, M., 1999. Solution structure of substrate-based ligands when bound to hepatitis C virus NS3 protease domain. *J Biol Chem* 274, 18618-24.
- Lazic, A., Goetz, D.H., Nomura, A.M., Marnett, A.B. and Craik, C.S., 2007. Substrate modulation of enzyme activity in the herpesvirus protease family. *J Mol Biol* 373, 913-23.
- Le Clorenec, C., Ouk, T.S., Youlyouz-Marfak, I., Panteix, S., Martin, C.C., Rastelli, J., Adriaenssens, E., Zimmer-Strobl, U., Coll, J., Feuillard, J. and Jayat-Vignoles, C., 2008. Molecular basis of cytotoxicity of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 (LMP1) in EBV latency III B cells: LMP1 induces type II ligand-independent autoactivation of CD95/Fas with caspase 8-mediated apoptosis. *J Virol* 82, 6721-33.

- Lea, J.S., Sunaga, N., Sato, M., Kalahasti, G., Miller, D.S., Minna, J.D. and Muller, C.Y., 2007. Silencing of HPV 18 oncoproteins With RNA interference causes growth inhibition of cervical cancer cells. *Reprod Sci* 14, 20-8.
- Lee, M.A., Diamond, M.E. and Yates, J.L., 1999. Genetic evidence that EBNA-1 is needed for efficient, stable latent infection by Epstein-Barr virus. *J Virol* 73, 2974-82.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S. and Kim, V.N., 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-9.
- Leonard, J.N. and Schaffer, D.V., 2006. Antiviral RNAi therapy: emerging approaches for hitting a moving target. *Gene Ther* 13, 532-40.
- Leung, D., Abbenante, G. and Fairlie, D.P., 2000. Protease inhibitors: current status and future prospects. *J Med Chem* 43, 305-41.
- 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.
- Levitsky, V. and Masucci, M.G., 2002. Manipulation of immune responses by Epstein-Barr virus. *Virus Res* 88, 71-86.
- Li, B.J., Tang, Q., Cheng, D., Qin, C., Xie, F.Y., Wei, Q., Xu, J., Liu, Y., Zheng, B.J., Woodle, M.C., Zhong, N. and Lu, P.Y., 2005a. Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nat Med* 11, 944-51.
- Li, G.Q., Xu, W.Z., Wang, J.X., Deng, W.W., Li, D. and Gu, H.X., 2007a. Combination of small interfering RNA and lamivudine on inhibition of human B virus replication in HepG2.2.15 cells. *World J Gastroenterol* 13, 2324-7.
- Li, H., Li, W.X. and Ding, S.W., 2002. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* 296, 1319-21.
- Li, J., Zhang, X.S., Xie, D., Deng, H.X., Gao, Y.F., Chen, Q.Y., Huang, W.L., Masucci, M.G. and Zeng, Y.X., 2007b. Expression of immune-related molecules in primary EBV-positive Chinese nasopharyngeal carcinoma: associated with latent membrane protein 1 (LMP1) expression. *Cancer Biol Ther* 6, 1997-2004.
- Li, M.J., Kim, J., Li, S., Zaia, J., Yee, J.K., Anderson, J., Akkina, R. and Rossi, J.J., 2005b. Long-term inhibition of HIV-1 infection in primary hematopoietic cells by lentiviral vector delivery of a triple combination of anti-HIV shRNA, anti-CCR5 ribozyme, and a nucleolar-localizing TAR decoy. *Mol Ther* 12, 900-9.
- Li, X., Liu, X., Li, C.Y., Ding, Y., Chau, D., Li, G., Kung, H.F., Lin, M.C. and Peng, Y., 2006. Recombinant adeno-associated virus mediated RNA interference inhibits metastasis of nasopharyngeal cancer cells in vivo and in vitro by suppression of Epstein-Barr virus encoded LMP-1. *Int J Oncol* 29, 595-603.

- Li, X.P., Li, G., Peng, Y., Kung, H.F. and Lin, M.C., 2004. Suppression of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 by RNA interference inhibits the metastatic potential of nasopharyngeal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 315, 212-8.
- Lim, J.K., Louie, C.Y., Glaser, C., Jean, C., Johnson, B., Johnson, H., McDermott, D.H. and Murphy, P.M., 2008. Genetic deficiency of chemokine receptor CCR5 is a strong risk factor for symptomatic West Nile virus infection: a meta-analysis of 4 cohorts in the US epidemic. *J Infect Dis* 197, 262-5.
- Lim, L.P., Glasner, M.E., Yekta, S., Burge, C.B. and Bartel, D.P., 2003. Vertebrate microRNA genes. *Science* 299, 1540.
- Lindner, S.E., Zeller, K., Schepers, A. and Sugden, B., 2008. The affinity of EBNA1 for its origin of DNA synthesis is a determinant of the origin's replicative efficiency. *J Virol* 82, 5693-702.
- Liu, Q., Rand, T.A., Kalidas, S., Du, F., Kim, H.E., Smith, D.P. and Wang, X., 2003. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway. *Science* 301, 1921-5.
- Lo, A.K., To, K.F., Lo, K.W., Lung, R.W., Hui, J.W., Liao, G. and Hayward, S.D., 2007. Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 16164-9.
- Lo, Y.M., Chan, L.Y., Chan, A.T., Leung, S.F., Lo, K.W., Zhang, J., Lee, J.C., Hjelm, N.M., Johnson, P.J. and Huang, D.P., 1999. Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 59, 5452-5.
- Lopez-Fraga, M., Wright, N. and Jimenez, A., 2008. RNA interference-based therapeutics: new strategies to fight infectious disease. *Infect Disord Drug Targets* 8, 262-73.
- Louis, N., Eveleigh, C. and Graham, F.L., 1997. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology* 233, 423-9.
- Lu, C.C., Huang, H.T., Wang, J.T., Slupphaug, G., Li, T.K., Wu, M.C., Chen, Y.C., Lee, C.P. and Chen, M.R., 2007. Characterization of the uracil-DNA glycosylase activity of Epstein-Barr virus BKRF3 and its role in lytic viral DNA replication. *J Virol* 81, 1195-208.
- Lukes, R.J., Tindle, B.H. and Parker, J.W., 1969. Reed-Sternberg-like cells in infectious mononucleosis. *Lancet* 2, 1003-4.
- Lung, R.W., Tong, J.H., Sung, Y.M., Leung, P.S., Ng, D.C., Chau, S.L., Chan, A.W., Ng, E.K., Lo, K.W. and To, K.F., 2009. Modulation of LMP2A expression by a newly identified Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART22. *Neoplasia* 11, 1174-84.

