



HAL
open science

Caractérisation de l'ubinucléine, partenaire cellulaire du transactivateur ZEBRA du virus d'Epstein-Barr

Julien Lupo

► **To cite this version:**

Julien Lupo. Caractérisation de l'ubinucléine, partenaire cellulaire du transactivateur ZEBRA du virus d'Epstein-Barr. Interactions entre organismes. Université de Grenoble, 2010. Français. NNT : . tel-00559673

HAL Id: tel-00559673

<https://theses.hal.science/tel-00559673>

Submitted on 26 Jan 2011

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

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



UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité **Virologie Microbiologie Immunologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée et soutenue publiquement par

LUPO Julien

le 13 décembre 2010

Caractérisation de l'ubinucléine, partenaire cellulaire du transactivateur ZEBRA du virus d'Epstein-Barr

Thèse dirigée par **BOYER Véronique** et codirigée par **MORAND Patrice**

Thèse préparée au sein du **Laboratoire UVHCI**
dans l' **Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

JURY

- **Mr SEIGNEURIN Jean-Marie**
- **Mme FAFI-KREMER Samira**
- **Mr BUSSON Pierre**
- **Mme MANET Evelyne**
- **Mme BOYER Véronique**
- **Mr MORAND Patrice**

PU-PH, Grenoble
MCU-PH, Strasbourg
DR2 CNRS, Paris
DR2 CNRS, Lyon
CR1 INSERM, Grenoble
PU-PH, Grenoble

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur



UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité **Virologie Microbiologie Immunologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée et soutenue publiquement par

LUPO Julien

le 13 décembre 2010

Caractérisation de l'ubinucléine, partenaire cellulaire du transactivateur ZEBRA du virus d'Epstein-Barr

Thèse dirigée par **BOYER Véronique** et codirigée par **MORAND Patrice**

Thèse préparée au sein du **Laboratoire UVHCI**
dans l' **Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

JURY

- **Mr SEIGNEURIN Jean-Marie**
- **Mme FAFI-KREMER Samira**
- **Mr BUSSON Pierre**
- **Mme MANET Evelyne**
- **Mme BOYER Véronique**
- **Mr MORAND Patrice**

PU-PH, Grenoble
MCU-PH, Strasbourg
DR2 CNRS, Paris
DR2 CNRS, Lyon
CR1 INSERM, Grenoble
PU-PH, Grenoble

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

RÉSUMÉ

Le facteur de transcription ZEBRA (EB1) du virus d'Epstein-Barr joue un rôle essentiel dans l'initiation de l'infection lytique et la production virale. L'ubinucléine a été identifiée comme un partenaire cellulaire de ZEBRA, capable de l'empêcher de se fixer à ses séquences d'ADN cibles. Le rôle de l'ubinucléine dans la cellule demeure inconnu, ainsi que les conséquences de son interaction avec ZEBRA dans les cellules infectées par l'EBV.

Notre travail a permis, d'abord, de mieux caractériser l'ubinucléine dans la cellule épithéliale en l'identifiant comme une protéine des jonctions serrées. L'ubinucléine a été proposée comme un nouveau membre de la famille des protéines NACos (nuclear and adhesion complex components) possédant une double localisation, les noyaux et les jonctions des cellules. Afin de mieux comprendre son rôle dans la cellule épithéliale, nous avons étudié par une approche protéomique couplée à la spectrométrie de masse les partenaires de l'ubinucléine et identifié les protéines LYRIC et RACK-1. Nos résultats suggèrent que l'ubinucléine est impliquée dans différents processus biologiques tels que la régulation de la prolifération et de l'adhésion cellulaires. Enfin, dans les cellules épithéliales infectées par l'EBV, les fonctions de l'ubinucléine semblent dépendre de sa localisation cellulaire. Au niveau nucléaire, l'ubinucléine régule négativement le cycle lytique et la production de particules virales en empêchant ZEBRA et d'autres facteurs cellulaires de se fixer à leurs promoteurs de type AP-1. Lorsqu'elle est séquestrée dans les jonctions serrées, l'inhibition de ZEBRA est levée permettant ainsi le bon déroulement du cycle lytique du virus.

Mots clés : Epstein-Barr Virus (EBV), ZEBRA/EB1, ubinucléine, jonctions serrées, protéomique

ABSTRACT

The ZEBRA (EB1) transcription factor of Epstein-Barr virus (EBV) is crucial for initiation of lytic infection and viral production. Ubinuclein (Ubn-1) has been identified as a cellular partner of ZEBRA enabling to prevent ZEBRA-DNA interaction. The role of Ubn-1 in the cell remains elusive as well as the consequences of its interaction with ZEBRA in EBV infected cells.

In our work, we have characterized Ubn-1 as a new protein of epithelial cells tight junctions (TJ) and a new member of NACos (nuclear and adhesion complex components) proteins with a dual cellular localisation, the nuclei and the junctions of the cells. Using a proteomic approach coupled to mass spectrometry, we have then studied interacting partners of Ubn-1 in order to get more insights on its role in epithelial cells and identified LYRIC and RACK-1 proteins. Our results suggest that Ubn-1 is involved in different biological processes such regulation of cells proliferation and cell-cell contacts. Finally, in EBV infected epithelial cells, Ubn-1 functions seem depend on its cellular localisation. Nuclear Ubn-1 regulates negatively lytic cycle and virus production interfering with ZEBRA and others cellular factors in the activation of AP-1 promoters. When Ubn-1 is sequestered in TJ, Ubn-1 can no longer act as a repressor of ZEBRA which is free to activate the EBV productive cycle.

Key words: Epstein-Barr virus (EBV), ZEBRA/EB1, ubinuclein, tight junctions, proteomic

UVHCI (Unit of Virus Host Cell Interactions) BP181

UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS

6, rue Jules Horowitz

F-38042 Grenoble cedex 9, France

Remerciements

D'abord je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à l'égard des personnes qui ont dirigé mon travail et participé à mon jury de thèse :

A Madame le **Docteur Véronique Boyer**, directeur de thèse

Je te remercie vivement pour avoir encadré mon travail durant ces 4 années. J'ai vraiment apprécié ton dynamisme et ton esprit d'initiative, qualités importantes pour mener à bien un travail de recherche et avancer dans la vie. Je te souhaite beaucoup de réussite dans tes projets futurs et la vie associative auprès des malades.

A Monsieur le **Professeur Patrice Morand**, co-directeur de thèse

Merci de m'avoir motivé à poursuivre mon internat de biologie par un travail de thèse et de la confiance que tu m'as accordée au cours de ces années. Je te suis très reconnaissant de m'avoir aidé dans mon organisation personnelle afin de concilier à la fois mon travail de recherche et le travail hospitalier. Tant sur le plan professionnel que personnel, je te remercie pour ta disponibilité et ton soutien pendant cette période. Je souhaite vivement que mon travail au sein de l'équipe du laboratoire de virologie puisse s'inscrire dans la durée.

A Madame le **Docteur Samira Fafi-Kremer**

Je suis très honoré que vous jugiez mon travail en tant que virologue et ancien assistant du laboratoire de virologie de Grenoble, poste que j'occupe maintenant depuis une année.

A Monsieur le **Docteur Pierre Busson**

C'est un honneur que vous participiez à mon jury de thèse en tant que spécialiste de l'EBV et des cancers associés à ce virus.

A Madame le **Docteur Evelyne Manet**

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. La collaboration avec votre laboratoire fut déterminante pour la réalisation de mon travail.

A Monsieur le **Professeur Jean-Marie Seigneurin**

Je vous remercie de faire partie de mon jury de thèse et de m'avoir accueilli dans le laboratoire de virologie dès mon internat en 2005.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser ce travail, chercheurs, biologistes, thésards, étudiants...

Je remercie le **Docteur Stephen Cusack** et le **Professeur Rob Ruigrok** pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire UVHCI et d'une structure qui jouit d'un environnement privilégié sur le plan scientifique et technique.

Je remercie le **Docteur Henri Gruffat** pour son aide scientifique et sa collaboration précieuse dans mon travail.

Je remercie le **Professeur Wim Burmeister** et le **Docteur Nicolas Tarbouriech** pour leur aide scientifique.

Merci à **Pierre Alain Coly** avec qui j'ai travaillé au début de ma thèse au laboratoire et interagi par la suite à l'hôpital. Nous avons aussi partagé de merveilleux moments en dehors du contexte professionnel et nul doute que tu as beaucoup contribué à mon travail de thèse ainsi qu'à mon épanouissement personnel.

Merci à **Charlotte Sueur** et **Audrey Conti** qui abordent leur 2^{ème} année de thèse dans le laboratoire. Je vous souhaite une grande réussite dans la poursuite de vos projets scientifiques et personnels.

Je remercie le **Docteur Jacques Croizé** pour sa disponibilité, sa bienveillance et ses encouragements au cours de l'intégralité de mon cursus hospitalo-universitaire.

Je remercie le **Docteur Isabelle Pelloux** pour la relecture de mon manuscrit et son expertise en orthographe.

Merci au **Docteur Sylvie Larrat** pour ses conseils précieux et son soutien pendant cette période.

Je remercie aussi vivement mes autres collègues biologistes du laboratoire de virologie de l'hôpital, en particulier les **Docteurs Raphaële Germi, Monique Baccard-Longere, Christine Morel-Baccard** et **Anne Schmuck** pour leur aide et leur soutien tout au long de ma thèse.

Merci à tous les thésards du laboratoire UVHCI avec lesquels j'ai pu échanger sur le plan scientifique et personnel en particulier, Alexandre, Cédric, Nicolas, Céleste, Julien et Ivan. Merci aux internes qui m'ont aidé et soutenu à l'hôpital en particulier, Bérangère, Stéphanie, David, Laetitia, Julie, Cécile et Perrine.

Avant-propos

Petites considérations personnelles sur le travail de thèse...

Initier une thèse pour la gloire, l'ambition, les dîners mondains ou accéder à une moindre ignorance ? La thèse pour une vie intellectuelle réussie ? Mais, effectuer une thèse, n'est-ce pas plutôt développer une étroitesse d'esprit au détriment d'une amplitude d'esprit ? « Il faut savoir peu de tout, car il est bien plus beau de savoir quelque chose de tout que de savoir tout d'une chose ¹ ».

La thèse, c'est du travail accompli. Travailler pour travailler est une activité absurde. Le travail fécond qui élève l'homme, c'est celui qu'il s'approprie par une réelle prise de conscience autonome et adéquate. Être satisfait de son travail ou de sa vie personnelle, c'est juger de la validité de sa propre expérience et ne pas persévérer dans le déni de réalité...

Par-delà la thèse : les amis, la famille et le sentiment amoureux...

J'avais cru identifier certains des éléments qui joueraient sur mon sentiment de vie heureuse et de satisfaction de ma propre existence. Il suffisait d'organiser ma vie selon les bonnes exigences du travail, des disciplines sportives et de faire abstraction de tout événement que j'aurais pu juger susceptible d'interférer avec le bon cheminement de ma thèse. Vivre aussi un peu à l'image des Sénèque et Marc-Aurèle, dans la tempérance et la négation des affects. Une maîtrise de soi garante de ma réussite professionnelle et de mon bonheur ? Mais une vie heureuse ne pouvait dépendre uniquement de l'effort que je poursuivais à l'application de cette entreprise. Une vie basée seulement sur de tels principes conduisait irrémédiablement à une vie périssable.

Devant les difficultés, ma famille et mes amis ² se sont montrés présents pour me soutenir et je leur en suis infiniment reconnaissant. Ces moments ont été aussi l'occasion de me révéler sur le plan personnel et affectif. Un mal pour un bien.

A. ³, mon élan vital, ma force créatrice, mon cœur m'a permis de dépasser mes inquiétudes et mon anxiété et nul doute que ma raison ne peut qu'accompagner ce sentiment libérateur. Je te remercie de t'être montrée patiente avec moi, de m'avoir soutenu malgré mes humeurs. Tu es ma source de joie et de vie, ma prise de conscience du sentiment d'exister, mon accès pour l'éternité.

¹Pascal, *Les Pensées*, 1662. Fragments 183 (Ed. de M Le Guern).

² Je pense particulièrement à mes parents, à ma sœur Julie dont l'accouchement est prévu le jour de ma soutenance de thèse, à Christian, François-Xavier, Benoit, Isabelle, Charles et Marie.

³ Audrey

Citations

« Le monde juge bien des choses, car il est dans l'ignorance naturelle qui est le vrai siège de l'homme. Les sciences ont deux extrémités qui se touchent, la première est la pure ignorance naturelle où se trouvent tous les hommes en naissant, l'autre extrémité est celle où arrivent les grandes âmes qui, ayant parcouru tout ce que les hommes peuvent savoir, trouvent qu'ils ne savent rien et se rencontrent en cette même ignorance d'où ils étaient partis, mais c'est une ignorance savante qui se connaît. Ceux d'entre deux, qui sont sortis de l'ignorance naturelle et n'ont pu arriver à l'autre, ont quelque teinture de sottise science suffisante et font les entendus. Ceux-là troublent le monde et jugent mal de tout ».

Blaise Pascal, *Les Pensées* 1662. Fragments 77 (Ed. de M Le Guern)

« La raison agit avec lenteur et avec tant de vues sur tant de principes, lesquels il faut qu'ils soient toujours présents, qu'à toute heure elle s'assoupit ou s'égare manque d'avoir tous ses principes présents. Le sentiment n'agit pas ainsi ; il agit en un instant et toujours est prêt à agir. Il faut donc mettre notre foi dans le sentiment, autrement elle sera toujours vacillante ».

Blaise Pascal, *Les Pensées* 1662. Fragments 671 (Ed. de M Le Guern)

« L'expérience m'avait appris que toutes les occurrences les plus fréquentes de la vie ordinaire sont vaines et futiles ; je voyais qu'aucune des choses, qui étaient pour moi cause ou objet de crainte, ne contient rien en soi de bon ni de mauvais, si ce n'est à proportion du mouvement qu'elle excite dans l'âme : je résolus enfin de chercher s'il existait quelque objet qui fût un bien véritable, capable de se communiquer, et par quoi l'âme, renonçant à tout autre, pût être affectée uniquement, un bien dont la découverte et la possession eussent pour fruit une éternité de joie continue et souveraine ».

Baruch de Spinoza, *Traité de la Réforme de l'Entendement*, 1661.

SOMMAIRE

TABLE DES ILLUSTRATIONS.....	12
LISTE DES ABRÉVIATIONS	14
INTRODUCTION.....	17
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	19
Chapitre 1 :	20
Généralités sur le virus d'Epstein-Barr (EBV)	20
1. De 1958 à nos jours : découverte et caractérisation du virus d'Epstein Barr et des pathologies associées.....	21
2. Structure et génome du virus EBV.....	22
3. Protéines virales associées à l'infection latente	25
3.1 Le modèle classique de persistance virale.....	27
3.2 Des protéines exprimées principalement pendant l'infection lytique contribuent à la latence virale.....	28
4. Eléments de l'histoire naturelle de l'infection par le virus EBV	30
4.1 Vue d'ensemble.....	30
4.2 Evènements décrits au cours de la primo-infection	30
4.3 Persistance virale et réactivation	32
Chapitre 2 :	34
La protéine virale ZEBRA	34
1. Découverte de la protéine transactivatrice ZEBRA	35
2. Caractérisation de ZEBRA (Zta, EB1), produit du gène BZLF1 : aspects moléculaires et structuraux	37
3. Régulation de l'initiation de l'infection lytique	42
3.1 Mécanismes de régulation survenant en amont de l'expression du gène BZLF1 ..	42
3.1.1 Voies de signalisation cellulaire associées à l'activation du cycle lytique	42
3.1.2 Régulation transcriptionnelle de l'expression de ZEBRA	45
3.2 Mécanismes de régulation survenant en aval de la transcription du gène BZLF1.	48
3.2.1 Modifications post-traductionnelles de ZEBRA	48
3.2.2 Interaction de ZEBRA avec des protéines cellulaires.....	48
4. Fonctions de la protéine ZEBRA dans le déroulement du cycle viral	50
4.1 Promoteurs viraux activés par ZEBRA et régulation par les protéines virales et cellulaires	50
4.2 ZEBRA et reconnaissance de l'ADN méthylé.....	51

4.3 Résumé : rôle de la méthylation et de ZEBRA dans la régulation du cycle lytique	53
5. Ingérence de ZEBRA dans l'homéostasie cellulaire.....	54
5.1 Régulation du cycle cellulaire et interférence avec les mécanismes d'apoptose ...	56
5.2 Régulation de l'immunité cellulaire.....	57
5.2.1 Inhibition de l'expression des molécules de présentation de l'antigène	58
5.2.2 Interférence avec la synthèse ou les fonctions effectrices de cytokines	58
5.3. ZEBRA et cancers associés à l'EBV.....	60
5.3.1 ZEBRA et maladies lymphoprolifératives associées à l'EBV	60
5.3.2 ZEBRA et carcinome indifférencié du nasopharynx (NPC).....	62
5.3.3 Résumé : rôle de ZEBRA dans l'oncogénèse	63
6. ZEBRA : aspects thérapeutiques.....	64
6.1 Inhibition de ZEBRA	64
6.2 Induction du cycle lytique par ZEBRA dans les cancers associés à l'EBV.....	65
6.3 ZEBRA : protéine transductrice et outil thérapeutique ?	66

Chapitre 3 : 68
Les jonctions serrées : les protéines NACos et interaction jonctions serrées - virus ... 68

Introduction.....	69
1. Organisation moléculaire des jonctions serrées	71
1.1 Vue d'ensemble.....	71
1.2 Les protéines transmembranaires.....	73
1.2.1 Les protéines à 4 domaines transmembranaires.....	73
1.2.2 Les protéines à un seul domaine transmembranaire.....	75
1.2.3 Autres protéines transmembranaires décrites.....	76
1.3 Les protéines de la plaque cytoplasmique.....	76
1.3.1 Les protéines ZO	76
1.3.2 Les autres protéines PDZ	79
1.3.3 Les protéines sans domaine PDZ	79
2. Les protéines NACos (Nuclear and Adhesion Complex components).....	80
2.1 ZO-1 et le facteur de transcription ZONAB.....	80
2.2 ZO-2 et régulation de l'expression des gènes et de la prolifération cellulaires	81
2.3 Symplokinine : régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire.....	82
2.4 HuASH1 et régulation épigénétique	83
2.5 La protéine LYRIC.....	83
3. Interaction des virus avec les protéines des jonctions serrées.....	84
3.1 Virus utilisant les jonctions serrées comme récepteurs.....	84
3.1.1 Interactions avec le récepteur CAR (Coxsackie and Adenovirus Receptor) ..	84
3.1.2 Le virus de l'hépatite C (VHC) et les protéines claudines et occludine	85
3.1.3 Les réovirus et la protéine JAM-A.....	86
3.2 La déstabilisation des jonctions serrées comme instrument de la pathogénèse	87
3.2.1 Exemples des rotavirus, du VIH et des arboviroses.....	87
3.2.2 Les virus oncogènes	88
Conclusion.....	89

RESULTATS	90
Partie I :	91
Caractérisation de l'ubinucléine au niveau des jonctions serrées des cellules	91
1. Introduction : découverte et caractérisation de l'ubinucléine	92
2. Principaux résultats de l'article n°1	92
3. Article n°1 :	94
Partie II :	111
Identification de partenaires cellulaires de l'ubinucléine	111
1. Objectifs de l'article n°2	112
2. Principaux résultats de l'article n°2	112
3. Article n°2	114
4. Résultats complémentaires	139
4.1 Identification des partenaires nucléaires de l'ubinucléine	139
4.2 Mise en évidence du complexe ubinucléine/14-3-3 ϵ /ZEBRA	143
Partie III :	146
Rôle de l'ubinucléine dans la régulation du cycle lytique de l'EBV	146
1. Objectifs de l'article n°3	147
2. Principaux résultats de l'article n°3	147
3. Article n°3	148
DISCUSSION	160
CONCLUSION-PERSPECTIVES	169
REFERENCES	171
ANNEXES.....	190
Annexe 1 : Ensemble des protéines identifiées par GST-pulldown.....	191

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1 : Histoire naturelle et physiopathologie de l'infection à EBV	23
Figure 2 : Le virus EBV et son génome..	26
Figure 3 : Schéma représentant le profil de transcription des gènes viraux en fonction des différentes formes de latence.....	28
Figure 4 : Modèle décrivant <i>in vivo</i> les interactions entre virus EBV et cellules hôte	33
Figure 5 : Séquence de <i>Bam</i> HI WZhet issue d'une recombinaison non homologue et d'une inversion entre la région <i>Bam</i> HI W et <i>Bam</i> HI Z d'un génome EBV classique.	36
Figure 6 : Région des gènes très précoces BZLF1/BRLF1 du génome EBV: structure des ARNm produits dans cette région	38
Figure 7 : Structure schématique de la protéine transactivatrice ZEBRA (EB1).....	39
Figure 8 : Structure du complexe ZEBRA-ADN	41
Figure 9 : Schéma des voies de signalisation les mieux décrites induites par des anti-immunoglobulines (Ig) et impliquées dans l'activation du promoteur du gène BZLF1 dans une lignée lymphoblastoïde	44
Figure 10 : Structure schématique du promoteur du gène BZLF1, pZ	46
Figure 11 : Représentation schématique du rôle de ZEBRA dans le développement tumoral	64
Figure 12 : Les jonctions intercellulaires des cellules épithéliales.	70
Figure 13 : Organisation structurale des jonctions serrées.....	72
Figure 14 : Représentation schématique des principales protéines transmembranaires des jonctions serrées..	73
Figure 15 : La plaque cytoplasmique des jonctions serrées..	77
Figure 16 : Marquage de l'ubiquitine dans les cellules C666-1	94
Figure 17 : Stratégie d'identification des partenaires de l'ubiquitine (Ubn) par une technique de GST-pulldown couplée à une analyse en spectrométrie de masse (MS).....	113
Figure 18 : Surexpression de l'ubiquitine dans les HEK 293.....	139
Figure 19 : Représentation schématique de l'interactome de l'ubiquitine nucléaire.....	140

Figure 20: Immunoprécipitation de l'ubiquitine dans les cellules HT29	143
Figure 21 : Interaction entre l'ubiquitine et 14-3-3ε.....	144
Figure 22: Interaction entre l'ubiquitine, ZEBRA et 14-3-3ε.....	145
Figure 23: Modèle d'épithélium oropharyngé infecté par l'EBV	170

Tableaux

Tableau I : Cancers associés à l'EBV chez l'immunocompétent et l'immunodéprimé	24
Tableau II : Liste des gènes cellulaires régulés par ZEBRA ou des protéines cellulaires interagissant avec ZEBRA	55
Tableau III : Partenaires nucléaires de l'ubiquitine identifiés par spectrométrie de masse	141
Tableau IV : Protéines identifiées conjointement dans les cellules transfectées et non transfectées (contrôle négatif)	142

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AP-1	activator protein 1
aPKC	activated PKC
ASH	absent, small or homeotic discs
ATF	activating transcription factor
ATM	ataxia telangiectasia mutated
BA	acide butyrique
BART	<i>BamHI</i> rightward transcripts
BCR	B cell receptor
BR	région basique
Bves	blood vessel epicardial substance
bZIP	basic/leucine zipper
CaMKIV	kinase calcium-calmoduline dépendante
CAR	coxsackie and adenovirus receptor
CBP	CREB binding protein
CG	centre germinatif
CEBP	CCAAT/enhancer binding protein
CK2	casein kinase 2
CRB3	crumbs homologue3
CREB	cyclic AMP response element binding protein
CsA	ciclosporine A
CVB	coxsachievirus B
CT	C-terminale
DBD	domaine de liaison et de dimérisation à l'ADN
DIAG	diacyglycérol
EA	early antigen
EBER	EBV-encoded small non polyadenylated RNA
EBV	virus d'Epstein-Barr
EBNA-1	Epstein-Barr nuclear antigen
EGF	epidermal growth factor
Egr-1	early growth response
ERK	extracellular signal regulated kinase
GEF-H1	guanine nucleotide exchange factor
GUK	guanylate kinase
HDAC	histones déacétylases

HEK	human embryonic kidney
HHV	human herpes virus
hnRNP	heterogeneous ribonucleoproteins
HPV	human papillomavirus
HSF	heat shock inducible transcription factor
HSP	heat shock protein
IFN	interféron
IP	immunoprécipitation
IP3	inositol 1,4,5-triphosphate
IQGAP1	IQ motif containing GTPase activating protein 1
IR	internal repeat
JAM	junctional adhesion molecule
JNK	c-jun N-terminal kinase
LCL	lymphoblastoid cell lines
LMP	latent membran proteins
LYRIC	lysine rich CEACAM1 associated protein
MACF1	microtubule actin crosslinking factor
MAGI	MAGUK with inverted domain structure
MAGUK	membrane associated guanylate cyclase
MAPK	mitogen activated protein kinase
MDCK	Madin Darby canine kidney
MEF2	myocyte enhancer factor 2
MMP	matrice metalloprotease
MNI	mononucléose infectieuse
MS	spectrométrie de masse
mtSSB	mitochondrial single-strand DNA binding protein
MUPP1	multi-PDZ protein
NACos	nuclear and adhesion complex components
NFAT	nuclear factor of activated T cell
NF-κB	nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells
NLS	signaux de localisation nucléaire
NPC	carcinome indifférencié du nasopharynx
ORF	open reading frame
Pals	proteins associated with Lin-7
PAR	partitioning defective
PATJ	tight junction associated multi-PDZ protein

PDZ	post synaptic density protein (PSD95) / <i>Drosophila</i> disc large tumor suppressor (DlgA)/ <i>zonula occludens</i> 1 (ZO-1)
PFA	paraformaldéhyde
PI3-K	phosphatidylinositol 3-kinase
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
PLZF	promyelocytic leukaemia zinc finger
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RACK-1	receptor for activated C-kinase
RAR	récepteur de l'acide rétinoïque
SAF-B	scaffold attachment factor B
SCID	severe combined immunodeficiency
SH3	Src homology 3
STAT	signal transducers and activators of transcription protein
SV 40	simian virus 40
TFIID	transcription factor II D
TGF	transforming growth factor
TNF	tumour necrosis factor
TORC	transduced of activated CREB
TPA	12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate
TR	terminal repeat
TSA	trichostatine A
Ubn-1	ubinucléine
VCA	viral capsid entigen
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHC	virus de l'hépatite C
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
VPA	acide valproïque
WNV	virus West Nile
XBP-1	X-box binding protein 1
YB-1	Y box factor 1/DNA binding protein B
ZEB	zinc finger E-box binding protein
ZEBRA	Z Epstein-Barr replication activator
ZO	<i>zonula occludens</i>
ZONAB/DbpA	ZO-1 associated nucleic acid binding protein/DNA binding protein
ZRE	Z responsive elements

INTRODUCTION

Ce travail de thèse s'est effectué au sein du laboratoire UVHCI (Unit of Virus Host Cell Interactions) dont la thématique générale est l'étude des interactions entre les virus et la cellule hôte infectée. Le groupe que j'ai intégré étudie depuis plusieurs années le virus d'Epstein-Barr (EBV) sur le plan structural et cellulaire.

Le virus EBV est un virus ubiquitaire qui infecte plus de 95% de la population adulte. La primo-infection, si elle est symptomatique, est responsable de la mononucléose infectieuse. Le virus EBV est aussi un virus oncogène associé à diverses pathologies malignes telles que certains lymphomes ou le cancer indifférencié du nasopharynx (NPC). Le cycle viral de l'EBV est caractérisé par 2 modes d'infection : une infection latente qui permet la persistance du virus dans l'organisme et une infection lytique qui aboutit à la production de nouveaux virus capables d'infecter de nouveaux hôtes.

L'infection lytique de l'EBV est initiée par le transactivateur viral ZEBRA (également appelé EB1, Zta, Z ou BZLF1) qui joue un rôle déterminant dans l'activation des gènes très précoces et précoces du virus et la réplication virale. Cette protéine virale interfère aussi avec l'homéostasie cellulaire en interagissant avec des protéines ou des promoteurs de la cellule. Les mécanismes cellulaires régulant le passage de l'infection latente à l'infection lytique ne sont pas clairement élucidés mais pourraient dépendre de facteurs cellulaires interférant avec la synthèse ou l'activité de ZEBRA. En 2000, un nouveau partenaire cellulaire de ZEBRA, la protéine ubinucléine, a été identifié par l'équipe actuellement dirigée par le Dr Evelyne Manet de Lyon (INSERM U758-ENSL) et avec laquelle notre groupe est en collaboration. L'ubinucléine a été décrite initialement comme une protéine exprimée dans de nombreux tissus et localisée au niveau du noyau des cellules. Ces fonctions au niveau cellulaire et dans le cycle viral par son interaction avec ZEBRA demeurent largement inconnues.

L'objectif de ce travail de thèse a été de mieux caractériser l'ubinucléine et de comprendre son rôle au niveau cellulaire et dans le cycle viral de l'EBV. La partie bibliographique de cette thèse est composée de 3 chapitres. Le premier chapitre traite des principales caractéristiques de l'infection par le virus EBV. Le second chapitre porte sur la protéine ZEBRA et ses différentes fonctions au niveau viral et cellulaire. Le troisième chapitre que nous avons voulu intégrer de manière originale, a été écrit en vue de préparer le lecteur aux résultats qui ont été obtenus sur l'ubinucléine. Ce dernier chapitre traitera des jonctions serrées des cellules, nouvelle localisation de l'ubinucléine décrite dans ma thèse. Le

travail expérimental sera présenté sous forme d'articles. Le premier article porte sur la caractérisation nouvelle de l'ubinucléine au niveau des jonctions serrées des cellules. Le second article présente une approche protéomique par spectrométrie de masse visant à identifier des nouvelles protéines partenaires de l'ubinucléine. Le 3^{ème} article étudie l'aspect fonctionnel de l'ubinucléine sur le plan viral et sa capacité à moduler l'activité de ZEBRA et le cycle lytique du virus EBV en fonction de sa localisation cellulaire. Enfin, dans une dernière partie, nous discuterons de l'ensemble des résultats et le rôle de cette protéine dans la cellule infectée ou non par le virus EBV.

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 :

Généralités sur le virus d'Epstein-Barr (EBV)

1. De 1958 à nos jours : découverte et caractérisation du virus d'Epstein Barr et des pathologies associées

En 1958, Denis Burkitt décrit pour la première fois des cas de tumeur lymphoïde de la mâchoire chez des enfants ougandais. En 1961, Burkitt expose à Londres ses observations sur ce nouveau lymphome qu'il qualifie comme « le cancer le plus répandu chez les enfants en Afrique tropicale ». En rapportant une répartition géographique particulière de ces cas de lymphomes en Afrique (« the lymphoma belt », la ceinture des lymphomes), il envisage le rôle d'un agent infectieux comme responsable de la maladie (Burkitt, 1962). Le virologue Michael Anthony Epstein, interpellé par les travaux de Burkitt et l'évidence de cofacteurs climatiques associés à la maladie, suggère l'étiologie d'un virus oncogène qui serait transmis par un arthropode vecteur. En 1964, l'équipe du laboratoire d'Epstein, comprenant Achong et Barr, réussit à mettre en évidence par microscopie électronique un virus de type herpès dans les lignées cellulaires obtenues à partir des biopsies de lymphomes données par Burkitt (Epstein et al., 1964). Devant le scepticisme d'une partie de la communauté scientifique, Epstein fait appel aux compétences de Werner et Gertrude Henle qui apportent la preuve antigénique du caractère distinct de ce virus par rapport aux autres herpèsvirus déjà connus à cette époque : ils nomment alors ce nouveau virus, mis en évidence dans les lignées EB dérivées de lymphome de Burkitt, « virus d'Epstein-Barr » (EBV). A partir de 1966, l'équipe de Henle, en utilisant comme source d'antigènes les virions produits à partir de ces lignées lymphoïdes, montre que les individus atteints de lymphomes de Burkitt, mais aussi la plupart des individus sans lymphomes, possèdent des anticorps vis-à-vis du virus EBV. En 1968, alors que l'équipe de Henle essaie d'établir un lien entre l'EBV et d'autres pathologies, en criblant des sérums de nombreux malades, est suspecté, suite à une séroconversion chez une technicienne du laboratoire, une relation entre la mononucléose infectieuse (MNI) et la primo-infection à EBV. Une étude sérologique rétrospective menée chez des étudiants de l'Université de Yale ayant eu une MNI, confirmera que l'EBV est l'agent responsable de cette maladie (Epstein, 2001; Henle et al., 1968). Les recherches effectués par les « pionniers de l'EBV » dans les années 70 permettront également la mise en évidence d'une des propriétés fondamentales de l'EBV : sa capacité à faire proliférer indéfiniment des lymphocytes B *in vitro* à travers l'établissement de lignées cellulaires continues (lignées lymphoblastoïdes). C'est également à cette époque que le virus fut associé à un autre cancer, cette fois-ci développé aux dépens du tissu épithélial : le carcinome indifférencié du cavum.

Aujourd'hui, l'infection à virus EBV est considérée comme un modèle bien spécifique au sein des infections à herpes virus humain. En effet, c'est à la fois une infection ubiquitaire, le plus souvent asymptomatique, touchant plus de 95 % de la population mondiale mais c'est également une infection virale persistante associée à des cancers chez des individus immunocompétents ou immunodéprimés. Bien que moins évidente que pour les pathologies malignes, l'association de l'EBV à d'autres pathologies chroniques auto-immunes ou dégénératives est également souvent rapportée (Salveti et al., 2009 ; Niller et al., 2008). Depuis la découverte du virus, il existe une recherche fondamentale et médicale intense pour comprendre les mécanismes liés à ce caractère asymptomatique ou non de l'infection virale. Du point de vue médical, cette recherche a abouti à des tests diagnostiques performants et, dans une moindre mesure, à des stratégies antivirales capables de lutter contre les conséquences délétères de l'infection virale : ces aspects ne seront pas développés dans ce manuscrit. L'histoire naturelle et les pathologies associées à l'EBV sont schématisées, respectivement, dans la **Figure 1** et le **Tableau I**.

2. Structure et génome du virus EBV

Le virus EBV ou HHV-4 (human herpes virus type 4) appartient à la famille des *Herpesviridae*, sous famille des *Gammaherpesvirinae*, genre *Lymphocryptovirus*. Les virus classés dans cette famille possèdent une étroite communauté de structure portant sur 4 éléments : un génome ADN double brin, une capsidie icosaédrique, une structure fibrillaire formant le tégument et une enveloppe portant des glycoprotéines virales (**Figure 2A**) (Kieff and Rickinson, 2007). Parmi les glycoprotéines de l'EBV, la gp350/220 permet l'attachement du virion à la surface de la cellule hôte (lymphocytes B) par interaction avec le récepteur CR2 (CD21) du complément (Szakonyi et al., 2006).

Le génome de l'EBV est contenu dans la nucléocapsidie et est constitué d'un ADN bicaténaire de 172 kbp (souche B 95.8), comprenant des séquences terminales répétées de petite taille (TR), ainsi que des séquences répétées internes (IR) (Kieff and Rickinson, 2007) (**Figure 2B, C**). Le génome de l'EBV est linéaire dans la particule virale infectieuse. Quand l'EBV infecte une cellule hôte, son génome est circularisé grâce aux séquences TR et forme alors un épisome qui se lie étroitement à la chromatine cellulaire. Le nombre de séquences TR est un marqueur de l'homogénéité ou de l'hétérogénéité de la population virale et cellulaire présente dans un tissu infecté (Kieff and Rickinson, 2007).

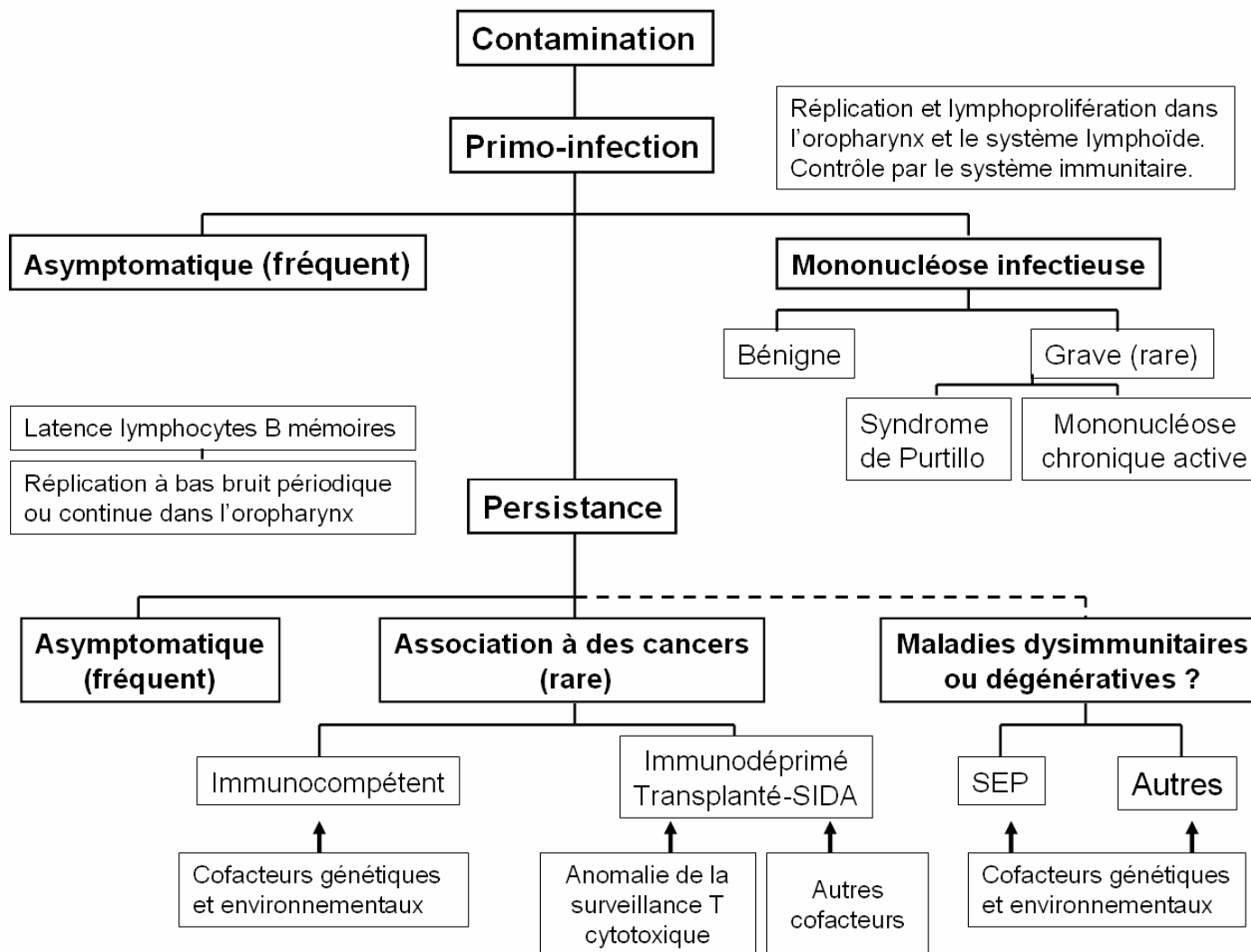


Figure 1 : Histoire naturelle et physiopathologie de l'infection à EBV (SEP : sclérose en plaques).

Cancers	Sous-type	Type de latence	Association à l'EBV (%)
Lymphome de Burkitt	Endémique	Latence I	> 95
	Sporadique		15-85
Lymphome de Hodgkin	Déplétion lymphocytaire	Latence II	> 95
	Cellularité mixte	Latence II	70
	Scléronodulaire		20-40
	Prédominance lymphocytaire		<5
Lymphome non Hodgkinien	Nasal T/NK	Latence II	> 90
	Angioimmunoblastique	Latence II	
Syndrome lymphoprolifératif post-transplantation*		Latence III	> 90
Lymphomes associés au SIDA*	Cérébraux primitifs	Latence III	> 95
	Autres		30-50
Carcinome du nasopharynx	Indifférencié	Latence II	> 95
Léiomyosarcome de l'immunodéprimé		?	Fréquente
Cancer gastrique	Type lympho-épithélial	Latence I/II	> 90
	Adénocarcinome		5-15
Cancer du sein	Carcinome médullaire		0-50
	Adénocarcinome		

Tableau I : Cancers associés à l'EBV chez l'immunocompétent et l'immunodéprimé (* d'autres situations cliniques d'immunodépression pouvant favoriser la survenue d'un lymphome sont décrites telles que, par exemple, les patients atteints d'un déficit congénital de l'immunité ou sous traitement immunosuppresseur ; d'après Rickinson and Kieff, 2007).

Deux origines de réplication sont décrites. L'origine de réplication latente *OriP* permet au virus de se maintenir sous forme d'épisome dans la cellule hôte au cours des divisions cellulaires. La protéine virale EBNA-1 joue un rôle primordial dans le mécanisme de ségrégation de l'ADN viral pendant la mitose (Nanbo et al., 2007). L'origine de réplication lytique *OriLyt* (2 séquences) est fonctionnelle durant la réplication virale.

Le génome de l'EBV a été cloné et séquencé à partir de la souche B95.8 après digestion par l'enzyme de restriction *BamHI*. Une centaine de cadres ouverts de lecture (ORF, Open Reading Frame) ont été identifiés et répertoriés suivant la taille des fragments obtenus après digestion enzymatique et le sens de leur transcription (**Figure 2D**).

3. Protéines virales associées à l'infection latente

L'essentiel des connaissances acquises sur le cycle biologique de l'EBV provient d'expériences conduites sur des lignées cellulaires continues. Dans la majorité des cas, il s'agit de lignées cellulaires B dérivant de tumeurs (lignées lymphomateuses) ou de lignées lymphoblastoïdes établies à partir de lymphocytes B non tumoraux. En comparaison avec les cellules B, l'infection des cellules épithéliales est plus difficile à obtenir *in vitro* malgré de réelles avancées dans le domaine (Shannon-Lowe et al., 2006; Turk et al., 2006). D'une manière générale, le cycle viral de l'EBV se distingue par une infection latente associée à la persistance du virus dans les cellules, et par une infection lytique qui conduit à la lyse de la cellule infectée et à la production de nouveaux virus. Classiquement, le pouvoir oncogène de l'EBV est attribué aux propriétés immortalisantes et/ou transformantes de protéines virales exprimées pendant l'infection latente. Cependant de récentes études ont montré que des protéines dont l'expression est communément décrite au cours de l'infection lytique pourraient jouer un rôle important dans les premiers stades de l'infection et l'établissement de l'infection latente. Ces nouvelles données suggèrent qu'établir une distinction trop formelle entre infection latente et infection lytique paraît trop simpliste.

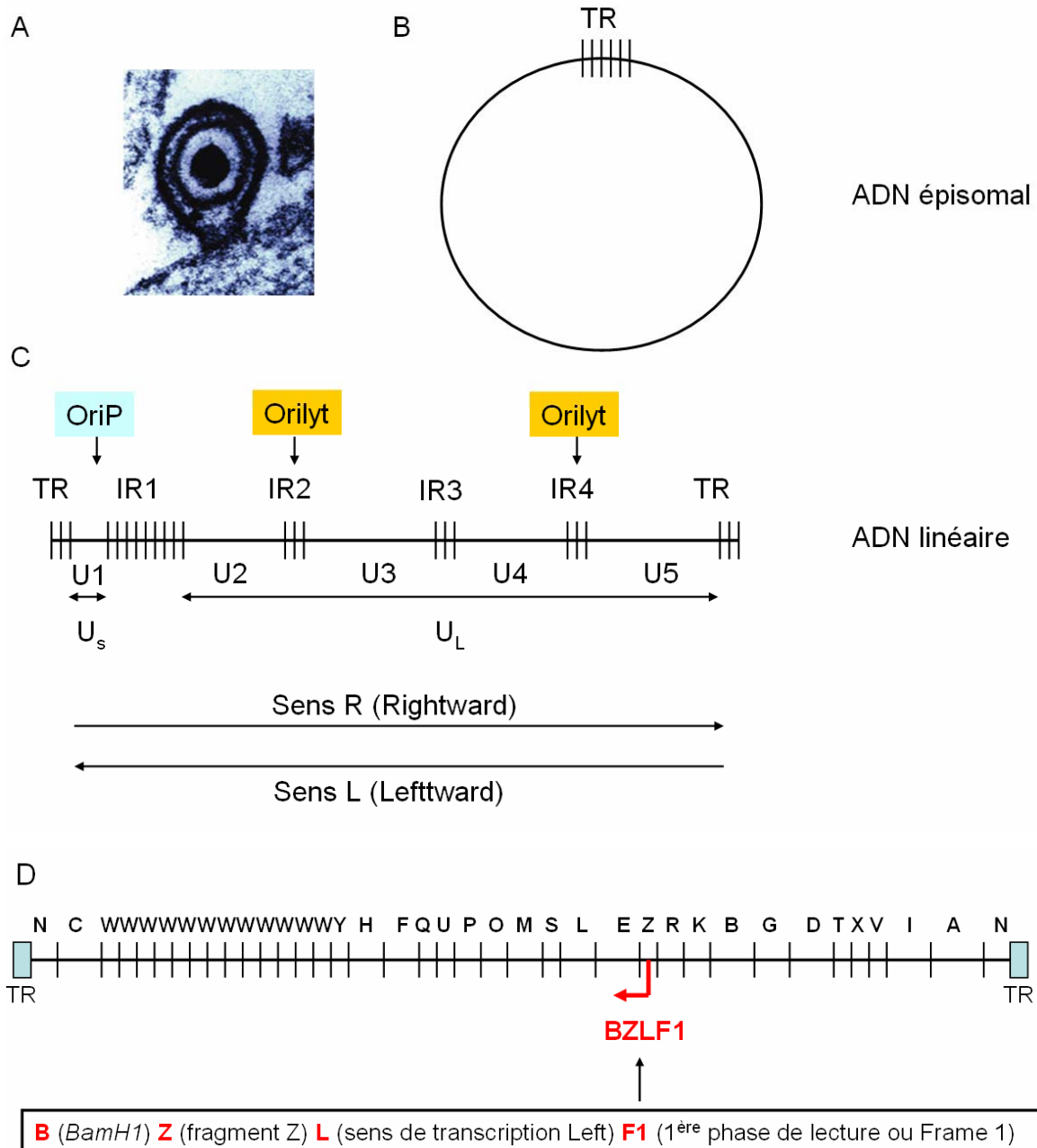


Figure 2: Le virus EBV et son génome. Photographie en microscopie électronique d'un virion EBV (A) (Young et al., 2004) et représentation schématique du génome viral sous forme épisomale (B) ou sous forme linéaire (C) avec la carte de restriction obtenue après digestion enzymatique par *Bam*HI (D). Le génome de l'EBV est constitué de séquences terminales répétées de 0,5 kpb (TR, terminal repeat) et de séquences répétées internes (IR1 à IR4, internal repeat). IR1 (3kpb) divise le génome en 2 régions uniques, une région courte U_s (short unique region) et une région longue U_L (long unique region) comprenant les régions U2 à U5. (D) Les gènes de l'EBV sont annotés par ordre alphabétique de A à Z suivant la taille des fragments générés après digestion par *Bam*HI (A étant le plus grand fragment). D'autre part, cette nomenclature prend en compte l'orientation de la transcription des gènes. Deux sens de lecture ont été arbitrairement choisis: le sens U1 à U5 (de gauche à droite) correspond au sens R (Rightward) et l'inverse (U5 à U1) correspond au sens L (Leftward). La phase de lecture utilisée est aussi indiquée dans l'annotation (Frame).

3.1 Le modèle classique de persistance virale

Le virus EBV persiste chez l'hôte en maintenant deux formes d'infection, latente et lytique (productive). Au niveau cellulaire, la latence virale est associée à l'expression d'un nombre limité de protéines, à la persistance du génome viral malgré les divisions cellulaires et à l'absence de production de particules virales. Au cours de l'infection latente, seuls quelques gènes viraux sont transcrits : les protéines EBNA (Epstein Barr Nuclear Antigen), les protéines LMP (Latent Membrane Protein), les ARN EBERs (EBV-encoded small nonpolyadenylated RNAs), les ARN BARTs (*BamHI* A Rightward Transcripts) et des miARNs (**Figure 3**). Actuellement, 25 gènes codant pour 39 miARNs ont été dénombrés, ceux-ci étant localisés au niveau des gènes BHRF1 et BART (Boss et al., 2009). En fonction des protéines exprimées *in vitro* et *ex vivo*, 4 types de latence ont été décrits. Le profil de latence est associé à une utilisation préférentielle de 3 principaux promoteurs viraux (Qp, Cp et Wp) régulés par la méthylation du génome viral. Dans la latence de type 0 ou latence «vraie», retrouvée *in vivo* dans les lymphocytes B mémoires infectés, aucune protéine virale n'est détectée. La latence de type III est associée à l'expression de 6 protéines nucléaires EBNA (EBNA-LP, EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B et EBNA3C) et de 3 protéines membranaires LMPs (LMP1, LMP2A, LMP2B). La latence de type III est retrouvée *in vitro* dans les LCLs et dans certaines situations cliniques (MNI, syndrome prolifératif post-transplantation). Les ARN EBERs, BARTs et les miARN sont détectés dans presque tous les types de latence (dans la latence 0, la présence des ARN BARTs et des miARNs est suggérée mais pas encore confirmée). Entre la latence 0 et III, d'autres formes de latence sont décrites et associées à des pathologies malignes de l'EBV, d'origine lymphoïde ou épithéliale (**Figure 3**) (Kieff and Rickinson, 2007).

Les fonctions des protéines et transcrits produits au cours de la latence virale ne seront pas traitées dans le manuscrit. Leur rôle dans la pathogénie des cancers associés à l'EBV est sans conteste établi (se référer aux revues (Pattle and Farrell, 2006; Thorley-Lawson and Allday, 2008; Young and Rickinson, 2004)). De récentes études ont montré que des miARNs codés par l'EBV pouvaient aussi jouer un rôle dans l'oncogénèse en ciblant des ARNm viraux (rôle de LMP1 dans la sensibilité à l'apoptose) (Lo et al., 2007) ou cellulaires (miR-BART5 altérant la transcription du gène pro-apoptotique PUMA) (Choy et al., 2008).

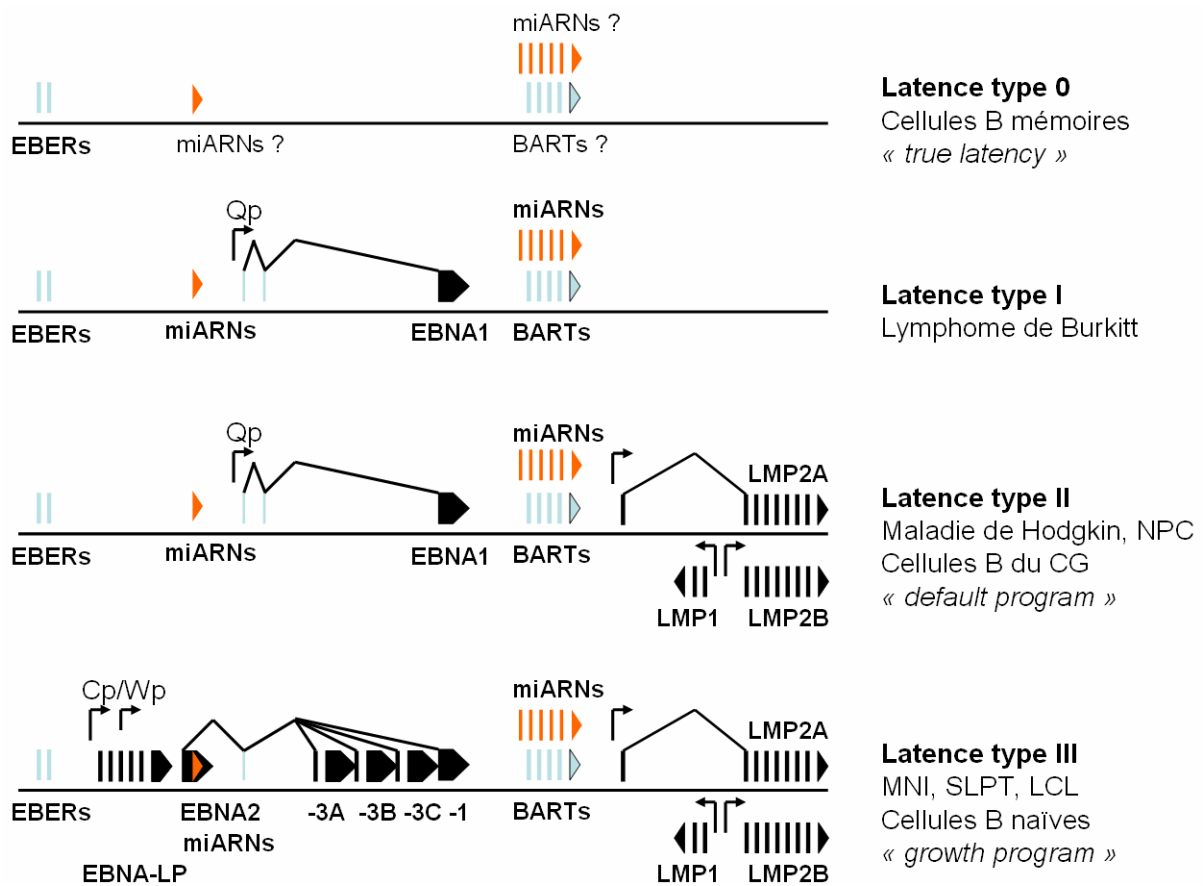


Figure 3: Schéma représentant le profil de transcription des gènes viraux en fonction des différentes formes de latence (adapté de Kieff and Rickinson, 2007). En bleu, sont représentés les ARN EBERs et BARTs non codants. En orange, sont indiqués les miARNs de l'EBV et en noir, les ARN codant pour les protéines de latence. Les principales maladies associées aux différents types de latence sont décrites. NPC, carcinome indifférencié du nasopharynx; CG, centre germinatif; MNI, mononucléose infectieuse; SLPT, syndrome lymphoprolifératif post-transplantation; LCL, lignée lymphoblastoïde.

3.2 Des protéines exprimées principalement pendant l'infection lytique contribuent à la latence virale

L'infection lytique conduit à l'expression d'un nombre important de protéines (> 80) et aboutit à la production de particules virales capables d'infecter de nouvelles cellules. Cette phase permet ainsi au virus de renouveler son pool de cellules infectées. De récentes études suggèrent que certaines protéines, caractérisées jusqu'à maintenant principalement au cours de l'infection lytique, pourraient aussi être exprimées dans des cellules infectées de manière latente ou participer à l'établissement de la latence par leur effet sur la prolifération cellulaire.

Actuellement, les protéines ZEBRA (transactivateur appelé aussi EB1, Zta, Z ou BZLF1), BCRF1 ou vIL-10 (analogue de la protéine cellulaire IL-10) puis BHRF1 et BALF1 (toutes deux homologues de la protéine cellulaire Bcl-2) sont supposées jouer un rôle, à la fois au niveau du cycle lytique, mais aussi au cours de l'infection latente. Au premier stade de l'infection par l'EBV, étudié *in vitro* lors de l'établissement des LCLs, la protéine ZEBRA est exprimée très précocement au cours d'une infection lytique productive ou abortive, ce dernier aspect étant controversé suivant les études (Halder et al., 2009; Kalla et al., 2009). Le rôle de ZEBRA dans l'établissement de la lignée et la latence virale a été fortement suggéré en montrant que la prolifération cellulaire induite par des souches EBV KO-BZLF1 était beaucoup moins importante que celle observée avec des souches sauvages (Kalla et al., 2009). Les implications de ZEBRA dans la pathogénie des cancers seront largement abordées dans le chapitre suivant. La protéine BCRF1, homologue cellulaire de l'IL-10, est considérée depuis quelques années comme une protéine ambivalente associée aussi à la latence virale et à la prolifération cellulaire (Mahot et al., 2003; Miyazaki et al., 1993). Les protéines BALF1 et BHRF1 sont des homologues de la protéine cellulaire anti-apoptotique Bcl-2. Ces 2 protéines sont exprimées à un stade précoce après infection des cellules B et semblent jouer un rôle essentiel dans les mécanismes d'échappement cellulaire à l'apoptose. Leur expression semble indépendante du cycle lytique (Altmann and Hammerschmidt, 2005). Récemment, la régulation de l'expression du gène BHRF1 a été étudiée à partir de lignées de lymphome de Burkitt. Dans ces lignées, l'expression de BHRF1 est détectée et dépendrait de l'activation du promoteur Wp qui est associé à la régulation des gènes latents. Dans les LCLs, BHRF1 est aussi exprimée de manière constitutive comme une protéine latente à partir de ce promoteur (Kelly et al., 2009).

L'expression de protéines du cycle lytique dans des modèles cellulaires associés à la latence virale ou *ex vivo* dans des pathologies malignes de l'EBV semble indiquer qu'une infection lytique productive ou abortive peut survenir dans une population minoritaire de cellules parmi un ensemble de cellules infectées majoritairement de manière latente (voir chapitre suivant et référence Kenney, 2006). Les travaux menés sur la régulation de l'expression de la protéine BHRF1 apportent un nouveau regard sur la distinction entre infection lytique et infection latente dans un ensemble hétérogène de cellules. Certains gènes initialement décrits comme gènes lytiques pourraient être exprimés indépendamment de l'infection lytique et être considérés comme gènes latents en fonction du stade de l'infection *in vivo* et de l'état de régulation de la cellule. Dans un modèle d'infection précoce de cellules épithéliales, l'analyse de l'expression des protéines virales par immunofluorescence montre

que certaines cellules peuvent exprimer à la fois la protéine ZEBRA et des protéines de latence suggérant, d'après les auteurs, la présence d'un cycle lytique abortif (Shannon-Lowe et al., 2009). Un modèle séparant de manière trop restrictive infection latente et infection lytique semble désormais dépassé pour expliquer et décrire les différents états transitoires survenant dans une cellule infectée par l'EBV (Thorley-Lawson et al., 2008).

4. Eléments de l'histoire naturelle de l'infection par le virus EBV

4.1 Vue d'ensemble

La plupart des individus sont infectés par le virus EBV comme en témoigne la séroprévalence élevée vis-à-vis de cet agent infectieux dans la population humaine adulte (> 95%). La primo-infection est souvent asymptomatique mais peut entraîner chez l'adolescent ou l'adulte jeune une mononucléose infectieuse. Le virus persiste ensuite dans l'organisme toute la vie à l'état latent dans les lymphocytes B mémoires mais peut se réactiver de manière intermittente et initier un cycle lytique qui aboutit à la production de nouvelles particules virales capables d'infecter aussi un autre type cellulaire, les cellules épithéliales de l'oropharynx. La multiplication de l'EBV au niveau de la sphère oropharyngée entraîne le relargage de virions dans la salive permettant ainsi la transmission interhumaine du virus. Pendant toutes les phases du cycle biologique de l'EBV, la pression immunitaire de l'hôte assure le contrôle de l'infection (Rickinson and Kieff, 2007).

4.2 Evènements décrits au cours de la primo-infection

La nature des premières cellules cibles infectées par l'EBV a largement été débattue. Le modèle actuel suggère que le virus EBV infecte d'abord les lymphocytes B situés dans les cryptes de l'épithélium oropharyngé (anneau de Waldeyer) puis gagnerait les cellules épithéliales grâce à un transfert direct depuis la membrane du lymphocyte B. Ce mécanisme met en jeu un contact étroit ou « synapse » entre le virus resté fixé à la surface de la membrane cellulaire du lymphocyte B et non internalisé, et la cellule épithéliale. L'infection des cellules épithéliales serait facilitée quand le virus est déjà fixé au lymphocyte B par sa

gp350/220 : cette fixation préalable rendrait plus accessible d'autres ligands du virus à un récepteur de la membrane de la cellule épithéliale (Bornkamm et al., 2006; Shannon-Lowe et al., 2006; Turk et al., 2006). Les mécanismes d'entrée du virus dans la cellule épithéliale ne sont pas encore clairement établis mais différent de ceux décrits pour le lymphocyte B (se référer à la revue (Hutt-Fletcher, 2007)). Des travaux récents suggèrent l'importance de l'interaction entre la glycoprotéine BMRF2 du virus et la β 1-intégrine des cellules épithéliales dans l'infection et la propagation basolatérale du virus de cellules à cellules (Tugizov et al., 2003; Xiao et al., 2008; Xiao et al., 2009). Chez le sujet sain, les cellules épithéliales ne semblent pas être un site où le virus établit une infection latente mais un site d'amplification de la production virale dans la salive qui peut se maintenir pendant une longue période (Fafi-Kremer et al., 2005; Hadinoto et al., 2009).

La première phase de l'infection est caractérisée par une infection lytique dont le siège est le tissu lymphoépithélial de l'oropharynx. Durant cette phase, la réponse immune de l'hôte est forte et sollicite des lymphocytes T CD8+ dirigés principalement contre des antigènes du cycle lytique (Hislop et al., 2007). De manière concomitante, le virus établit une infection latente dans des cellules B de la muqueuse qui peuvent être soit des lymphocytes B naïfs, soit des lymphocytes B mémoires selon le modèle proposé (Thorley-Lawson and Gross, 2004; Young and Rickinson, 2004). Les études menées par l'équipe de Thorley-Lawson suggèrent que le lymphocyte B naïf infecté par l'EBV suit la même voie de différenciation cellulaire que celle qu'emprunte, de manière physiologique, un lymphocyte B activé après sa rencontre avec l'antigène. Après infection du lymphocyte B naïf au niveau des cryptes de l'anneau de Waldeyer (périphérie d'un follicule), le virus induit la prolifération cellulaire du lymphocyte B qui est transformé en lymphoblaste. Cette étape transitoire est associée à l'expression de protéines virales définissant une latence de type III et correspondant au programme de prolifération cellulaire. Les lymphoblastes migrent ensuite dans le centre germinatif du follicule pour être différenciés en cellules B mémoires exprimant les protéines virales caractérisant la latence de type II (programme en défaut). Enfin, les cellules B mémoires sortent du centre germinatif pour gagner la circulation sanguine et les tissus lymphoïdes secondaires. Ces cellules qui n'expriment pas de protéines (latence vraie) ne sont pas ciblées par le système immunitaire et représentent le site de persistance du virus. Dans chacune des phases décrites, les protéines virales exprimées interfèrent avec les mécanismes de régulation et de différenciation de la cellule pour permettre au virus EBV d'atteindre son site de persistance (**Figure 4**) (Thorley-Lawson, 2005).

4.3 Persistance virale et réactivation

Les cellules B mémoires sont le siège de la persistance virale et sont caractérisées par une latence de type 0/I suivant l'expression de la protéine EBNA-1. Lors de la division physiologique d'une cellule B mémoire (non programmée par le virus), EBNA-1 permet la ségrégation du génome viral dans chacune des cellules filles formées. A la résolution de l'infection, le virus EBV persiste dans les cellules B mémoires à raison d'une cellule infectée sur 100 000 (Thorley-Lawson, 2005).

Les cellules B mémoires circulent dans le sang et les tissus lymphoïdes secondaires dont ceux associés à l'oropharynx (anneau de Waldeyer). A la faveur d'une stimulation antigénique, le lymphocyte B mémoire infecté reçoit un signal de différenciation cellulaire et se transforme en plasmocytes. La différenciation cellulaire induit la réactivation du cycle lytique de l'EBV dont les virions néosynthétisés infectent d'autres lymphocytes B (naïfs ou mémoires) et les cellules épithéliales de l'oropharynx (**Figure 4**) (Laichalk and Thorley-Lawson, 2005; Thorley-Lawson, 2005). La réplication virale survient au niveau des cellules les plus différenciées de l'épithélium oropharyngé (stratum spinosum et stratum granulosum) (Young et al., 1991). De récentes études suggèrent le rôle des monocytes-macrophages et des cellules de Langerhans comme hôtes intermédiaires permettant au virus EBV d'accéder aux couches superficielles de l'épithélium afin d'y établir son infection lytique (Tugizov et al., 2007; Walling et al., 2007). Les cellules épithéliales sont le siège d'une intense réplication virale maintenant une excrétion périodique ou durable du virus dans la salive (Hadinoto et al., 2009).

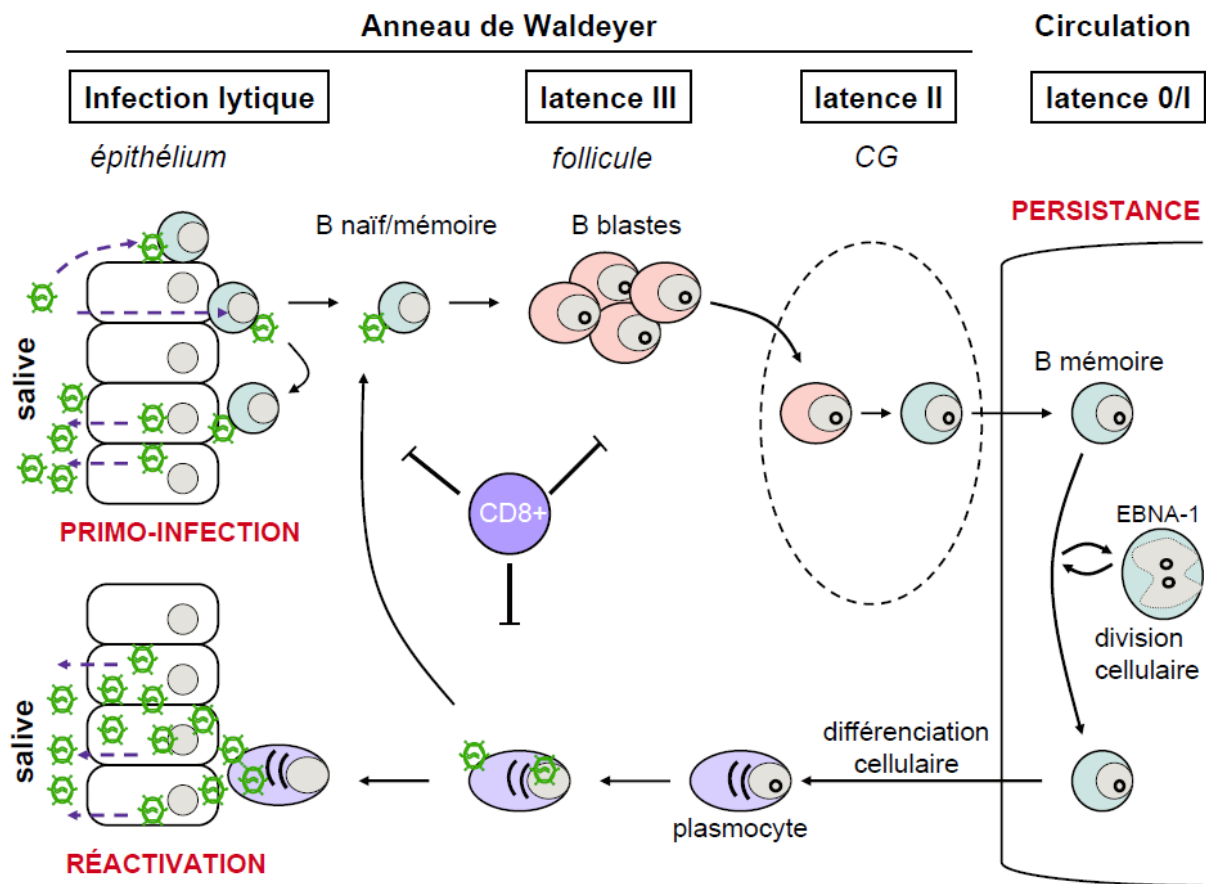


Figure 4: Modèle décrivant *in vivo* les interactions entre virus EBV et cellules hôtes. Lors de la primo-infection, le virus transmis à partir de la salive, infecte un lymphocyte B naïf ou mémoire du tissu lymphoépithélial oropharyngé soit directement, soit après passage à travers une cellule épithéliale (transcytose). Le virus est ensuite transféré à la cellule épithéliale grâce au lymphocyte B puis y établit une infection lytique avec relargage de virions dans la salive. De manière parallèle, le virus établit une infection latente dans le lymphocyte B qui se transforme en lymphoblaste (latence III) à la périphérie du follicule. Le blaste gagne ensuite le centre germinatif (CG) où il se différencie en lymphocyte B mémoire (latence II). La cellule B mémoire part dans la circulation sanguine et dans les organes lymphoïdes secondaires: cette cellule n'exprime pas de protéines (latence 0) sauf lors d'une division cellulaire physiologique (latence I, EBNA-1) et représente le site de persistance du virus EBV. Lors d'une stimulation antigénique, la cellule B mémoire se différencie en plasmocyte provoquant la réactivation du virus et l'initiation du cycle lytique. Les virions produits peuvent infecter des lymphocytes B naïfs ou mémoires ou les cellules épithéliales de l'oropharynx où l'infection lytique est entretenue et amplifiée avec excrétion de virus dans la salive. La réponse immunitaire de l'hôte (en particulier les lymphocytes T CD8+), permet de contrôler l'infection à presque tous ses stades hormis lors de la phase de latence 0 (schéma adapté de Thorley-Lawson et al., 2004).

Chapitre 2 :

La protéine virale ZEBRA

Introduction

Pour persister à long terme dans l'organisme, le virus EBV, présent à l'état latent dans les lymphocytes B mémoires, doit se réactiver et engager un cycle lytique qui aboutit, lorsqu'il est complet, à la production de nouvelles particules virales capables d'infecter de nouvelles cellules et de nouveaux hôtes. Le premier évènement qui survient au début du cycle lytique est la production de la protéine très précoce et facteur de transcription viral, ZEBRA dont les fonctions transactivatrices sont indispensables au bon déroulement de l'infection lytique et à la production virale. Cette protéine a la capacité d'interférer avec l'homéostasie cellulaire en interagissant directement avec des protéines cellulaires ou en régulant l'expression de gènes cellulaires. Ces dernières années, de nombreux travaux ont apporté de nouveaux éléments dans la compréhension du rôle de ZEBRA et de sa régulation, au niveau viral et cellulaire.

1. Découverte de la protéine transactivatrice ZEBRA

La découverte de la protéine ZEBRA et son rôle dans l'initiation du cycle lytique du virus EBV découle des travaux réalisés dans les années 1980 par l'équipe de George Miller sur une lignée cellulaire issue d'un lymphome de Burkitt, la lignée P3HR-1 (Miller, 1989). Cette lignée cellulaire est infectée par la souche EBV HR-1 qui se différencie des autres souches EBV par 2 propriétés remarquables. D'une part, cette souche HR-1 a perdu sa capacité à immortaliser les lymphocytes B (Miller et al., 1975). La perte du phénotype transformant fut expliquée par la présence d'une délétion importante (Rabson et al., 1982) affectant, entre autres, le gène codant pour la protéine EBNA-2 (Bornkamm et al., 1982; Wang et al., 1987). D'autre part, lorsque cette souche infecte des cellules Raji (lignée EBV-positif issue d'un lymphome de Burkitt), elle est capable d'induire le cycle lytique du virus EBV présent à l'état latent dans cette lignée cellulaire (Henle et al., 1970).

L'équipe de Miller montra par clonage qu'une faible population de cellules de la lignée P3HR-1 rentrait spontanément en cycle lytique, ces cellules étant caractérisées par un ADN viral « hétérogène » (ADN het +) dont les fragments de digestion par des endonucléases signaient la présence d'importants réarrangements moléculaires dans le génome viral par rapport aux souches EBV classiques. En revanche, les cellules de la lignée P3HR-1 restant en latence virale étaient dépourvues de cet ADN het réarrangé (Rabson et al., 1983). D'autres expériences ont montré que l'apport exogène spécifique de souches HR-1 het + dans la lignée

lymphoblastoïde X50-7 (lymphocytes de sang de cordon transformés par l'EBV) conduisait à la *trans* activation du virus endogène et le passage de la latence au cycle lytique alors que les souches HR-1 het – en étaient incapables (Miller et al., 1984). Par la suite, la même équipe voulut déterminer plus précisément la séquence de cet ADN het responsable des propriétés d'activation de cette souche déficiente : un fragment de 2,7 Kbp, désigné *Bam*HI WZhet, fut identifié (Countryman and Miller, 1985). Cette séquence d'ADN résultait d'une recombinaison non homologe et d'une inversion de 2 régions d'ADN EBV, *Bam*HI W et *Bam*HI Z, distantes normalement de 55 Kbp sur un génome EBV habituel. Elle était composée d'un cadre ouvert de lecture (ORF, Open Reading Frame) associé au gène BZLF1 et de 3 autres ORFs partiellement tronqués correspondant aux gènes BWRF1, BZLF2 et BRLF1 (Countryman et al., 1987; Jenson et al., 1986) (Figure 5).

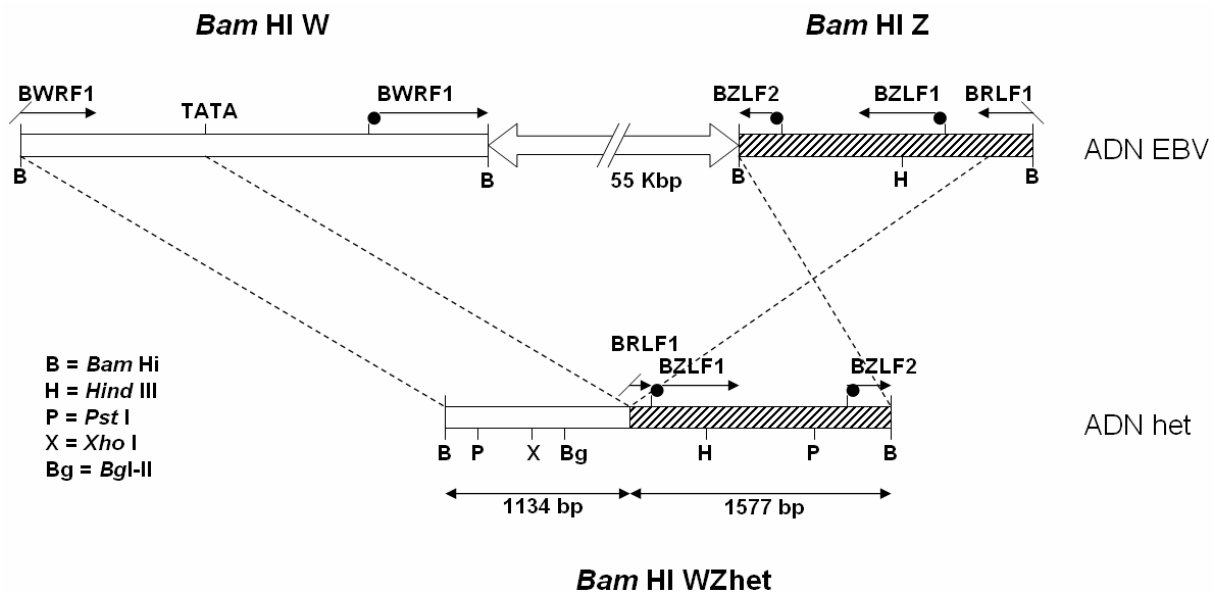


Figure 5: Séquence de *Bam* HI WZhet issue d'une recombinaison non homologe et d'une inversion entre la région *Bam* HI W et *Bam* HI Z d'un génome EBV classique (adapté de Countrymann et al., 1987).

Les travaux menés par l'équipe d'Alain Sergeant permirent d'identifier le rôle transactivateur de transcription du produit du gène BZLF1 en sous-clonant l'ORF BZLF1 d'un génome EBV non réarrangé dans un vecteur plasmidique contenant un promoteur du SV40. Après transfection du plasmide dans des cellules Raji, le produit du gène BZLF1, nommé alors EB1, était capable d'induire la transcription virale à partir des promoteurs des gènes précoces du cycle lytique (Chevallier-Greco et al., 1986). En transfectant dans des cellules D98/HR-1 la séquence *Bam*HI Z du génome EBV classique contenant l'ORF BZLF1,

la séquence *Bam*HI WZhet réarrangée ou des mutants *Bam*HI WZhet invalidant l'expression de la protéine codée par le gène BZLF1, l'équipe de Miller prouva le rôle du produit du gène BZLF1 dans l'interruption de la latence. Cette protéine fut alors appelée ZEBRA pour *Bam*HI fragment **Z** Epstein-Barr **R**eplication **A**ctivator ou encore Zta (Countryman et al., 1987; Grogan et al., 1987). L'activation du cycle lytique étant plus efficace en transfectant la séquence *Bam*HI WZhet réarrangée plutôt que la séquence *Bam*HI Z d'un génome classique, la même équipe étudia si les réarrangements moléculaires présents sur *Bam*HI WZhet pouvaient jouer un rôle dans la régulation de l'expression de la protéine ZEBRA. Une portion de la région *Bam*HI W (ou IR1, « internal repeat ») qui se trouve placée juste en amont du gène BZLF1 dans le génome HR-1 het réarrangé fut identifiée comme une séquence importante impliquée dans la régulation positive de l'expression de ZEBRA (Rooney et al., 1988). Les réarrangements moléculaires présents sur la souche déficiente HR-1 het + ont entraîné le positionnement anormal d'éléments régulateurs positifs et de régions promotrices de gènes de latence (promoteur Wp) juste en amont du gène BZLF1, permettant ainsi l'expression constitutive de la protéine ZEBRA, alors que cette protéine est normalement non exprimée spontanément dans les lignées cellulaires infectées par un génome EBV non réarrangé.

2. Caractérisation de ZEBRA (Zta, EB1), produit du gène BZLF1 : aspects moléculaires et structuraux

L'analyse de banques d'ADNc a permis d'identifier 3 ARNm majeurs respectivement de 1, 3 et 4 kb contenant la séquence transcrite complète de BZLF1 (**Figure 6**). Le messager de 1 kb est un ARNm monocistronique avec la phase de lecture BZLF1 qui est sous contrôle du promoteur pZ et est responsable de la synthèse de la protéine ZEBRA. Les messagers de 3 et 4 kb, produits sous contrôle du promoteur pR, sont 2 messagers bicistroniques contenant à la fois les phases de lecture BZLF1 et BRLF1 et générés par épissage alternatif d'une région non codante (Manet et al., 1989). Même si la traduction *in vitro* de ZEBRA semble possible à partir de ces 2 ARNm bicistroniques (Chang et al., 1998), la synthèse de ZEBRA semble dépendre préférentiellement du promoteur pZ. Un autre ARNm minoritaire de 0,9 kb permet l'expression d'une protéine de fusion comportant les 81 résidus N-terminaux de la protéine Rta et les 159 résidus C-terminaux de la protéine ZEBRA. Cette protéine, appelée RAZ, a été

décrite comme pouvant être un régulateur négatif de la transcription de ZEBRA (Segouffin et al., 1996).