- Luo, B., Wang, Y., Wang, X.F., Liang, H., Yan, L.P., Huang, B.H. and Zhao, P., 2005. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 11, 629-33.
- Ma, Y., Chan, C.Y. and He, M.L., 2007. RNA interference and antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 13, 5169-79.
- Mannick, J.B., Cohen, J.I., Birkenbach, M., Marchini, A. and Kieff, E., 1991. The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation. *J Virol* 65, 6826-37.
- Manoharan, M., 2004. RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. *Curr Opin Chem Biol* 8, 570-9.
- Margosiak, S.A., Vanderpool, D.L., Sisson, W., Pinko, C. and Kan, C.C., 1996. Dimerization of the human cytomegalovirus protease: kinetic and biochemical characterization of the catalytic homodimer. *Biochemistry* 35, 5300-7.
- Marnett, A.B., Nomura, A.M., Shimba, N., Ortiz de Montellano, P.R. and Craik, C.S., 2004. Communication between the active sites and dimer interface of a herpesvirus protease revealed by a transition-state inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6870-5.
- Martel-Renoir, D., Grunewald, V., Touitou, R., Schwaab, G. and Joab, I., 1995. Qualitative analysis of the expression of Epstein-Barr virus lytic genes in nasopharyngeal carcinoma biopsies. *J Gen Virol* 76 (Pt 6), 1401-8.
- Maruo, S., Johannsen, E., Illanes, D., Cooper, A., Zhao, B. and Kieff, E., 2005. Epstein-Barr virus nuclear protein 3A domains essential for growth of lymphoblasts: transcriptional regulation through RBP-Jkappa/CBF1 is critical. *J Virol* 79, 10171-9.
- Maruo, S., Wu, Y., Ishikawa, S., Kanda, T., Iwakiri, D. and Takada, K., 2006. Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA3C is required for cell cycle progression and growth maintenance of lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19500-5.
- Maruo, S., Wu, Y., Ito, T., Kanda, T., Kieff, E.D. and Takada, K., 2009. Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA3C residues critical for maintaining lymphoblastoid cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4419-24.
- McCaffrey, A.P., Meuse, L., Pham, T.T., Conklin, D.S., Hannon, G.J. and Kay, M.A., 2002. RNA interference in adult mice. *Nature* 418, 38-9.
- McCaffrey, A.P., Nakai, H., Pandey, K., Huang, Z., Salazar, F.H., Xu, H., Wieland, S.F., Marion, P.L. and Kay, M.A., 2003. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* 21, 639-44.
- McDonald, C., Karstegl, C.E., Kellam, P. and Farrell, P.J., 2009. Regulation of the Epstein-Barr virus Zp promoter in B lymphocytes during reactivation from latency. *J Gen Virol* 91, 622-9.
- Mei, Y.P., Zhou, J.M., Wang, Y., Huang, H., Deng, R., Feng, G.K., Zeng, Y.X. and Zhu, X.F., 2007. Silencing of LMP1 induces cell cycle arrest and enhances chemosensitivity

- through inhibition of AKT signaling pathway in EBV-positive nasopharyngeal carcinoma cells. *Cell Cycle* 6, 1379-85.
- Mei, Y.P., Zhu, X.F., Zhou, J.M., Huang, H., Deng, R. and Zeng, Y.X., 2006. siRNA targeting LMP1-induced apoptosis in EBV-positive lymphoma cells is associated with inhibition of telomerase activity and expression. *Cancer Lett* 232, 189-98.
- Mendoza, N., Diamantis, M., Arora, A., Bartlett, B., Gewirtzman, A., Tremaine, A.M. and Tying, S., 2008. Mucocutaneous manifestations of Epstein-Barr virus infection. *Am J Clin Dermatol* 9, 295-305.
- Merchant, M., Swart, R., Katzman, R.B., Ikeda, M., Ikeda, A., Longnecker, R., Dykstra, M.L. and Pierce, S.K., 2001. The effects of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A on B cell function. *Int Rev Immunol* 20, 805-35.
- Miller, C.L., Burkhardt, A.L., Lee, J.H., Stealey, B., Longnecker, R., Bolen, J.B. and Kieff, E., 1995. Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. *Immunity* 2, 155-66.
- Miller, G., El-Guindy, A., Countryman, J., Ye, J. and Gradoville, L., 2007. Lytic cycle switches of oncogenic human gammaherpesviruses. *Adv Cancer Res* 97, 81-109.
- Miranda, K.C., Huynh, T., Tay, Y., Ang, Y.S., Tam, W.L., Thomson, A.M., Lim, B. and Rigoutsos, I., 2006. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 126, 1203-17.
- Moens, U., 2009. Silencing viral microRNA as a novel antiviral therapy? *J Biomed Biotechnol* 2009, 419539.
- Montone, K.T., Hodinka, R.L., Salhany, K.E., Lavi, E., Rostami, A. and Tomaszewski, J.E., 1996. Identification of Epstein-Barr virus lytic activity in post-transplantation lymphoproliferative disease. *Mod Pathol* 9, 621-30.
- Morand, P., Buisson, M., Collandre, H., Chanzy, B., Genoulaz, O., Bourgeat, M.J., Pinel, N., Leclercq, P., Leroux, D., Marechal, V., Fritsch, L., Ruigrok, R. and Seigneurin, J.M., 1999. Human herpesvirus 8 and Epstein Barr-virus in a cutaneous B-cell lymphoma and a malignant cell line established from the blood of an AIDS patient. *Leuk Lymphoma* 35, 379-87.
- Morrison, J.A. and Raab-Traub, N., 2005. Roles of the ITAM and PY motifs of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A in the inhibition of epithelial cell differentiation and activation of {beta}-catenin signaling. *J Virol* 79, 2375-82.
- Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C. and Kieff, E., 1995. The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 80, 389-99.
- Motsch, N., Pfuhl, T., Mrazek, J., Barth, S. and Grasser, F.A., 2007. Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146a. *RNA Biol* 4, 131-7.

- Mougin, C., Bourgault-Villada, I. and Coursaget, P., 2009. [HPV immunization for the prevention of cervical cancer]. *Presse Med* 38, 1750-68.
- Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Jouette, D., Lacombe, A.M., Nikic, S., Picault, N., Remoue, K., Sanial, M., Vo, T.A. and Vaucheret, H., 2000. Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101, 533-42.
- Nakagawa, M., Sakamoto, N., Tanabe, Y., Koyama, T., Itsui, Y., Takeda, Y., Chen, C.H., Kakinuma, S., Oooka, S., Maekawa, S., Enomoto, N. and Watanabe, M., 2005. Suppression of hepatitis C virus replication by cyclosporin a is mediated by blockade of cyclophilins. *Gastroenterology* 129, 1031-41.
- Nanbo, A. and Takada, K., 2002. The role of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs (EBERs) in oncogenesis. *Rev Med Virol* 12, 321-6.
- Napoli, C., Lemieux, C. and Jorgensen, R., 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2, 279-289.
- Navarro, A., Gaya, A., Martinez, A., Urbano-Ispizua, A., Pons, A., Balague, O., Gel, B., Abrisqueta, P., Lopez-Guillermo, A., Artells, R., Montserrat, E. and Monzo, M., 2008. MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 111, 2825-32.
- Nemerow, G.R., Wolfert, R., McNaughton, M.E. and Cooper, N.R., 1985. Identification and characterization of the Epstein-Barr virus receptor on human B lymphocytes and its relationship to the C3d complement receptor (CR2). *J Virol* 55, 347-51.
- Newcomb, W.W., Trus, B.L., Cheng, N., Steven, A.C., Sheaffer, A.K., Tenney, D.J., Weller, S.K. and Brown, J.C., 2000. Isolation of herpes simplex virus procapsids from cells infected with a protease-deficient mutant virus. *J Virol* 74, 1663-73.
- Neyts, J., Sadler, R., De Clercq, E., Raab-Traub, N. and Pagano, J.S., 1998. The antiviral agent cidofovir [(S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonyl-methoxypropyl)cytosine] has pronounced activity against nasopharyngeal carcinoma grown in nude mice. *Cancer Res* 58, 384-8.
- Nicholls, J.M., Agathangelou, A., Fung, K., Zeng, X. and Niedobitek, G., 1997. The association of squamous cell carcinomas of the nasopharynx with Epstein-Barr virus shows geographical variation reminiscent of Burkitt's lymphoma. *J Pathol* 183, 164-8.
- Nicholson, P., Addison, C., Cross, A.M., Kennard, J., Preston, V.G. and Rixon, F.J., 1994. Localization of the herpes simplex virus type 1 major capsid protein VP5 to the cell nucleus requires the abundant scaffolding protein VP22a. *J Gen Virol* 75 (Pt 5), 1091-9.
- Niedobitek, G., Agathangelou, A., Herbst, H., Whitehead, L., Wright, D.H. and Young, L.S., 1997. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J Pathol* 182, 151-9.

- Niedobitek, G., Agathangelou, A. and Nicholls, J.M., 1996. Epstein-Barr virus infection and the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma: viral gene expression, tumour cell phenotype, and the role of the lymphoid stroma. *Semin Cancer Biol* 7, 165-74.
- Niller, H.H., Wolf, H. and Minarovits, J., 2008. Regulation and dysregulation of Epstein-Barr virus latency: implications for the development of autoimmune diseases. *Autoimmunity* 41, 298-328.
- Ning, S., Campos, A.D., Darnay, B.G., Bentz, G.L. and Pagano, J.S., 2008. TRAF6 and the three C-terminal lysine sites on IRF7 are required for its ubiquitination-mediated activation by the tumor necrosis factor receptor family member latent membrane protein 1. *Mol Cell Biol* 28, 6536-46.
- Nitsche, F., Bell, A. and Rickinson, A., 1997. Epstein-Barr virus leader protein enhances EBNA-2-mediated transactivation of latent membrane protein 1 expression: a role for the W1W2 repeat domain. *J Virol* 71, 6619-28.
- Niu, X.Y., Peng, Z.L., Duan, W.Q., Wang, H. and Wang, P., 2006. Inhibition of HPV 16 E6 oncogene expression by RNA interference in vitro and in vivo. *Int J Gynecol Cancer* 16, 743-51.
- Nomura, A.M., Marnett, A.B., Shimba, N., Dotsch, V. and Craik, C.S., 2005. Induced structure of a helical switch as a mechanism to regulate enzymatic activity. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1019-20.
- Nomura, A.M., Marnett, A.B., Shimba, N., Dotsch, V. and Craik, C.S., 2006. One functional switch mediates reversible and irreversible inactivation of a herpesvirus protease. *Biochemistry* 45, 3572-9.
- Nur, S., Rosenblum, W.D., Katta, U.D., Islam, H., Brown, K. and Ramaswamy, G., 2007. Epstein-Barr virus-associated multifocal leiomyosarcomas arising in a cardiac transplant recipient: autopsy case report and review of the literature. *J Heart Lung Transplant* 26, 944-52.
- Palliser, D., Chowdhury, D., Wang, Q.Y., Lee, S.J., Bronson, R.T., Knipe, D.M. and Lieberman, J., 2006. An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. *Nature* 439, 89-94.
- Pan, Y.R., Vatsyayan, J., Chang, Y.S. and Chang, H.Y., 2008. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A upregulates UDP-glucose dehydrogenase gene expression via ERK and PI3K/Akt pathway. *Cell Microbiol* 10, 2447-60.
- Panagopoulos, D., Victoratos, P., Alexiou, M., Kollias, G. and Mosialos, G., 2004. Comparative analysis of signal transduction by CD40 and the Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1 in vivo. *J Virol* 78, 13253-61.
- Pathmanathan, R., Prasad, U., Sadler, R., Flynn, K. and Raab-Traub, N., 1995. Clonal proliferations of cells infected with Epstein-Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma. *N Engl J Med* 333, 693-8.
- Patick, A.K. and Potts, K.E., 1998. Protease inhibitors as antiviral agents. *Clin Microbiol Rev* 11, 614-27.

- Pedersen, I.M., Cheng, G., Wieland, S., Volinia, S., Croce, C.M., Chisari, F.V. and David, M., 2007. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature* 449, 919-22.
- Pegman, P.M., Smith, S.M., D'Souza, B.N., Loughran, S.T., Maier, S., Kempkes, B., Cahill, P.A., Simmons, M.J., Gelinas, C. and Walls, D., 2006. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 trans-activates the cellular antiapoptotic bfl-1 gene by a CBF1/RBPJ kappa-dependent pathway. *J Virol* 80, 8133-44.
- Pegtel, D.M., Middeldorp, J. and Thorley-Lawson, D.A., 2004. Epstein-Barr virus infection in ex vivo tonsil epithelial cell cultures of asymptomatic carriers. *J Virol* 78, 12613-24.
- Peng, C.W., Zhao, B., Chen, H.C., Chou, M.L., Lai, C.Y., Lin, S.Z., Hsu, H.Y. and Kieff, E., 2007. Hsp72 up-regulates Epstein-Barr virus EBNA1P coactivation with EBNA2. *Blood* 109, 5447-54.
- Peng, R., Moses, S.C., Tan, J., Kremmer, E. and Ling, P.D., 2005. The Epstein-Barr virus EBNA-LP protein preferentially coactivates EBNA2-mediated stimulation of latent membrane proteins expressed from the viral divergent promoter. *J Virol* 79, 4492-505.
- Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grasser, F.A., van Dyk, L.F., Ho, C.K., Shuman, S., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., Randall, G., Lindenbach, B.D., Rice, C.M., Simon, V., Ho, D.D., Zavolan, M. and Tuschl, T., 2005. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods* 2, 269-76.
- Pfeffer, S. and Voinnet, O., 2006. Viruses, microRNAs and cancer. *Oncogene* 25, 6211-9.
- Polack, A., Hortnagel, K., Pajic, A., Christoph, B., Baier, B., Falk, M., Mautner, J., Geltinger, C., Bornkamm, G.W. and Kempkes, B., 1996. c-myc activation renders proliferation of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed cells independent of EBV nuclear antigen 2 and latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10411-6.
- Purtilo, D.T., 1981. Malignant lymphoproliferative diseases induced by Epstein-Barr Virus in immunodeficient patients, including X-linked, cytogenetic, and familial syndromes. *Cancer Genet Cytogenet* 4, 251-68.
- Putral, L.N., Bywater, M.J., Gu, W., Saunders, N.A., Gabrielli, B.G., Leggatt, G.R. and McMillan, N.A., 2005. RNA interference against human papillomavirus oncogenes in cervical cancer cells results in increased sensitivity to cisplatin. *Mol Pharmacol* 68, 1311-9.
- Pyrc, K., Bosch, B.J., Berkhout, B., Jebbink, M.F., Dijkman, R., Rottier, P. and van der Hoek, L., 2006. Inhibition of human coronavirus NL63 infection at early stages of the replication cycle. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 2000-8.
- Qiu, X. and Abdel-Meguid, S. 1999. Human Herpesvirus Proteases. In: B. Dunn (Ed), *Proteases of Infectious Agents*, Academic Press, Pennsylvania, USA, pp. 93-115.
- Qiu, X., Janson, C.A., Culp, J.S., Richardson, S.B., Debouck, C., Smith, W.W. and Abdel-Meguid, S.S., 1997. Crystal structure of varicella-zoster virus protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 2874-9.