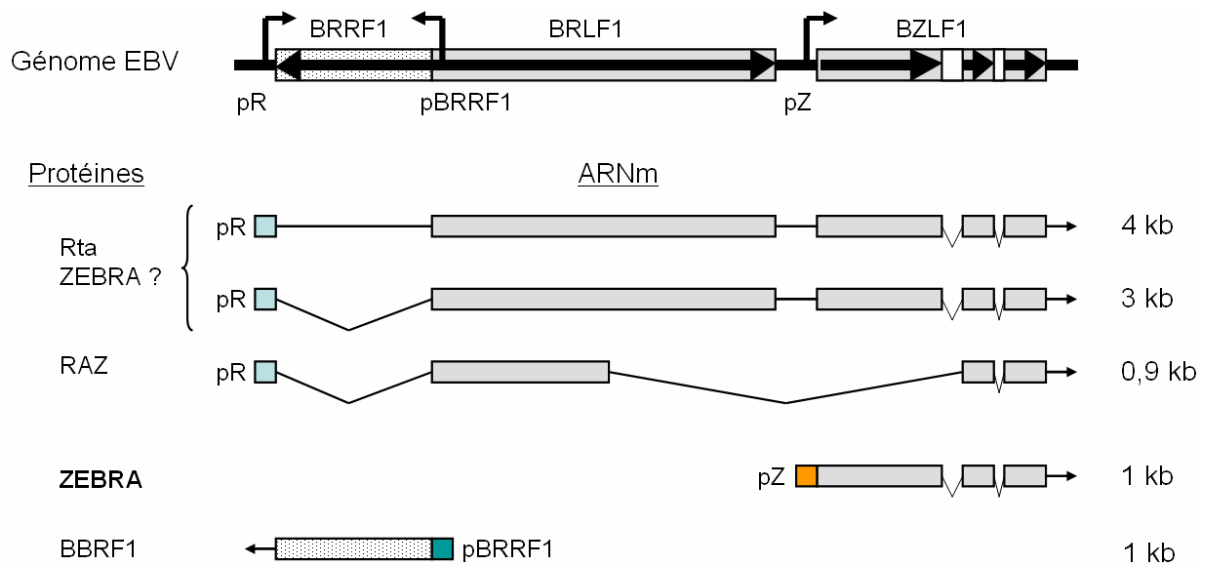


Figure 6: Région des gènes très précoces BZLF1/BRLF1 du génome EBV: structure des ARNm produits dans cette région. La région des gènes très précoces code pour 2 gènes très précoces (BZLF1 et BRLF1) et un gène précoce (BRRF1) qui est transcrit dans la région opposée avec un promoteur indépendant. La protéine précoce BRRF1 (Na) est un facteur de transcription qui médie l'induction du cycle lytique par Rta (Hong 2004). L'orientation des différents gènes est schématisée par une flèche noire. pZ, pR et pBRRF1 représentent les promoteurs respectifs des gènes BZLF1, BRLF1 et BRRF1. Les introns sont indiqués par des lignes obliques (schéma adapté d'Israel et al., 2005).

ZEBRA est une protéine homodimérique de 245 acides aminés organisée en 2 domaines principaux : un domaine de transactivation N-terminal et un domaine de dimérisation et de liaison à l'ADN (domaine DBD) conforme aux protéines de la famille bZIP (basic/leucine zipper) auxquelles appartiennent, par exemple, les facteurs de transcription cellulaires fos/jun, C/EBP α ou GCN4 de la levure (**Figure 7**) (Chang et al., 1990; Sinclair and Farrell, 1992). Ce domaine de type bZIP est composé de 3 régions : une région basique (BR), une région de dimérisation à motif leucine zipper et une queue C-terminale (CT) dont les fonctions sont essentielles à la fixation de ZEBRA à l'ADN (Hicks et al., 2003). La protéine ZEBRA est une protéine nucléaire qui comporte des signaux de localisations nucléaires (NLS), en particulier au niveau de sa région basique de liaison à l'ADN (Giot et al., 1991; Kenney et al., 1992). Quelques équipes ont étudié la variabilité des séquences de ZEBRA ou de son promoteur Zp et ont pu mettre en évidence une distribution géographique particulière de certains variants (Chang et al., 2009b). De même, l'association de certains variants de

ZEBRA ou de son promoteur avec des pathologies associées à l'EBV a été évoquée, en particulier pour le carcinome indifférencié du nasopharynx mais ces données restent peu nombreuses et nécessitent des études épidémiologiques complémentaires (Chang et al., 2009a; Grunewald et al., 1998; Ji et al., 2008).

La cristallisation du fragment C-terminal de ZEBRA (résidus 175-245) en complexe avec l'ADN a permis de mieux caractériser les domaines fonctionnels impliqués dans la dimérisation et la fixation à l'ADN de la protéine (**Figure 7**) (Petosa et al., 2006; Sinclair, 2006). Comme les autres protéines bZIP, l'homodimère de ZEBRA est formé de 2 longues hélices α qui se fixent au niveau du sillon majeur de la double hélice d'ADN via leurs régions basiques et qui interagissent entre elles au niveau de leur région leucine zipper en créant un motif structural appelé super-enroulement d'hélice (« coiled-coil ») (Glover and Harrison, 1995).

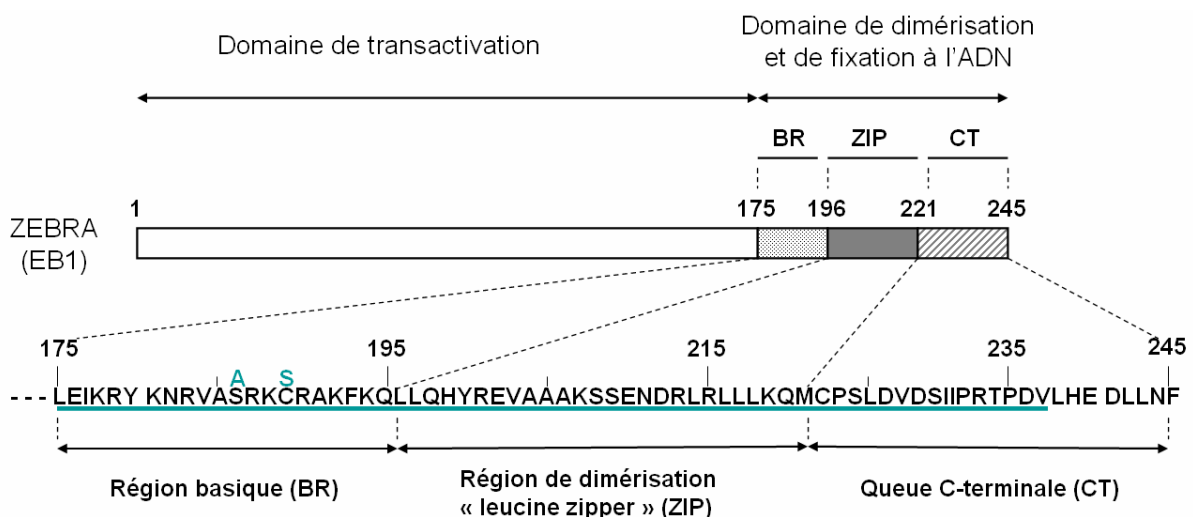


Figure 7: Structure schématique de la protéine transactivatrice ZEBRA (EB1). Le domaine de la protéine qui a été cristallisé par Petosa et al. est surligné en vert: il correspond au domaine de dimérisation et de fixation à l'ADN délété des résidus 237-245 avec 2 mutations ponctuels S186A et C189S.

La région leucine zipper des protéines bZIP est, en général, caractérisée par une séquence répétée de 7 acides aminés abcdefg où la position a est occupée par un résidu hydrophobe et la position d par une leucine. La région riche en leucine adopte une structure en hélice α dans laquelle les leucines apparaissent tous les 2 tours et du même côté de l'hélice. Cette configuration leur permet d'interagir, via leur chaîne latérale, avec les résidus leucine d'un deuxième monomère ce qui permet de former le motif en « leucine zipper » (**Figure 8A**).

Le motif leucine-zipper joue aussi un rôle structural indirect dans la fixation de la protéine à l'ADN : en facilitant la dimérisation, il permet le positionnement correct des régions basiques des deux monomères sur la double hélice d'ADN. La protéine ZEBRA ne possède pas une séquence de type « leucine zipper » conventionnelle et diffère du schéma classique retrouvé chez les autres protéines bZIP, comme c-Jun ou c-Fos, au niveau de 4 positions consécutives en a et d (**Figure 8B**).

La résolution de la structure tridimensionnelle de ZEBRA a permis de mettre en évidence que la région C-terminale (queue CT) de la protéine formait un motif structural additionnel. L'hélice α N de chaque monomère se coude au niveau du résidu proline 223 pour former une hélice à un tour appelée hélice α C qui descend de façon anti-parallèle au « coiled-coil ». La queue CT forme ainsi de nombreuses interactions avec les hélices α N du « coiled-coil » permettant de stabiliser et d'augmenter considérablement l'interface de dimérisation (Petosa et al., 2006) (**Figure 8C**). Cette conformation explique la stabilité de l'homodimère ZEBRA en dépit de l'absence d'un motif leucine zipper conventionnel et également l'incapacité pour la protéine de lier l'ADN si des mutations affectent la queue CT (Hicks et al., 2003).

La protéine ZEBRA a une plus grande variété de sites d'ADN cibles que les autres protéines bZIP ce qui lui permet d'activer de nombreux gènes cellulaires et viraux. Elle peut se fixer sur une séquence AP-1 spécifique des facteurs de transcription c-Jun/Fos (**Figure 8C**), sur l'octamère reconnu par C/EBP α ou sur d'autres sites ZREs (Z-responsive elements) dérivant de ces derniers (Farrell et al., 1989; Kouzarides et al., 1991) (cf paragraphe ultérieur sur les fonctions de ZEBRA). La structure de ZEBRA en complexe avec un site AP-1 n'a pu être établie à haute résolution qu'avec une forme mutée en S186A et C189S pouvant diminuer son affinité pour certaines de ses séquences d'ADN cibles ou altérer ses propriétés transactivatrices (Francis et al., 1999; Heston et al., 2006; Schelcher et al., 2005). Néanmoins, grâce à des modélisations moléculaires, l'interaction de ZEBRA (sauvage) avec l'ADN a pu être prédite, suggérant un mécanisme qui explique la variabilité des séquences reconnues par ZEBRA : comparativement à Fos et Jun, ZEBRA interagirait d'une manière plus importante avec les groupements phosphates de l'ADN rendant la protéine moins dépendante d'une reconnaissance bases-spécifique (Heston et al., 2006; Petosa et al., 2006).

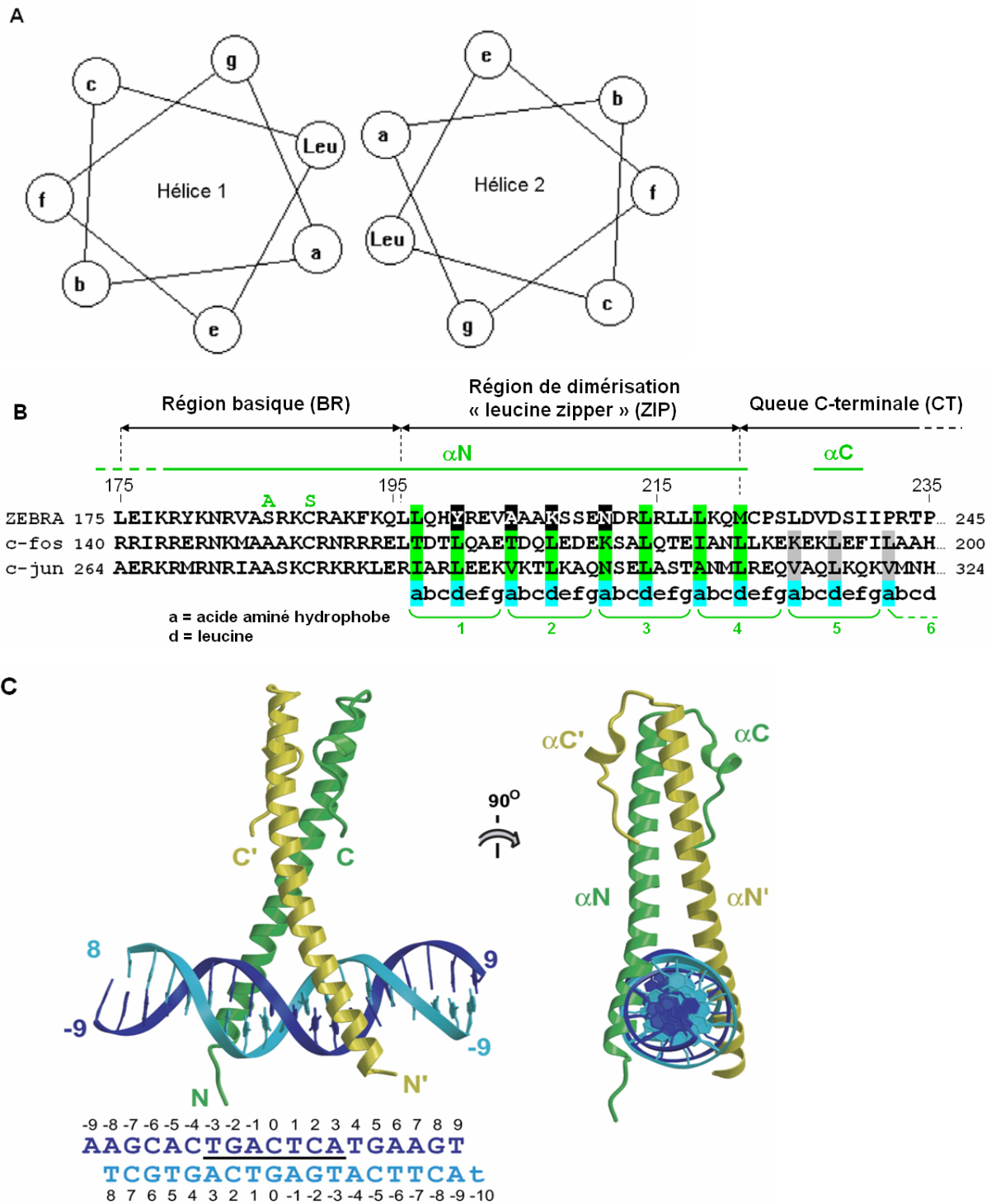


Figure 8: Structure du complexe ZEBRA-ADN. **A)** Représentation schématique d'une protéine bZIP. Le motif en « leucine zipper » est assurée par l'interaction entre les résidus hydrophobes (a) et les résidus leucines (d) de chaque monomère d'hélice α . **B)** Alignement de séquence de 3 protéines bZIP (ZEBRA, c-fos et c-jun) et structure secondaire. Les 4 acides aminés consécutifs a et d de ZEBRA (surlignés en fond noir) dérivent de la séquence consensus. Les lignes vertes délimitent les hélices α : α N (région bZIP) et α C (région CT). **C)** Vue orthogonale du complexe ZEBRA-ADN (schéma fourni par C Petosa). L'une des hélices du bZIP est courbée (en jaune) et l'autre hélice est essentiellement droite (en vert). La séquence d'ADN cible est représentée ainsi que son code numérique (heptamère AP-1).

3. Régulation de l'initiation de l'infection lytique

3.1 Mécanismes de régulation survenant en amont de l'expression du gène BZLF1

La compréhension des mécanismes impliqués dans le contrôle de l'expression de ZEBRA au niveau de son promoteur fait encore l'objet de nombreuses études menées pour la plupart *in vitro*. La régulation de l'expression de ZEBRA dépend de l'action d'un ensemble de facteurs cellulaires ou viraux associée, ou non, à des modifications épigénétiques du génome viral (Speck et al., 1997). La part relative jouée par ces différents acteurs dans la régulation du gène BZLF1 et les voies de signalisation sollicitées en amont sont à l'étude et varient suivant les lignées cellulaires utilisées (Countryman et al., 2009; Countryman et al., 2008; McDonald et al., 2009; Miller et al., 2007).

3.1.1 Voies de signalisation cellulaire associées à l'activation du cycle lytique

Le modèle général communément admis suggère que l'activation du gène BZLF1 est initiée par un signal extérieur qui serait ensuite transduit vers le noyau via différentes voies de signalisation intracellulaire suivant l'agent inducteur utilisé *in vitro* (**Figure 9**). Deux voies de signalisation ont été essentiellement étudiées. La première voie mobilise le taux de calcium intracellulaire et active deux intermédiaires de la voie du calcium, la calcineurine et la protéine kinase calcium-calmoduline dépendante de type IV (CaMKIV). La calcineurine pourrait agir en induisant la translocation dans le noyau d'un facteur de transcription de la famille NFAT (nuclear factor of activated T cell). Un autre facteur, dépendant de la voie de la calcineurine et impliqué dans l'induction de l'infection lytique, a été récemment identifié, la protéine TORC2 (transduced of regulated CREB). L'activité phosphatase de la calcineurine permettrait la translocation de TORC2 dans le noyau alors que celle-ci est normalement séquestrée dans le cytoplasme par les protéines 14.3.3 (Murata et al., 2009). La protéine CaMKIV activerait des facteurs cellulaires tels que MEF2 (myocyte enhancer factor 2) ou ATF/CREB (activating transcription factor/cyclic AMP response element binding protein) en modifiant leur état de phosphorylation. Des agents pharmacologiques tels que les ionophores calciques (par exemple, l'ionomycine) activent sélectivement cette voie. La 2^{ème} voie de signalisation implique la protéine kinase C et peut agir de manière synergique avec la 1^{ère} voie

en induisant aussi la phosphorylation des facteurs MEF2 et CREB. L'ester de phorbol (TPA, 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acétate) active sélectivement la voie d'activation par la protéine kinase C. Les 2 voies de signalisation décrites peuvent être sollicitées conjointement suite au pontage des récepteurs des lymphocytes B (BCR) par des anti-immunoglobulines (Speck et al., 1997) (**Figure 9**).

D'autres voies de signalisation impliquées dans la réactivation virale ont été décrites après stimulation avec le facteur de croissance TGF- β 1 (transforming growth factor). L'activation par TGF- β 1 sollicite des voies de signalisation complexes qui peuvent être différentes selon le type cellulaire considéré. Une des voies décrites emprunte la cascade d'activation MAPK/ERK (mitogen activated protein kinase/extracellular signal regulated kinase) avec les intermédiaires p38 et JNK (c-jun N-terminal kinase). Cette voie de signalisation aboutit à l'activation de facteurs cellulaires, comme c-jun ou ATF-2, pouvant interagir avec les régions régulatrices du promoteur de ZEBRA (Fahmi et al., 2000). De récents travaux ont aussi souligné le rôle de la voie PI3-K/Akt (phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B) dans la transduction du signal initié par TGF- β 1 et celui des facteurs Smad3/CBP (CREB binding protein) (Oussaief et al., 2009). Après transduction du signal par différentes kinases cellulaires, la phosphorylation de Smad3 induit sa translocation dans le noyau où elle est acétylée grâce à la formation d'un complexe avec la protéine CBP. La protéine Smad3 une fois activée, peut se lier avec les régions régulatrices du promoteur de Zp et induire la transcription du gène BZLF1.

Certaines protéines de l'EBV peuvent interférer avec le processus de réactivation virale en agissant au niveau de la cascade d'activation intracellulaire. La protéine de latence LMP1 peut accroître le taux d'expression de la CaMKIV et favoriser la phosphorylation des facteurs cellulaires dépendants (Chatila et al., 1997; Mosialos et al., 1994). En revanche, la protéine de latence LMP2a jouerait un rôle opposé en inhibant les protéines tyrosine kinases impliquées au tout début de la voie d'activation par le BCR (Miller et al., 1994), cet effet pouvant être néanmoins régulé par LMP2b qui agirait en s'opposant aux fonctions de LMP2a (Rechsteiner et al., 2008) (**Figure 9**).

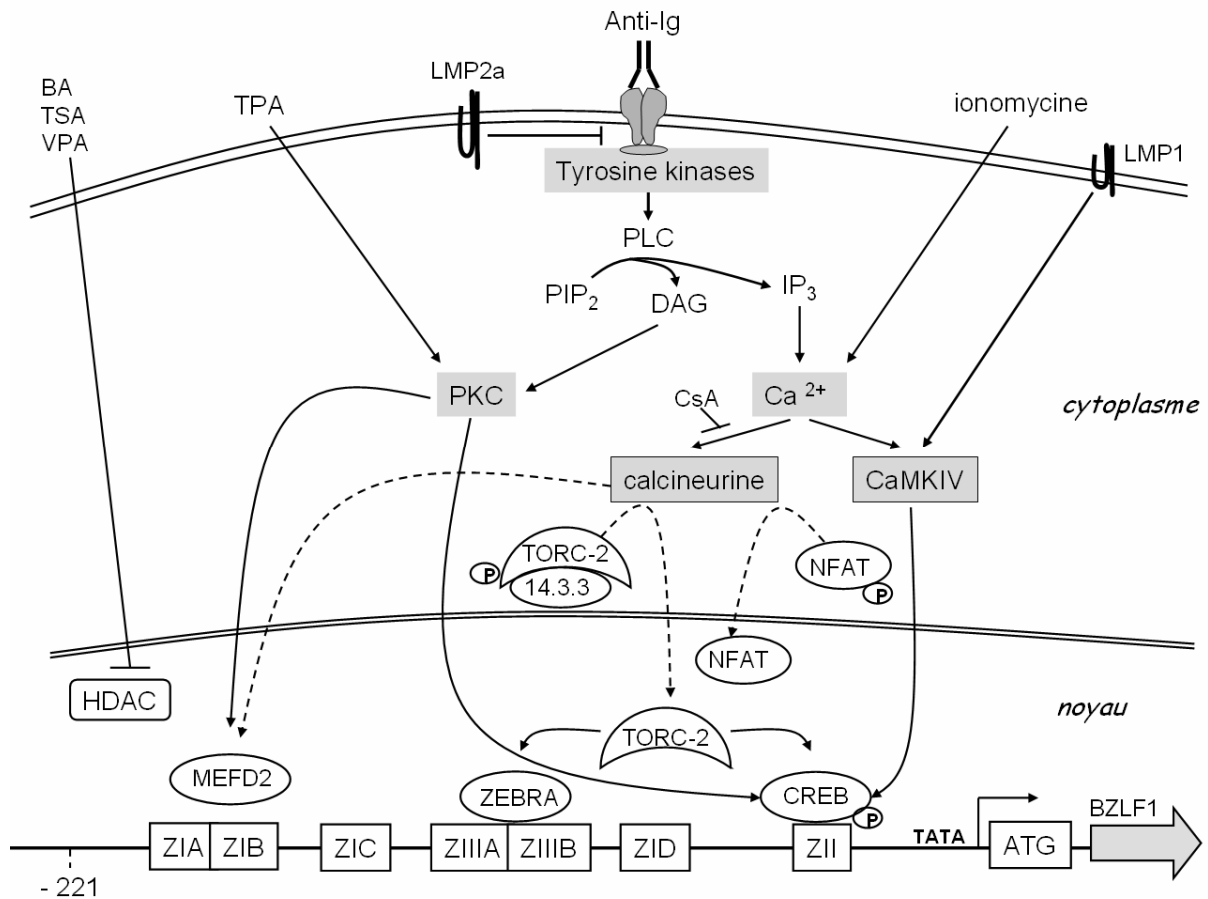


Figure 9: Schéma des voies de signalisation les mieux décrites induites par des anti-immunoglobulines (Ig) et impliquées dans l'activation du promoteur du gène BZLF1 dans une lignée lymphoblastoïde. Le pontage du récepteur du lymphocyte B déclenche l'activation de tyrosine kinases puis de la phospholipase C (PLC) qui hydrolyse le phosphatidylinostol 4,5-disphosphate (PIP₂) en diacylglycérol (DAG) et inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃). La protéine kinase C (PKC) induite par le DAG ou par l'ester de phorbol (TPA) active, en les phosphorylant, des facteurs de transcription cellulaires (par exemple, MEFD2 et CREB) qui interagissent avec des éléments régulateurs du promoteur du gène BZLF1. L'autre voie induite par IP₃ sollicite le calcium intracellulaire (Ca²⁺) qui permet l'activation de la kinase calcium/calmoduline-dépendante (CaMKIV) responsable de la phosphorylation et de l'activation de facteurs cellulaires. Le Ca²⁺ peut aussi induire une phosphatase, la calcineurine, qui permet la translocation nucléaire de facteurs cytoplasmiques (protéines NFATs, TORC2) impliqués dans l'activation d'autres facteurs de transcription cellulaires (CREB) ou viraux (ZEBRA). L'acide butyrique (BA), la trichostatine A (TSA) et l'acide valproïque (VPA) sont des inhibiteurs des histones déacétylases (HDAC) impliqués dans l'induction du cycle lytique. La ionomycine est un agoniste calcique. La ciclosporine A (CsA) inhibe l'activation de la calcineurine. La protéine LMP1 (latent membrane protein 1) du virus EBV peut induire l'expression de CaMKIV. La protéine virale LMP2a peut bloquer la voie d'activation par le BCR en inhibant les protéines kinases.

3.1.2 Régulation transcriptionnelle de l'expression de ZEBRA

Le promoteur de ZEBRA Zp est organisé en différents éléments cis-régulateurs qui peuvent être impliqués dans l'activation ou l'inhibition de l'expression du gène BZLF1 (**Figure 10**). La région portant l'essentiel des éléments cis-régulateurs du promoteur Zp est située entre les nucléotides -221 et +12. Ces séquences régulatrices sont constituées de 5 groupes : ZI (4 membres : ZI A-D), ZII, ZIII (2 membres : ZIII A-B), ZIV et ZV (2 membres ZV et ZV'). D'autres éléments cis-régulateurs, nommés HI α , HI β , HI γ , HI δ , et HI ϵ , localisés pour la plupart en amont, au niveau des nucléotides -500 et -280, ont été identifiés et pourraient jouer un rôle dans la répression du gène BZLF1 (Thomas et al., 2003).

L'expression du gène BZLF1 peut être régulée de manière positive ou négative par la fixation de facteurs cellulaires sur les séquences régulatrices du promoteur Zp. L'ensemble des facteurs cellulaires interagissant au niveau de ces régions est représenté en **Figure 10**. Les séquences régulatrices ZI comprenant ZIA, ZIB, ZIC et ZID sont des motifs riches en paires de bases A-T qui répriment le promoteur Zp en l'absence de stimuli inducteurs du cycle lytique. Les régions ZIA, ZIB et ZID regroupent des sites d'interaction pour la protéine transactivatrice MEF2-D. Les sites ZIA, ZIC et ZID seraient également capables d'interagir *in vitro* avec les facteurs ubiquitaires Sp1 et Sp3 dont l'activation nécessite l'intervention d'autres facteurs cellulaires (Doetzlhofer et al., 1999; Liu et al., 1997). Le mécanisme de régulation associé à MEF2-D a été en partie expliqué par les travaux menés par l'équipe actuellement dirigée par Evelyne Manet (Gruffat et al., 2002): ce facteur cellulaire est capable de recruter des complexes à activité histones déacétylases de classe II (HDAC) favorisant ainsi la formation d'une chromatine virale compacte et inactive, difficilement accessible aux facteurs de transcription. Durant la latence virale, MEF2-D est associé à une répression du gène BZLF-1 suite à la modification locale de l'ADN viral et la présence d'histones hypoacétylées. Cet état de répression est levé suite à l'induction du cycle lytique : *in vitro*, l'action d'agents inducteurs tels que les inhibiteurs des histones déacétylases (acide butyrique, trichostatine, ester de phorbol) met fin à l'interaction entre MEF2-D et les HDAC suite aux changements de phosphorylation occasionnés sur ces protéines. La protéine MEF2-D déphosphorylée pourrait recruter des facteurs à activité histone acétyl-transférase permettant la formation d'une chromatine active et la transcription du gène BZLF1 (Gruffat et al., 2002).

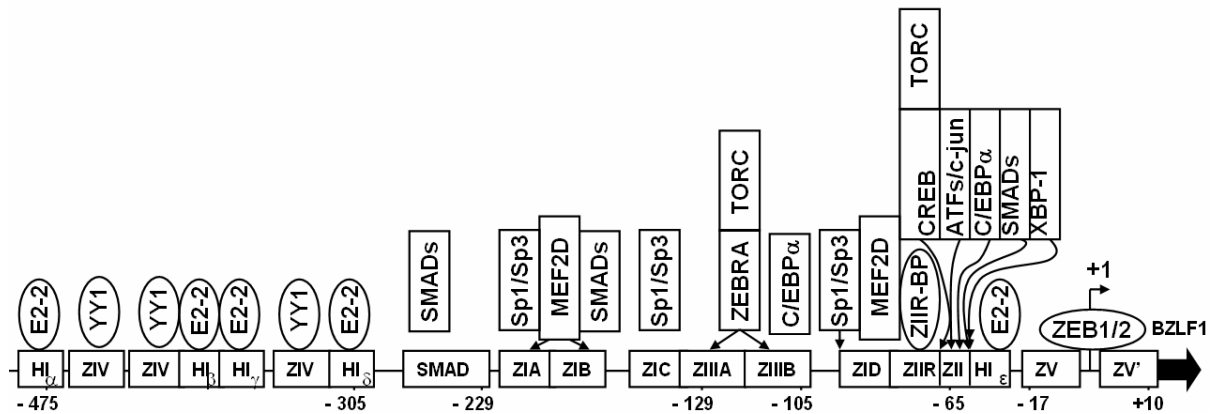


Figure 10: Structure schématique du promoteur du gène BZLF1, pZ. La position des différents éléments cis-régulateurs est donnée par rapport au site de démarrage de la transcription du gène BZLF1 (+1). Les différents facteurs cellulaires ou viraux connus, interagissant avec les sites régulateurs de pZ, sont représentés entourés d'un rectangle pour les facteurs activateurs, ou d'une forme elliptique pour les répresseurs. (Cependant, ceci reste une vue très schématique, la distinction entre la fonction activatrice ou répresseur de certains facteur de transcription n'étant pas si formelle et pouvant varier suivant l'état de régulation de la cellule)

Le motif ZII est impliqué dans l'activation du promoteur Zp par son interaction avec plusieurs facteurs cellulaires : CREB, ATF-1, les hétérodimères ATF-2/c-jun et c-jun/c-fos, les protéines Smads, C/EBP- α (CCAAT/enhancer binding protein) et XBP-1 (X-box binding protein-1) (**Figure 10**). Un nouveau mécanisme, indépendant de la phosphorylation, a récemment été suggéré pour l'activation de la protéine CREB et dépendrait d'une interaction avec la protéine TORC2 (Murata et al., 2009) (**Figure 10**). *In vivo*, le cycle lytique est initié dans les cellules les plus différenciées de l'épithélium (Young et al., 1991) ou au niveau des plasmocytes (Laichalk and Thorley-Lawson, 2005). Les protéines CREB, ATF1, ATF2 et C/EBP α sont des facteurs de transcription impliqués, entre autres, dans la différenciation cellulaire et sont responsables de l'activation de pZ dans les cellules épithéliales (Huang et al., 2006; MacCallum et al., 1999). Le facteur XBP-1 est un facteur essentiel pour la différenciation plasmocytaire (Reimold et al., 2001). L'EBV utiliserait aussi ce facteur pour initier son cycle lytique mais XBP-1 ne serait pas suffisant pour réactiver efficacement le virus dans toutes les cellules (Sun and Thorley-Lawson, 2007). Le rôle de ces facteurs ne semble pas suffisant pour expliquer à eux seuls leur responsabilité dans la réactivation du virus.

Les sites ZIIIA et ZIIIB sont des éléments ZREs (Z-responsive elements) qui sont reconnus directement par ZEBRA suggérant une boucle d'autoactivation dans la régulation du gène BZLF1. Cependant ce modèle a été remis en cause dans des expériences réalisées sur des cellules B infectées par l'EBV où il a été montré que ZEBRA était incapable d'activer son propre promoteur (Le Roux et al., 1996). De nouveaux travaux ont montré que le site ZIIIB était reconnu par la protéine C/EBP α qui pourrait coopérer avec ZEBRA pour activer le promoteur pZ au niveau des ces sites (Wu et al., 2004). De même, un rôle identique a été évoqué pour la protéine TORC2 qui activerait pZ par son interaction avec ZEBRA (Murata et al., 2009). Le mécanisme d'activation des sites ZIIIA et B par ZEBRA reste controversé mais il semble que l'intervention de facteurs cellulaires soit indispensable.

Le promoteur pZ contient aussi différents éléments de régulation négative impliqués dans l'inhibition de l'expression du gène BZLF1. Les sites ZIV sont reconnus par le facteur de transcription répresseur ubiquitaire YY-1 (Montalvo et al., 1995). Le site ZIIR est un élément cis-répresseur qui fixe de manière spécifique une protéine qui n'est pas encore identifiée (Liu et al., 1998). Les sites HI fixent les facteurs E2-2 (protéines E box) qui pourraient avoir un rôle régulateur négatif dans les cellules B et un rôle activateur sur pZ dans les cellules épithéliales (Thomas et al., 2003). Enfin, le site ZV et le site adjacent nouvellement identifié ZV', localisés au niveau des nucléotides -17 et +10 de pZ, fixent respectivement les répresseurs de transcription ZEB1 et ZEB2 (Zinc finger E-box-binding protein). Ces facteurs semblent jouer un rôle majeur dans l'inhibition de la réactivation du virus EBV et l'établissement de la latence dans les cellules B et les cellules épithéliales (Ellis et al., 2010; Feng et al., 2007; Kraus et al., 2003; Yu et al., 2007). Suivant le type cellulaire étudié, le rôle de ZEB2 semble prépondérant mettant en évidence l'importance de ce nouveau facteur avec ZEB1 (Ellis et al., 2010).

D'autres facteurs cellulaires pouvant interférer avec la réactivation virale ont été identifiés mais le mécanisme exact par lequel ils contribuent à réguler l'activité du promoteur de ZEBRA est encore inconnu. La protéine proapoptotique p53 ne possède pas de site de fixation pour le promoteur de ZEBRA mais pourrait réguler positivement pZ en favorisant le recrutement d'autres facteurs de transcription dans des lignées cellulaires de carcinome indifférencié du nasopharynx traitées par des inhibiteurs de HDAC. Dans ce modèle, la voie proapoptotique serait favorable pour l'établissement de l'infection lytique de l'EBV (Chang et al., 2008). Le facteur NF-Y (nuclear factor-Y) est impliqué dans la réponse au stress cellulaire après dommage de l'ADN. Après exposition de la lignée C666-1 (carcinome indifférencié du nasopharynx infecté par l'EBV) à des radiations ou au cisplatine, une étude a suggéré le rôle

de NF-Y dans l'induction du cycle lytique et l'interruption de la latence : NF-Y se fixerait au promoteur pR du gène très précoce BRLF1 contrôlant l'expression de Rta. Le mécanisme par lequel ZEBRA serait exprimée n'est pas clairement établi mais dépendrait de l'expression de Rta. L'induction du cycle lytique par radiation et le cisplatine dans ce modèle cellulaire pourrait faire envisager des perspectives de traitement pour le carcinome indifférencié du nasopharynx, basées sur une association entre la radiothérapie ou la chimiothérapie et une molécule antivirale (Chia et al., 2008).

3.2 Mécanismes de régulation survenant en aval de la transcription du gène BZLF1

La régulation post-transcriptionnelle de ZEBRA peut intervenir au niveau du transcrit d'ARN ou plus tard, directement au niveau de la protéine néosynthétisée qui peut subir des modifications post-traductionnelles ou interagir avec des protéines cellulaires ou virales. Ne seront commentés dans ce chapitre que les aspects portant sur la régulation négative de ZEBRA.

3.2.1 Modifications post-traductionnelles de ZEBRA

Les modifications post-traductionnelles de ZEBRA peuvent activer (phosphorylation) ou inhiber (oxydation, S-nitrosylation, sumoylation) ses fonctions sur le cycle lytique. L'acide aminé cystéine en position 189 de la séquence de Zta (C189) est sensible à l'oxydation et à la S-nitrosylation ce qui affecte sa capacité à se lier à l'ADN *in vitro* et probablement ses fonctions transactivatrices sur le cycle lytique (Wang et al., 2005). La production d'oxyde nitrique (NO) dans des lignées lymphoblastoïdes a été associée à une inhibition de la réactivation virale (Mannick et al., 1994), ZEBRA pourrait être une protéine ciblée par cet agent délétère. La sumoylation de ZEBRA au niveau de son résidu lysine en position 12 (K12) est responsable de l'inhibition de ses fonctions transactivatrices. La protéine kinase de l'EBV (BGLF4) agirait en empêchant la sumoylation de ZEBRA pendant la réactivation virale par un mécanisme encore non élucidé précisément (Hagemeier et al., 2010).

3.2.2 Interaction de ZEBRA avec des protéines cellulaires

De nombreux partenaires cellulaires de ZEBRA ont été décrits comme pouvant interférer avec la réactivation virale de l'EBV. La protéine CBP et le facteur oncogène c-myb

coopèrent avec ZEBRA et potentialisent ses fonctions activatrices sur le cycle lytique (Kenney et al., 1992; Zerby et al., 1999). D'autres protéines, à l'inverse, sont responsables d'une inhibition de ZEBRA dont le rôle dans l'initiation du cycle lytique est altéré.

La protéine p53 a été caractérisée en 1994 comme pouvant interagir directement avec Zta au niveau de sa région de dimérisation. Ce facteur proapoptotique inhiberait la capacité de ZEBRA à interrompre la latence virale. En réalité, ZEBRA et p53 s'inhiberaient de manière intermutuelle, ZEBRA pouvant aussi inhiber les fonctions de p53 (Zhang et al., 1994). Ces éléments sont à confronter aux résultats de Chang (Chang et al., 2008) (paragraphe régulation transcriptionnelle) où p53 est suspecté d'activer le promoteur de ZEBRA. La nature des interactions entre ZEBRA et p53 semble donc complexe.

Partant du constat que l'acide rétinoïque était capable d'inhiber la réactivation virale induite par le TPA, des études ont montré que les récepteurs de l'acide rétinoïque RAR- α et RXR- α pouvaient se lier à ZEBRA et inhiber sa capacité à transactiver le gène lytique précoce BMRF1. Réciproquement, ZEBRA serait aussi capable d'inhiber l'activité de transcription de ces 2 facteurs (Sista et al., 1993). Les sites d'interaction entre les récepteurs de l'acide rétinoïque et ZEBRA seraient situés au niveau du domaine de dimérisation de ZEBRA qui doit être sous forme homodimérique (Sista et al., 1995) mais pourraient aussi impliquer sa région transactivatrice (Pfitzner et al., 1995).

Une autre protéine, la sous unité p65 du facteur NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) interagit aussi avec l'homodimère ZEBRA au niveau de son domaine de dimérisation, inhibant ainsi ses fonctions transactivatrices sur les gènes lytiques (Gutsch et al., 1994).

Enfin, l'équipe d'Alain Sergeant en collaboration avec une équipe américaine a identifié en 2000 un nouveau partenaire cellulaire de ZEBRA, une protéine ubiquitaire initialement décrite au niveau nucléaire, l'ubinucléine. Cette protéine interagit avec ZEBRA au niveau de son domaine basique d'interaction avec l'ADN. Des expériences menées *in vitro* ont montré que l'ubinucléine pouvait empêcher la fixation de ZEBRA à ses séquences d'ADN cibles (Aho et al., 2000). Cette interaction pourrait inhiber les fonctions transactivatrices de ZEBRA et réguler l'infection lytique (voir l'article n°3 de la partie résultats).

4. Fonctions de la protéine ZEBRA dans le déroulement du cycle viral

Outre ses fonctions transactivatrices, ZEBRA joue un rôle majeur dans la réplication de l'ADN EBV pendant le cycle lytique mais cet aspect ne sera pas développé dans ce manuscrit.

4.1 Promoteurs viraux activés par ZEBRA et régulation par les protéines virales et cellulaires

La protéine transactivatrice ZEBRA a la capacité de se fixer à une grande variété de séquences d'ADN cibles, similaires aux sites AP-1 et aux séquences reconnues par C/EBP α , appelés sites ZREs (Z-responsive elements), lui permettant d'activer la transcription de nombreux gènes viraux ou cellulaires (se rapporter au paragraphe portant sur « la caractérisation structurale de ZEBRA »). La caractérisation des différents sites de réponse à ZEBRA a permis de montrer que la protéine reconnaît et se fixe sur une séquence relativement dégénérée autour du consensus suivant : T-G/T-T/A-G-T/C-G/C/A-A (Speck et al., 1997). Des sites ZREs ont été identifiés à proximité des promoteurs de nombreux gènes viraux dont le gène très précoce BRLF1 codant pour la protéine transactivatrice Rta (le promoteur de ZEBRA possède aussi des sites ZREs ou sites ZIII). Les promoteurs de nombreux gènes précoces contiennent des sites ZREs comme par exemple les promoteurs BSLF2+BMLF1 (protéine Mta ou EB2 ou SM impliquée dans la stabilité et l'export des transcrits sans introns), BHLF1, BHRF1, BRRF1 (facteur de transcription coopérant avec Rta), BMRF1 (facteur de transcription et facteur de processivité de l'ADN polymérase virale).

La protéine transactivatrice ZEBRA est responsable de l'activation de nombreux gènes précoces du cycle lytique en coopération avec la seconde protéine transactivatrice de l'EBV, la protéine Rta. Ces 2 protéines peuvent activer les gènes du cycle lytique indépendamment l'une de l'autre quand elles sont surexprimées mais l'expression de l'ensemble des gènes du cycle lytique de l'EBV dépend de l'action synergique de ces 2 protéines (Feederle et al., 2000). L'induction du cycle lytique est initiée par ZEBRA qui active le promoteur du gène BRLF1. La protéine Rta néosynthétisée est capable d'activer de manière indirecte sa propre expression et celle de ZEBRA créant ainsi une boucle d'amplification. Le promoteur de ZEBRA est activé au niveau de la séquence régulatrice ZII par l'intermédiaire des facteurs de transcription c-jun et ATF-2 dont la phosphorylation résulte de l'activation de la voie des Map kinases par Rta (Adamson et al., 2000). A noter que la protéine précoce BRRF1, codant pour

le facteur de transcription Na, est capable, en coopération avec Rta, d'activer aussi le promoteur de ZEBRA au niveau du site ZII en activant la phosphorylation de c-jun (Hong et al., 2004).

Le virus EBV a besoin de la machinerie cellulaire pour activer la transcription des gènes dont les promoteurs possèdent des sites ZREs (Sinclair, 2003). ZEBRA interagit au niveau de sa région transactivatrice avec les facteurs de transcription cellulaires TFIIA et TFIID. L'interaction entre ZEBRA et TFIID stabilise l'association de TFIID au niveau de la boîte TATA du gène précoce BHLF1 et la formation du complexe d'initiation de la transcription (Lieberman and Berk, 1991). ZEBRA interagit aussi avec la protéine CBP dont l'activité histone acétyl-transferase conduit à un remodelage de la chromatine favorable à la transcription des gènes viraux (Adamson and Kenney, 1999; Zerby et al., 1999). L'activité transactivatrice de ZEBRA étudiée au niveau du promoteur du gène précoce BMRF1 est aussi potentialisée par une interaction directe de ZEBRA avec le facteur c-myc (Kenney et al., 1992). Récemment, une étude a suggéré le rôle du facteur de transcription cellulaire MACF1 (microtubule-actin crosslinking factor) dans l'activation des promoteurs de gènes précoces de l'EBV. MACF1 se fixerait au niveau des sites ZREs en formant un complexe ternaire avec ZEBRA et Rta. En médiant l'interaction entre ZEBRA et Rta, MACF1 serait responsable de la synergie d'action de ces 2 transactivateurs viraux sur les sites ZREs des gènes précoces de l'EBV (Chang et al., 2010).

4.2 ZEBRA et reconnaissance de l'ADN méthylé

La méthylation de l'ADN cible les cytosines au niveau de régions riches en dinucléotides CpG (îlots CpG) et est généralement associée à l'inhibition de l'expression des gènes viraux ou cellulaires. Différents mécanismes peuvent être impliqués dans la répression de l'expression des gènes médiée par la méthylation de l'ADN : le recrutement de complexes à activité histone déacétylase ou de protéines MBPs (Methyl-CpG-binding proteins) conduisant à un remodelage de la chromatine, ou encore l'inhibition de la fixation de facteurs de transcription au niveau de leur promoteur (voir revue Klose and Bird, 2006). Le génome EBV est non méthylé dans les virions. Cependant, dans les cellules supportant l'infection latente et non nouvellement infectées, le génome EBV est hautement méthylé conduisant à l'expression d'un nombre limité de gènes (Bhende et al., 2005; Takacs et al., 2010).

La protéine ZEBRA représente le premier facteur de transcription capable d'activer des gènes viraux ou cellulaires méthylés et capable d'outrepasser l'inhibition induite par ces modifications épigénétiques (Bhende et al., 2004; Dickerson et al., 2009; Flower et al., 2010). La capacité de ZEBRA à se fixer et à activer préférentiellement les promoteurs méthylés a initialement été décrite pour le promoteur de BRLF1 (pR) qui contient 3 motifs ZREs (Bhende et al., 2004). Les motifs ZREs ont été classés en 3 groupes suivant la présence d'îlots CpG dans la séquence et la sélectivité d'interaction de ZEBRA vis-à-vis du site méthylé. Les ZREs de classe I (ZRE1 de pR) ne contiennent pas de motifs CpG et ZEBRA n'est donc pas affectée par la méthylation de la séquence. Les ZREs de classe II (ZRE2 de pR) contiennent un motif CpG, ZEBRA interagit avec la séquence quel que soit son état de méthylation. Les ZREs de classe III (ZRE3 de pR) contiennent un ou plusieurs motifs CpG qui doivent obligatoirement être méthylés pour permettre la fixation de ZEBRA (Bhende et al., 2004; Karlsson et al., 2008b). Les résidus S186 et C189 de ZEBRA ont été identifiés comme jouant un rôle majeur dans la reconnaissance des sites méthylés ZRE2 et ZRE3 du promoteur de BRLF1 (Bhende et al., 2005; Karlsson et al., 2008a). Une étude récente a mis en évidence un second promoteur viral contenant 2 sites ZREs avec des motifs CpG : le promoteur du gène précoce BRRF1 (pNa), codant pour le facteur de transcription Na. ZEBRA ne fixe et n'active efficacement le promoteur pNa que dans la mesure où les motifs CpG de ses deux séquences ZREs sont méthylés. Le résidu S186 semble indispensable à la fixation et à l'activation des sites ZREs méthylés de pNa dans les cellules en latence virale (Dickerson et al., 2009). Bien que la structure de ZEBRA en complexe avec les sites ZREs méthylés n'ait pas été encore résolue, des travaux de modélisation ont permis de suggérer des mécanismes expliquant la reconnaissance préférentielle de ZEBRA pour les promoteurs méthylés (Dickerson et al., 2009; Karlsson et al., 2008a; Petosa et al., 2006).

Les travaux menés par l'équipe d'Hammerschmidt ont permis d'apporter de nouveaux éléments et d'identifier de nouveaux sites ZREs méthylés au niveau de promoteurs de gènes précoces de l'EBV (Kalla et al., 2009). Les promoteurs BMRF1 et BSLF2/BMLF1 contiennent des sites ZREs mais aucune étude n'avait encore identifié de motifs CpG dans leur séquence. D'autre part, les promoteurs des gènes BSRF1 (protéine du tégument) et BBLF4 (hélicase) pourraient aussi contenir des séquences méthylées pouvant fixer ZEBRA bien que la régulation de ces 2 gènes par ZEBRA soit pour l'instant encore inconnue. Enfin, certains résultats semblent remettre en cause l'importance du rôle de la méthylation sur le promoteur de BRLF1 dans l'activation du cycle lytique (Kalla et al., 2009).

De récentes études ont révélé que ZEBRA pouvait aussi activer des promoteurs cellulaires contenant des motifs CpG méthylés au niveau de leur site ZREs (Flower et al., 2010; Heather et al., 2009). ZEBRA est donc aussi capable de s'affranchir de l'inhibition induite sur le génome cellulaire par la méthylation.

4.3 Résumé : rôle de la méthylation et de ZEBRA dans la régulation du cycle lytique

Les derniers travaux menés par les équipes de Sinclair, Kenney et d'Hammerschmidt ont apporté de nouveaux éléments dans la compréhension du rôle de la méthylation et de ZEBRA dans la régulation de l'infection lytique. Ces données récentes permettent d'envisager un modèle de régulation de l'infection lytique en fonction de l'état de méthylation du génome du virus EBV et le type cellulaire. Dans les cellules supportant une infection lytique, comme les cellules épithéliales oropharyngées, le génome EBV est non méthylé empêchant ZEBRA d'accomplir efficacement ses fonctions transactivatrices. Les facteurs de transcription Rta et Na, n'étant pas inhibés, seraient alors les premiers médiateurs impliqués dans l'expression des gènes lytiques. Dans un autre modèle cellulaire correspondant au début de l'infection des cellules B, ZEBRA est exprimée à faible niveau mais ne peut induire le cycle lytique car le génome EBV est non méthylé (Kalla et al., 2009). Durant cette phase, ZEBRA pourrait participer à l'établissement de la latence et jouer un rôle dans la prolifération cellulaire des cellules B de manière à protéger le virus contre le système immunitaire (Kalla et al., 2009). Durant l'établissement de la latence, le génome viral est progressivement méthylé. Rta et Na ne peuvent alors activer les promoteurs des gènes du cycle lytique. A la suite d'un signal extérieur tel que la différenciation cellulaire en plasmocytes, ZEBRA serait exprimée et pourrait engager le cycle lytique en activant les promoteurs méthylés de Rta et Na. La combinaison d'action de ZEBRA, Rta et Na serait ensuite suffisante pour initier l'expression de l'ensemble des gènes du cycle lytique. Grâce, en partie, à la capacité de ZEBRA à réguler ses fonctions suivant le degré de méthylation cellulaire, le virus EBV a réussi à s'adapter pour, d'une part, persister dans les cellules B et échapper à la réponse immune au début de l'infection puis, d'autre part, produire de nouveaux virions et infecter de nouveaux hôtes à un stade ultérieur de l'infection (Dickerson et al., 2009; Kalla et al., 2009).

5. Ingérence de ZEBRA dans l'homéostasie cellulaire

L'expression de la protéine ZEBRA est essentielle pour le virus EBV, notamment au cours de l'infection lytique. Pendant l'infection virale, le virus EBV s'adapte à son environnement et régule les fonctions d'un certain nombre de protéines cellulaires afin de persister chez l'hôte infecté et de produire de nouveaux virions, capables d'infecter de nouvelles cellules, et transmissibles à de nouveaux hôtes. La protéine ZEBRA interfère avec l'expression de nombreux gènes cellulaires ou modifie l'activité de protéines cellulaires en interagissant directement avec elles. Comme décrit précédemment, la protéine ZEBRA a la propriété de se fixer sur une grande variété de séquences d'ADN cibles, appelées séquences ZREs, similaires au site AP-1 sur lequel se fixent les facteurs de transcription cellulaire c-jun et c-fos. De nombreux sites ZREs ont été identifiés sur les promoteurs de gènes cellulaires expliquant l'activité de facteur de transcription cellulaire de ZEBRA. ZEBRA peut aussi intervenir de manière indirecte sur l'expression d'un gène en interagissant avec des facteurs de transcription cellulaires. Les conséquences fonctionnelles des interactions décrites entre ZEBRA et certaines protéines cellulaires peuvent être complexes et être à l'origine de phénomènes d'activation ou d'inhibition, réciproques ou non (voir revues Chen et al., 2009; Sinclair, 2003).

Nous avons décrit dans un paragraphe précédent (voir « régulation de l'infection lytique ») quelques exemples d'interaction entre protéines cellulaires et ZEBRA en nous focalisant principalement sur l'aspect modulation de l'activité de ZEBRA par certains facteurs cellulaires. Dans ce chapitre, nous traiterons surtout des effets de l'expression de ZEBRA sur la cellule et des perturbations induites par la protéine virale sur l'homéostasie cellulaire. Les principales protéines ou principaux gènes cellulaires ciblés par ZEBRA sont répertoriés dans le **Tableau II**. Les conséquences fonctionnelles de ces interactions sur la cellule, sous réserve qu'elles aient été décrites, seront abordées par thématique dans les paragraphes ci-dessous.

Gènes cellulaires régulés par ZEBRA Partenaires cellulaires de ZEBRA

Cycle cellulaire-apoptose

P53	P53	Zhang et al., 1994 ; Mauser et al., 2003
C/EBP	C/EBP	Wu et al., 2002 ; Wu et al., 2003
P21, p27		Cayrol et al., 1996 ; Wu et al., 2003
CDC25, E2F1		Mauser et al., 2002b
Stem-loop binding protein		Mauser et al., 2002b
Cycline E		Mauser et al., 2002b
c-myc		Rodriguez et al., 2001
DHRS-9		Jones et al., 2007
	53BP1	Bailey et al., 2009

Immunité cellulaire

CIITA		Li et al., 2009
hIL-10		Mahot et al., 1993
TGF- β , TGF- β inh3, α 1-collagène		Cayrol et al., 1995
Egr-1		Chang et al., 2006
IFN- γ R		Morrison et al., 2001
TNF-R1		Morrison et al., 2004
	IRF-7	Hahn et al., 2005
	NF- κ B	Keating et al., 2002 ; Morrison et al., 2004

Facteurs de croissance /tumorigénèse

VEGF		Hong et al., 2005
IL-6		Jones et al., 2007
IL-8		Hsu et al., 2008
IL-13		Tsai et al., 2009

Autres fonctions ou inconnues

c-fos/c-jun		Flemington et al., 1990 ; Sato et al., 1992
MMP-1		Lu et al., 2003
	Ubn-1	Aho et al., 2000
	RACK-1	Baumann et al., 2000
	mtSSB	Wiedmer et al., 2008
	RXR, RAR	Sista et al., 1993
	c-myb	Kenney et al., 1992
	CBP	Zerby et al., 1999
	TFIID	Lieberman et al., 1991

Tableau II: Liste des gènes cellulaires régulés par ZEBRA ou des protéines cellulaires interagissant avec ZEBRA.

5.1 Régulation du cycle cellulaire et interférence avec les mécanismes d'apoptose

Beaucoup de virus de la famille des *Herpesviridae* détournent à leur profit les mécanismes de contrôle du cycle cellulaire pour assurer leur propre réplication virale. Le cycle lytique du virus EBV est étroitement associé à un arrêt du cycle cellulaire, phénomène qui serait favorable à la réplication virale au détriment de la réplication de l'ADN cellulaire. L'arrêt du cycle cellulaire permettrait au virus d'utiliser, à la place de la cellule, des substrats essentiels à sa réplication (Israel, 2005).

La protéine proapoptotique p53 régule de nombreux mécanismes dans la cellule et participe au contrôle du cycle cellulaire. L'effet de l'interaction de ZEBRA avec p53 est complexe et controversé, certaines études montrant un effet activateur de ZEBRA sur p53 (Cayrol and Flemington, 1996) et d'autres un effet inhibiteur (Mauser et al., 2002c; Zhang et al., 1994). Cependant, de récents travaux menés par l'équipe de Tsurumi ont permis de proposer un modèle de régulation de p53 par ZEBRA intégrant ces éléments, à première vue, contradictoires (Sato et al.).

A un stade précoce de l'infection lytique, ZEBRA activerait la fixation de la protéine p53, en complexe avec TFIID et présente sous une forme peu phosphorylée, à ses séquences d'ADN cibles ce qui induirait la transcription des gènes p53-dépendants (Chen et al., 1993; Sato et al.). L'expression de l'inhibiteur p21^{WAF1/CIP1} entraînerait alors l'arrêt du cycle cellulaire en G1 (Cayrol and Flemington, 1996; Sato et al.). ZEBRA pourrait aussi entraîner l'arrêt du cycle cellulaire en empêchant C/EBP- α d'être dégradée par le protéasome permettant alors à cette protéine de transactiver le gène p21^{WAF1/CIP1} (Wu et al., 2003). ZEBRA est aussi responsable de la transactivation d'un autre inhibiteur du cycle cellulaire, la protéine p27^{KIP1} (Cayrol and Flemington, 1996). D'autres travaux ont suggéré que l'expression des protéines p21 et p27 résultait de l'inhibition du facteur c-myc par ZEBRA (Rodriguez et al., 2001). Plusieurs mécanismes pourraient donc expliquer le rôle de ZEBRA dans l'arrêt du cycle cellulaire au début de l'infection.

A un stade plus avancé de l'infection lytique, en raison de la présence de l'ADN viral, la cellule active une voie dépendante de la kinase ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et impliquée dans la réponse au dommage de l'ADN. Cette voie ATM-dépendante conduit à la phosphorylation de p53 (Kudoh et al., 2005). Fait intrigant, un nouveau partenaire de ZEBRA impliqué dans la voie ATM-dépendante a récemment été identifié, la protéine 53BP1 qui pourrait servir de chaperonne moléculaire à la protéine virale (Bailey et al., 2009). La

protéine ZEBRA serait ensuite associée au complexe ECS ubiquitine ligase qui ciblerait la protéine p53 phosphorylée pour la dégrader dans le protéasome (Sato et al., 2009a; Sato et al., 2009b). L'expression des gènes activés par p53 serait alors maintenue à un niveau faible entretenant la cellule dans une phase tardive G1 /phase S favorable au virus et à sa réplication virale (Guo et al., 2010; Kudoh et al., 2003; Kudoh et al., 2005; Sato et al., 2009a). Cet environnement qui ne permet pas la réplication de l'ADN cellulaire est associé à une synthèse limitée de protéines cellulaires dont les protéines E2F1, cycline E, Cdc25A et SLBP (stem loop binding protein) qui sont induites par ZEBRA (Mauser et al., 2002b). ZEBRA peut interférer avec de nombreuses voies de régulation du cycle cellulaire et entraîner son arrêt à des stades un peu différents suivant le type cellulaire étudié (Cayrol and Flemington, 1996; Mauser et al., 2002a; Mauser et al., 2002b).

ZEBRA est aussi responsable de la dispersion des corps nucléaires PML (promyelocytic leukemia bodies) qui sont des structures macromoléculaires localisées essentiellement dans le noyau (Adamson and Kenney, 2001). Ces éléments sont formés de complexes protéiques rattachés à la chromatine et seraient impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques comme, par exemple, l'apoptose, la sénescence et la réponse antivirale par l'interféron (Bernardi and Pandolfi, 2007; Regad and Chelbi-Alix, 2001). Le virus EBV pourrait cibler la destruction de ces structures afin de persister dans la cellule et accomplir son cycle lytique.

5.2 Régulation de l'immunité cellulaire

La réponse immunitaire de l'hôte permet de contrôler l'infection par le virus EBV durant toute la vie de l'individu. La primo-infection à EBV conduit à une forte réponse immunitaire de l'hôte, principalement médiée par les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, et qui est responsable des symptômes associés à la mononucléose infectieuse. La réponse immunitaire anti-EBV met en jeu aussi d'autres cellules de l'immunité (lymphocytes B, lymphocytes T CD4⁺, cellules NK...) et la régulation de cette réponse immunitaire fait aussi intervenir de nombreuses cytokines. Le virus EBV a adopté de multiples stratégies pour échapper à la réponse immune de l'hôte en régulant l'expression de certaines cytokines ou de molécules de reconnaissance de l'antigène (Hislop et al., 2007).

5.2.1 Inhibition de l'expression des molécules de présentation de l'antigène

Beaucoup d'études ont souligné le rôle de protéines du cycle lytique et de ZEBRA dans les stratégies d'immunoévasion adoptées par le virus EBV (Ressing et al., 2008). ZEBRA est impliquée dans l'inhibition de l'expression des molécules de présentation de l'antigène du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I et II (Keating et al., 2002; Li et al., 2009). Le mécanisme d'inhibition des molécules du CMH II par ZEBRA a été exploré récemment. Le facteur CIITA est un facteur majeur de régulation de l'expression des molécules du CMH II et fonctionne comme un coactivateur transcriptionnel ne se liant pas à l'ADN. Le promoteur de CIITA contient des motifs ZREs sur lesquels se fixe ZEBRA qui joue le rôle d'inhibiteur de la transcription du gène CIITA. ZEBRA interfère donc avec l'expression des molécules de CMH II qui sont impliquées dans l'activation de la réponse immune médiée par les lymphocytes T CD4+ helpers (Li et al., 2009).

5.2.2 Interférence avec la synthèse ou les fonctions effectrices de cytokines

ZEBRA interfère avec les fonctions effectrices de nombreuses cytokines. ZEBRA inhibe la transcription du gène codant pour le récepteur de l'IFN- γ (interféron), cytokine qui est impliquée dans la réponse cytotoxique médiée par les cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes T CD4 Th1 et CD8) ou innée (cellules NK) (Morrison et al., 2001). L'IFN- γ induit aussi de manière importante l'expression des molécules du CMH II sur les cellules non présentatrices de l'antigène comme les cellules épithéliales. ZEBRA, par son rôle inhibiteur sur les molécules du CMH II, pourrait influencer le tropisme d'infection du virus EBV pour les cellules B au détriment des cellules épithéliales. En effet, une étude a suggéré que les virus, produits à partir de cellules n'exprimant pas des molécules de CMH II, infectent préférentiellement les cellules B (Borza and Hutt-Fletcher, 2002).

La protéine ZEBRA altère aussi les fonctions de la cytokine TNF- α (facteur de nécrose tumorale) en inhibant la transcription du gène codant pour son récepteur 1, TNF-R1. TNF- α possède, entre autres, une activité antitumorale et antivirale, active la synthèse de cytokines proinflammatoires comme IL-1 et Il-6 et stimule l'apoptose. ZEBRA empêche TNF- α d'induire l'apoptose cellulaire et d'activer la transcription de nombreux gènes comme ICAM-1 (inter-cellular adhesion molecule) qui code pour une molécule d'adhésion exprimée sur les monocytes et l'endothélium (Morrison et al., 2004). Le facteur NF- κ B contrôle

l'expression d'un ensemble de gènes impliqués dans la réponse immunitaire et inflammatoire et peut être activé par de nombreux stimuli comme les cytokines IL-1 et TNF- α . ZEBRA interagit avec la sous-unité p65 de NF- κ B et empêche la transcription des gènes dépendants de la voie NF- κ B et induits par IL-1 ou TNF- α . Cependant, la nature de l'interaction entre ces 2 facteurs est complexe et peut aboutir aussi à une inhibition de l'activité de ZEBRA par NF- κ B (Gutsch et al., 1994; Keating et al., 2002; Morrison and Kenney, 2004).

Le facteur IRF-7 (interferon regulatory factor 7) joue un rôle prépondérant dans la réponse immune anti-virale en induisant l'expression des interférons IFN- α et IFN- β . ZEBRA interagit directement avec IRF-7 et inhibe la transcription de ces gènes cibles dont les interférons α/β et la protéine Tap-2 (antigen peptide transporter) impliquée dans l'apprêtement de l'antigène associé aux molécules du CMH de classe I (Hahn et al., 2005).

L'immunomodulation induite par le virus EBV peut aussi se traduire par une activation par ZEBRA de l'expression de cytokines anti-inflammatoires ou immunosuppressives. ZEBRA induit la transcription des gènes codant pour la cytokine immunosuppressive TGF- β 1 (transforming growth factor) et les protéines TGF- β igh3 et α 1-collagène IV qui contiennent toutes les deux des motifs ZREs au niveau de leur séquence d'ADN. TGF- β igh3 est une protéine induite par TGF- β 1 et participe à l'élaboration de la matrice extracellulaire. La protéine α 1-collagène IV est capable de se fixer à TGF- β 1 et pourrait la protéger de la dégradation par les protéases cellulaires. ZEBRA, en activant l'expression de TGF- β igh3 et α 1-collagène IV, pourrait potentialiser les fonctions biologiques de TGF- β 1 sur la synthèse des composants de la matrice extracellulaire et favoriser aussi son activité anti-inflammatoire et immunosuppressive (Cayrol and Flemington, 1995).

Pendant l'infection lytique, l'expression du gène tardif BCRF1 aboutit à la production d'une protéine virale (vIL-10) qui présente une forte homologie (70%) avec la cytokine IL-10 humaine (hIL-10). Cette protéine virale possède des propriétés similaires à la cytokine hIL-10 qui est impliquée dans l'inhibition de la synthèse d'IFN- γ , de cytokines proinflammatoires et la fonction des cellules présentatrices de l'antigène. L'IL-10 humaine et virale induisent aussi la prolifération et la différenciation des lymphocytes B (Miyazaki et al., 1993). ZEBRA est capable de se fixer sur des motifs ZREs présents sur le promoteur du gène d'hIL-10 et d'induire l'expression de cette cytokine (Mahot et al., 2003). La cytokine IL-10 dont l'origine peut être virale ou cellulaire, semble importante pour la survie du virus EBV. Elle pourrait

aider à la persistance du virus EBV et créer un microenvironnement favorable à l'infection de nouveaux lymphocytes B (Mahot et al., 2003).

5.3. ZEBRA et cancers associés à l'EBV

Bien que le lien entre les cancers associés à l'EBV et la latence virale soit bien établi, le rôle de la protéine ZEBRA a été évoqué à plusieurs reprises dans de récents travaux menés sur des modèles cellulaires et animaux ou des études cliniques se basant sur des données sérologiques ou anatomopathologiques.

5.3.1 ZEBRA et maladies lymphoprolifératives associées à l'EBV

Le virus EBV participe à la lymphogénèse et est associé à divers lymphomes (Thorley-Lawson and Allday, 2008; Thorley-Lawson and Gross, 2004). Les lignées lymphoblastoïdes sont obtenues *in vitro* en infectant des lymphocytes B primaires avec du virus EBV et représentent un modèle cellulaire de latence couramment utilisé pour étudier la pathogénie des maladies lymphoprolifératives associées à l'EBV. Cependant, lors des premiers passages en culture, quelques cellules de la lignée lymphoblastoïde peuvent exprimer des protéines précoces du cycle lytique (Hong et al., 2005a; Shannon-Lowe et al., 2009). L'équipe de Kenney a étudié les propriétés de lignées lymphoblastoïdes établies à partir de virus EBV sauvages ou délétés des gènes très précoces BZLF1 ou BRLF1 codant, respectivement, pour ZEBRA ou Rta. Les lignées lymphoblastoïdes ayant subi seulement quelques passages en culture et défectives des gènes BZLF1 ou BRLF1 étaient incapables d'induire une croissance tumorale chez la souris SCID (severe combined immunodeficiency) contrairement aux lignées contenant du virus sauvage. Ces lignées défectives étaient aussi associées à une synthèse moins importante des cytokines IL-6 et IL-10 en comparaison avec les lignées contenant du virus sauvage. La production de ces cytokines était restaurée si l'infection lytique était rétablie dans ces cellules (Hong et al., 2005a). D'autre part, ces lignées lymphoblastoïdes à faible passage en culture (appelées lignées lymphoblastoïdes précoces) et défectives en protéines du cycle lytique perdaient leur capacité à sécréter le facteur VEGF (vascular endothelial growth factor) et à promouvoir *in vitro* l'angiogénèse (Hong et al., 2005b). La cytokine IL-6 est impliquée dans la maturation des lymphocytes B et

est un facteur de croissance tumorale associé aux maladies lymphoprolifératives (Haddad et al., 2001; Scala et al., 1990). D'autres travaux menés par la même équipe ont souligné l'importance d'IL-6 dans la croissance de la tumeur établie chez la souris SCID après injection de cellules provenant d'une lignée lymphoblastoïde précoce. ZEBRA stimulerait la synthèse d'IL-6 dans ces lignées et cette action serait synergique avec la protéine de latence LMP-1. Parmi l'ensemble des cellules d'une lignée lymphoblastoïde précoce, quelques cellules seulement pourraient engager une infection lytique qui serait abortive, avec synthèse de certaines protéines lytiques mais sans production de virions. ZEBRA serait exprimée dans quelques cellules et stimulerait par un mécanisme paracrine la synthèse d'IL-6 au niveau des autres cellules infectées de manière latente (Jones et al., 2007).

La cytokine IL-13 possède de multiples fonctions dans le système immunitaire et est capable de favoriser la prolifération et la différenciation cellulaire des lymphocytes B. Une étude récente a montré que ZEBRA est capable de se fixer sur un site AP-1 du promoteur d'IL-13 et d'activer de manière importante l'expression de cette cytokine dans différents modèles cellulaires infectés par l'EBV. Le rôle d'IL-13 sur la prolifération cellulaire a pu être mis en évidence sur des lignées lymphoblastoïdes et des lymphocytes B nouvellement infectés par l'EBV. ZEBRA, en activant l'expression d'IL-13 par un mécanisme autocrine et paracrine, pourrait contribuer à la prolifération cellulaire des cellules B infectées par l'EBV et à l'établissement d'un microenvironnement favorable à la formation de lymphomes (Tsai et al., 2009).

Des arguments sérologiques et anatomopathologiques témoignent aussi du rôle de la protéine ZEBRA dans les maladies lymphoprolifératives associées à l'EBV. Des taux élevés d'anticorps dirigés contre des protéines du cycle lytique, dont ZEBRA, sont retrouvés dans les sérums de patients atteints de certains cancers lymphoïdes associés à l'EBV, en comparaison avec des porteurs sains (de-The et al., 1978; Drouet et al., 1999; Mueller et al., 1989). De plus, ZEBRA, ainsi que son transcrite d'ARNm, a pu être mise en évidence au niveau de biopsies de lymphome de Burkitt (Niedobitek et al., 1995; Xue et al., 2002), de lymphome d'Hodgkin (Pallesen et al., 1991) ou de lymphoprolifération post-transplantation (Montone et al., 1996; Oudejans et al., 1995; Rea et al., 1994).

5.3.2 ZEBRA et carcinome indifférencié du nasopharynx (NPC)

Le carcinome indifférencié du nasopharynx (NPC) est étroitement lié à l'infection par le virus EBV (Busson et al., 2004). Cette maladie est caractérisée par une intense infiltration leucocytaire entretenant une réponse inflammatoire chronique qui participe au développement du cancer (Mantovani et al., 2008; Young and Rickinson, 2004). La chimiokine IL-8 a un rôle dans le chimiotactisme cellulaire lors des réactions inflammatoires et participe à l'angiogénèse. IL-8 est exprimée dans les tissus de NPC infectés par l'EBV (Yoshizaki et al., 2001). De récents travaux ont mis en évidence dans le promoteur d'IL-8 des séquences ZREs fixant ZEBRA. Dans des lignées cellulaires de NPC, ZEBRA active de manière importante l'expression d'IL-8 par une voie n'impliquant pas le facteur Egr-1 (early growth response) (Hsu et al., 2008). En effet, ce facteur qui est impliqué dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et la différenciation cellulaire, peut être aussi induit par ZEBRA (Chang et al., 2006). ZEBRA, en favorisant l'expression d'IL-8, pourrait favoriser l'infiltration leucocytaire associée aux tumeurs de NPC.

Les métalloprotéases de la matrice (MMPs) sont impliquées dans la dégradation physiologique de la matrice extracellulaire mais aussi dans la progression du processus tumoral (Coussens et al., 2002; Deryugina and Quigley, 2006). La protéine MMP-1 est surexprimée dans les biopsies de NPC (Lu et al., 2003). *In vitro*, ZEBRA activerait l'expression des métalloprotéases MMP-1 et MMP-9 par l'intermédiaire des sites AP-1 présents au niveau de leur promoteur. La survie et le pouvoir invasif des cellules exprimant ZEBRA seraient augmentés et cet effet serait directement corrélé à la production de MMP-1 ou MMP-9 (Lu et al., 2003; Yoshizaki et al., 1999).

L'instabilité du génome est définie par une augmentation de la fréquence de modifications génétiques répertoriées au niveau des chromosomes. L'instabilité génomique peut être une cause de développement de cancers (Hanahan and Weinberg, 2000). Des études récentes ont mis en évidence que le degré d'instabilité génomique et d'aberrations chromosomiques présentes dans des cellules de lignées de NPC EBV-positives était proportionnel à la fréquence de réactivations virales survenant dans ces cellules. Le pouvoir invasif des cellules de NPC était corrélé au nombre de réactivations virales subies par ces cellules, ainsi que leur pouvoir tumoral évalué sur des souris SCID (Fang et al., 2009). La réactivation fréquente du virus EBV est donc associée à des altérations chromosomiques de la cellule hôte qui pourraient contribuer à la carcinogénèse des cellules épithéliales. La protéine du cycle lytique BGLF5 qui possède une activité DNase, pourrait être impliquée directement

dans ces phénomènes d'instabilité génomique (Wu et al., 2010). Le rôle de ZEBRA dans l'induction de l'instabilité génomique semble indirect et lié à sa fonction initiatrice du cycle lytique.

Sur le plan clinique, des anticorps anti-ZEBRA sont retrouvés chez les patients atteints de NPC et pourraient représenter chez les jeunes patients un marqueur diagnostique et pronostique plus sensible que les anticorps IgA anti-VCA (Viral Capsid Antigen) et anti-EA (Early Antigen) (Dardari et al., 2000; Dardari et al., 2008). De même, l'expression de la protéine ZEBRA et d'autres protéines du cycle lytique est aussi détectée au niveau des tumeurs de NPC (Cochet et al., 1993; Martel-Renoir et al., 1995).

5.3.3 Résumé : rôle de ZEBRA dans l'oncogénèse

La protéine ZEBRA pourrait contribuer de différentes manières à la cancérogénèse. L'infection lytique initiée par ZEBRA permettrait au virus d'augmenter le pool de cellules infectées dans la tumeur par transmission horizontale de cellules à cellules des nouveaux virions produits. Les cellules nouvellement infectées permettent de renouveler et d'accroître le nombre de cellules en latence virale, mécanisme pouvant contribuer au développement de la tumeur (Kenney, 2006) (**Figure 11A**). En effet, bien que l'efficacité du traitement antiviral par aciclovir ou ganciclovir dans les lymphoproliférations liées à l'EBV soit controversée (Heslop, 2009), quelques études ont montré qu'un traitement préventif basé sur ces mêmes molécules pouvait réduire le risque de développement de syndrome lymphoprolifératif post-transplantation (Funch et al., 2005; Malouf et al., 2002; McDiarmid et al., 1998).

D'autre part, l'infection lytique survenant dans quelques cellules de la tumeur peut être abortive et ne pas conduire à la production de virions. L'expression de la protéine ZEBRA dans quelques cellules de la tumeur permet la stimulation autocrine et paracrine de cytokines et facteurs de croissance impliqués dans la prolifération cellulaire (**Figure 11B**). L'infection lytique abortive survenant dans quelques cellules pourrait créer un microenvironnement favorable au développement de la tumeur (Hsu et al., 2008; Jones et al., 2007; Tsai et al., 2009).

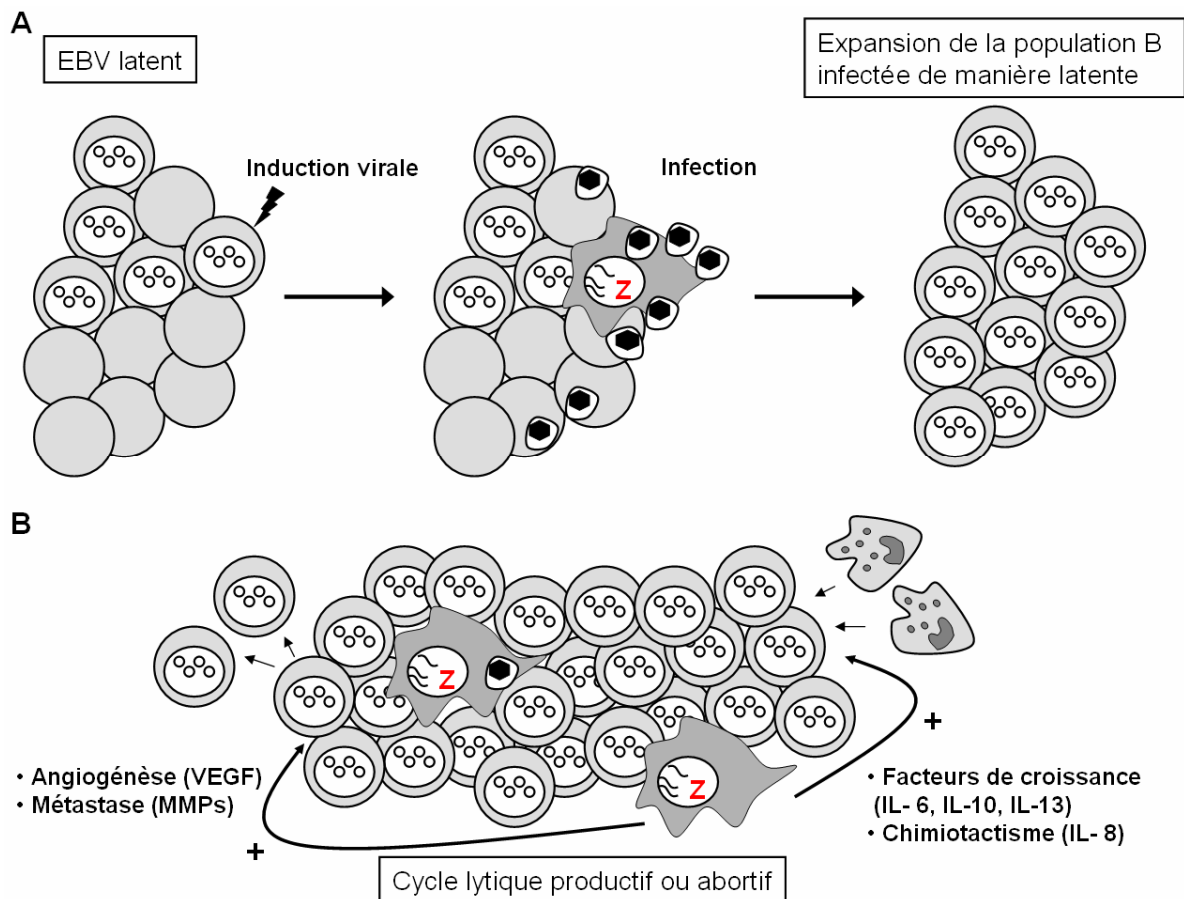


Figure 11: Représentation schématique du rôle de ZEBRA dans le développement tumoral (adapté de Kenney, 2006). **A)** Le cycle lytique induit par ZEBRA permet la production de virions capables d’infecter de nouvelles cellules B ce qui permet au final d’augmenter le réservoir de cellules B infectées de manière latente. **B)** La protéine ZEBRA, produite au cours d’un cycle lytique complet ou abortif, induit l’expression de cytokines, de facteurs de croissance ou de métalloprotéases (MMPs) contribuant à la croissance tumorale et à la pathogénie du cancer.

6. ZEBRA : aspects thérapeutiques

6.1 Inhibition de ZEBRA

Le cycle lytique de l’EBV peut être inhibé *in vitro* par l’action de l’aciclovir et du ganciclovir (Cheng et al., 1983; Datta et al., 1980). L’aciclovir et le ganciclovir sont des analogues nucléosidiques qui ont besoin d’être phosphorylés pour être actifs et incorporés dans l’ADN par la polymérase virale. Les cellules non infectées ou infectées de manière latente par l’EBV ne peuvent phosphoryler efficacement l’aciclovir ou le ganciclovir. Les

cellules en cycle lytique expriment une protéine kinase, produit du gène BGLF4 qui est responsable de la phosphorylation initiale de l'aciclovir et du ganciclovir (Meng et al.). En raison d'une meilleure tolérance, l'aciclovir ou ses dérivés est préférentiellement utilisé en pratique clinique pour soigner la leucoplasie orale chevelue (Walling et al., 2003). Le traitement de la mononucléose infectieuse par l'aciclovir n'apporte aucun bénéfice probablement en raison du rôle important de la réponse immune dans la physiopathologie de cette maladie (Torre and Tambini, 1999).