- Raab-Traub, N. and Flynn, K., 1986. The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell* 47, 883-9.
- Rasti, N., Falk, K.I., Donati, D., Gyan, B.A., Goka, B.Q., Troye-Blomberg, M., Akanmori, B.D., Kurtzhals, J.A., Dodoo, D., Consolini, R., Linde, A., Wahlgren, M. and Bejarano, M.T., 2005. Circulating Epstein-Barr virus in children living in malaria-endemic areas. *Scand J Immunol* 61, 461-5.
- Rauschhuber, C., Xu, H., Salazar, F.H., Marion, P.L. and Ehrhardt, A., 2008. Exploring gene-deleted adenoviral vectors for delivery of short hairpin RNAs and reduction of hepatitis B virus infection in mice. *J Gene Med* 10, 878-89.
- Rechsteiner, M.P., Berger, C., Zauner, L., Sigrist, J.A., Weber, M., Longnecker, R., Bernasconi, M. and Nadal, D., 2008. Latent membrane protein 2B regulates susceptibility to induction of lytic Epstein-Barr virus infection. *J Virol* 82, 1739-47.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R. and Ruvkun, G., 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403, 901-6.
- Resnick, L., Herbst, J.S., Ablashi, D.V., Atherton, S., Frank, B., Rosen, L. and Horwitz, S.N., 1988. Regression of oral hairy leukoplakia after orally administered acyclovir therapy. *Jama* 259, 384-8.
- Ricci, E.P., Mure, F., Gruffat, H., Decimo, D., Medina-Palazon, C., Ohlmann, T. and Manet, E., 2009. Translation of intronless RNAs is strongly stimulated by the Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2. *Nucleic Acids Res* 37, 4932-43.
- Richardson, C., Brennan, P., Powell, M., Prince, S., Chen, Y.H., Spiller, O.B. and Rowe, M., 2005. Susceptibility of B lymphocytes to adenovirus type 5 infection is dependent upon both coxsackie-adenovirus receptor and alpha5beta1 integrin expression. *J Gen Virol* 86, 1669-79.
- Rixon, F.J., Addison, C., McGregor, A., Macnab, S.J., Nicholson, P., Preston, V.G. and Tatman, J.D., 1996. Multiple interactions control the intracellular localization of the herpes simplex virus type 1 capsid proteins. *J Gen Virol* 77 (Pt 9), 2251-60.
- Rixon, F.J. and McNab, D., 1999. Packaging-competent capsids of a herpes simplex virus temperature-sensitive mutant have properties similar to those of in vitro-assembled procapsids. *J Virol* 73, 5714-21.
- Rooney, C.M., Smith, C.A., Ng, C.Y., Loftin, S.K., Sixbey, J.W., Gan, Y., Srivastava, D.K., Bowman, L.C., Krance, R.A., Brenner, M.K. and Heslop, H.E., 1998. Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 92, 1549-55.
- Roughan, J.E. and Thorley-Lawson, D.A., 2009. The intersection of Epstein-Barr virus with the germinal center. *J Virol* 83, 3968-76.
- Roughan, J.E., Torgbor, C. and Thorley-Lawson, D.A., 2010. Germinal center B cells latently infected with Epstein-Barr virus proliferate extensively but do not increase in number. *J Virol* 84, 1158-68.

- Rowe, M., Kelly, G.L., Bell, A.I. and Rickinson, A.B., 2009. Burkitt's lymphoma: the Rosetta Stone deciphering Epstein-Barr virus biology. *Semin Cancer Biol* 19, 377-88.
- Sabariego, R., Gimenez-Barcons, M., Tapia, N., Clotet, B. and Martinez, M.A., 2006. Sequence homology required by human immunodeficiency virus type 1 to escape from short interfering RNAs. *J Virol* 80, 571-7.
- Salek-Ardakani, S., Arrand, J.R. and Mackett, M., 2002. Epstein-Barr virus encoded interleukin-10 inhibits HLA-class I, ICAM-1, and B7 expression on human monocytes: implications for immune evasion by EBV. *Virology* 304, 342-51.
- Samanta, M., Iwakiri, D. and Takada, K., 2008. Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces IL-10 through RIG-I-mediated IRF-3 signaling. *Oncogene* 27, 4150-60.
- Sample, J., Young, L., Martin, B., Chatman, T., Kieff, E., Rickinson, A. and Kieff, E., 1990. Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J Virol* 64, 4084-92.
- Scaria, V. and Jadhav, V., 2007. microRNAs in viral oncogenesis. *Retrovirology* 4, 82.
- Schepers, A., Pich, D. and Hammerschmidt, W., 1996. Activation of oriLyt, the lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus, by BZLF1. *Virology* 220, 367-76.
- Schulz, T.F., 2006. The pleiotropic effects of Kaposi's sarcoma herpesvirus. *J Pathol* 208, 187-98.
- Shannon-Lowe, C., Adland, E., Bell, A.I., Delecluse, H.J., Rickinson, A.B. and Rowe, M., 2009. Features distinguishing Epstein-Barr virus infections of epithelial cells and B cells: viral genome expression, genome maintenance, and genome amplification. *J Virol* 83, 7749-60.
- Shannon-Lowe, C.D., Neuhierl, B., Baldwin, G., Rickinson, A.B. and Delecluse, H.J., 2006. Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7065-70.
- Shaw, G., Morse, S., Ararat, M. and Graham, F.L., 2002. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *Faseb J* 16, 869-71.
- Sijen, T., Fleenor, J., Simmer, F., Thijssen, K.L., Parrish, S., Timmons, L., Plasterk, R.H. and Fire, A., 2001. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107, 465-76.
- Sima, N., Wang, W., Kong, D., Deng, D., Xu, Q., Zhou, J., Xu, G., Meng, L., Lu, Y., Wang, S. and Ma, D., 2008. RNA interference against HPV16 E7 oncogene leads to viral E6 and E7 suppression in cervical cancer cells and apoptosis via upregulation of Rb and p53. *Apoptosis* 13, 273-81.
- Sixbey, J.W., Nedrud, J.G., Raab-Traub, N., Hanes, R.A. and Pagano, J.S., 1984. Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med* 310, 1225-30.