Les analogues nucléosidiques précédemment décrits ne sont pas actifs sur l'expression des gènes très précoces ZEBRA et Rta. Etant donné les effets de ZEBRA sur la cellule et son rôle probable dans la pathogénie des cancers, des études évaluant l'efficacité de molécules ciblant cette protéine, sembleraient utiles à envisager. D'autres molécules actives sur le cycle lytique du virus EBV ont été décrites (Gershburg and Pagano, 2005; Wang et al., 2009) mais peu d'entre elles sont capables d'inhiber la synthèse de ZEBRA (Chang et al., 2009b; Li et al., 2004; Lin et al., 2008). Des stratégies basées sur l'ARN interférence ont démontré leur efficacité *in vitro* pour inhiber l'expression de ZEBRA et son activité transactivatrice (Chang et al., 2004). Grâce à la résolution tridimensionnelle du domaine de dimérisation et de fixation à l'ADN de ZEBRA (Petosa et al., 2006), de nouvelles approches sont envisageables pour trouver des molécules inhibant ZEBRA.

6.2 Induction du cycle lytique par ZEBRA dans les cancers associés à l'EBV

Comme discuté précédemment, quelques cellules accomplissant un cycle lytique productif ou abortif pourraient aider à la croissance de tumeurs infectées par l'EBV. En revanche, l'induction du cycle lytique dans l'ensemble des cellules de la tumeur pourrait être une stratégie efficace pour traiter les cancers associés à l'EBV dont les cellules sont infectées pour la plupart de manière latente et expriment un nombre limité de protéines antigéniques. Etant donné que, dans ces pathologies, le virus EBV est présent dans les tissus malins et non pas dans les tissus sains, cette stratégie permettrait de cibler uniquement le tissu malade.

L'injection d'un vecteur adénoviral recombinant comportant les gènes BZLF1 et BRLF1 dans la tumeur de NPC induite chez la souris SCID a entraîné une régression de la tumeur alors que le vecteur contrôle n'avait aucun effet (Feng et al., 2002b). La même équipe a évalué une autre méthode basée sur la stimulation du cycle lytique des cellules tumorales infectées par différents agents physiques ou chimiques activant l'expression endogène des gènes BZLF1 et BRLF1. Différents agents utilisés dans des protocoles de chimiothérapie

(irradiation gamma ou médicaments cytotoxiques) sont capables d'induire le cycle lytique et de faire régresser la tumeur dans des modèles animaux de NPC ou de lymphomes (Feng et al., 2004; Feng et al., 2002a; Westphal et al., 2000). L'induction du cycle lytique permet l'utilisation des analogues nucléosidiques. Les stratégies d'induction du cycle lytique sont plus efficaces pour inhiber la croissance tumorale dans des modèles animaux quand elles sont combinées au ganciclovir (Daibata et al., 2005; Feng et al., 2004; Feng et al., 2002a; Westphal et al., 2000).

Des études cliniques basées sur l'association du ganciclovir à des agents utilisés en chimiothérapie semblent rationnelles à entreprendre dans l'objectif de traiter les cancers associés à l'EBV. Actuellement, peu d'études cliniques ont été menées pour évaluer cette stratégie chez les patients. Récemment, une étude a suivi la réponse virale post-chimiothérapie chez 21 enfants atteints de lymphome de Burkitt endémique et traité par cyclophosphamide. D'après les résultats, cet agent induirait une réactivation du cycle lytique chez certains malades suggérant que l'association cyclophosphamide – ganciclovir pourrait être efficace dans le traitement du lymphome de Burkitt endémique (Tang et al., 2010).

6.3 ZEBRA : protéine transductrice et outil thérapeutique ?

La protéine ZEBRA a la capacité de traverser les membranes cellulaires et de pénétrer dans les lymphocytes B à partir d'un compartiment extracellulaire (Mahot et al., 2005). Une étude récente a permis de mieux caractériser les propriétés transductrices de ZEBRA. Cette protéine possède une séquence peptidique localisée au niveau de son domaine basique et de dimérisation lui conférant la propriété d'être transportée à l'intérieur des cellules sans l'intervention d'un récepteur spécifique. Cette séquence spécifique, si elle est fusionnée à une autre protéine, permet l'internalisation de cette protéine d'intérêt dans le cytoplasme et son transport au niveau du noyau de la cellule cible (Rothe and Lenormand, 2008; Rothe et al., 2010). Les propriétés transductrices d'autres protéines ont été décrites et utilisées à des fins thérapeutiques (Kabouridis, 2003). La protéine ZEBRA, par ses propriétés transductrices, représente donc un outil de vectorisation de molécules ou de protéines thérapeutiques qui pourrait trouver des applications dans le domaine biomédical.

Conclusion

Le transactivateur viral ZEBRA (EB1, Zta) est une protéine essentielle à l'établissement de l'infection lytique et à la production virale du virus EBV. De nouveaux éléments de connaissance sont apparus ces dernières années, portant sur l'aspect structural de ZEBRA, ses fonctions transactivatrices régulées par la méthylation du génome et ses nouveaux effets décrits sur la cellule, contribuant à la pathogénie des cancers associés à l'EBV. Dans la mesure où les arguments associant ZEBRA à la tumorigénèse se confirment, de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à cibler le cycle lytique semblent importantes à explorer pour le traitement des cancers associés à l'EBV.

Chapitre 3 :

**Les jonctions serrées : les protéines NACos et
interaction jonctions serrées - virus**

Introduction

Les cellules épithéliales ou endothéliales d'un tissu animal sont reliées entre elles grâce à des structures spécialisées de la membrane plasmique, appelées jonctions intercellulaires. Ces jonctions intercellulaires jouent un rôle prépondérant dans la cohésion de l'ensemble du tissu en assurant l'attachement des cellules entre elles ou à la matrice extracellulaire et aux éléments du cytosquelette. D'une manière générale, deux cellules épithéliales adjacentes peuvent être unies par 4 types de jonctions intercellulaires distinctes qui sont les jonctions communicantes (« gap junctions »), les desmosomes, les jonctions adhérentes (*zonula adherens*), et les jonctions serrées (*zonula occludens*) (**Figure 13A, B**). Le complexe des jonctions épithéliales (« epithelial junctional complex ») regroupe classiquement les desmosomes, les jonctions adhérentes et les jonctions serrées, en excluant les jonctions communicantes dont la principale fonction consiste à former des canaux permettant aux petites molécules cytoplasmiques de passer d'une cellule à l'autre. Mon travail de thèse m'a conduit à caractériser l'ubiquitine comme une nouvelle protéine appartenant aux jonctions serrées des cellules. Les jonctions serrées ont longtemps été considérées comme une simple barrière sélective régulant le passage des ions et des molécules à travers l'espace paracellulaire. Les jonctions serrées formeraient un réseau complexe de protéines membranaires et cytoplasmiques essentielles au maintien de l'adhérence des cellules entre elles mais jouant aussi un rôle dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaires. Ce chapitre ne sera pas une revue exhaustive de la littérature sur les jonctions serrées et n'abordera que les éléments bibliographiques en rapport étroit avec mon sujet de thèse. Après une description concise de l'organisation moléculaire des jonctions serrées, nous focaliserons notre intérêt sur une nouvelle famille de protéines appartenant à ces structures, les protéines NACos (Nuclear and Adhesion Complex components) dont fait partie l'ubiquitine, puis nous montrerons le rôle important joué par les jonctions serrées dans la relation hôte-pathogène, notamment avec les virus.

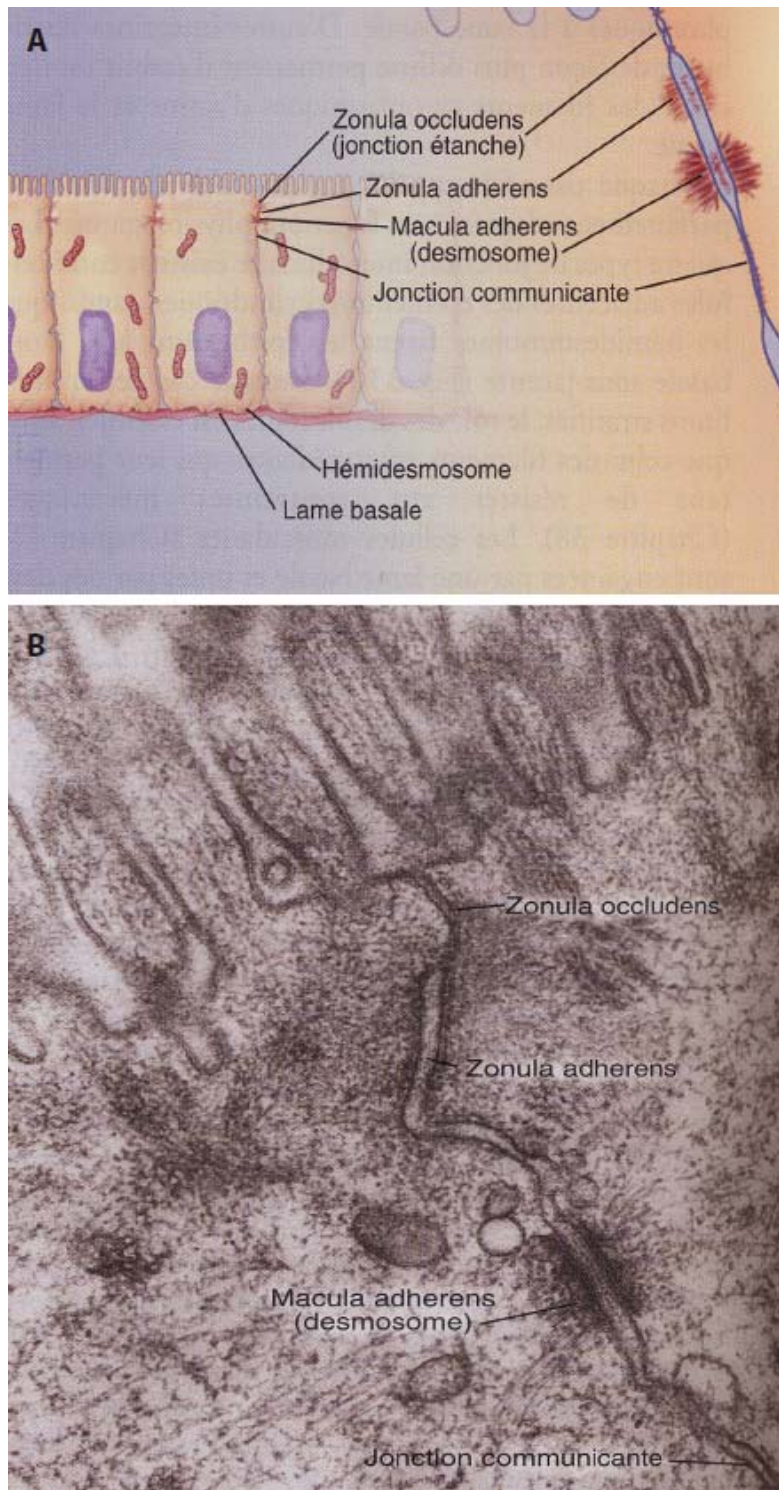


Figure 12 : Les jonctions intercellulaires des cellules épithéliales. **A)** Représentation schématique montrant les différentes jonctions intercellulaires d'une cellule épithéliale. Les jonctions serrées représentent l'élément le plus proche du domaine apical de la cellule. **B)** Micrographie électronique d'une coupe mince d'entérocytes. (D'après Pollard and Earnshaw, 2004).

1. Organisation moléculaire des jonctions serrées

1.1 Vue d'ensemble

En 1963, Farquhar et Palade décrivent en microscopie électronique les jonctions serrées comme l'élément jonctionnel le plus proche du domaine apical de la cellule épithéliale (**Figure 12A, B**) (Farquhar and Palade, 1963). Au niveau des jonctions serrées, les membranes cytoplasmiques des cellules adjacentes fusionnent sur de courtes distances au niveau de crêtes jonctionnelles encore appelées foyers de fusion. La juxtaposition de ces foyers de fusion conduit à la formation de lignes de fermetures qui s'entrecroisent constituant un réseau plus ou moins dense (**Figure 13A, B**). Les jonctions serrées ont aussi été appelées *zonula occludens* (ZO) car elles forment un anneau (ceinture) entourant le pourtour de la cellule (*zonula*) et permettent une occlusion complète de l'espace intercellulaire (*occludens*). Pour désigner les jonctions serrées, les termes de jonctions étanches et de jonctions imperméables sont également utilisés. Cette ZO constitue la « frontière » qui sépare, sur un plan physique et fonctionnel, le domaine apical du domaine baso-latéral de la cellule. De manière simplifiée, trois catégories de protéines participent à l'organisation moléculaire des jonctions serrées (**Figure 13C**):

- des protéines transmembranaires qui au niveau des foyers de fusion interagissent étroitement avec les molécules transmembranaires situées en vis-à-vis, à la façon d'une fermeture éclair.
- des protéines d'attachement intracellulaire ou adaptatrices qui se lient aux protéines transmembranaires. Au sein des jonctions serrées, ces protéines sous membranaires interagissent avec d'autres protéines cytoplasmiques et l'ensemble de ce réseau complexe de protéines forme une région appelée la plaque cytoplasmique (Guillemot et al., 2008).
- des protéines du cytosquelette qui s'insèrent sur les protéines de la plaque cytoplasmique. Les éléments du cytosquelette jouent un rôle crucial dans l'établissement et le maintien de l'intégrité des jonctions serrées.

Les jonctions serrées ne constituent pas une structure figée mais au contraire, un ensemble dynamique (Steed et al., 2010). Le trafic membranaire joue un rôle important dans cet aspect dynamique avec l'internalisation et le recyclage de protéines des jonctions serrées. L'importance du trafic membranaire dans la physiologie des jonctions serrées ne sera pas abordée dans ce chapitre (se référer à la revue (Yu and Turner, 2008)) mais sera évoquée en

traitant les interactions entre virus et protéines des jonctions serrées, ces derniers exploitant les mécanismes d'internalisation de la cellule au cours de leur infection des cellules épithéliales.

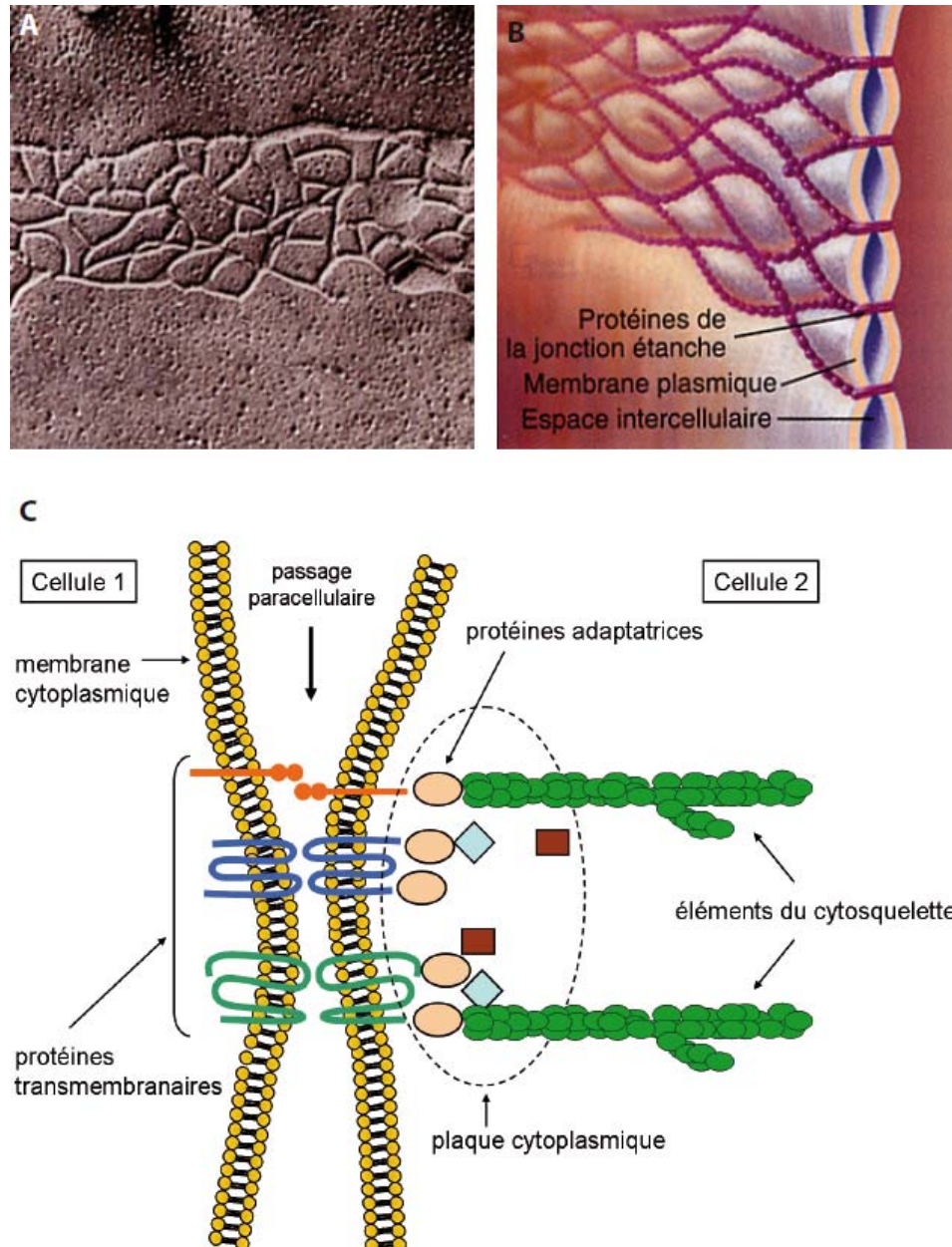


Figure 13 : Organisation structurale des jonctions serrées. A) Micrographie électronique d'une réplique de cryofracture de cellules épithéliales intestinales montrant l'alignement des brins aux sites de contact entre les membranes plasmiques ; d'après Pollard and Earnshaw, 2004. B) Schéma explicatif montrant que les brins aux points de contact sont constitués de protéines transmembranaires ; d'après Pollard and Earnshaw, 2004. C) Représentation de l'organisation moléculaire des jonctions serrées avec les protéines transmembranaires régulant la perméabilité cellulaire et reliées au cytosquelette par les protéines adaptatrices. La plaque cytoplasmique est formée d'un réseau complexe de protéines.

1.2 Les protéines transmembranaires

1.2.1 Les protéines à 4 domaines transmembranaires

Trois principales protéines transmembranaires ont été décrites au niveau des jonctions serrées : l'occludine, les claudines qui forment une famille de 24 membres et la tricelluline (Chiba et al., 2008). Ces protéines à 4 domaines transmembranaires possèdent deux boucles extracellulaires, une petite boucle intracellulaire et deux extrémités carboxy et amino-terminales intracellulaires (**Figure 14**).

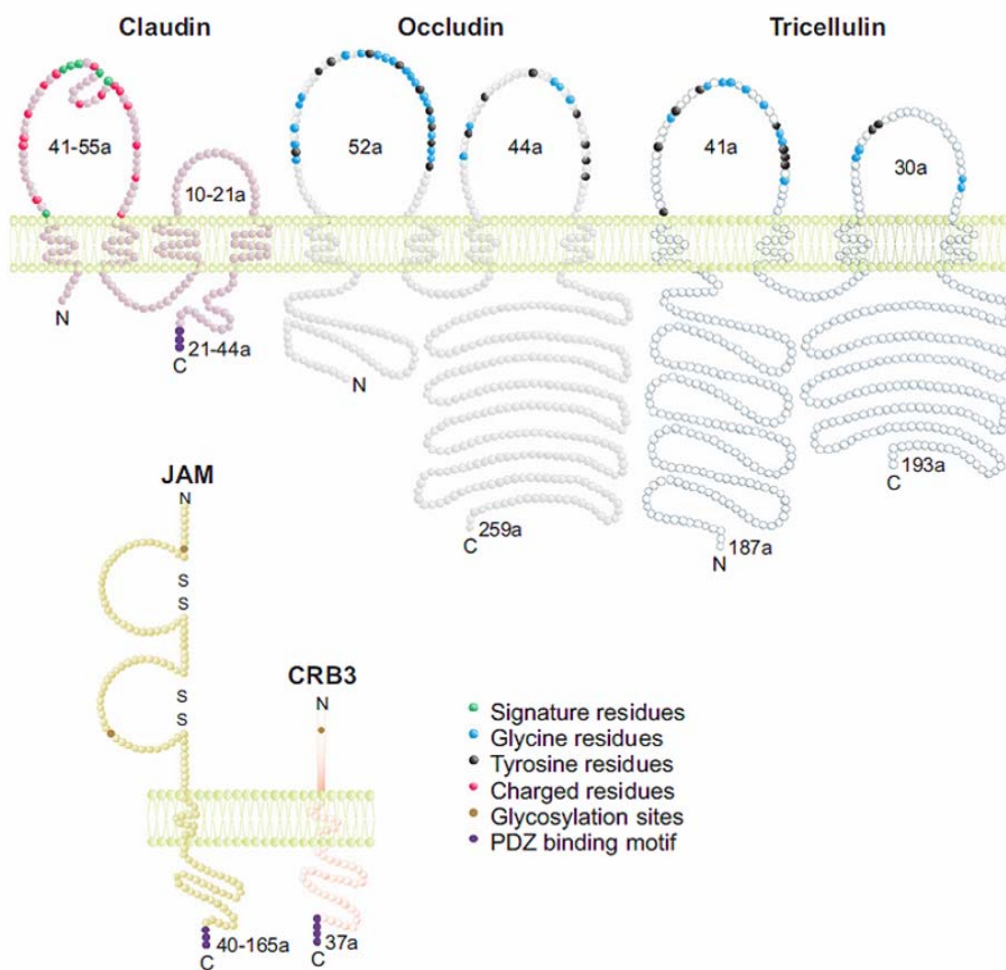


Figure 14 : Représentation schématique des principales protéines transmembranaires des jonctions serrées. Les claudines, l'occludine et la tricelluline possèdent 4 domaines transmembranaires tandis que les protéines JAM et CRB3 ne possèdent qu'un seul domaine transmembranaire. Le nombre de résidus présents au niveau des domaines extracellulaires et de l'extrémité C-terminale est indiqué. D'après Gonzalez-Mariscal et al., 2007.

L'occludine fut la première protéine transmembranaire identifiée au niveau des jonctions serrées (Furuse et al., 1993). Plusieurs arguments suggèrent que cette protéine ne joue pas un rôle fondamental dans l'organisation structurale des jonctions serrées. En effet, la non-expression de l'occludine dans les cellules épithéliales n'entraîne pas de changements significatifs au niveau de la morphologie et la physiologie des jonctions serrées (Saitou et al., 1998). De même, des souris transgéniques ne possédant plus le gène codant pour l'occludine restent viables (Saitou et al., 2000). Cependant, l'occludine régule la perméabilité paracellulaire, la diffusion intramembranaire des lipides et des protéines, et la migration transépithéliale des polynucléaires neutrophiles (Balda et al., 1996b; Huber et al., 2000). Cette protéine est associée à la régulation de plusieurs voies de signalisation cellulaire telles que la voie dépendante des MAP-kinases ou de la GTPase Rho A (Murata et al., 2005; Yu et al., 2005). L'occludine interagit avec plusieurs protéines adaptatrices de la plaque cytoplasmique (protéines ZO, cinguline) ou enzymes (kinases, phosphorylases) qui modulent son activité (Paris et al., 2008).

Les claudines (du latin *claudere*, fermer) jouent un rôle majeur dans la structure et la physiologie des jonctions serrées (revues (Furuse and Tsukita, 2006; Krause et al., 2008)). Toutes les isoformes de cette famille possèdent des similarités de séquences (W-GLW-C-C) au niveau de leur premier domaine extracellulaire. La partie carboxy-terminale des claudines comporte un domaine de liaison PDZ qui interagit avec plusieurs protéines PDZ de la plaque cytoplasmique tels que les protéines ZO, MUPP1 et PATJ. Ces interactions semblent importantes dans la régulation de l'assemblage des jonctions serrées. Les claudines jouent un rôle crucial dans la perméabilité sélective des jonctions serrées au niveau paracellulaire. Bien qu'aucune donnée structurale ne soit disponible à ce jour, les modèles actuels suggèrent que cette barrière sélective est formée par l'interaction des domaines extracellulaires de claudines issues de 2 cellules adjacentes. Les claudines sont capables de former des oligomères au sein de la même cellule (interaction en *cis*) ou avec les claudines des cellules adjacentes (interaction en *trans*). Ces interactions peuvent s'établir entre claudines de même isoforme (interaction homophile) ou d'isoformes différentes (interaction hétérophile). La perméabilité sélective des jonctions serrées est déterminée par la combinaison et la nature des interactions entre les différentes claudines exprimées par les cellules épithéliales dans un tissu donné. L'organisation moléculaire des claudines au sein des jonctions serrées permet la formation de pores qui régulent le passage des molécules suivant leur charge et leur taille (Anderson and Van Itallie, 2009). Plusieurs mutations affectant les gènes des claudines ont été décrites et associées à des maladies héréditaires (claudine 16, 19 et l'hypomagnésémie familiale avec

hyperclaciurie et néphrocalcinose, claudine 14 et la surdité héréditaire DFNB29) (Forster, 2008).

La tricelluline a été identifiée comme une protéine hautement enrichie au niveau des jonctions serrées qui sont établies au contact de 3 cellules épithéliales (« jonctions serrées tricellulaires ») (Ikenouchi et al., 2005). La tricelluline formerait un complexe avec l'occludine qui guiderait son assemblage au niveau de ces jonctions serrées tricellulaires (Ikenouchi et al., 2008) (Westphal et al., 2010). Cette protéine serait impliquée dans l'organisation structurale et la perméabilité paracellulaire des jonctions serrées (Ikenouchi et al., 2005).

1.2.2 Les protéines à un seul domaine transmembranaire

Les protéines JAM (Junctional Adhesion Molecules) sont des membres de la superfamille des immunoglobulines. Elles présentent un domaine extracellulaire caractéristique des protéines d'adhésion CTX (cortical thymocyte receptor in *Xenopus*) constitué de 2 boucles (une région distale de type variable V, et une région proximale de type constant C2), une région transmembranaire unique et un domaine C-terminal cytoplasmique comportant un motif de liaison aux protéines PDZ (**Figure 14**). Cette famille est divisée en 2 sous-groupes selon la similarité de leur séquence. Le 1^{er} sous-groupe comprend les protéines JAM-A, JAM-B et JAM-C. Le 2^{ème} sous-groupe est composé des protéines CAR (coxsackie and adenovirus receptor), ESAM (endothelial cell-selective adhesion molecule) et JAM4 (Ebnet et al., 2004). Ces protéines sont exprimées à la surface des cellules épithéliales et endothéliales, des plaquettes et des leucocytes. A l'image des claudines, elles peuvent aussi former des homodimères ou des hétérodimères via leur domaine extracellulaire avec d'autres protéines de la même cellule ou d'une cellule adjacente. En interagissant avec d'autres molécules d'adhésion cellulaires comme les intégrines, elles facilitent le recrutement et le passage des leucocytes entre les cellules endothéliales (Weber et al., 2007). Les protéines JAM interagissent aussi avec de nombreuses protéines PDZ de la plaque cytoplasmique telles que ZO-1, MAGI-1 ou PAR-3 (Ebnet et al., 2004). JAM-A pourrait réguler le développement de la polarité cellulaire en recrutant le complexe PAR-3/PAR-6/aPKC au niveau des jonctions serrées (Ebnet et al., 2003; Ebnet et al., 2001). Le rôle de JAM-C dans la polarisation cellulaire a aussi été mis en évidence durant la spermatogénèse (Gliki et al., 2004).

La protéine CRB3 (Crumbs homologue 3) est présente au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales. Seulement une faible fraction du pool cellulaire de la protéine

est associée aux jonctions serrées. Le domaine cytoplasmique de CRB3 comporte à son extrémité C-terminale un motif de liaison PDZ (**Figure 15**) qui interagit avec les protéines adaptatrices Pals1 et PAR-6. CRB3 forme un complexe avec les protéines Pals1 et PATJ qui sont impliquées dans l'établissement de la polarité cellulaire et le développement fonctionnel des jonctions serrées (Shin et al., 2006).

1.2.3 Autres protéines transmembranaires décrites

MarvelD3 a récemment été identifiée comme une protéine à 4 domaines transmembranaires localisée au niveau des jonctions serrées (Steed et al., 2009). MarvelD3 appartiendrait à une nouvelle famille de protéines appelée TAMP (tight junction associated MARVEL protein) incluant l'occludine et la tricelluline (Raleigh et al., 2010).

La protéine **Bves** est une protéine à 3 domaines transmembranaires associée aux jonctions serrées et interagissant avec la protéine adaptatrice ZO-1 (Osler et al., 2005; Osler et al., 2006). Cette protéine pourrait jouer un rôle dans le maintien de l'intégrité des cellules épithéliales.

1.3 Les protéines de la plaque cytoplasmique

Les protéines de la plaque cytoplasmique jouent un rôle crucial dans l'organisation structurale et la physiologie des jonctions serrées. Ces protéines forment un réseau complexe de protéines dont les multiples interactions sont encore peu connues (**Figure 15**). Ces protéines sont associées à diverses fonctions biologiques : liaison au cytosquelette, transduction de signaux, trafic membranaire, régulation de la transcription. Parmi ces protéines, certaines contiennent dans leur séquence des domaines PDZ leur permettant d'interagir avec des protéines transmembranaires ou d'autres protéines de la plaque cytoplasmique.

1.3.1 Les protéines ZO

La protéine adaptatrice **ZO-1** fut la première protéine identifiée au niveau des jonctions serrées (Stevenson et al., 1986). Les protéines ZO-1, **ZO-2** et **ZO-3** possèdent la même organisation moléculaire avec une région N-terminale comportant 3 domaines PDZ,

suivie d'un domaine SH3 (Src homology 3) et d'un domaine GUK (guanylate kinase). La région C-terminale de ZO-1 et ZO-2 comprend à proximité du domaine GUK des domaines riches en résidus acides. Les protéines ZO appartiennent à la famille des protéines MAGUK (Membrane Associated Guanylate Kinase) qui fonctionnent comme des chaperonnes moléculaires capables d'interagir avec de nombreuses protéines tels que des protéines transmembranaires, des éléments du cytosquelette ou des molécules impliquées dans la transduction de signaux (Gonzalez-Mariscal et al., 2000).

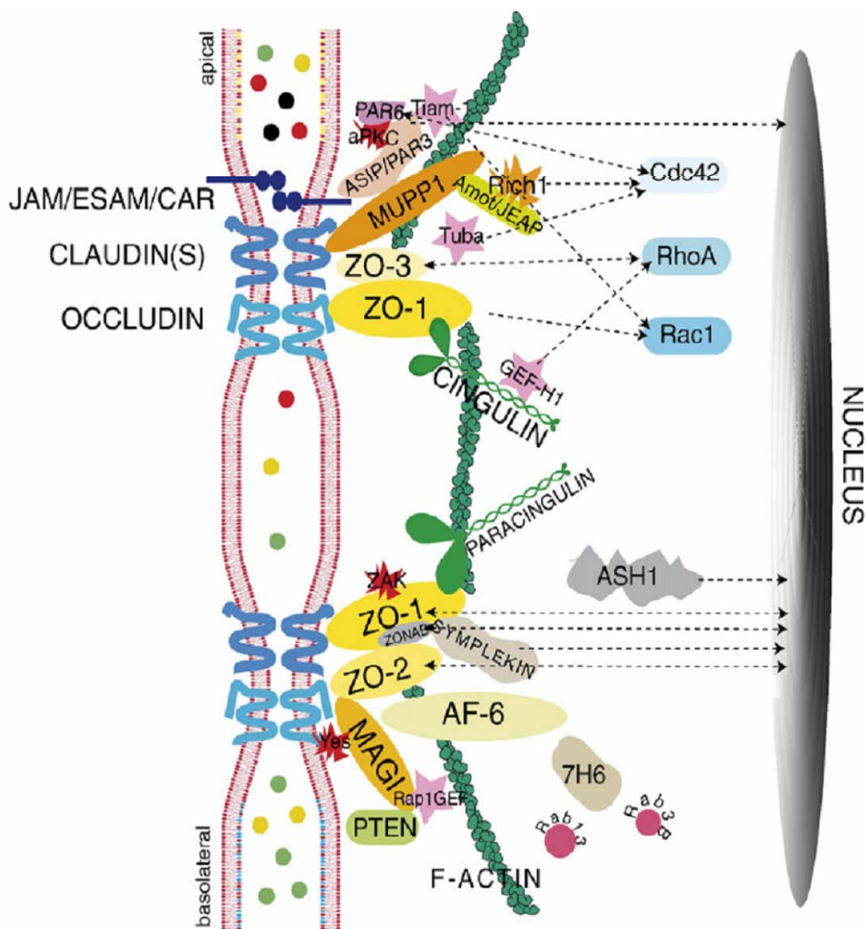


Figure 15 : La plaque cytoplasmique des jonctions serrées. Représentation schématique de différentes protéines présentes au niveau de la plaque cytoplasmique des jonctions serrées. Les protéines adaptatrices tels que ZO-1 lient les protéines transmembranaires aux éléments du cytosquelette. La plaque cytoplasmique contient des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire telles que PTEN, Cdc42, RhoA, ou le trafic membranaire (Rab). Certaines protéines naviguant entre les jonctions serrées et le noyau de la cellule (par exemple, la sympléctine, ZO-2, ZONAB, ASH1) appartiennent à la famille des protéines NACos (Schéma adapté de Guillemot et al., 2008).

Les protéines ZO occupent une place centrale au sein du réseau d'interactions protéiques siégeant au niveau de la plaque cytoplasmique. Le premier domaine PDZ de ZO-1, ZO-2 et ZO-3 se lie directement à l'extrémité C-terminale des claudines (Itoh et al., 1999). L'interaction entre les domaines PDZ de ZO-1 et ZO-2 avec les claudines est déterminante pour l'assemblage et la formation des jonctions serrées (Umeda et al., 2006). Les domaines SH3, GUK et acides (U5 et U6) de ZO-1 joueraient un rôle primordial dans la localisation correcte de la protéine et la polymérisation des claudines au sein de l'architecture des jonctions serrées (Fanning et al., 2007). Le second domaine PDZ de ZO-1 est responsable de l'homodimérisation et l'hétérodimérisation de la protéine avec les autres protéines ZO (Utepbergenov et al., 2006) ainsi que de sa liaison avec les connexines (Kausalya et al., 2001). La dimérisation semble importante pour les fonctions adaptatrices des protéines ZO et le recrutement adéquat des claudines au niveau des jonctions serrées (Umeda et al., 2006). Le troisième domaine PDZ et le domaine GUK de ZO-1 interagissent, respectivement, avec les protéines transmembranaires JAM-A (Itoh et al., 2001) et occludine (Schmidt et al., 2004). Le domaine SH3 de ZO-1 se lie à des protéines de signalisation telles que des kinases (Balda et al., 1996a), le facteur de transcription ZONAB (Balda and Matter, 2000) et la protéine Apg-2 (Tsapara et al., 2006) (cf paragraphe 2). La région C-terminale de ZO-1 est impliquée dans l'interaction directe de la protéine avec les éléments du cytosquelette (Fanning et al., 1998). ZO-1 interagit aussi de manière indirecte avec le réseau d'actine-myosine en se liant à des protéines telles que shroom2 (Etournay et al., 2007) ou la cinguline (Cordenonsi et al., 1999). ZO-1 pourrait réguler la perméabilité cellulaire par son interaction directe ou indirecte avec des protéines du cytosquelette et des voies de signalisation impliquées dans le contrôle dynamique du cytosquelette d'actine (Terry et al., 2010; Van Itallie et al., 2009).

ZO-2 et ZO-3 possèdent une organisation structurale semblable à ZO-1, avec une extrémité C-terminale plus courte (Guillemot et al., 2008). Comme ZO-1, ZO-2 et ZO-3 interagissent avec les claudines, l'occludine et l'actine. ZO-2 pourrait avoir des fonctions redondantes avec ZO-1 en favorisant l'assemblage des claudines au niveau des jonctions serrées (Umeda et al., 2006) ou en régulant la perméabilité paracellulaire (Hernandez et al., 2007). Les fonctions de ZO-3 n'ont pas encore été clairement établies. De nombreux éléments mettent en évidence un lien entre les protéines ZO et les jonctions adhérentes. Par exemple, l'interaction de ZO-1 avec le complexe nectine/afadine pourrait jouer un rôle dans le recrutement de la protéine au niveau des jonctions cellulaires (Yamada et al., 2006).

1.3.2 Les autres protéines PDZ

En dehors des protéines ZO, d'autres protéines PDZ sont retrouvées au niveau de la plaque cytoplasmique des jonctions serrées telles que les protéines MAGI (MAGUK with inverted domain structure), AF6/afadine, MUPP1 (multiPDZ protein) ou encore les protéines du complexe de polarité CRB3/Pals1/PATJ et PAR3/PAR6/aPKC (Guillemot et al., 2008). La protéine AF6/afadine semble essentielle à l'organisation des jonctions serrées à travers son interaction avec l'actine et sa capacité à moduler certaines voies de signalisation comme Ras/Rap1 (Boettner et al., 2000; Ikeda et al., 1999).

Deux voies de signalisation impliquées dans la polarité cellulaire et conservées au cours de l'évolution sont décrites au niveau des jonctions serrées. Bien que non entièrement élucidée, la voie CRB3/Pals1/PATJ régule l'assemblage des jonctions et la biogénèse de la membrane apicale dans les cellules épithéliales (Shin et al., 2006). L'autre voie implique le complexe PAR3/PAR6/aPKC qui fut d'abord caractérisé chez le nématode *Caenorhabditis elegans* comme un régulateur de la division cellulaire au cours de l'embryogénèse. La protéine PAR6 contient un domaine CRIB (Cdc42/rac interactive binding) capable de se lier à la forme active de la GTPase de la famille Rho, Cdc42 qui joue un rôle crucial dans l'établissement la polarité cellulaire. Cdc42 régulerait l'activation du complexe PAR3/PAR6/aPKC nécessaire pour promouvoir la maturation des jonctions serrées fonctionnelles (Shin et al., 2006).

1.3.3 Les protéines sans domaine PDZ

De nombreuses protéines sans domaine PDZ sont décrites au niveau de la plaque cytoplasmique (Guillemot 2008). La cinguline est une protéine adaptatrice qui lie les jonctions serrées au réseau d'actine et de myosine du cytosquelette. Cette protéine interagit avec ZO-1 qui permettrait son recrutement au niveau des jonctions serrées, (Umeda et al., 2004) mais aussi avec les autres protéines ZO (Cordenonsi et al., 1999). La cinguline ne semble pas jouer un rôle direct dans la structure et la physiologie des jonctions serrées (Paschoud and Citi, 2008). Cependant, par son interaction inhibitrice avec l'activateur de RhoA, GEF-H1 (guanine nucleotide exchange factor), la cinguline pourrait réguler l'expression de la claudine 2 et la formation des jonctions serrées (Guillemot and Citi, 2006). Les protéines JACOP/paracingulin et de la famille des angiomotines sont aussi retrouvées dans les jonctions serrées mais leur rôle est encore peu connu.

Comme déjà évoqué précédemment, la plaque cytoplasmique contient aussi une grande diversité de protéines impliquées dans la transduction de signaux: des kinases, des phosphatases telles que PTEN (phosphatase and tensin homolog) ou PP2A, des régulateurs du trafic membranaire (Rab 13, Rab 3A...) ou des régulateurs de l'activité des GTPases (RhoA, Rac1, Cdc42) (se référer à (Gonzalez-Mariscal et al., 2008) pour une revue détaillée).

2. Les protéines NACos (Nuclear and Adhesion Complex components)

Parmi les protéines présentes au sein de la plaque cytoplasmique des jonctions serrées, certaines possèdent une autre localisation, le noyau des cellules épithéliales (**Figure 15**). Ces protéines qui naviguent entre ces deux compartiments cellulaires font partie de la famille des protéines NACos qui regroupe les protéines associées à la fois au complexe jonctionnel et au noyau des cellules épithéliales (Balda and Matter, 2003). Dans ce chapitre, nous citerons quelques exemples de protéines NACos associées aux jonctions serrées et impliquées dans la régulation de l'expression de gènes et le contrôle de la différenciation et la prolifération cellulaires.

2.1 ZO-1 et le facteur de transcription ZONAB

Le facteur de transcription ZONAB/DbpA (ZO-1 associated nucleic-acid-binding protein/DNA binding protein A) active l'expression de protéines du cycle cellulaire telles que la cycline D1 et PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). ZONAB agit aussi comme un répresseur du promoteur du gène *erbB2* qui exprime un récepteur tyrosine kinase de la famille des récepteurs à l'EGF (Epidermal Growth Factor) jouant un rôle dans la différenciation épithéliale (Balda et al., 2003; Balda and Matter, 2000; Sourisseau et al., 2006). ZO-1 interagit via son domaine SH3 avec ZONAB et régule l'activité du facteur de transcription en influençant sa localisation cellulaire. Dans des cellules non confluentes, ZO-1 étant peu exprimée, ZONAB est sous forme libre, s'accumule dans le noyau et agit comme un répresseur du gène *erbB2*. A l'inverse, dans des cellules confluentes, ZONAB est séquestré dans les jonctions serrées en raison de son association avec ZO-1 et ne peut plus jouer son rôle de répresseur nucléaire. La régulation de l'expression du récepteur *erbB2* par ZONAB et ZO-1 révèle donc un mécanisme original par lequel les jonctions serrées régulent l'expression

de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire (Balda and Matter, 2000). D'autre part, la séquestration de ZONAB au niveau cytoplasmique par ZO-1 est associée à une réduction de la prolifération cellulaire (Balda et al., 2003). Cet effet peut être attribué à la diminution de l'activation de la transcription de gènes du cycle cellulaire par ZONAB (Sourisseau et al., 2006) mais aussi par un autre mécanisme dépendant encore de la densité cellulaire. En effet, ZONAB interagit avec la protéine CDK4 (Cell Division Kinase) qui possède aussi une double localisation cellulaire, le noyau et les jonctions serrées. Dans des cellules confluentes, la réduction du niveau d'expression nucléaire de ZONAB entraîne aussi une diminution de l'expression nucléaire de CDK4. En recrutant ZONAB au niveau des jonctions serrées, ZO-1 prévient aussi l'accumulation nucléaire de CDK4 et ses effets sur le cycle cellulaire (Balda et al., 2003). Au final, ZO-1, en régulant l'activité et la localisation cellulaire de la protéine NACos ZONAB, agirait comme un inhibiteur de la prolifération cellulaire et favoriserait la différenciation des cellules épithéliales.

La voie de signalisation mettant en jeu le complexe ZONAB/ZO-1 peut être régulée par des protéines interagissant avec l'une ou l'autre de ces protéines. ZONAB interagit avec la protéine à activité GTPase, RalA. La formation du complexe ZONAB/RalA au niveau des jonctions est augmentée avec le degré de confluence cellulaire empêchant ZONAB d'exercer son rôle répresseur sur le promoteur du gène *erbB2* (Frankel et al., 2005). ZO-1 interagit avec la protéine de choc thermique Apg-2 qui se localise partiellement au niveau des jonctions intercellulaires. Apg2, en rentrant en compétition avec ZONAB pour la fixation avec le domaine SH3 de ZO-1, pourrait favoriser l'activité transcriptionnelle de ZONAB (Tsapara et al., 2006).

2.2 ZO-2 et régulation de l'expression des gènes et de la prolifération cellulaires

ZO-2 est une protéine NACos dont la localisation cellulaire dépend du degré de confluence des cellules épithéliales en culture. ZO-2 est localisée au niveau des jonctions serrées des cellules en confluence alors qu'elle se concentre dans le noyau des cellules prolifératives non confluentes. La séquence de ZO-2 contient des signaux d'import et d'export nucléaires jouant un rôle dans la navigation de la protéine entre le noyau et les jonctions serrées (Gonzalez-Mariscal et al., 2006; Islas et al., 2002). Dans le noyau, ZO-2 est associée à des composants du transcriptosome tels que le facteur d'épissage SC-35 (Islas et al., 2002), la protéine KyoT2 (Huang et al., 2002) et le facteur SAF-B (Scaffold Attachment factor B) qui interagit au niveau du domaine PDZ1 de ZO-2 (Traweger et al., 2003). ZO-2 interagit au

niveau de son extrémité C-terminale avec des facteurs de transcription tels que Jun, Fos et C/EBP (Betanzos et al., 2004). De manière originale, l'interaction de ZO-2 avec ces facteurs de transcription survient à la fois au niveau nucléaire mais aussi au niveau des jonctions serrées de cellules confluentes en culture. Dans des expériences de gènes rapporteurs, ZO-2 diminue la transcription de gènes placés sous le contrôle d'un promoteur de type AP-1. Ces observations suggèrent que ZO-2 pourrait réguler l'activité des facteurs de transcription Jun, Fos et C/EBP en les recrutant au niveau des jonctions serrées (Betanzos et al., 2004). Récemment, des études ont montré que ZO-2 inhibe la prolifération cellulaire en interférant avec la transcription, la traduction et la dégradation de la cycline D1 (Huerta et al., 2007; Tapia et al., 2009). Élément corroborant ces travaux, certains cancers ont, en effet, été associés à une diminution de l'expression de ZO-2 (Gonzalez-Mariscal et al., 2007).

2.3 Symplékine : régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaire

La symplékine fut la première protéine NACos identifiée. Cette protéine est retrouvée dans tous les noyaux des cellules et au niveau des jonctions serrées des cellules épithéliales (Keon et al., 1996). Au niveau nucléaire, la symplékine est impliquée dans la maturation et la polyadénylation des ARNm favorisant ainsi leur stabilité et leur traduction (Hofmann et al., 2002; Takagaki and Manley, 2000). Par exemple, dans des cellules subissant un stress, la symplékine interagit avec HSF-1 (heat shock inducible transcription factor) pour réguler la polyadénylation de l'ARNm de la protéine HSP 70 (Xing et al., 2004). La symplékine est aussi essentielle pour la maturation de l'extrémité 3' non polyadénylée des ARNm des histones (Kolev and Steitz, 2005). De récents travaux ont montré le rôle important joué par la symplékine dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaires ainsi que la physiologie des jonctions serrées. Kavanagh et al (2006) ont montré que la symplékine interagit avec le facteur de transcription ZONAB au niveau du noyau et des jonctions serrées. La symplékine en formant un complexe avec ZONAB, permet l'accumulation du facteur de transcription dans le noyau favorisant ainsi l'expression de la cycline D1 et la prolifération des cellules épithéliales (Kavanagh et al., 2006). La symplékine coopère aussi avec ZONAB pour réguler négativement la différenciation des cellules de la bordure en brosse de l'épithélium intestinal. Le complexe symplékine-ZONAB agirait comme un répresseur du facteur de transcription AML1/Runx1 impliqué dans l'activation de KLF4, facteur clé de la différenciation des cellules épithéliales (Buchert et al., 2009). De plus, le complexe symplékine/ZONAB induirait une diminution de la polarité cellulaire et une augmentation de

la perméabilité paracellulaire en activant la transcription de la claudine 2. La claudine 2 préviendrait aussi la relocalisation de ZONAB en dehors du noyau facilitant ainsi l'activité du facteur de transcription et son effet sur la prolifération cellulaire. La sympléchine jouerait aussi un rôle tumorigène par son effet activateur sur la claudine 2 (Buchert et al., 2010).

2.4 HuASH1 et régulation épigénétique

Le facteur de transcription huASH1 est l'orthologue humain de la protéine ASH1 (absent, small, or homeotic discs) découvert chez la drosophile. HuASH1 colocalise avec des marqueurs des jonctions serrées comme la cinguline ou ZO-1 (Nakamura et al., 2000). Au niveau nucléaire, cette protéine fonctionne comme une méthyltransférase et régule le remodelage de la chromatine et l'expression des gènes (Beisel et al., 2002). De plus, huASH1 interagit avec des complexes à activité HDAC (histone déacétylase) impliqués dans la répression épigénétique de l'expression des gènes (Tanaka et al., 2008). Cependant, l'importance fonctionnelle de la localisation de huASH1 au niveau des jonctions serrées reste encore à établir.

2.5 La protéine LYRIC

La protéine LYRIC/AEG-1 (Lysine rich CEACAM1 associated protein/astrocyte elevated gene) a été identifiée à l'origine comme un composant des jonctions serrées où elle co-localise avec ZO-1 (Britt et al., 2004). D'autres localisations cellulaires ont ensuite été retrouvées pour la protéine dont le noyau des cellules épithéliales (Sutherland et al., 2004). Malgré le manque de connaissances sur les fonctions de LYRIC au niveau des jonctions serrées, cette protéine peut être considérée comme une protéine NACos en raison de ses caractéristiques de localisations cellulaires. Quelques études suggèrent que LYRIC pourrait agir comme un oncogène et promouvoir la tumorigénèse (Emdad et al., 2006; Lee et al., 2008). Récemment, le facteur de transcription répresseur PLZF (Promyelocytic Leukaemia Zinc Finger) a été identifié comme un partenaire de la protéine LYRIC nucléaire (Thirkettle et al., 2009b). PLZF joue un rôle dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la croissance cellulaire et l'apoptose tels que c-myc (Bernardo et al., 2007). Dans des cellules tumorales surexprimant LYRIC, cette protéine inhiberait l'activité répressive de PLZF favorisant ainsi la survie cellulaire et la progression tumorale (Thirkettle et al., 2009b).

3. Interaction des virus avec les protéines des jonctions serrées

Les épithéliums des muqueuses font partie des premiers moyens de défense naturelle dont dispose l'hôte pour lutter contre les agressions d'origine infectieuse. Au sein des épithéliums, les jonctions serrées jouent le rôle de barrière, empêchant les agents pathogènes de traverser les espaces intercellulaires. Des microorganismes tels que certaines bactéries, des virus ou encore des parasites se sont adaptés, développant des stratégies pour altérer la barrière épithéliale et diffuser dans l'organisme (Sousa et al., 2005). Parmi les agents pathogènes, certains virus ciblent et interagissent avec des protéines des jonctions serrées pour les détruire en vue de disséminer dans l'organisme et infecter de nouveaux hôtes. De manière parallèle, d'autres virus se servent des jonctions serrées comme récepteur facilitant leur infection des cellules épithéliales (Bergelson, 2009).

3.1 Virus utilisant les jonctions serrées comme récepteurs

3.1.1 Interactions avec le récepteur CAR (Coxsackie and Adenovirus Receptor)

CAR est une protéine des jonctions serrées de la famille des JAM (voir paragraphe 1.2.2) et le récepteur cellulaire des coxsackievirus B (CVB) et des adénovirus de sérotype 2 et 5 (Bergelson et al., 1997). Une étude récente a montré l'importance de la protéine CAR dans la pathogénèse du CVB. La délétion du gène CAR chez la souris diminue fortement sa susceptibilité à l'infection et la protège des conséquences cliniques de l'infection virale au niveau du cœur et du pancréas (Kallewaard et al., 2009). Bien que le récepteur CAR joue un rôle crucial dans l'infection du CVB, cette protéine ne représente pas la première cible du virus au cours du cycle viral. En effet, lors de l'entrée du virus au niveau de la surface apicale de la cellule épithéliale, CAR n'est pas accessible en raison de son confinement au sein des jonctions serrées. Dans les cellules polarisées, le CVB interagit alors avec un autre récepteur, appelé DAF (decay accelerating factor), largement exprimé au niveau de la membrane apicale (Bergelson et al., 1995). En engageant cette interaction, le CVB active des voies de signalisation impliquant les protéines Abl kinase et Rac GTPase agissant sur le remodelage du cytosquelette. Ce réarrangement du réseau d'actine au niveau apical facilite alors la migration

du virus au niveau de la région des jonctions serrées et sa liaison au récepteur CAR. L'interaction de CVB avec CAR déstabilise les jonctions serrées et déclenche un changement conformationnel de la capsid virale permettant la poursuite du cycle viral et le relargage de l'ARN génomique du CVB dans le cytoplasme (Coyne and Bergelson, 2006). Une autre protéine des jonctions serrées semble essentielle pour le bon déroulement du cycle viral du CVB : l'occludine (Coyne et al., 2007). Lors de l'entrée du CVB dans la cellule, l'occludine est internalisée de manière concomitante dans le cytoplasme dans des vésicules de macropinocytose suivant un mécanisme commun au virus, dépendant de la cavéoline. Bien que l'occludine n'interagisse pas directement avec le CVB, la déplétion en occludine prévient l'entrée du virus dans le cytoplasme et inhibe l'infection. Le virus pourrait exploiter les mécanismes d'internalisation décrits pendant le remodelage des jonctions serrées (voir revue (Yu and Turner, 2008)) et se servirait de l'occludine comme protéine capable de recruter des molécules de signalisation essentielles à la poursuite de son cycle viral (Coyne et al., 2007). La même équipe a récemment mis en évidence que, dans des cellules épithéliales non polarisées, le mécanisme d'infection du CVB était différent, indépendant du récepteur DAF et impliquant une autre voie d'internalisation (Patel et al., 2009).

Le récepteur CAR joue aussi un rôle crucial dans l'infection des adénovirus de sérotype 2 et 5 (Medina-Kauwe, 2003). L'entrée du virus est initiée par l'interaction des glycoprotéines de la capsid virale avec l'extrémité N-terminale de la protéine CAR. Le virus se lie ensuite aux intégrines présentes à la surface de la cellule épithéliale ce qui provoque son internalisation par macropinocytose et selon une voie clathrine-dépendante (Meier et al., 2002). Le virus utilise alors les éléments du cytosquelette cellulaire pour gagner le noyau et se répliquer. La sortie du virus au niveau apical de la cellule implique de nouveau la protéine CAR qui lie les glycoprotéines des virions néoformés. L'interaction CAR-glycoprotéines virales étant de plus forte affinité que l'interaction des homodimères CAR-CAR, ce mécanisme conduit à la rupture de l'intégrité des jonctions serrées permettant ainsi au virus de sortir de la cellule et d'infecter de nouveaux hôtes (Walters et al., 2002).

3.1.2 Le virus de l'hépatite C (VHC) et les protéines claudines et occludine

Le virus de l'hépatite C utilise deux types de protéines transmembranaires des jonctions serrées, les claudines et l'occludine, pour infecter les hépatocytes (Evans et al., 2007; Ploss et al., 2009). Même si d'autres co-récepteurs cellulaires ont été identifiés, ces 2 protéines sont essentielles au VHC pour initier son cycle viral. Le virus interagit via ses

glycoprotéines d'enveloppe de manière très spécifique avec le premier domaine extracellulaire de la claudine-1 et le second de l'occludine. L'entrée du VHC nécessite l'internalisation du virus dans les endosomes et la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. La claudine -1 serait impliquée dans cette étape de fusion membranaire, dépendante d'un bas pH (Evans et al., 2007). D'autres isoformes des claudines, telles que les types 6 et 9, ont été identifiées comme co-récepteurs du VHC mais celles-ci sembleraient jouer un rôle moins important dans l'infection des hépatocytes que la claudine-1 (Meertens et al., 2008). Ces protéines transmembranaires essentielles pour l'infection du virus représentent autant de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter les patients atteints d'hépatite C chronique. De récentes études ont montré, en effet, que l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la claudine-1 permettait de réduire de manière efficace l'infection *in vitro* des hépatocytes (Fofana et al., 2010; Krieger et al., 2010).

3.1.3 Les réovirus et la protéine JAM-A

Les réovirus sont ubiquitaires et possèdent un large spectre d'hôtes. Leur rôle en pathologie humaine est mineur : ils peuvent être responsables de gastro-entérites ou de manifestations respiratoires non graves chez l'enfant. Les réovirus utilisent la protéine JAM-A des jonctions serrées comme principal récepteur pour infecter les cellules épithéliales ou endothéliales (Antar et al., 2009; Barton et al., 2001). Une étude récente chez la souris a démontré le rôle crucial de JAM-A dans la diffusion hématogène des réovirus. Des souris transgéniques JAM-A^{-/-} et infectées *per os* par des réovirus maintiennent une réplication virale au niveau de leurs cellules épithéliales intestinales suggérant l'existence de co-récepteurs, autres que JAM-A, permettant l'infection. Cependant, ces souris JAM-A^{-/-} ne permettent pas la diffusion hématogène du virus et leurs cellules endothéliales ne sont pas susceptibles à l'infection. Ces résultats suggèrent donc que l'expression de la protéine JAM-A au niveau de l'endothélium est essentielle à la diffusion hématogène du virus (Antar et al., 2009).

3.2 La déstabilisation des jonctions serrées comme instrument de la pathogénèse

3.2.1 Exemples des rotavirus, du VIH et des arboviroses

Les rotavirus sont des virus non-enveloppés à ARN responsables d'épidémies de gastroentérites. Pendant l'infection, la glycoprotéine VP4 de la capsidie des rotavirus est clivée et donne naissance au fragment VP8 qui interfère avec la localisation de protéines des jonctions serrées tels que la claudine-3, ZO-1 et l'occludine. Ces changements induisent une rupture de l'intégrité des jonctions serrées durant l'infection (Beau et al., 2007; Nava et al., 2004; Obert et al., 2000). Le mécanisme par lequel VP8 interfère avec les jonctions serrées est inconnu mais VP8 pourrait rentrer en compétition avec les homodimères d'occludine obstruant l'espace intercellulaire (Nava et al., 2004). Les rotavirus produisent aussi une entérotoxine appelée NSP4. L'exposition à long terme de cette toxine sur des cellules MDCK cause une augmentation de la perméabilité paracellulaire et inhibe le recrutement de ZO-1 au niveau des jonctions intercellulaires (Tafazoli et al., 2001).

Une étude récente a suggéré que le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine) pourrait entraîner une altération de l'intégrité de la barrière des muqueuses épithéliales et favoriser ainsi l'infection par d'autres agents pathogènes (Nazli et al., 2010). Des cultures primaires de cellules épithéliales provenant de la sphère génitale féminine ont été exposées au VIH pour observer l'effet du virus sur la barrière épithéliale. L'exposition au VIH était associée à une dégradation des protéines des jonctions serrées claudines (isoformes 1,2 et 4), occludine et ZO-1 et à une augmentation de la perméabilité paracellulaire. La glycoprotéine d'enveloppe gp120 semble directement impliquée dans l'altération de la barrière épithéliale via l'activation de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α (Nazli et al., 2010).

Le virus de la dengue et le virus West Nile (WNV) sont deux arbovirus de la famille des *Flaviviridae* transmis par deux différentes espèces de moustiques. De récents travaux ont montré que ces virus pouvaient interférer avec des protéines des jonctions serrées pour assurer leur pathogénèse. *In vivo*, l'infection par le WNV entraîne une diminution de l'expression des claudines au niveau des cellules épithéliales du tubule rénal de souris. L'infection de cellules épithéliales en culture est associée à une augmentation de la perméabilité membranaire. Cet effet semble relié à la capsidie du virus qui activerait la dégradation des claudines au niveau des lysosomes. La perte de l'intégrité des jonctions serrées au niveau des cellules épithéliales pourrait favoriser la dissémination du virus dans l'organisme (Medigeshi et al., 2009). Une étude protéomique menée sur un modèle cellulaire endothélial a identifié les protéines dont

l'expression était altérée suite à l'infection par le virus de la dengue. Parmi ces protéines, certaines sont associées au cytosquelette et aux jonctions cellulaires, comme la protéine des jonctions serrées ZO-1. Ces résultats, confirmés sur le plan fonctionnel, pourraient expliquer l'augmentation de la perméabilité vasculaire observée dans les cas graves de dengues hémorragiques (Kanlaya et al., 2009).

3.2.2 Les virus oncogènes

La relation entre jonctions serrées et cancer est bien documentée (voir revue (Gonzalez-Mariscal et al., 2007)). Par exemple, l'expression des protéines des jonctions serrées dans différents carcinomes est souvent diminuée ou augmentée. D'autre part, la perte de la fonctionnalité des jonctions serrées peut être associée à la progression du cancer et à l'apparition de métastases. Enfin, nous avons abordé précédemment, dans le chapitre traitant des protéines NACos, le fait que les jonctions serrées jouaient un rôle dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaires. Certaines protéines des jonctions serrées sont ciblées par des oncoprotéines virales révélant aussi le lien entre protéines des jonctions serrées, virus et cancers.

Les virus HPV (Human Papilloma Virus) oncogènes sont les principaux agents étiologiques des cancers du col de l'utérus. La protéine E6 est considérée comme le déterminant majeur du pouvoir oncogène des virus HPV à haut risque. Cette protéine possède des motifs de liaison aux domaines PDZ qui interagissent avec les protéines des jonctions serrées MUPP1 (Lee et al., 2000), MAGI-1 (Glaunsinger et al., 2000; Thomas et al., 2001) et PATJ (Storrs and Silverstein, 2007). La protéine E6 cible ces protéines PDZ pour les dégrader dans le protéasome. L'expression de E6 dans les cellules épithéliales déstabilise les jonctions serrées et induit une mauvaise localisation de ZO-1 (Nakagawa and Huibregtse, 2000). Une partie du pouvoir oncogène de la protéine E6 pourrait être reliée à ses effets sur les jonctions serrées mais les mécanismes précis mis en jeu ne sont pas encore établis.

Les adénovirus peuvent induire des tumeurs chez l'animal et transformer les cellules fibroblastiques de rongeurs. Le pouvoir oncogène de l'adénovirus humain de sérotype 9 est lié à la protéine E4-ORF1 qui contient dans sa séquence des motifs de liaisons aux protéines PDZ. Cette oncoprotéine interagit à ce niveau avec les protéines des jonctions serrées ZO-2, MAGI-1, MUPP1 et PATJ en les séquestrant dans le cytoplasme des cellules fibroblastiques (Glaunsinger et al., 2000; Glaunsinger et al., 2001; Latorre et al., 2005; Lee et al., 2000). Dans

des cellules épithéliales, E4-ORF1 inhibe la localisation de PATJ et ZO-2 au niveau des jonctions serrées et altère l'intégrité de la barrière épithéliale et de la polarité cellulaire (Latorre et al., 2005). En interférant avec la localisation de ZO-2, E4-ORF1 inhiberait son activité antiproliférative et anti-tumorale (Glaunsinger et al., 2000; Tapia et al., 2009).

Le pouvoir oncogène du virus SV40 (Simian Virus) est établi chez l'animal mais encore discuté chez l'homme (Javier and Butel, 2008). La protéine oncogène sTag (small tumor antigen) du SV40 interagit avec la phosphatase PP2A localisée au niveau de la plaque cytoplasmique des jonctions serrées où elle induit la déphosphorylation des protéines ZO-1, occludine et claudine-1 (Gonzalez-Mariscal et al., 2008). Au cours de l'infection par le SV40, la protéine sTag forme un complexe avec PP2A inactivant son activité au niveau des jonctions serrées. La surexpression de sTag dans les cellules épithéliales entraîne une désorganisation du réseau du cytosquelette et une altération des propriétés de barrière des jonctions serrées pouvant expliquer le rôle du SV40 dans la transformation des cellules épithéliales (Nunbhakdi-Craig et al., 2003).

Conclusion

L'intérêt porté par les scientifiques aux jonctions serrées est grandissant. Les connaissances sur ces structures évoluent rapidement. Considérées initialement comme de simples barrières régulant la perméabilité paracellulaire, les jonctions serrées sont composées en réalité d'un réseau protéique dense et dynamique régulant de multiples fonctions dans la cellule. En particulier, une nouvelle famille de protéines pouvant naviguer entre les jonctions serrées et le noyau des cellules a été décrite ces dernières années : la famille des protéines NACos. Ces protéines sont impliquées entre autres, dans la régulation de l'expression des gènes, et le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaires. Fait intéressant, les protéines des jonctions serrées sont aussi la cible d'agents pathogènes, comme les virus. Ces derniers peuvent se servir de ces structures pour infecter les cellules épithéliales et accomplir leur cycle viral, ou les déstabiliser pour disséminer dans l'organisme.

RESULTATS

Partie I :

Caractérisation de l'ubiquitine au niveau des jonctions serrées des cellules

1. Introduction : découverte et caractérisation de l'ubinucléine

L'ubinucléine (Ubn-1) fut découverte en 2000 grâce à la collaboration de deux équipes travaillant dans des domaines de recherche différents (Aho et al., 2000). La première équipe, actuellement dirigée par le Dr Evelyne Manet (INSERM U758-ENSL) identifia l'ubinucléine en recherchant les partenaires cellulaires de ZEBRA par criblage d'une banque de phage d'ADNc. La seconde équipe, comprenant le Dr Sirpa Aho (Université Thomas Jefferson de Philadelphie), isola le gène de l'ubinucléine en caractérisant la périplakine, une autre protéine située sur le même locus que l'ubinucléine au niveau du chromosome 16.

L'ubinucléine est une protéine basique (pI 9,34) de 1164 résidus (PM 120 kDa), riche en acides aminés sérine et lysine. Les prédictions de structure secondaire suggèrent que la région N-terminale de la protéine, composée d'acides aminés chargés, forme plusieurs hélices α , alors que la région C-terminale, composée d'acides aminés polaires et apolaires, est flexible avec une prédominance de feuillets β . La région N-terminale contient 5 domaines composés majoritairement de résidus acides qui alternent avec des séquences d'acides aminés basiques, cette alternance pouvant favoriser la formation de structures secondaires. L'ubinucléine contient plusieurs séquences basiques déterminant des signaux de localisation nucléaire et possède à l'extrémité C-terminale un motif de liaison à l'ATP ou au GTP (se référer à la représentation schématique de l'ubinucléine en Figure 1A de l'article n°1) (Aho et al., 2009).

L'ubinucléine est largement exprimée dans tous les tissus et a initialement été décrite comme une protéine nucléaire dans des kératinocytes en culture. L'ubinucléine interagit avec le facteur de transcription ZEBRA au niveau du domaine basique de sa région de dimérisation et de fixation à l'ADN. D'autre part, elle interagit aussi avec d'autres facteurs de transcription cellulaires de la famille des protéines bZIP tel que c-jun et C/EBP. L'interaction de l'ubinucléine avec ZEBRA l'empêche de se fixer à ses séquences d'ADN cibles laissant suggérer un rôle de l'ubinucléine dans la régulation des fonctions de ce facteur de transcription (Aho et al., 2000).

2. Principaux résultats de l'article n°1

L'ubinucléine a été décrite initialement comme une protéine nucléaire. Dans l'article n°1 (Aho et al., 2009), une nouvelle localisation cellulaire de l'ubinucléine est décrite : les

jonctions serrées des cellules. Cette protéine, en appartenant à la fois aux noyaux et aux jonctions serrées des cellules, représente donc un nouveau membre de la famille des protéines NACos.

***L'ubinucléine est une protéine des jonctions serrées qui interagit avec ZO-1**

Pour prouver la localisation de l'ubinucléine au niveau des jonctions serrées des cellules, nous avons montré que l'ubinucléine co-localisait et interagissait avec des marqueurs des jonctions serrées. Dans des cellules MDCK en culture, l'ubinucléine co-localise avec les protéines des jonctions serrées ZO-1, claudine-1 et occludine. Des expériences de microscopie confocale effectuées sur des cellules HT29 en confluence (adénocarcinome du colon) montrent une parfaite co-localisation entre l'ubinucléine et ZO-1. L'ubinucléine est aussi détectée dans les cellules C666-1 de carcinome indifférencié du nasopharynx au niveau des jonctions intercellulaires (résultats non publiés, **Figure 16**). Nous avons ensuite montré que l'ubinucléine interagissait avec ZO-1 par des techniques biochimiques de GST-pulldown et de co-immunoprécipitation. Pour la technique de GST-pulldown, nous avons incubé l'ubinucléine traduite *in vitro* (séquence complète) avec la protéine recombinante GST fusionnée à la région N-terminale de ZO-1 comportant ses domaines PDZ. La co-immunoprécipitation de l'ubinucléine avec ZO-1 a été réalisée à partir de cellules HT29 en confluence. En utilisant les protéines recombinantes GST fusionnées aux régions N-terminales des protéines ZO-2 et ZO-3, nous avons aussi montré que l'ubinucléine interagissait *in vitro* avec ZO-2 et ZO-3. En montrant que l'ubinucléine co-localise avec des marqueurs des jonctions serrées et interagit avec ZO-1 par 2 techniques biochimiques différentes, nous avons démontré que l'ubinucléine appartenait au complexe des jonctions serrées.

*** La localisation de l'ubinucléine dépend du degré de confluence et de l'état de différenciation cellulaires.**

Dans des cellules MDCK à faible confluence en culture, l'ubinucléine se localise à la fois au niveau du noyau et au niveau des jonctions serrées. Dans des cellules à fort degré de confluence, le marquage de l'ubinucléine est restreint au niveau des jonctions serrées. D'autre part, la localisation de l'ubinucléine semble dépendre de l'état de différenciation cellulaire. Dans des kératinocytes cultivées dans un milieu à faible concentration en calcium, l'ubinucléine est retrouvée majoritairement au niveau nucléaire, tandis que dans un milieu à haute concentration en calcium favorisant la différenciation cellulaire, l'ubinucléine se

relocalise au niveau des jonctions serrées. De même, sur des coupes histologiques d'épiderme humain, l'ubinucléine retrouvée au niveau des couches cellulaires les plus superficielles présente un marquage caractéristique de celui de la ceinture des jonctions serrées et co-localise partiellement avec les marqueurs de différenciation périplakine et involucrine.

*** La surexpression de l'ubinucléine dans les cellules MDCK est associée à un défaut de la division cellulaire**

La surexpression de l'ubinucléine dans les cellules MDCK (système Tet-Off) semble régulée par l'état de prolifération cellulaire. Quand les cellules MDCK sont en confluence et arrêtent de proliférer, l'expression de l'ubinucléine analysée en Western-Blot tend à diminuer. Dans les cellules non confluentes, le marquage de l'ubinucléine est observé au niveau nucléaire dans chaque cellule. Quand les cellules sont en confluence, un marquage intense de l'ubinucléine nucléaire est observé spécifiquement dans les cellules binucléées ou possédant un gros noyau. Ces observations suggèrent que la surexpression d'ubinucléine au niveau nucléaire pourrait interférer avec la division cellulaire.

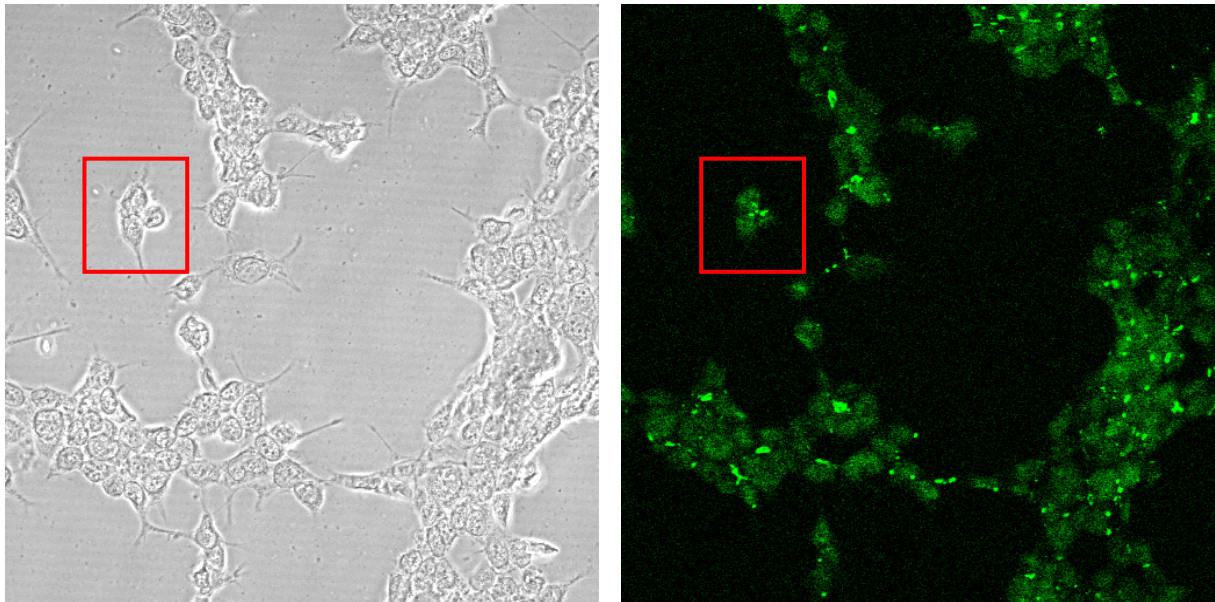


Figure 16 : Marquage de l'ubinucléine dans les cellules C666-1 (cellules fournies gracieusement par le Dr Pierre Busson, Institut Gustave Roussy, Villejuif).

3. Article n°1 :

(Aho et al., 2009)

Characterization of the ubinuclein protein as a new member of the nuclear and adhesion complex components (NACos)

Sirpa Aho^{*1}, Julien Lupo[†], Pierre-Alain Coly[†], Amélie Sabine^{‡§||}, Marc Castellazzi^{‡§||}, Patrice Morand[†], Alain Sergeant^{‡§||}, Evelyne Manet^{‡§||}, Véronique Boyer^{†2} and Henri Gruffat^{‡§||2,3}

^{*}Department of Dermatology and Cutaneous Biology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, U.S.A., [†]Unit Virus Host Cell Interactions (UVHCI), UMR 5233, UJF-EMBL-CNRS, 6 rue Jules Horowitz, BP 181, F-38042 Grenoble, cedex 9, France, [‡]INSERM U758, 46 allée d'Italie, F-69007, Lyon, France, [§]ENS-Lyon, 46 allée d'Italie, F-69007, Lyon, France, and ^{||}IFR 128 BioSciences Gerland-Lyon Sud, 21 avenue Tony Garnier, 69365, Lyon, Cedex 07, France

Background information. We characterized previously a cellular protein through its interaction with cellular and viral transcription factors from the bZip family. The corresponding mRNA was detected in a wide range of cell types and the protein was highly expressed in the nucleus of human keratinocytes. On the basis of these observations, we named this protein ubinuclein.

Results. Using a specific monoclonal antibody, we have shown in the present study that, although endogenous ubinuclein was mainly nuclear in sparse MDCK (Madin–Darby canine kidney) cells, it was exclusively present in the cell–cell junctions in confluent MDCK cultures or in polarized HT29 cells, where it co-localized with the tight junction marker ZO-1 (zonula occludens 1). In accordance with this, we have shown that ubinuclein interacted with ZO-1 *in vitro* and *in vivo*. In cultures of undifferentiated human keratinocytes, ubinuclein was essentially nuclear, but in differentiated cells, in which involucrin and periplakin reside at the apical cell membrane and at the cell–cell junctions, ubinuclein staining was observed at the lateral cell–cell borders. In human skin, ubinuclein appeared as a thread-like pattern between the upper granular cell layer and the cornified cell layer. In mouse epithelia, including bile canaliculi, bronchioli, salivary gland ducts, and oral and olfactory epithelium, ubinuclein co-localized with tight junction markers. Ubinuclein was, however, not present in endothelial cell–cell junctions. In addition, when overexpressed, ubinuclein localized to the nucleus and prevented MDCK cells from entering cytokinesis, resulting in multinucleated giant cells after several cycles of endoreplication.

Conclusions. Ubinuclein mRNA and its corresponding protein are expressed in almost all cell types. Analyses have revealed that in most cells ubinuclein occurred in the nucleoplasm, but in cells forming tight junctions it is recruited to the plaque structure of the zonula occludens. This recruitment appeared to be dependent on cell density. Therefore ubinuclein is a new NACos (nuclear and adhesion complex component) protein.

¹Present address: R&D, Unilever HPC-NA, Trumbull, CT, U.S.A.

²These authors contributed equally to this work.

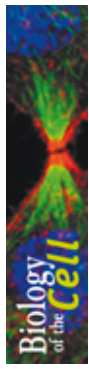
³To whom correspondence should be addressed (email hgruffat@ens-lyon.fr).

Key words: cytokinesis, epidermis, keratinocyte, simple epithelium, tight junction, ubinuclein.

Abbreviations used: C/EBP, CCAAT/enhancer-binding protein; CMV, cytomegalovirus; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; EBV, Epstein–Barr virus; GST, glutathione transferase; HEK-293T cell, human embryonic kidney cell expressing the large T-antigen of simian virus 40; Hira, histone cell cycle regulation defective homologue A; KGM, keratinocyte growth medium; MAb, monoclonal antibody; MDCK, Madin–Darby canine kidney; NACos, nuclear and adhesion complex component; P1 etc., passage 1 etc.; RT-PCR, reverse transcription–PCR; UTR, untranslated region; ZO protein, zonula occludens protein.

Introduction

Epithelial cells form cellular barriers that separate different tissues and body compartments by interacting with one another through adhesive complexes, called junctions. In vertebrates, the epithelial junctional complex consists of tight junctions (zonula occludens), adherens junctions (zonula adherens), desmosomes (macula adherens) and gap junctions (nexus). Tight junctions and adherens junctions are the most apical components of lateral cell–cell



junction complexes. In simple epithelia, tight junctions provide a paracellular permeability barrier regulating the movement of water, solutes, immune cells and viruses (Anderson and Van Itallie, 1995; Collins, 2002; Shin et al., 2006). Tight junctions are components of the junctional complex linking neighbouring epithelial and endothelial cells and are important for barrier formation (Tsuruta et al., 2002; Balda and Matter, 2003; Matter and Balda, 2003a, 2003b, 2007). Tight junction proteins are also present in human epidermis, in keratinocyte cultures (Pummi et al., 2001, 2004; Brandner et al., 2002; Langbein et al., 2002, 2003; Malminen et al., 2003) and within the granular cell layer (stratum granulosum) of human epidermis where they provide the outermost epidermal barrier (Morita and Miyachi, 2003).

Tight junctions have a similar molecular architecture to other adhesion complexes. They consist of transmembrane proteins, such as claudins, occludins and JAMs (junctional adhesion molecules), which mediate adhesion and barrier formation. These membrane proteins associate with different peripheral membrane proteins called adaptors, such as the ZO (zonula occludens) proteins, which are located on the intracellular side of the plasma membrane. Adaptor proteins contain multiple protein–protein interaction domains, allowing them to form a protein network that recruits different types of signalling proteins and transcriptional or post-transcriptional regulators. Adaptors also interact with actin and link the tight junctions to the actin cytoskeleton. Thus tight junctions join the cytoskeletons of adjacent cells together and are points that initiate cell signalling (Zahraoui et al., 2000; Matter and Balda, 2003b; Matter et al., 2005). In addition, some adaptor proteins, such as ZO-2, shuttle between tight junctions and the nucleus, and by specifically associating with transcription factors, such as Jun, Fos, C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) or Myc, they can induce their relocalization and thus potentially modify gene expression in epithelial cells (Islas et al., 2002; Betanzos et al., 2004; Jaramillo et al., 2004; Gonzalez-Mariscal et al., 2006; Huerta et al., 2007).

In addition to ZO-2, some cell–cell junction proteins have also been found in the nucleus and have accordingly been named NACos (nuclear and adhesion complex components) (Balda and Matter, 2003). In the nucleus, they are involved in the regulation of

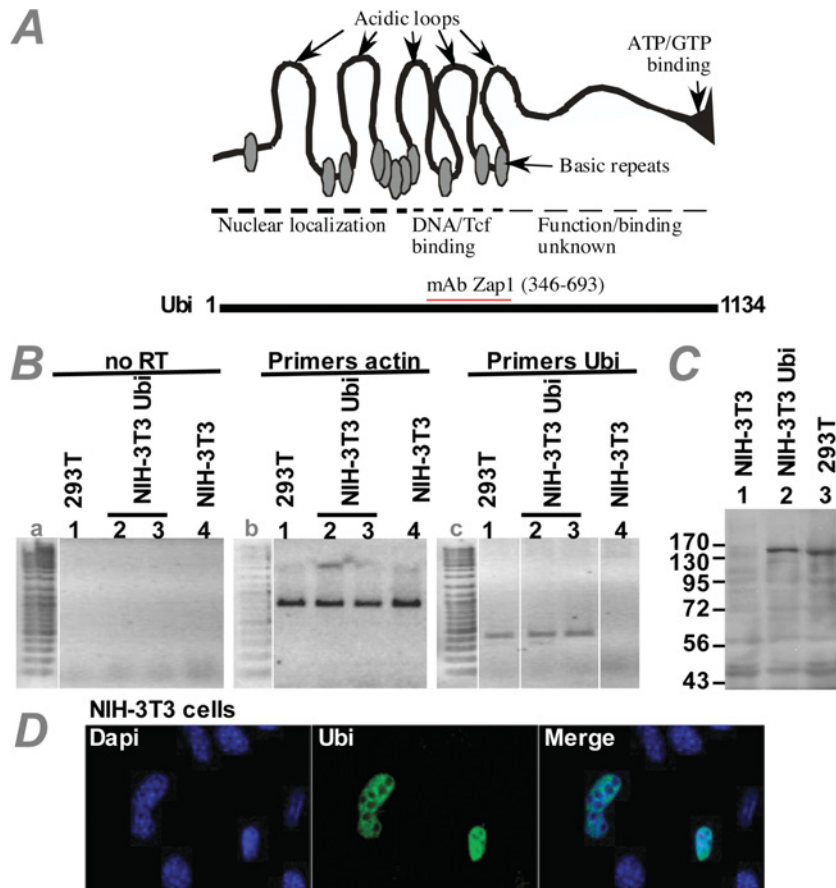
transcription, splicing or mRNA 3'-end processing. Plakophilin 2 forms complexes with RNA polymerase III (Mertens et al., 2001). p120^{ctn} and β -catenin are involved in the regulation of RNA polymerase II transcription (Behrens et al., 1996; Daniel and Reynolds, 1999). Pinin functions in RNA splicing in the nucleus and in polyadenylation in the cytoplasm (Wang et al., 2002). Symplekin is associated with factors involved in 3'-end processing of the pre-mRNA in the nucleus, as well as regulating polyadenylation in the cytoplasm (Hofmann et al., 2002; Barnard et al., 2004; Kolev and Steitz, 2005; Mandel et al., 2008). ZONAB/DbpA (ZO-1-associated nucleic-acid-binding protein/DNA-binding protein A), a Y-box transcription factor, regulates the transcription of genes that are important for G1/S-phase progression and binds ZO-1, a component of the junctional plaque (Balda and Matter, 2000; Balda et al., 2003; Sourisseau et al., 2006).

We have characterized previously ubinuclein, a novel ubiquitously expressed nuclear protein, through its interaction with the EBV (Epstein–Barr virus) early transcription factor EB1 (also called Zta or ZEBRA) (Aho et al., 2000). EB1 is a member of the basic leucine-zipper family of transcription factors which interacts with both viral and cellular promoters to modulate the reactivation of latent EBV. In this study, we showed that ubinuclein can also interact with other transcription factors of the basic leucine-zipper family, such as C/EBP and Jun. Ubinuclein transcripts were present in a wide variety of human adult, fetal and tumour tissues, and the protein was detected in the nuclei of cells throughout the human epidermis and also in cultured keratinocytes. The N-terminal of ubinuclein is essential for nuclear localization, whereas its central domain is responsible for interaction with EB1 (Aho et al., 2000).

We now demonstrate that ubinuclein is a new member of NACos protein family. It is mainly localized in the nuclei of isolated MDCK (Madin–Darby canine kidney) epithelial cells and undifferentiated keratinocytes, but can be relocalized into the tight junctions in confluent epithelial cells, polarized HT29 cells and differentiated keratinocytes. Accordingly, we observed that the ubinuclein was present in the tight junctions of both stratified and simple epithelia, but, specifically, not in endothelial cell junctions. Furthermore, ubinuclein appears to be a regulator of endoreplication and cytokinesis.

Figure 1 | Characterization of the MAb ZAP1

(A) Representation of ubinuclein domains. MAb ZAP1 recognizes an epitope within ubinuclein (amino acids 346–693). (B) NIH 3T3 cells do not express ubinuclein: RT-PCR assay carried out with HEK-293T (293T) cell mRNA as a positive control (lane 1), NIH 3T3 cells mRNA (lane 4) or NIH 3T3 cells transfected with an ubinuclein (Ubi) expression vector (lanes 2 and 3). Panel a, PCR control without reverse transcriptase (RT); panel b, mRNA quality control with the actin primers; panel c, ubinuclein specific primers. (C) MAb ZAP1 revealed a specific signal only in the HEK-293T cells and the NIH 3T3 cells transfected with an ubinuclein expression plasmid, but not in the untransfected NIH 3T3 cells. (D) NIH 3T3 cells transfected with an ubinuclein expression plasmid were stained with the ZAP1 MAb. Nuclei were visualized by DAPI staining and the merged images are shown on the right-hand side.



Results

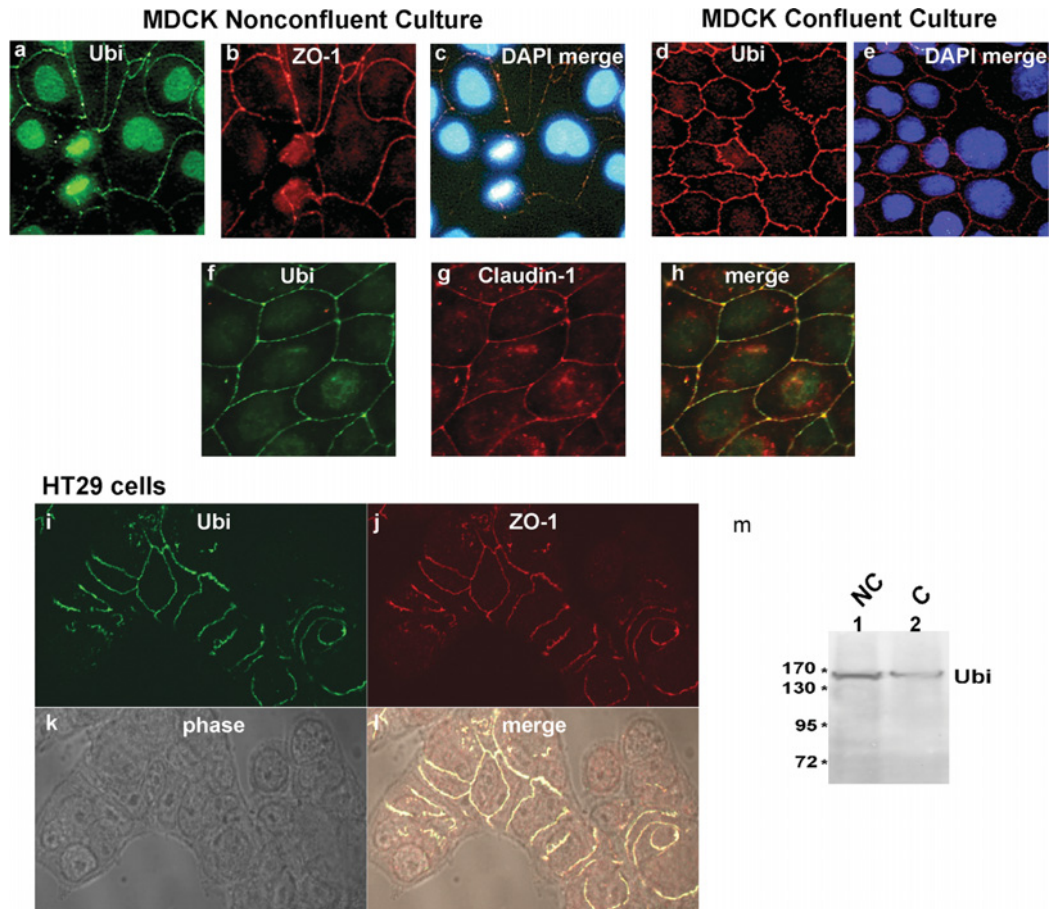
Endogenous ubinuclein is a NACos protein

Using a polyclonal antibody, we have shown previously that ubinuclein is a nuclear protein (Aho et al., 2000). To further study the subcellular localization of ubinuclein, we have produced a MAb (monoclonal antibody) called ZAP1 directed against amino acids 346–693 of ubinuclein (Figure 1A). Ubinuclein has been described as a ubiquitously expressed gene, but, interestingly, we found that in NIH 3T3 cells the corresponding mRNA was not detected by RT-PCR (re-

verse transcription–PCR) (Figure 1B, panel c, lane 4), whereas in HEK-293T cells (human embryonic kidney cells expressing the large T-antigen of simian virus 40) the mRNA was easily detected using the same set of primers. This absence of detection was not related to the quality of the RNA, as actin mRNA expression was observed in all cell lines (Figure 1B, panel b). Consequently, in NIH 3T3 cells the ZAP1 MAb detected no specific protein (Figure 1C, lane 1). However, when NIH 3T3 cells were transfected with a ubinuclein expression vector, the corresponding

Figure 2 | Endogenous ubinuclein co-localizes to cell–cell junctions with ZO-1 and claudin-1

Non-confluent MDCK culture double-labelled for ubinuclein (Ubi) (a; green) and ZO-1 (b; red). Nuclei were visualized by DAPI staining and the merged images, obtained via the triple band-pass filter, are shown (c). A confluent MDCK cell culture was labelled for ubinuclein (d; red). A merged image with the DAPI staining is also shown (e). Confluent MDCK cells were double-labelled for ubinuclein (f; green) and claudin-1 (g; red). Co-localization was shown by the merged image (h). Ubinuclein and ZO-1 co-localized in the tight junctions of HT29 cells. HT29 cells were double-labelled for ubinuclein (i) and ZO-1 (j). The phase-contrast image of the cells (k) and the merged image (l), showing the complete overlapping of the ZO-1 and ZAP1 labeling, are shown. (m) Western blotting of non-confluent (lane 1; NC) and confluent (lane 2; C) MDCK cells stained with the MAb ZAP1.



mRNA was detected by RT-PCR (Figure 1B, panel c, lanes 2 and 3) and a specific band of approx. 160 kDa was observed by Western blotting (Figure 1C, lane 2). A similar migrating band was also observed in HEK-293T cells, which constitutively express ubinuclein (Figure 1C, lane 3). In addition, by indirect immunofluorescence the ZAP1 MAb clearly stained the nucleus of the transfected cells (Figure 1D). These results clearly show that the ZAP1 MAb is specific for the ubinuclein protein.

With further use of the ZAP1 MAb, we found that in sub-confluent cultures of MDCK cells, the endo-

genous ubinuclein was as expected detected in the nuclei, but, surprisingly, a signal also appeared at the lateral cell–cell borders, co-localizing with the tight junction marker ZO-1 (Figures 2a–2c). In contrast, in confluent MDCK cultures, ubinuclein localized exclusively to cell–cell junctions (Figures 2d and 2e). Western blotting using cell extracts of either non-confluent or confluent MDCK cells demonstrated that ubinuclein is present in comparable amounts in both cases (Figure 2m), which supports the argument for a translocation of ubinuclein from the nucleus to cell–cell junctions when the cells reach confluence. In

order to confirm the localization of ubinuclein in the tight junctions we used an antibody against claudin-1, which is a more exclusive marker of tight junctions than ZO-1 (Figures 2f–2h). As shown (Figures 2f–2h), ubinuclein also co-localized with claudin-1 at the cell–cell junctions.

In order to generalize this first observation to other epithelial cell types we used the human HT29 cell line. HT29 cells are particularly interesting, as they form polarized monolayers with functional tight junctions in culture (Lesuffleur et al., 1991; Bertrand et al., 1998). Co-labelling of HT29 cells with the two antibodies directed respectively against ubinuclein and the tight junction protein ZO-1 clearly showed that in these cells, similar to MDCK cells, the two proteins were co-localized at cell–cell junctions, whereas free cell edges were not labelled (Figures 2i–2l). Interestingly, in these polarized cells ubinuclein was never detected in the nucleus. The above observations reveal a double localization of ubinuclein directed by the level of cell–cell contact, and thus identify ubinuclein as a new member of the NACos protein family, which includes ZONA/B or symplekin.

Ubinuclein interacts with ZO-1 both *in vivo* and *in vitro*

As the microscopy studies showed that ubinuclein co-localizes with ZO-1, we asked whether the protein interacted physically with ZO-1. As shown in Figure 3(A), immunoprecipitation of ZO-1 from HT29 cells allowed the co-immunoprecipitation of ubinuclein (Figure 3A, lane 3). A non-specific antibody used as a control did not co-immunoprecipitate ubinuclein (Figure 3A, lane 1), showing that the co-immunoprecipitation observed was specific. Moreover, in a GST (glutathione transferase) pull-down assay, *in vitro*-synthesized ubinuclein labelled with [³⁵S]methionine clearly interacted with the GST–ZO-1(N-terminus)-fusion protein, but not with the GST protein alone (Figure 3B, panel a). In addition, the two other ZO proteins, ZO-2 and ZO-3, also interacted with ubinuclein in the GST pull-down assay (Figure 3B, panels b and c). As it has been shown previously that ZO-1 interacts with the actin cytoskeleton (Fanning et al., 1998), it was possible that actin, present in the rabbit reticulocyte lysate, may serve as intermediary protein in the interaction. However, interaction of ZO-1 with

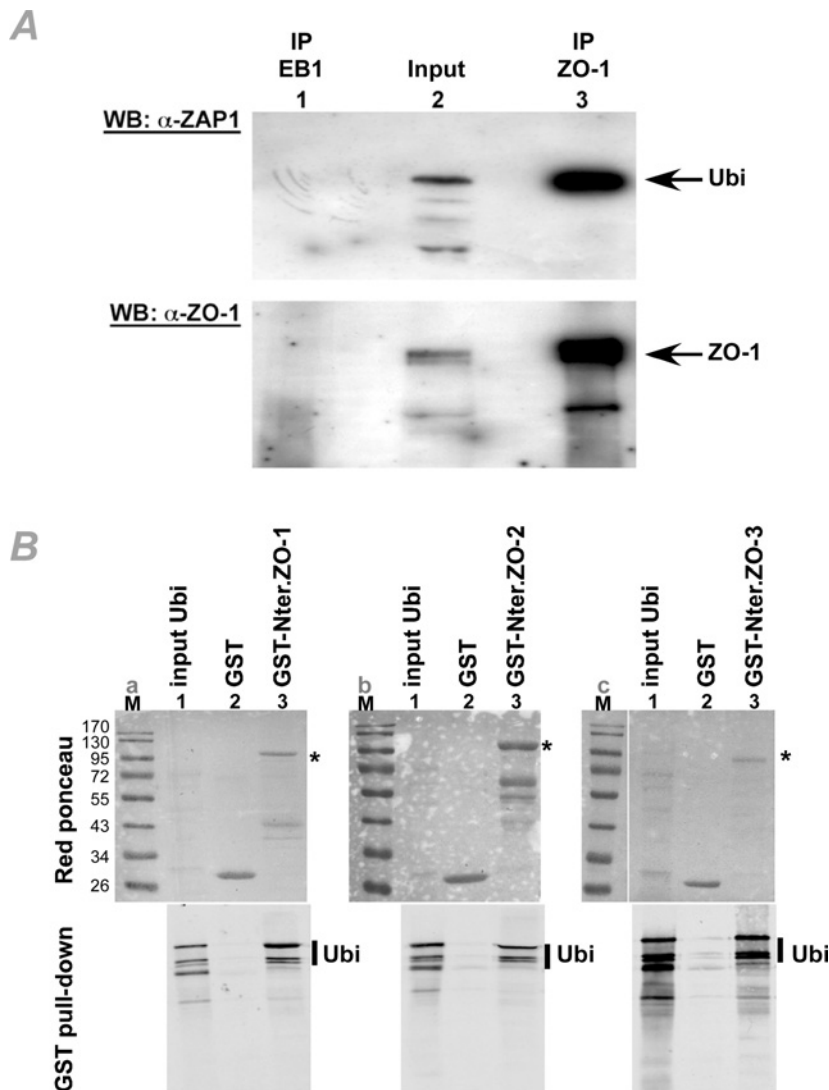
actin is known to be mediated by its C-terminal domain that is not present in our GST–ZO-1 construct, which argues against this possibility. Taken together, the results of the co-localization study between ubinuclein and the tight junction marker ZO-1 in the HT29 cells by confocal microscopy, combined with the results of the physical interaction between the two proteins, strongly suggest that ubinuclein can specifically localize to epithelial cell tight junctions.

Overexpressed ubinuclein promotes endoreplication in MDCK cells

In order to monitor the subcellular localization of ubinuclein, we used MDCK Tet-off cells (see the Materials and methods section) to overexpress ubinuclein from a doxycycline-regulated promoter. At the first cell passage [P1 (passage 1)], in the absence of doxycycline in the culture medium, ubinuclein expression started to increase after 4 days, as was detected by Western blotting with the ZAP1 MAb (Figure 4A, lane 6). However, after the second passage (P2), there was an accumulation of ubinuclein in the cells, which appeared to decrease when cells reached confluence (Figure 4A, lane 11). This decrease is specific for ubinuclein, as the amounts of β -catenin and actin remained unchanged (Figure 4A). This observation suggested that ubinuclein expression was tightly controlled in the cells and that overexpression was not possible when the cells stop proliferating. Endogenous ubinuclein in MDCK cells was not seen on this Western blot because of its low expression level, but, when more proteins were loaded on to the gel, the endogenous protein could be visualized, as seen in Figure 2(m). Indirect immunofluorescence also showed that overexpressed ubinuclein was observed in proliferating cells in which ubinuclein was seen in the nucleus of all single cells (data not shown). Interestingly, however, at 4–5 days after P1, when cells reached confluence, the ZAP1 MAb revealed a strong nuclear staining of ubinuclein specifically in cells with double nuclei (Figure 4B, panel a). It is noteworthy that the surrounding cells with a single nucleus showed only a weak nuclear staining. However, all the cells showed a clear staining of ubinuclein in the cell–cell junctions. At days 3–4 after P2, ubinuclein was also seen in giant cells with a single large nucleus or multiple nuclei, indicating that its

Figure 3 | Ubinuclein directly interacts with ZO-1

(A) Co-immunoprecipitation of ubinuclein (Ubi) with ZO-1. HT29 cell extracts were immunoprecipitated (IP) with a MAb directed against EB1 as a negative control (lane 1) or ZO-1 (lane 3). The immunoprecipitated proteins were loaded on to two gels (SDS/PAGE), together with an aliquot of the cell extract (Input, lane 2), transferred on to a nitrocellulose membrane and the Western blots (WB) were incubated with the MAb ZAP1 directed against ubinuclein and with the MAb directed against ZO-1. (B) Ubinuclein and ZO proteins interacted *in vitro* in a GST pull-down assay. *In vitro*-translated ubinuclein labelled with [³⁵S]methionine (lane 1) was incubated with GST or GST-ZO-1(N-terminus) (GST-Nter.ZO-1; panel a), GST-ZO-2(N-terminus) (GST-Nter.ZO-2; panel b) or GST-ZO-3(N-terminus) (GST-Nter.ZO-3; panel c) proteins produced in bacteria and purified with glutathione–Sepharose beads (lanes 2 and 3). The GST-ZO(N-terminus)-fusion proteins contain the N-terminal part of ZO proteins with their three PDZ domains fused to the GST protein. The amount of GST and GST-ZO(N-terminus) proteins used was controlled on the gel by staining with Ponceau Red.

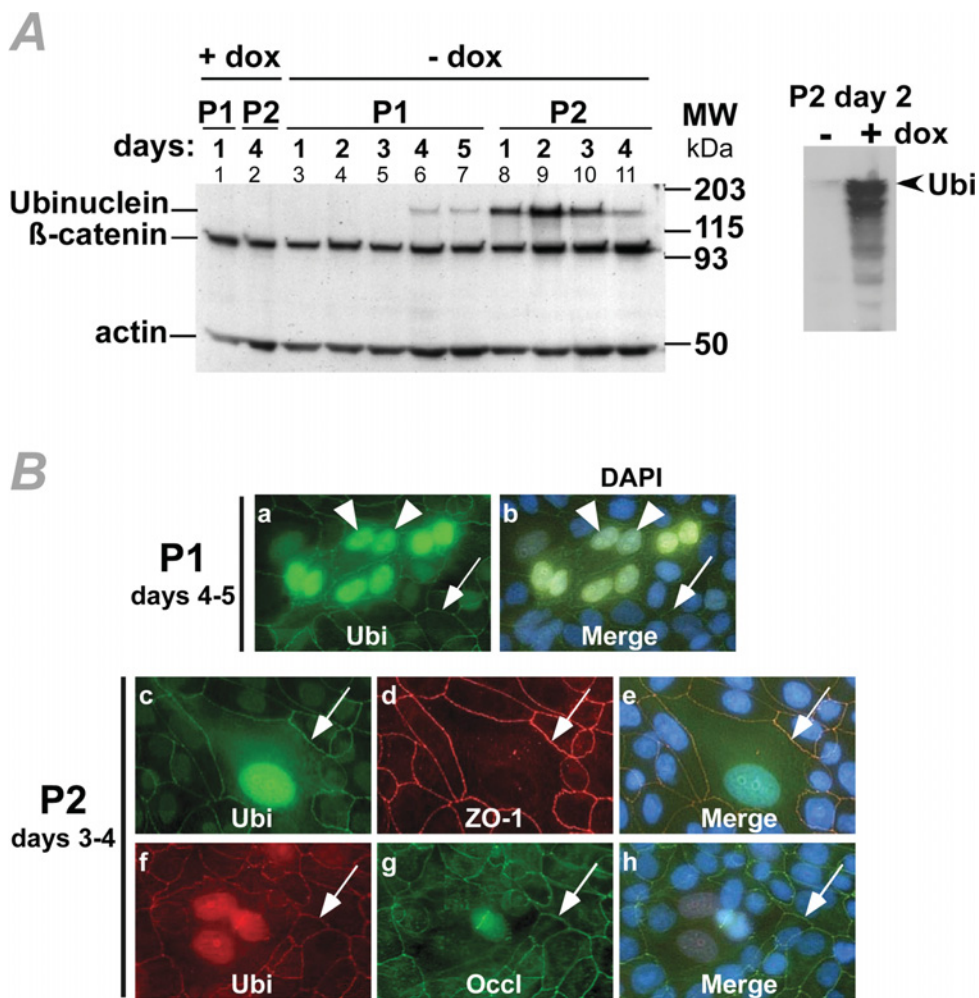


overexpression resulted in its accumulation in the nucleus of a small population of the cells and this accumulation was correlated with defective cytokin-

esis (Figure 4B, P2, panels c–h). Again, ubinuclein was also present in all cell–cell junctions in which it co-localized with the tight junction markers ZO-1

Figure 4 | Forced over-expression of ubinuclein in MDCK cells

(A) MDCK Tet-off cells transfected with a TetCMV-ubinuclein expression plasmid were selected for by hygromycin resistance. Ubinuclein (Ubi) expression was induced by omitting doxycycline (dox) from the culture medium. After several days in passage 1 (P1) or 2 (P2) total cell extracts were loaded on to SDS/PAGE and transferred on to a membrane. The blot was first incubated with the MAb directed against ubinuclein and then with β -catenin and actin antibodies as controls. MW, molecular mass. (B) Selected MDCK Tet-off cells transfected with a TetCMV-ubinuclein expression plasmid in P1, days 4–5 were labelled with the MAb ZAP1 directed against ubinuclein (panel a). Cells with double nuclei are marked with arrowheads (panels a and b). ZAP1 also showed a signal at cell–cell junctions (arrow). Cells in P2, days 3–4, were labelled with MAbs directed against ubinuclein (panels c and f), ZO-1 (panel d) and occludin (Occl; panel g). Arrows indicate the co-localization at cell–cell junctions between endogenous ubinuclein and ZO-1 or occludin. Nuclei were visualized by DAPI staining and the images, obtained with the triple band-pass filter, are shown (panels b, e and h).



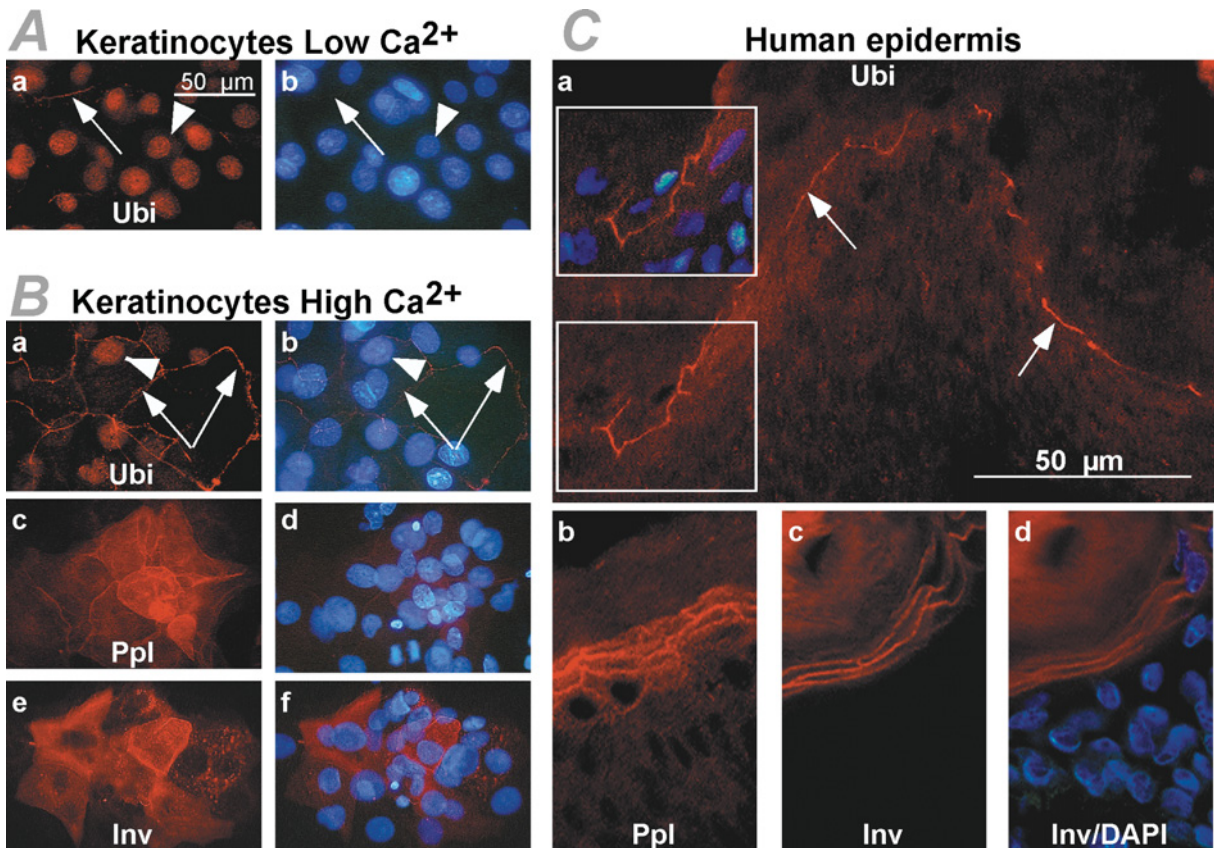
and occludin. Taken together, these results confirm that ubinuclein has a double localization – in the nuclei and at the cell–cell junctions – and suggest that overexpression of nuclear ubinuclein affects cell division.

Ubinuclein is mainly nuclear in undifferentiated human keratinocytes, but is relocated in the tight junctions of differentiated cells

In a keratinocyte culture grown in low-calcium medium, the ZAP1 MAb consistently stained nuclei,

Figure 5 | Subcellular distribution of ubinuclein in keratinocytes is differentiation-dependent

(A) Undifferentiated keratinocytes (in 60 μM Ca^{2+}) were labelled with the MAb ZAP1 directed against ubinuclein (Ubi). Ubinuclein is a nuclear protein (arrowheads), but can also be detected at an occasional cell–cell junctions (arrow). Cell nuclei were labelled with DAPI (panel b). (B) Keratinocytes, induced to differentiate under high Ca^{2+} conditions (1 mM), were labelled with the MAb ZAP1 directed against ubinuclein (panel c), periplakin (Ppl) (panel e) or involucrin (Inv) (panel g). Cell nuclei were labelled with DAPI (panels d, f and h). (C) Distribution of ubinuclein in epidermis. The epidermis was labelled with the MAb ZAP1 directed against ubinuclein (panel a) or periplakin (panel b) or involucrin (panel c). Epidermal cell layers are emphasized through the nuclei double-stained with DAPI in the involucrin staining (panel d). Arrows indicate the separation between the granular cell layer and the cornified cell layer.



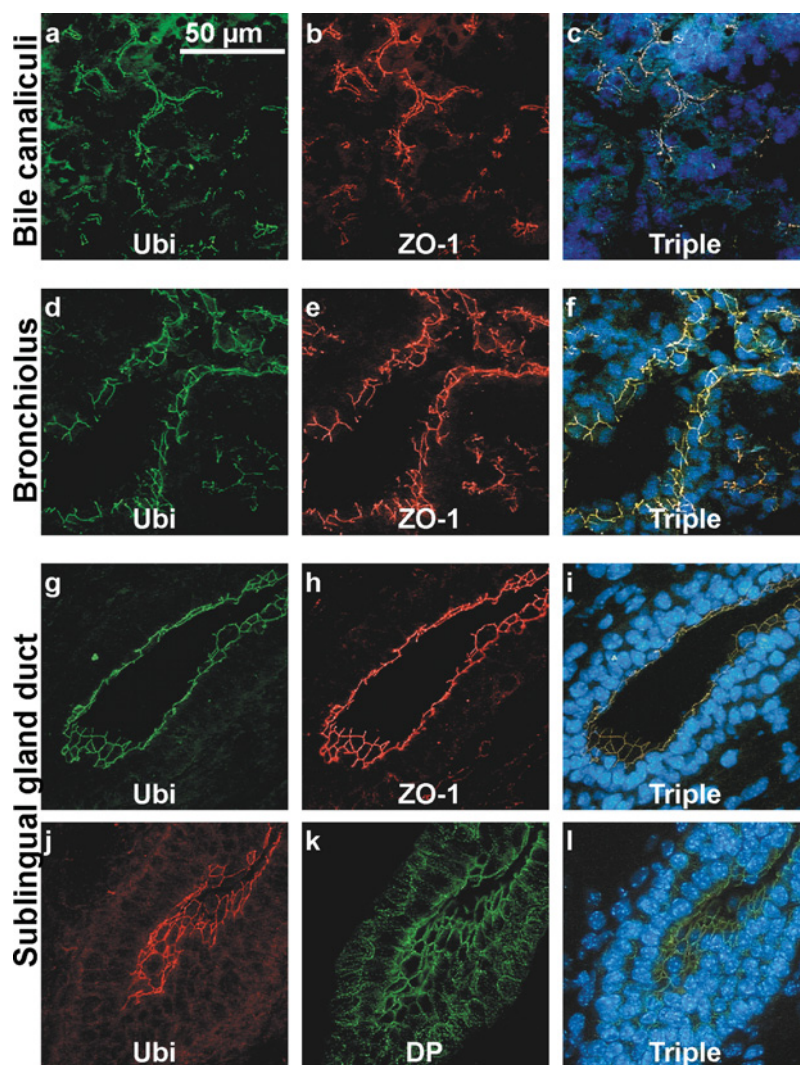
although an occasional cell–cell junction appeared positive for ubinuclein staining (Figure 5A, arrows). Keratinocytes in the high-calcium medium differentiate and form stratified layers. Ubinuclein was detected in nuclei in the basal cell layer, but a distinct string-like staining along the cell–cell junctions of the upper layers of anucleated large flattened squames was evident (Figure 5B). In these cultures periplakin and involucrin, which are known to be differentiation markers and precursors of the keratinocyte-cornified cell envelope, showed a different staining. Periplakin localized to both cell–cell junctions and to the apical

plasma membrane, whereas involucrin was clearly excluded from the nuclei while being heavily stained in the plasma membrane (Figure 5B).

In human epidermis, ubinuclein was detected in cell nuclei in the air-dried sections, which were only briefly permeabilized with Triton X-100 (Aho et al., 2000). However, after methanol or methanol/acetone fixation, nuclear staining was much weaker or was completely lost, although distinct staining along the outer granular cell layer became evident (Figure 5C). Again, ubinuclein overlapped, but did not completely, co-localize with the differentiation

Figure 6 | Ubinuclein co-localizes with the tight junction marker ZO-1 in murine internal epithelia

Ubinuclein (Ubi) co-localizes with ZO-1 in the bile canaliculi of mouse liver (a–c) at the cell–cell junctions of bronchiolar epithelium of mouse lung (d–f) and in mouse salivary (sublingual) gland duct epithelium (g–i), but only partially overlaps with desmoplakin (DP), which is present throughout the epithelial cell layers of the salivary gland duct (j–l). Double-labelling for ubinuclein (ZAP1 MAb) (a, d, g and j) and ZO-1 (b, e and h) or desmoplakin (k) are shown together with the triple images with nuclei visualized through DAPI staining (c, f, i and l), obtained with the triple band-pass filter.



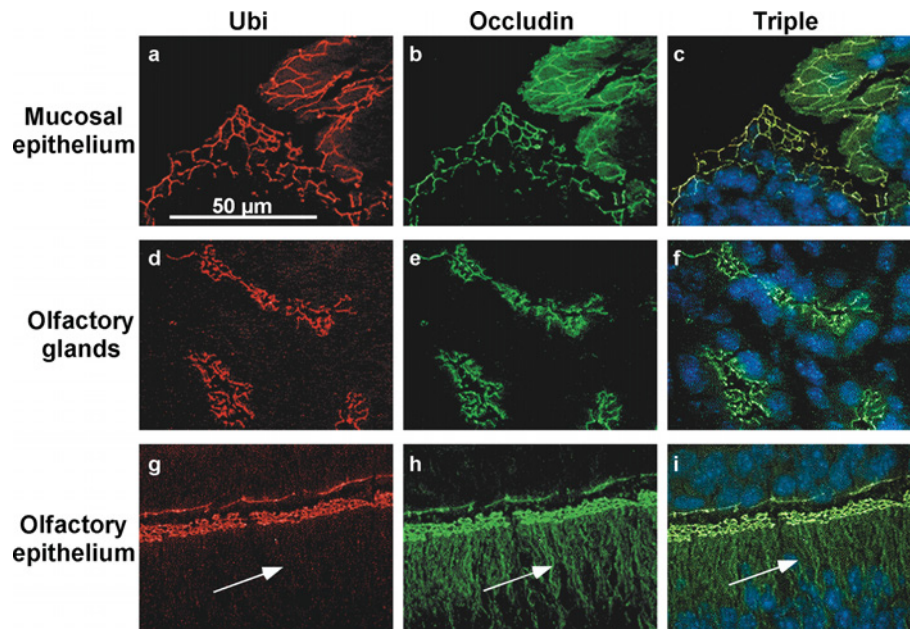
markers periplakin and involucrin. Periplakin was present in the cytoplasm throughout the epidermis and accumulated in the cell–cell junctions within the granular cell layer, whereas involucrin was expressed only in the upper granular cell layer (Figure 5C). The appearance of ubinuclein along the upper granular cell layer of epidermis resembled the localization of the tight junction belt.

Ubinuclein co-localizes with tight junction markers in murine internal epithelia

Cryosections of mouse tissues with a prominent epithelial component were studied for ubinuclein expression. Indirect immunofluorescence revealed distinct staining along bile canaliculi in liver and along the bronchiolar epithelium in lung, co-localizing with the tight junction marker ZO-1 (Figures 6a–6f).

Figure 7 | Ubinuclein co-localizes with the tight junction marker occludin in murine internal epithelia

Ubinuclein co-localizes with occludin in mouse nasal mucosal epithelium (a–c) and at the cell–cell junctions in olfactory gland ducts (d–f). In the olfactory epithelium, occludin distributes along the ciliated cells (arrows), whereas ubinuclein staining is limited only to the outermost cell–cell junctions (g–i).



In the duct of the sublingual salivary gland, ubinuclein and ZO-1 co-localized along the junctions of the outermost layers of epithelial cells, whereas desmoplakin was prominently present throughout the epithelial cell layers (Figures 6g–6l). Within the outermost layers of the mucosal epithelium in nasal cavities, both in the longitudinal and transverse sections, the cell–cell junctions strongly stained for ubinuclein and occludin (Figures 7a–7c). Ubinuclein and occludin staining also co-localized in the tubular structures of gland ducts inside the olfactory epithelium (Figures 7d–7f). However, within the olfactory epithelium, occludin was present throughout the elongated cells, whereas ubinuclein showed a more restricted distribution, staining only the outermost cell–cell junctions at the surface of the olfactory epithelium (Figures 7g–7i). Ubinuclein and ZO-1 co-localized along the epithelium in the longitudinal section of mouse tongue (Figures 8a–8c). Furthermore, ZO-1 demonstrated distinct staining between muscle fibres, highlighting the network of capillaries. Double labelling revealed that these structures were negative for ubinuclein, specifically sug-

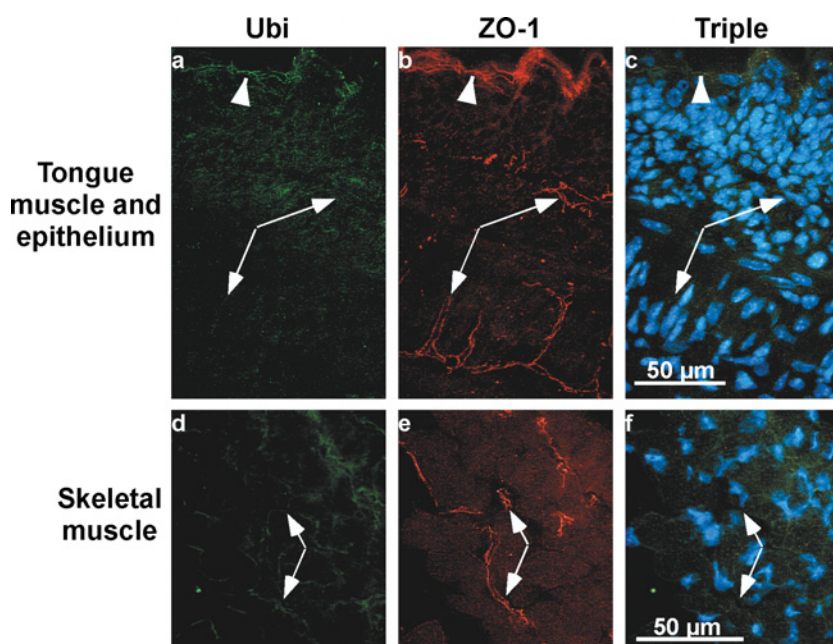
gesting that ubinuclein is not a component of cell–cell junctions in endothelial cells (Figures 8d–8f). However, it is noteworthy that expression of ubinuclein was clearly detected in HUVECs (human umbilical vein embryonic cells) in culture (data not shown).

Discussion

Ubinuclein was first described as a nuclear protein with the capacity to interact *in vitro* with the basic domains of both cellular (c-Jun and C/EBP) and viral (EB1 from EBV) members of the basic leucine-zipper family of proteins and to interfere with their DNA-binding function. In the present study, we demonstrate that ubinuclein can also be found in the tight junctions of epithelial cells. In confluent MDCK and HT29 cultures, endogenous ubinuclein localized exclusively to cell–cell junctions where it co-localized with ZO-1 and occludin. In simple internal epithelia, ubinuclein also co-localized with tight junction markers, but not with a desmosomal marker. In pseudo-stratified olfactory epithelium, ubinuclein

Figure 8 | Mouse tongue epithelium (a–c) and skeletal muscle (d–f) were labelled with MAbs directed against ubinuclein (Ubi; green) or ZO-1 (red)

Co-localizing signals in tongue epithelium are indicated with arrowheads. The absence of protein co-localization in arterioles and capillaries, whose structures strongly express ZO-1, traversing between the muscle fibres are indicated with double arrows. Longitudinal section of the tongue epithelium and underlying muscle with capillaries in horizontal and vertical views (a–c) and transverse section of mouse skeletal muscle with both longitudinal and transverse sections of capillaries (d–f) are shown. DAPI staining of nuclei shows the cellular content of muscle tissue.



showed a more limited staining pattern than occludin, which has been considered to be a specific marker for tight junctions. Thus ubinuclein belongs to the group of proteins with dual subcellular localization called NACos. The role of these proteins in the nucleus as transcriptional regulators and their function in RNA processing and transport is presently emerging, but nothing is known of their functional role in the tight junctions. It has been hypothesized that for some of these factors, their localization in tight junctions sequesters them away from the nucleus in order to regulate their activity.

Ubinuclein has no sequence homology with presently characterized proteins in general, or with any tight junction components, in particular. However, in accordance with its capacity to shuttle between the nucleus and the plasma membrane, several potential putative nuclear import (nuclear localization signals) and leucine-rich-type export (nuclear export signals) signals can be found in the ubinuclein se-

quence, although none have as yet been shown to be functional. For its localization in tight junctions, interaction with protein components of these structures may also be required. Accordingly, we have shown in a co-immunoprecipitation assay *in vivo*, that ubinuclein not only co-localizes with various components of tight junctions (claudin-1, occludin and ZO-1), but also co-immunoprecipitates with ZO-1. Furthermore, as shown in a GST pull-down assay *in vitro*, the interaction between ubinuclein and ZO-1 is probably direct. Finally, we have also found that ubinuclein interacts with ZO-2 and ZO-3, the two other members of the ZO protein family. Determination of the domains in ubinuclein and ZO proteins responsible for these interactions is in progress.

Similar to other NACos proteins, the subcellular localization of ubinuclein varies according to the degree of cell–cell contact in the epithelia: ubinuclein localizes to both tight junctions and nuclei in low-density proliferating cells, but becomes restricted to

tight junctions in high-density cells. It is interesting to note that this dual localization of ubinuclein parallels the localization of ZO-1 with which it interacts (Gottardi et al., 1996). Moreover, this observation suggests that ubinuclein, similar to the ZONAB protein (Kavanagh et al., 2006), may also have a role in the regulation of epithelial cell proliferation. In addition, Tagami et al. (2004) found ubinuclein in a complex with histone H3.3 and the histone chaperone Hira (histone cell cycle regulation defective homologue A). Deposition of the major histone H3 is coupled to DNA synthesis during DNA replication and possibly DNA repair, whereas the histone variant H3.3 serves as the replacement variant for the DNA-synthesis-independent deposition pathway. Hira is necessary to mediate DNA-synthesis-independent nucleosome assembly. Hira aids nucleosome assembly preferentially in transcriptionally active loci, marking active chromatin. This observation suggests that in the histone H3.3 complex ubinuclein may play a role targeting active chromatin through its interaction with various transcription factors.

Human skin is a multilayered stratified epithelium in which the differentiation of keratinocytes proceeds towards the outer cell layers. The stratum corneum is generally thought to provide the epidermis with a permeability barrier. The existence of tight junctions in the upper granular cell layer of the epidermis has become evident and a continuous zonula occludens has been proposed to cover the entire human body at the level of the granular cell layer of the epidermis (Brandner et al., 2002, 2006). The appearance of ubinuclein as a continuous thread along the outermost granular cell layer suggests a role for this protein as a component of the tight junction layer in human epidermis. In keratinocytes, the relocation of ubinuclein from nucleus to cell–cell junctions coincides with the final events of epidermal differentiation: the elimination of keratinocyte nuclei and formation of the tightly packed flattened cells of the stratum corneum. Thus, along with the disintegration of nuclei, ubinuclein may be directed to cell–cell junctions by default. It is also possible that translation of ubinuclein continues and that the ubinuclein polypeptide directed to tight junctions is submitted to specific post-translational modifications. Furthermore, endogenous ubinuclein is translated from a transcript with a 3 kb 3'-UTR (untranslated re-

gion) whose sequence is highly conserved between species (Aho et al., 2000). In addition to stabilizing mRNA, the presence or absence of the 3'-UTR may direct the mRNA to a different set of ribosomes, thus influencing the subcellular localization of the nascent polypeptide. The continuous network of ubinuclein around the differentiated squames in keratinocytes culture suggests stabilization of ubinuclein through incorporation into insoluble structures at the lateral borders of the outermost keratinocyte layers. Another significant observation is that ubinuclein is not present in the cell–cell junctions of endothelial cells which is reminiscent of what is observed for another NACos protein, symplekin (Keon et al., 1996).

In cell culture *in vitro*, we have found that MDCK cells overexpressing ubinuclein go through mitosis, but this overexpression results in a cytokinesis deficiency, as shown by the accumulation of giant cells with either large nuclei or multiple nuclei. Cytokinesis is a crucial, but poorly understood, process of cell proliferation (Field et al., 1999). Interestingly, terminal differentiation of epidermal keratinocytes has been associated with defective cell cycle progression (Gandarillas et al., 2000). Cells undergoing terminal differentiation become polyploid and occasionally multinucleate. The increase of cell size due to cycles of DNA replication in the absence of mitosis is called endoreplication. The molecular mechanisms that suppress cell division and trigger endoreplication in the onset of terminal differentiation are not well characterized. One hypothesis is that when keratinocytes proliferating in the basal cell compartment detach from the basement membrane, they produce a rigid cytoskeleton and assemble the cornified cell envelope (Fuchs and Byrne, 1994). The new cytoskeleton has been suggested to be too rigid, creating a physical constraint, preventing the cell in the spinous cell layer from splitting, even when the DNA replicatory machinery was still functional. However, endoreplication with defective cytokinesis is also found in differentiated cells that are large and highly metabolically active (Edgar and Orr-Weaver, 2001). It is also known that the AP-1, Myc and Mad complexes have a role in regulating keratinocyte proliferation and terminal differentiation (Gandarillas and Watt, 1995). Activation of c-Myc specifically promotes epidermal stem cell differentiation, but in the absence of Myc stem cell amplification is compromised and keratinocyte cell size, growth and endoreplication are

reduced (Gandarillas and Watt, 1997; Zanet et al., 2005). This suggests that endoreplication is a consequence of an active mechanism and, interestingly, we have previously shown that ubinuclein interacts with some bZip family transcription factors (Aho et al., 2000). As yet, nothing is known about the consequences of this interaction, but since ubinuclein interacts with the basic domain of these factors it can be supposed that ubinuclein modulates their function.

The functional connection between the dual localization of these proteins, on one hand, in the nucleus as transcriptional regulators possibly involved in cell differentiation and, on the other, at cell–cell junctions regulating epithelial barrier function, is largely unknown. Understanding this connection is a challenge for the future.

Materials and methods

Expression constructs

Expression vectors used for transient transfections, encoding FLAG-epitope-tagged full-length ubinuclein, have been described previously (Aho et al., 2000). In order to generate a cell line expressing ubinuclein from the tetracycline-regulatable promoter, the cDNA was released from the pcDNA3 vector by HindIII/NotI digestion and ligated into HindIII/NotI-digested pCEP4 (Invitrogen), which had been modified to drive the expression of the transgene from a minimal CMV (cytomegalovirus) promoter under the control of seven repeats of a tetracycline-response element. The resulting cloning vector, pCEP4t, contains the EBNA-1 (EBV nuclear antigen 1) gene for autonomous replication in mammalian cells and a hygromycin gene for the selection of transfected cells (Aho, 2004a).

Cell cultures

The MDCK Tet-Off cell line was purchased from Clontech (Palo Alto, CA, U.S.A.) and grown according to the manufacturer's instructions. For the transfections, cells were plated on 60-mm diameter plates, and the FuGENE™ 6 transfection reagent (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, U.S.A.) was used in the ratio of 1 µg of DNA to 3 µl transfection reagent, following the manufacturer's instructions. Doxycycline was included in the transfection medium, and, 24 h after transfection, selection was started with hygromycin. Cultures were subjected to trypsin treatment and replated before reaching confluency, usually every 3–4 days. After 3–5 passages, no more adherent cells remained in the untransfected control plates. For the induction of transgene expression, cells were plated after trypsin treatment without doxycycline, allowed to grow to 70% confluency, subjected to trypsin treatment again and replated on 35-mm-diameter tissue culture plates to be harvested either for Western blotting or indirect immunofluorescence in four-well chamber slides. HT29 cells were grown in DMEM (Dulbecco's modified

Eagle's medium) supplemented with 10% FCS (fetal calf serum) and antibiotics (100 units/ml penicillin/streptomycin).

Human foreskin keratinocytes were isolated by the Cell Culture Core Unit, Department of Dermatology, Thomas Jefferson University, Philadelphia, PA, U.S.A. After separation from epidermis by trypsin treatment, keratinocytes were plated on to Matrigel™-coated eight-well chamber slides and left to adhere and reach confluency in defined KGM (keratinocyte growth medium) (Clonetics, San Diego, CA, U.S.A.), supplemented with 60 µM Ca²⁺. Differentiation of keratinocytes and stratification of the cultures was induced through applying KGM supplemented with 1 mM Ca²⁺ on to the cells for 2 days.

Antibodies

A MAb against ubinuclein, ZAP1, was obtained by immunizing mice with a GST–ubinuclein (amino acid 284–1134) fusion protein (Wistar Institute, Hybridoma Facilities, Philadelphia, PA, U.S.A.). The hybridoma cells were cloned by limited dilution and a selected clone grown in the large-scale culture. The hybridoma culture supernatant was tested by ELISA and used for Western blotting and immunofluorescence assays in 1:3 dilution. By both Western blotting and indirect immunofluorescence, using ubinuclein deletion mutants, we located the epitope detected by the MAb ZAP1 to between amino acids 346–693 (data not shown). The MAb PPL-488 against periplakin was produced and used as described previously (Aho, 2004b).

The following commercially available primary antibodies were used: rabbit anti-FLAG (1:500 dilution; Abcam, Cambridge, MA, U.S.A.), mouse anti-β-catenin (1:500 dilution; BD Biosciences Transduction Laboratories, Lexington, KY, U.S.A.), rat anti-ZO-1 (1:1000 dilution; Chemicon International, Temecula, CA, U.S.A.), rabbit anti-ZO-1 and anti-occludin (1:50 and 1:1000 dilutions respectively; Zymed Laboratories, San Francisco, CA, U.S.A.), rabbit anti-desmoplakin (1:5000 dilution; Serotec, Raleigh, NC, U.S.A.), mouse anti-actin (1:5000 dilution; Boehringer/Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, U.S.A.) and anti-claudin-1 (1:50 dilution; polyclonal antibody, Invitrogen) and anti-involucrin (1:2000 dilution; Neomarkers, Fremont, CA, U.S.A.). Secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, U.S.A.). The HRP (horseradish peroxidase)-conjugated anti-mouse antibody was used for Western blotting at 1:25 000 dilution. Texas Red- and FITC-conjugated species-specific secondary antibodies were used for indirect immunofluorescence at 1:500 dilution in PBS with 1% BSA. Nuclei were visualized with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), which was included in the secondary antibody incubation.

RT-PCR

Total RNAs were extracted from cells in a 60-mm-diameter dish using a Nucleospin RNA/protein kit (Macherey-Nagel). Total RNAs (2.5 µg) were reversed-transcribed with (dT)₁₆ and 1 µl of Superscript II enzyme (Invitrogen) in a 20 µl reaction volume at 42°C for 1 h. PCR reactions were performed using a Taq core kit (Q-Biogen) with a set of specific primer pairs. The PCR-amplified fragments were then analysed on a 2% agarose gel. To control our RT-PCR experiments, we evaluated the endogenous expression of β-actin mRNA by RT-PCR. Amplification of a 690-bp DNA fragment corresponding to β-actin mRNA

showed that no DNA contamination was present in our preparations. The primer sequences used were as follows: β -actin forward, 5'-GCTGCGTGTGGCTCCCGAGGAG-3'; β -actin reverse, 5'-ATCTTCATTGTGCTGGGTGCCAG-3'; ubinuclein forward, 5'-CCTCTTTGATGGCTTCACCCTAC-3'; ubinuclein reverse, 5'-TGATTCCACCCAGACCCAAGTG-3'. The ubinuclein primers used were specific for both murine and human RNA.

In vitro interaction assays

The GST-ZO-1(N-terminus)-fusion protein (provided by Dr Walter Hunziker, Institute of Molecular and Cell Biology, A*STAR, Singapore) (Kausalya et al., 2004) was expressed in *Escherichia coli*, and purified according to the manufacturer's instructions (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, U.S.A.). The GST-ZO-1(N-terminus) bound to glutathione agarose was incubated with *in vitro*-translated (Promega) ^{35}S -labelled ubinuclein, essentially as described previously (Manet et al., 1993). Bound proteins were loaded on to SDS/PAGE (10% gel) and visualized by autoradiography.

Immunoblotting and co-immunoprecipitation

For Western blotting, MDCK cells were washed three times with cold PBS and lysed in 0.1 ml of SDS sample buffer (BioRad Laboratories, Hercules, CA, U.S.A.), supplemented with 2-mercaptoethanol. After boiling for 10 min, 10 μl aliquots of cell lysates were separated on 4–20% acrylamide SDS gels and then transferred on to PVDF membranes, which were blocked for 1 h at room temperature (20°C) in PBS containing 1% BSA and 5% non-fat dried milk powder. After primary antibody incubation, the membranes were washed four times, 10 min each wash, in TBS/0.5% Tween 20, incubated for 1 h at room temperature with the secondary antibody, washed again, and the signal developed using Western LightningTM Chemiluminescence Reagent Plus (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, U.S.A.).

For co-immunoprecipitation assays, confluent HT29 cells from a 100-mm-diameter culture dish were washed three times with cold PBS and lysed in 0.9 ml of lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 , 0.2% Triton X-100, 0.01% SDS and 1% glycerol) for 20 min at 4°C, centrifuged and the supernatant pre-cleared with Protein A/G plus agarose (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, U.S.A.). Polyclonal antibody (10 μg) directed against ZO-1 or EB1 as a control antibody was then added to 0.45 ml of the lysate and left overnight at 4°C, followed by 15 μl of bead suspension for 2 h. Beads were washed four times with PBS supplemented with 250 mM NaCl and 0.1% Triton X-100, and proteins were eluted by boiling with 50 μl of Laemmli buffer before being loaded on to a SDS gel and transferred on to a PVDF membrane. Membranes were incubated either with MAb ZAP1 or with polyclonal ZO-1 as described above.

Immunofluorescence studies

For indirect immunofluorescence, tissues were embedded in OCT compound, frozen and then cut into 7 μm sections. Slides were either stored frozen at -20°C or used immediately. Tissue sections, as well as the cultured cells on the chamber slides, were fixed with methanol for 10 min and, after two washes with PBS, further permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for

5 min, followed by three washes with PBS. Blocking was made with 1% BSA in PBS for 1 h at room temperature, followed by the primary antibody incubation at 8°C overnight. Slides were washed three times with PBS, each time for 5 min, followed by the secondary antibody incubation at room temperature for 1 h. After three washes with PBS, slides were mounted and studied using a fluorescence microscope (Axioskop, Carl Zeiss, Thornwood, NY, U.S.A.) or for HT29 cells, a confocal microscope (Confocal Axioplan2 LSM510, Zeiss). The images were stored with ImagePro Plus 4.0 imaging software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, U.S.A.) and processed with Photoshop 5.0 (Adobe Systems, San Jose, CA, U.S.A.) and Canvas 5 (Deneba Software, Miami, FL, U.S.A.).

Acknowledgements

We thank Dr W. Hunziker for the gift of the GST-ZO-1(N-terminus) plasmid and Ms Tiina Pajunen for GST-fusion protein purification. The Hybridoma Core Facility at the Wistar Institute is acknowledged for excellent service in MAb production. Ms Isabelle Grosjean and the 'Production et analyse des protéines' facilities of the IFR128 is also acknowledged for purification of the ZAP1 antibody. The skillful assistance of Ms Sue Gotta and the Morphology Core in obtaining the immunofluorescence images is acknowledged. We also acknowledge the 'Platim' microscope facilities of IFR128. We thank Robin Buckland for editing the manuscript prior to submission.

Funding

This work was supported by the National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, National Institutes of Health [grant number RO1 33588]; the Association pour la Recherche contre le Cancer [grant numbers 4914, 3420]; the Ligue Régionale Contre le Cancer (Comité du Rhône) [grant number 05.10.23]; the Agence Nationale pour la Recherche [grant number RPV06120CSA]; the Pôle de Compétitivité Lyon-Biopôle; and the 'Réseau Herpesvirus et Cancer'.

References

- Aho, S. (2004a) Soluble form of Jagged-1: unique product of epithelial keratinocytes and a regulator of keratinocyte differentiation. *J. Cell. Biochem.* **92**, 1271–1281
- Aho, S. (2004b) Plakin proteins are coordinately cleaved during apoptosis but preferentially through the action of different caspases. *Exp. Dermatol.* **13**, 700–707
- Aho, S., Buisson, M., Pajunen, T., Ryoo, Y. W., Giot, J. F., Gruffat, H., Sergeant, A. and Uitto, J. (2000) Ubinuclein, a novel nuclear protein interacting with cellular and viral transcription factors. *J. Cell Biol.* **148**, 1165–1176
- Anderson, J. M. and Van Itallie, C. M. (1995) Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am. J. Physiol.* **269**, G467–G475

- Balda, M. S. and Matter, K. (2000) The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *EMBO J.* **19**, 2024–2033
- Balda, M. S. and Matter, K. (2003) Epithelial cell adhesion and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol.* **13**, 310–318
- Balda, M. S., Garrett, M. D. and Matter, K. (2003) The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J. Cell Biol.* **160**, 423–432
- Barnard, D. C., Ryan, K., Manley, J. L. and Richter, J. D. (2004) Symplekin and xGLD-2 are required for CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation. *Cell* **119**, 641–651
- Behrens, J., von Kries, J. P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. and Birchmeier, W. (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**, 638–642
- Bertrand, C. A., Durand, D. M., Saidel, G. M., Laboisse, C. and Hopfer, U. (1998) System for dynamic measurements of membrane capacitance in intact epithelial monolayers. *Biophys. J.* **75**, 2743–2756
- Betanzos, A., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., Azuara, E., Amerena, J. and Gonzalez-Mariscal, L. (2004) The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Exp. Cell Res.* **292**, 51–66
- Brandner, J. M., Kief, S., Grund, C., Rendl, M., Houdek, P., Kuhn, C., Tschachler, E., Franke, W. W. and Moll, I. (2002) Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Eur. J. Cell Biol.* **81**, 253–263
- Brandner, J. M., Kief, S., Wladykowski, E., Houdek, P. and Moll, I. (2006) Tight junction proteins in the skin. *Skin Pharmacol. Physiol.* **19**, 71–77
- Collins, J. E. (2002) Adhesion between dendritic cells and epithelial cells maintains the gut barrier during bacterial sampling. *Gut* **50**, 449–450
- Daniel, J. M. and Reynolds, A. B. (1999) The catenin p120^{ctn} interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol. Cell Biol.* **19**, 3614–3623
- Edgar, B. A. and Orr-Weaver, T. L. (2001) Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* **105**, 297–306
- Fanning, A. S., Jameson, B. J., Jesaitis, L. A. and Anderson, J. M. (1998) The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* **273**, 29745–29753
- Field, C., Li, R. and Oegema, K. (1999) Cytokinesis in eukaryotes: a mechanistic comparison. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**, 68–80
- Fuchs, E. and Byrne, C. (1994) The epidermis: rising to the surface. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 725–736
- Gandarillas, A. and Watt, F. M. (1995) Changes in expression of members of the fos and jun families and myc network during terminal differentiation of human keratinocytes. *Oncogene* **11**, 1403–1407
- Gandarillas, A. and Watt, F. M. (1997) c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. *Genes. Dev.* **11**, 2869–2882
- Gandarillas, A., Davies, D. and Blanchard, J. M. (2000) Normal and c-Myc-promoted human keratinocyte differentiation both occur via a novel cell cycle involving cellular growth and endoreplication. *Oncogene* **19**, 3278–3289
- Gonzalez-Mariscal, L., Ponce, A., Alarcon, L. and Jaramillo, B. E. (2006) The tight junction protein ZO-2 has several functional nuclear export signals. *Exp. Cell Res.* **312**, 3323–3335
- Gottardi, C. J., Arpin, M., Fanning, A. S. and Louvard, D. (1996) The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 10779–10784
- Hofmann, I., Schnolzer, M., Kaufmann, I. and Franke, W. W. (2002) Symplekin, a constitutive protein of karyo- and cytoplasmic particles involved in mRNA biogenesis in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1665–1676
- Huerta, M., Munoz, R., Tapia, R., Soto-Reyes, E., Ramirez, L., Recillas-Targa, F., Gonzalez-Mariscal, L. and Lopez-Bayghen, E. (2007) Cyclin D1 is transcriptionally down-regulated by ZO-2 via an E box and the transcription factor c-Myc. *Mol. Biol. Cell* **18**, 4826–4836
- Islas, S., Vega, J., Ponce, L. and Gonzalez-Mariscal, L. (2002) Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. *Exp. Cell Res.* **274**, 138–148
- Jaramillo, B. E., Ponce, A., Moreno, J., Betanzos, A., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E. and Gonzalez-Mariscal, L. (2004) Characterization of the tight junction protein ZO-2 localized at the nucleus of epithelial cells. *Exp. Cell Res.* **297**, 247–258
- Kausalya, P. J., Phua, D. C. and Hunziker, W. (2004) Association of ARVCF with zonula occludens (ZO)-1 and ZO-2: binding to PDZ-domain proteins and cell-cell adhesion regulate plasma membrane and nuclear localization of ARVCF. *Mol. Biol. Cell* **15**, 5503–5515
- Kavanagh, E., Buchert, M., Tsapara, A., Choquet, A., Balda, M. S., Hollande, F. and Matter, K. (2006) Functional interaction between the ZO-1-interacting transcription factor ZONAB/DbpA and the RNA processing factor symplekin. *J. Cell Sci.* **119**, 5098–5105
- Keon, B. H., Schafer, S., Kuhn, C., Grund, C. and Franke, W. W. (1996) Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein. *J. Cell Biol.* **134**, 1003–1018
- Kolev, N. G. and Steitz, J. A. (2005) Symplekin and multiple other polyadenylation factors participate in 3'-end maturation of histone mRNAs. *Genes Dev.* **19**, 2583–2592
- Langbein, L., Grund, C., Kuhn, C., Praetzel, S., Kartenbeck, J., Brandner, J. M., Moll, I. and Franke, W. W. (2002) Tight junctions and compositionally related junctional structures in mammalian stratified epithelia and cell cultures derived therefrom. *Eur. J. Cell Biol.* **81**, 419–435
- Langbein, L., Pape, U. F., Grund, C., Kuhn, C., Praetzel, S., Moll, I., Moll, R. and Franke, W. W. (2003) Tight junction-related structures in the absence of a lumen: occludin, claudins and tight junction plaque proteins in densely packed cell formations of stratified epithelia and squamous cell carcinomas. *Eur. J. Cell Biol.* **82**, 385–400
- Lesuffleur, T., Kornowski, A., Augeron, C., Dussaulx, E., Barbat, A., Laboisse, C. and Zweibaum, A. (1991) Increased growth adaptability to 5-fluorouracil and methotrexate of HT-29 sub-populations selected for their commitment to differentiation. *Int. J. Cancer* **49**, 731–737
- Malminen, M., Koivukangas, V., Peltonen, J., Karvonen, S. L., Oikarinen, A. and Peltonen, S. (2003) Immunohistological distribution of the tight junction components ZO-1 and occludin in regenerating human epidermis. *Br. J. Dermatol.* **149**, 255–260
- Mandel, C. R., Bai, Y. and Tong, L. (2008) Protein factors in pre-mRNA 3'-end processing. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 1099–1122
- Manet, E., Allera, C., Gruffat, H., Mikaelian, I., Rigolet, A. and Sergeant, A. (1993) The acidic activation domain of the Epstein-Barr virus transcription factor R interacts *in vitro* with both TBP and TFIIB and is cell-specifically potentiated by a proline-rich region. *Gene Expr.* **3**, 49–59
- Matter, K. and Balda, M. S. (2003a) Functional analysis of tight junctions. *Methods* **30**, 228–234
- Matter, K. and Balda, M. S. (2003b) Signalling to and from tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 225–236
- Matter, K. and Balda, M. S. (2007) Epithelial tight junctions, gene expression and nucleo-junctional interplay. *J. Cell Sci.* **120**, 1505–1511
- Matter, K., Aijaz, S., Tsapara, A. and Balda, M. S. (2005) Mammalian tight junctions in the regulation of epithelial differentiation and proliferation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**, 453–458
- Mertens, C., Hofmann, I., Wang, Z., Teichmann, M., Sepehri Chong, S., Schnolzer, M. and Franke, W. W. (2001) Nuclear particles containing RNA polymerase III complexes associated with the junctional plaque protein plakophilin 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 7795–7800

- Morita, K. and Miyachi, Y. (2003) Tight junctions in the skin. *J. Dermatol. Sci.* **31**, 81–89
- Pummi, K., Malminen, M., Aho, H., Karvonen, S. L., Peltonen, J. and Peltonen, S. (2001) Epidermal tight junctions: ZO-1 and occludin are expressed in mature, developing, and affected skin and *in vitro* differentiating keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **117**, 1050–1058
- Pummi, K. P., Heape, A. M., Grenman, R. A., Peltonen, J. T. and Peltonen, S. A. (2004) Tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudins in developing and adult human perineurium. *J. Histochem. Cytochem.* **52**, 1037–1046
- Shin, K., Fogg, V. C. and Margolis, B. (2006) Tight junctions and cell polarity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 207–235
- Sourisseau, T., Georgiadis, A., Tsapara, A., Ali, R. R., Pestell, R., Matter, K. and Balda, M. S. (2006) Regulation of PCNA and cyclin D1 expression and epithelial morphogenesis by the ZO-1-regulated transcription factor ZONAB/DbpA. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 2387–2398
- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G. and Nakatani, Y. (2004) Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* **116**, 51–61
- Tsuruta, D., Green, K. J., Getsios, S. and Jones, J. C. (2002) The barrier function of skin: how to keep a tight lid on water loss. *Trends Cell Biol.* **12**, 355–357
- Wang, P., Lou, P. J., Leu, S. and Ouyang, P. (2002) Modulation of alternative pre-mRNA splicing *in vivo* by pinin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **294**, 448–455
- Zahraoui, A., Louvard, D. and Galli, T. (2000) Tight junction, a platform for trafficking and signaling protein complexes. *J. Cell Biol.* **151**, 31–36
- Zanet, J., Pibre, S., Jacquet, C., Ramirez, A., de Alboran, I. M. and Gandarillas, A. (2005) Endogenous Myc controls mammalian epidermal cell size, hyperproliferation, endoreplication and stem cell amplification. *J. Cell Sci.* **118**, 1693–1704

Received 8 May 2008/24 September 2008; accepted 30 September 2008

Published as Immediate Publication 30 September 2008, doi:10.1042/BC20080072

Partie II :

**Identification de partenaires cellulaires de
l'ubiquitine**

1. Objectifs de l'article n°2

Nous avons démontré dans l'article n°1 que l'ubiquitine est une protéine NACos (Aho et al., 2009). Au niveau nucléaire, l'ubiquitine interagit avec le facteur de transcription viral ZEBRA et d'autres facteurs de transcription cellulaires de la famille bZIP tels que c-jun et C/EBP (Aho et al., 2000). Au niveau des jonctions serrées, l'ubiquitine interagit avec la protéine ZO-1 (Aho et al., 2009). Dans cet article, nous définissons avec plus de précision les domaines de ZO-1 et de l'ubiquitine impliqués dans cette interaction. D'autre part, les fonctions de l'ubiquitine dans la cellule épithéliale sont inconnues ainsi que les mécanismes régulant sa localisation dans la cellule. Pour mieux comprendre le rôle de l'ubiquitine dans la cellule, nous avons tenté d'identifier ses protéines partenaires en adoptant une approche protéomique par analyse en spectrométrie de masse.

2. Principaux résultats de l'article n°2

*** L'ubiquitine interagit avec le domaine PDZ2 de ZO-1.**

D'abord, en utilisant une technique basée sur la complémentation de fluorescence, nous avons montré *in vivo* que la région N-terminale de l'ubiquitine (acides aminés 1-300) interagit avec la région N-terminale de ZO-1 comprenant ses 3 domaines PDZ (acides aminés 1-500). Pour préciser les domaines d'interaction entre les 2 protéines, des expériences de GST-pulldown ont ensuite été menées en incubant différentes constructions d'ubiquitine traduites *in vitro* avec la protéine recombinante GST - ZO-1 incluant les 3 domaines PDZ de ZO-1 ou chacun de ses domaines PDZ. Nos résultats ont montré que l'ubiquitine interagit spécifiquement avec le domaine PDZ2 de ZO-1. D'autre part, nous avons pu définir une région de l'ubiquitine de 60 acides aminés (résidus 163 à 223) impliquée dans l'interaction avec ZO-1.

*** Stratégie d'identification des partenaires de l'ubiquitine**

Pour identifier les partenaires de l'ubiquitine, nous avons travaillé sur des cellules HT29 à confluence. Après une lyse hypotonique à pH basique, différentes étapes de fractionnement subcellulaire ont été menées par centrifugation et ultracentrifugation successives. Nous avons recueilli 2 types de fractions cytosoliques (S1 et S2) différant par

leur degré de fractionnement et une fraction « membranaire » (MB) comparable à une fraction microsomale issue d'un protocole de fractionnement classique. Ces différents extraits protéiques ont été incubés avec la protéine recombinante GST-ubynucléine. Après plusieurs étapes de lavage pour éliminer la fixation non spécifique à l'ubynucléine, chaque échantillon a été élué dans des conditions dénaturantes et séparé en gel d'électrophorèse unidimensionnelle (« pseudo-separating »). L'intégralité des protéines présentes dans chaque échantillon a été analysée en spectrométrie de masse en tandem afin d'identifier les partenaires potentiels ayant interagi avec la protéine recombinante GST-ubynucléine (**Figure 17**).

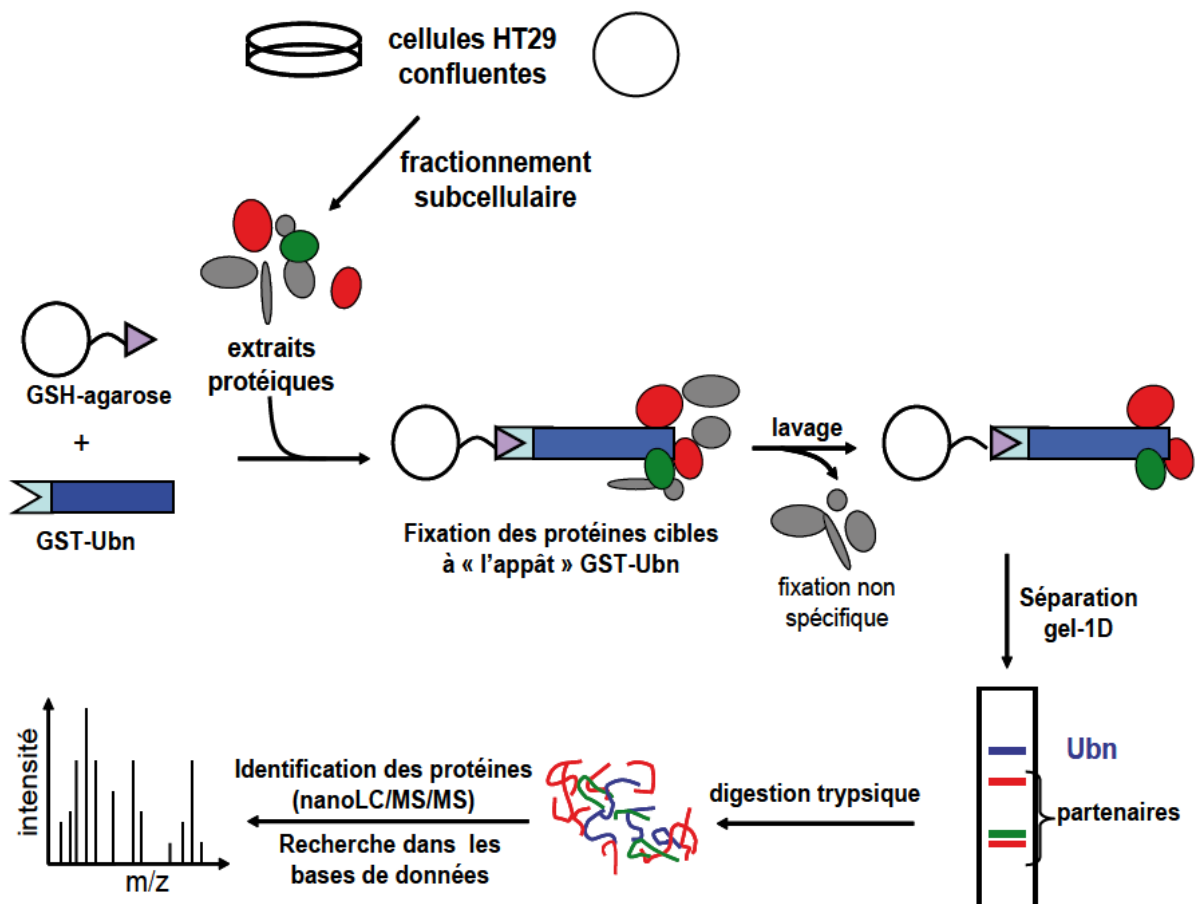


Figure 17: Stratégie d'identification des partenaires de l'ubynucléine (Ubn) par une technique de GST-pulldown couplée à une analyse en spectrométrie de masse (MS).

* Validation des partenaires de l'ubynucléine

Chaque protéine a été identifiée en spectrométrie de masse à partir d'un minimum de 2 peptides (voir la liste complète des protéines identifiées en **Annexe 1**). La protéine identifiée était considérée comme un partenaire putatif de l'ubynucléine à la condition qu'elle soit

détectée de manière exclusive avec la GST-ubiquitine et non pas aussi avec le contrôle négatif GST seul. En adoptant ces critères, nous avons pu identifier 100 candidats partenaires pour l'ubiquitine. Parmi cette liste de partenaires, certaines protéines retrouvées couramment de manière non spécifique en spectrométrie de masse, pourraient être des contaminants de l'expérience tels que les ribonucléoprotéines (hnRNP), les protéines ribosomales ou les facteurs d'initiation de la traduction. Les partenaires putatifs de l'ubiquitine ont été classés suivant leur fonction biologique ou leur localisation dans la cellule. Nous avons identifié des protéines impliquées dans diverses fonctions biologiques telles que le remodelage de la chromatine, la maturation de l'ARN, la traduction ou la signalisation cellulaire. Une partie des protéines identifiées sont des protéines associées à la membrane cytoplasmique. Pour s'assurer de la spécificité des interactions entre l'ubiquitine et les protéines partenaires proposées, nos résultats ont été validés par d'autres techniques. Nous avons pu vérifier l'interaction existant entre l'ubiquitine et les protéines RACK-1 et LYRIC par co-localisation et co-immunoprécipitation. D'autre part, nous avons pu mettre en évidence une interaction entre l'ubiquitine et la cinguline bien que cette dernière n'ait pas été identifiée à partir des expériences de spectrométrie de masse. L'ensemble des résultats suggère que l'ubiquitine pourrait agir comme une protéine chaperonne participant au contrôle de l'adhésion et de la prolifération cellulaires.

3. Article n°2

(Lupo et al., 2010) soumission en cours.

1 **IDENTIFICATION OF NEW INTERACTING PARTNERS OF THE SHUTTLING**
2 **PROTEIN UBINUCLEIN (UBN-1)**

3
4 **Julien Lupo^{1,2}, Charlotte Sueur¹, Audrey Conti¹, Pierre-Alain Coly¹, Yohann Couté⁶,**
5 **Wim P Burmeister¹, Raphaële Germi^{1,2}, Walter Hunziker⁷, Evelyne Manet^{3,4,5}, Henri**
6 **Gruffat^{3,4,5}, Patrice Morand^{1,2} and Véronique Boyer^{1§}**

7
8 From the ¹ Unit of Virus Host Cell Interactions (UVHCI), UMI 3265 UJF-EMBL-CNRS, 6 rue
9 Jules Horowitz, BP 181, F-38042 Grenoble cedex 9;² Laboratoire de virologie, CHU Grenoble,
10 BP 217 38043 Grenoble cedex 9. ³ INSERM U758, 46 allée d'Italie, F-69007 Lyon; ⁴ ENS-
11 Lyon, 46 allée d'Italie, F-69007 Lyon; ⁵ IFR 128 BioSciences Gerland-Lyon Sud, 21 avenue
12 Tony Garnier, 69365 Lyon Cedex 07, France; ⁶ Laboratoire d'Etude de la Dynamique des
13 Protéomes, U880, CEA/DSV/iRTSV-INSERM-UJF, 17 rue des Martyrs, 38 054 Grenoble
14 Cedex 09, France; the ⁷ Institute of Molecular and Cell Biology, Epithelial Cell Biology
15 Laboratory, Singapore 1386473, Singapore.