- Sixbey, J.W., Vesterinen, E.H., Nedrud, J.G., Raab-Traub, N., Walton, L.A. and Pagano, J.S., 1983. Replication of Epstein-Barr virus in human epithelial cells infected in vitro. *Nature* 306, 480-3.
- Skare, J., Edson, C., Farley, J. and Strominger, J.L., 1982. The B95-8 isolate of Epstein-Barr virus arose from an isolate with a standard genome. *J Virol* 44, 1088-91.
- Song, E., Lee, S.K., Wang, J., Ince, N., Ouyang, N., Min, J., Chen, J., Shankar, P. and Lieberman, J., 2003. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 9, 347-51.
- Soul-Lawton, J., Seaber, E., On, N., Wootton, R., Rolan, P. and Posner, J., 1995. Absolute bioavailability and metabolic disposition of valaciclovir, the L-valyl ester of acyclovir, following oral administration to humans. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 2759-64.
- Speck, P., Haan, K.M. and Longnecker, R., 2000. Epstein-Barr virus entry into cells. *Virology* 277, 1-5.
- Spender, L.C., Lucchesi, W., Bodelon, G., Bilancio, A., Karstegl, C.E., Asano, T., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., Vanhaesebroeck, B. and Farrell, P.J., 2006. Cell target genes of Epstein-Barr virus transcription factor EBNA-2: induction of the p55alpha regulatory subunit of PI3-kinase and its role in survival of EREB2.5 cells. *J Gen Virol* 87, 2859-67.
- Stevens, J.T., Mapelli, C., Tsao, J., Hail, M., O'Boyle, D., 2nd, Weinheimer, S.P. and DiIanni, C.L., 1994. In vitro proteolytic activity and active-site identification of the human cytomegalovirus protease. *Eur J Biochem* 226, 361-7.
- Stevenson, M., 2004. Therapeutic potential of RNA interference. *N Engl J Med* 351, 1772-7.
- Strockbine, L.D., Cohen, J.I., Farrah, T., Lyman, S.D., Wagener, F., DuBose, R.F., Armitage, R.J. and Spriggs, M.K., 1998. The Epstein-Barr virus BARF1 gene encodes a novel, soluble colony-stimulating factor-1 receptor. *J Virol* 72, 4015-21.
- Sun, Y., Li, Z., Li, L., Li, J., Liu, X. and Li, W., 2007. Effective inhibition of hepatitis B virus replication by small interfering RNAs expressed from human foamy virus vectors. *Int J Mol Med* 19, 705-11.
- Suzuki, R., Takeuchi, K., Ohshima, K. and Nakamura, S., 2008. Extranodal NK/T-cell lymphoma: diagnosis and treatment cues. *Hematol Oncol* 26, 66-72.
- Szakonyi, G., Klein, M.G., Hannan, J.P., Young, K.A., Ma, R.Z., Asokan, R., Holers, V.M. and Chen, X.S., 2006. Structure of the Epstein-Barr virus major envelope glycoprotein. *Nat Struct Mol Biol* 13, 996-1001.
- Takacs, M., Banati, F., Koroknai, A., Segesdi, J., Salamon, D., Wolf, H., Niller, H.H. and Minarovits, J., 2010. Epigenetic regulation of latent Epstein-Barr virus promoters. *Biochim Biophys Acta* 1799, 228-235.
- Takayama, T., Morelli, A.E., Onai, N., Hirao, M., Matsushima, K., Tahara, H. and Thomson, A.W., 2001. Mammalian and viral IL-10 enhance C-C chemokine receptor 5 but

- down-regulate C-C chemokine receptor 7 expression by myeloid dendritic cells: impact on chemotactic responses and in vivo homing ability. *J Immunol* 166, 7136-43.
- Tao, Q. and Chan, A.T., 2007. Nasopharyngeal carcinoma: molecular pathogenesis and therapeutic developments. *Expert Rev Mol Med* 9, 1-24.
- Tao, Q., Robertson, K.D., Manns, A., Hildesheim, A. and Ambinder, R.F., 1998. Epstein-Barr virus (EBV) in endemic Burkitt's lymphoma: molecular analysis of primary tumor tissue. *Blood* 91, 1373-81.
- ter Brake, O., Konstantinova, P., Ceylan, M. and Berkhout, B., 2006. Silencing of HIV-1 with RNA interference: a multiple shRNA approach. *Mol Ther* 14, 883-92.
- Terrin, L., Dal Col, J., Rampazzo, E., Zancai, P., Pedrotti, M., Ammirabile, G., Bergamin, S., Rizzo, S., Dolcetti, R. and De Rossi, A., 2008. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus activates the hTERT promoter and enhances telomerase activity in B lymphocytes. *J Virol* 82, 10175-87.
- Thorley-Lawson, D.A., 2005. EBV the prototypical human tumor virus--just how bad is it? *J Allergy Clin Immunol* 116, 251-61; quiz 262.
- Thorley-Lawson, D.A. and Allday, M.J., 2008. The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nat Rev Microbiol* 6, 913-24.
- Thorley-Lawson, D.A. and Gross, A., 2004. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* 350, 1328-37.
- Timmons, L., Tabara, H., Mello, C.C. and Fire, A.Z., 2003. Inducible systemic RNA silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 14, 2972-83.
- Timms, J.M., Bell, A., Flavell, J.R., Murray, P.G., Rickinson, A.B., Traverse-Glehen, A., Berger, F. and Delecluse, H.J., 2003. Target cells of Epstein-Barr-virus (EBV)-positive post-transplant lymphoproliferative disease: similarities to EBV-positive Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 361, 217-23.
- Tomkinson, B. and Kieff, E., 1992. Use of second-site homologous recombination to demonstrate that Epstein-Barr virus nuclear protein 3B is not important for lymphocyte infection or growth transformation in vitro. *J Virol* 66, 2893-903.
- Torre, D. and Tambini, R., 1999. Acyclovir for treatment of infectious mononucleosis: a meta-analysis. *Scand J Infect Dis* 31, 543-7.
- Trumper, P.A., Epstein, M.A., Giovanella, B.C. and Finerty, S., 1977. Isolation of infectious EB virus from the epithelial tumour cells of nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 20, 655-62.
- Truong, C.D., Feng, W., Li, W., Khoury, T., Li, Q., Alrawi, S., Yu, Y., Xie, K., Yao, J. and Tan, D., 2009. Characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: a study of 235 cases at a comprehensive cancer center in U.S.A. *J Exp Clin Cancer Res* 28, 14.
- Tugizov, S., Herrera, R., Veluppillai, P., Greenspan, J., Greenspan, D. and Palefsky, J.M., 2007. Epstein-Barr virus (EBV)-infected monocytes facilitate dissemination of EBV within the oral mucosal epithelium. *J Virol* 81, 5484-96.

- Tugizov, S.M., Berline, J.W. and Palefsky, J.M., 2003. Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells. *Nat Med* 9, 307-14.
- Uchida, J., Yasui, T., Takaoka-Shichijo, Y., Muraoka, M., Kulwichit, W., Raab-Traub, N. and Kikutani, H., 1999. Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science* 286, 300-3.
- Uejima, Y., Kokubo, M., Oshida, J., Kawabata, H., Kato, Y. and Fujii, K., 1993. 5-Methyl-4H-3,1-benzoxazin-4-one derivatives: specific inhibitors of human leukocyte elastase. *J Pharmacol Exp Ther* 265, 516-23.
- Unal, A., Pray, T.R., Lagunoff, M., Pennington, M.W., Ganem, D. and Craik, C.S., 1997. The protease and the assembly protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8). *J Virol* 71, 7030-8.
- Uprichard, S.L., Boyd, B., Althage, A. and Chisari, F.V., 2005. Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 773-8.
- van der Krol, A.R., Mur, L.A., Beld, M., Mol, J.N. and Stuitje, A.R., 1990. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2, 291-9.
- Vaucheret, H., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J.B., Mourrain, P., Palauqui, J.C. and Vernhettes, S., 1998. Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J* 16, 651-9.
- Vigne, S., Duraffour, S., Andrei, G., Snoeck, R., Garin, D. and Crance, J.M., 2009. Inhibition of vaccinia virus replication by two small interfering RNAs targeting B1R and G7L genes and their synergistic combination with cidofovir. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 2579-88.
- Vigne, S., Germi, R., Duraffour, S., Larrat, S., Andrei, G., Snoeck, R., Garin, D. and Crance, J.M., 2008. Specific inhibition of orthopoxvirus replication by a small interfering RNA targeting the D5R gene. *Antivir Ther* 13, 357-68.
- Voinnet, O., 2005. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet* 6, 206-20.
- Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J. and Munoz, N., 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189, 12-9.
- Waldele, K., Silbermann, K., Schneider, G., Ruckes, T., Cullen, B.R. and Grassmann, R., 2006. Requirement of the human T-cell leukemia virus (HTLV-1) tax-stimulated HIAP-1 gene for the survival of transformed lymphocytes. *Blood* 107, 4491-9.
- Walling, D.M., Flaitz, C.M. and Nichols, C.M., 2003. Epstein-Barr virus replication in oral hairy leukoplakia: response, persistence, and resistance to treatment with valacyclovir. *J Infect Dis* 188, 883-90.