16
17 Running head: interacting partners of Ubn-1

18
19 §Address correspondence to: Dr Véronique Boyer, Unit of Virus Host Cell Interactions
20 (UVHCI), 6 rue Jules Horowitz, BP 181, F-38042 Grenoble cedex 9. Fax: +33 (0) 4 76 20 94
21 00; E-mail: boyer@embl.fr

22
23

24 **Abstract**

25 We have previously characterized ubinuclein (Ubn-1) as a NACos (Nuclear and Adherent
26 junction Complex components) protein which interacts with viral or cellular transcription
27 factors and the ZO-1 tight junction (TJ) protein. The purpose of this study was to get more
28 insights on the partners of Ubn-1, especially those of the epithelial junctions. Using *in vitro*
29 and *in vivo* assays, we first demonstrated that the N-terminal region of Ubn-1 is sufficient for
30 its interaction with the PDZ2 domain of ZO-1. Both N-terminal domains triggered the
31 functional interaction between the 2 proteins. Moreover, co-immunoprecipitation and confocal
32 microscopy experiments revealed the tight junction protein cingulin as a new interacting
33 partner of Ubn-1. In order to identify further binding partners of Ubn-1 in different
34 subcellular fractions of HT29 cells, a proteomic approach has been realized using a GST pull-
35 down assay. A total of 100 proteins were identified as putative partners of Ubn-1 and
36 classified in different functional classes. LYRIC (Lysine-rich CEACAM1-associated protein)
37 and RACK-1 (receptor for activated C-kinase) proteins were validated as bona fide interacting
38 partners of Ubn-1. Altogether, these results suggest that Ubn-1 is a scaffold protein which
39 may be involved in several processes such as cell-cell contact signalling or modulation of
40 gene activity.

41

42

43

44

45 **Introduction**

46

47 Tight junctions (TJs) are intercellular contacts that seal the space between individual
48 cells of an epithelial sheet collectively separating tissue compartments. TJs, apart from their
49 role as barriers between adjacent cells are also implicated in vesicle targeting, cytoskeletal
50 dynamics, signalling for proliferation and transcription, and definition of cellular polarity. The
51 growing list of diseases caused by mutations in the genes encoding TJ proteins has provided
52 significant insight into the TJ roles. Moreover, the deregulation of TJs in epithelia seen during
53 cancer processes or following bacterial or viral infections leads to junctional dissociation and
54 loss of epithelial barrier function which are critical steps in these diseases. For example, the
55 CagA protein of *H. pylori* translocates into host cells and associates with the ZO-1 (zonula
56 occludens) - JAM-A (junctional adhesion molecule) complex of the TJs, thus contributing to
57 the corruption of the gastric epithelial barrier (3). A second example is the SV40 small tumor
58 antigen which, during the process of epithelial cell transformation, induces a marked
59 disorganization of the actin cytoskeleton accompanied by an altered localization and a down-
60 regulation of several TJ proteins such as ZO-1, occludin and claudin-1 (38). Finally, another
61 striking example concerns Rotavirus infection during which occludin totally disappears from
62 intestinal epithelial differentiated cells, this phenomenon participating to the disorganization
63 of the barrier function of the TJs (10).

64 ZO-1, ZO-2, and ZO-3 are peripheral junctional proteins of the TJ complex clustering the
65 transmembrane proteins and providing redundant attachments to the cytoskeleton. ZO-1 can
66 bind directly to ZO-2 or ZO-3 to form ZO-1/ZO-2 and ZO-1/ZO-3 complexes that link
67 directly to actin filaments. In parallel, ZO-1 binds directly to the cytoplasmic tail of
68 transmembrane proteins such as occludin or claudin. Interestingly, ZO-1 and ZO-2 have also
69 been to concentrate within nucleus in response to chemical stress or mechanical injury, during
70 cell dissociation such cancer process or when cells are cultured at low confluence (23, 27, 45,
71 47). Several nuclear localisation and export signals (NLS and NES) have been described for
72 ZO-2 (22). The nuclear localization of ZO proteins may be functionally linked to the
73 description that ZO-1 and ZO-2 associate with proteins involved in the regulation of cell
74 proliferation such as the transcription factors Jun, Fos, C/EBP (CCAAT/enhancer-binding
75 protein) (12), ZONAB/DbpA (ZO-1 associated nucleic-acid-binding protein/DNA binding
76 protein A) (30) and KyoT2 (25). ZO-2 has also been shown to modulate AP-1-regulated gene
77 transcription (26).

78 We have previously shown that ZO proteins could interact with ubinuclein (Ubn-1)
79 (2), a cellular protein first described as a nuclear protein interacting with the EBV
80 transcription factor EB1 (also called ZEBRA or Zta) and other cellular transcription factor of
81 the leucine-zipper family such as C/EBP or Jun (1). We reported that this cellular protein
82 shuttles between the nucleus and the TJs thus belonging to the nuclear and the adhesion
83 complex components (NACos) (2). Recently, studies described nuclear Ubn-1 as a histone
84 chaperone in senescent cells (4, 7). However the role of Ubn-1 in epithelial cells remains
85 elusive. In this work, we first defined more precisely the interaction modalities between Ubn-
86 1 and ZO-1 using *in vitro* and *in vivo* assays. Then, in order to get more insights on the role of
87 Ubn-1, notably in the cytoplasmic plaque of TJs, we identified putative interacting partners of
88 Ubn-1 using a proteomic approach. Some of which were confirmed by biochemical and
89 microscopic experiments. The presented results suggest that Ubn-1 may be a functional
90 scaffold protein involved in cell-cell contact signalling and the modulation of gene activity.

91
92

93 **Materials and Methods**

94

95 **Expression constructs**

96 Expression vectors encoding FLAG-epitope-tagged full-length Ubn-1 have been described
97 previously (1). Plasmid p2101 was made from a construct containing the first 1037 nucleotide
98 of the Ubn-1 ORF in which the NgoMIV restriction fragment was deleted. p2163, p2234 and
99 p2235 contain respectively the 744, 490 and 231 first nucleotides of the Ubn-1 ORF. These
100 plasmids contain a T7 promoter upstream of the Ubn-1 ORF allowing *in vitro* transcription of
101 the different Ubn-1 mutants. Vectors encoding the N-terminal (Venus 1) and the C-terminal
102 (Venus 2) fragment of Venus were kindly provided by Dr S.W. Michnick (Biochemistry
103 Department, Montréal University, Canada). Restriction enzyme sites *BspeI/XbaI* and
104 *XmaI/SpeI* were inserted by PCR at N-terminal ends of Ubn-1 (amino-acids 1-300) and ZO-1
105 (amino acids 1-500) to clone into *BspeI/XbaI* sites of Venus 1 and Venus 2, respectively. As
106 negative control, we used vectors encoding Venus 1-Alix and Venus 2-Alix fusion proteins
107 kindly provided by Dr W. Weissenhorn (UVHCI, Grenoble, France).

108
109
110

111 **Cell cultures and transfection**

112 HEK 293 and HT29 epithelial cells were cultured in DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
113 containing 10% fetal bovine serum and antibiotics (100 units/ml penicillin/streptomycin). All
114 cell lines were grown at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. For the transfection of HEK 293,
115 cells were plated on 35-mm diameter plates, and Lipofectamine 2000 (Invitrogen) was used in
116 the ratio of 4 µg of DNA to 15 µl transfection reagent, following the manufacturer's
117 instructions.

118

119 **Antibodies**

120 The mAb against Ubn-1 was produced and used as described previously (2). The rabbit
121 polyclonal antibody against LYRIC was a gift from Dr Deborah E. Britt (Department of
122 Medicine, Rhode Island Hospital/Brown University, USA). The rabbit polyclonal antibody
123 against Alix was a gift from Dr W Weissenhorn (UVHCI, Grenoble, France). The mAb
124 control was a purified mouse IgG1 kappa (Gentaur, Brussels, Belgium). The following
125 commercially available primary antibodies were used: mouse IgM anti-Rack-1 (BD
126 Biosciences, San Jose, CA, USA), mouse anti-lamin A/C (Santa Cruz Biotechnology, Santa
127 Cruz, CA, U.S.A), rabbit anti-cingulin and anti-ZO-1 (Invitrogen), rabbit anti-tubulin (Sigma,
128 Saint Louis, MI, U.S.A.). Secondary HRP-conjugated anti-mouse antibody used for Western
129 blotting was purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA,
130 U.S.A.). HRP-Protein A was purchased from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Alexa 350,
131 Alexa 488 and Alexa 594-conjugated secondary antibodies (Invitrogen) were used for indirect
132 immunofluorescence. IgM anti-Rack-1 was revealed with a biotin-conjugated anti-IgM
133 antibody and Alexa 594-conjugated streptavidine (Invitrogen) for indirect
134 immunofluorescence or HRP-conjugated streptavidine (Invitrogen) for Western blotting.

135

136 **GST-fusion proteins and *in vitro* protein-binding assays**

137 The GST-Ubn-1 fusion protein was described previously (1). The GST-ZO-1, ZO-2 and ZO-
138 3 (N-terminus) fusion proteins (28) were expressed in *Escherichia coli*, and purified
139 according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare Life Sciences, Orsay, France).
140 The GST-ZOs (N-terminus) bound to glutathione sepharose were incubated with *in vitro*-
141 translated ³⁵S-labelled Ubn-1 constructs (Promega, Madison, WIS, USA), essentially as
142 described previously (34). Bound proteins were loaded on to SDS/PAGE (10% gel) and
143 visualized by autoradiography. Proteins were then transferred on to a nitrocellulose membrane
144 before staining by Red Ponceau.

145

146 **Preparation of HT29 cellular extracts**

147 HT29 cells were plated onto 10 100-mm diameter plates at 80% confluent density at 48-72
148 hours before utilization for biochemistry. The day of purification, cells were quickly rinsed
149 four times with ice cold 10 mM HEPES, pH 9.0, and incubated in the same buffer for three
150 hours at 4°C without agitation. At the end of three hours, the buffer was decanted; cells were
151 immediately scraped off the plates, collected in a 10 ml conical tube chilled on ice and passed
152 10 times through a 22 G needle. After homogenization, a cocktail of protease (Complete
153 EDTA-free, Roche Diagnostics, Indianapolis, In, USA) and phosphatase inhibitors (Protein
154 Phosphatase Inhibitor Set II, Calbiochem, Darmstadt, Germany) were added immediately.
155 Large organelles, nuclei, and whole cells were gently removed by centrifugation at 1,000 g
156 for 15 minutes at 4°C. The pellet, which contains the nuclei, was rehomogenized in ice-cold
157 lysis buffer, containing 250 mM sucrose, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl₂ and a
158 cocktail of protease/phosphatase inhibitors, then was centrifuged at 6,000 g for 15 min at 4°C.
159 The pellet was resuspended in cushion buffer (2 M sucrose, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM
160 MgCl₂ and protease/phosphatase inhibitors), filtered, layered onto cushion buffer, and
161 ultracentrifuged at 100,000 g for 1h at 4°C. Nuclear proteins were extracted by resuspending
162 the nuclei in 5 volumes of 20 mM HEPES pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 0.42 M NaCl, 0.2 mM
163 EDTA, and 25% glycerol for 30 min at 4°C with gentle shaking. The nuclei were then lysed
164 by 10 passages through a 20-gauge needle, and debris were removed by centrifugation at
165 6,000 g for 30 min. The supernatant served as “nuclear” fraction (N).

166 The supernatant obtained after the first centrifugation at 1,000 g served as source of cytosol
167 and microsomes. A second centrifugation was performed at 6,000 g for 30 minutes at 4°C to
168 clear the supernatant and to remove the rest of nuclear components. Half of the resulting
169 supernatant called S1 was kept at 4°C for GST pulldown experiments and Western blotting.
170 The other half of S1 was centrifuged at 100,000 g (Optima LE-80K ultracentrifuge, Beckman
171 Coulter) for 60 minutes at 4°C onto a saturated sucrose cushion (2 M sucrose, 50 mM Tris-
172 HCl pH 7.4, 5 mM MgCl₂). The supernatant thus obtained (S2 supernatant fraction) was
173 stored at 4°C for further experiments. Membrane fraction (MB fraction) was collected at the
174 buffer and sucrose interface, washed with ice cold distilled water, and re-centrifuged at
175 100,000 g onto a saturated sucrose cushion into a new tube. The washed membranes were
176 collected at the water/sucrose interface and diluted in 10% CHAPS in distilled water (chilled
177 to 4°C) to a final concentration of 2% CHAPS detergent.

178

179 **Western blot of different prepared fractions**

180 N, S1, S2 and MB fractions were prepared as described above and aliquoted (100 µl each) for
181 Western blot analysis. Total protein concentrations of different fractions were measured using
182 a Bradford assay. After boiling for 10 min, 20 µg aliquots of cell lysates were separated on 6-
183 15% acrylamide SDS gels and then transferred on to PVDF membranes, which were blocked
184 for 1 h at room temperature (20°C) in TBS containing 5% non-fat dried milk powder. After
185 primary antibody incubation, the membranes were washed two times, 10 min each wash, in
186 TBS/0.1% Tween 20, incubated for 1 h at room temperature with the secondary antibody,
187 washed again, and the signal developed using the Supersignal West Pico Chemiluminescent
188 Substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

189

190 **Pull-down of proteins for MS analysis**

191 The different fractionated supernatants (S1, S2 and MB) were precleared for 2h at 4°C with
192 25 µl of glutathione-linked sepharose beads to remove proteins interacting non-specifically
193 with the beads. After centrifugation at 2000g for 3 min, the supernatants were incubated with
194 sepharose conjugated GST-Ubn-1 fusion protein or GST protein (negative control) overnight
195 at 4°C. Beads were then collected and washed 4 times at 4°C with 0.5ml of washing buffer
196 (250 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8, 0.1% NP 40, 0.5% Triton X-100). Proteins obtained from
197 pull-down experiments were eluted by boiling with 50 µl of Laemmli buffer, resolved by
198 SDS-PAGE and visualized by Coomassie staining.

199

200 **MS analysis**

201 Protein bands were manually excised from the gels and washed several times by incubation in
202 25 mM NH₄HCO₃ for 15 min and then in 50 % (v/v) acetonitrile containing 25mM NH₄HCO₃
203 for 15 min. Gel pieces were then dehydrated with 100 % acetonitrile and then incubated with
204 7 % H₂O₂ for 15 min before being washed again with the destaining solutions described
205 above. 0.15 µg of modified trypsin (Promega, sequencing grade) in 25 mM NH₄HCO₃ was
206 added to the dehydrated gel spots for an overnight incubation at 37°C. Peptides were then
207 extracted from gel pieces in three 15 min sequential extraction steps in 30 µL of 50%
208 acetonitrile, 30 µL of 5% formic acid and finally 30µL of 100% acetonitrile. The pooled
209 supernatants were then dried under vacuum. The dried extracted peptides were resuspended in
210 5% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid and analysed by online nanoLC-MS/MS
211 (Ultimate 3000, Dionex and LTQ-Orbitrap, Thermo Fischer Scientific). The nanoLC method
212 consisted in a 40-minutes gradient ranging from 5% to 55% acetonitrile in 0.1% formic acid

213 at a flow rate of 300 nL/min. Peptides were sampled on a 300 μ m x 5 mm PepMap C18
214 precolumn and separated on a 75 μ m x 150 mm C18 column (Gemini C18, Phenomenex). MS
215 and MS/MS data were acquired using Xcalibur (Thermo Fischer Scientific) and processed
216 automatically using Mascot Daemon software (version 2.2, Matrix Science). Consecutive
217 searches against the concatenated Swiss-Prot and Trembl databases (respectively version 57.6
218 and 40.6, decoy database, Homo sapiens taxonomy, 164'620 entries) were performed for each
219 sample using an in-house version of Mascot 2.2). ESI-TRAP was chosen as the instrument,
220 trypsin as the enzyme and 2 missed cleavages allowed. Precursor and fragment mass error
221 tolerance were set respectively at 10 ppm and 1 Da. Peptide modifications allowed during the
222 search were: acetyl (N-ter), dioxidation (M), oxidation (M) and trioxidation (C). Proteins
223 identified with a minimum of 2 peptides each with a score higher than the query identity
224 threshold ($p < 0.01$) and of rank 1 were automatically validated using IRMa (version 1.23.1)
225 (18). The filtered results were downloaded into a MSI database. For each identified protein,
226 the spectral count values (number of spectra assigned per protein in the sample) were
227 calculated and reported in the result tables (Table S1). A homemade tool (hEIDI) was used for
228 the compilation, grouping and comparison of the proteins.

229

230 **Co-immunoprecipitation assays**

231 Confluent HT29 cells from a 100-mm-diameter culture dish were washed three times with
232 cold PBS and lysed in 0.9 ml of lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.5, 200 mM NaCl, 1 mM
233 $MgCl_2$, 0.2% Triton X-100, 0.01% SDS and 1% glycerol) for 20 min at 4°C, centrifuged and
234 the supernatant pre-cleared with Protein A/G plus agarose (Santa Cruz Biotechnology).
235 Antibodies directed against targeted protein or control antibodies were then added to 0.45 ml
236 of the lysate overnight at 4°C, followed by adding 15 μ l of bead suspension for 2 h. Beads
237 were washed four times with PBS supplemented with 250 mM NaCl and 0.1% Triton X-100,
238 and proteins were eluted by boiling with 50 μ l of Laemmli buffer before being loaded on a
239 SDS gel (6-15% acrylamide) and transferred to a PVDF membrane.

240

241 **Immunofluorescence studies**

242 Cultured cells on the coverslips were fixed with methanol for 20 min and with acetone for
243 30s, followed by washes with PBS. Blocking was made with 3% goat preimmun serum (GPI)
244 diluted in TBS/0.1% Triton X-100 for 30 min at room temperature. Cells fixed on the slides
245 were incubated with the primary antibody diluted in 1% GPI-TBS/0.1% Triton X-100 for 1h
246 at room temperature and then washed two times with TBS/0.1% Triton followed by the

247 secondary antibody incubation at room temperature for 1 h. After washes with TBS/0.1%
248 Triton X-100, slides were mounted with mowiol and studied using a fluorescence microscope
249 (Axio Imager Z1 Microscope System, Zeiss, Jena, Germany) or a confocal microscope
250 (Confocal Axioplan2 LSM510, Zeiss). Images were processed with Adobe Photoshop CS4
251 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

252

253

254 **Results**

255

256 **Mapping of Ubn-1 and ZO interaction domains**

257 As previously shown by biochemical and microscopic studies, Ubn-1 interacts with the N-
258 terminal part of ZO-1 encompassing its PDZ domain (2). In order to define more precisely the
259 interaction domains between both proteins, experiments based on protein-fragment
260 complementation assay (PCA) were carried out. This technique is based on the formation of a
261 fluorescent complex from fragments of fluorescent proteins that associates when the proteins
262 fused to these fragments interact together (41). The N-terminal regions of Ubn-1 (amino acids
263 1 to 300) and ZO-1 proteins (amino acids 1 to 500, including the PDZ domains), were fused
264 respectively to the N-terminal and C-terminal halves of Venus protein. In 293 cells, co-
265 expression of these chimeric proteins led to the formation of a specific fluorescent signal
266 localised in the nuclei of the transfected cells whereas the expression of each of these proteins
267 alone or with another protein (Alix protein fused to N-terminal or C-terminal fragment of
268 venus protein) did not trigger fluorescence emission (Fig. 1A). Furthermore, expression of the
269 Venus1-Ubn-1-N-ter and Venus2-ZO-1-N-ter in the same cell induced the relocalization of
270 ZO-1 in the nucleus as shown in Fig. 1A (third panel, see arrows).

271 In order to further characterize the interaction domains of Ubn-1 and ZO-1 proteins, GST
272 pulldown assays were realized. To map the domain of Ubn-1 responsible for the interaction
273 with ZO-1, a series of *in vitro*-translated Ubn-1 constructs was tested for the affinity to GST-
274 ZO-1 (N-terminus)-fusion protein (Fig. 2A). As shown in Fig 2B, deletion of the N-terminal
275 region of Ubn-1 (p1771 mutant) abrogated the binding with GST-ZO-1N-ter. Region
276 involving amino acids 1 to 248 is necessary for binding to ZO-1 (p2163 mutant). Finally,
277 results obtained with p2101 and p2234 mutants showed that the region including amino acids
278 163 to 223 of Ubn-1 was implicated in the interaction with the N-terminal part of ZO-1.
279 Furthermore, as shown in Fig 2B, the PDZ2 domain of ZO-1 was responsible for the

280 interaction with Ubn-1. Same result was obtained with the p2163 Ubn-1 mutant (data not
281 shown).

282

283 **Characterization of the interaction between Ubn-1 and cingulin**

284 Among TJ proteins described in the literature, the cingulin protein has the property to interact
285 with ZO-1, ZO-2 and ZO-3 proteins (14), as it is the case for Ubn-1. We then tested if Ubn-1
286 and cingulin could represent binding partners. As shown in Fig. 3A, cingulin co-
287 immunoprecipitated with the anti-Ubn-1 antibody but not with a control antibody unable to
288 immunoprecipitate Ubn-1. Confocal microscopy at the TJ stack level was able to demonstrate
289 a large colocalisation of both proteins in TJ of HT29 cells (Fig. 3B).

290

291

292 **Identification of Ubn-1 interacting partners using proteomics approach**

293 In order to identify multi-protein complexes associated with Ubn-1, GST-pull-down assays
294 were combined with MS analyses. For this, different subfractions of HT29 confluent
295 epithelial cells were prepared. These fractions were tested by western blotting to reveal the
296 distribution of markers of cellular organelles (Fig. 4A). ZO-1 protein which is a marker of TJ
297 and a partner of Ubn-1 was mostly present in the cytosolic fractions (S1 and S2) and appeared
298 weakly in the membrane fraction (MB) which is equivalent to a classical microsomal fraction
299 (15). As expected, the less fractionated sample (S1) was partly contaminated by nuclear
300 components. The S2 fraction was highly enriched in cytoskeletal markers suggesting that
301 cytoskeleton associated proteins, such as several TJ proteins, might be found in this
302 subcellular fraction. Ubn-1 was found in all fractions but more concentrated in nuclear and S2
303 fractions, a result in accordance with the already described dual localization of this protein in
304 nucleus and cytoplasmic plaque of TJs.

305 To understand the role of Ubn-1 in the protein interaction network of the epithelial junctional
306 complex, the cytosolic (S1 and S2) and membrane (MB) fractions from HT29 cells were
307 incubated with GST-Ubn-1 fusion protein or GST protein alone as a negative control. After
308 extensive washes, the proteins were eluted and separated on SDS-PAGE gels before being
309 digested with trypsin and submitted to nano-liquid chromatography coupled to tandem MS.
310 Bioinformatics tools were then used to identify proteins with a minimum of two individual
311 peptides. Hundred proteins were identified only in the pull-down assay using GST-Ubn-1 (see
312 Table S1 for a comprehensive list of all proteins identified. Extensive bibliographic and
313 bioinformatic analyses allowed us to group each of the 100 putative partners of Ubn-1 into

314 functional classes (Fig. 4B). Membrane proteins, including integral (such as integrin) and
315 peripheral membrane proteins (such as GBLP or LYRIC), represented 8% of the identified
316 proteins. Seven percents of the identified proteins were involved in signaling. Proteins
317 implicated in cell machinery were classified into 3 major categories: chromatin remodeling,
318 RNA processing and translation (respectively 4%, 13% and 11% of the proteins). Finally, the
319 remaining identified proteins were ribosomal proteins, ribonucleoproteins or translation
320 initiation factors. As expected, most of the membrane proteins were identified in the MB
321 fraction, nuclear proteins involved in chromatin remodeling such as histones in the S1 fraction
322 whereas proteins implicated in signaling, RNA processing and translation were identified in
323 each fractions (Fig 4C).

324

325

326 **Validation of putative interaction partners**

327 The proteomic approach was validated with putative partners which might be important for
328 the comprehension of Ubn-1 role in the cell. LYRIC (Lysine-rich CEACAM1-associated
329 protein) has been shown to shuttle between the nucleus and the TJs (13, 43), as it is the case
330 for Ubn-1. RACK1, the receptor for activated C-kinase, also called guanine nucleotide-
331 binding protein subunit beta-2-like 1 (GBLP), has been described as a partner of the EBV
332 transcription factor EB1 which also interacts with Ubn-1 (9). As shown in Fig. 5A,
333 immunoprecipitation of Ubn-1 from HT29 cells revealed LYRIC and RACK-1 proteins
334 whereas control antibody did not. Confocal microscopy showed that Ubn-1 colocalized partly
335 with both proteins in HT29 cells (Fig. 5B). Of note that this colocalization occurred in the
336 cytoplasm of these cells.

337

338

339 **Discussion**

340

341 Using *in vivo* and *in vitro* assays, we mapped the respective interacting domains on
342 Ubn-1 and ZO-1 proteins. We showed that the PDZ2 domain of ZO-1 was involved in the
343 interaction with Ubn-1. This domain was previously described as responsible for homo-and
344 hetero-dimerization of ZO proteins, and for binding to connexins (29, 48). PDZ domains
345 generally interact with short C-terminal amino acids sequences but internal “ligands” have
346 also been identified (39). Thus, PDZ2 domain of ZO-1 interacts with Ubn-1 at a non classical

347 binding site localized within a N-terminal region of 60 amino acids. When overexpressed, the
348 N-terminus of Ubn-1 accumulated within nucleus as previously described (14, 15). PCA
349 revealed that the N-terminal part of Ubn-1 interacts with the N-terminal part of ZO-1.
350 Moreover, the co-expression of Ubn-1-N-ter and ZO-1-N-ter induced the relocalization of
351 ZO-1-N-ter from the cytoplasm to the nucleus suggesting a functional interaction between
352 Ubn-1 and ZO-1. A nuclear localization has been described for ZO-1 in some cells and under
353 specific conditions (5, 23, 40). Our results suggest that Ubn-1 may be a partner of ZO-1
354 influencing its nuclear localization.

355 Since cingulin is a TJ protein and since it has been described to be a binding partner of ZO
356 proteins (14), we decided to test a possible interaction between Ubn-1 and cingulin. Co-
357 immunoprecipitation and confocal experiments showed that Ubn-1 and cingulin interact at the
358 TJ. Thus, our data suggest that a molecular complex including Ubn-1, ZO-1 and cingulin
359 might be present at TJ.

360 In order to identify new binding partners of Ubn-1 in epithelial cells, we performed MS-based
361 identification of proteins eluted from pull-down assays. Hundred different proteins were
362 identified only with Ubn-1 as the bait and were grouped into functional classes. Interestingly,
363 several membrane proteins were identified. Among them, LYRIC and RACK-1 were
364 validated as true partners of Ubn-1 through co-immunoprecipitation and confocal microscopy
365 analyses. LYRIC protein was originally identified in TJs where it colocalized with ZO-1 (13).
366 LYRIC has also been described as localised in other subcellular complexes such as in
367 endoplasmic reticulum (ER), nucleolus, cytoplasm and nucleus (43). In HT29 cells, we
368 identified LYRIC in the cytosolic fraction S1 and showed that it colocalized with Ubn-1 in
369 the cytoplasm. At the functional level, LYRIC has been proposed to act as an oncogene and
370 promote tumourigenesis (19, 32). It would be thus interesting to investigate a potential role
371 for Ubn-1 in this process. RACK-1 was the second potential binding partner of Ubn-1 to be
372 tested. It was identified in the pull-down assay using the MB fraction. RACK-1 has been
373 described as a component of the small subunit of ribosome (37) explaining its identification in
374 the MB fraction which contains ribosomes of the rough ER (15). Using confocal microscopy,
375 we showed that it colocalized with Ubn-1 in the cytoplasm of HT29 cells. RACK-1 regulates
376 several key processes that involve contact with the extracellular matrix, such as cell
377 spreading, the establishment of focal adhesion and cell-cell contacts. In the context of EBV
378 infection, interaction of the viral transcription factor EB1 with RACK-1 could result in
379 inhibition of PKC activity, which affects functions of EBV-infected monocytes such as
380 phagocytosis (46). RACK-1 has been described to interact with the integrin receptor and

381 interferes with integrin-signalling pathways by recruiting specific kinases (16, 33, 49).
382 Interestingly, RACK-1 interacts also with spectrin (42), IP₃R (receptor for inositol 1, 4, 5
383 triphosphate) (6) and Scp160p which is a member of the vigilin family of RNA-binding
384 proteins (8). It is striking to see that these interacting partners of RACK-1, including integrin,
385 were also identified in this study as partners of Ubn-1.

386 In addition to cytoplasmic or membrane proteins, nuclear proteins have also been found by
387 our strategy. Indeed, we identified histone proteins (H2A, H2B) as well as vigilin and HP1B3
388 (heterochromatin protein 1 binding protein 3) involved in the formation of heterochromatin
389 (50). These proteins were found in the less fractionated sample (S1) which contained nuclear
390 components. Recent studies have shown that Ubn-1 may be a histone chaperone involved in
391 transcription repression of proliferation-promoting genes (4, 7). Indeed, MS analysis of
392 nuclear extracts described histone H3.3 and histone chaperone Hira (histone cell cycle
393 regulation defective homologue A) as interacting partners of Ubn-1 (44). Of note that another
394 NACos protein, HuAsH1, the human homolog of *Drosophila* ASH1 (absent, small, or
395 homeotic discs 1), also contributes to chromatin remodelling (11, 36). Whether Ubn-1 could
396 participate in the same cells to the architecture of the TJ and to the chromatin modelling is
397 currently under investigation. In addition, our data and others suggest that Ubn-1 may interact
398 with proteins involved in closely related cellular processes such as RNA processing and
399 regulation of translation (for example RACK-1, RNA helicases, the translational activator
400 GCN1, the eIF2A protein kinase 2) (17, 20, 21, 35, 37). In this context, it should be noted that
401 symplekin, a nuclear protein that can also associate with TJs, has been linked to the
402 machinery involved in 3'-end processing of pre-mRNA (24, 31). Finally, Ubn-1 may interact
403 with other transcription factors than those already described (1), such as the Y-box factor
404 1/DNA binding protein B (YB-1/DbpB). Interestingly, ZO-1 binds ZONAB/DbpA, another
405 member of the Y-box factor family and regulates its activity by influencing its subcellular
406 localization (5). Confirmation of the interaction between Ubn-1 and YB-1 is under progress.

407 All together the results presented in this work suggest that Ubn-1 may act as a scaffold
408 protein involved in several processes such as cell-cell contact signalling and the modulation
409 of gene activity.

410

411

412

413

FOOTNOTES

414

415 This work is supported in part by grants from the Agence Nationale pour la Recherche and La
416 Ligue contre le Cancer.

417 The abbreviations used are: eIFs, eukaryotic initiation translation factors; ER endoplasmic
418 reticulum; hnRNPs, heterogeneous nuclear ribonucleoproteins; LYRIC, lysine-rich
419 CEACAM1-associated protein; MS mass spectrometry; NACos, Nuclear and Adherent
420 junction Complex components; PCA, protein complementation assay; PDZ, Post synaptic
421 density protein / *Drosophila* disc large tumor suppressor/ Zonula occludens-1 protein; RACK-
422 1, receptor for activated C-kinase; TJ, tight junction; Ubn-1, ubinuclein 1; ZO, Zonula
423 Occludens.

424

425

426

FIGURE LEGENDS

427

428

429 **FIGURE 1. Protein-fragment complementation assay between the N-terminal parts of**
430 **Ubn-1 and ZO-1 proteins.** *A*, cotransfection of Venus1-Ubn-1(N-ter₁₋₃₀₀) and Venus2-ZO-
431 1(N-ter₁₋₅₀₀) fusion proteins triggered Venus fluorescence in 293 cells (third panel).
432 Transfection of Venus1-Ubn-1(N-ter₁₋₃₀₀) (first panel) and Venus2-ZO-1(N-ter₁₋₅₀₀) (second
433 panel) alone did not lead to any fluorescence. Overexpression of Venus2-ZO-1(N-ter₁₋₅₀₀)
434 alone showed a cytosolic and perinuclear signal (second panel). In co-transfected cells, signal
435 of ZO-1 was restricted to the nucleus (third panel, see arrows). *B*, experiments with negative
436 control proteins (Venus1-Alix and Venus2-Alix) were performed to exclude non specific
437 signal. Anti-Ubn-1 antibody was labelled by Alexa 350 (blue); anti-ZO-1 and anti-Alix
438 antibodies were labelled by Alexa 594 (red); Venus fluorescence appears in green.

439

440

441 **FIGURE 2. Definition of interacting domains of Ubn-1 and ZO-1.** *A*, schema describing
442 the different *in vitro* translated constructs of Ubn-1. For each mutant, the number of amino
443 acids (nb aa) is indicated as well as the presence (+) or absence (-) of interaction with GST-
444 ZO-1 (N-terminus)-fusion protein. Vector encoding the p1813 construct leads to the Ubn-1
445 full-length protein production (1134 amino acids). *B*, GST-pull down assay. *In vitro* translated
446 Ubn-1 constructs labelled with [³⁵S]methionine were incubated with GST or GST-ZO-1 (N-
447 terminus) proteins. GST-ZO1Nter contained the N-terminal part of ZO-1 protein with the

448 three PDZ domains fused to the GST protein. The amount of GST and GST-ZO1Nter proteins
449 used was controlled on membrane by a Red Ponceau staining.

450
451

452 **FIGURE 3. Ubn-1 interacts with cingulin in HT29 cells.** *A*, cingulin was co-
453 immunoprecipitated with anti-Ubn-1 antibody from HT29 lysates. After SDS-PAGE and
454 transfer, membrane was blotted with anti-Ubn-1 and anti-cingulin antibodies. *B*, co-
455 localization of Ubn-1 (green, T1) and cingulin (red, T2). Co-localization of both proteins is
456 indicated by a white staining at the z axis of the TJ.

457
458

459 **FIGURE 4. Results of MS analysis.** *A*, assessment of subcellular fractionation by western
460 blotting of lamin A/C (marker of nucleus), tubulin (marker of cytoskeleton), ZO-1 and Ubn-1
461 proteins in each sample isolated from HT29 cell lines. Same quantity of proteins issued from
462 each fraction (20µg) was loaded on gel electrophoresis. N, nuclear fraction; S1 and S2,
463 cytosolic fraction; MB, membrane fraction. *B*, putative interacting partners of Ubn-1 obtained
464 from pull-down assay and identified by MS. Cytosolic (S1 and S2) and membrane (MB)
465 fractions from confluent HT29 cells were incubated with GST-Ubn-1 or GST protein
466 (negative control). After extensive washes and migration on gel electrophoresis, captured
467 protein complexes were analysed by MS. Proteins obtained specifically from GST-Ubn-1
468 were categorized according to their known biological function or configuration. The number
469 of proteins belonging to each category is indicated as a percentage of total proteins found.
470 hnRNPs, heterogeneous ribonucleoproteins; eIFs, eukaryotic initiation factors of translation.
471 *C*, subcellular distribution of the different classified proteins. The darker colour corresponds
472 to S1 fraction ■, the lighter colour to MB fraction □ and S2 fraction is represented with an
473 intermediate grey tone ■.

474
475

476 **FIGURE 5. Validation of the interactions between Ubn-1 and LYRIC and RACK-1.** *A*,
477 co-immunoprecipitation of Lyric and Rack-1 with Ubn-1. HT29 cells were lysed as described
478 in experimental procedures and immunoprecipitated by Ubn-1 or a control antibody. After
479 SDS-PAGE and transfer, membranes were blotted with either anti-Ubn-1, anti-LYRIC or
480 anti-Rack-1 antibodies. *B*, co-localization of LYRIC and Rack-1 with Ubn-1. HT29 cells were
481 double stained with anti-Ubn-1 (green, T1) and anti-LYRIC (red, T2) or anti-Rack-1 (red,

482 T2). Staining was analysed using a confocal microscope. White staining indicates co-
483 localization of Ubn-1 with LYRIC (at the top) or with Rack-1 (bottom) inside the cytoplasm
484 at the z axis.

485

486

487

- 488 1. **Aho, S., M. Buisson, T. Pajunen, Y. W. Ryoo, J. F. Giot, H. Gruffat, A. Sergeant,**
489 **and J. Uitto.** 2000. Ubinuclein, a novel nuclear protein interacting with cellular and
490 viral transcription factors. *J Cell Biol* **148**:1165-76.
- 491 2. **Aho, S., J. Lupo, P. A. Coly, A. Sabine, M. Castellazzi, P. Morand, A. Sergeant,**
492 **E. Manet, V. Boyer, and H. Gruffat.** 2009. Characterization of the ubinuclein
493 protein as a new member of the nuclear and adhesion complex components (NACos).
494 *Biol Cell* **101**:319-34.
- 495 3. **Amieva, M. R., R. Vogelmann, A. Covacci, L. S. Tompkins, W. J. Nelson, and S.**
496 **Falkow.** 2003. Disruption of the epithelial apical-junctional complex by *Helicobacter*
497 *pylori* CagA. *Science* **300**:1430-4.
- 498 4. **Balaji, S., L. M. Iyer, and L. Aravind.** 2009. HPC2 and ubinuclein define a novel
499 family of histone chaperones conserved throughout eukaryotes. *Mol Biosyst* **5**:269-75.
- 500 5. **Balda, M. S., and K. Matter.** 2000. The tight junction protein ZO-1 and an
501 interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *Embo J* **19**:2024-33.
- 502 6. **Bandyopadhyay, B. C., H. L. Ong, T. P. Lockwich, X. Liu, B. C. Paria, B. B.**
503 **Singh, and I. S. Ambudkar.** 2008. TRPC3 controls agonist-stimulated intracellular
504 Ca²⁺ release by mediating the interaction between inositol 1,4,5-trisphosphate
505 receptor and RACK1. *J Biol Chem* **283**:32821-30.
- 506 7. **Banumathy, G., N. Somaiah, R. Zhang, Y. Tang, J. Hoffmann, M. Andrade, H.**
507 **Ceulemans, D. Schultz, R. Marmorstein, and P. D. Adams.** 2009. Human UBN1 is
508 an ortholog of yeast Hpc2p and has an essential role in the HIRA/ASF1a chromatin-
509 remodeling pathway in senescent cells. *Mol Cell Biol* **29**:758-70.
- 510 8. **Baum, S., M. Bittins, S. Frey, and M. Seedorf.** 2004. Asc1p, a WD40-domain
511 containing adaptor protein, is required for the interaction of the RNA-binding protein
512 Scp160p with polysomes. *Biochem J* **380**:823-30.
- 513 9. **Baumann, M., O. Gires, W. Kolch, H. Mischak, R. Zeidler, D. Pich, and W.**
514 **Hammerschmidt.** 2000. The PKC targeting protein RACK1 interacts with the
515 Epstein-Barr virus activator protein BZLF1. *Eur J Biochem* **267**:3891-901.
- 516 10. **Beau, I., J. Cotte-Laffitte, R. Amsellem, and A. L. Servin.** 2007. A protein kinase
517 A-dependent mechanism by which rotavirus affects the distribution and mRNA level
518 of the functional tight junction-associated protein, occludin, in human differentiated
519 intestinal Caco-2 cells. *J Virol* **81**:8579-86.
- 520 11. **Beisel, C., A. Imhof, J. Greene, E. Kremmer, and F. Sauer.** 2002. Histone
521 methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature*
522 **419**:857-62.
- 523 12. **Betanzos, A., M. Huerta, E. Lopez-Bayghen, E. Azuara, J. Amerena, and L.**
524 **Gonzalez-Mariscal.** 2004. The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos
525 and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Exp Cell Res* **292**:51-66.
- 526 13. **Britt, D. E., D. F. Yang, D. Q. Yang, D. Flanagan, H. Callanan, Y. P. Lim, S. H.**
527 **Lin, and D. C. Hixson.** 2004. Identification of a novel protein, LYRIC, localized to
528 tight junctions of polarized epithelial cells. *Exp Cell Res* **300**:134-48.

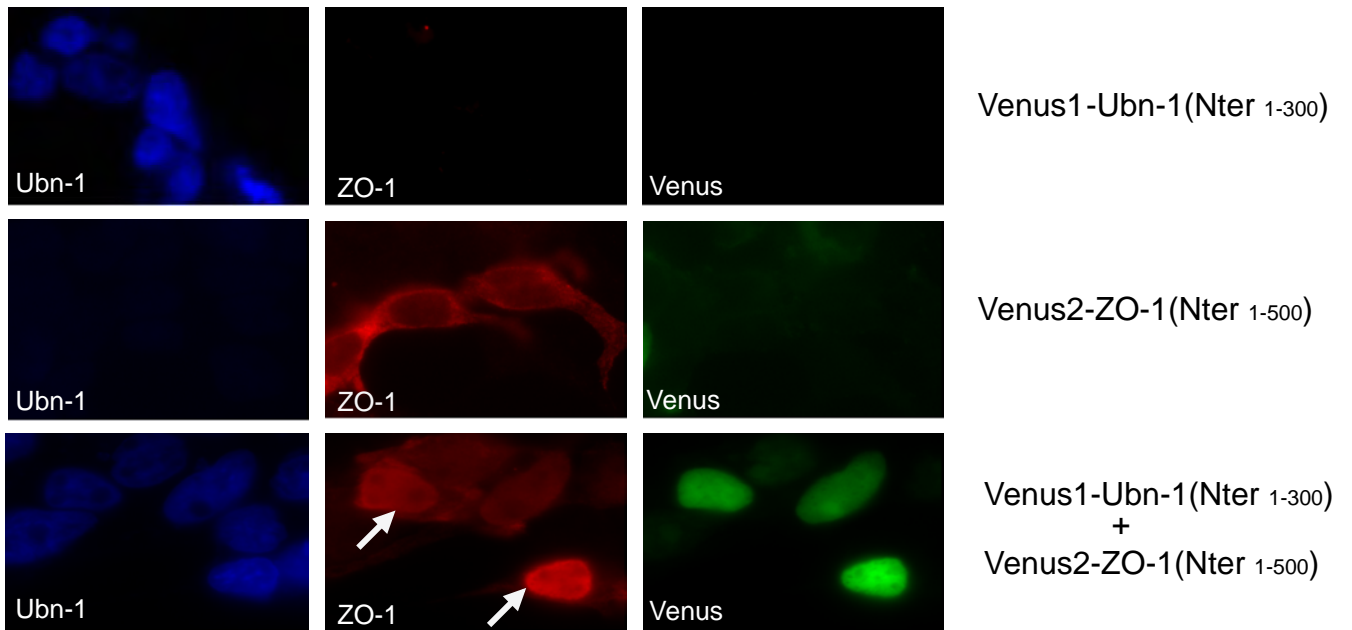
- 529 14. **Cordenonsi, M., F. D'Atri, E. Hammar, D. A. Parry, J. Kendrick-Jones, D. Shore,**
530 **and S. Citi.** 1999. Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts
531 with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J Cell Biol* **147**:1569-82.
- 532 15. **Cox, B., and A. Emili.** 2006. Tissue subcellular fractionation and protein extraction
533 for use in mass-spectrometry-based proteomics. *Nat Protoc* **1**:1872-8.
- 534 16. **Cox, E. A., D. Bennin, A. T. Doan, T. O'Toole, and A. Huttenlocher.** 2003.
535 RACK1 regulates integrin-mediated adhesion, protrusion, and chemotactic cell
536 migration via its Src-binding site. *Mol Biol Cell* **14**:658-69.
- 537 17. **Dar, A. C., T. E. Dever, and F. Sicheri.** 2005. Higher-order substrate recognition of
538 eIF2alpha by the RNA-dependent protein kinase PKR. *Cell* **122**:887-900.
- 539 18. **Dupierris, V., C. Masselon, M. Court, S. Kieffer-Jaquinod, and C. Bruley.** 2009.
540 A toolbox for validation of mass spectrometry peptides identification and generation
541 of database: IRMa. *Bioinformatics* **25**:1980-1.
- 542 19. **Emdad, L., D. Sarkar, Z. Z. Su, A. Randolph, H. Boukerche, K. Valerie, and P.**
543 **B. Fisher.** 2006. Activation of the nuclear factor kappaB pathway by astrocyte
544 elevated gene-1: implications for tumor progression and metastasis. *Cancer Res*
545 **66**:1509-16.
- 546 20. **Evdokimova, V., L. P. Ovchinnikov, and P. H. Sorensen.** 2006. Y-box binding
547 protein 1: providing a new angle on translational regulation. *Cell Cycle* **5**:1143-7.
- 548 21. **Fuller-Pace, F. V.** 2006. DExD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with
549 important roles in transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res* **34**:4206-15.
- 550 22. **Gonzalez-Mariscal, L., A. Ponce, L. Alarcon, and B. E. Jaramillo.** 2006. The tight
551 junction protein ZO-2 has several functional nuclear export signals. *Exp Cell Res*
552 **312**:3323-35.
- 553 23. **Gottardi, C. J., M. Arpin, A. S. Fanning, and D. Louvard.** 1996. The junction-
554 associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation
555 and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:10779-
556 84.
- 557 24. **Hofmann, I., M. Schnolzer, I. Kaufmann, and W. W. Franke.** 2002. Symplekin, a
558 constitutive protein of karyo- and cytoplasmic particles involved in mRNA biogenesis
559 in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Biol Cell* **13**:1665-76.
- 560 25. **Huang, H. Y., R. Li, Q. Sun, J. Wang, P. Zhou, H. Han, and W. H. Zhang.** 2002.
561 [LIM protein KyoT2 interacts with human tight junction protein ZO-2-i3]. *Yi Chuan*
562 *Xue Bao* **29**:953-8.
- 563 26. **Huerta, M., R. Munoz, R. Tapia, E. Soto-Reyes, L. Ramirez, F. Recillas-Targa, L.**
564 **Gonzalez-Mariscal, and E. Lopez-Bayghen.** 2007. Cyclin D1 is transcriptionally
565 down-regulated by ZO-2 via an E box and the transcription factor c-Myc. *Mol Biol*
566 *Cell* **18**:4826-36.
- 567 27. **Islas, S., J. Vega, L. Ponce, and L. Gonzalez-Mariscal.** 2002. Nuclear localization
568 of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. *Exp Cell Res* **274**:138-48.
- 569 28. **Kausalya, P. J., D. C. Phua, and W. Hunziker.** 2004. Association of ARVCF with
570 zonula occludens (ZO)-1 and ZO-2: binding to PDZ-domain proteins and cell-cell
571 adhesion regulate plasma membrane and nuclear localization of ARVCF. *Mol Biol*
572 *Cell* **15**:5503-15.
- 573 29. **Kausalya, P. J., M. Reichert, and W. Hunziker.** 2001. Connexin45 directly binds to
574 ZO-1 and localizes to the tight junction region in epithelial MDCK cells. *FEBS Lett*
575 **505**:92-6.
- 576 30. **Kavanagh, E., M. Buchert, A. Tsapara, A. Choquet, M. S. Balda, F. Hollande,**
577 **and K. Matter.** 2006. Functional interaction between the ZO-1-interacting

- 578 transcription factor ZONAB/DbpA and the RNA processing factor symplekin. *J Cell*
579 *Sci* **119**:5098-105.
- 580 31. **Keon, B. H., S. Schafer, C. Kuhn, C. Grund, and W. W. Franke.** 1996. Symplekin,
581 a novel type of tight junction plaque protein. *J Cell Biol* **134**:1003-18.
- 582 32. **Lee, S. G., Z. Z. Su, L. Emdad, D. Sarkar, T. F. Franke, and P. B. Fisher.** 2008.
583 Astrocyte elevated gene-1 activates cell survival pathways through PI3K-Akt
584 signaling. *Oncogene* **27**:1114-21.
- 585 33. **Liliental, J., and D. D. Chang.** 1998. Rack1, a receptor for activated protein kinase
586 C, interacts with integrin beta subunit. *J Biol Chem* **273**:2379-83.
- 587 34. **Manet, E., C. Allera, H. Gruffat, I. Mikaelian, A. Rigolet, and A. Sergeant.** 1993.
588 The acidic activation domain of the Epstein-Barr virus transcription factor R interacts
589 in vitro with both TBP and TFIIB and is cell-specifically potentiated by a proline-rich
590 region. *Gene Expr* **3**:49-59.
- 591 35. **Marton, M. J., C. R. Vazquez de Aldana, H. Qiu, K. Chakraborty, and A. G.**
592 **Hinnebusch.** 1997. Evidence that GCN1 and GCN20, translational regulators of
593 GCN4, function on elongating ribosomes in activation of eIF2alpha kinase GCN2.
594 *Mol Cell Biol* **17**:4474-89.
- 595 36. **Nakamura, T., J. Blechman, S. Tada, T. Rozovskaia, T. Itoyama, F. Bullrich, A.**
596 **Mazo, C. M. Croce, B. Geiger, and E. Canaani.** 2000. huASH1 protein, a putative
597 transcription factor encoded by a human homologue of the *Drosophila ash1* gene,
598 localizes to both nuclei and cell-cell tight junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A*
599 **97**:7284-9.
- 600 37. **Nilsson, J., J. Sengupta, J. Frank, and P. Nissen.** 2004. Regulation of eukaryotic
601 translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the
602 ribosome. *EMBO Rep* **5**:1137-41.
- 603 38. **Nunbhakdi-Craig, V., L. Craig, T. Machleidt, and E. Sontag.** 2003. Simian virus
604 40 small tumor antigen induces deregulation of the actin cytoskeleton and tight
605 junctions in kidney epithelial cells. *J Virol* **77**:2807-18.
- 606 39. **Penkert, R. R., H. M. DiVittorio, and K. E. Prehoda.** 2004. Internal recognition
607 through PDZ domain plasticity in the Par-6-Pals1 complex. *Nat Struct Mol Biol*
608 **11**:1122-7.
- 609 40. **Reichert, M., T. Muller, and W. Hunziker.** 2000. The PDZ domains of zonula
610 occludens-1 induce an epithelial to mesenchymal transition of Madin-Darby canine
611 kidney I cells. Evidence for a role of beta-catenin/Tcf/Lef signaling. *J Biol Chem*
612 **275**:9492-500.
- 613 41. **Remy, I., and S. W. Michnick.** 1999. Clonal selection and in vivo quantitation of
614 protein interactions with protein-fragment complementation assays. *Proc Natl Acad*
615 *Sci U S A* **96**:5394-9.
- 616 42. **Rodriguez, M. M., D. Ron, K. Touhara, C. H. Chen, and D. Mochly-Rosen.** 1999.
617 RACK1, a protein kinase C anchoring protein, coordinates the binding of activated
618 protein kinase C and select pleckstrin homology domains in vitro. *Biochemistry*
619 **38**:13787-94.
- 620 43. **Sutherland, H. G., Y. W. Lam, S. Briers, A. I. Lamond, and W. A. Bickmore.**
621 2004. 3D3/lyric: a novel transmembrane protein of the endoplasmic reticulum and
622 nuclear envelope, which is also present in the nucleolus. *Exp Cell Res* **294**:94-105.
- 623 44. **Tagami, H., D. Ray-Gallet, G. Almouzni, and Y. Nakatani.** 2004. Histone H3.1 and
624 H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of
625 DNA synthesis. *Cell* **116**:51-61.
- 626 45. **Takai, E., X. Tan, Y. Tamori, M. Hirota, H. Egami, and M. Ogawa.** 2005.
627 Correlation of translocation of tight junction protein Zonula occludens-1 and

- 628 activation of epidermal growth factor receptor in the regulation of invasion of
629 pancreatic cancer cells. *Int J Oncol* **27**:645-51.
- 630 46. **Tardif, M., M. Savard, L. Flamand, and J. Gosselin.** 2002. Impaired protein kinase
631 C activation/translocation in Epstein-Barr virus-infected monocytes. *J Biol Chem*
632 **277**:24148-54.
- 633 47. **Traweger, A., R. Fuchs, I. A. Krizbai, T. M. Weiger, H. C. Bauer, and H. Bauer.**
634 2003. The tight junction protein ZO-2 localizes to the nucleus and interacts with the
635 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein scaffold attachment factor-B. *J Biol Chem*
636 **278**:2692-700.
- 637 48. **Utepergenov, D. I., A. S. Fanning, and J. M. Anderson.** 2006. Dimerization of the
638 scaffolding protein ZO-1 through the second PDZ domain. *J Biol Chem* **281**:24671-7.
- 639 49. **Vomastek, T., M. P. Iwanicki, H. J. Schaeffer, A. Tarcsafalvi, J. T. Parsons, and**
640 **M. J. Weber.** 2007. RACK1 targets the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-
641 activated protein kinase pathway to link integrin engagement with focal adhesion
642 disassembly and cell motility. *Mol Cell Biol* **27**:8296-305.
- 643 50. **Zhou, J., Q. Wang, L. L. Chen, and G. G. Carmichael.** 2008. On the mechanism of
644 induction of heterochromatin by the RNA-binding protein vigilin. *Rna* **14**:1773-81.
645
646

FIGURE 1

A



B

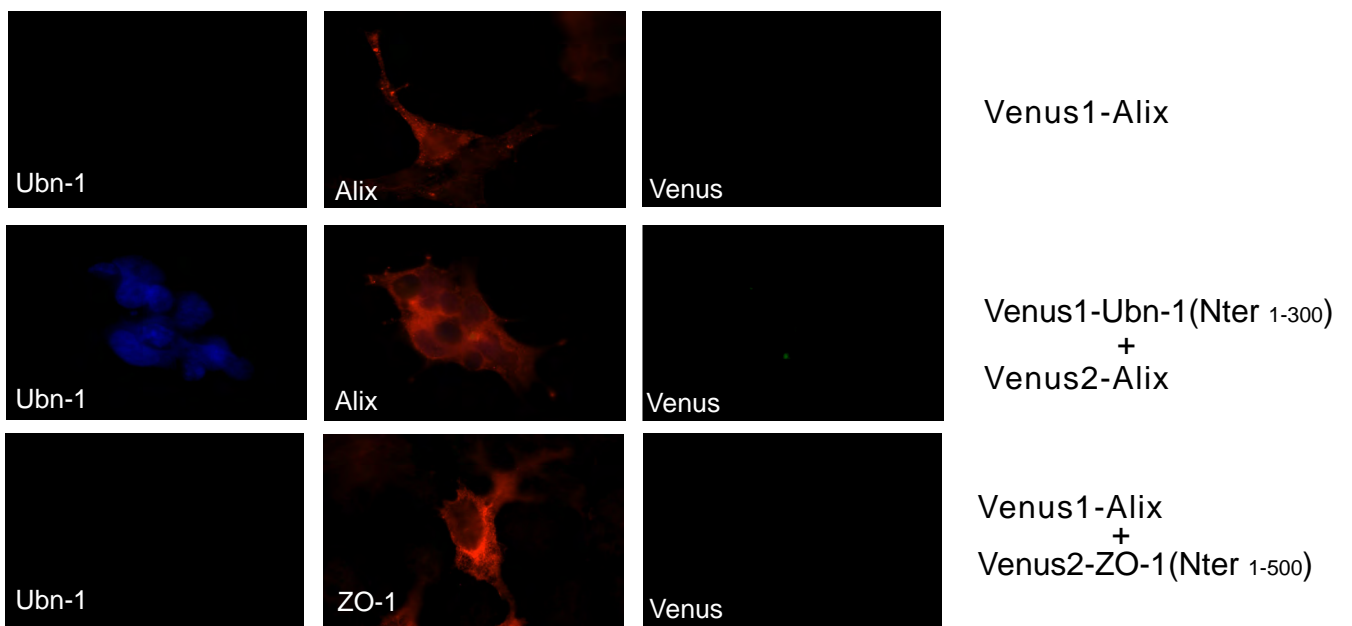
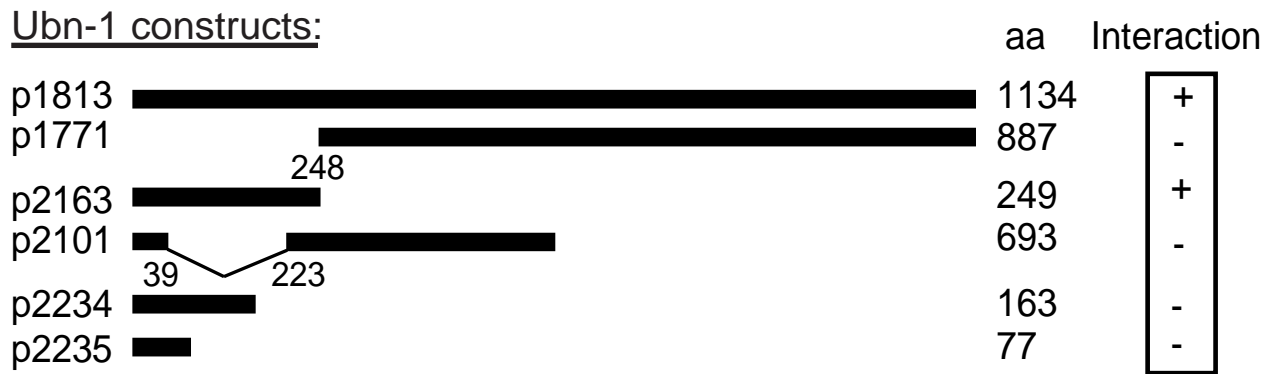


FIGURE 2

A



B

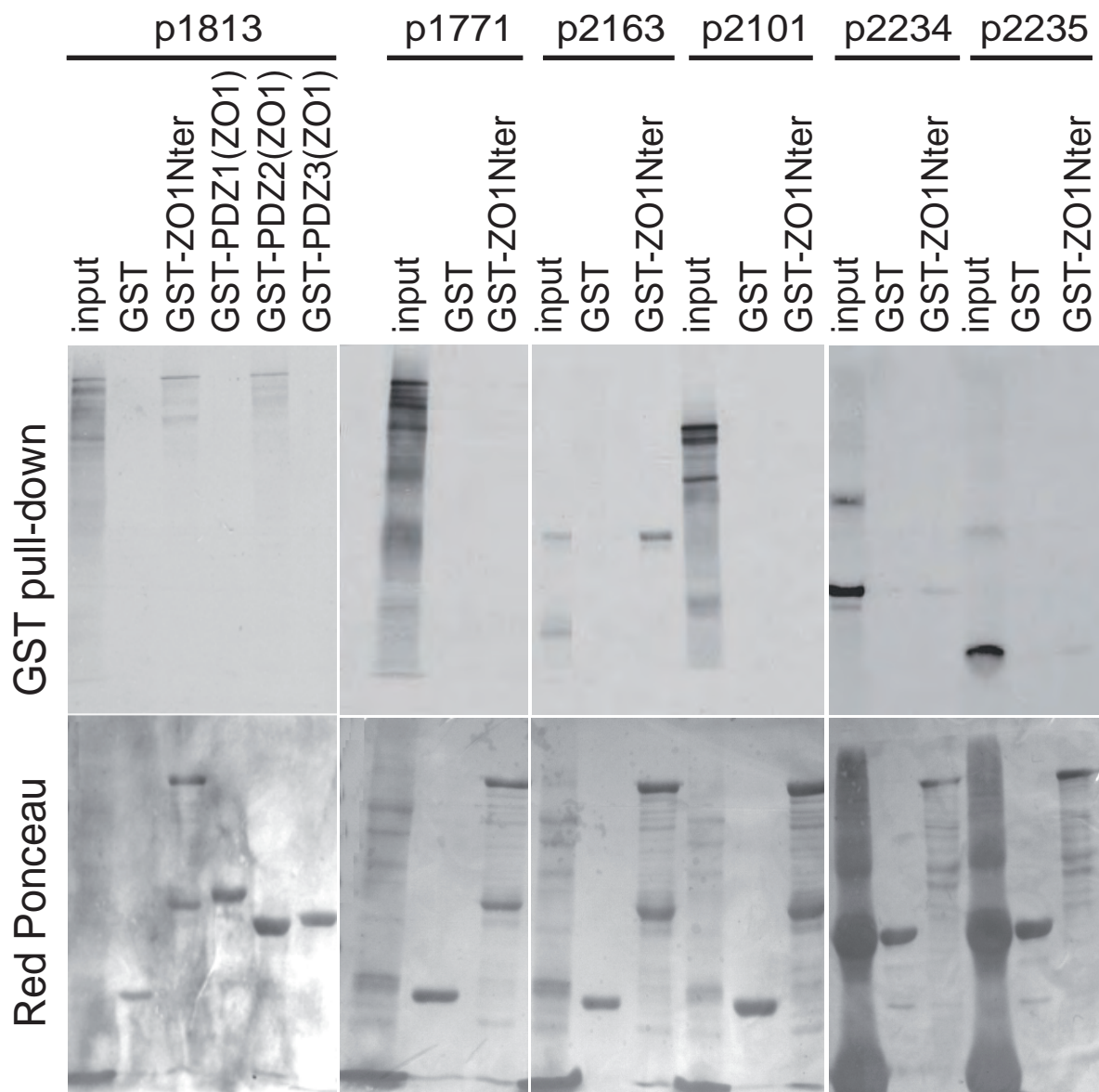
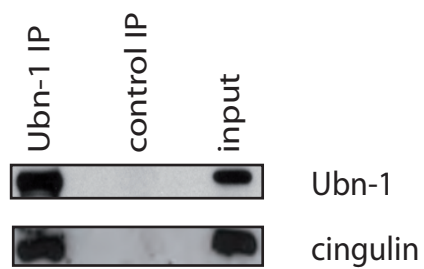


FIGURE 3

A



B

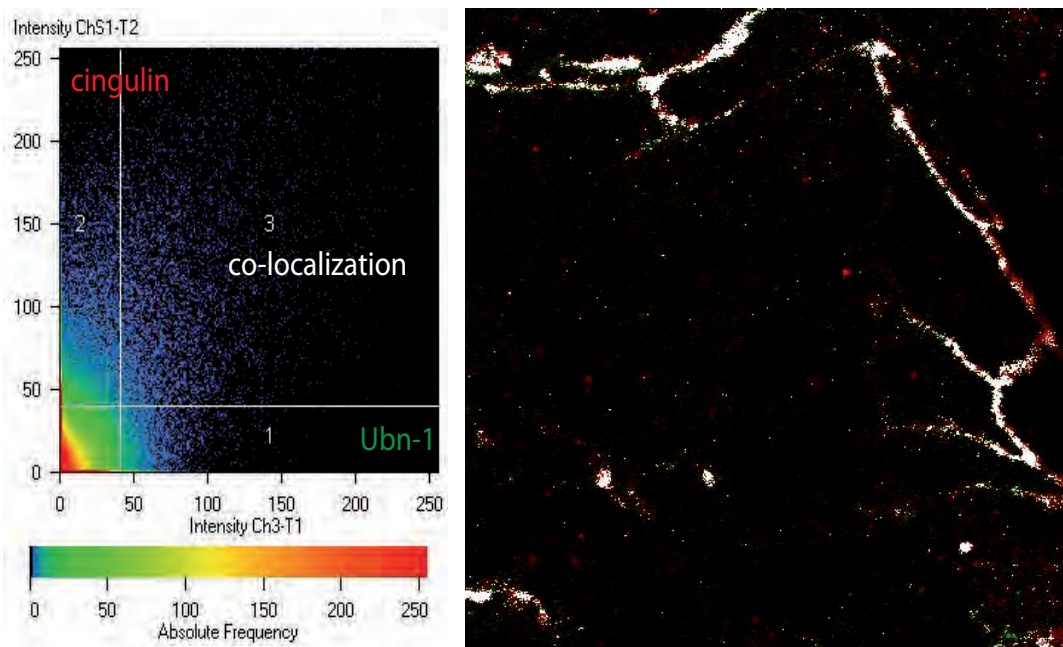
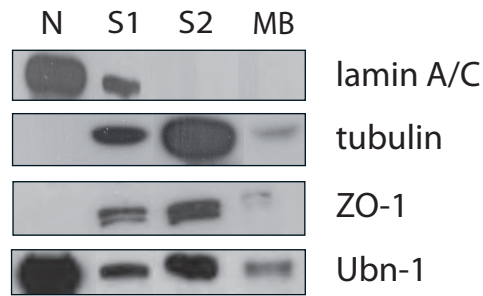
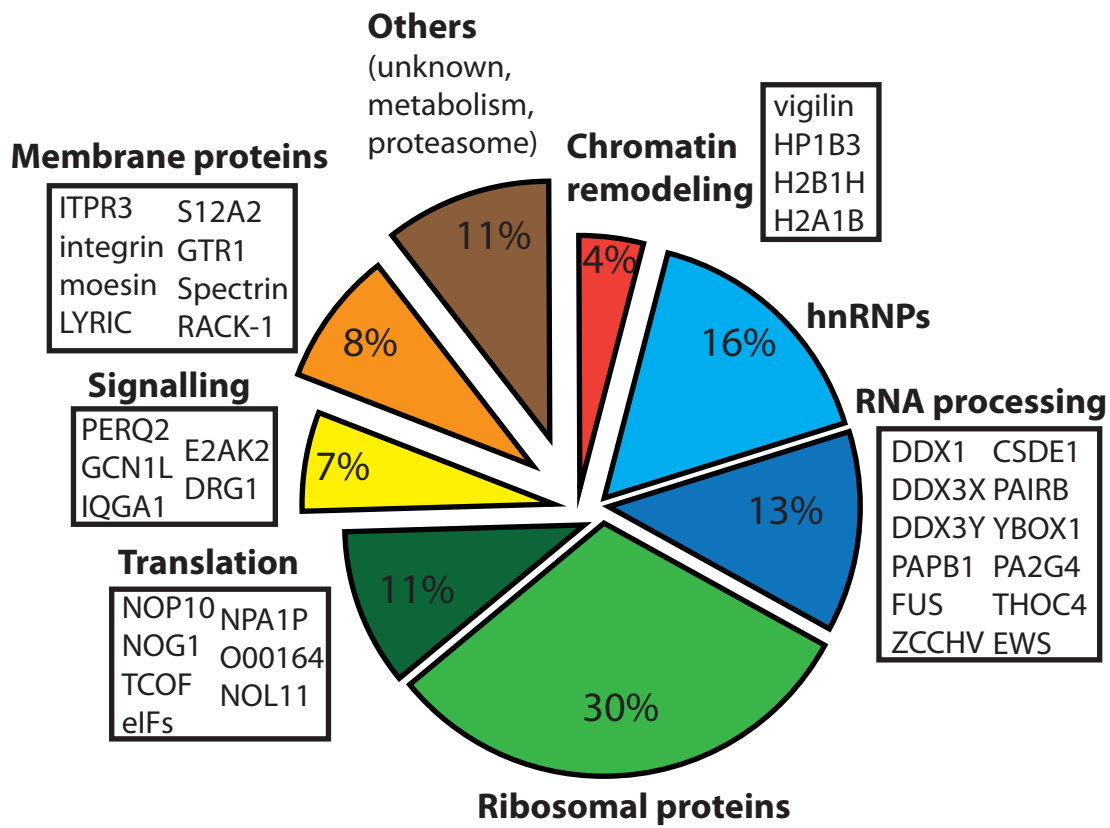


FIGURE 4

A



B



C

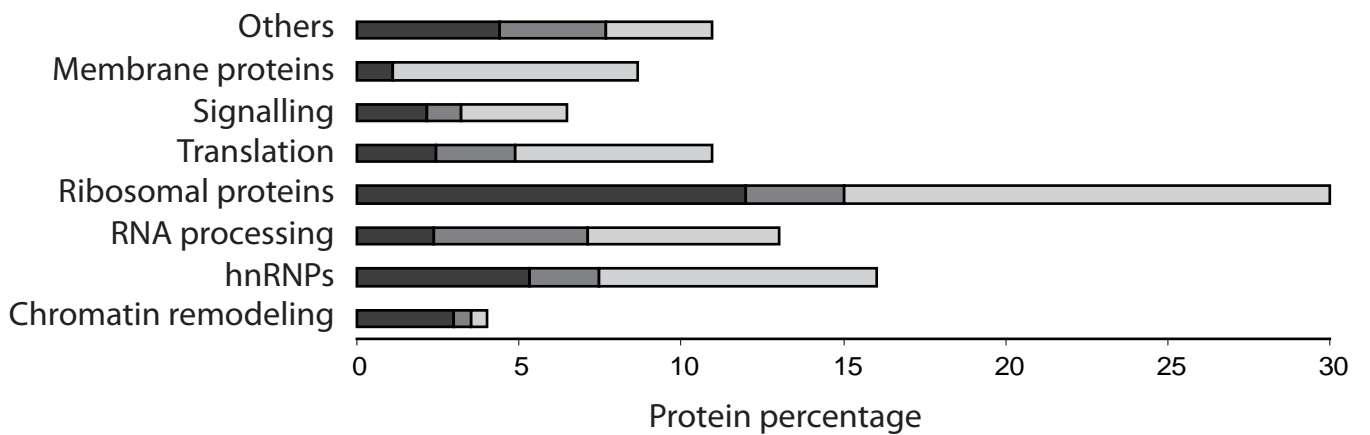
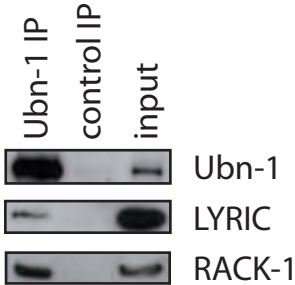
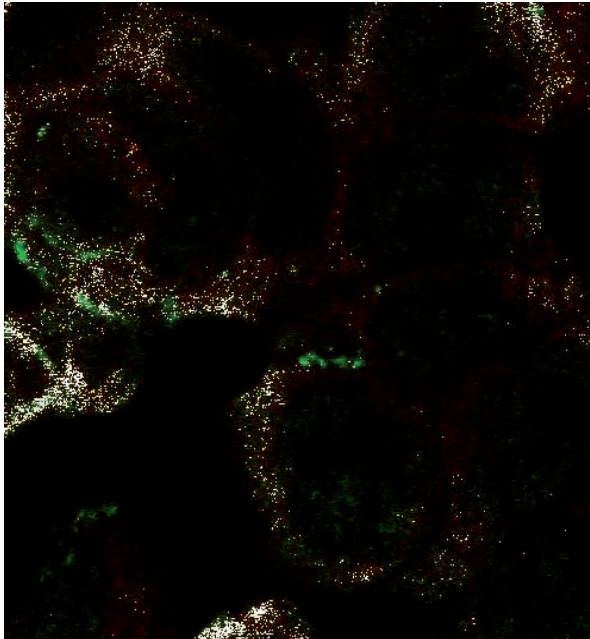
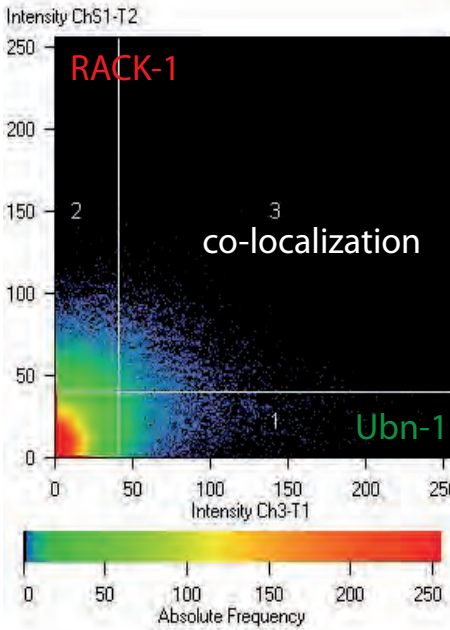
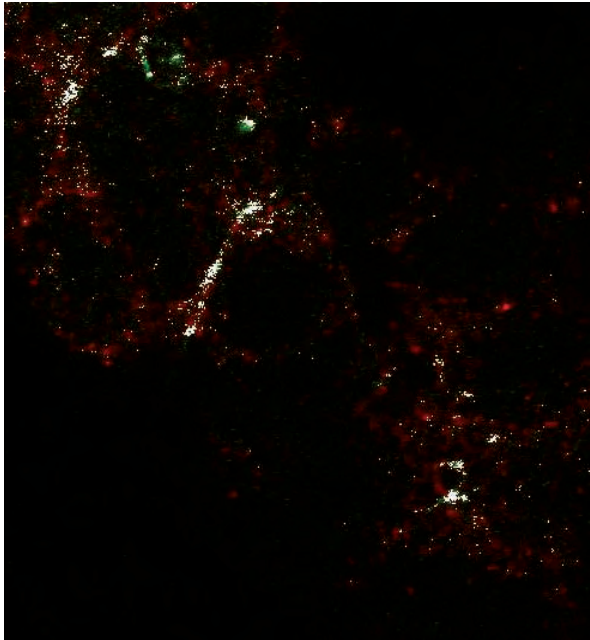
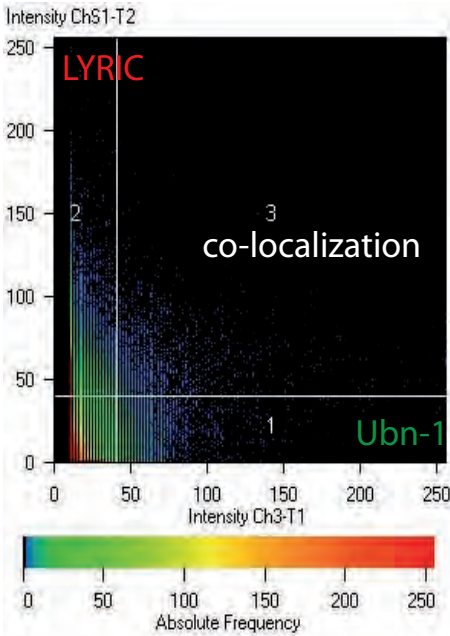


FIGURE 5

A



B



4. Résultats complémentaires

4.1 Identification des partenaires nucléaires de l'ubinucléine

Pour identifier les partenaires nucléaires de l'ubinucléine, nous avons travaillé sur des cellules HEK 293 surexprimant l'ubinucléine étiquetée Flag. Dans cette lignée cellulaire, l'ubinucléine transfectée se localise au niveau des noyaux (**Figure 18 A**). Après lyse cellulaire (tampon composé de NP40 1%, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 2mM pH 7,5) et centrifugation à 8000g, le surnageant a été incubé avec un anticorps monoclonal anti-Flag (Sigma) et la protéine A/G agarose pour immunoprécipiter l'ubinucléine (**Figure 18 B**). Les protéines qui co-immunoprécipitaient avec l'ubinucléine nucléaire ont été identifiées par spectrométrie de masse selon le même protocole décrit en Figure 17. Dans cette expérience, les cellules HEK 293 non transfectées ont servi de contrôle négatif.

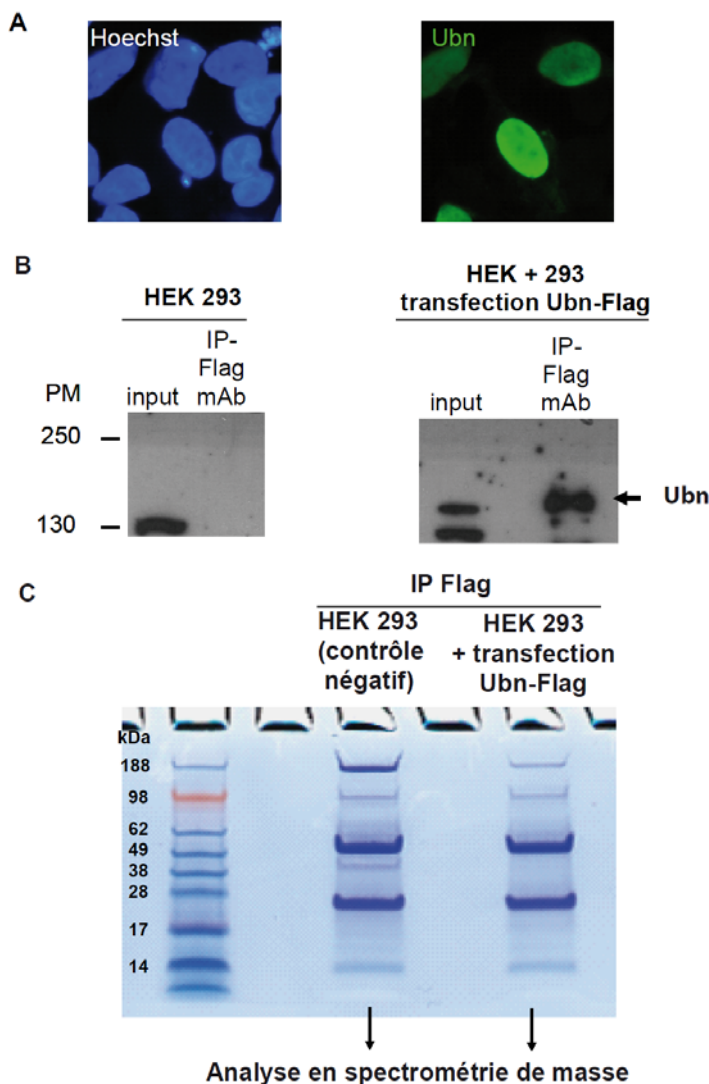


Figure 18: Surexpression de l'ubinucléine dans les HEK 293. **A)** Localisation nucléaire de l'ubinucléine surexprimée (Ac utilisé en IFI : hybridome anti-Ubn ZAP1, fixation des cellules au PFA 4%). **B)** Western blot révélé avec anti-Flag pAb (Sigma). **C)** Gel coloré au bleu de Coomassie. Les 2 pistes de migration (contrôle négatif et cellules transfectées) sont analysées en intégralité en spectrométrie de masse après découpage du gel en différentes bandes.

Les résultats de l'analyse en spectrométrie de masse ont révélé environ 70 protéines identifiées à partir des cellules transfectées avec l'ubinucléine. Parmi ces protéines, une quarantaine de protéines ont été identifiées spécifiquement dans les cellules transfectées avec l'ubinucléine et une trentaine ont été identifiées conjointement dans les cellules transfectées et le contrôle négatif (**Tableau III et IV**). La représentation graphique de la **Figure 19A** montre qu'une partie des protéines identifiées spécifiquement dans les cellules transfectées avec l'ubinucléine sont des protéines ribosomales ou des protéines impliquées dans la maturation de l'ARN. Fait notable, de nombreux variants d'histones ont aussi été identifiés de manière spécifique dans ces cellules transfectées et pourraient représenter des partenaires probables de l'ubinucléine. Les résultats du contrôle négatif sont aussi représentés en **Figure 19B** et révèlent de nombreuses protéines du cytosquelette. Les protéines retrouvées conjointement dans les cellules non transfectées et transfectées par l'ubinucléine sont majoritairement des protéines du cytosquelette, de la maturation de l'ARN, de la traduction ou du métabolisme (**Tableau IV**).

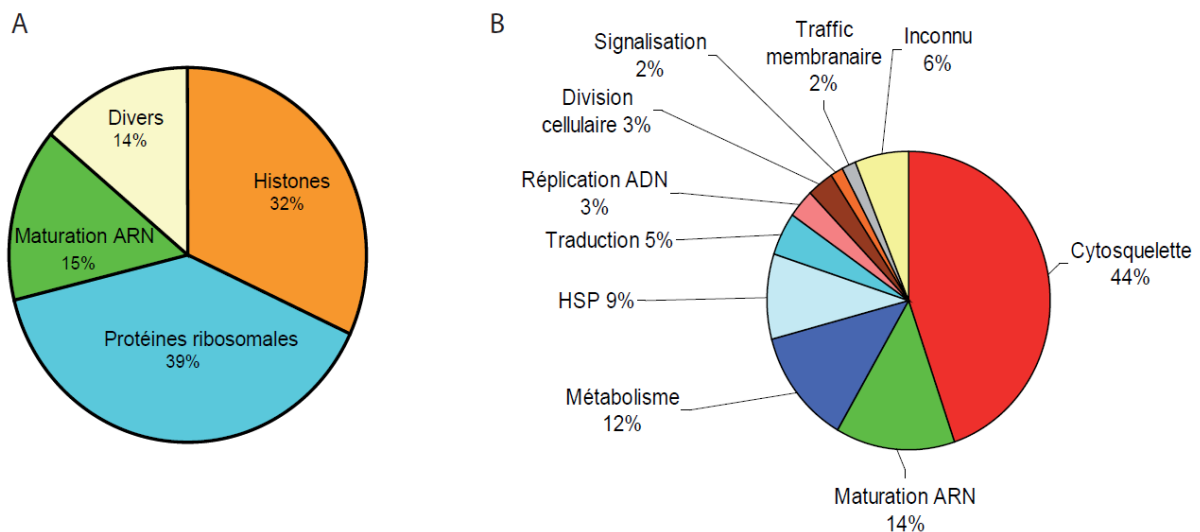


Figure 19: Représentation schématique de l'interactome de l'ubinucléine nucléaire. A) Interactome de l'ubinucléine des cellules HEK 293 transfectées Ubn-Flag. **B)** Interactome du contrôle négatif correspondant aux cellules HEK 293 non transfectées (HSP : heat shock protein).

description	accession	score	mass	#peptides	SC (relevant+ duplicated)
sp Q7L2E3 DHX30_HUMAN Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30 OS=Homo sapiens GN=DHX30 PE=1 SV=1	DHX30_HUMAN	101,88	133854,48	2	2
sp P10412 H14_HUMAN Histone H1.4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H1E PE=1 SV=2	H14_HUMAN	309,14	21852,00	4	4
sp Q96QV6 H2A1A_HUMAN Histone H2A type 1-A OS=Homo sapiens GN=HIST1H2AA PE=1 SV=3	H2A1A_HUMAN	336,25	14224,91	4	21
sp P04908 H2A1B_HUMAN Histone H2A type 1-B/E OS=Homo sapiens GN=HIST1H2AB PE=1 SV=2	H2A1B_HUMAN	398,58	14126,95	5	38
sp P20671 H2A1D_HUMAN Histone H2A type 1-D OS=Homo sapiens GN=HIST1H2AD PE=1 SV=2	H2A1D_HUMAN	136,59	14098,94	2	3
sp Q6F113 H2A2A_HUMAN Histone H2A type 2-A OS=Homo sapiens GN=HIST2H2AA3 PE=1 SV=3	H2A2A_HUMAN	568,36	14086,89	7	45
sp P0C0S5 H2AZ_HUMAN Histone H2A.Z OS=Homo sapiens GN=H2AFZ PE=1 SV=2	H2AZ_HUMAN	309,04	13544,55	5	22
sp P33778 H2B1B_HUMAN Histone H2B type 1-B OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BB PE=1 SV=2	H2B1B_HUMAN	345,75	13941,58	5	62
sp P58876 H2B1D_HUMAN Histone H2B type 1-D OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BD PE=1 SV=2	H2B1D_HUMAN	156,21	13927,57	2	3
sp Q99877 H2B1N_HUMAN Histone H2B type 1-N OS=Homo sapiens GN=HIST1H2BN PE=1 SV=3	H2B1N_HUMAN	359,53	13913,55	5	64
sp Q16695 H31T_HUMAN Histone H3.1t OS=Homo sapiens GN=HIST3H3 PE=1 SV=3	H31T_HUMAN	107,84	15498,51	2	8
sp Q71DI3 H32_HUMAN Histone H3.2 OS=Homo sapiens GN=HIST2H3A PE=1 SV=3	H32_HUMAN	238,59	15378,50	2	9
sp P84243 H33_HUMAN Histone H3.3 OS=Homo sapiens GN=H3F3A PE=1 SV=2	H33_HUMAN	185,55	15318,50	2	8
sp P62805 H4_HUMAN Histone H4 OS=Homo sapiens GN=HIST1H4A PE=1 SV=2	H4_HUMAN	135,60	11360,38	2	2
sp P61978 HNRPK_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens GN=HNRPK PE=1 SV=1	HNRPK_HUMAN	130,49	50944,40	2	2
sp Q9NXV2 KCTD5_HUMAN BTB/POZ domain-containing protein KCTD5 OS=Homo sapiens GN=KCTD5 PE=1 SV=1	KCTD5_HUMAN	350,49	26076,05	5	6
sp Q15233 NONO_HUMAN Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Homo sapiens GN=NONO PE=1 SV=4	NONO_HUMAN	123,36	54197,28	2	3
sp P62937 PPIA_HUMAN Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Homo sapiens GN=PPIA PE=1 SV=2	PPIA_HUMAN	136,49	18000,88	2	2
sp Q06830 PRDX1_HUMAN Peroxiredoxin-1 OS=Homo sapiens GN=PRDX1 PE=1 SV=1	PRDX1_HUMAN	144,72	22096,27	3	3
sp P30050 RL12_HUMAN 60S ribosomal protein L12 OS=Homo sapiens GN=RPL12 PE=1 SV=1	RL12_HUMAN	119,28	17807,54	2	2
sp Q07020 RL18_HUMAN 60S ribosomal protein L18 OS=Homo sapiens GN=RPL18 PE=1 SV=2	RL18_HUMAN	94,82	21621,06	2	2
sp P62750 RL23A_HUMAN 60S ribosomal protein L23a OS=Homo sapiens GN=RPL23A PE=1 SV=1	RL23A_HUMAN	105,66	17684,13	2	2
sp P62424 RL7A_HUMAN 60S ribosomal protein L7a OS=Homo sapiens GN=RPL7A PE=1 SV=2	RL7A_HUMAN	132,47	29977,02	3	3
sp P05388 RLA0_HUMAN 60S acidic ribosomal protein P0 OS=Homo sapiens GN=RPLP0 PE=1 SV=1	RLA0_HUMAN	128,40	34251,79	2	2
sp P05387 RLA2_HUMAN 60S acidic ribosomal protein P2 OS=Homo sapiens GN=RPLP2 PE=1 SV=1	RLA2_HUMAN	219,97	11657,85	3	3
sp P62277 RS13_HUMAN 40S ribosomal protein S13 OS=Homo sapiens GN=RPS13 PE=1 SV=2	RS13_HUMAN	180,24	17211,66	2	2
sp P62244 RS15A_HUMAN 40S ribosomal protein S15a OS=Homo sapiens GN=RPS15A PE=1 SV=2	RS15A_HUMAN	106,96	14829,96	2	2
sp P60866 RS20_HUMAN 40S ribosomal protein S20 OS=Homo sapiens GN=RPS20 PE=1 SV=1	RS20_HUMAN	181,65	13364,31	3	3
sp P62266 RS23_HUMAN 40S ribosomal protein S23 OS=Homo sapiens GN=RPS23 PE=1 SV=3	RS23_HUMAN	94,30	15797,71	2	2
sp P62851 RS25_HUMAN 40S ribosomal protein S25 OS=Homo sapiens GN=RPS25 PE=1 SV=1	RS25_HUMAN	118,01	13733,70	2	2
sp P62854 RS26_HUMAN 40S ribosomal protein S26 OS=Homo sapiens GN=RPS26 PE=1 SV=3	RS26_HUMAN	149,96	13007,08	2	2
sp P23396 RS3_HUMAN 40S ribosomal protein S3 OS=Homo sapiens GN=RPS3 PE=1 SV=2	RS3_HUMAN	224,11	26671,42	3	3
sp P61247 RS3A_HUMAN 40S ribosomal protein S3a OS=Homo sapiens GN=RPS3A PE=1 SV=2	RS3A_HUMAN	87,47	29925,73	2	2
sp P62701 RS4X_HUMAN 40S ribosomal protein S4, X isoform OS=Homo sapiens GN=RPS4X PE=1 SV=2	RS4X_HUMAN	82,77	29579,05	2	2
sp P62241 RS8_HUMAN 40S ribosomal protein S8 OS=Homo sapiens GN=RPS8 PE=1 SV=2	RS8_HUMAN	143,62	24190,16	2	2
sp P84103 SFRS3_HUMAN Splicing factor, arginine/serine-rich 3 OS=Homo sapiens GN=SFRS3 PE=1 SV=1	SFRS3_HUMAN	154,47	19317,90	2	2
sp P62314 SMD1_HUMAN Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 OS=Homo sapiens GN=SNRPD1 PE=1 SV=1	SMD1_HUMAN	127,65	13273,36	2	2
sp P62318 SMD3_HUMAN Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3 OS=Homo sapiens GN=SNRPD3 PE=1 SV=1	SMD3_HUMAN	162,34	13907,30	2	2
sp Q15208 STK38_HUMAN Serine/threonine-protein kinase 38 OS=Homo sapiens GN=STK38 PE=1 SV=1	STK38_HUMAN	133,28	54155,37	2	2
sp P62988 UBIQ_HUMAN Ubiquitin OS=Homo sapiens GN=RPS27A PE=1 SV=1	UBIQ_HUMAN	208,14	8559,62	3	6
sp Q9NPG3 UBN1_HUMAN Ubiquitin-1 OS=Homo sapiens GN=UBN1 PE=1 SV=1	UBN1_HUMAN	1171,38	121445,75	17	20
sp P08670 VIME_HUMAN Vimentin OS=Homo sapiens GN=VIM PE=1 SV=4	VIME_HUMAN	119,15	53619,07	2	2

Tableau III: Partenaires de l'ubiquitine nucléaire identifiés par spectrométrie de masse

description	accession	score	mass	#peptides	SC (relevant + duplicated)
sp P60709 ACTB_HUMAN Actin, cytoplasmic 1 OS=Homo sapiens GN=ACTB PE=1 SV=1	ACTB_HUMAN	672,21	41709,72	9	18
sp P63261 ACTG_HUMAN Actin, cytoplasmic 2 OS=Homo sapiens GN=ACTG1 PE=1 SV=1	ACTG_HUMAN	694,24	41765,79	9	15
sp P52907 CAZA1_HUMAN F-actin-capping protein subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=CAPZA1 PE=1 SV=3	CAZA1_HUMAN	128,94	32902,32	2	2
sp P17844 DDX5_HUMAN Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5 OS=Homo sapiens GN=DDX5 PE=1 SV=1	DDX5_HUMAN	124,88	69104,72	2	2
sp Q7L2E3 DHX30_HUMAN Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30 OS=Homo sapiens GN=DHX30 PE=1 SV=1	DHX30_HUMAN	101,88	133854,48	2	2
sp P68104 EF1A1_HUMAN Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EEF1A1 PE=1 SV=1	EF1A1_HUMAN	107,79	50109,10	2	2
sp P09211 GSTP1_HUMAN Glutathione S-transferase P OS=Homo sapiens GN=GSTP1 PE=1 SV=2	GSTP1_HUMAN	210,19	23341,02	2	2
sp P38159 HNRPG_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G OS=Homo sapiens GN=RBMX PE=1 SV=3	HNRPG_HUMAN	191,31	42306,33	3	3
sp Q00839 HNRPU_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U OS=Homo sapiens GN=HNRNPU PE=1 SV=6	HNRPU_HUMAN	164,72	90527,99	2	2
sp P08107 HSP71_HUMAN Heat shock 70 kDa protein 1 OS=Homo sapiens GN=HSPA1A PE=1 SV=5	HSP71_HUMAN	277,12	70009,02	3	3
sp Q8N5Z5 KCD17_HUMAN BTB/POZ domain-containing protein KCTD17 OS=Homo sapiens GN=KCTD17 PE=1 SV=3	KCD17_HUMAN	208,00	35647,50	3	5
sp Q14681 KCTD2_HUMAN BTB/POZ domain-containing protein KCTD2 OS=Homo sapiens GN=KCTD2 PE=1 SV=2	KCTD2_HUMAN	149,63	28568,29	2	4
sp P52732 KIF11_HUMAN Kinesin-like protein KIF11 OS=Homo sapiens GN=KIF11 PE=1 SV=2	KIF11_HUMAN	218,64	119085,02	3	3
sp P42166 LAP2A_HUMAN Lamina-associated polypeptide 2, isoform alpha OS=Homo sapiens GN=TMPO PE=1 SV=2	LAP2A_HUMAN	146,03	75445,62	2	2
sp P02545 LMNA_HUMAN Lamin-A/C OS=Homo sapiens GN=LMNA PE=1 SV=1	LMNA_HUMAN	475,70	74094,70	7	8
sp P19105 ML12A_HUMAN Myosin regulatory light chain 12A OS=Homo sapiens GN=MYL12A PE=1 SV=2	ML12A_HUMAN	142,29	19781,49	2	4
sp P35580 MYH10_HUMAN Myosin-10 OS=Homo sapiens GN=MYH10 PE=1 SV=3	MYH10_HUMAN	657,08	228857,93	9	10
sp Q7Z406 MYH14_HUMAN Myosin-14 OS=Homo sapiens GN=MYH14 PE=1 SV=1	MYH14_HUMAN	533,26	227862,80	7	7
sp P35579 MYH9_HUMAN Myosin-9 OS=Homo sapiens GN=MYH9 PE=1 SV=4	MYH9_HUMAN	282,52	226391,57	4	4
sp P60660 MYL6_HUMAN Myosin light polypeptide 6 OS=Homo sapiens GN=MYL6 PE=1 SV=2	MYL6_HUMAN	581,58	16919,13	7	12
sp Q43795 MYO1B_HUMAN Myosin-Ib OS=Homo sapiens GN=MYO1B PE=1 SV=3	MYO1B_HUMAN	159,73	131901,91	3	3
sp Q15233 NONO_HUMAN Non-POU domain-containing octamer-binding protein OS=Homo sapiens GN=NONO PE=1 SV=4	NONO_HUMAN	123,36	54197,28	2	3
sp P09874 PARP1_HUMAN Poly [ADP-ribose] polymerase 1 OS=Homo sapiens GN=PARP1 PE=1 SV=4	PARP1_HUMAN	887,53	113012,37	13	15
sp P22061 PIMT_HUMAN Protein-L-isoaspartate(D-aspartate) O-methyltransferase OS=Homo sapiens GN=PCMT1 PE=1 SV=3	PIMT_HUMAN	202,20	24634,58	4	4
sp Q75688 PPM1B_HUMAN Protein phosphatase 1B OS=Homo sapiens GN=PPM1B PE=1 SV=1	PPM1B_HUMAN	198,07	52609,35	3	4
tr Q5VU58 Q5VU58_HUMAN Tropomyosin 3 OS=Homo sapiens GN=TPM3 PE=2 SV=1	Q5VU58_HUMAN	336,62	28904,73	5	8
sp P62249 RS16_HUMAN 40S ribosomal protein S16 OS=Homo sapiens GN=RPS16 PE=1 SV=2	RS16_HUMAN	175,42	16435,04	3	5
sp P62269 RS18_HUMAN 40S ribosomal protein S18 OS=Homo sapiens GN=RPS18 PE=1 SV=3	RS18_HUMAN	368,26	17707,86	6	7
sp P68363 TBA1B_HUMAN Tubulin alpha-1B chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1B PE=1 SV=1	TBA1B_HUMAN	246,95	50119,59	3	3
sp P07437 TBB5_HUMAN Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2	TBB5_HUMAN	273,13	49638,96	4	4
sp Q13428 TCOF_HUMAN Treacle protein OS=Homo sapiens GN=TCOF1 PE=1 SV=2	TCOF_HUMAN	136,26	152013,28	2	3
sp P67936 TPM4_HUMAN Tropomyosin alpha-4 chain OS=Homo sapiens GN=TPM4 PE=1 SV=3	TPM4_HUMAN	139,72	28504,49	2	3

Tableau IV: Protéines identifiées conjointement dans les cellules transfectées et non transfectées (contrôle négatif)

4.2 Mise en évidence du complexe ubinucléine/14-3-3 ϵ /ZEBRA

Nous avons adopté une technique différente de celle des GST-pulldown pour identifier les partenaires de l'ubinucléine endogène des jonctions serrées des cellules HT29 en confluence. Nous avons réalisé les mêmes étapes biochimiques de lyse et de fractionnement subcellulaires que celles décrites dans l'article n°2. En revanche, les différents extraits ont été immunoprécipités avec l'anticorps anti-ubinucléine (hybridome ZAP1 décrit dans l'article n°1) et la protéine A/G agarose. Les protéines co-immunoprécipitant avec l'ubinucléine ont ensuite été identifiées par spectrométrie de masse comme décrit précédemment. Nous avons utilisé comme contrôle négatif un anticorps monoclonal de souris purifié de classe IgG1 kappa (Gentaur, Grussels, Belgium). Malheureusement, ces expériences n'ont pas permis de mettre en évidence l'ubinucléine parmi les protéines identifiées en spectrométrie de masse. Cette absence d'identification de l'ubinucléine par la spectrométrie de masse oblige à une interprétation très prudente des résultats malgré la présence de la protéine dans l'échantillon et sa détection en Western-blot (**Figure 20**).

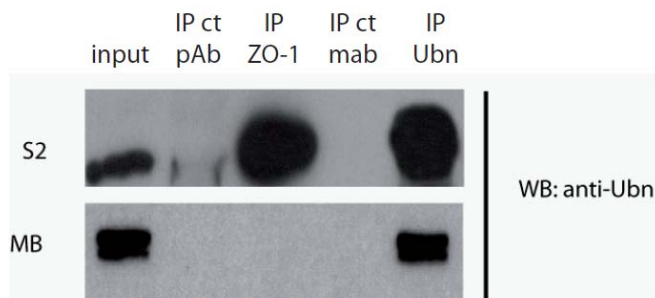


Figure 20: Immunoprécipitation de l'ubinucléine dans les cellules HT29. Western blot montrant la présence de l'ubinucléine (Ubn) dans les fractions S2 et MB (input) et la qualité de son immunoprécipitation (IP). A noter que l'ubinucléine co-immunoprécipite avec l'anticorps anti-ZO-1 ; ct : contrôle négatif.

Malgré la réserve associée aux résultats de cette expérience, nous avons remarqué que la protéine 14-3-3 epsilon (ϵ) était retrouvée de manière répétée ($n=3$) dans les protéines identifiées par spectrométrie de masse. La protéine 14-3-3 ϵ étant suspectée aussi d'interagir avec la protéine ZEBRA par double-hybride (communication personnelle, Dr Irène Joab, INSERM UMR 542, Villejuif), nous avons voulu vérifier l'existence d'un complexe entre ces 3 protéines. L'initiation de ce travail fut l'objet du mémoire de M2R d'une étudiante du laboratoire, Mlle Charlotte Sueur. L'interaction de l'ubinucléine avec la protéine 14-3-3 ϵ a pu être démontrée par co-immunoprécipitation (**Figure 21A**). En étudiant la séquence primaire

de l'ubiquitine, nous avons remarqué que la protéine possédait un motif de liaison aux protéines 14-3-3 au niveau de ses acides aminés 348 à 354 (motif de type 2, RXXXpSXP) avec la présence d'une sérine en 352 dont la phosphorylation pourrait potentiellement réguler l'interaction entre les 2 protéines (**Figure 21B**) (Muslin et al., 1996). Afin de confirmer le rôle de ce motif et de la sérine phosphorylée dans l'interaction avec 14-3-3 ϵ , nous avons utilisé des peptides de 15 acides aminés, phosphorylés ou non, contenant le motif consensus de liaison à 14-3-3 ϵ et fixés à des billes d'agarose (Biotem). Les expériences de pull-down réalisées avec des lysats de différents types cellulaires (HEK 293, HT29) ont montré que la protéine 14-3-3 ϵ se fixe sur la séquence peptidique uniquement lorsque la sérine est phosphorylée (**Figure 21C**). L'ubiquitine semble donc interagir avec la protéine 14-3-3 ϵ au niveau d'un motif consensus bien identifié possédant une sérine phosphorylée. Nos expériences actuelles visent à vérifier la spécificité de l'interaction en travaillant avec le mutant S352A de l'ubiquitine où la sérine en position 352 a été remplacée par l'alanine.

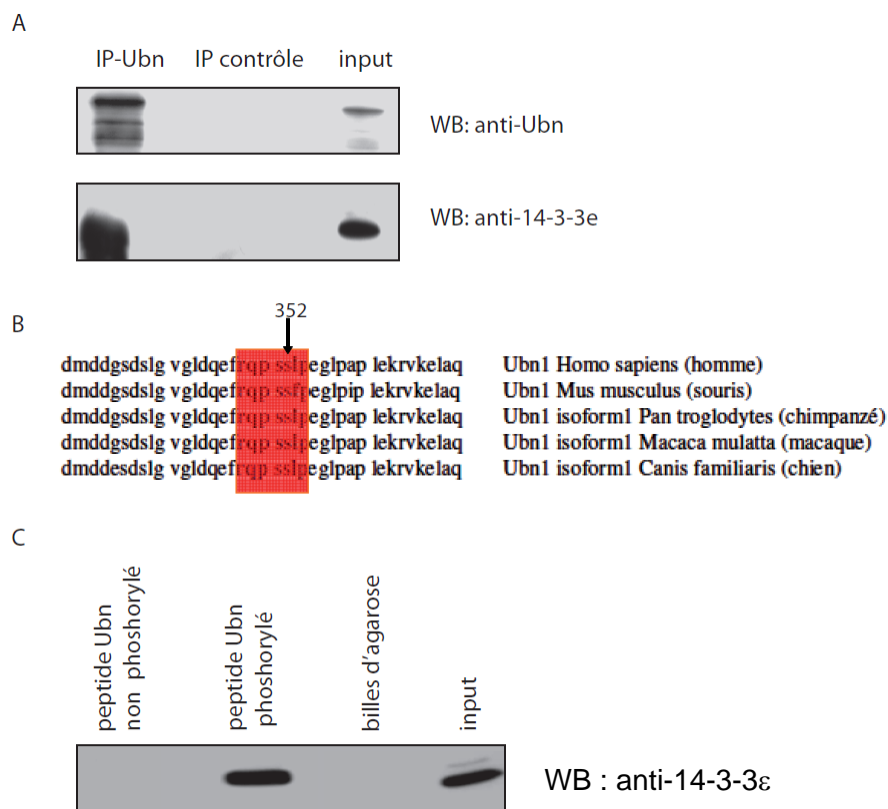


Figure 21 : Interaction entre l'ubiquitine et 14-3-3 ϵ . **A)** Co-immunoprécipitation de 14-3-3 ϵ avec l'anticorps anti-ubiquitine dans les cellules HEK 293 surexprimant l'ubiquitine. **B)** Séquence d'acide aminé de l'ubiquitine montrant le motif consensus et conservé de liaison à 14-3-3 (rouge). La flèche indique la sérine 352. **C)** Pull-down des lysats de cellules HT29 sur les différents peptides de l'ubiquitine fixés aux billes d'agarose. Le western-blot est révélé avec l'anticorps anti-14-3-3 ϵ .

Nous avons montré que l'ubiquitine (mutants Ubn2 correspondant aux acides aminés 355-693) interagit avec ZEBRA (fragment 178-233) de manière directe (**Figure 22A**). Nos résultats récents suggèrent que l'interaction entre ZEBRA et 14-3-3 ϵ serait indirecte et dépendrait de la présence de l'ubiquitine (**Figure 22B**).

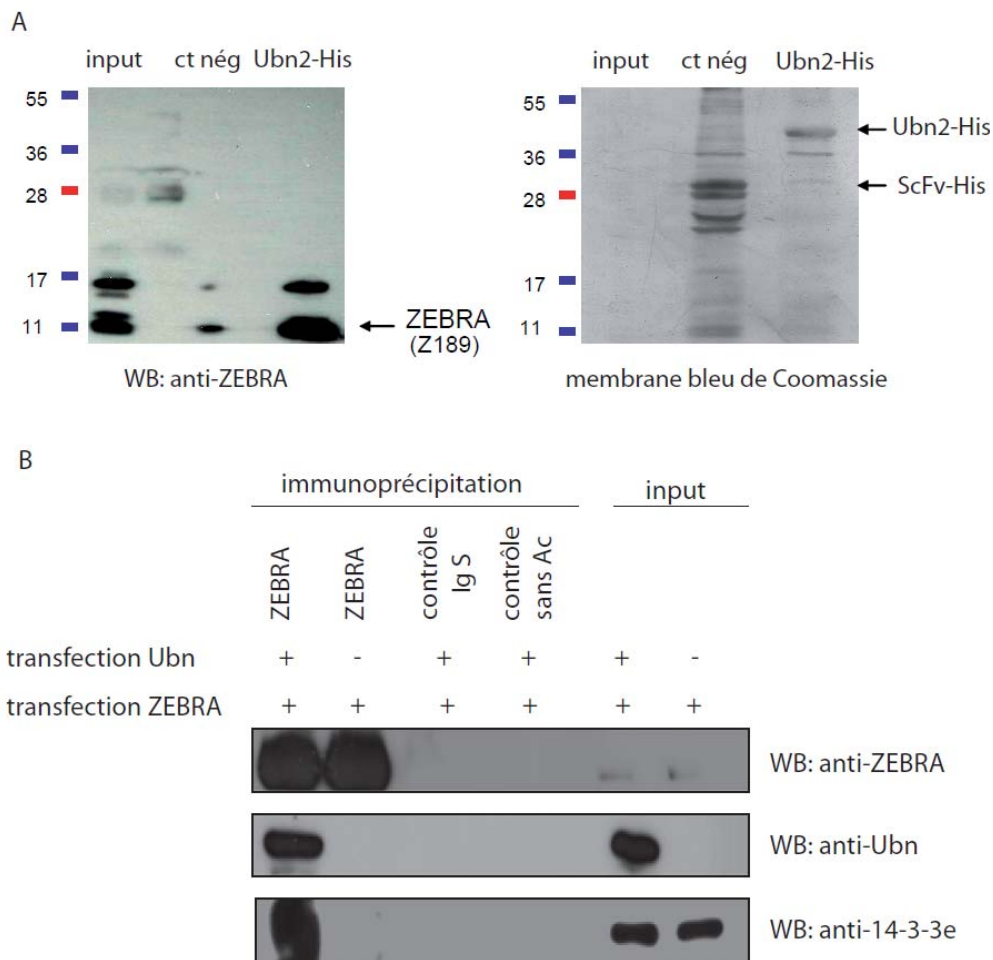


Figure 22: Interaction entre l'ubiquitine, ZEBRA et 14-3-3 ϵ . **A)** Pull-down entre la protéine recombinante Ubn2-histidine et le fragment Z189 de ZEBRA (acides aminés 178 à 233). Le contrôle négatif est la protéine recombinante ScFv portant l'étiquette histidine (single chain variable fragment anti-Tat). **B)** Immunoprécipitation de ZEBRA dans des cellules HEK 293 transfectées par ZEBRA +/- l'ubiquitine. La co-immunoprécipitation de 14-3-3 ϵ n'est possible qu'en présence de la transfection de l'ubiquitine (IgS : immunoglobulines de souris).

Partie III :

Rôle de l'ubiquitine dans la régulation du cycle lytique de l'EBV

1. Objectifs de l'article n°3

Peu d'éléments sont disponibles sur les fonctions de l'ubinucléine dans la cellule épithéliale. La connaissance de ses protéines partenaires, comme étudiées dans la partie précédente, est une voie pour comprendre son rôle et mener à bien de nouvelles expériences sur l'aspect fonctionnel de la protéine. Dans cette partie est étudié plus spécifiquement le rôle de l'ubinucléine dans les cellules infectées par le virus EBV. L'ubinucléine interagit avec le facteur de transactivation viral ZEBRA (également appelé EB1) en inhibant sa capacité à se fixer *in vitro* à ses séquences d'ADN cibles (Aho, 2000). Dans l'article n°3, en collaboration avec les Dr Evelyne Manet et Henri Gruffat (INSERM U758-ENSL), nous montrons que l'ubinucléine interfère avec les fonctions de ZEBRA en inhibant le cycle lytique du virus EBV dans les cellules épithéliales.

2. Principaux résultats de l'article n°3

*** L'ubinucléine interfère *in vivo* avec le cycle productif de l'EBV et les fonctions transactivatrices de ZEBRA.**

Dans la lignée HEK 293_{EBV} infectée de manière latente par l'EBV, l'ubinucléine inhibe l'induction du cycle lytique et la production de particules virales induites par les facteurs de transcription ZEBRA ou Rta, de manière dose dépendante. D'autre part, l'ubinucléine inhibe la transactivation des gènes précoces et tardifs de l'EBV sous dépendance directe ou indirecte de ZEBRA. Enfin, la surexpression de l'ubinucléine est associée à une diminution de la réplication virale dans les cellules HEK 293_{EBV}.

*** La surexpression de l'ubinucléine diminue *in vivo* l'interaction de ZEBRA à ses séquences d'ADN cibles.**

Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont été menées sur les cellules HEK 293_{EBV} après transfection avec ZEBRA et, ou non, l'ubinucléine. La chromatine a été immunoprécipitée avec un anticorps anti-ZEBRA ou anti-Ubn-1. Les résultats ont montré que la surexpression de l'ubinucléine était associée à une diminution de la fixation de ZEBRA à ses sites ZRE (Z responsive elements) présents sur son propre promoteur pZ ou le promoteur pM du gène précoce BSLF2/BMLF1. L'ubinucléine n'a pas été retrouvée fixée au niveau des promoteurs testés. Ces résultats suggèrent que la protéine

ZEBRA forme un complexe stable avec Ubn-1 dans la cellule l'empêchant d'interagir avec ses séquences d'ADN cibles.

*** L'inhibition de l'ubinucléine endogène par shARN augmente la production de particules virales.**

Les cellules HEK 293_{EBV} ont été infectées par des particules lentivirales exprimant un shARN ciblant l'ARNm de l'Ubn-1. L'inhibition de l'expression de l'Ubn-1 est associée à une augmentation de la production de particules virales dans cette lignée cellulaire.

*** L'ubinucléine interfère aussi avec l'activation de promoteurs cellulaires sous dépendance d'éléments régulateurs de type AP-1.**

L'ubinucléine interagit aussi avec d'autres facteurs de transcription de type bZIP, tel que le facteur cellulaire c-jun du complexe AP-1. Dans des expériences de gènes rapporteurs menées avec la luciférase dans des cellules HeLa, l'ubinucléine altère l'activation des promoteurs sous contrôle de sites AP-1. La surexpression de l'ubinucléine conduit à une diminution de l'activation des promoteurs cellulaires de l'IL-6 et de l'IL-10 qui sont sous la dépendance d'éléments régulateurs de type AP-1 alors qu'elle est sans effet sur l'activation d'autres promoteurs AP-1 indépendants.

*** L'activation du cycle lytique de l'EBV est reliée à la localisation cellulaire de l'ubinucléine.**

Pour tester si la localisation cellulaire de l'ubinucléine influence l'activation du cycle lytique du virus EBV, nous avons travaillé sur deux lignées de cellules épithéliales infectées par l'EBV, les cellules MDCK_{EBV} et AGS_{EBV}. A faible confluence cellulaire, l'ubinucléine est localisée dans le noyau de ces cellules et est associée à une faible expression de ZEBRA. Après quelques jours de culture, lorsque ces cellules sont à confluence, l'ubinucléine est localisée au niveau des jonctions serrées des cellules et l'expression de ZEBRA est augmentée considérablement. L'ubinucléine nucléaire pourrait inhiber le cycle lytique alors que l'ubinucléine des jonctions serrées, en levant l'inhibition sur ZEBRA, permettrait le bon déroulement du cycle viral.

3. Article n°3

(Gruffat et al., 2010)

The Nuclear and Adherent Junction Complex Component Protein Ubinuclein Negatively Regulates the Productive Cycle of Epstein-Barr Virus in Epithelial Cells[∇]

Henri Gruffat,^{1,2,3*} Julien Lupo,^{4,5} Patrice Morand,^{4,5} Véronique Boyer,⁴ and Evelyne Manet^{1,2,3*}

INSERM U758, 46 Allée d'Italie, F-69007 Lyon, France¹; ENS-Lyon, 46 Allée d'Italie, F-69007 Lyon, France²; IFR 128 BioSciences Gerland-Lyon Sud, 21 Avenue Tony Garnier, 69365 Lyon Cedex 07, France³; Unit Virus Host Cell Interactions (UVHCI), UMR 5233, UJF-EMBL-CNRS, 6 Rue Jules Horowitz, BP 181, F-38042 Grenoble Cedex 9, France⁴; and Laboratoire de Virologie, CHU Grenoble, BP 217, 38043 Grenoble Cedex 9, France⁵

Received 6 July 2010/Accepted 1 November 2010

The Epstein-Barr Virus (EBV) productive cycle is initiated by the expression of the viral *trans*-activator EB1 (also called Zebra, Zta, or BZLF1), which belongs to the basic leucine zipper transcription factor family. We have previously identified the cellular NACos (nuclear and adherent junction complex components) protein ubinuclein (Ubn-1) as a partner for EB1, but the function of this complex has never been studied. Here, we have evaluated the consequences of this interaction on the EBV productive cycle and find that Ubn-1 overexpression represses the EBV productive cycle whereas Ubn-1 downregulation by short hairpin RNA (shRNA) increases virus production. By a chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay, we show that Ubn-1 blocks EB1-DNA interaction. We also show that in epithelial cells, relocalization and sequestration of Ubn-1 to the tight junctions of nondividing cells allow increased activation of the productive cycle. We propose a model in which Ubn-1 is a modulator of the EBV productive cycle: in proliferating epithelial cells, Ubn-1 is nuclear and inhibits activation of the productive cycle, whereas in differentiated cells, Ubn-1 is sequestered to tight junctions, thereby allowing EB1 to fully function in the nucleus.

Epstein-Barr virus (EBV) is a human gammaherpesvirus that infects more than 95% of the human adult population. It is the causative agent of infectious mononucleosis (30) and is associated with several human cancers, including Burkitt's lymphoma (BL), Hodgkin's disease (HD), nasopharyngeal carcinoma (NPC), gastric carcinoma, and immunoblastic lymphoma, in immunosuppressed individuals (58, 60, 61). After primary infection, EBV persists lifelong in a latent state in a subpopulation of resting memory B cells (4). A generally accepted model of viral persistence suggests that the virus uses its transforming abilities to activate newly infected resting B cells. Latency-associated viral proteins then provide surrogate signals to allow the newly activated cells to differentiate through the germinal center into the memory compartment (59). In memory B cells, expression of viral genes is shut down, which allows them to evade cytotoxic-T-cell immunosurveillance and achieve long-term persistence (32). Although the hallmark of latency is the absence of a complete viral productive cycle, EBV productively reactivates from latency in mucosal epithelia and infectious virions are shed continuously into the saliva of healthy carriers (28). This allows the efficient spread of the virus from host to host. Interestingly, there is strong evidence that both the latent and the productive forms of EBV infection are essential for the emergence of EBV-associated malignancies (33, 50).

In vivo, EBV reactivation has been linked to terminal differentiation of latently infected B cells into plasma cells (16, 39, 46, 47). In addition, in the case of oral hairy leukoplakia, a disease associated with the presence of EBV in the tongue's epithelial cells, the viral productive cycle takes place only in differentiated cells (8, 67). Up to now, the signals and molecular mechanisms that trigger the switch from latency to the productive cycle *in vivo* have remained unknown. In contrast, activation of the viral productive cycle *in vitro* has been well documented for cell lines established from EBV-positive BL biopsy specimens. The productive cycle can be induced by treating these infected cells with various agents, such as the tumor promoter 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA), associated with sodium butyrate (BA) (70), anti-Ig (57), and tumor growth factor β (TGF- β) (20). In these models, it is now well established that these inducing agents activate the transcription of two immediate-early (IE) viral genes, the BZLF1 and BRLF1 genes, whose products are viral transcription factors called EB1 (or ZEBRA or Zta) and R (or Rta), respectively (13, 14, 15, 23, 29). EB1 is a bZip protein related to c-Jun and c-Fos that binds to the consensus AP1 motif as well as atypical AP1-like motifs known as Z-responsive elements (ZREs) (12, 21, 49, 62). Interestingly, EB1 is the only transcription factor known to preferentially activate the methylated form of its ZRE target (11, 18). R activates some early promoters through a direct binding mechanism but also activates some promoters indirectly, through effects on cellular transcription factors (1, 25, 27). EB1 and R activate the transcription of all the early genes, some of which are essential for viral DNA replication, a prerequisite for expression of most late

* Corresponding author. Mailing address: U758 INSERM, ENS-Lyon, 46 Allée d'Italie, F-69007 Lyon, France. Phone: 33 4 72 72 89 55. Fax: 33 4 72 72 81 37. E-mail for Evelyne Manet: evelyne.manet@ens-lyon.fr. E-mail for Henri Gruffat: henri.gruffat@ens-lyon.fr.

[∇] Published ahead of print on 17 November 2010.

genes, DNA encapsidation, and production of infectious virions (reviewed in reference 35).

We have previously characterized a ubiquitously expressed cellular protein, which we called ubinuclein (Ubn-1), through its interaction with EB1 (2). Ubn-1 can also interact with other transcription factors of the basic leucine zipper family, such as C/EBP and c-Jun. The N terminus of Ubn-1 is essential for nuclear localization of the protein, whereas its central domain is responsible for interaction with EB1's basic domain. *In vitro*, the Ubn-1-EB1 interaction inhibits EB1's binding to DNA (2). Ubn-1 transcripts are present in a wide variety of human adult, fetal, and tumor tissues (2, 7), and the protein is detected in the nuclei of cells throughout the human epidermis and also in cultured keratinocytes (2). More recently, we have demonstrated that Ubn-1 is a member of the NACos (nuclear adherent-junction complex components) protein family. This protein is localized mainly in the nuclei of isolated MDCK (Madin-Darby canine kidney) epithelial cells and undifferentiated keratinocytes but is relocalized to the tight junctions in confluent epithelial cells, polarized cells, or differentiated keratinocytes. *In vivo*, we observed that Ubn-1 is present in the tight junctions of both stratified and simple epithelia (3). As a NACos protein, Ubn-1 may participate in the regulation of gene expression (6), and interestingly, Ubn-1 has been found associated in a complex with HIRA (histone cell cycle regulation-defective homologue A) and H3.3 (histone H3 variant 3) (56). HIRA is required for the DNA replication-independent assembly of chromatin. More recently, Ubn-1 has also been identified as an ortholog of *Saccharomyces cerevisiae* Hpc2p and characterized as a novel regulator of fibroblast cell senescence (5, 7). Hence, Ubn-1 appears to act at the level of chromatin remodeling, and in this way, Ubn-1 may control gene expression.

Here, we have studied the consequences of the interaction between Ubn-1 and EB1 during the EBV productive cycle. We find that Ubn-1 can control the production of infectious virus. In HEK293 cells infected with EBV, Ubn-1 overexpression mediates a clear decrease in the level of virions produced, and inversely, repression of Ubn-1's expression ameliorates viral production. By using chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays, we show that Ubn-1 blocks EB1-ZRE interaction *in vivo*. Ubn-1 overexpression also has a negative effect on AP1-induced promoters. In epithelial cells infected with EBV, the productive cycle appears to be more efficient when cells reach confluence, in accordance with relocalization of Ubn-1 to the tight junctions. We thus propose a model in which Ubn-1 contributes to the control of the EBV productive cycle *in vivo* depending on epithelial cell differentiation.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids. The EB1, Ubn-1, and R expression vectors, pRc/CMV-EB1, pCEP4t-Ubi, and pRc/CMV-R, respectively, have been described previously (3, 26, 27). Appropriate control vectors, pRc/CMV and pCEP4t (Invitrogen), were used in all experiments. The pRK5-BALF4 expression vector encodes the EBV gp110 protein and has previously been shown to enhance the infection efficiency of EBV virions derived from the B95-8 strain of EBV (a gift from W. Hammerschmidt) (45). The pIL6-Luc, pIL10-Luc, pLMP1-Luc, and pTK-Luc reporter plasmids have been described elsewhere (40, 63, 64). A TATA box-containing oligonucleotide was cloned into the pGL2-basic vector from Promega to create the pTATA-Luc reporter plasmid. In this vector, a concatemeric oligonucleotide bearing the TPA-responsive element TGAGTCA was cloned to generate the pTRE.TATA-Luc reporter plasmid (a gift from M. Castellazzi). In the pTP1.Gal4-Luc reporter plasmid, the luciferase gene is under the control of the

LMP2 promoter, in which the EBNA2-responsive elements have been exchanged for 10 Gal4-binding sites. The Ubn-1 short hairpin RNA (shRNA) sequence (sh.Ubn) (CCGGGCCAGCTCAATCTCCAAACATCTCGAGATGTTTGGAGATTGAGCTGGCTTTT) cloned in the pLKO1 plasmid was a gift from P. Adams (7). The shRNA-encoding lentiviral pseudoparticles were produced by the vectorology platform of IFR 128.

Cell lines. HEK293 cells infected with the recombinant EBV virus (HEK293_{EBV}), a gift from W. Hammerschmidt, have been described previously (17). The recombinant virus also encodes enhanced green fluorescent protein (eGFP) and the hygromycin B resistance gene. HEK293_{EBV} cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin, and hygromycin B (100 µg/ml; Invitrogen). HeLa cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and penicillin-streptomycin. AGS_{EBV} cells (a gift from S. Kenney) (22) were maintained in F-12 medium containing 10% FBS, penicillin-streptomycin, and hygromycin B (100 µg/ml). Raji cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS and penicillin-streptomycin. The MDCK cell line was purchased from Clontech (Palo Alto, CA) and grown according to the manufacturer's instructions in DMEM containing 10% FBS. These cells were infected with the recombinant EBV_{GFP} virus and selected for hygromycin B resistance.

Viral titration. Supernatants from HEK293_{EBV} cells were harvested at 72 h posttransfection and filtered through a 0.45-µm-pore-size filter. Raji cells (2×10^5) were incubated in 0.5 ml of virus solution for 3 h at 37°C in a 24-well plate. Cells were then washed, resuspended in 1 ml of RPMI medium, and incubated for an additional 48 h at 37°C. GFP-expressing Raji cells were quantified by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis.

Viral DNA analysis. HEK293_{EBV} cells were transfected with an EB1 expression vector to activate the EBV productive cycle and with increasing amounts of the Ubn-1 expression vector. At 72 h posttransfection, DNA was prepared by the Hirt technique, digested with DpnI and BamHI, subjected to electrophoresis through a 0.7% agarose gel, transferred to a nylon N+ membrane (GE Healthcare), and probed with a randomly primed ³²P-labeled EBV BRRF1 DNA probe. The replication efficiency of the EBV plasmid was quantified by scanning the Southern blot autoradiogram with a phosphorimager (Fuji FLA-5100).

DNA transfection. HeLa or HEK293_{EBV} cells were seeded at 1×10^6 cells per 100-mm-diameter petri dish 10 h prior to transfection. Transfections of HEK293_{EBV} cells were performed by the calcium phosphate precipitation method as described previously (31). Transfections of HeLa cells for reporter assays were performed by use of PEI (Ozyme) according to the manufacturer's instructions. All transfections were performed in triplicate. *Renilla* luciferase assays were performed with a *Renilla* luciferase assay system (Promega).

Coimmunoprecipitation assays. HEK293_{EBV} cells transfected with expression vectors for EB1 and Ubn-1 were harvested from 100-mm dishes at 48 h posttransfection. Nuclear extracts were prepared from these cells by the method of Dignam et al. (19). Nuclear cell extracts were then incubated overnight with the Z125 anti-EB1 monoclonal antibody (MAb) (41) in Dignam buffer III supplemented with 140 mM NaCl and protease inhibitors (Roche Molecular Biochemicals) at 4°C, followed by a 15 min of incubation with 50 µl of PureProteome protein A magnetic beads (Millipore). Beads were then washed twice with Dignam buffer III supplemented with 140 mM NaCl and then 3 times with the same buffer supplemented with 1% Triton X-100. Immunopurified proteins were analyzed by Western blotting.

Immunoblotting. Immunoblotting was performed as described previously (24). Briefly, cells were lysed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer supplemented with protease inhibitors; equivalent amounts of proteins were then separated in sodium dodecyl sulfate-10% polyacrylamide electrophoresis gels. After being transferred and blocked, membranes were incubated 2 h at 20°C with the appropriate primary antibodies diluted in $1 \times$ Tris-buffered saline (TBS), 0.1% Tween 20 (TBS-T). The primary antibody dilutions were as follows: 1:250 anti-EB1 (Z125 monoclonal antibody) (41), 1:2,000 anti-Ubn-1 (ZAP1 monoclonal antibody) (3), 1:1,000 anti-gp350 (OT6) (69), and 1:250 anti-EB2 (31). The appropriate anti-mouse or anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (GE Healthcare) were used at a dilution of 1:5,000 in $1 \times$ TBS-T for 1 h at room temperature. Bound antibodies were visualized by use of enhanced chemiluminescence (ECL) reagent (Pierce) according to the manufacturer's instructions.

Immunofluorescence studies. For indirect immunofluorescence, cells were fixed with methanol for 10 min and further permeabilized with 0.1% Triton X-100 in phosphate-buffered saline (PBS) for 5 min. Blocking was made with 0.2% gelatin in PBS for 1 h at room temperature, followed by incubation with the primary antibody at room temperature for 20 min in PBS-0.2% gelatin. Slides were washed three times with PBS, followed by incubation with the secondary

TABLE 1. Primers used in this study

Primer target (orientation)	Sequence
β -Actin (forward)	GCTGCGTGTGGCTCCCGAGGAG
β -Actin (reverse)	ATCTTCATTGTGCTGGTGCCAC
Ubn-1 (forward)	CCTCTTTGATGGCTTACCCTAC
Ubn-1 (reverse)	TGATTCCACCAGACCCAAAGTG
LMP1 (forward)	TGAACACCACCAGATGACT
LMP1 (reverse)	GTGCGCTAGGTTTTGAGAG
BALF4 (forward)	GGAGTCGTAGGCAAATTGGA
BALF4 (reverse)	TCAAGAACCTGACGGAGCTT
BALF5 (forward)	AAGAGGCACTGGAGGATGTTGG
BALF5 (reverse)	AGGGCTACCCTGTGGGCTTTTTG
BMRF1 (forward)	CCAGACATACGGTCAGTCCA
BMRF1 (reverse)	TGCTTCACCTTCTTGGG
BDFL1 (forward)	CAGATTTGAAAGTGGTAG
BDFL1 (reverse)	TTATCTTAAACCAGCAAGTG
BFRF3 (forward)	GGGAGGCTCAAAGAAGTTA
BFRF3 (reverse)	ATGAAGAAACAGAGGGGG
BdRF1 (forward)	CACTATCAGGTAACGCA
BdRF1 (reverse)	TCAAGCCAGCGTTTATT
F19 promoter pZ (forward)	TGGGCTGTCTATTTTTGACACCAG
B20 promoter pZ (reverse)	CCTCAGCAAAGATAGCAAAGGTGG
F11 promoter pM (forward)	AAACTTAGTTCAGGTGTGCCATGC
B13 promoter pM (reverse)	GGGATGTAGTGCTGTCTTGACTGG

antibody at room temperature for 20 min. Slides were washed three times with PBS, followed by DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) staining in PBS. After three washes with PBS, slides were mounted and studied using a fluorescence microscope (Axioplan 2; Zeiss). Images were processed with Photoshop 5.0 (Adobe Systems, San Jose, CA).

RT-PCR. Total RNA was extracted using a Macherey-Nagel Nucleospin RNA/protein kit. Total RNA (2.5 μ g) was reverse transcribed with oligo(dT)₁₆ and 1 μ l of Superscript II enzyme (Invitrogen) in a 20- μ l reaction mixture at 42°C for 1 h. PCRs were performed using the GoTaq Hot Start polymerase (Promega) with a set of specific primer pairs. For quantification of PCR products, [α ³²P]dCTP (0.1 μ Ci) was added to each PCR mixture, and the PCR products were fractionated on 6% polyacrylamide gels. Quantifications were made by means of a phosphorimager (Fuji FLA-5100). To monitor our reverse transcription-PCR (RT-PCR) experiments, we evaluated the endogenous expression of β -actin mRNA by RT-PCR. Amplification of a 690-bp DNA fragment corresponding to β -actin mRNA showed that no DNA contamination was present in our preparations. The primer sequences used are listed in Table 1.

ChIP. The method described by Orlando et al. was used for chromatin immunoprecipitation (ChIP) (48). Briefly, 48 h after transfection, cells were fixed by the addition of formaldehyde to give a final concentration of 1% for 15 min. Cells were then washed twice with PBS, and crude nuclei were prepared and resuspended at a concentration of 1×10^7 nuclei/ml in lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF]). The resulting solution was sonicated such that the average DNA fragment length was reduced to less than 1 kb. This solution was diluted 10-fold with immunoprecipitation buffer (1.2 mM EDTA, 0.01% SDS, 1.1% Triton, 16.7 mM Tris-HCl [pH 8.0], 167 mM NaCl, 1 mM PMSF) and precleared for 2 h with protein A-Sepharose beads preabsorbed with both bovine serum albumin (BSA) and sonicated single-stranded DNA. Immunoprecipitation was performed by incubation for 12 h at 4°C with monoclonal antibodies directed either to EB1 (MAb Z125 [44]), to Ubn-1 (MAb ZAP1 [3]), or to a control MAb. Immune complexes were collected by incubation with protein A-Sepharose beads, and washed extensively with low-salt buffer (0.1% SDS, 1% Triton, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl), high-salt buffer (0.1% SDS, 1% Triton, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 500 mM NaCl), LiCl buffer (1% deoxycholate, 1% NP-40, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 250 mM LiCl), and Tris-EDTA (TE) prior to elution from the beads with 300 μ l of elution buffer (1% SDS, 0.1 M NaHCO₃). Protein-DNA cross-links were reversed by heating to 65°C for 4 h. DNA fragments were purified by proteinase K digestion followed by a phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation in the presence of a glycogen carrier. The immunoselected DNA fragments were dissolved in 50 μ l of water. The presence of DNA was then evaluated using semiquantitative PCR with sets of primer pairs that hybridize along the different promoter regions analyzed (Table 1) in the presence of [α ³²P]dCTP (0.1 μ Ci). PCRs were performed using GoTaq Hot Start polymerase (Promega) with 1 μ l of the solution of immunoselected DNA fragments, as well as with various dilutions of the DNA purified from the input chromatin, in order to generate a standard curve in a linear range. The PCR-amplified fragments (24 cycles) were then analyzed using

6% polyacrylamide gels and autoradiographed. Each PCR-amplified band was subsequently quantified with a phosphorimager (Fuji FLA-5100). The amount of DNA amplified from the control immunoprecipitated chromatin was systematically subtracted from the amount of DNA amplified from the specific immunoprecipitated chromatin and the results expressed as a percentage of immunoprecipitated DNA relative to the quantity of DNA present before immunoprecipitation (input).

RESULTS

Ubinuclein interferes with EB1-mediated induction of the EBV productive cycle *in vivo*. We have previously shown that Ubn-1 interacts with EB1's basic DNA-binding domain and abrogates EB1's binding to DNA *in vitro* (2). To determine whether Ubn-1 also impairs the function of EB1 *in vivo*, we analyzed the effect of Ubn-1 overexpression on the EBV productive cycle. For this, we used the HEK293_{EBV} cell line (17). In this cell line, EBV is present in a latent state and ectopic expression of EB1 is sufficient to induce virus production. We evaluated the production of infectious EBV virions in this system, following transient expression of EB1, expressed either alone or together with increasing amounts of Ubn-1. The production of virus was evaluated by infection of Raji cells with the filtered HEK293_{EBV} supernatant. Due to constitutive expression of GFP from the EBV recombinant genome, infected Raji cells appear bright green under UV light and can be quantified by FACS analysis. Expression of EB1 alone induced the production of a large number of EBV virions (Fig. 1A, lane 2), but when increasing amounts of Ubn-1 were coexpressed, the relative efficiency of virus production was reduced in a dose-dependent manner (Fig. 1A, lanes 3 and 4). This effect is not due to a decrease in EB1 levels, as can be seen by Western blot analysis (Fig. 1A, bottom panel). To confirm these results under conditions where EB1 would be present under more-physiological conditions, we took advantage of the fact that the other viral transcription factor, R, has been reported to induce expression of EB1 and consequently the EBV productive cycle in epithelial cells (68). We thus induced the EBV productive cycle in HEK293_{EBV} cells by transfecting an R expression vector and evaluated the production of infectious EBV virions in the presence of increasing amounts of Ubn-1. As expected, untransfected HEK293_{EBV} cells produced no virus (Fig. 1B, lane 2), nor did HEK293_{EBV} cells transfected with an Ubn-1 expression plasmid (Fig. 1B, lane 1), demonstrating that Ubn-1 alone is not able to induce the EBV productive cycle. Expression of R alone induced the production of a large number of EBV virions (Fig. 1B, lane 3), but when increasing amounts of Ubn-1 were coexpressed, the efficiency of virus production was reduced in a dose-dependent manner (Fig. 1B, lanes 4 and 5). Again, Ubn-1 overexpression did not affect the level of EB1 expressed in HEK293_{EBV} cells induced by R (Fig. 1B, bottom panel). These results strongly suggest that Ubn-1 can act as a negative regulator of the EBV productive cycle.

Ubinuclein modulates expression of both early and late EBV genes. As a viral transcription factor, EB1 is required for activation of the EBV early genes (14), but EB1 is also directly implicated in the *trans*-activation of the lytic origin of replication (*ori*Lyt) of the virus (52). In order to first investigate whether Ubn-1 directly affects viral gene expression, we analyzed the expression level of a selected batch of early and late EBV genes in the presence of overexpressed Ubn-1. After

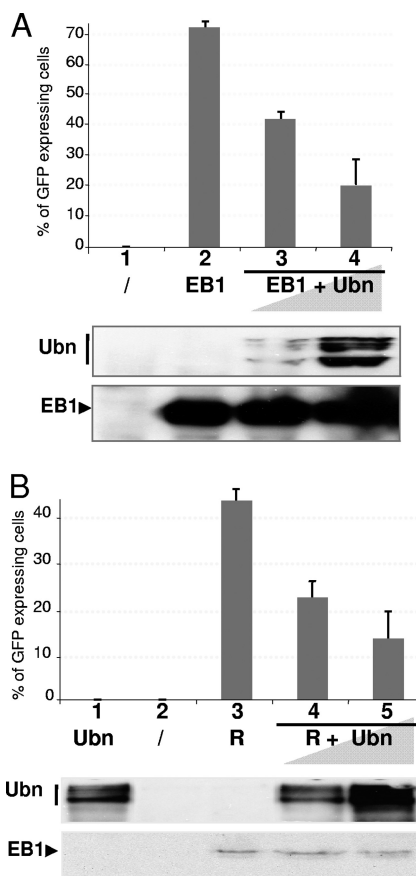


FIG. 1. Ubinuclein overexpression inhibits virion production in HEK293_{EBV} cells. (A) Raji cells (2.5×10^5) were incubated with 1 ml of filtered medium from HEK293_{EBV} cells that had been either not transfected (lane 1), transfected with 0.5 μ g of an EB1 expression plasmid (lane 2), or cotransfected with expression plasmids for both EB1 (0.5 μ g) and increasing amounts of Ubn-1 (2 and 4 μ g) (lanes 3 and 4). The amount of GFP-expressing Raji cells was determined by FACS analysis. The experiment was done 5 times, and the error bars represent standard deviations. (Lower panel) Immunoblot analysis for one representative experiment. Ubn-1 protein was detected using MAb ZAP1; EB1 protein was detected on the same membrane using MAb Z125. (B) Raji cells (2.5×10^5) were incubated with 1 ml of filtered medium from HEK293_{EBV} cells that had been either not transfected (lane 2), transfected with 4 μ g of expression plasmid for Ubn-1 (lane 1) or 1 μ g of an R expression plasmid (lane 3), or cotransfected with expression plasmids for both R (1 μ g) and increasing amounts of Ubn-1 (2 and 4 μ g) (lanes 3 and 4). The number of GFP-expressing Raji cells was determined by FACS analysis. (Lower panel) Immunoblot analysis for one representative experiment.

transfection of HEK293_{EBV} cells with an EB1 expression vector and increasing amounts of an Ubn-1 expression vector, total cellular mRNA was purified and reverse transcribed, and the reverse transcribed products were amplified by semiquantitative PCR, using primer pairs specific for the different genes studied (Table 1). The products of these RT-PCRs were analyzed using agarose gels and quantified (Fig. 2A). β -Actin primers were used as a control to ensure that the same amount of RNA was used in each RT-PCR and that no DNA contamination was present in our mRNA preparations. The absence of DNA contamination was also confirmed by the absence of amplification when no reverse transcriptase was used (lane 5 of

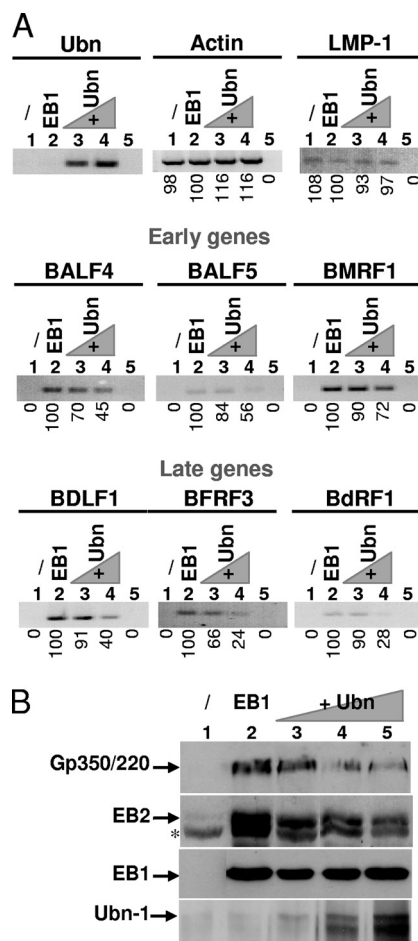


FIG. 2. Ubinuclein modulates expression of both early and late EBV genes. (A) Total RNA from HEK293_{EBV} cells that have been either not transfected (lane 1 of each panel), transfected with 0.5 μ g of an EB1 expression plasmid (lane 2 of each panel), or cotransfected with expression plasmids for both EB1 (0.5 μ g) and increasing amounts of Ubn-1 (2 and 4 μ g) (lanes 3 and 4 of each panel) were purified, reverse transcribed, and analyzed by PCR using specific primers for actin (used to monitor the quality of mRNA purification and to normalize the amount of mRNA used under each condition), Ubn-1, the LMP-1 latent gene, the BALF4, BALF5, and BMRF1 early genes, and the BDLF1, BFRF3, and BdRF1 late genes. Lane 5 of each panel represents the results of a PCR amplification in the absence of reverse transcriptase. The results of PCR quantifications are indicated underneath each panel and are expressed relative to the amount of amplified DNA from the assay in which cells were transfected with an expression plasmid for EB1. (B) Immunoblot analysis of gp350/220, EB2, EB1, and Ubn-1 proteins expressed from HEK293_{EBV} cells that have been either not transfected (lane 1), transfected with 0.5 μ g of an EB1 expression plasmid (lane 2), or cotransfected with expression plasmids for both EB1 (0.5 μ g) and increasing amounts of Ubn-1 (1, 2, and 4 μ g) (lanes 3 and 4).

each panel). Overexpression of Ubn-1 mRNA was also monitored using RT-PCR (top left panel, lanes 3 and 4). The expression of the LMP1 gene, a gene normally expressed during latency, was not significantly altered when the productive cycle was induced by ectopic expression of EB1 (lane 2) or when Ubn-1 was overexpressed (lanes 3 and 4), demonstrating that Ubn-1 has no effect on the expression of this latent gene. As expected, expression of both the early genes (the BALF4,

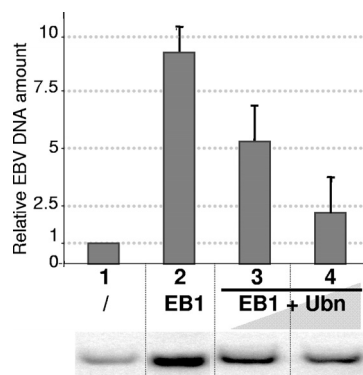


FIG. 3. Ubinuclein overexpression inhibits viral DNA replication. Viral DNA extracted from HEK293_{EBV} cells that had been either not transfected (lane 1), transfected with 0.5 µg of an EB1 expression plasmid (lane 2), or cotransfected with expression plasmids for both EB1 (0.5 µg) and increasing amounts of Ubn-1 (2 and 4 µg) (lanes 3 and 4) was quantified by Southern blotting using the BRRF1 probe. Fifty micrograms of total DNA obtained by Hirt extraction was cut by DpnI and BamHI and loaded in each lane. The results for one representative Southern blot are shown in the bottom panel. Quantification of the Southern blots is presented in the graph above as relative amounts of viral DNA observed after assignment of an arbitrary value of 1 to the quantified DNA present in the cells prior to reactivation of the productive cycle (lane 1). The experiment was done 3 times, and the error bars represent standard deviations.

BALF5, and BMRF1 genes) and the late genes (the BDLF1, BFRF3, and BdRF1 genes) was efficiently induced when EB1 was expressed (compare lane 2 to lane 1 in each panel). Interestingly, Ubn-1 overexpression clearly downregulated the expression of the three early and three late EBV genes tested (lanes 3 and 4). At the higher levels of Ubn-1, expression of the early genes decreased between 28 and 55% and expression of the late genes between 60 and 76%. The decrease in early- and late-gene expression could also be visualized at the protein level, as can be seen by the immunoblot analysis for the early BMLF1 protein, EB2, and the late gp350/220 glycoprotein (Fig. 2B).

As shown in Fig. 3, in addition to its effect on expression of the EBV genes, Ubn-1 overexpression also had a strong effect on the efficiency of EBV's DNA replication during the productive cycle. In the absence of EB1, a small amount of EBV DNA was detected in the HEK293_{EBV} cells (lane 1), whereas when EB1 was expressed, the amount of EBV DNA was increased 10 fold (lane 2), indicating that the viral genome was efficiently replicated. However, when Ubn-1 was coexpressed in these cells together with EB1, the amount of viral DNA replicated decreased in a dose-dependent manner (compare lanes 3 and 4 to lane 2). This decrease in the efficiency of EBV DNA replication is probably partly due to the weaker expression of the EBV early genes. However, since EB1 also acts as an origin-binding protein and directly transactivates oriLyt, the effect on DNA replication is likely to be also the result of a more direct effect on replication itself.

Taken together, these results indicate that the downregulation of virion production following Ubn-1 overexpression is due to a combination of effects on early-gene expression, viral DNA replication, and late-gene expression, the last probably being only a consequence of the two precedent effects since

EBV late-gene expression is known to be dependent on viral DNA replication.

In vivo, ubinuclein overexpression reduces the interaction of EB1 with DNA. We have shown above that Ubn-1 interferes with the reactivation of the EBV productive cycle. We had previously shown that Ubn-1 inhibits the interaction between EB1 and its DNA-responsive elements (ZREs) *in vitro* (2). We thus speculated that *in vivo*, Ubn-1 could inhibit the production of infectious virus by interfering with EB1's binding to ZREs both on its viral target promoters and on the oriLyt region. In order to test this hypothesis, we assayed the EB1-DNA interaction *in vivo* by a chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay, following cotransfection of latently infected HEK293_{EBV} cells with a control vector or an EB1 expression plasmid together with (or without) an Ubn-1 expression plasmid. The chromatin was immunoprecipitated either with a monoclonal antibody directed against EB1 (Mab Z125) or with a monoclonal antibody directed against Ubn-1 (Mab ZAP1). We then measured the amount of specific immunoprecipitated DNA by semiquantitative PCR using primers encompassing ZRE sites present on the two viral promoters pM and pZ, which control expression of the BSLF2/BMLF1 and BZLF1 genes, respectively, and on the oriLyt region (Fig. 4A). Quantification of the amount of DNA amplified by PCR after immunoprecipitation of the chromatin was expressed as a percentage of the amount of input DNA used. The results presented in Fig. 4B show that when the cells were transfected with a control vector, immunoprecipitation of chromatin with Mab Z125 resulted only in a basic amplification of the pM, pZ, or oriLyt sequence (lane 1). In contrast, when EB1 was expressed, ChIP assays using Mab Z125 revealed striking increases in the amounts of pZ, pM, and oriLyt DNA present in the immunoprecipitated chromatin (lane 2). We found a consistent 14, 20, or 19% of the total pZ, pM, or oriLyt DNA, respectively, bound by EB1. However, when Ubn-1 was overexpressed, we observed a significant decrease in the amount of pZ, pM, or oriLyt DNA immunoprecipitated by Mab Z125 (down to 7.5, 12.5, or 11%, respectively) (lane 4). Interestingly, immunoprecipitation of chromatin with Mab ZAP1 did not allow any specific amplification of the pM, pZ, or oriLyt DNA under any conditions tested, even when Ubn-1 was overexpressed (lanes 5 to 8), indicating that Ubn-1 did not interact specifically on the two promoters tested or on the oriLyt region. These results indicate that *in vivo*, Ubn-1 reduces the amount of EB1 bound both to EB1-responsive promoters and to the EBV lytic origin of replication, oriLyt.

In order to confirm that this effect is due to a direct interaction between Ubn-1 and EB1, we performed a coimmunoprecipitation assay with HEK293_{EBV} cells transfected with expression vectors for EB1 and Ubn-1. Immunoprecipitation from nuclear cell extracts was carried out using the anti-EB1 Mab Z125, and the amount of coimmunoprecipitated Ubn-1 was evaluated by immunoblotting using Mab ZAP1. As shown in Fig. 4C, Ubn-1 was indeed coimmunoprecipitated together with EB1 from cotransfected HEK293_{EBV} cell extracts.

Taken together, these results indicate that Ubn-1 forms stable complexes with EB1 in cells and that when complexed with Ubn-1, EB1 is unable to interact with its target binding sites.

Ubinuclein knockdown boosts the production of viral particles. Overexpression of ubinuclein leads to a decrease in the

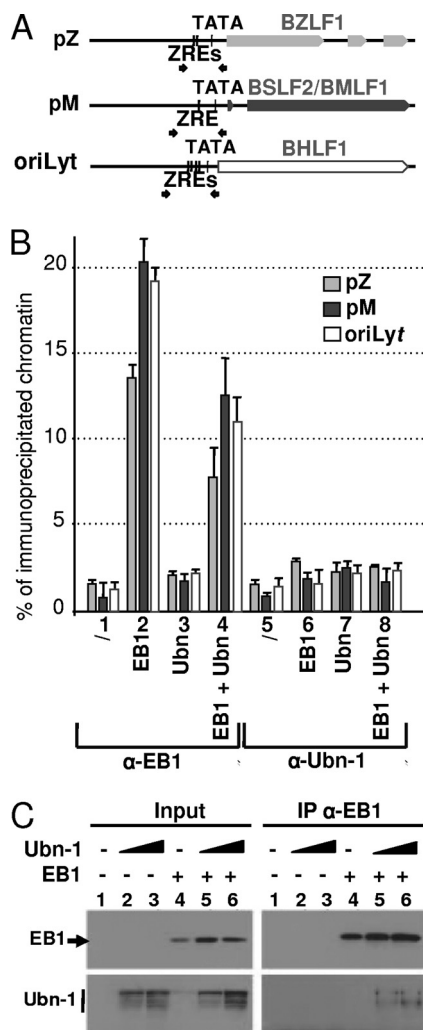


FIG. 4. Ubinuclein overexpression inhibits EB1-DNA interaction. (A) Schematic representation of the BZLF1 and BSLF2/BMLF1 promoters and those for the oriLyt region. TATA, TATA box; ZRE, EB1-responsive element. Small arrows indicate the positions of the primers used for the PCR. (B) HEK293_{EBV} cells that had been either not transfected (lanes 1 and 5), transfected with 0.5 μg of an EB1 expression plasmid (lanes 2 and 6) or 4 μg of a Ubn-1 expression plasmid (lanes 3 and 7), or cotransfected with expression plasmids for both EB1 (0.5 μg) and Ubn-1 (4 μg) (lanes 4 and 8) were fixed with paraformaldehyde. The chromatin was then immunoprecipitated using either Z125 MAb directed against EB1 (lanes 1 to 4) or Zap-1 MAB directed against Ubn-1 (lanes 5 to 8). Immunoprecipitated DNA was then quantified by PCR using specific primers located on the pM or pZ promoter or on the oriLyt region. The results are given as the percentage of coimmunoprecipitated DNA relative to the amount of input DNA. The results obtained for the pZ promoter are shown in light gray, those for the pM promoter in dark gray, and those for the oriLyt region in white. (C) Coimmunoprecipitation of Ubn-1 and EB1 in HEK293_{EBV} cells. HEK293_{EBV} cells were transfected with 0.5 μg of EB1 expression plasmids or 2 and 4 μg of Ubn-1 expression plasmid as indicated in the figure. EB1 was immunoprecipitated using MAb Z125 and protein A magnetic beads (Millipore), and the immunoprecipitated proteins were analyzed by immunoblotting using either MAb Z125 or MAb ZAP1 to reveal the presence of EB1 or Ubn-1, respectively (right panels). The total amount of each protein present in the extract prior to immunoprecipitation was evaluated by analysis of aliquots (1/10 for EB1 and 1/50 for Ubn-1) of cell extracts by immunoblotting as shown in the left panels.

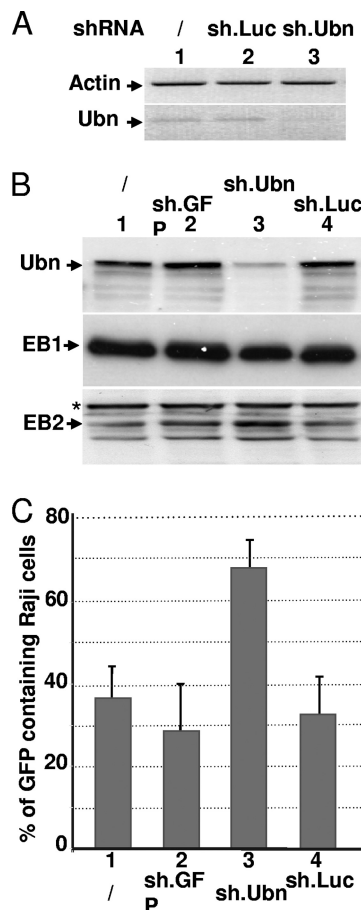


FIG. 5. Ubinuclein knockdown allows an increased production of virions. HEK293_{EBV} cells were infected with lentiviruses coding for an Ubn-1-specific shRNA (sh.Ubn) or an unspecific shRNA, either sh.GFP or sh.Luc, and then transfected with an expression plasmid for EB1. The relative levels of both Ubn-1 mRNA and the actin control mRNA were measured by RT-PCR (A), and the relative amounts of Ubn-1, EB1, and BMLF1 proteins were evaluated by immunoblotting using specific antibodies (B). Supernatants from HEK293_{EBV} cells infected with the shRNA-carrying lentiviruses and transfected by an EB1 expression vector were collected and used to infect Raji cells. The number of GFP-expressing Raji cells was determined by FACS analysis (C). The experiment was done 3 times, and the error bars represent standard deviations.

number of viral particles produced by HEK293_{EBV} cells. We then tested the consequence of Ubn-1 knockdown on the EBV productive cycle. For this, HEK293_{EBV} cells were infected with lentiviral particles allowing expression of Ubn-1-specific shRNA (sh.Ubn) or control shRNAs (sh.GFP and sh.Luc). As shown in Fig. 5A, at 8 days postinfection, the shRNA directed against Ubn-1 largely decreased Ubn-1 mRNA expression (Fig. 5A, lane 3) whereas the sh.Luc shRNA had no effect (Fig. 5A, lane 2). The level of Ubn-1 protein itself was also substantially decreased (Fig. 5B, lane 3). We then quantified the number of viral particles produced after induction of the EBV productive cycle by ectopic expression of EB1 in HEK293_{EBV} cells treated or not treated with the anti-Ubn-1 shRNA. Interestingly, the number of virions produced by the HEK293_{EBV} cells doubled when Ubn-1 expression was downregulated (Fig. 5C). We checked that this increase was not due to an unspecific

increase in the amount of ectopically EB1 protein expressed (Fig. 5B, middle panel). However, we observed an increase in the amount of the early BMLF1 protein, EB2, whose gene expression is known to be directly upregulated by EB1 (Fig. 5B, bottom panel), which correlates with the increase in viral production. From these results, we can conclude that the presence of endogenous Ubn-1 in the cells limits the efficiency of viral production.

Ubinuclein also interferes with AP1 trans-activation of various promoters. We had previously shown that Ubn-1 interacts with the basic domain of another b-ZIP protein, c-Jun, known to participate in AP1 complexes (2). Since Ubn-1 is a negative regulator of EB1-induced genes, we asked whether it could also interfere with c-Jun in the activation of reporter genes dependent upon AP1. In order to test this hypothesis, we transfected HeLa cells with luciferase reporter plasmids in which the luciferase gene was placed under the control of a minimal promoter (a TATA box), with or without the presence of upstream AP1-binding sites (Fig. 6A). The results presented in Fig. 6B show that Ubn-1 overexpression has only a weak effect on the minimal promoter construct (pTATA-Luc), which can be explained by the presence of an AP1-binding site further upstream in the plasmid sequence. However, when five AP1-binding sites were added immediately upstream of the minimal promoter (pTRE.TATA-Luc), the luciferase activity decreased substantially in the presence of overexpressed Ubn-1. In contrast, pTP1.Gal4, a construct containing the luciferase reporter gene under the control of an artificial promoter, which does not contain any AP1-binding sites, was unaffected by Ubn-1 overexpression. We then tested the effect of Ubn-1 overexpression on a selection of viral and cellular promoters, among which pIL6 and pIL10 are known to bear AP1-binding sites. HeLa cells were cotransfected with the different luciferase reporter constructs together with increasing amounts of Ubn-1 expression vector. Forty-eight hours after transfection, the luciferase activity was measured and the amount of Ubn-1 expressed in the cells was monitored by Western blotting. The results presented in Fig. 6C show that the level of luciferase expressed from promoters not regulated by AP1, like the EBV LMP1 or TP1 latent promoter or the herpes simplex virus type 1 (HSV-1) TK promoter, was not significantly affected by Ubn-1 overexpression (lanes 1 to 11). In contrast, transcription induced from two cellular promoters (interleukin 6 [IL-6] and IL-10), known to be activated by AP1, was decreased in a dose-dependent manner by overexpression of Ubn-1 (lanes 12 to 19). These results clearly show that the cellular protein c-Jun, like EB1, can be a target for Ubn-1.

Ubinuclein inhibits spontaneous reactivation of the EBV productive cycle in latently infected epithelial cells. We have shown above that the ubiquitously expressed cellular protein Ubn-1 is a potent inhibitor of the EBV productive cycle. Interestingly, we had previously demonstrated (3) that Ubn-1 has a different localization depending on the cell's proliferation or differentiation state (nuclear in proliferating or undifferentiated cells and localized in the tight junctions in confluent polarized or differentiated cells). In addition, it has been reported that *in vivo*, the EBV productive cycle takes place in differentiated epithelial cells (8, 39, 67). In such cells, Ubn-1 is localized exclusively in the tight junctions (2). We thus hypothesized that if Ubn-1 plays a role in the regulation of the EBV

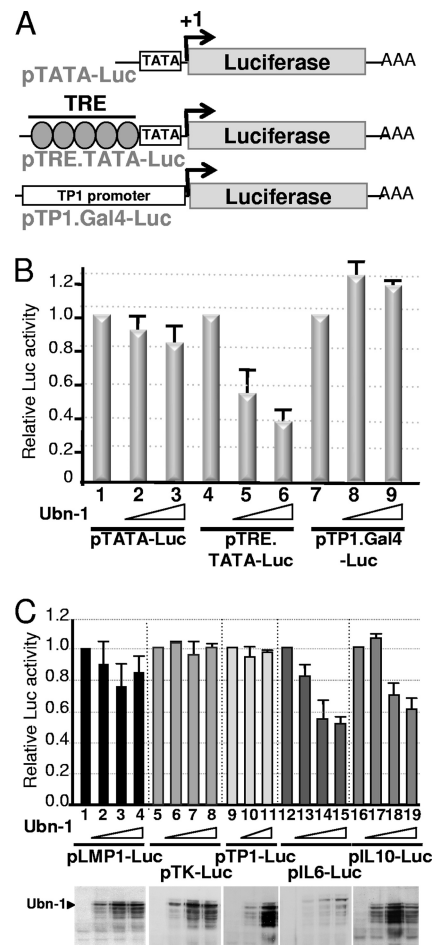


FIG. 6. Ubinuclein interferes with AP1 trans-activation. (A) Schematic representation of the luciferase reporter constructs. TATA, TATA box; AAA, poly(A) site; TRE, AP-1-responsive element; +1, transcription initiation site. (B) HeLa cells were transfected with the various reporter constructs represented in panel A, together with no or increasing amounts of Ubn-1 expression plasmid. The luciferase activities presented in the histogram are given as relative values, using the results for the assay performed in the absence of Ubn-1 as a reference. (C) HeLa cells were transfected with reporter constructs carrying the luciferase-coding sequence under the control of various viral and cellular promoters as indicated in the figure, together with no or increasing amounts of Ubn-1 expression plasmid. The luciferase activities presented in the histogram are given as relative values, using the results for the assay performed in the absence of Ubn-1 as a reference. (Lower panel) Representative immunoblots from transfected HeLa cell extracts incubated with MAb ZAP1. The experiments were done 4 times, and the error bars represent standard deviations.

productive cycle, EBV-infected epithelial cells should enter more efficiently into the productive cycle when they grow to confluence, because at this time, Ubn-1 will be sequestered outside the cell nucleus. To test this hypothesis, we used MDCK cells, a cell model which we have used previously to demonstrate the delocalization of Ubn-1 from the nucleus of the cells in sparse culture, to the tight junctions when cells become confluent (3). We thus infected MDCK cells with the EBV_{GFP} recombinant virus, and after selection of the infected cells, we analyzed by RT-PCR the expression of the BZLF1 immediate-early gene (encoding EB1) in cells collected at dif-

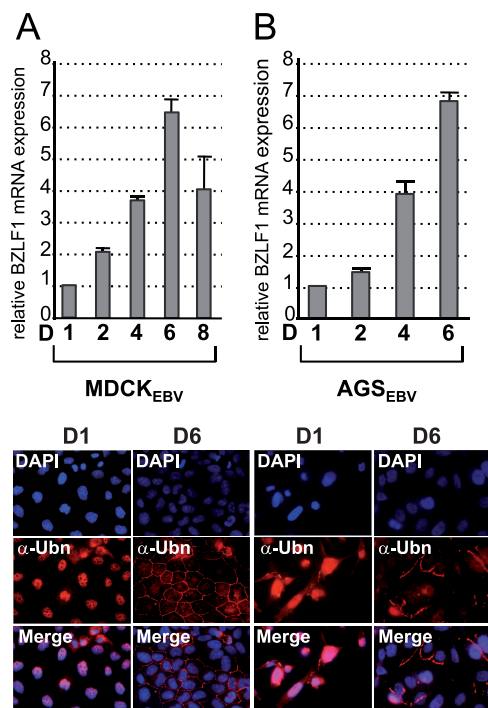


FIG. 7. Correlation between ubinuclein localization and activation of the EBV productive cycle. Nonconfluent MDCK_{EBV} cells (A) or AGS_{EBV} cells (B) were plated in petri dishes. Cells were collected at different time points (D, day), and expression of the BZLF1 gene was monitored by semiquantitative RT-PCR. The results are presented as the amount of [³²P]dCTP incorporation, relative to that obtained at day 1, which has been given an arbitrary value of 1. The experiments were done 4 times, and the error bars represent standard deviations. (Bottom panels) Localization of Ubn-1 was monitored by immunofluorescence staining at day 1 (nonconfluent cells) and day 6 (confluent cells). Cells were labeled using the anti-Ubn (α -Ubn) MAb ZAP1 (red); nuclei were visualized using DAPI (blue).

ferent stages of confluence. The same assay was also done with another EBV-positive epithelial cell line derived from a gastric carcinoma, the AGS_{EBV} cell line (22). It should be noted that MDCK_{EBV} cells are not able to support a complete EBV productive cycle, because the BALF5 gene, encoding the EBV DNA polymerase, is not expressed in these cells after reactivation of the viral productive cycle (data not shown). We then purified the total mRNA and analyzed the expression level of the BZLF1 mRNA by semiquantitative PCR at different time points after plating the cells. The results are presented in Fig. 7A. When MDCK_{EBV} cells were plated at low density, a low but constitutive level of expression of the BZLF1 mRNA was clearly detected. This basic level of BZLF1 mRNA was given an arbitrary value of 1. Interestingly, when the cells grew to confluence, expression of the BZLF1 mRNA increased significantly until day 6 (Fig. 7A, lanes 2 to 6). This increase correlated with a relocalization of Ubn-1 to the tight junctions (Fig. 7A, bottom panels, compare lanes D6 to lanes D1). At day 8, however, the expression level of BZLF1 mRNA decreased, probably because of the drastic reduction of cell proliferation and cell death at high density. In contrast to the MDCK_{EBV} cells, the AGS_{EBV} cells stably infected with the EBV B95-8 strain support lytic infection (37). In these cells, as in the

MDCK_{EBV} cells, BZLF1 mRNA expression is clearly detected when cells are plated at low density (Fig. 7B, lane 1), and again, when the cell culture grew to reach confluence, the expression level of BZLF1 mRNA increased dramatically (Fig. 7B, lanes 2 to 6). We have also looked by RT-PCR at the expression of another lytic gene, the BMRF1 gene, and found that its expression level also increased along with that of the BZLF1 mRNA (data not shown). At day 6, when the amount of BZLF1 mRNA was largest, Ubn-1 was found to be totally relocalized to the tight junctions (Fig. 7, bottom panels). After day 6, likely because the AGS_{EBV} cells are actively producing virions, most of the cells lysed and the culture died.