- Wang, D., Liebowitz, D. and Kieff, E., 1985. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* 43, 831-40.
- Wang, F., Gregory, C.D., Rowe, M., Rickinson, A.B., Wang, D., Birkenbach, M., Kikutani, H., Kishimoto, T. and Kieff, E., 1987. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3452-6.
- Wang, Q., Contag, C.H., Ilves, H., Johnston, B.H. and Kaspar, R.L., 2005. Small hairpin RNAs efficiently inhibit hepatitis C IRES-mediated gene expression in human tissue culture cells and a mouse model. *Mol Ther* 12, 562-8.
- Waxman, L. and Darke, P.L., 2000. The herpesvirus proteases as targets for antiviral chemotherapy. *Antivir Chem Chemother* 11, 1-22.
- Welch, A.R., Villarreal, E.C. and Gibson, W., 1995. Cytomegalovirus protein substrates are not cleaved by the herpes simplex virus type 1 proteinase. *J Virol* 69, 341-7.
- Wiedmer, A., Wang, P., Zhou, J., Rennekamp, A.J., Tiranti, V., Zeviani, M. and Lieberman, P.M., 2008. Epstein-Barr virus immediate-early protein Zta co-opts mitochondrial single-stranded DNA binding protein to promote viral and inhibit mitochondrial DNA replication. *J Virol* 82, 4647-55.
- Wies, E., Mori, Y., Hahn, A., Kremmer, E., Sturzl, M., Fleckenstein, B. and Neipel, F., 2008. The viral interferon-regulatory factor-3 is required for the survival of KSHV-infected primary effusion lymphoma cells. *Blood* 111, 320-7.
- Wilson, J.A. and Richardson, C.D., 2005. Hepatitis C virus replicons escape RNA interference induced by a short interfering RNA directed against the NS5b coding region. *J Virol* 79, 7050-8.
- Wood, V.H., O'Neil, J.D., Wei, W., Stewart, S.E., Dawson, C.W. and Young, L.S., 2007. Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 regulates cellular gene transcription and modulates the STAT1 and TGFbeta signaling pathways. *Oncogene* 26, 4135-47.
- Wu, H.L., Huang, L.R., Huang, C.C., Lai, H.L., Liu, C.J., Huang, Y.T., Hsu, Y.W., Lu, C.Y., Chen, D.S. and Chen, P.J., 2005. RNA interference-mediated control of hepatitis B virus and emergence of resistant mutant. *Gastroenterology* 128, 708-16.
- Yajima, M., Kanda, T. and Takada, K., 2005. Critical role of Epstein-Barr Virus (EBV)-encoded RNA in efficient EBV-induced B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 79, 4298-307.
- Yalamanchili, R., Tong, X., Grossman, S., Johannsen, E., Mosialos, G. and Kieff, E., 1994. Genetic and biochemical evidence that EBNA 2 interaction with a 63-kDa cellular GTG-binding protein is essential for B lymphocyte growth transformation by EBV. *Virology* 204, 634-41.
- Yamato, K., Yamada, T., Kizaki, M., Ui-Tei, K., Natori, Y., Fujino, M., Nishihara, T., Ikeda, Y., Nasu, Y., Saigo, K. and Yoshinouchi, M., 2008. New highly potent and specific E6 and E7 siRNAs for treatment of HPV16 positive cervical cancer. *Cancer Gene Ther* 15, 140-53.

- Yates, J.L., Warren, N. and Sugden, B., 1985. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* 313, 812-5.
- Yeung, M.L., Benkirane, M. and Jeang, K.T., 2007. Small non-coding RNAs, mammalian cells, and viruses: regulatory interactions? *Retrovirology* 4, 74.
- Yin, Q. and Flemington, E.K., 2006. siRNAs against the Epstein Barr virus latency replication factor, EBNA1, inhibit its function and growth of EBV-dependent tumor cells. *Virology* 346, 385-93.
- Ying, R.S., Zhu, C., Fan, X.G., Li, N., Tian, X.F., Liu, H.B. and Zhang, B.X., 2007. Hepatitis B virus is inhibited by RNA interference in cell culture and in mice. *Antiviral Res* 73, 24-30.
- Yoshinouchi, M., Yamada, T., Kizaki, M., Fen, J., Koseki, T., Ikeda, Y., Nishihara, T. and Yamato, K., 2003. In vitro and in vivo growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by E6 siRNA. *Mol Ther* 8, 762-8.
- Yoshizaki, T., Wakisaka, N., Kondo, S., Murono, S., Shimizu, Y., Nakashima, M., Tsuji, A. and Furukawa, M., 2008. Treatment of locally recurrent Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma using the anti-viral agent cidofovir. *J Med Virol* 80, 879-82.
- Young, K.A., Chen, X.S., Holers, V.M. and Hannan, J.P., 2007. Isolating the Epstein-Barr virus gp350/220 binding site on complement receptor type 2 (CR2/CD21). *J Biol Chem* 282, 36614-25.
- Yu, M.C. and Yuan, J.M., 2002. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol* 12, 421-9.
- Zalani, S., Holley-Guthrie, E. and Kenney, S., 1996. Epstein-Barr viral latency is disrupted by the immediate-early BRLF1 protein through a cell-specific mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 9194-9.
- Zhang, J., Yamada, O., Sakamoto, T., Yoshida, H., Iwai, T., Matsushita, Y., Shimamura, H., Araki, H. and Shimotohno, K., 2004. Down-regulation of viral replication by adenoviral-mediated expression of siRNA against cellular cofactors for hepatitis C virus. *Virology* 320, 135-43.
- Zhang, J.X., Chen, H.L., Zong, Y.S., Chan, K.H., Nicholls, J., Middeldorp, J.M., Sham, J.S., Griffin, B.E. and Ng, M.H., 1998. Epstein-Barr virus expression within keratinizing nasopharyngeal carcinoma. *J Med Virol* 55, 227-33.
- Zheng, B.J., Guan, Y., Tang, Q., Du, C., Xie, F.Y., He, M.L., Chan, K.W., Wong, K.L., Lader, E., Woodle, M.C., Lu, P.Y., Li, B. and Zhong, N., 2004. Prophylactic and therapeutic effects of small interfering RNA targeting SARS-coronavirus. *Antivir Ther* 9, 365-74.
- Zhu, J.Y., Pfuhl, T., Motsch, N., Barth, S., Nicholls, J., Grasser, F. and Meister, G., 2009. Identification of novel Epstein-Barr virus microRNA genes from nasopharyngeal carcinomas. *J Virol* 83, 3333-41.