Taken together, these results demonstrate the existence of a tight correlation between cell density, Ubn-1 localization, and BZLF1 expression in EBV-infected epithelial cells.

DISCUSSION

Ubn-1, first described as a nuclear protein, is now classified in the NACos (nuclear adhesion complexes) protein family (3) since Ubn-1 is localized in the nuclei of proliferating cells but sequestered to the tight junctions of nonproliferating cells. Characterized for its capacity to interact *in vitro* with the basic domains of both cellular (c-Jun and C/EBP) and viral (EB1 from EBV) members of the basic leucine zipper family of proteins, Ubn-1 has been shown to interfere *in vitro* with their DNA-binding function. In the present study, we demonstrate that Ubn-1 is able to modulate the EBV productive cycle *in vivo*. When overexpressed in HEK293_{EBV} cells, Ubn-1 inhibits binding of EB1 to its target promoters, thereby reducing both expression of the EBV early genes and EBV DNA replication during the viral productive cycle. Consequently, Ubn-1's overexpression lowers the production of viral particles. In contrast, when Ubn-1 expression is downregulated by shRNA, viral particle production increases. Interestingly, in epithelial cells latently infected by EBV, the amount of EBV immediate-early-gene expression increases with the level of confluence of the cell culture, suggesting that in subconfluent cells, EB1 produced at a low level is inactive because of the presence of Ubn-1 in the cell nuclei. However, when cells become confluent and Ubn-1 is relocalized from the nucleus to the tight junctions, EB1 is free to activate its target promoters as well as its own promoter.

Epithelial cell proliferation and differentiation are regulated by cell-to-cell interaction. Apical cell-cell junctions participate in these processes by using different types of shuttling proteins, such as the NACos, which exhibit both nuclear and junctional localization. Tight junctions are an example of such cell-cell junctions, and several signaling complexes have been identified to associate with them (43). In general, expression of NACos in tight junctions suppresses proliferation and allows differentiation in a coordinated manner with adherent junctions and extracellular matrix adhesion. When localized in the nucleus, some of these tight junction components have been shown to affect different signaling and transcriptional pathways (6, 42). Ubn-1 function is not as yet well characterized. However, three recent reports show that Ubn-1 forms a complex with the histone chaperone protein HIRA (5, 7, 56). In addition, Banumathy et al. have shown that Ubn-1 is a regulator of cell senescence in fibroblasts (7). Taken together, these observa-

tions argue in favor of a role for Ubn-1 in the regulation of gene expression linked to cell proliferation such as that described for ZONA/B (38). In this work, we have shown that Ubn-1 is indeed able to control expression of various viral and cellular genes. However, as shown by chromatin immunoprecipitation, Ubn-1 does not appear to directly interact with the promoters of early EBV genes. Rather, Ubn-1 interacts directly and specifically with the DNA-binding domain of transcription factors such as c-Jun or EB1. This interaction inhibits the binding of these factors to their target recognition sequences *in vitro* (2) and *in vivo* (this report). Hence, Ubn-1 could be a negative regulator of gene expression via its interaction with DNA-binding factors, but it could also be implicated in chromatin remodeling via its interaction with the histone chaperone HIRA.

We have shown that Ubn-1 not only alters gene expression induced by the viral transcription factor EB1 but also controls AP1-induced gene expression. Interestingly, many genes under the control of the AP1 complex have been implicated in cell differentiation and proliferation (51). This is reminiscent of the observation that another NACos protein, ZO2 (zonula occludens 2), is able to relocalize c-Jun to the tight junctions and in this way controls expression of some of c-Jun's target genes (9, 36).

Ubn-1 is a potent inhibitor of EB1's and AP1's function. *In vitro* experiments using electrophoretic mobility shift assays and *in vivo* observation by chromatin immunoprecipitation suggest that this inhibition is due to an interaction between Ubn-1 and EB1 that results in the loss of EB1 DNA-binding activity, without the need for Ubn-1 to bind DNA. Hence, in the nucleus, Ubn-1, similarly to the retinoic acid receptor (RAR) (53, 54, 66), could modulate reactivation of latent EBV infection by a direct protein-protein interaction not only with EB1 but also with c-Jun or other cellular proteins of the b-ZIP family. Several reports have shown that AP1 complexes or C/EBP is implicated in the regulation of BZLF1 expression (34, 55, 65). Since some of these proteins can interact with Ubn-1, which is able to repress their DNA-binding activity (2), we speculate that in EBV-infected cells, endogenous Ubn-1 might also regulate induction of BZLF1 expression. In this way, Ubn-1 could be a negative regulator of the EBV productive cycle both by inhibiting BZLF1 expression induced by AP1 complexes and by interfering with transcriptional activation of early-gene expression by EB1. However, it is important to note that activation of the EBV productive cycle is not dependent just on absence of Ubn-1 from the cell nucleus. In effect, it has been shown that the switch between latent and productive EBV infection in B cells is mediated by the cellular transcription factor XBP-1, which plays an essential role in cell differentiation (10). Ubn-1 may participate in the maintenance of the EBV latent cycle, but removing Ubn-1 is certainly not sufficient for reactivation. EBV reactivation requires cell differentiation and transcriptional activation of the BZLF1 and BRLF1 promoters by XBP-1 in B cells or a yet unknown factor in epithelial cells.

In addition, it is now well established that the EBV productive cycle takes place in differentiated cells (39), and it has been suggested from studies made with biopsy specimens from oral hairy leukoplakia, an AIDS-associated lesion characterized by high-level EBV replication in the tongue, that BZLF1 expres-

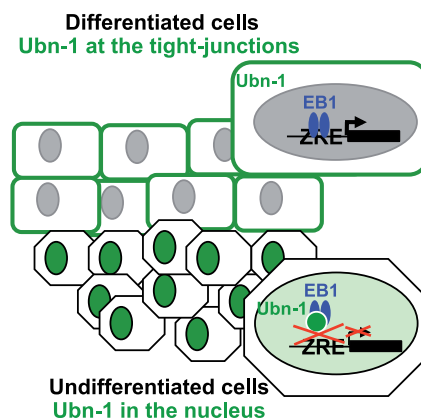


FIG. 8. Model of control of the EBV productive cycle in epithelial cells. In undifferentiated cells, ubinuclein localized in the cell nucleus controls reactivation of the EBV productive cycle by inhibiting both AP1- and EB1-mediated gene expression, whereas in differentiated cells, ubinuclein is sequestered to the tight junctions so that EB1 is free to activate the productive cycle. ZRE, EB1-responsive elements.

sion could be regulated by the degree of epithelial cell differentiation (8, 67). Interestingly, we show here that spontaneous expression of the EBV BZLF1 gene is also regulated by cell culture confluence conditions, in accordance with Ubn-1 localization. Together with our previous demonstration that Ubn-1 is sequestered to the tight junctions in differentiated cells (3), these observations led us to propose a model in which Ubn-1 controls the EBV productive cycle according to the differentiation status of epithelial cells (Fig. 8). In undifferentiated cells from the basal epithelium, Ubn-1 is nuclear and is free to interact with c-Jun and with the small amount of EB1 that is expressed. By interacting with the DNA-binding domains of both c-Jun and EB1, Ubn-1 can inhibit the association of these proteins with DNA and repress activation of the productive cycle. In differentiated cells of the squamous epithelium, however, Ubn-1 is sequestered to the tight junctions and BZLF1 expression is activated by a yet-unknown mechanism probably linked to the differentiation of the cells. In the absence of Ubn-1, EB1 would then be free to activate its target genes, allowing completion of a full productive cycle. Ubn-1 should thus be considered an important modulator of the EBV productive cycle in epithelial cells.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank W. Hammerschmidt for the gift of the HEK293_{EBV} cells, S. Kenney for the AGS_{EBV} cells, and M. Castellazzi for the pTATA-Luc and pTRE-TATA-Luc constructs. PLATIM, FACS, and the lentivirus vector production facilities of IFR 128 are also acknowledged. We thank R. Buckland for editing the manuscript prior to submission.

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Association pour la Recherche contre le Cancer (grant numbers 4914 and 3420), the Ligue Régionale Contre le Cancer (Comité du Rhône) (grant number 05.10.23), the Agence Nationale pour la Recherche (grant numbers RPV06120CSA and RPV09056CSA), the Pôle de Compétitivité Lyon-Biopôle, and the Réseau INSERM Herpesvirus et Cancer. E.M. is a CNRS scientist.

REFERENCES

1. Adamson, A. L., D. Darr, E. Holley-Guthrie, R. A. Johnson, A. Mauser, J. Swenson, and S. Kenney. 2000. Epstein-Barr virus immediate-early proteins BZLF1 and BRLF1 activate the ATF2 transcription factor by increasing the

- levels of phosphorylated p38 and c-Jun N-terminal kinases. *J. Virol.* **74**:1224–1233.
2. **Aho, S., M. Buisson, T. Pajunen, Y. W. Ryoo, J. F. Giot, H. Gruffat, A. Sergeant, and J. Uitto.** 2000. Ubinuclein, a novel nuclear protein interacting with cellular and viral transcription factors. *J. Cell Biol.* **148**:1165–1176.
 3. **Aho, S., J. Lupo, P. A. Coly, A. Sabine, M. Castellazzi, P. Morand, A. Sergeant, E. Manet, V. Boyer, and H. Gruffat.** 2009. Characterization of the ubinuclein protein as a new member of the nuclear and adhesion complex components (NACos). *Biol. Cell* **101**:319–334.
 4. **Babcock, G. J., L. L. Decker, M. Volk, and D. A. Thorley-Lawson.** 1998. EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* **9**:395–404.
 5. **Balaji, S., L. M. Iyer, and L. Aravind.** 2009. HPC2 and ubinuclein define a novel family of histone chaperones conserved throughout eukaryotes. *Mol. Biosyst.* **5**:269–275.
 6. **Balda, M. S., and K. Matter.** 2009. Tight junctions and the regulation of gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**:761–767.
 7. **Banumathy, G., N. Somaiah, R. Zhang, Y. Tang, J. Hoffmann, M. Andrade, H. Ceulemans, D. Schultz, R. Marmorstein, and P. D. Adams.** 2009. Human UBN1 is an ortholog of yeast Hpc2p and has an essential role in the HIRA/ASF1a chromatin-remodeling pathway in senescent cells. *Mol. Cell. Biol.* **29**:758–770.
 8. **Becker, J., U. Leser, M. Marschall, A. Langford, W. Jilg, H. Gelderblom, P. Reichart, and H. Wolf.** 1991. Expression of proteins encoded by Epstein-Barr virus trans-activator genes depends on the differentiation of epithelial cells in oral hairy leukoplakia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**:8332–8336.
 9. **Betanzos, A., M. Huerta, E. Lopez-Bayghen, E. Azuara, J. Amerena, and L. Gonzalez-Mariscal.** 2004. The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Exp. Cell Res.* **292**:51–66.
 10. **Bhende, P. M., S. J. Dickerson, X. Sun, W. H. Feng, and S. C. Kenney.** 2007. X-box-binding protein 1 activates lytic Epstein-Barr virus gene expression in combination with protein kinase D. *J. Virol.* **81**:7363–7370.
 11. **Bhende, P. M., W. T. Seaman, H. J. Delecluse, and S. C. Kenney.** 2004. The EBV lytic switch protein, Z, preferentially binds to and activates the methylated viral genome. *Nat. Genet.* **36**:1099–1104.
 12. **Chang, Y.-N., D. L.-Y. Dong, G. S. Hayward, and D. Hayward.** 1990. The Epstein-Barr virus Zta transactivator: a member of the bZIP family with unique DNA-binding specificity and a dimerization domain that lacks the characteristic heptad leucine zipper motif. *J. Virol.* **64**:3358–3369.
 13. **Chevallier-Greco, A., H. Gruffat, E. Manet, A. Calender, and A. Sergeant.** 1989. The Epstein-Barr virus (EBV) DR enhancer contains two functionally different domains: domain A is constitutive and cell specific, domain B is transactivated by the EBV early protein R. *J. Virol.* **63**:615–623.
 14. **Chevallier-Greco, A., E. Manet, P. Chavrier, C. Mosnier, J. Daillie, and A. Sergeant.** 1986. Both Epstein-Barr virus (EBV) encoded trans-acting factors, EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter. *EMBO J.* **5**:3243–3249.
 15. **Countryman, J., and G. Miller.** 1985. Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**:4085–4089.
 16. **Crawford, D. H., and I. Ando.** 1986. EB virus induction is associated with B-cell maturation. *Immunology* **59**:405–409.
 17. **Delecluse, H. J., T. Hilsendegen, D. Pich, R. Zeidler, and W. Hammerschmidt.** 1998. Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**:8245–8250.
 18. **Dickerson, S. J., Y. Xing, A. R. Robinson, W. T. Seaman, H. Gruffat, and S. C. Kenney.** 2009. Methylation-dependent binding of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein to viral promoters. *PLoS Pathog.* **5**:e1000356.
 19. **Dignam, J. D., R. M. Lebovitz, and R. G. Roeder.** 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* **11**:1475–1489.
 20. **Fahmi, H., C. Cochet, Z. Hmama, P. Opolon, and I. Joab.** 2000. Transforming growth factor beta 1 stimulates expression of the Epstein-Barr virus BZLF1 immediate-early gene product ZEBRA by an indirect mechanism which requires the MAPK kinase pathway. *J. Virol.* **74**:5810–5818.
 21. **Farrell, P. J., D. T. Rowe, C. M. Rooney, and T. Kouzarides.** 1989. Epstein-Barr virus BZLF1 trans-activator specifically binds to a consensus AP-1 site and is related to c-fos. *EMBO J.* **8**:127–132.
 22. **Feng, W. H., R. J. Kraus, S. J. Dickerson, H. J. Lim, R. J. Jones, X. Yu, J. E. Mertz, and S. C. Kenney.** 2007. ZEB1 and c-Jun levels contribute to the establishment of highly lytic Epstein-Barr virus infection in gastric AGS cells. *J. Virol.* **81**:10113–10122.
 23. **Grogan, E., H. Jensen, J. Countryman, L. Heston, L. Gradoville, and G. Miller.** 1987. Transfection of a rearranged viral DNA fragment, WZhet, stably converts latent Epstein-Barr viral infection to productive infection in lymphoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**:1332–1336.
 24. **Gruffat, H., J. Batisse, D. Pich, B. Neuhiel, E. Manet, W. Hammerschmidt, and A. Sergeant.** 2002. Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 is essential for production of infectious virus. *J. Virol.* **76**:9635–9644.
 25. **Gruffat, H., E. Manet, A. Rigolet, and A. Sergeant.** 1990. The enhancer factor R of Epstein-Barr virus (EBV) is a sequence-specific DNA binding protein. *Nucleic Acids Res.* **18**:6835–6843.
 26. **Gruffat, H., E. Manet, and A. Sergeant.** 2002. MEF2-mediated recruitment of class II HDAC at the EBV immediate early gene BZLF1 links latency and chromatin remodeling. *EMBO Rep.* **3**:141–146.
 27. **Gruffat, H., and A. Sergeant.** 1994. Characterization of the DNA-binding site repertoire for the Epstein-Barr virus transcription factor R. *Nucleic Acids Res.* **22**:1172–1178.
 28. **Hadinoto, V., M. Shapiro, C. C. Sun, and D. A. Thorley-Lawson.** 2009. The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLoS Pathog.* **5**:e1000496.
 29. **Hardwick, J. M., P. M. Lieberman, and S. D. Hayward.** 1988. A new Epstein-Barr virus transactivator, R, induces expression of a cytoplasmic early antigen. *J. Virol.* **62**:2274–2284.
 30. **Henle, W.** 1972. Role of Epstein-Barr virus in infectious mononucleosis and malignant lymphomas in man. *Fed. Proc.* **31**:1674.
 31. **Hiriart, E., G. Farjot, H. Gruffat, M. V. Nguyen, A. Sergeant, and E. Manet.** 2003. A novel nuclear export signal and a REF interaction domain both promote mRNA export by the Epstein-Barr virus EB2 protein. *J. Biol. Chem.* **278**:335–342.
 32. **Hochberg, D., J. M. Middeldorp, M. Catalina, J. L. Sullivan, K. Luzziariaga, and D. A. Thorley-Lawson.** 2004. Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:239–244.
 33. **Hong, G. K., M. L. Gulley, W. H. Feng, H. J. Delecluse, E. Holley-Guthrie, and S. C. Kenney.** 2005. Epstein-Barr virus lytic infection contributes to lymphoproliferative disease in a SCID mouse model. *J. Virol.* **79**:13993–14003.
 34. **Huang, J., G. Liao, H. Chen, F. Y. Wu, L. Hutt-Fletcher, G. S. Hayward, and S. D. Hayward.** 2006. Contribution of C/EBP proteins to Epstein-Barr virus lytic gene expression and replication in epithelial cells. *J. Virol.* **80**:1098–1109.
 35. **Israel, B. F., and S. C. Kenney.** 2005. EBV lytic infection. *Robertson ES*, Philadelphia, PA.
 36. **Jaramillo, B. E., A. Ponce, J. Moreno, A. Betanzos, M. Huerta, E. Lopez-Bayghen, and L. Gonzalez-Mariscal.** 2004. Characterization of the tight junction protein ZO-2 localized at the nucleus of epithelial cells. *Exp. Cell Res.* **297**:247–258.
 37. **Jones, R. J., S. J. Dickerson, P. M. Bhende, H. J. Delecluse, and S. C. Kenney.** 2007. Epstein-Barr virus lytic infection induces retinoic acid-responsive genes through induction of a retinol-metabolizing enzyme, DHRS9. *J. Biol. Chem.* **282**:8317–8324.
 38. **Kavanagh, E., M. Buchert, A. Tsapara, A. Choquet, M. S. Balda, F. Hollande, and K. Matter.** 2006. Functional interaction between the ZO-1-interacting transcription factor ZONAB/DbpA and the RNA processing factor symplekin. *J. Cell Sci.* **119**:5098–5105.
 39. **Laichalk, L. L., and D. A. Thorley-Lawson.** 2005. Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J. Virol.* **79**:1296–1307.
 40. **Mahot, S., A. Sergeant, E. Drouet, and H. Gruffat.** 2003. A novel function for the Epstein-Barr virus transcription factor EB1/Zta: induction of transcription of the hIL-10 gene. *J. Gen. Virol.* **84**:965–974.
 41. **Manet, E., C. Allera, H. Gruffat, I. Mikaelian, A. Rigolet, and A. Sergeant.** 1993. The acidic activation domain of the Epstein-Barr virus transcription factor R interacts in vitro with both TBP and TFIIB and is cell-specifically potentiated by a proline-rich region. *Gene Expr.* **3**:49–59.
 42. **Matter, K., and M. S. Balda.** 2007. Epithelial tight junctions, gene expression and nucleo-junctional interplay. *J. Cell Sci.* **120**:1505–1511.
 43. **Matter, K., and M. S. Balda.** 2003. Signalling to and from tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**:225–236.
 44. **Mikaelian, I., E. Drouet, V. Marechal, G. Denoyel, J. C. Nicolas, and A. Sergeant.** 1993. The DNA-binding domain of two bZIP transcription factors, the Epstein-Barr virus switch gene product EB1 and Jun, is a bipartite nuclear targeting sequence. *J. Virol.* **67**:734–742.
 45. **Neuhiel, B., R. Feederle, W. Hammerschmidt, and H. J. Delecluse.** 2002. Glycoprotein gp110 of Epstein-Barr virus determines viral tropism and efficiency of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**:15036–15041.
 46. **Niedobitek, G., A. Agathangelou, H. Herbst, L. Whitehead, D. H. Wright, and L. S. Young.** 1997. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J. Pathol.* **182**:151–159.
 47. **Niedobitek, G., A. Agathangelou, N. Steven, and L. S. Young.** 2000. Epstein-Barr virus (EBV) in infectious mononucleosis: detection of the virus in tonsillar B lymphocytes but not in desquamated oropharyngeal epithelial cells. *Mol. Pathol.* **53**:37–42.
 48. **Orlando, V., H. Strutt, and R. Paro.** 1997. Analysis of chromatin structure by in vivo formaldehyde cross-linking. *Methods* **11**:205–214.
 49. **Petosa, C., P. Morand, F. Baudin, M. Moulin, J. B. Artero, and C. W. Muller.** 2006. Structural basis of lytic cycle activation by the Epstein-Barr virus ZEBRA protein. *Mol. Cell* **21**:565–572.
 50. **Rickinson, A. B., J. E. Jarvis, D. H. Crawford, and M. A. Epstein.** 1974. Observations on the type of infection by Epstein-Barr virus in peripheral

- lymphoid cells of patients with infectious mononucleosis. *Int. J. Cancer*. **14**:704–715.
51. **Santaguida, M., K. Schepers, B. King, A. J. Sabnis, E. C. Forsberg, J. L. Attema, B. S. Braun, and E. Passegue.** 2009. JunB protects against myeloid malignancies by limiting hematopoietic stem cell proliferation and differentiation without affecting self-renewal. *Cancer Cell* **15**:341–352.
 52. **Schepers, A., D. Pich, J. Mankertz, and W. Hammerschmidt.** 1993. cis-acting elements in the lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* **67**:4237–4245.
 53. **Sista, N. D., C. Barry, K. Sampson, and J. Pagano.** 1995. Physical and functional interaction of the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator with the retinoic acid receptors RAR alpha and RXR alpha. *Nucleic Acids Res.* **23**:1729–1736.
 54. **Sista, N. D., J. S. Pagano, W. Liao, and S. Kenney.** 1993. Retinoic acid is a negative regulator of the Epstein-Barr virus protein (BZLF1) that mediates disruption of latent infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**:3894–3898.
 55. **Speck, S. H., T. Chatila, and E. Flemington.** 1997. Reactivation of the Epstein-Barr virus: regulation and function of the BZLF1 gene. *Trends Microbiol.* **5**:399–405.
 56. **Tagami, H., D. Ray-Gallet, G. Almouzni, and Y. Nakatani.** 2004. Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* **116**:51–61.
 57. **Takada, K., and Y. Ono.** 1989. Synchronous and sequential activation of latently infected Epstein-Barr virus genomes. *J. Virol.* **63**:445–449.
 58. **Thompson, M. P., and R. Kurzrock.** 2004. Epstein-Barr virus and cancer. *Clin. Cancer Res.* **10**:803–821.
 59. **Thorley-Lawson, D. A.** 2001. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **1**:75–82.
 60. **Thorley-Lawson, D. A., and M. J. Allday.** 2008. The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**:913–924.
 61. **Thorley-Lawson, D. A., and A. Gross.** 2004. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N. Engl. J. Med.* **350**:1328–1337.
 62. **Urier, G., M. Buisson, P. Chambard, and A. Sergeant.** 1989. The Epstein-Barr virus early protein EB1 activates transcription from different responsive elements including AP-1 binding sites. *EMBO J.* **8**:1447–1453.
 63. **Waltzer, L., P. Y. Bourillot, A. Sergeant, and E. Manet.** 1995. RBP-J κ repression activity is mediated by a co-repressor and antagonized by the Epstein-Barr virus transcription factor EBNA2. *Nucleic Acids Res.* **23**:4939–4945.
 64. **Waltzer, L., M. Perricaudet, A. Sergeant, and E. Manet.** 1996. Epstein-Barr virus EBNA3A and EBNA3C proteins both repress RBP-J κ -EBNA2-activated transcription by inhibiting the binding of RBP-J κ to DNA. *J. Virol.* **70**:5909–5915.
 65. **Wu, F. Y., H. Chen, S. E. Wang, C. M. ApRhys, G. Liao, M. Fujimuro, C. J. Farrell, J. Huang, S. D. Hayward, and G. S. Hayward.** 2003. CCAAT/enhancer binding protein alpha interacts with ZTA and mediates ZTA-induced p21(CIP-1) accumulation and G(1) cell cycle arrest during the Epstein-Barr virus lytic cycle. *J. Virol.* **77**:1481–1500.
 66. **Yang-Yen, H. F., X. K. Zhang, G. Graupner, M. Tzukerman, B. Sakamoto, M. Karin, and M. Pfahl.** 1991. Antagonism between retinoic acid receptors and AP-1: implications for tumor promotion and inflammation. *New Biol.* **3**:1206–1219.
 67. **Young, L. S., R. Lau, M. Rowe, G. Niedobitek, G. Packham, F. Shanahan, D. T. Rowe, D. Greenspan, J. S. Greenspan, A. B. Rickinson, et al.** 1991. Differentiation-associated expression of the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator protein in oral hairy leukoplakia. *J. Virol.* **65**:2868–2874.
 68. **Zalani, S., E. Holley-Guthrie, and S. Kenney.** 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**:9194–9199.
 69. **Zhang, J. X., H. L. Chen, Y. S. Zong, K. H. Chan, J. Nicholls, J. M. Middeldorp, J. S. Sham, B. E. Griffin, and M. H. Ng.** 1998. Epstein-Barr virus expression within keratinizing nasopharyngeal carcinoma. *J. Med. Virol.* **55**:227–233.
 70. **Zur Hausen, H., F. J. O'Neil, U. K. Freese, and E. Hecker.** 1978. Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumor promoter TPA. *Nature* **27**:373–375.

DISCUSSION

L'ubinucléine a été identifiée initialement comme un partenaire cellulaire du facteur de transcription ZEBRA du virus d'Epstein-Barr (EBV) (Aho et al., 2000). En empêchant ZEBRA de se fixer à ses séquences d'ADN cibles, l'ubinucléine pourrait moduler l'activité de ZEBRA dont le rôle dans l'initiation du cycle lytique et la réplication virale est essentiel. Les fonctions de l'ubinucléine dans la cellule épithéliale sont inconnues. Notre travail a permis, d'abord, de mieux caractériser l'ubinucléine dans la cellule épithéliale en l'identifiant comme une nouvelle protéine des jonctions serrées. L'ubinucléine a été proposée comme un nouveau membre de la famille des protéines NACos (nuclear and adhesion complex components) qui possèdent une double localisation cellulaire, le noyau et les jonctions des cellules. Ensuite, afin de mieux comprendre son rôle dans la cellule épithéliale, nous avons adopté une stratégie protéomique par analyse en spectrométrie de masse pour identifier les protéines avec lesquelles elle pourrait interagir dans la cellule. La connaissance des partenaires cellulaires de l'ubinucléine est une voie pour initier de nouvelles expériences sur l'aspect fonctionnel de la protéine. Enfin, le rôle de l'ubinucléine dans la cellule épithéliale infectée par le virus EBV a été étudié et pourrait dépendre de sa localisation cellulaire. L'ubinucléine nucléaire régulerait négativement l'initiation du cycle lytique et la production des particules virales en empêchant ZEBRA de se fixer à ses promoteurs. Séquestrée dans les jonctions serrées, l'ubinucléine lèverait son inhibition sur ZEBRA permettant ainsi le bon déroulement du cycle lytique dans les cellules épithéliales.

Nous avons décrit une nouvelle localisation cellulaire pour l'ubinucléine, les jonctions serrées des cellules (Aho et al., 2009). Pour prouver que l'ubinucléine appartient véritablement au complexe des jonctions serrées, nous avons montré sa co-localisation avec des marqueurs des jonctions serrées tels que ZO-1, l'occludine et la claudine-1 et son interaction avec ZO-1 par des méthodes biochimiques classiques. Nos tentatives d'obtenir un marquage en microscopie électronique furent vaines mais les arguments biochimiques et de microscopie optique ont permis de valider l'ubinucléine comme une nouvelle protéine des jonctions serrées. Initialement décrite au niveau nucléaire, l'ubinucléine possède cette double localisation cellulaire caractéristique des protéines NACos (Aho et al., 2009). Comme décrit pour d'autres protéines NACos telles que ZO-1, ZO-2 ou ZONAB (Balda and Matter, 2000; Gottardi et al., 1996; Islas et al., 2002), la localisation cellulaire de l'ubinucléine varie suivant le degré de confluence des cellules en culture ou l'état de différenciation cellulaire.

L'ubiquitine est retrouvée au niveau des jonctions serrées dans les cellules à fort degré de confluence ainsi que dans les cellules les plus différenciées de l'épithélium. Comme la protéine NACos syntrophine (Keon et al., 1996), l'ubiquitine ne semble pas localisée au niveau des jonctions serrées des cellules endothéliales.

Les protéines NACos sont impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques telles que le contrôle de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération ou la différenciation cellulaires (Balda and Matter, 2008). Pour explorer les fonctions de l'ubiquitine dans la cellule épithéliale, nous avons tenté de rechercher ses partenaires cellulaires par une approche protéomique par analyse en spectrométrie de masse.

Pour identifier les partenaires de l'ubiquitine au niveau du complexe des jonctions serrées, nous avons choisi comme modèle d'étude la lignée HT29 d'adénocarcinome du colon dans laquelle le marquage de l'ubiquitine est localisé presque exclusivement au niveau des jonctions serrées des cellules. L'isolement et la purification des protéines du complexe des jonctions serrées des cellules est délicate en raison de la présence de protéines issues de différents compartiments : les jonctions serrées rassemblent des protéines membranaires, sous-membranaires et du cytosquelette. Nous avons adopté une stratégie semblable à celle décrite par Tang (Tang, 2006) qui débute par une lyse hypotonique à pH basique suivie d'un fractionnement subcellulaire par différentes étapes de centrifugation et d'ultracentrifugation. Afin d'identifier le maximum de protéines partenaires de l'ubiquitine, nous avons choisi de travailler sur 3 fractions générées au cours du protocole : deux fractions cytosoliques et une fraction appelée « MB » (membrane) similaire à une fraction microsomale (Cox and Emili, 2006). Une stratégie par GST-pulldown a été testée sur ces différents échantillons en utilisant la protéine recombinante GST-Ubn-1. Après des étapes de lavage, les protéines se liant à la GST-Ubn-1 ont été éluées, séparées en gel d'électrophorèse unidimensionnel puis identifiées par spectrométrie de masse en tandem. En parallèle, les différents échantillons ont été testés avec la protéine GST seule qui a servi de contrôle négatif. Une centaine de protéines non retrouvées dans le contrôle négatif ont été identifiées comme partenaires putatifs de l'ubiquitine et classées suivant leur fonction biologique ou leur localisation cellulaire. Parmi ces protéines, la moitié est représentée par des protéines ribosomales, ribonucléoprotéines et facteurs d'initiation de la transcription. Ces protéines, impliquées dans la machinerie cellulaire de base, sont fréquemment retrouvées en protéomique et sont considérées, en général, comme des contaminants des expériences (Trinkle-Mulcahy et al., 2008). Cependant, un lien entre ces protéines et l'ubiquitine n'est pas obligatoirement à exclure et pourrait être exploré en fonction de l'évolution de l'état de nos connaissances sur l'ubiquitine.

Parmi la liste de protéines identifiées spécifiquement avec la GST-Ubn-1, nous avons voulu vérifier l'interaction existant entre l'ubiquitine et les protéines LYRIC et RACK-1 en raison de la description dans la littérature de partenaires communs entre l'ubiquitine et ces protéines. En effet, la protéine LYRIC co-localise comme l'ubiquitine avec ZO-1 au niveau des jonctions serrées (Britt et al., 2004) et est retrouvée aussi au niveau des noyaux des cellules (Sutherland et al., 2004) suggérant son appartenance à la famille des protéines NACos. De même, la protéine RACK-1, ou récepteur de la protéine kinase C, interagit avec la protéine ZEBRA (Baumann et al., 2000) qui fut le premier partenaire identifié de l'ubiquitine (Aho et al., 2000). L'interaction de l'ubiquitine avec les protéines LYRIC et RACK-1 a été validée par co-immunoprécipitation et co-localisation des protéines par microscopie confocale. Le rôle fonctionnel de l'interaction entre l'ubiquitine et ces protéines reste à élucider. Les fonctions de la protéine LYRIC ne sont pas encore clairement établies mais cette protéine pourrait agir comme un oncogène et promouvoir la tumorigénèse en fonction de sa localisation cellulaire (Emdad et al., 2009; Emdad et al., 2006; Thirkettle et al., 2009a). La protéine nucléaire LYRIC interagit avec le facteur de transcription PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger) en l'empêchant de réprimer l'expression de gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire comme c-myc (Thirkettle et al., 2009b). Le rôle potentiel de l'ubiquitine dans la régulation de ces processus serait important à explorer. RACK-1 est une protéine chaperonne capable d'interagir avec de nombreuses molécules impliquées dans la transduction de signaux telles que des protéines kinases ou la protéine d'adhésion intégrine (McCahill et al., 2002). RACK-1 joue un rôle clé dans différents processus biologiques tels que l'établissement de l'adhésion cellulaire (Liliental and Chang, 1998), l'apoptose (Mamidipudi and Cartwright, 2009), le remodelage de la chromatine (He et al., 2010) ou la régulation de la traduction au niveau du ribosome (Nilsson et al., 2004). Dans les monocytes infectés par l'EBV, les fonctions activatrices de RACK-1 sur la protéine kinase C seraient inhibées en raison de son interaction avec ZEBRA, affectant ainsi l'activité phagocytaire des monocytes (Tardif et al., 2002). Comment l'ubiquitine pourrait interférer avec les fonctions de RACK-1 ou, inversement, comment RACK-1 pourrait agir sur les modifications post-traductionnelles de l'ubiquitine et sa localisation sont autant de voies intéressantes à examiner pour la suite de notre travail. De manière intéressante, parmi les partenaires putatifs de l'ubiquitine dont l'interaction n'a pas été vérifiée, nous avons retrouvé plusieurs protéines décrites dans la littérature comme étant des partenaires de RACK-1 tels que l'intégrine- β (Liliental and Chang, 1998), la spectrine (Rodriguez et al., 1999), le récepteur de l'inositol 1,4,5, triphosphate (ITPR3) (Bandyopadhyay et al., 2008) et

la vigiline (Baum et al., 2004). Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour vérifier si ces protéines interagissent de manière directe avec l'ubinucléine. Plusieurs protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire et l'organisation du cytosquelette comme l'intégrine (Harburger and Calderwood, 2009), la moésine (Mangeat et al., 1999), la spectrine (Bennett and Healy, 2009) et IQGAP1 (IQ motif containing GTPase activating protein 1) (Noritake et al., 2005) ont été identifiées et nécessitent d'être validées. L'interaction possible avec l'intégrine et la protéine chaperonne IQGAP1 pourrait suggérer un lien entre l'ubinucléine et les jonctions adhérentes comme il a déjà été décrit pour d'autres protéines des jonctions serrées (Mandell et al., 2005; Yamada et al., 2006). Nos résultats ont aussi mis en évidence des protéines intervenant dans la maturation de l'ARN et la régulation de la traduction. De manière intéressante, une autre protéine des jonctions serrées, la sympléchine a été décrite comme associée au transcriptosome et participant à la maturation de l'ARN (Hofmann et al., 2002; Takagaki and Manley, 2000). Enfin, l'ubinucléine pourrait interagir avec d'autres facteurs de transcription que ceux déjà décrit (Aho et al., 2000), en particulier les facteurs YB-1/DbpB (Y box factor 1/DNA binding protein B) et PA2G4 (Prolifération-associated protein 2G4). Notons que ZO-1 interagit avec le facteur de transcription ZONAB/DbpA qui appartient à la même famille qu'YB-1, et régule son activité en influençant sa localisation cellulaire (Balda and Matter, 2000). Sous réserve de validation de ces interactions, l'ubinucléine pourrait, à l'image de ZO-1, moduler l'activité de facteurs de transcription tels que YB-1 et PA2G4 qui sont impliqués dans la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaires (Jurchott et al., 2003; Xia et al., 2001; Yoo et al., 2000).

Nous avons adopté d'autres stratégies pour identifier les partenaires de l'ubinucléine dans la cellule épithéliale, en particulier celles utilisant l'immunoprécipitation d'ubinucléine. Les partenaires nucléaires de l'ubinucléine ont été recherchés dans le modèle cellulaire HEK 293 dans lequel l'ubinucléine surexprimée est localisée uniquement au niveau des noyaux des cellules. Les protéines co-immunoprécipitant avec l'ubinucléine ont été identifiées par spectrométrie de masse. Nos résultats ont révélé la présence spécifique, comparativement au contrôle négatif, de nombreuses protéines histones associées à l'ubinucléine. Même si ces interactions doivent encore être vérifiées dans nos expériences, des arguments parus récemment dans la littérature nous permettent de valider la pertinence de ces résultats. En effet, l'ubinucléine a été décrite en complexe avec le variant d'histone H3.3 et la protéine chaperonne Hira (histone cell cycle regulation defective homologue A) (Tagami et al., 2004). L'ubinucléine agirait comme une protéine chaperonne des histones et participerait à la formation de régions spécialisées de l'hétérochromatine inactive (Balaji et al., 2009;

Banumathy et al., 2009). Nos expériences menées à partir de la GST-Ubn-1 nous ont aussi permis d'identifier des protéines histones et des protéines associées à l'hétérochromatine telles que la vigilline et HP1B3 (heterochromatin protein 1 binding protein 3). Enfin, une autre protéine NACos, HuAsH1, a aussi été décrite dans la littérature comme impliquée dans le remodelage de la chromatine (Beisel et al., 2002). Tous ces éléments suggèrent donc un lien entre l'ubinucléine et la régulation épigénétique de l'expression des gènes. Récemment, Banumathy et al (2009) ont suggéré que l'ubinucléine pourrait être associée à la répression de la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire.

L'analyse protéomique couplée à la spectrométrie de masse est une méthode performante pour identifier de nouveaux complexes protéiques mais cette stratégie comprend des limites dans le cadre de l'étude de l'interactome d'une protéine. Chaque interaction identifiée en spectrométrie de masse doit être vérifiée par une autre technique afin d'éliminer tout résultat faussement positif. La spécificité des résultats peut être améliorée par l'utilisation de contrôle négatif ou en jouant sur la composition des tampons de lavage. Dans nos expériences, nous avons choisi de ne pas tenir compte des protéines qui étaient identifiées à la fois dans notre préparation d'intérêt et le contrôle négatif. De même, nous avons utilisé des tampons de lavage permettant le meilleur compromis entre la réduction du nombre d'interactions non spécifiques et le maintien des interactions spécifiques. Les interactions identifiées dans une expérience ne peuvent, en pratique, que difficilement être toutes vérifiées. Dans ce contexte, de récentes études ont montré l'apport de la spectrométrie de masse quantitative pour cibler au mieux les partenaires véritables d'une protéine d'intérêt (Oeljeklaus et al., 2009; Vermeulen et al., 2008). En dehors du problème de spécificité, l'utilisation de la spectrométrie de masse dans le cadre d'une étude interactomique nécessite d'optimiser les étapes de biochimie en amont pour s'assurer d'une bonne sensibilité des résultats. En effet, des étapes de fractionnement et d'enrichissement du matériel de départ sont souvent nécessaires afin d'éliminer une partie des protéines les plus abondantes susceptibles de masquer la détection des partenaires recherchés. Malgré ces précautions, notre stratégie de GST-pulldown couplée à la spectrométrie de masse n'a pas permis d'identifier ZO-1 comme partenaire de l'ubinucléine. De même, la cinguline dont l'interaction et la co-localisation avec l'ubinucléine a été confirmée, n'a pas non plus été identifiée en spectrométrie de masse. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer la non détection de ces protéines lors de ces expériences. Les conditions biochimiques de lyse et de fractionnement pourraient ne pas être optimales pour enrichir au mieux l'échantillon en ces protéines rattachées au cytosquelette (Wang et al., 2010). De même, la production de la GST-Ubn-1 en bactéries ne permet pas le

repliement adéquat de la protéine ni même l'obtention de modifications post-traductionnelles sur sa séquence. L'utilisation de la GST-Ubn-1 comme appât ne permet donc pas de détecter les partenaires dont l'interaction avec l'ubiquitine dépendrait de la présence de modifications post-traductionnelles ou d'un repliement spécifique de la protéine. Nous avons aussi mené des expériences en immunoprécipitant l'ubiquitine surexprimée ou endogène et en recherchant les protéines co-immunoprécipitant avec l'ubiquitine par spectrométrie de masse. Malgré de multiples tentatives, l'ubiquitine endogène n'a jamais pu être identifiée par spectrométrie de masse bien qu'elle fût détectée dans l'échantillon par Western-blot avant l'analyse. La non détection de l'ubiquitine endogène est vraisemblablement liée à un manque d'efficacité d'immunoprécipitation de notre anticorps monoclonal anti-Ubn-1 qui n'a pas permis d'enrichir suffisamment l'échantillon en notre protéine d'intérêt.

Une partie de nos objectifs était de mieux comprendre les fonctions de l'ubiquitine dans la cellule épithéliale non infectée par l'EBV. Récemment, les travaux d'une équipe américaine ont décrit l'ubiquitine nucléaire des cellules fibroblastiques comme une protéine chaperonne des histones intervenant dans le remodelage de la chromatine et la régulation épigénétique de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Banumathy et al., 2009). L'ubiquitine a été associée avec la protéine Hira à des régions spécialisées de l'hétérochromatine facultative appelée SAHF (senescence-associated heterochromatin foci) suggérant un rôle de l'ubiquitine dans la régulation de la sénescence cellulaire (Banumathy et al., 2009). Cette étude récente corrobore nos résultats obtenus sur les partenaires nucléaires de l'ubiquitine. Les expériences menées sur les autres compartiments cellulaires ont permis d'identifier d'autres partenaires tels que RACK-1 et LYRIC : l'importance fonctionnelle de ces interactions doit maintenant être explorée mais l'ensemble de nos résultats suggère un rôle de l'ubiquitine dans les phénomènes d'adhésion et de prolifération cellulaires ainsi que la régulation de l'expression des gènes.

En collaboration avec l'équipe dirigée par le Dr Evelyne Manet (INSERM U758, ENS-Lyon), nous avons exploré les conséquences fonctionnelles de l'interaction entre l'ubiquitine et le facteur de transcription viral ZEBRA dans les cellules épithéliales infectées

par l'EBV. Nos résultats ont montré que l'ubinucléine interfère *in vivo* avec le cycle productif de l'EBV et les fonctions transactivatrices de ZEBRA. Depuis que l'ubinucléine a été impliquée dans le remodelage de la chromatine et la répression de gènes (Banumathy et al., 2009), nous avons suggéré que cette protéine pourrait réguler la transcription des gènes ciblés par ZEBRA par ce même mécanisme épigénétique. Dans des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine, nous n'avons pu mettre en évidence l'ubinucléine au niveau des promoteurs précoces ciblés par ZEBRA. Notre hypothèse est que l'ubinucléine formerait *in vivo* un complexe stable avec ZEBRA l'empêchant d'interagir avec ses séquences d'ADN cibles mais l'implication de l'ubinucléine dans la régulation épigénétique de certains gènes viraux ne peut être exclue. Notre travail a montré que l'ubinucléine peut aussi moduler l'activité de facteurs cellulaires du complexe AP-1 tel que c-jun. Ces facteurs cellulaires sont, par ailleurs, impliqués directement dans l'activation du promoteur de ZEBRA (Speck et al., 1997). L'ubinucléine peut donc inhiber les fonctions de ZEBRA de manière directe ou de manière indirecte en se liant avec certains facteurs cellulaires du complexe AP-1. D'autres protéines cellulaires ont été décrites comme pouvant inhiber les fonctions de ZEBRA (Gutsch et al., 1994; Sista et al., 1995; Sista et al., 1993; Zhang et al., 1994). Comme l'ubinucléine, le récepteur de l'acide rétinoïque (RAR) se fixe à ZEBRA en inhibant son activité transactivatrice et est aussi capable d'interagir avec des protéines du complexe AP-1 (Yang-Yen et al., 1991).

Notre travail a permis de proposer un modèle dans lequel l'ubinucléine régulerait le cycle lytique de l'EBV en fonction de sa localisation dans la cellule. *In vivo*, le cycle lytique de l'EBV se déroule dans les plasmocytes et les cellules épithéliales différenciées de l'oropharynx (Laichalk and Thorley-Lawson, 2005; Young et al., 1991). Nous avons décrit que l'ubinucléine était nucléaire dans les cellules indifférenciées et localisée au niveau des jonctions serrées des cellules différenciées des épithéliums (Aho et al., 2009). Dans nos lignées cellulaires infectées par l'EBV, à faible confluence, la présence de l'ubinucléine au niveau nucléaire est associée à une faible expression de ZEBRA et de la protéine précoce BMRF1. A l'inverse, à confluence cellulaire, l'ubinucléine est relocalisée au niveau des jonctions serrées levant ainsi son inhibition sur ZEBRA dont l'expression est augmentée avec BMRF1. Dans un épithélium infecté par l'EBV, l'ubinucléine nucléaire des couches basales indifférenciées réprimerait le cycle lytique de l'EBV par son interaction avec des facteurs cellulaires tels que c-jun et le peu de ZEBRA exprimé. Au niveau des cellules différenciées et des couches les plus superficielles de l'épithélium, l'ubinucléine séquestrée au niveau des jonctions serrées ne pourrait inhiber ZEBRA devenue libre d'activer ses promoteurs cibles et

d'assurer le bon déroulement du cycle lytique. Fait intéressant, la protéine NACos ZO-2 interagit aussi, comme l'ubiquitine, avec des facteurs cellulaires de la famille bZIP tel que c-jun en inhibant leur activité au niveau nucléaire. ZO-2 pourrait aussi réguler leur fonction en les séquestrant au niveau des jonctions serrées (Betanzos et al., 2004). L'ubiquitine pourrait, à l'image de ZO-2, réguler les fonctions de ZEBRA en la séquestrant en dehors du noyau ce qui n'a pas pu être mis en évidence dans nos expériences.

CONCLUSION-PERSPECTIVES

En conclusion, nos travaux ont permis de caractériser l'ubinucléine comme une nouvelle protéine NACos des jonctions serrées des cellules épithéliales. Comme d'autres protéines appartenant à cette famille, l'ubinucléine pourrait jouer un rôle au niveau de la régulation du cycle cellulaire par différents mécanismes tels que, par exemple, la régulation épigénétique de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire ou l'interférence avec l'activité de certains facteurs du complexe AP-1 (Shaulian and Karin, 2002). Nous avons identifié par spectrométrie de masse RACK-1 et LYRIC comme partenaires de l'ubinucléine. Même si l'aspect fonctionnel de ces interactions n'a pu encore être exploré, l'ubinucléine pourrait aussi être impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire par son interaction avec ces protéines. Dans les cellules épithéliales infectées par l'EBV, nous avons montré que l'ubinucléine régule négativement le cycle lytique en inhibant les fonctions de ZEBRA (EB1). Suivant l'état de prolifération et de différenciation cellulaires, l'ubinucléine régulerait, en fonction de sa localisation cellulaire, l'activation du cycle lytique par ZEBRA (voir modèle d'épithélium oropharyngé infecté par l'EBV en **Figure 23**).

Le mode de régulation de la localisation de l'ubinucléine dans la cellule reste à déterminer. Nos résultats complémentaires ont montré que l'ubinucléine forme un complexe ternaire avec ZEBRA et la protéine 14.3.3 ϵ , chaperonne moléculaire capable de réguler la localisation cellulaire de nombreuses protéines (Dougherty and Morrison, 2004). Nos expériences récentes menées avec des inhibiteurs de PKA (protéine kinase A) suggèrent que l'ubinucléine phosphorylée pourrait jouer son rôle inhibiteur sur les fonctions de ZEBRA tout en étant séquestrée dans le noyau par la protéine 14.3.3 ϵ . La déphosphorylation de l'ubinucléine entraînerait sa relocalisation dans les jonctions serrées et la levée d'inhibition sur ZEBRA.

De nombreux partenaires putatifs de l'ubinucléine ont été identifiés et demandent maintenant à être validés. La connaissance de ces protéines est source d'informations importantes pour comprendre le rôle de l'ubinucléine et initier de nouvelles expériences sur l'aspect fonctionnel de cette protéine.

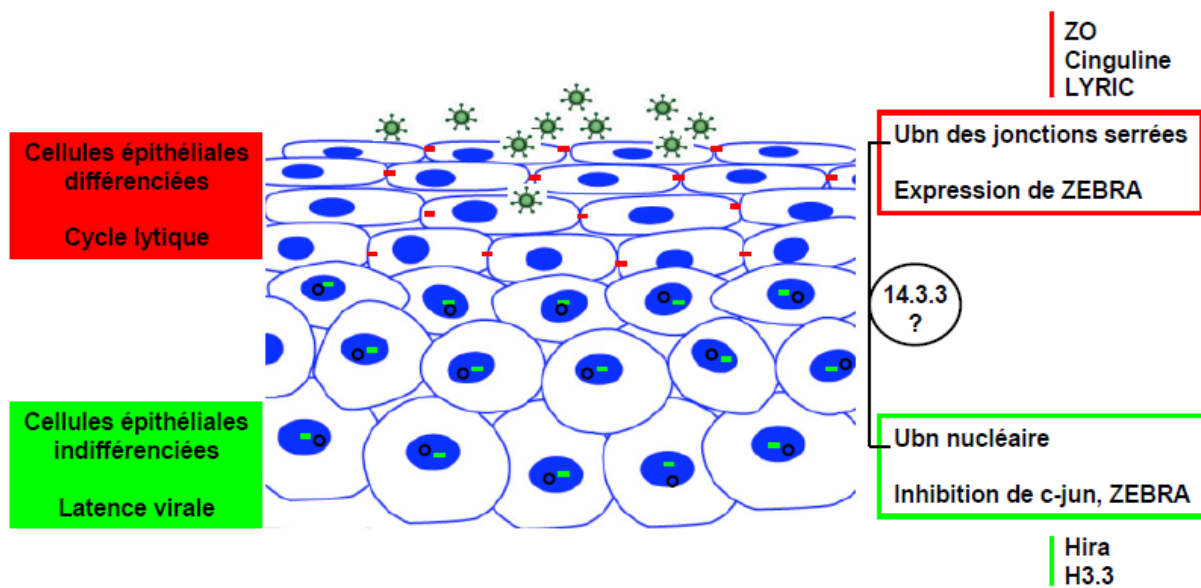


Figure 23: Modèle d'épithélium oropharyngé infecté par l'EBV : rôle hypothétique de l'ubinucléine et de ses partenaires. Dans les cellules épithéliales indifférenciées, l'ubinucléine nucléaire inhibe le cycle lytique par son interaction avec ZEBRA faiblement exprimée ou en interférant avec l'activité de protéines du complexe Ap-1 (c-jun) capables de se fixer sur le promoteur de ZEBRA. Au niveau nucléaire, l'ubinucléine agit aussi comme une protéine chaperonne des histones et interagit avec Hira et H3.3. Au niveau des cellules les plus différenciées et superficielles de l'épithélium, l'ubinucléine est localisée au niveau des jonctions serrées où elle interagit avec les protéines ZO et cinguline. L'inhibition sur ZEBRA étant alors levée, le cycle lytique de l'EBV peut s'accomplir avec relargage de virions néosynthétisés dans la salive de l'hôte infecté. La régulation de la localisation cellulaire de l'ubinucléine est encore à élucider mais pourrait impliquer la protéine chaperonne 14.3.3. L'ubinucléine est représentée par un trait vert au niveau du noyau et par un trait rouge au niveau des jonctions serrées. Le génome épisomal de l'EBV est représenté par un cercle noir. Schéma inspiré de Tugizov et al., 2007 et Gruffat et al., 2010.

REFERENCES

- Adamson, A.L., Darr, D., Holley-Guthrie, E., Johnson, R.A., Mauser, A., Swenson, J. and Kenney, S. (2000) Epstein-Barr virus immediate-early proteins BZLF1 and BRLF1 activate the ATF2 transcription factor by increasing the levels of phosphorylated p38 and c-Jun N-terminal kinases. *J Virol*, **74**, 1224-1233.
- Adamson, A.L. and Kenney, S. (1999) The Epstein-Barr virus BZLF1 protein interacts physically and functionally with the histone acetylase CREB-binding protein. *J Virol*, **73**, 6551-6558.
- Adamson, A.L. and Kenney, S. (2001) Epstein-barr virus immediate-early protein BZLF1 is SUMO-1 modified and disrupts promyelocytic leukemia bodies. *J Virol*, **75**, 2388-2399.
- Aho, S., Buisson, M., Pajunen, T., Ryoo, Y.W., Giot, J.F., Gruffat, H., Sergeant, A. and Uitto, J. (2000) Ubinuclein, a novel nuclear protein interacting with cellular and viral transcription factors. *J Cell Biol*, **148**, 1165-1176.
- Aho, S., Lupo, J., Coly, P.A., Sabine, A., Castellazzi, M., Morand, P., Sergeant, A., Manet, E., Boyer, V. and Gruffat, H. (2009) Characterization of the ubinuclein protein as a new member of the nuclear and adhesion complex components (NACos). *Biol Cell*, **101**, 319-334.
- 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.
- Anderson, J.M. and Van Itallie, C.M. (2009) Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **1**, a002584.
- Antar, A.A., Konopka, J.L., Campbell, J.A., Henry, R.A., Perdigoto, A.L., Carter, B.D., Pozzi, A., Abel, T.W. and Dermody, T.S. (2009) Junctional adhesion molecule-A is required for hematogenous dissemination of reovirus. *Cell Host Microbe*, **5**, 59-71.
- Bailey, S.G., Verrall, E., Schelcher, C., Rhie, A., Doherty, A.J. and Sinclair, A.J. (2009) Functional interaction between Epstein-Barr virus replication protein Zta and host DNA damage response protein 53BP1. *J Virol*, **83**, 11116-11122.
- Balaji, S., Iyer, L.M. and Aravind, L. (2009) HPC2 and ubinuclein define a novel family of histone chaperones conserved throughout eukaryotes. *Mol Biosyst*, **5**, 269-275.
- Balda, M.S., Anderson, J.M. and Matter, K. (1996a) The SH3 domain of the tight junction protein ZO-1 binds to a serine protein kinase that phosphorylates a region C-terminal to this domain. *FEBS Lett*, **399**, 326-332.
- Balda, M.S., Garrett, M.D. and Matter, K. (2003) The ZO-1-associated Y-box factor ZONAB regulates epithelial cell proliferation and cell density. *J Cell Biol*, **160**, 423-432.
- Balda, M.S. and Matter, K. (2000) The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. *Embo J*, **19**, 2024-2033.
- Balda, M.S. and Matter, K. (2003) Epithelial cell adhesion and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol*, **13**, 310-318.
- Balda, M.S. and Matter, K. (2008) Tight junctions and the regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta*, **11**, 11.
- Balda, M.S., Whitney, J.A., Flores, C., Gonzalez, S., Cereijido, M. and Matter, K. (1996b) Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol*, **134**, 1031-1049.
- Bandyopadhyay, B.C., Ong, H.L., Lockwich, T.P., Liu, X., Paria, B.C., Singh, B.B. and Ambudkar, I.S. (2008) TRPC3 controls agonist-stimulated intracellular Ca²⁺ release by mediating the interaction between inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and RACK1. *J Biol Chem*, **283**, 32821-32830.
- Banumathy, G., Somaiah, N., Zhang, R., Tang, Y., Hoffmann, J., Andrade, M., Ceulemans, H., Schultz, D., Marmorstein, R. and Adams, P.D. (2009) Human UBN1 is an ortholog of yeast Hpc2p and has an essential role in the HIRA/ASF1a chromatin-remodeling pathway in senescent cells. *Mol Cell Biol*, **29**, 758-770.

- Barton, E.S., Forrest, J.C., Connolly, J.L., Chappell, J.D., Liu, Y., Schnell, F.J., Nusrat, A., Parkos, C.A. and Dermody, T.S. (2001) Junction adhesion molecule is a receptor for reovirus. *Cell*, **104**, 441-451.
- Baum, S., Bittins, M., Frey, S. and Seedorf, M. (2004) Asc1p, a WD40-domain containing adaptor protein, is required for the interaction of the RNA-binding protein Scp160p with polysomes. *Biochem J*, **380**, 823-830.
- Baumann, M., Gires, O., Kolch, W., Mischak, H., Zeidler, R., Pich, D. and Hammerschmidt, W. (2000) The PKC targeting protein RACK1 interacts with the Epstein-Barr virus activator protein BZLF1. *Eur J Biochem*, **267**, 3891-3901.
- Beau, I., Cotte-Laffitte, J., Amsellem, R. and Servin, A.L. (2007) A protein kinase A-dependent mechanism by which rotavirus affects the distribution and mRNA level of the functional tight junction-associated protein, occludin, in human differentiated intestinal Caco-2 cells. *J Virol*, **81**, 8579-8586.
- Beisel, C., Imhof, A., Greene, J., Kremmer, E. and Sauer, F. (2002) Histone methylation by the *Drosophila* epigenetic transcriptional regulator Ash1. *Nature*, **419**, 857-862.
- Bennett, V. and Healy, J. (2009) Membrane domains based on ankyrin and spectrin associated with cell-cell interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **1**, a003012.
- Bergelson, J.M. (2009) Intercellular junctional proteins as receptors and barriers to virus infection and spread. *Cell Host Microbe*, **5**, 517-521.
- Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., Droguett, G., Kurt-Jones, E.A., Krithivas, A., Hong, J.S., Horwitz, M.S., Crowell, R.L. and Finberg, R.W. (1997) Isolation of a common receptor for Cocksackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, **275**, 1320-1323.
- Bergelson, J.M., Mohanty, J.G., Crowell, R.L., St John, N.F., Lublin, D.M. and Finberg, R.W. (1995) Cocksackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55). *J Virol*, **69**, 1903-1906.
- Bernardi, R. and Pandolfi, P.P. (2007) Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 1006-1016.
- Bernardo, M.V., Yelo, E., Gimeno, L., Campillo, J.A. and Parrado, A. (2007) Identification of apoptosis-related PLZF target genes. *Biochem Biophys Res Commun*, **359**, 317-322.
- Betanzos, A., Huerta, M., Lopez-Bayghen, E., Azuara, E., Amerena, J. and Gonzalez-Mariscal, L. (2004) The tight junction protein ZO-2 associates with Jun, Fos and C/EBP transcription factors in epithelial cells. *Exp Cell Res*, **292**, 51-66.
- Bhende, P.M., Seaman, W.T., Delecluse, H.J. and Kenney, S.C. (2004) The EBV lytic switch protein, Z, preferentially binds to and activates the methylated viral genome. *Nat Genet*, **36**, 1099-1104.
- Bhende, P.M., Seaman, W.T., Delecluse, H.J. and Kenney, S.C. (2005) BZLF1 activation of the methylated form of the BRLF1 immediate-early promoter is regulated by BZLF1 residue 186. *J Virol*, **79**, 7338-7348.
- Boettner, B., Govek, E.E., Cross, J. and Van Aelst, L. (2000) The junctional multidomain protein AF-6 is a binding partner of the Rap1A GTPase and associates with the actin cytoskeletal regulator profilin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9064-9069.
- Bornkamm, G.W., Behrends, U. and Mautner, J. (2006) The infectious kiss: newly infected B cells deliver Epstein-Barr virus to epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 7201-7202.
- Bornkamm, G.W., Hudewentz, J., Freese, U.K. and Zimmer, U. (1982) Deletion of the nontransforming Epstein-Barr virus strain P3HR-1 causes fusion of the large internal repeat to the DSL region. *J Virol*, **43**, 952-968.
- Borza, C.M. and Hutt-Fletcher, L.M. (2002) Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med*, **8**, 594-599.
- Boss, I.W., Plaisance, K.B. and Renne, R. (2009) Role of virus-encoded microRNAs in herpesvirus biology. *Trends Microbiol*, **17**, 544-553.
- Britt, D.E., Yang, D.F., Yang, D.Q., Flanagan, D., Callanan, H., Lim, Y.P., Lin, S.H. and Hixson, D.C. (2004) Identification of a novel protein, LYRIC, localized to tight junctions of polarized epithelial cells. *Exp Cell Res*, **300**, 134-148.
- Buchert, M., Darido, C., Lagerqvist, E., Sedello, A., Cazevieille, C., Buchholz, F., Bourgaux, J.F., Pannequin, J., Joubert, D. and Hollande, F. (2009) The symplekin/ZONAB complex inhibits

- intestinal cell differentiation by the repression of AML1/Runx1. *Gastroenterology*, **137**, 156-164, 164 e151-153.
- Buchert, M., Papin, M., Bonnans, C., Darido, C., Raye, W.S., Garambois, V., Pelegrin, A., Bourgaux, J.F., Pannequin, J., Joubert, D. and Hollande, F. (2010) Symplekin promotes tumorigenicity by up-regulating claudin-2 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **107**, 2628-2633.
- Burkitt, D. (1962) A lymphoma syndrome in African children. *Ann R Coll Surg Engl*, **30**, 211-219.
- Busson, P., Keryer, C., Ooka, T. and Corbex, M. (2004) EBV-associated nasopharyngeal carcinomas: from epidemiology to virus-targeting strategies. *Trends Microbiol*, **12**, 356-360.
- Cayrol, C. and Flemington, E.K. (1995) Identification of cellular target genes of the Epstein-Barr virus transactivator Zta: activation of transforming growth factor beta igh3 (TGF-beta igh3) and TGF-beta 1. *J Virol*, **69**, 4206-4212.
- Cayrol, C. and Flemington, E.K. (1996) The Epstein-Barr virus bZIP transcription factor Zta causes G0/G1 cell cycle arrest through induction of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Embo J*, **15**, 2748-2759.
- Chang, C.M., Yu, K.J., Mbulaiteye, S.M., Hildesheim, A. and Bhatia, K. (2009a) The extent of genetic diversity of Epstein-Barr virus and its geographic and disease patterns: a need for reappraisal. *Virus Res*, **143**, 209-221.
- Chang, F.R., Hsieh, Y.C., Chang, Y.F., Lee, K.H., Wu, Y.C. and Chang, L.K. (2009b) Inhibition of the Epstein-Barr virus lytic cycle by moronic acid. *Antiviral Res*, **85**, 490-495.
- Chang, L.K., Chuang, J.Y., Nakao, M. and Liu, S.T. (2010) MCAF1 and synergistic activation of the transcription of Epstein-Barr virus lytic genes by Rta and Zta. *Nucleic Acids Res*, **2010**, 12.
- Chang, P.J., Chang, Y.S. and Liu, S.T. (1998) Role of Rta in the translation of bicistronic BZLF1 of Epstein-Barr virus. *J Virol*, **72**, 5128-5136.
- Chang, S.S., Lo, Y.C., Chua, H.H., Chiu, H.Y., Tsai, S.C., Chen, J.Y., Lo, K.W. and Tsai, C.H. (2008) Critical role of p53 in histone deacetylase inhibitor-induced Epstein-Barr virus Zta expression. *J Virol*, **82**, 7745-7751.
- 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**, 1371-1379.
- Chang, Y., Lee, H.H., Chen, Y.T., Lu, J., Wu, S.Y., Chen, C.W., Takada, K. and Tsai, C.H. (2006) Induction of the early growth response 1 gene by Epstein-Barr virus lytic transactivator Zta. *J Virol*, **80**, 7748-7755.
- Chang, Y.N., Dong, D.L., Hayward, G.S. and Hayward, S.D. (1990) The Epstein-Barr virus Zta transactivator: a member of the bZIP family with unique DNA-binding specificity and a dimerization domain that lacks the characteristic heptad leucine zipper motif. *J Virol*, **64**, 3358-3369.
- Chatila, T., Ho, N., Liu, P., Liu, S., Mosialos, G., Kieff, E. and Speck, S.H. (1997) The Epstein-Barr virus-induced Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase type IV/Gr promotes a Ca²⁺-dependent switch from latency to viral replication. *J Virol*, **71**, 6560-6567.
- Chen, C., Li, D. and Guo, N. (2009) Regulation of cellular and viral protein expression by the Epstein-Barr virus transcriptional regulator Zta: implications for therapy of EBV associated tumors. *Cancer Biol Ther*, **8**, 987-995.
- Chen, X., Farmer, G., Zhu, H., Prywes, R. and Prives, C. (1993) Cooperative DNA binding of p53 with TFIID (TBP): a possible mechanism for transcriptional activation. *Genes Dev*, **7**, 1837-1849.
- Cheng, Y.C., Huang, E.S., Lin, J.C., Mar, E.C., Pagano, J.S., Dutschman, G.E. and Grill, S.P. (1983) Unique spectrum of activity of 9-[(1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl]-guanine against herpesviruses in vitro and its mode of action against herpes simplex virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 2767-2770.
- Chevallier-Greco, A., Manet, E., Chavrier, P., Mosnier, C., Daillie, J. and Sergeant, A. (1986) Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors, EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter. *Embo J*, **5**, 3243-3249.
- Chia, M.C., Leung, A., Krushel, T., Alajez, N.M., Lo, K.W., Busson, P., Klamut, H.J., Bastianutto, C. and Liu, F.F. (2008) Nuclear factor-Y and Epstein Barr virus in nasopharyngeal cancer. *Clin Cancer Res*, **14**, 984-994.

- Chiba, H., Osanai, M., Murata, M., Kojima, T. and Sawada, N. (2008) Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim Biophys Acta*, **1778**, 588-600.
- Choy, E.Y., Siu, K.L., Kok, K.H., Lung, R.W., Tsang, C.M., To, K.F., Kwong, D.L., Tsao, S.W. and Jin, D.Y. (2008) An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. *J Exp Med*, **205**, 2551-2560.
- Cochet, C., Martel-Renoir, D., Grunewald, V., Bosq, J., Cochet, G., Schwaab, G., Bernaudin, J.F. and Joab, I. (1993) Expression of the Epstein-Barr virus immediate early gene, BZLF1, in nasopharyngeal carcinoma tumor cells. *Virology*, **197**, 358-365.
- Cordenonsi, M., D'Atri, F., Hammar, E., Parry, D.A., Kendrick-Jones, J., Shore, D. and Citi, S. (1999) Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and myosin. *J Cell Biol*, **147**, 1569-1582.
- Countryman, J., Gradoville, L., Bhaduri-McIntosh, S., Ye, J., Heston, L., Himmelfarb, S., Shedd, D. and Miller, G. (2009) Stimulus duration and response time independently influence the kinetics of lytic cycle reactivation of Epstein-Barr virus. *J Virol*, **83**, 10694-10709.
- Countryman, J., Jenson, H., Seibl, R., Wolf, H. and Miller, G. (1987) Polymorphic proteins encoded within BZLF1 of defective and standard Epstein-Barr viruses disrupt latency. *J Virol*, **61**, 3672-3679.
- Countryman, J. and Miller, G. (1985) Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 4085-4089.
- Countryman, J.K., Gradoville, L. and Miller, G. (2008) Histone hyperacetylation occurs on promoters of lytic cycle regulatory genes in Epstein-Barr virus-infected cell lines which are refractory to disruption of latency by histone deacetylase inhibitors. *J Virol*, **82**, 4706-4719.
- Coussens, L.M., Fingleton, B. and Matrisian, L.M. (2002) Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*, **295**, 2387-2392.
- Cox, B. and Emili, A. (2006) Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics. *Nat Protoc*, **1**, 1872-1878.
- Coyne, C.B. and Bergelson, J.M. (2006) Virus-induced Abl and Fyn kinase signals permit coxsackievirus entry through epithelial tight junctions. *Cell*, **124**, 119-131.
- Coyne, C.B., Shen, L., Turner, J.R. and Bergelson, J.M. (2007) Coxsackievirus entry across epithelial tight junctions requires occludin and the small GTPases Rab34 and Rab5. *Cell Host Microbe*, **2**, 181-192.
- Daibata, M., Bandobashi, K., Kuroda, M., Imai, S., Miyoshi, I. and Taguchi, H. (2005) Induction of lytic Epstein-Barr virus (EBV) infection by synergistic action of rituximab and dexamethasone renders EBV-positive lymphoma cells more susceptible to ganciclovir cytotoxicity in vitro and in vivo. *J Virol*, **79**, 5875-5879.
- Dardari, R., Khyatti, M., Benider, A., Jouhadi, H., Kahlain, A., Cochet, C., Mansouri, A., El Gueddari, B., Benslimane, A. and Joab, I. (2000) Antibodies to the Epstein-Barr virus transactivator protein (ZEBRA) as a valuable biomarker in young patients with nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*, **86**, 71-75.
- 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.
- Datta, A.K., Colby, B.M., Shaw, J.E. and Pagano, J.S. (1980) Acyclovir inhibition of Epstein-Barr virus replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**, 5163-5166.
- de-The, G., Geser, A., Day, N.E., Tukei, P.M., Williams, E.H., Beri, D.P., Smith, P.G., Dean, A.G., Bronkamm, G.W., Feorino, P. and Henle, W. (1978) Epidemiological evidence for causal relationship between Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma from Ugandan prospective study. *Nature*, **274**, 756-761.
- Deryugina, E.I. and Quigley, J.P. (2006) Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, **25**, 9-34.
- 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.

- Doetzlhofer, A., Rotheneder, H., Lagger, G., Koranda, M., Kurtev, V., Brosch, G., Wintersberger, E. and Seiser, C. (1999) Histone deacetylase 1 can repress transcription by binding to Sp1. *Mol Cell Biol*, **19**, 5504-5511.
- Dougherty, M.K. and Morrison, D.K. (2004) Unlocking the code of 14-3-3. *J Cell Sci*, **117**, 1875-1884.
- Drouet, E., Brousset, P., Fares, F., Icart, J., Verniol, C., Meggetto, F., Schlaifer, D., Desmorat-Coat, H., Rigal-Huguet, F., Niveleau, A. and Delsol, G. (1999) High Epstein-Barr virus serum load and elevated titers of anti-ZEBRA antibodies in patients with EBV-harboring tumor cells of Hodgkin's disease. *J Med Virol*, **57**, 383-389.
- Ebnet, K., Aurrand-Lions, M., Kuhn, A., Kiefer, F., Butz, S., Zander, K., Meyer zu Brickwedde, M.K., Suzuki, A., Imhof, B.A. and Vestweber, D. (2003) The junctional adhesion molecule (JAM) family members JAM-2 and JAM-3 associate with the cell polarity protein PAR-3: a possible role for JAMs in endothelial cell polarity. *J Cell Sci*, **116**, 3879-3891.
- Ebnet, K., Suzuki, A., Horikoshi, Y., Hirose, T., Meyer Zu Brickwedde, M.K., Ohno, S. and Vestweber, D. (2001) The cell polarity protein ASIP/PAR-3 directly associates with junctional adhesion molecule (JAM). *Embo J*, **20**, 3738-3748.
- Ebnet, K., Suzuki, A., Ohno, S. and Vestweber, D. (2004) Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci*, **117**, 19-29.
- Ellis, A.L., Wang, Z., Yu, X. and Mertz, J.E. (2010) Either ZEB1 or ZEB2/SIP1 Can Play a Central Role in Regulating the Epstein-Barr Virus Latent-Lytic Switch in a Cell-Type-Specific Manner. *J Virol*, **84**, 6139-6152.
- Emdad, L., Lee, S.G., Su, Z.Z., Jeon, H.Y., Boukerche, H., Sarkar, D. and Fisher, P.B. (2009) Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) functions as an oncogene and regulates angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 21300-21305.
- Emdad, L., Sarkar, D., Su, Z.Z., Randolph, A., Boukerche, H., Valerie, K. and Fisher, P.B. (2006) Activation of the nuclear factor kappaB pathway by astrocyte elevated gene-1: implications for tumor progression and metastasis. *Cancer Res*, **66**, 1509-1516.
- Epstein, M.A. (2001) Historical background. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **356**, 413-420.
- Epstein, M.A., Achong, B.G. and Barr, Y.M. (1964) Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet*, **1**, 702-703.
- Etournay, R., Zwaenepoel, I., Perfettini, I., Legrain, P., Petit, C. and El-Amraoui, A. (2007) Shroom2, a myosin-VIIa- and actin-binding protein, directly interacts with ZO-1 at tight junctions. *J Cell Sci*, **120**, 2838-2850.
- Evans, M.J., von Hahn, T., Tscherne, D.M., Syder, A.J., Panis, M., Wolk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J.A., Bieniasz, P.D. and Rice, C.M. (2007) Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, **446**, 801-805.
- Fafi-Kremer, S., Morand, P., Brion, J.P., Pavese, P., Baccard, M., Germi, R., Genoulaz, O., Nicod, S., Jolivet, M., Ruigrok, R.W., Stahl, J.P. and Seigneurin, J.M. (2005) Long-term shedding of infectious Epstein-Barr virus after infectious mononucleosis. *J Infect Dis*, **191**, 985-989.
- Fahmi, H., Cochet, C., Hmama, Z., Opolon, P. and Joab, I. (2000) Transforming growth factor beta 1 stimulates expression of the Epstein-Barr virus BZLF1 immediate-early gene product ZEBRA by an indirect mechanism which requires the MAPK kinase pathway. *J Virol*, **74**, 5810-5818.
- 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**, 2016-2025.
- Fanning, A.S., Jameson, B.J., Jesaitis, L.A. and Anderson, J.M. (1998) The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem*, **273**, 29745-29753.
- Fanning, A.S., Little, B.P., Rahner, C., Utepbergenov, D., Walther, Z. and Anderson, J.M. (2007) The unique-5 and -6 motifs of ZO-1 regulate tight junction strand localization and scaffolding properties. *Mol Biol Cell*, **18**, 721-731.
- Farquhar, M.G. and Palade, G.E. (1963) Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol*, **17**, 375-412.

- Farrell, P.J., Rowe, D.T., Rooney, C.M. and Kouzarides, T. (1989) Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator specifically binds to a consensus AP-1 site and is related to c-fos. *Embo J*, **8**, 127-132.
- Feederle, R., Kost, M., Baumann, M., Janz, A., Drouet, E., Hammerschmidt, W. and Delecluse, H.J. (2000) The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators. *Embo J*, **19**, 3080-3089.
- Feng, W.H., Hong, G., Delecluse, H.J. and Kenney, S.C. (2004) Lytic induction therapy for Epstein-Barr virus-positive B-cell lymphomas. *J Virol*, **78**, 1893-1902.
- Feng, W.H., Israel, B., Raab-Traub, N., Busson, P. and Kenney, S.C. (2002a) Chemotherapy induces lytic EBV replication and confers ganciclovir susceptibility to EBV-positive epithelial cell tumors. *Cancer Res*, **62**, 1920-1926.
- Feng, W.H., Kraus, R.J., Dickerson, S.J., Lim, H.J., Jones, R.J., Yu, X., Mertz, J.E. and Kenney, S.C. (2007) ZEB1 and c-Jun levels contribute to the establishment of highly lytic Epstein-Barr virus infection in gastric AGS cells. *J Virol*, **81**, 10113-10122.
- Feng, W.H., Westphal, E., Mauser, A., Raab-Traub, N., Gulley, M.L., Busson, P. and Kenney, S.C. (2002b) Use of adenovirus vectors expressing Epstein-Barr virus (EBV) immediate-early protein BZLF1 or BRLF1 to treat EBV-positive tumors. *J Virol*, **76**, 10951-10959.
- Flower, K., Hellen, E., Newport, M.J., Jones, S. and Sinclair, A.J. (2010) Evaluation of a prediction protocol to identify potential targets of epigenetic reprogramming by the cancer associated Epstein Barr virus. *PLoS One*, **5**, e9443.
- Fofana, I., Krieger, S.E., Grunert, F., Glauben, S., Xiao, F., Fafi-Kremer, S., Soulier, E., Royer, C., Thumann, C., Mee, C.J., McKeating, J.A., Dragic, T., Pessaux, P., Stoll-Keller, F., Schuster, C., Thompson, J. and Baumert, T.F. (2010) Monoclonal anti-claudin 1 antibodies prevent hepatitis C virus infection of primary human hepatocytes. *Gastroenterology*, **139**, 953-964, 964 e951-954.
- Forster, C. (2008) Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem Cell Biol*, **130**, 55-70.
- Francis, A., Ragozy, T., Gradoville, L., Heston, L., El-Guindy, A., Endo, Y. and Miller, G. (1999) Amino acid substitutions reveal distinct functions of serine 186 of the ZEBRA protein in activation of early lytic cycle genes and synergy with the Epstein-Barr virus R transactivator. *J Virol*, **73**, 4543-4551.
- Frankel, P., Aronheim, A., Kavanagh, E., Balda, M.S., Matter, K., Bunney, T.D. and Marshall, C.J. (2005) RalA interacts with ZONAB in a cell density-dependent manner and regulates its transcriptional activity. *Embo J*, **24**, 54-62.
- 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**, 2894-2900.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S. and Tsukita, S. (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*, **123**, 1777-1788.
- Furuse, M. and Tsukita, S. (2006) Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol*, **16**, 181-188.
- Gershburg, E. and Pagano, J.S. (2005) Epstein-Barr virus infections: prospects for treatment. *J Antimicrob Chemother*, **56**, 277-281.
- Giot, J.F., Mikaelian, I., Buisson, M., Manet, E., Joab, I., Nicolas, J.C. and Sergeant, A. (1991) Transcriptional interference between the EBV transcription factors EB1 and R: both DNA-binding and activation domains of EB1 are required. *Nucleic Acids Res*, **19**, 1251-1258.
- Glaunsinger, B.A., Lee, S.S., Thomas, M., Banks, L. and Javier, R. (2000) Interactions of the PDZ-protein MAGI-1 with adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus E6 oncoproteins. *Oncogene*, **19**, 5270-5280.
- Glaunsinger, B.A., Weiss, R.S., Lee, S.S. and Javier, R. (2001) Link of the unique oncogenic properties of adenovirus type 9 E4-ORF1 to a select interaction with the candidate tumor suppressor protein ZO-2. *Embo J*, **20**, 5578-5586.