ANNEXES

Annexe 1

Gene **BLLF1**

Amorces

Sonde

-Intron= GP220

siRNAs

77101	aaagaaagtg	caaatttctg	attaataaat	ttttattgac	tttatacata	ggtctcggcg
77161	tcatcatatg	gtgggggtgg	gtaggtatgg	gatgtagaca	agttacgcct	aaaggcgcag
77221	tccgccatga	ccagcagcag	cagaagggtc	agcacagcca	gagaggcca	ctgcagtact
77281	agcatggaga	ggtttgagaa	tctgggctgg	gacgttggcg	ggactggcac	ggtggcttgg
77341	gctgtggtaa	ccggtgggct	cgtaaaagtc	cagcggggcc	gcagtttgc	agaagtgc
77401	ggaggtagat	aggtggctgc	attgtatctc	ggtcttggcg	tagttgaatc	accgcccgtaa
77461	tctgtgggtgg	gctctgtact	tgtccgggct	ccatgctctg	tgggtgtgctt	tccaccgggtg
77521	gtagaattgg	cctttccacc	tgttgagggtg	accgtgggaa	ccgccgtctt	ttggccactg
77581	ggggcctggg	gcgacggtgc	atlttggggg	ggcgtgcctt	tggtagacatt	aacctcccc
77641	ggttttgtgg	atgtggaact	gtttccaggg	cctgacgctt	ggctggtggt	gcctggggcg
77701	ggtgctggcg	aactgggtgga	cacatgatgt	gtgctgatag	aggctggtgt	cacctgtgtt
77761	atattttcac	cacctgttgg	gtgagcggag	gtagtaaaag	gcataatgtga	cgttgaattg
77821	tcaactgggtg	aggggctgag	tgtctctggg	tttgaactgg	gtctcagtga	catggaagag
77881	gttgaacttg	aagttatggt	atglttggcct	gtggtaacag	cactggttgc	atlttttgggt
77941	tggctggtaa	ctactggggg	gggacttgtt	cctcctaagg	tgtggttgg	ggcatttggc
78001	tgtggacttg	tttctccac	agtagggccg	gtggcatttg	gggttgggg	agtcactgct
78061	gagggtgggg	ttgtttttcc	caagggtggg	ctgggtggcat	ttggggttgg	gtagtact
78121	gctgaggtgg	ggcttgtttt	tcccagggtg	gggctggtgg	catttgggg	tgggtagtc
78181	actgctgagg	taggacttgt	tttcccaag	gtggggctgg	tggcatttgg	ggttgggta
78241	gtcactgctg	gggtggggct	ggtggcattt	ggggttgggg	tagtcaactgc	tggggtgggg
78301	ctggtggcat	ttggggttgg	ggttagtcaact	ggtgaggtgg	agctggtcat	gtcggggggc
78361	ttactttctg	tgccgttgtc	ccatggagat	ggacttgggtg	tcaccgggtga	tgcgcctgac
78421	gttgtgcccg	ctgggttgg	gctggtgaca	tccgcgggtg	atacagtggg	gcctgtgctt
78481	gcaggtgccc	tgaggttgg	aggcacgtga	gtagagctgg	gtagacctgt	cgttgtattg
78541	ggatcagcaa	atccagttgt	attcaaggta	ggggaggtgg	tgggtgctctc	gggtgccttg
78601	gagaatataa	ccttgtgggt	tgttgtgggt	gcattggttag	cgttcgtgt	gataatgag
78661	gtcttggggg	ccgtgccaa	accgagaca	gtaatgcaa	atgtccgatt	gctcgcaaat
78721	gcaccagaaa	tatttccaca	accgaagg	gtccccgagg	tgagagtcca	tttgcactta
78781	aagtcagttt	cagtgttgtt	tggccaggcc	caaaaggcag	tcactgtaac	atlttggcgag
78841	tttgcgtcct	cagaagtgc	cattggcact	gaataggtag	cattgtcacc	cacataatgt
78901	atgtctgtgg	tgtttgtcgg	catgtcctgt	gaagctggaa	tctcatcaga	gaacacaatg
78961	ttggactgaa	tgcagtaatc	tccccgctc	gccttcggtc	cattcccaga	gtaaaacacg
79021	tacaggatac	tgttattgcc	aagaaatcgt	gacactggac	gtggtgtcag	acgcaggctg
79081	tatgcatacc	ctgtaccagg	tattgggggtg	gccacgggac	tcgttgatgt	gagaattccg
79141	ccgctgggaa	catggctctc	gtatccactg	caggtgatgt	taaatttgtt	gtctccgggc
79201	agaacttgtg	aaatttccg	atcctccata	atacactcaa	tatctatctc	attaccgagc
79261	atlttctgtt	ttacgctgaa	attcagctct	tgagctgacg	ttggcaact	taagggtagc
79321	gtgacatcca	gcccctgtgc	cctcactact	gccgttatat	tggtagaatt	acagttatcc
79381	cactttatgt	atggcactgt	ttctggtatc	aggtacacgg	ggttttgc	ttctgcatgg
79441	tggcaccaca	tggttccaaa	cacatcttga	aagtagacat	ctacagattc	caggcttact
79501	tgttgcctct	ctccgggtgg	gacgttaatt	ggaagcttct	tagaccgat	agttagagcc
79561	aattctctct	caccaaggag	ctccagtaga	aagagattgg	tggcattttc	tgagccacca
79621	aatgcacctc	gaggttggta	gacagccttc	gtatgggggtg	tcagctggcc	aaagtcaaga
79681	tcaagttgat	gctttttgac	cccgacatcg	aaattgatag	ttacattgac	atctgcccgtg
79741	caaacattgc	atgtggggta	aaatgggaa	tccggaatct	caacattgaa	aaaaccagga
79801	tcttcaccgg	tgagatggat	caggctctgg	atgggtgact	gacacacaag	caaggctgcc
79861	tccat	tgtct	cggcaocgat	ttctaggcag	catcctcttt	aataggtaaca
79921	ggtggttgg	agtcacactt	ttgttgcaga	caaaatggac	aaggacaggc	cgggtcccc

Gene BZLF1
Amorces
Sonde
siRNA

```

[...]
```

88741	ttcaactttc	attggtgcca	ctgggtctcat	cctctgcacc	atcatgggtca	tctccccagc
88801	cccagagcccc	catacgcccc	attccaacaa	gattccccccc	tccccctatg	ccgttacaag
88861	atagcatggc	cgtgggggtg	gactcatcag	gtacagcatg	ccaagcatg	ccctttgcca
88921	gtgattacag	tcaaggtgca	tttacccccac	tggacattaa	tgccaccacg	ccaaaaaggc
88981	ctcgagtaga	agaaagttct	cacggacctg	cccggtgttc	ccaagctact	gctgaagcac
89041	aggagattct	cagtgacaat	tctgagatct	ccgtgttccc	aaaggacgcg	aagcagactg
89101	actacgatgc	atccactgaa	agtgagctag	attaagggga	tccaaggtga	ccctgttag
89161	ctatgtgatc	tttgactgac	acataaacat	ggtttaagga	atgaacactc	atggtgtgag
89221	actggaactg	tactaaat	gctgacatat	gtacaatgag	agccaaaaat	ttgataaacc
89281	ttaaaagtcc	ccccatctaa	tgatgtccag	ttcccttctc	ccaccctgta	caccccgacc
89341	caaagggact	caatggcatt	cagat	tttcta	gttaccacag	gtagaatatc
89401	ccataaaaaat	aagtgcattg	atatagctct	gcacaggctt	ggaaacaccc	attccaggtg
89461	tgcttctttt	tggtgaaata	aaaacagcat	cctttatatg	aaaatgtgta	ttctctggtg
89521	ttgcagtatg	tacagttagc	tttggatatag	ttttggggta	cctgaaatgt	gtgcagggtg
89581	ggtgtccaat	gtggcagttt	tacctctttg	tccccatact	cctgctcggc	cgtcttgta
89641	aagttaaccg	gcggtggagg	atccaccggc	cagacctcta	catttggtt	gggtaccag
89701	gtgatggccg	cggctgccac	ccgccctcct	cctcttacc	tgggtggcaa	aaagtatgcc
89761	aggagtagaa	caataacaag	tgcgatggcg	gtaaacaatg	gcaccctcac	ctgcttaaat
89821	gaaaccatgg	caaccacttc	aaagagagcc	gacaggaaga	tatttattaa	tattccatta
89881	gtaaacgagg	cgtgaagcag	gcgtggtttc	aataacggga	gtagaaatt	taagagatcc
89941	tcgtgtaaaa	catctgggtg	ccgggggata	atggagtcaa	catccaggct	tgggcacatc
90001	tgcttcaaca	ggagggcag	cctgtcattt	tcagatgatt	tggcagcagc	cacctgcgga
90061	caaaaatcag	gcgttttagat	ggggcattta	tgtttgggac	gctagccgcc	tgggcattcg
90121	tgttagtata	tactgacctc	acggtagtgc	tgcagcagtt	gcttaaacct	ggcccggcat
90181	tttctggaag	ccaccgatt	cttgtatcgc	tttatttcta	gttcagaatc	gcattcctcc
90241	agctgcgagc	aagggaatgc	gttactacia	gtggtgccta	gtcagttgaa	acaagcccca
90301	ccatccgctg	ccgccctcc	atgagcccca	ccgtccgctg	ccgccctcc	ttgagccct
90361	ccttaccgat	tctggctgtt	gtgggttccg	tgtgctcgt	gccggggcag	ccactggtgc
90421	aggctgtgga	acaccaatgt	ctgctagctg	ttgtccttgg	ttagccccgg	ggcaagcaaa
90481	caccactgct	gctgctgttt	gaacagtaga	attgtctcca	ggttgaggtg	cttctcccc
90541	ggcttggtta	gtctgttgat	tctgggttat	gtcggagact	gggaacagct	gaggtgctgc
90601	ataagcttga	taagcattct	caggagcagg	ctgaggggca	gaaaaccacg	accagctcgg
90661	agcggttgaa	acatgatagg	cagttagctg	gccttgtggc	agaggctctg	gcagaccgg
90721	ccacagcaca	caaggcaaa	gagcttgcca	tggccctccc	aggtcctgat	agactctggt
90781	agcttggtca	aaagcttgta	caaaaggcac	ctggatggg	tcaggtgtaa	attttacatc
90841	ttcagaagtc	gagtttgggt	ccatcatctt	cagcaaaagat	agcaaaaggtg	gccggcaagg
90901	tgcaatggtt	agtgagttac	ctgtcctaaca	tctccccctt	aaapccaagg	caccagcctc
90961	ctctgtgatg	tcatggtttg	ggacgtgcta	aatttaggtg	tgtctatgag	gtacattagc
91021	aatgcctgtg	gctcatgcat	agtttctaaa	agaggaggag	gcagttttca	gaagtgtcta
91081	aaataagctg	gtgtcaaaaa	tagacagccc	agttgaaata	tgcatggcat	gcagcagaca

[...]

135361 ggcccggtaa agcagggtacc agtattcatc cggcaccttg cgtgccaaca cacgattcgt

135421 gcggtttcca gtatttatca cggcttcccg ccacaggtaa aagttaacac ttagggtcag

Gene BVRF2 135481 cagcttggtc agggataggt gcaaaaacct gagctcgtcc tcgcgagag cgcaaagcgg

Amorces 135541 ccagttcttt agcatcttca ggaggagccc gtgaatccca ggtgtcattc gcgctcatc

Sonde 135601 cccgcgcacc cccagtccca ttaacatagc gggcacaatg gtgcaggcac cgtctgtata

siRNA 135661 cgtctgcggc ttcgtggagc gcccgagcgc cccaccaag gacgcctgcc ttcacctgga

135721 tcccctcacc gtcaagagcc agtcctctct gaagaagccc ttgccactca cggtggaaaca

135781 cctgcccgat gctccggctg gctcagctct tggcctttac cagagccogag cgggtctctt

135841 tagcgcagcc tcgattacct ctggggactt cctgtccctg ctggactcaa ttaccacga

135901 ttgcatatt gcacagagtc agcgcctgcc cctccctcga gaaccaag tggaggctct

135961 gcacgcctgg ctcccctcac tgtcactggc ctcccctcac ccagacatac cccaaaccac

136021 cgcagatgga **ggcaagctgt ccttctttga** ccacgtgtct atctgtgcc tgggtcgtcg

136081 gcgcggca **cc acggcagtct acggtaga** **ccttgctgg** **gtcctgaagc** **acttagtga**

136141 **cctggaa**ccg tctatcgccg cccagattga gaatgacgcc aatgccgcaa agcgtgaatc

136201 cggatgcccg gaagaccacc ctctgcccct cacgaagctc atagctaag **caatcgatgc**

136261 **tggatttctg** agaaaccgag tggagactct gaggcaggac aggggtgtgg **ccaatatccc**

136321 **agccgagctg** tatttaaagg ccagcgacgc cccggaccta caaaagccgg **acaaggcact**

136381 **tcagagccca** ccaccggcct ccacagacc agccaccatg ctatcaggta acgcaggaga

136441 aggagcaaca gcctgcccag gttcggcccg cgcgggcccag gacctcatca gcgtccccg

136501 caacaccttt atgacactgc ttcagaccaa cctggacaac aaaccgcccga ggcagaccac

136561 gctaccctac gcggccccgc tgccccctt tcccaccag gcaatagcca ccgcgccttc

136621 ctacggctct ggggcccggag cggctgcccc ggcccggcggc tactttacct ccccaggagg

136681 ttactacgcc gggcccgcgg gcggggacc gcgggtcctt ttggcgatgg acgctcacac

136741 ctaccacccc caccacacc cccctccggc ctactttggc ttgccgggccc tctttggccc

136801 cctccacccc gtgcctcctt actacggatc cacttgccg gcagactacg tccccgctcc

136861 ctcgcatcc aacaagcggg aaagagacc cgaggaggat gaagaagcgg gggggctatt

136921 cccgggggag gacgccacc tctaccgcaa ggacatagcg ggcctctcca agagtgtgaa

136981 tgagttacag cacacgtac aggcctcgc cggggagacg ctgtcctacg gccacaccgg

137041 agtcggatac tgccccagc agggcccctg ctacaccac tcggggcctt acggatttca

137101 gcctcatcaa agctacgaag tgcccagata cgtccctcat ccgccccac caccaacttc

137161 tcaccaggca gctcaggcgc agcctccacc cccgggcaca caggccccg aagcccactg

137221 tgtggcccag tccacgatcc ctgaggcggg agcagccggg aactctggac cccgggagga

137281 caccaacct cagcagccca ccaccgagg ccaccaccgc ggaaagaaac tgggtcaggc

137341 ctctgcgtcc ggagtggctc agtctaagga gccaccacc ccaaggcca agtctgtgtc

137401 agcccacctc aagtccatct tttgcgagga attgctgaat aaacgcgtgg **ctgaa**agta

137461 aactttattg cgtgttagta cctgtccatt cacaggggta tccagccctt gcgcccctc

Annexe 2

Article :

“Inhibition of Epstein-Barr virus replication by small interfering RNA targeting the Epstein-Barr virus protease gene.”

Larrat S, Morand P, Bas A, Vigne S, Crance JM, Boyer V, Nicod S, Grossi L, Buisson M, Burmeister WP, Seigneurin JM, Germe R.

Antiviral Therapy, **2009**;14(5):655-62.