- Gliki, G., Ebnet, K., Aurrand-Lions, M., Imhof, B.A. and Adams, R.H. (2004) Spermatid differentiation requires the assembly of a cell polarity complex downstream of junctional adhesion molecule-C. *Nature*, **431**, 320-324.
- Glover, J.N. and Harrison, S.C. (1995) Crystal structure of the heterodimeric bZIP transcription factor c-Fos-c-Jun bound to DNA. *Nature*, **373**, 257-261.
- Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A. and Avila-Flores, A. (2000) MAGUK proteins: structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol*, **11**, 315-324.
- Gonzalez-Mariscal, L., Lechuga, S. and Garay, E. (2007) Role of tight junctions in cell proliferation and cancer. *Prog Histochem Cytochem*, **42**, 1-57.
- Gonzalez-Mariscal, L., Ponce, A., Alarcon, L. and Jaramillo, B.E. (2006) The tight junction protein ZO-2 has several functional nuclear export signals. *Exp Cell Res*, **312**, 3323-3335.
- Gonzalez-Mariscal, L., Tapia, R. and Chamorro, D. (2008) Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta*, **1778**, 729-756.
- Gottardi, C.J., Arpin, M., Fanning, A.S. and Louvard, D. (1996) The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10779-10784.
- Grogan, E., Jenson, H., Countryman, J., Heston, L., Gradoville, L. and Miller, G. (1987) Transfection of a rearranged viral DNA fragment, WZhet, stably converts latent Epstein-Barr viral infection to productive infection in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 1332-1336.
- Gruffat, H., Lupo, J., Morand, P., Boyer, V. and Manet, E. (2010) The NACos protein, ubinuclein, negatively regulates the Epstein-Barr Virus productive cycle in epithelial cells. *J Virol* accepted 1 november 2010.
- Gruffat, H., Manet, E. and Sergeant, A. (2002) MEF2-mediated recruitment of class II HDAC at the EBV immediate early gene BZLF1 links latency and chromatin remodeling. *EMBO Rep*, **3**, 141-146.
- Grunewald, V., Bonnet, M., Boutin, S., Yip, T., Louzir, H., Levrero, M., Seigneurin, J.M., Raphael, M., Touitou, R., Martel-Renoir, D., Cochet, C., Durandy, A., Andre, P., Lau, W., Zeng, Y. and Joab, I. (1998) Amino-acid change in the Epstein-Barr-virus ZEBRA protein in undifferentiated nasopharyngeal carcinomas from Europe and North Africa. *Int J Cancer*, **75**, 497-503.
- Guillemot, L. and Citi, S. (2006) Cingulin regulates claudin-2 expression and cell proliferation through the small GTPase RhoA. *Mol Biol Cell*, **17**, 3569-3577.
- Guillemot, L., Paschoud, S., Pulimeno, P., Foglia, A. and Citi, S. (2008) The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center. *Biochim Biophys Acta*, **1778**, 601-613.
- Guo, Q., Qian, L., Guo, L., Shi, M., Chen, C., Lv, X., Yu, M., Hu, M., Jiang, G. and Guo, N. (2010) Transactivators Zta and Rta of Epstein-Barr virus promote G0/G1 to S transition in Raji cells: a novel relationship between lytic virus and cell cycle. *Mol Immunol*, **47**, 1783-1792.
- Gutsch, D.E., Holley-Guthrie, E.A., Zhang, Q., Stein, B., Blonar, M.A., Baldwin, A.S. and Kenney, S.C. (1994) The bZIP transactivator of Epstein-Barr virus, BZLF1, functionally and physically interacts with the p65 subunit of NF-kappa B. *Mol Cell Biol*, **14**, 1939-1948.
- Haddad, E., Paczesny, S., Leblond, V., Seigneurin, J.M., Stern, M., Achkar, A., Bauwens, M., Delwail, V., Debray, D., Duvoux, C., Hubert, P., Hurault de Ligny, B., Wijdenes, J., Durandy, A. and Fischer, A. (2001) Treatment of B-lymphoproliferative disorder with a monoclonal anti-interleukin-6 antibody in 12 patients: a multicenter phase 1-2 clinical trial. *Blood*, **97**, 1590-1597.
- 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.
- Hagemeyer, S.R., Dickerson, S.J., Meng, Q., Yu, X., Mertz, J.E. and Kenney, S.C. (2010) Sumoylation of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein inhibits its transcriptional activity and is regulated by the virus-encoded protein kinase. *J Virol*, **84**, 4383-4394.
- Hahn, A.M., Huye, L.E., Ning, S., Webster-Cyriaque, J. and Pagano, J.S. (2005) Interferon regulatory factor 7 is negatively regulated by the Epstein-Barr virus immediate-early gene, BZLF-1. *J Virol*, **79**, 10040-10052.

- Halder, S., Murakami, M., Verma, S.C., Kumar, P., Yi, F. and Robertson, E.S. (2009) Early events associated with infection of Epstein-Barr virus infection of primary B-cells. *PLoS One*, **4**, e7214.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, **100**, 57-70.
- Harburger, D.S. and Calderwood, D.A. (2009) Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci*, **122**, 159-163.
- He, D.Y., Neasta, J. and Ron, D. (2010) Epigenetic regulation of BDNF expression via the scaffolding protein RACK1. *J Biol Chem*, **285**, 19043-19050.
- Heather, J., Flower, K., Isaac, S. and Sinclair, A.J. (2009) The Epstein-Barr virus lytic cycle activator Zta interacts with methylated ZRE in the promoter of host target gene *egr1*. *J Gen Virol*, **90**, 1450-1454.
- Henle, G., Henle, W. and Diehl, V. (1968) Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **59**, 94-101.
- Henle, W., Henle, G., Zajac, B.A., Pearson, G., Waubke, R. and Scriba, M. (1970) Differential reactivity of human serums with early antigens induced by Epstein-Barr virus. *Science*, **169**, 188-190.
- Hernandez, S., Chavez Munguia, B. and Gonzalez-Mariscal, L. (2007) ZO-2 silencing in epithelial cells perturbs the gate and fence function of tight junctions and leads to an atypical monolayer architecture. *Exp Cell Res*, **313**, 1533-1547.
- Heslop, H.E. (2009) How I treat EBV lymphoproliferation. *Blood*, **114**, 4002-4008.
- Heston, L., El-Guindy, A., Countryman, J., Dela Cruz, C., Delecluse, H.J. and Miller, G. (2006) Amino acids in the basic domain of Epstein-Barr virus ZEBRA protein play distinct roles in DNA binding, activation of early lytic gene expression, and promotion of viral DNA replication. *J Virol*, **80**, 9115-9133.
- Hicks, M.R., Al-Mehairi, S.S. and Sinclair, A.J. (2003) The zipper region of Epstein-Barr virus bZIP transcription factor Zta is necessary but not sufficient to direct DNA binding. *J Virol*, **77**, 8173-8177.
- Hislop, A.D., Taylor, G.S., Sauce, D. and Rickinson, A.B. (2007) Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol*, **25**, 587-617.
- Hofmann, I., Schnolzer, M., Kaufmann, I. and Franke, W.W. (2002) Symplekin, a constitutive protein of karyo- and cytoplasmic particles involved in mRNA biogenesis in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Biol Cell*, **13**, 1665-1676.
- Hong, G.K., Delecluse, H.J., Gruffat, H., Morrison, T.E., Feng, W.H., Sergeant, A. and Kenney, S.C. (2004) The BRRF1 early gene of Epstein-Barr virus encodes a transcription factor that enhances induction of lytic infection by BRLF1. *J Virol*, **78**, 4983-4992.
- 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**, 13993-14003.
- 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**, 13984-13992.
- Hsu, M., Wu, S.Y., Chang, S.S., Su, I.J., Tsai, C.H., Lai, S.J., Shiau, A.L., Takada, K. and Chang, Y. (2008) Epstein-Barr virus lytic transactivator Zta enhances chemotactic activity through induction of interleukin-8 in nasopharyngeal carcinoma cells. *J Virol*, **82**, 3679-3688.
- Huang, H.Y., Li, R., Sun, Q., Wang, J., Zhou, P., Han, H. and Zhang, W.H. (2002) [LIM protein KyoT2 interacts with human tight junction protein ZO-2-i3]. *Yi Chuan Xue Bao*, **29**, 953-958.
- Huang, J., Liao, G., Chen, H., Wu, F.Y., Hutt-Fletcher, L., Hayward, G.S. and Hayward, S.D. (2006) Contribution of C/EBP proteins to Epstein-Barr virus lytic gene expression and replication in epithelial cells. *J Virol*, **80**, 1098-1109.
- Huber, D., Balda, M.S. and Matter, K. (2000) Occludin modulates transepithelial migration of neutrophils. *J Biol Chem*, **275**, 5773-5778.
- Huerta, M., Munoz, R., Tapia, R., Soto-Reyes, E., Ramirez, L., Recillas-Targa, F., Gonzalez-Mariscal, L. and Lopez-Bayghen, E. (2007) Cyclin D1 is transcriptionally down-regulated by ZO-2 via an E box and the transcription factor c-Myc. *Mol Biol Cell*, **18**, 4826-4836.
- Hutt-Fletcher, L.M. (2007) Epstein-Barr virus entry. *J Virol*, **81**, 7825-7832.

- Ikeda, W., Nakanishi, H., Miyoshi, J., Mandai, K., Ishizaki, H., Tanaka, M., Togawa, A., Takahashi, K., Nishioka, H., Yoshida, H., Mizoguchi, A., Nishikawa, S. and Takai, Y. (1999) Afadin: A key molecule essential for structural organization of cell-cell junctions of polarized epithelia during embryogenesis. *J Cell Biol*, **146**, 1117-1132.
- Ikenouchi, J., Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H., Tsukita, S. and Tsukita, S. (2005) Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol*, **171**, 939-945.
- Ikenouchi, J., Sasaki, H., Tsukita, S., Furuse, M. and Tsukita, S. (2008) Loss of occludin affects tricellular localization of tricellulin. *Mol Biol Cell*, **19**, 4687-4693.
- Islas, S., Vega, J., Ponce, L. and Gonzalez-Mariscal, L. (2002) Nuclear localization of the tight junction protein ZO-2 in epithelial cells. *Exp Cell Res*, **274**, 138-148.
- Israel, B.F., Shannon, C.K. (2005) EBV lytic infection. In Robertson, E.S. (ed.), *Epstein Barr Virus*. Caister Academic Press, Philadelphia, pp. 571-601.
- Itoh, M., Furuse, M., Morita, K., Kubota, K., Saitou, M. and Tsukita, S. (1999) Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol*, **147**, 1351-1363.
- Itoh, M., Sasaki, H., Furuse, M., Ozaki, H., Kita, T. and Tsukita, S. (2001) Junctional adhesion molecule (JAM) binds to PAR-3: a possible mechanism for the recruitment of PAR-3 to tight junctions. *J Cell Biol*, **154**, 491-497.
- Javier, R.T. and Butel, J.S. (2008) The history of tumor virology. *Cancer Res*, **68**, 7693-7706.
- Jenson, H.B., Rabson, M.S. and Miller, G. (1986) Palindromic structure and polypeptide expression of 36 kilobase pairs of heterogeneous Epstein-Barr virus (P3HR-1) DNA. *J Virol*, **58**, 475-486.
- Ji, K.M., Li, C.L., Meng, G., Han, A.D. and Wu, X.L. (2008) New BZLF1 sequence variations in EBV-associated undifferentiated nasopharyngeal carcinoma in southern China. *Arch Virol*, **153**, 1949-1953.
- Jones, R.J., Seaman, W.T., Feng, W.H., Barlow, E., Dickerson, S., Delecluse, H.J. and Kenney, S.C. (2007) Roles of lytic viral infection and IL-6 in early versus late passage lymphoblastoid cell lines and EBV-associated lymphoproliferative disease. *Int J Cancer*, **121**, 1274-1281.
- Jurchott, K., Bergmann, S., Stein, U., Walther, W., Janz, M., Manni, I., Piaggio, G., Fietze, E., Dietel, M. and Royer, H.D. (2003) YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. *J Biol Chem*, **278**, 27988-27996.
- Kabouridis, P.S. (2003) Biological applications of protein transduction technology. *Trends Biotechnol*, **21**, 498-503.
- 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**, 850-855.
- Kallewaard, N.L., Zhang, L., Chen, J.W., Guttenberg, M., Sanchez, M.D. and Bergelson, J.M. (2009) Tissue-specific deletion of the coxsackievirus and adenovirus receptor protects mice from virus-induced pancreatitis and myocarditis. *Cell Host Microbe*, **6**, 91-98.
- Kanlaya, R., Pattanakitsakul, S.N., Sinchaikul, S., Chen, S.T. and Thongboonkerd, V. (2009) Alterations in actin cytoskeletal assembly and junctional protein complexes in human endothelial cells induced by dengue virus infection and mimicry of leukocyte transendothelial migration. *J Proteome Res*, **8**, 2551-2562.
- Karlsson, Q.H., Schelcher, C., Verrall, E., Petosa, C. and Sinclair, A.J. (2008a) Methylated DNA recognition during the reversal of epigenetic silencing is regulated by cysteine and serine residues in the Epstein-Barr virus lytic switch protein. *PLoS Pathog*, **4**, e1000005.
- Karlsson, Q.H., Schelcher, C., Verrall, E., Petosa, C. and Sinclair, A.J. (2008b) The reversal of epigenetic silencing of the EBV genome is regulated by viral bZIP protein. *Biochem Soc Trans*, **36**, 637-639.
- Kausalya, P.J., Reichert, M. and Hunziker, W. (2001) Connexin45 directly binds to ZO-1 and localizes to the tight junction region in epithelial MDCK cells. *FEBS Lett*, **505**, 92-96.
- Kavanagh, E., Buchert, M., Tsapara, A., Choquet, A., Balda, M.S., Hollande, F. and Matter, K. (2006) Functional interaction between the ZO-1-interacting transcription factor ZONAB/DbpA and the RNA processing factor symplekin. *J Cell Sci*, **119**, 5098-5105.

- Keating, S., Prince, S., Jones, M. and Rowe, M. (2002) The lytic cycle of Epstein-Barr virus is associated with decreased expression of cell surface major histocompatibility complex class I and class II molecules. *J Virol*, **76**, 8179-8188.
- Kelly, G.L., Long, H.M., Stylianou, J., Thomas, W.A., Leese, A., Bell, A.I., Bornkamm, G.W., Mautner, J., Rickinson, A.B. and Rowe, M. (2009) An Epstein-Barr virus anti-apoptotic protein constitutively expressed in transformed cells and implicated in burkitt lymphomagenesis: the Wp/BHRF1 link. *PLoS Pathog*, **5**, e1000341.
- Kenney, S. (2006) Theodore E. Woodward Award: development of novel, EBV-targeted therapies for EBV-positive tumors. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, **117**, 55-73; discussion 73-54.
- Kenney, S.C., Holley-Guthrie, E., Quinlivan, E.B., Gutsch, D., Zhang, Q., Bender, T., Giot, J.F. and Sergeant, A. (1992) The cellular oncogene c-myc can interact synergistically with the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator in lymphoid cells. *Mol Cell Biol*, **12**, 136-146.
- Keon, B.H., Schafer, S., Kuhn, C., Grund, C. and Franke, W.W. (1996) Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein. *J Cell Biol*, **134**, 1003-1018.
- Kieff, E. and Rickinson, A.B. (2007) Epstein-Barr Virus and its replication. In Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B. and Straus, S.E. (eds.), *Fields Virology*. Lipincott Williams et Wilkins, Philadelphia, Vol. 2, pp. 2603-2654.
- Klose, R.J. and Bird, A.P. (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*, **31**, 89-97.
- Kolev, N.G. and Steitz, J.A. (2005) Symplekin and multiple other polyadenylation factors participate in 3'-end maturation of histone mRNAs. *Genes Dev*, **19**, 2583-2592.
- Kouzarides, T., Packham, G., Cook, A. and Farrell, P.J. (1991) The BZLF1 protein of EBV has a coiled coil dimerisation domain without a heptad leucine repeat but with homology to the C/EBP leucine zipper. *Oncogene*, **6**, 195-204.
- Kraus, R.J., Perrigoue, J.G. and Mertz, J.E. (2003) ZEB negatively regulates the lytic-switch BZLF1 gene promoter of Epstein-Barr virus. *J Virol*, **77**, 199-207.
- Krause, G., Winkler, L., Mueller, S.L., Haseloff, R.F., Piontek, J. and Blasig, I.E. (2008) Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta*, **1778**, 631-645.
- Krieger, S.E., Zeisel, M.B., Davis, C., Thumann, C., Harris, H.J., Schnober, E.K., Mee, C., Soulier, E., Royer, C., Lambotin, M., Grunert, F., Dao Thi, V.L., Dreux, M., Cosset, F.L., McKeating, J.A., Schuster, C. and Baumert, T.F. (2010) Inhibition of hepatitis C virus infection by anti-claudin-1 antibodies is mediated by neutralization of E2-CD81-claudin-1 associations. *Hepatology*, **51**, 1144-1157.
- Kudoh, A., Fujita, M., Kiyono, T., Kuzushima, K., Sugaya, Y., Izuta, S., Nishiyama, Y. and Tsurumi, T. (2003) Reactivation of lytic replication from B cells latently infected with Epstein-Barr virus occurs with high S-phase cyclin-dependent kinase activity while inhibiting cellular DNA replication. *J Virol*, **77**, 851-861.
- Kudoh, A., Fujita, M., Zhang, L., Shirata, N., Daikoku, T., Sugaya, Y., Isomura, H., Nishiyama, Y. and Tsurumi, T. (2005) Epstein-Barr virus lytic replication elicits ATM checkpoint signal transduction while providing an S-phase-like cellular environment. *J Biol Chem*, **280**, 8156-8163.
- 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**, 1296-1307.
- Latorre, I.J., Roh, M.H., Frese, K.K., Weiss, R.S., Margolis, B. and Javier, R.T. (2005) Viral oncoprotein-induced mislocalization of select PDZ proteins disrupts tight junctions and causes polarity defects in epithelial cells. *J Cell Sci*, **118**, 4283-4293.
- Le Roux, F., Sergeant, A. and Corbo, L. (1996) Epstein-Barr virus (EBV) EB1/Zta protein provided in trans and competent for the activation of productive cycle genes does not activate the BZLF1 gene in the EBV genome. *J Gen Virol*, **77** (Pt 3), 501-509.
- Lee, S.G., Su, Z.Z., Emdad, L., Sarkar, D., Franke, T.F. and Fisher, P.B. (2008) Astrocyte elevated gene-1 activates cell survival pathways through PI3K-Akt signaling. *Oncogene*, **27**, 1114-1121.
- Lee, S.S., Glaunsinger, B., Mantovani, F., Banks, L. and Javier, R.T. (2000) Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. *J Virol*, **74**, 9680-9693.

- Li, D., Qian, L., Chen, C., Shi, M., Yu, M., Hu, M., Song, L., Shen, B. and Guo, N. (2009) Down-regulation of MHC class II expression through inhibition of CIITA transcription by lytic transactivator Zta during Epstein-Barr virus reactivation. *J Immunol*, **182**, 1799-1809.
- Li, Y., Webster-Cyriaque, J., Tomlinson, C.C., Yohe, M. and Kenney, S. (2004) Fatty acid synthase expression is induced by the Epstein-Barr virus immediate-early protein BRLF1 and is required for lytic viral gene expression. *J Virol*, **78**, 4197-4206.
- Lieberman, P.M. and Berk, A.J. (1991) The Zta trans-activator protein stabilizes TFIID association with promoter DNA by direct protein-protein interaction. *Genes Dev*, **5**, 2441-2454.
- Liliental, J. and Chang, D.D. (1998) Rack1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin beta subunit. *J Biol Chem*, **273**, 2379-2383.
- Lin, T.P., Chen, S.Y., Duh, P.D., Chang, L.K. and Liu, Y.N. (2008) Inhibition of the Epstein-Barr virus lytic cycle by andrographolide. *Biol Pharm Bull*, **31**, 2018-2023.
- Liu, P., Liu, S. and Speck, S.H. (1998) Identification of a negative cis element within the ZII domain of the Epstein-Barr virus lytic switch BZLF1 gene promoter. *J Virol*, **72**, 8230-8239.
- Liu, S., Borrás, A.M., Liu, P., Suske, G. and Speck, S.H. (1997) Binding of the ubiquitous cellular transcription factors Sp1 and Sp3 to the ZI domains in the Epstein-Barr virus lytic switch BZLF1 gene promoter. *Virology*, **228**, 11-18.
- 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**, 16164-16169.
- Lu, J., Chua, H.H., Chen, S.Y., Chen, J.Y. and Tsai, C.H. (2003) Regulation of matrix metalloproteinase-1 by Epstein-Barr virus proteins. *Cancer Res*, **63**, 256-262.
- Lupo, J., Sueur, C., Conti, A., Coly, P.A., Couté, Y., Burmeister, W.P., Germi, R., Manet, E., Gruffat, H., Morand, P. and Boyer, V. (2010) Identification of new interacting partners of the shuttling protein ubinuclein (Ubn-1). *Exp Cell Res* *submitted*
- MacCallum, P., Karimi, L. and Nicholson, L.J. (1999) Definition of the transcription factors which bind the differentiation responsive element of the Epstein-Barr virus BZLF1 Z promoter in human epithelial cells. *J Gen Virol*, **80 (Pt 6)**, 1501-1512.
- Mahot, S., Fender, P., Vives, R.R., Caron, C., Perrissin, M., Gruffat, H., Sergeant, A. and Drouet, E. (2005) Cellular uptake of the EBV transcription factor EB1/Zta. *Virus Res*, **110**, 187-193.
- Mahot, S., Sergeant, A., Drouet, E. and Gruffat, H. (2003) A novel function for the Epstein-Barr virus transcription factor EB1/Zta: induction of transcription of the hIL-10 gene. *J Gen Virol*, **84**, 965-974.
- Malouf, M.A., Chhajed, P.N., Hopkins, P., Plit, M., Turner, J. and Glanville, A.R. (2002) Anti-viral prophylaxis reduces the incidence of lymphoproliferative disease in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*, **21**, 547-554.
- Mamidipudi, V. and Cartwright, C.A. (2009) A novel pro-apoptotic function of RACK1: suppression of Src activity in the intrinsic and Akt pathways. *Oncogene*, **28**, 4421-4433.
- Mandell, K.J., Babbitt, B.A., Nusrat, A. and Parkos, C.A. (2005) Junctional adhesion molecule 1 regulates epithelial cell morphology through effects on beta1 integrins and Rap1 activity. *J Biol Chem*, **280**, 11665-11674.
- Manet, E., Gruffat, H., Trescol-Biemont, M.C., Moreno, N., Chambard, P., Giot, J.F. and Sergeant, A. (1989) Epstein-Barr virus bicistronic mRNAs generated by facultative splicing code for two transcriptional trans-activators. *Embo J*, **8**, 1819-1826.
- Mangeat, P., Roy, C. and Martin, M. (1999) ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol*, **9**, 187-192.
- Mannick, J.B., Asano, K., Izumi, K., Kieff, E. and Stambler, J.S. (1994) Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell*, **79**, 1137-1146.
- Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. and Balkwill, F. (2008) Cancer-related inflammation. *Nature*, **454**, 436-444.
- 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)**, 1401-1408.

- Mausser, A., Holley-Guthrie, E., Simpson, D., Kaufmann, W. and Kenney, S. (2002a) The Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 induces both a G(2) and a mitotic block. *J Virol*, **76**, 10030-10037.
- Mausser, A., Holley-Guthrie, E., Zanation, A., Yarborough, W., Kaufmann, W., Klingelutz, A., Seaman, W.T. and Kenney, S. (2002b) The Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 induces expression of E2F-1 and other proteins involved in cell cycle progression in primary keratinocytes and gastric carcinoma cells. *J Virol*, **76**, 12543-12552.
- Mausser, A., Saito, S., Appella, E., Anderson, C.W., Seaman, W.T. and Kenney, S. (2002c) The Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 regulates p53 function through multiple mechanisms. *J Virol*, **76**, 12503-12512.
- McCahill, A., Warwicker, J., Bolger, G.B., Houslay, M.D. and Yarwood, S.J. (2002) The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms. *Mol Pharmacol*, **62**, 1261-1273.
- McDiarmid, S.V., Jordan, S., Kim, G.S., Toyoda, M., Goss, J.A., Vargas, J.H., Martin, M.G., Bahar, R., Maxfield, A.L., Ament, M.E. and Busuttill, R.W. (1998) Prevention and preemptive therapy of posttransplant lymphoproliferative disease in pediatric liver recipients. *Transplantation*, **66**, 1604-1611.
- 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**, 622-629.
- Medigeshi, G.R., Hirsch, A.J., Brien, J.D., Uhrlaub, J.L., Mason, P.W., Wiley, C., Nikolich-Zugich, J. and Nelson, J.A. (2009) West nile virus capsid degradation of claudin proteins disrupts epithelial barrier function. *J Virol*, **83**, 6125-6134.
- Medina-Kauwe, L.K. (2003) Endocytosis of adenovirus and adenovirus capsid proteins. *Adv Drug Deliv Rev*, **55**, 1485-1496.
- Meertens, L., Bertaux, C., Cukierman, L., Cormier, E., Lavillette, D., Cosset, F.L. and Dragic, T. (2008) The tight junction proteins claudin-1, -6, and -9 are entry cofactors for hepatitis C virus. *J Virol*, **82**, 3555-3560.
- Meier, O., Boucke, K., Hammer, S.V., Keller, S., Stidwill, R.P., Hemmi, S. and Greber, U.F. (2002) Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake. *J Cell Biol*, **158**, 1119-1131.
- Meng, Q., Hagemeyer, S.R., Fingerroth, J.D., Gershburg, E., Pagano, J.S. and Kenney, S.C. (2010) The Epstein-Barr virus (EBV)-encoded protein kinase, EBV-PK, but not the thymidine kinase (EBV-TK), is required for ganciclovir and acyclovir inhibition of lytic viral production. *J Virol*, **84**, 4534-4542.
- Miller, C.L., Lee, J.H., Kieff, E. and Longnecker, R. (1994) An integral membrane protein (LMP2) blocks reactivation of Epstein-Barr virus from latency following surface immunoglobulin crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 772-776.
- Miller, G. (1989) The switch between EBV latency and replication. *Yale J Biol Med*, **62**, 205-213.
- 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.
- Miller, G., Rabson, M. and Heston, L. (1984) Epstein-Barr virus with heterogeneous DNA disrupts latency. *J Virol*, **50**, 174-182.
- Miller, G., Robinson, J., Heston, L. and Lipman, M. (1975) Differences between laboratory strains of Epstein-Barr virus based on immortalization, abortive infection and interference. *IARC Sci Publ*, **11**, 395-408.
- Miyazaki, I., Cheung, R.K. and Dosch, H.M. (1993) Viral interleukin 10 is critical for the induction of B cell growth transformation by Epstein-Barr virus. *J Exp Med*, **178**, 439-447.
- Montalvo, E.A., Cottam, M., Hill, S. and Wang, Y.J. (1995) YY1 binds to and regulates cis-acting negative elements in the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter. *J Virol*, **69**, 4158-4165.
- 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**, 621-630.
- Morrison, T.E. and Kenney, S.C. (2004) BZLF1, an Epstein-Barr virus immediate-early protein, induces p65 nuclear translocation while inhibiting p65 transcriptional function. *Virology*, **328**, 219-232.

- Morrison, T.E., Mauser, A., Klingelutz, A. and Kenney, S.C. (2004) Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 inhibits tumor necrosis factor alpha-induced signaling and apoptosis by downregulating tumor necrosis factor receptor 1. *J Virol*, **78**, 544-549.
- Morrison, T.E., Mauser, A., Wong, A., Ting, J.P. and Kenney, S.C. (2001) Inhibition of IFN-gamma signaling by an Epstein-Barr virus immediate-early protein. *Immunity*, **15**, 787-799.
- Mosialos, G., Hanissian, S.H., Jawahar, S., Vara, L., Kieff, E. and Chatila, T.A. (1994) A Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase, CaM kinase-Gr, expressed after transformation of primary human B lymphocytes by Epstein-Barr virus (EBV) is induced by the EBV oncogene LMP1. *J Virol*, **68**, 1697-1705.
- Mueller, N., Evans, A., Harris, N.L., Comstock, G.W., Jellum, E., Magnus, K., Orentreich, N., Polk, B.F. and Vogelmann, J. (1989) Hodgkin's disease and Epstein-Barr virus. Altered antibody pattern before diagnosis. *N Engl J Med*, **320**, 689-695.
- Murata, M., Kojima, T., Yamamoto, T., Go, M., Takano, K., Osanai, M., Chiba, H. and Sawada, N. (2005) Down-regulation of survival signaling through MAPK and Akt in occludin-deficient mouse hepatocytes in vitro. *Exp Cell Res*, **310**, 140-151.
- Murata, T., Sato, Y., Nakayama, S., Kudoh, A., Iwahori, S., Isomura, H., Tajima, M., Hishiki, T., Ohshima, T., Hijikata, M., Shimotohno, K. and Tsurumi, T. (2009) TORC2, a coactivator of cAMP-response element-binding protein, promotes Epstein-Barr virus reactivation from latency through interaction with viral BZLF1 protein. *J Biol Chem*, **284**, 8033-8041.
- Muslin, A.J., Tanner, J.W., Allen, P.M. and Shaw, A.S. (1996) Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*, **84**, 889-897.
- Nakagawa, S. and Huijbregtse, J.M. (2000) Human scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol*, **20**, 8244-8253.
- Nakamura, T., Blechman, J., Tada, S., Rozovskaia, T., Itoyama, T., Bullrich, F., Mazo, A., Croce, C.M., Geiger, B. and Canaani, E. (2000) huASH1 protein, a putative transcription factor encoded by a human homologue of the Drosophila ash1 gene, localizes to both nuclei and cell-cell tight junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7284-7289.
- Nanbo, A., Sugden, A. and Sugden, B. (2007) The coupling of synthesis and partitioning of EBV's plasmid replicon is revealed in live cells. *Embo J*, **26**, 4252-4262.
- Nava, P., Lopez, S., Arias, C.F., Islas, S. and Gonzalez-Mariscal, L. (2004) The rotavirus surface protein VP8 modulates the gate and fence function of tight junctions in epithelial cells. *J Cell Sci*, **117**, 5509-5519.
- Nazli, A., Chan, O., Dobson-Belaire, W.N., Ouellet, M., Tremblay, M.J., Gray-Owen, S.D., Arsenault, A.L. and Kaushic, C. (2010) Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PLoS Pathog*, **6**, e1000852.
- Niedobitek, G., Agathangelou, A., Rowe, M., Jones, E.L., Jones, D.B., Turyaguma, P., Oryema, J., Wright, D.H. and Young, L.S. (1995) Heterogeneous expression of Epstein-Barr virus latent proteins in endemic Burkitt's lymphoma. *Blood*, **86**, 659-665.
- 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.
- Nilsson, J., Sengupta, J., Frank, J. and Nissen, P. (2004) Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO Rep*, **5**, 1137-1141.
- Noritake, J., Watanabe, T., Sato, K., Wang, S. and Kaibuchi, K. (2005) IQGAP1: a key regulator of adhesion and migration. *J Cell Sci*, **118**, 2085-2092.
- Nunbhakdi-Craig, V., Craig, L., Machleidt, T. and Sontag, E. (2003) Simian virus 40 small tumor antigen induces deregulation of the actin cytoskeleton and tight junctions in kidney epithelial cells. *J Virol*, **77**, 2807-2818.
- Obert, G., Peiffer, I. and Servin, A.L. (2000) Rotavirus-induced structural and functional alterations in tight junctions of polarized intestinal Caco-2 cell monolayers. *J Virol*, **74**, 4645-4651.
- Oeljeklaus, S., Meyer, H.E. and Warscheid, B. (2009) New dimensions in the study of protein complexes using quantitative mass spectrometry. *FEBS Lett*, **583**, 1674-1683.

- Osler, M.E., Chang, M.S. and Bader, D.M. (2005) Bves modulates epithelial integrity through an interaction at the tight junction. *J Cell Sci*, **118**, 4667-4678.
- Osler, M.E., Smith, T.K. and Bader, D.M. (2006) Bves, a member of the Popeye domain-containing gene family. *Dev Dyn*, **235**, 586-593.
- Oudejans, J.J., Jiwa, M., van den Brule, A.J., Grasser, F.A., Horstman, A., Vos, W., Kluin, P.M., van der Valk, P., Walboomers, J.M. and Meijer, C.J. (1995) Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplantation lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol*, **147**, 923-933.
- Oussaief, L., Hippocrate, A., Ramirez, V., Rampanou, A., Zhang, W., Meyers, D., Cole, P., Khelifa, R. and Joab, I. (2009) Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway targets acetylation of Smad3 through Smad3/CREB-binding protein interaction: contribution to transforming growth factor beta1-induced Epstein-Barr virus reactivation. *J Biol Chem*, **284**, 23912-23924.
- Pallesen, G., Sandvej, K., Hamilton-Dutoit, S.J., Rowe, M. and Young, L.S. (1991) Activation of Epstein-Barr virus replication in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Blood*, **78**, 1162-1165.
- Paris, L., Tonutti, L., Vannini, C. and Bazzoni, G. (2008) Structural organization of the tight junctions. *Biochim Biophys Acta*, **1778**, 646-659.
- Paschoud, S. and Citi, S. (2008) Inducible overexpression of cingulin in stably transfected MDCK cells does not affect tight junction organization and gene expression. *Mol Membr Biol*, **25**, 1-13.
- Patel, K.P., Coyne, C.B. and Bergelson, J.M. (2009) Dynamamin- and lipid raft-dependent entry of decay-accelerating factor (DAF)-binding and non-DAF-binding coxsackieviruses into nonpolarized cells. *J Virol*, **83**, 11064-11077.
- Pattle, S.B. and Farrell, P.J. (2006) The role of Epstein-Barr virus in cancer. *Expert Opin Biol Ther*, **6**, 1193-1205.
- Petosa, C., Morand, P., Baudin, F., Moulin, M., Artero, J.B. and Muller, C.W. (2006) Structural basis of lytic cycle activation by the Epstein-Barr virus ZEBRA protein. *Mol Cell*, **21**, 565-572.
- Pfifzner, E., Becker, P., Rolke, A. and Schule, R. (1995) Functional antagonism between the retinoic acid receptor and the viral transactivator BZLF1 is mediated by protein-protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 12265-12269.
- Ploss, A., Evans, M.J., Gaysinskaya, V.A., Panis, M., You, H., de Jong, Y.P. and Rice, C.M. (2009) Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*, **457**, 882-886.
- Pollard, T.D. and Earnshaw, W.C. (2004) Junctions intercellulaires. In Rouquette, M.J. and Trémeaux, A. (eds.), *Biologie cellulaire*. Elsevier, Paris, pp. 567-578.
- Rabson, M., Gradoville, L., Heston, L. and Miller, G. (1982) Non-immortalizing P3J-HR-1 Epstein-Barr virus: a deletion mutant of its transforming parent, Jijoye. *J Virol*, **44**, 834-844.
- Rabson, M., Heston, L. and Miller, G. (1983) Identification of a rare Epstein-Barr virus variant that enhances early antigen expression in Raji cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **80**, 2762-2766.
- Raleigh, D.R., Marchiando, A.M., Zhang, Y., Shen, L., Sasaki, H., Wang, Y., Long, M. and Turner, J.R. (2010) Tight junction-associated MARVEL proteins marveld3, tricellulin, and occludin have distinct but overlapping functions. *Mol Biol Cell*, **21**, 1200-1213.
- Rea, D., Fourcade, C., Leblond, V., Rowe, M., Joab, I., Edelman, L., Bitker, M.O., Gandjbakhch, I., Suberbielle, C., Farcet, J.P. and et al. (1994) Patterns of Epstein-Barr virus latent and replicative gene expression in Epstein-Barr virus B cell lymphoproliferative disorders after organ transplantation. *Transplantation*, **58**, 317-324.
- 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**, 1739-1747.
- Regad, T. and Chelbi-Alix, M.K. (2001) Role and fate of PML nuclear bodies in response to interferon and viral infections. *Oncogene*, **20**, 7274-7286.
- Reimold, A.M., Iwakoshi, N.N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravalles, E.M., Friend, D., Grusby, M.J., Alt, F. and Glimcher, L.H. (2001) Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature*, **412**, 300-307.

- Ressing, M.E., Horst, D., Griffin, B.D., Tellam, J., Zuo, J., Khanna, R., Rowe, M. and Wiertz, E.J. (2008) Epstein-Barr virus evasion of CD8(+) and CD4(+) T cell immunity via concerted actions of multiple gene products. *Semin Cancer Biol*, **18**, 397-408.
- Rickinson, A.B. and Kieff, E. (2007) Epstein-Barr virus. In Knipe, D.M., Howley, P.M., Griffin, B.D., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B. and Straus, S.E. (eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams et Wilkins, Philadelphia, Vol. 2, pp. 2655-2700.
- Rodriguez, A., Jung, E.J., Yin, Q., Cayrol, C. and Flemington, E.K. (2001) Role of c-myc regulation in Zta-mediated induction of the cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27 and cell growth arrest. *Virology*, **284**, 159-169.
- Rodriguez, M.M., Ron, D., Touhara, K., Chen, C.H. and Mochly-Rosen, D. (1999) RACK1, a protein kinase C anchoring protein, coordinates the binding of activated protein kinase C and select pleckstrin homology domains in vitro. *Biochemistry*, **38**, 13787-13794.
- Rooney, C., Taylor, N., Countryman, J., Jenson, H., Kolman, J. and Miller, G. (1988) Genome rearrangements activate the Epstein-Barr virus gene whose product disrupts latency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 9801-9805.
- Rothe, R. and Lenormand, J.L. (2008) Expression and purification of ZEBRA fusion proteins and applications for the delivery of macromolecules into mammalian cells. *Curr Protoc Protein Sci*, **Chapter 18**, Unit 18 11.
- Rothe, R., Liguori, L., Villegas-Mendez, A., Marques, B., Grunwald, D., Drouet, E. and Lenormand, J.L. (2010) Characterization of the cell-penetrating properties of the Epstein-Barr virus ZEBRA trans-activator. *J Biol Chem*, **2010**, 9.
- Saitou, M., Fujimoto, K., Doi, Y., Itoh, M., Fujimoto, T., Furuse, M., Takano, H., Noda, T. and Tsukita, S. (1998) Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol*, **141**, 397-408.
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T. and Tsukita, S. (2000) Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell*, **11**, 4131-4142.
- Sato, Y., Kamura, T., Shirata, N., Murata, T., Kudoh, A., Iwahori, S., Nakayama, S., Isomura, H., Nishiyama, Y. and Tsurumi, T. (2009a) Degradation of phosphorylated p53 by viral protein-ECS E3 ligase complex. *PLoS Pathog*, **5**, e1000530.
- Sato, Y., Shirata, N., Kudoh, A., Iwahori, S., Nakayama, S., Murata, T., Isomura, H., Nishiyama, Y. and Tsurumi, T. (2009b) Expression of Epstein-Barr virus BZLF1 immediate-early protein induces p53 degradation independent of MDM2, leading to repression of p53-mediated transcription. *Virology*, **388**, 204-211.
- Sato, Y., Shirata, N., Murata, T., Nakasu, S., Kudoh, A., Iwahori, S., Nakayama, S., Chiba, S., Isomura, H., Kanda, T. and Tsurumi, T. (2010) Transient increases in p53-responsible gene expression at early stages of Epstein-Barr virus productive replication. *Cell Cycle*, **9**, 807-814.
- Scala, G., Quinto, I., Ruocco, M.R., Arcucci, A., Mallardo, M., Caretto, P., Forni, G. and Venuta, S. (1990) Expression of an exogenous interleukin 6 gene in human Epstein Barr virus B cells confers growth advantage and in vivo tumorigenicity. *J Exp Med*, **172**, 61-68.
- Schelcher, C., Valencia, S., Delecluse, H.J., Hicks, M. and Sinclair, A.J. (2005) Mutation of a single amino acid residue in the basic region of the Epstein-Barr virus (EBV) lytic cycle switch protein Zta (BZLF1) prevents reactivation of EBV from latency. *J Virol*, **79**, 13822-13828.
- Schmidt, A., Utepbergenov, D.I., Mueller, S.L., Beyermann, M., Schneider-Mergener, J., Krause, G. and Blasig, I.E. (2004) Occludin binds to the SH3-hinge-GuK unit of zonula occludens protein 1: potential mechanism of tight junction regulation. *Cell Mol Life Sci*, **61**, 1354-1365.
- Segouffin, C., Gruffat, H. and Sergeant, A. (1996) Repression by RAZ of Epstein-Barr virus bZIP transcription factor EB1 is dimerization independent. *J Gen Virol*, **77** (Pt 7), 1529-1536.
- 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**, 7749-7760.
- 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**, 7065-7070.

- Shaulian, E. and Karin, M. (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol*, **4**, E131-136.
- Shin, K., Fogg, V.C. and Margolis, B. (2006) Tight junctions and cell polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **22**, 207-235.
- Sinclair, A.J. (2003) bZIP proteins of human gammaherpesviruses. *J Gen Virol*, **84**, 1941-1949.
- Sinclair, A.J. (2006) Unexpected structure of Epstein-Barr virus lytic cycle activator Zta. *Trends Microbiol*, **14**, 289-291.
- Sinclair, A.J. and Farrell, P.J. (1992) Epstein-Barr virus transcription factors. *Cell Growth Differ*, **3**, 557-563.
- Sista, N.D., Barry, C., Sampson, K. and Pagano, J. (1995) Physical and functional interaction of the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator with the retinoic acid receptors RAR alpha and RXR alpha. *Nucleic Acids Res*, **23**, 1729-1736.
- Sista, N.D., Pagano, J.S., Liao, W. and Kenney, S. (1993) Retinoic acid is a negative regulator of the Epstein-Barr virus protein (BZLF1) that mediates disruption of latent infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 3894-3898.
- Sourisseau, T., Georgiadis, A., Tsapara, A., Ali, R.R., Pestell, R., Matter, K. and Balda, M.S. (2006) Regulation of PCNA and cyclin D1 expression and epithelial morphogenesis by the ZO-1-regulated transcription factor ZONAB/DbpA. *Mol Cell Biol*, **26**, 2387-2398.
- Sousa, S., Lecuit, M. and Cossart, P. (2005) Microbial strategies to target, cross or disrupt epithelia. *Curr Opin Cell Biol*, **17**, 489-498.
- Speck, S.H., Chatila, T. and Flemington, E. (1997) Reactivation of Epstein-Barr virus: regulation and function of the BZLF1 gene. *Trends Microbiol*, **5**, 399-405.
- Steed, E., Balda, M.S. and Matter, K. (2010) Dynamics and functions of tight junctions. *Trends Cell Biol*, **20**, 142-149.
- Steed, E., Rodrigues, N.T., Balda, M.S. and Matter, K. (2009) Identification of MarvelD3 as a tight junction-associated transmembrane protein of the occludin family. *BMC Cell Biol*, **10**, 95.
- Stevenson, B.R., Siliciano, J.D., Mooseker, M.S. and Goodenough, D.A. (1986) Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol*, **103**, 755-766.
- Storrs, C.H. and Silverstein, S.J. (2007) PATJ, a tight junction-associated PDZ protein, is a novel degradation target of high-risk human papillomavirus E6 and the alternatively spliced isoform 18 E6. *J Virol*, **81**, 4080-4090.
- Sun, C.C. and Thorley-Lawson, D.A. (2007) Plasma cell-specific transcription factor XBP-1s binds to and transactivates the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter. *J Virol*, **81**, 13566-13577.
- Sutherland, H.G., Lam, Y.W., Briers, S., Lamond, A.I. and Bickmore, W.A. (2004) 3D3/lyric: a novel transmembrane protein of the endoplasmic reticulum and nuclear envelope, which is also present in the nucleolus. *Exp Cell Res*, **294**, 94-105.
- 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.
- Tafazoli, F., Zeng, C.Q., Estes, M.K., Magnusson, K.E. and Svensson, L. (2001) NSP4 enterotoxin of rotavirus induces paracellular leakage in polarized epithelial cells. *J Virol*, **75**, 1540-1546.
- Tagami, H., Ray-Gallet, D., Almouzni, G. and Nakatani, Y. (2004) Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell*, **116**, 51-61.
- 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.
- Takagaki, Y. and Manley, J.L. (2000) Complex protein interactions within the human polyadenylation machinery identify a novel component. *Mol Cell Biol*, **20**, 1515-1525.
- Tanaka, Y., Nakayama, Y., Taniguchi, M. and Kioussis, D. (2008) Regulation of early T cell development by the PHD finger of histone lysine methyltransferase ASH1. *Biochem Biophys Res Commun*, **365**, 589-594.
- Tang, V.W. (2006) Proteomic and bioinformatic analysis of epithelial tight junction reveals an unexpected cluster of synaptic molecules. *Biol Direct*, **1**, 37.

- Tang, W., Harmon, P., Gulley, M.L., Mwansambo, C., Kazembe, P.N., Martinson, F., Wokocho, C., Kenney, S.C., Hoffman, I., Sigel, C., Maygarden, S., Hoffman, M. and Shores, C. (2010) Viral response to chemotherapy in endemic burkitt lymphoma. *Clin Cancer Res*, **16**, 2055-2064.
- Tapia, R., Huerta, M., Islas, S., Avila-Flores, A., Lopez-Bayghen, E., Weiske, J., Huber, O. and Gonzalez-Mariscal, L. (2009) Zona occludens-2 inhibits cyclin D1 expression and cell proliferation and exhibits changes in localization along the cell cycle. *Mol Biol Cell*, **20**, 1102-1117.
- Tardif, M., Savard, M., Flamand, L. and Gosselin, J. (2002) Impaired protein kinase C activation/translocation in Epstein-Barr virus-infected monocytes. *J Biol Chem*, **277**, 24148-24154.
- Terry, S., Nie, M., Matter, K. and Balda, M.S. (2010) Rho signaling and tight junction functions. *Physiology (Bethesda)*, **25**, 16-26.
- Thirkettle, H.J., Girling, J., Warren, A.Y., Mills, I.G., Sahadevan, K., Leung, H., Hamdy, F., Whitaker, H.C. and Neal, D.E. (2009a) LYRIC/AEG-1 is targeted to different subcellular compartments by ubiquitinylation and intrinsic nuclear localization signals. *Clin Cancer Res*, **15**, 3003-3013.
- Thirkettle, H.J., Mills, I.G., Whitaker, H.C. and Neal, D.E. (2009b) Nuclear LYRIC/AEG-1 interacts with PLZF and relieves PLZF-mediated repression. *Oncogene*, **28**, 3663-3670.
- Thomas, C., Dankesreiter, A., Wolf, H. and Schwarzmann, F. (2003) The BZLF1 promoter of Epstein-Barr virus is controlled by E box-/HI-motif-binding factors during virus latency. *J Gen Virol*, **84**, 959-964.
- Thomas, M., Glaunsinger, B., Pim, D., Javier, R. and Banks, L. (2001) HPV E6 and MAGUK protein interactions: determination of the molecular basis for specific protein recognition and degradation. *Oncogene*, **20**, 5431-5439.
- Thorley-Lawson, D.A. (2005) EBV persistence and latent infection *in vivo*. In Robertson, E.S. (ed.), *Epstein Barr Virus*. Caister Academic Press, Wymondham, pp. 309-357.
- 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**, 913-924.
- Thorley-Lawson, D.A., Duca, K.A. and Shapiro, M. (2008) Epstein-Barr virus: a paradigm for persistent infection - for real and in virtual reality. *Trends Immunol*, **29**, 195-201.
- 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**, 1328-1337.
- Torre, D. and Tambini, R. (1999) Acyclovir for treatment of infectious mononucleosis: a meta-analysis. *Scand J Infect Dis*, **31**, 543-547.
- Traweger, A., Fuchs, R., Krizbai, I.A., Weiger, T.M., Bauer, H.C. and Bauer, H. (2003) The tight junction protein ZO-2 localizes to the nucleus and interacts with the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein scaffold attachment factor-B. *J Biol Chem*, **278**, 2692-2700.
- Trinkle-Mulcahy, L., Boulon, S., Lam, Y.W., Urcia, R., Boisvert, F.M., Vandermoere, F., Morrice, N.A., Swift, S., Rothbauer, U., Leonhardt, H. and Lamond, A. (2008) Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. *J Cell Biol*, **183**, 223-239.
- Tsai, S.C., Lin, S.J., Chen, P.W., Luo, W.Y., Yeh, T.H., Wang, H.W., Chen, C.J. and Tsai, C.H. (2009) EBV Zta protein induces the expression of interleukin-13, promoting the proliferation of EBV-infected B cells and lymphoblastoid cell lines. *Blood*, **114**, 109-118.
- Tsapara, A., Matter, K. and Balda, M.S. (2006) The heat-shock protein Apg-2 binds to the tight junction protein ZO-1 and regulates transcriptional activity of ZONAB. *Mol Biol Cell*, **17**, 1322-1330.
- 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**, 5484-5496.
- 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**, 307-314.
- Turk, S.M., Jiang, R., Chesnokova, L.S. and Hutt-Fletcher, L.M. (2006) Antibodies to gp350/220 enhance the ability of Epstein-Barr virus to infect epithelial cells. *J Virol*, **80**, 9628-9633.

- Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M. and Tsukita, S. (2006) ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell*, **126**, 741-754.
- Umeda, K., Matsui, T., Nakayama, M., Furuse, K., Sasaki, H., Furuse, M. and Tsukita, S. (2004) Establishment and characterization of cultured epithelial cells lacking expression of ZO-1. *J Biol Chem*, **279**, 44785-44794.
- Uteperbergenov, D.I., Fanning, A.S. and Anderson, J.M. (2006) Dimerization of the scaffolding protein ZO-1 through the second PDZ domain. *J Biol Chem*, **281**, 24671-24677.
- Van Itallie, C.M., Fanning, A.S., Bridges, A. and Anderson, J.M. (2009) ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton. *Mol Biol Cell*, **20**, 3930-3940.
- Vermeulen, M., Hubner, N.C. and Mann, M. (2008) High confidence determination of specific protein-protein interactions using quantitative mass spectrometry. *Curr Opin Biotechnol*, **19**, 331-337.
- 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**, 883-890.
- Walling, D.M., Ray, A.J., Nichols, J.E., Flaitz, C.M. and Nichols, C.M. (2007) Epstein-Barr virus infection of Langerhans cell precursors as a mechanism of oral epithelial entry, persistence, and reactivation. *J Virol*, **81**, 7249-7268.
- Walters, R.W., Freimuth, P., Moninger, T.O., Ganske, I., Zabner, J. and Welsh, M.J. (2002) Adenovirus fiber disrupts CAR-mediated intercellular adhesion allowing virus escape. *Cell*, **110**, 789-799.
- Wang, F., Petti, L., Braun, D., Seung, S. and Kieff, E. (1987) A bicistronic Epstein-Barr virus mRNA encodes two nuclear proteins in latently infected, growth-transformed lymphocytes. *J Virol*, **61**, 945-954.
- Wang, F.Z., Roy, D., Gershburg, E., Whitehurst, C.B., Dittmer, D.P. and Pagano, J.S. (2009) Maribavir inhibits epstein-barr virus transcription in addition to viral DNA replication. *J Virol*, **83**, 12108-12117.
- Wang, P., Day, L., Dheekollu, J. and Lieberman, P.M. (2005) A redox-sensitive cysteine in Zta is required for Epstein-Barr virus lytic cycle DNA replication. *J Virol*, **79**, 13298-13309.
- Wang, Q., He, J., Meng, L., Liu, Y., Pu, H. and Ji, J. (2010) A proteomics analysis of rat liver membrane skeletons: the investigation of actin- and cytokeratin-based protein components. *J Proteome Res*, **9**, 22-29.
- Weber, C., Fraemohs, L. and Dejana, E. (2007) The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol*, **7**, 467-477.
- Westphal, E.M., Blackstock, W., Feng, W., Israel, B. and Kenney, S.C. (2000) Activation of lytic Epstein-Barr virus (EBV) infection by radiation and sodium butyrate in vitro and in vivo: a potential method for treating EBV-positive malignancies. *Cancer Res*, **60**, 5781-5788.
- Westphal, J.K., Dorfel, M.J., Krug, S.M., Cording, J.D., Piontek, J., Blasig, I.E., Tauber, R., Fromm, M. and Huber, O. (2010) Tricellulin forms homomeric and heteromeric tight junctional complexes. *Cell Mol Life Sci*, **67**, 2057-2068.
- Wu, C.C., Liu, M.T., Chang, Y.T., Fang, C.Y., Chou, S.P., Liao, H.W., Kuo, K.L., Hsu, S.L., Chen, Y.R., Wang, P.W., Chen, Y.L., Chuang, H.Y., Lee, C.H., Chen, M., Wayne Chang, W.S. and Chen, J.Y. (2010) Epstein-Barr virus DNase (BGLF5) induces genomic instability in human epithelial cells. *Nucleic Acids Res*, **38**, 1932-1949.
- Wu, F.Y., Chen, H., Wang, S.E., ApRhys, C.M., Liao, G., Fujimuro, M., Farrell, C.J., Huang, J., Hayward, S.D. and Hayward, G.S. (2003) CCAAT/enhancer binding protein alpha interacts with ZTA and mediates ZTA-induced p21(CIP-1) accumulation and G(1) cell cycle arrest during the Epstein-Barr virus lytic cycle. *J Virol*, **77**, 1481-1500.
- Wu, F.Y., Wang, S.E., Chen, H., Wang, L., Hayward, S.D. and Hayward, G.S. (2004) CCAAT/enhancer binding protein alpha binds to the Epstein-Barr virus (EBV) ZTA protein through oligomeric interactions and contributes to cooperative transcriptional activation of the ZTA promoter through direct binding to the ZII and ZIIIB motifs during induction of the EBV lytic cycle. *J Virol*, **78**, 4847-4865.

- Xia, X., Cheng, A., Lessor, T., Zhang, Y. and Hamburger, A.W. (2001) Ebp1, an ErbB-3 binding protein, interacts with Rb and affects Rb transcriptional regulation. *J Cell Physiol*, **187**, 209-217.
- Xiao, J., Palefsky, J.M., Herrera, R., Berline, J. and Tugizov, S.M. (2008) The Epstein-Barr virus BMRF-2 protein facilitates virus attachment to oral epithelial cells. *Virology*, **370**, 430-442.
- Xiao, J., Palefsky, J.M., Herrera, R., Berline, J. and Tugizov, S.M. (2009) EBV BMRF-2 facilitates cell-to-cell spread of virus within polarized oral epithelial cells. *Virology*, **388**, 335-343.
- Xing, H., Mayhew, C.N., Cullen, K.E., Park-Sarge, O.K. and Sarge, K.D. (2004) HSF1 modulation of Hsp70 mRNA polyadenylation via interaction with symplekin. *J Biol Chem*, **279**, 10551-10555.
- Xue, S.A., Labrecque, L.G., Lu, Q.L., Ong, S.K., Lampert, I.A., Kazembe, P., Molyneux, E., Broadhead, R.L., Borgstein, E. and Griffin, B.E. (2002) Promiscuous expression of Epstein-Barr virus genes in Burkitt's lymphoma from the central African country Malawi. *Int J Cancer*, **99**, 635-643.
- Yamada, A., Fujita, N., Sato, T., Okamoto, R., Ooshio, T., Hirota, T., Morimoto, K., Irie, K. and Takai, Y. (2006) Requirement of nectin, but not cadherin, for formation of claudin-based tight junctions in annexin II-knockdown MDCK cells. *Oncogene*, **25**, 5085-5102.
- Yang-Yen, H.F., Zhang, X.K., Graupner, G., Tzukerman, M., Sakamoto, B., Karin, M. and Pfahl, M. (1991) Antagonism between retinoic acid receptors and AP-1: implications for tumor promotion and inflammation. *New Biol*, **3**, 1206-1219.
- Yoo, J.Y., Wang, X.W., Rishi, A.K., Lessor, T., Xia, X.M., Gustafson, T.A. and Hamburger, A.W. (2000) Interaction of the PA2G4 (EBP1) protein with ErbB-3 and regulation of this binding by heregulin. *Br J Cancer*, **82**, 683-690.
- Yoshizaki, T., Horikawa, T., Qing-Chun, R., Wakisaka, N., Takeshita, H., Sheen, T.S., Lee, S.Y., Sato, H. and Furukawa, M. (2001) Induction of interleukin-8 by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 and its correlation to angiogenesis in nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res*, **7**, 1946-1951.
- Yoshizaki, T., Sato, H., Muroso, S., Pagano, J.S. and Furukawa, M. (1999) Matrix metalloproteinase 9 is induced by the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator. *Clin Exp Metastasis*, **17**, 431-436.
- Young, L.S., Lau, R., Rowe, M., Niedobitek, G., Packham, G., Shanahan, F., Rowe, D.T., Greenspan, D., Greenspan, J.S., Rickinson, A.B. and et al. (1991) Differentiation-associated expression of the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator protein in oral hairy leukoplakia. *J Virol*, **65**, 2868-2874.
- Young, L.S. and Rickinson, A.B. (2004) Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*, **4**, 757-768.
- Yu, A.S., McCarthy, K.M., Francis, S.A., McCormack, J.M., Lai, J., Rogers, R.A., Lynch, R.D. and Schneeberger, E.E. (2005) Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **288**, C1231-1241.
- Yu, D. and Turner, J.R. (2008) Stimulus-induced reorganization of tight junction structure: the role of membrane traffic. *Biochim Biophys Acta*, **1778**, 709-716.
- Yu, X., Wang, Z. and Mertz, J.E. (2007) ZEB1 regulates the latent-lytic switch in infection by Epstein-Barr virus. *PLoS Pathog*, **3**, e194.
- Zerby, D., Chen, C.J., Poon, E., Lee, D., Shiekhatar, R. and Lieberman, P.M. (1999) The amino-terminal C/H1 domain of CREB binding protein mediates zta transcriptional activation of latent Epstein-Barr virus. *Mol Cell Biol*, **19**, 1617-1626.
- Zhang, Q., Gutsch, D. and Kenney, S. (1994) Functional and physical interaction between p53 and BZLF1: implications for Epstein-Barr virus latency. *Mol Cell Biol*, **14**, 1929-1938.

ANNEXES

Annexe 1: Ensemble des protéines identifiées par GST pull-down

pep (number of peptides)
SC (relevant+ duplicated)

description	accession	MB fraction						S2 fraction						S1 fraction					
		MB_GST control			MB_GST-Ubn			S2_GST control			S2_GST-Ubn			S1_GST control			S1_GST-Ubn		
		band	Pep	SC	band	Pep	SC	band	Pep	SC	band	Pep	SC	band	Pep	SC	band	Pep	SC
sp Q9NPG3 UBN1_HUMAN Ubinuclein-1 OS=Homo sapiens GN=UBN1 PE=1 SV=2	UBN1_HUMAN				1	25	28				1	37	62				1	41	88
					2	29	70				2	29	77				2	37	143
					3	15	56				3	18	55				3	26	116
					4	9	14				4	10	21				4	19	63
					5	2	2										5	9	19
																	6	5	7
sp Q00341 VIGLN_HUMAN Vigilin OS=Homo sapiens GN=HDLBP PE=1 SV=2	VIGLN_HUMAN				1	4	4				1	2	2				1	7	7
sp P25398 RS12_HUMAN 40S ribosomal protein S12 OS=Homo sapiens GN=RPS12 PE=1 SV=3	RS12_HUMAN				4	2	2				4	2	2				6	2	3
					5	2	3												
sp P55795 HNRH2_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2 OS=Homo sapiens GN=HNRNPH2 PE=1 SV=1	HNRH2_HUMAN				3	3	4				3	4	6				4	2	3
sp P62244 RS15A_HUMAN 40S ribosomal protein S15a OS=Homo sapiens GN=RPS15A PE=1 SV=2	RS15A_HUMAN										4	2	2						
					5	3	4				5	5	7				6	2	3
sp P46781 RS9_HUMAN 40S ribosomal protein S9 OS=Homo sapiens GN=RPS9 PE=1 SV=3	RS9_HUMAN				4	5	6				4	3	3				5	7	8
																	6	2	2
sp O00571 DDX3X_HUMAN ATP-dependent RNA helicase DDX3X OS=Homo sapiens GN=DDX3X PE=1 SV=3	DDX3X_HUMAN				2	3	4				2	6	6				3	4	5
					3	2	3				3	9	11						
sp P62851 RS25_HUMAN 40S ribosomal protein S25 OS=Homo sapiens GN=RPS25 PE=1 SV=1	RS25_HUMAN				4	2	2				4	2	2				5	2	2
																	6	2	2
sp P09651 ROA1_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA1 PE=1 SV=4	ROA1_HUMAN				3	8	12				3	2	2				4	3	4
					4	6	6				4	3	4						
sp P62829 RL23_HUMAN 60S ribosomal protein L23 OS=Homo sapiens GN=RPL23 PE=1 SV=1	RL23_HUMAN				4	2	4				4	2	5				6	2	6
					5	2	5												
sp P62249 RS16_HUMAN 40S ribosomal protein S16 OS=Homo sapiens GN=RPS16 PE=1 SV=2	RS16_HUMAN				4	3	3				4	4	9				5	2	2
					5	2	2				5	2	2				6	5	6
sp Q92499 DDX1_HUMAN ATP-dependent RNA helicase DDX1 OS=Homo sapiens GN=DDX1 PE=1 SV=2	DDX1_HUMAN				2	4	4				2	7	7						
sp P15880 RS2_HUMAN 40S ribosomal protein S2 OS=Homo sapiens GN=RPS2 PE=1 SV=2	RS2_HUMAN				4	3	3										5	2	2
sp P27635 RL10_HUMAN 60S ribosomal protein L10 OS=Homo sapiens GN=RPL10 PE=1 SV=4	RL10_HUMAN				4	2	3										5	3	4
sp P62280 RS11_HUMAN 40S ribosomal protein S11 OS=Homo sapiens GN=RPS11 PE=1 SV=3	RS11_HUMAN				4	2	2										5	2	2
sp P84098 RL19_HUMAN 60S ribosomal protein L19 OS=Homo sapiens GN=RPL19 PE=1 SV=1	RL19_HUMAN				4	2	2										5	2	2
sp O60841 IF2P_HUMAN Eukaryotic translation initiation factor 5B OS=Homo sapiens GN=EIF5B PE=1 SV=3	IF2P_HUMAN										1	3	3				1	7	8
sp P61247 RS3A_HUMAN 40S ribosomal protein S3a OS=Homo sapiens GN=RPS3A PE=1 SV=2	RS3A_HUMAN										4	2	3				5	5	7
sp Q13428 TCOF_HUMAN Treacle protein OS=Homo sapiens GN=TCOF1 PE=1 SV=2	TCOF_HUMAN				1	8	10				1	2	2						
sp P83731 RL24_HUMAN 60S ribosomal protein L24 OS=Homo sapiens GN=RPL24 PE=1 SV=1	RL24_HUMAN				4	3	4				4	2	3						
sp P60866 RS20_HUMAN 40S ribosomal protein S20 OS=Homo sapiens GN=RPS20 PE=1 SV=1	RS20_HUMAN				4	2	2										6	2	3
					5	3	3												
sp P52597 HNRPF_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F OS=Homo sapiens GN=HNRNPF PE=1 SV=3	HNRPF_HUMAN										3	7	8				3	4	5
																	4	4	5
sp P42766 RL35_HUMAN 60S ribosomal protein L35 OS=Homo sapiens GN=RPL35 PE=1 SV=2	RL35_HUMAN										4	2	2				5	2	2
																	6	2	2
sp Q14103 HNRPD_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 OS=Homo sapiens GN=HNRNPD PE=1 SV=1	HNRPD_HUMAN				3	2	3				3	2	2						
sp P35268 RL22_HUMAN 60S ribosomal protein L22 OS=Homo sapiens GN=RPL22 PE=1 SV=2	RL22_HUMAN										5	2	3				6	3	4
sp P67809 YBOX1_HUMAN Nuclease-sensitive element-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=YBX1 PE=1 SV=3	YBOX1_HUMAN				3	4	4										3	2	4
sp Q01082 SPTB2_HUMAN Spectrin beta chain, brain 1 OS=Homo sapiens GN=SPTBN1 PE=1 SV=2	SPTB2_HUMAN				1	2	2												
sp Q04637 IF4G1_HUMAN Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 OS=Homo sapiens GN=EIF4G1 PE=1 SV=3	IF4G1_HUMAN				1	4	4												
sp Q13151 ROA0_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0 OS=Homo sapiens GN=HNRNPA0 PE=1 SV=1	ROA0_HUMAN				3	3	3												
					4	3	3												
sp Q14152 EIF3A_HUMAN Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A OS=Homo sapiens GN=EIF3A PE=1 SV=1	EIF3A_HUMAN				1	6	6												
sp Q14157 UBP2L_HUMAN Ubiquitin-associated protein 2-like OS=Homo sapiens GN=UBAP2L PE=1 SV=2	UBP2L_HUMAN				2	3	3												
sp Q14573 ITPR3_HUMAN Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 OS=Homo sapiens GN=ITPR3 PE=1 SV=2	ITPR3_HUMAN				1	4	4												
sp Q6Y7W6 PERQ2_HUMAN PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=GIGYF2 PE=1 SV= PERQ2_HUMAN	PERQ2_HUMAN				1	2	3												

sp Q92616 GCN1L_HUMAN Translational activator GCN1 OS=Homo sapiens GN=GCN1L1 PE=1 SV=5	GCN1L_HUMAN	1	21	23					
tr B4DDB6 B4DDB6_HUMAN Microsomal glutathione S-transferase 1 OS=Homo sapiens GN=MGST1 PE=1 SV=1	B4DDB6_HUMAN	3	6	8					
sp P46783 RS10_HUMAN 40S ribosomal protein S10 OS=Homo sapiens GN=RPS10 PE=1 SV=1	RS10_HUMAN	4	2	2					
sp P63244 GBLP_HUMAN Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 OS=Homo sapiens GN=GNB2L1 PE=1 SV=3	GBLP_HUMAN RACK1	4	2	2					
sp P63220 RS21_HUMAN 40S ribosomal protein S21 OS=Homo sapiens GN=RPS21 PE=1 SV=1	RS21_HUMAN	5	3	8					
sp P10620 MGST1_HUMAN Microsomal glutathione S-transferase 1 OS=Homo sapiens GN=MGST1 PE=1 SV=1	MGST1_HUMAN	5	2	6					
sp P62888 RL30_HUMAN 60S ribosomal protein L30 OS=Homo sapiens GN=RPL30 PE=1 SV=2	RL30_HUMAN	5	4	4					
sp P62314 SMD1_HUMAN Small nuclear ribonucleoprotein Sm D1 OS=Homo sapiens GN=SNRPD1 PE=1 SV=1	SMD1_HUMAN	5	2	2					
tr Q59H46 Q59H46_HUMAN Integrin beta (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	Q59H46_HUMAN	1	4	4					
sp P08865 RSSA_HUMAN 40S ribosomal protein SA OS=Homo sapiens GN=RPSA PE=1 SV=4	RSSA_HUMAN	3	4	5					
sp P11940 PABP1_HUMAN Polyadenylate-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=PABPC1 PE=1 SV=2	PABP1_HUMAN	2	2	2					
sp P14866 HNRPL_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L OS=Homo sapiens GN=HNRNPL PE=1 SV=2	HNRPL_HUMAN	3	2	2					
sp P26038 MOES_HUMAN Moesin OS=Homo sapiens GN=MSN PE=1 SV=3	MOES_HUMAN	2	4	5					
sp Q01844 EWS_HUMAN RNA-binding protein EWS OS=Homo sapiens GN=EWSR1 PE=1 SV=1	EWS_HUMAN	2	2	4					
sp O60287 NPA1P_HUMAN Nucleolar pre-ribosomal-associated protein 1 OS=Homo sapiens GN=URB1 PE=1 SV=3	NPA1P_HUMAN	1	3	3					
sp O75691 UTP20_HUMAN Small subunit processome component 20 homolog OS=Homo sapiens GN=UTP20 PE=1 SV=2	UTP20_HUMAN	1	7	7					
sp P35637 FUS_HUMAN RNA-binding protein FUS OS=Homo sapiens GN=FUS PE=1 SV=1	FUS_HUMAN	2	4	6					
sp P51659 DHB4_HUMAN Peroxisomal multifunctional enzyme type 2 OS=Homo sapiens GN=HSD17B4 PE=1 SV=3	DHB4_HUMAN	2	4	4					
sp P55011 S12A2_HUMAN Solute carrier family 12 member 2 OS=Homo sapiens GN=SLC12A2 PE=1 SV=1	S12A2_HUMAN	1	4	4					
sp Q9BZE4 NOG1_HUMAN Nucleolar GTP-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=GTPBP4 PE=1 SV=3	NOG1_HUMAN	2	3	3					
sp Q9H8H0 NOL11_HUMAN Nucleolar protein 11 OS=Homo sapiens GN=NOL11 PE=1 SV=1	NOL11_HUMAN	2	2	2					
sp O43390 HNRPR_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R OS=Homo sapiens GN=HNRNPR PE=1 SV=1	HNRPR_HUMAN	3	3	3					
sp P11166 GTR1_HUMAN Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1 OS=Homo sapiens GN=SLC2A1 PE=1 SV=2	GTR1_HUMAN	1	2	2					
sp Q8NC51 PAIRB_HUMAN Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein OS=Homo sapiens GN=SERBP1 PE=1 SV=2	PAIRB_HUMAN	3	2	2					
sp Q9UQ80 PA2G4_HUMAN Proliferation-associated protein 2G4 OS=Homo sapiens GN=PA2G4 PE=1 SV=3	PA2G4_HUMAN	3	2	2					
sp Q9Y5J1 UTP18_HUMAN U3 small nucleolar RNA-associated protein 18 homolog OS=Homo sapiens GN=UTP18 PE=1 SV=3	UTP18_HUMAN	3	2	3					
tr B3KNN5 B3KNN5_HUMAN cDNA FLJ30038 fis, clone 3NB692001511, highly similar to Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B (HNRPAB), transcript variant 2, mRNA OS=Homo sapiens GN=HNRPAB PE=2 SV=1	B3KNN5_HUMAN	3	2	2					
sp P62917 RL8_HUMAN 60S ribosomal protein L8 OS=Homo sapiens GN=RPL8 PE=1 SV=2	RL8_HUMAN	4	3	4					
sp P18124 RL7_HUMAN 60S ribosomal protein L7 OS=Homo sapiens GN=RPL7 PE=1 SV=1	RL7_HUMAN	4	3	3					
sp P62906 RL10A_HUMAN 60S ribosomal protein L10a OS=Homo sapiens GN=RPL10A PE=1 SV=2	RL10A_HUMAN	4	2	2					
sp Q86V81 THOC4_HUMAN THO complex subunit 4 OS=Homo sapiens GN=THOC4 PE=1 SV=3	THOC4_HUMAN	4	2	2					
sp P39019 RS19_HUMAN 40S ribosomal protein S19 OS=Homo sapiens GN=RPS19 PE=1 SV=2	RS19_HUMAN	4	2	2					
		5	2	3					
sp P46782 RS5_HUMAN 40S ribosomal protein S5 OS=Homo sapiens GN=RPS5 PE=1 SV=4	RS5_HUMAN	4	2	2					
sp P61353 RL27_HUMAN 60S ribosomal protein L27 OS=Homo sapiens GN=RPL27 PE=1 SV=2	RL27_HUMAN	4	2	2					
sp Q9NPE3 NOP10_HUMAN H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 3 OS=Homo sapiens GN=NOP10 PE=1 SV=1	NOP10_HUMAN	5	3	4					
sp P42677 RS27_HUMAN 40S ribosomal protein S27 OS=Homo sapiens GN=RPS27 PE=1 SV=3	RS27_HUMAN	5	2	4					
sp P62316 SMD2_HUMAN Small nuclear ribonucleoprotein Sm D2 OS=Homo sapiens GN=SNRPD2 PE=1 SV=1	SMD2_HUMAN	5	2	2					
sp O60812 HNRCL_HUMAN Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1 OS=Homo sapiens GN=HNRNPCL1 PE=1 SV=1	HNRCL_HUMAN	3	3	3					
sp P46940 IQGA1_HUMAN Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 OS=Homo sapiens GN=IQGAP1 PE=1 SV=1	IQGA1_HUMAN	1	6	7					
sp O75534 CSDE1_HUMAN Cold shock domain-containing protein E1 OS=Homo sapiens GN=CSDE1 PE=1 SV=2	CSDE1_HUMAN	2	3	4					
sp Q9Y3I0 CV028_HUMAN UPF0027 protein C22orf28 OS=Homo sapiens GN=C22orf28 PE=1 SV=1	CV028_HUMAN	3	4	6					
sp Q14258 TRI25_HUMAN Tripartite motif-containing protein 25 OS=Homo sapiens GN=TRIM25 PE=1 SV=1	TRI25_HUMAN	3	2	2					
sp Q52LJ0 FA98B_HUMAN Protein FAM98B OS=Homo sapiens GN=FAM98B PE=1 SV=1	FA98B_HUMAN	3	2	2					
sp Q9NQ39 RS10L_HUMAN Putative 40S ribosomal protein S10-like protein OS=Homo sapiens GN=RPS10P5 PE=5 SV=1	RS10L_HUMAN	4	2	2					
sp Q9Y224 CN166_HUMAN UPF0568 protein C14orf166 OS=Homo sapiens GN=C14orf166 PE=1 SV=1	CN166_HUMAN	4	2	2					
sp Q08J23 NSUN2_HUMAN tRNA (cytosine-5-)-methyltransferase NSUN2 OS=Homo sapiens GN=NSUN2 PE=1 SV=2	NSUN2_HUMAN	2	2	2					
sp Q71UM5 RS27L_HUMAN 40S ribosomal protein S27-like protein OS=Homo sapiens GN=RPS27L PE=1 SV=3	RS27L_HUMAN	5	3	4					
sp P55265 DSRAD_HUMAN Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase OS=Homo sapiens GN=ADAR PE=1 SV=3	DSRAD_HUMAN	1	2	2					
sp Q5K651 SAMMD9_HUMAN Sterile alpha motif domain-containing protein 9 OS=Homo sapiens GN=SAMD9 PE=1 SV=1	SAMD9_HUMAN	1	2	2					
sp Q12797 ASPH_HUMAN Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase OS=Homo sapiens GN=ASPH PE=1 SV=3	ASPH_HUMAN	2	2	3					
sp Q72W4 ZCCHV_HUMAN Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1 OS=Homo sapiens GN=ZC3HAV1 PE=1 SV=3	ZCCHV_HUMAN	2	2	2					
tr O00164 O00164_HUMAN Ribosomal RNA upstream binding transcription factor (Fragment) OS=Homo sapiens GN=UBTF PE=4 SV=	O00164_HUMAN	2	3	3					
sp Q5SSJ5 HP1B3_HUMAN Heterochromatin protein 1-binding protein 3 OS=Homo sapiens GN=HP1BP3 PE=1 SV=1	HP1B3_HUMAN	2	2	2					
sp Q86UE4 LYRIC_HUMAN Protein LYRIC OS=Homo sapiens GN=MTDH PE=1 SV=2	LYRIC_HUMAN	2	2	2					

sp Q9NW13 RBM28_HUMAN RNA-binding protein 28 OS=Homo sapiens GN=RBM28 PE=1 SV=3	RBM28_HUMAN	2	3	4	2	2	2				
sp Q9P2E9 RRBP1_HUMAN Ribosome-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=RRBP1 PE=1 SV=4	RRBP1_HUMAN	1	4	4	1	12	14				
sp Q9Y2X3 NOP58_HUMAN Nucleolar protein 58 OS=Homo sapiens GN=NOP58 PE=1 SV=1	NOP58_HUMAN	3	5	9	3	6	6				
sp Q9Y3U8 RL36_HUMAN 60S ribosomal protein L36 OS=Homo sapiens GN=RPL36 PE=1 SV=3	RL36_HUMAN	5	2	4	5	3	5				
tr B2RWN5 B2RWN5_HUMAN HEAT repeat containing 1 OS=Homo sapiens GN=HEATR1 PE=2 SV=1	B2RWN5_HUMAN	1	7	7	1	11	13				
tr Q59F66 Q59F66_HUMAN DEAD box polypeptide 17 isoform p82 variant (Fragment) OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	Q59F66_HUMAN	2	4	4	2	9	11				
		3	3	4							
sp P08238 HS90B_HUMAN Heat shock protein HSP 90-beta OS=Homo sapiens GN=HSP90A1 PE=1 SV=4	HS90B_HUMAN		2	4	4			2	8	8	
sp P11142 HSP7C_HUMAN Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSPA8 PE=1 SV=1	HSP7C_HUMAN		2	3	3			2	2	3	
			3	3	4			3	3	4	
			3	4	5			3	2	3	
sp P08107 HSP71_HUMAN Heat shock 70 kDa protein 1 OS=Homo sapiens GN=HSPA1A PE=1 SV=5	HSP71_HUMAN										
sp O60832 DKC1_HUMAN H/ACA ribonucleoprotein complex subunit 4 OS=Homo sapiens GN=DKC1 PE=1 SV=3	DKC1_HUMAN	3	2	2							
sp O76021 RL1D1_HUMAN Ribosomal L1 domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=RSL1D1 PE=1 SV=3	RL1D1_HUMAN	2	5	6							
sp P02545 LMNA_HUMAN Lamin-A/C OS=Homo sapiens GN=LMNA PE=1 SV=1	LMNA_HUMAN	3	2	2							
sp P30050 RL12_HUMAN 60S ribosomal protein L12 OS=Homo sapiens GN=RPL12 PE=1 SV=1	RL12_HUMAN	4	3	3							
sp P34931 HS71L_HUMAN Heat shock 70 kDa protein 1L OS=Homo sapiens GN=HSPA1L PE=1 SV=2	HS71L_HUMAN	3	3	3							
sp P35221 CTNA1_HUMAN Catenin alpha-1 OS=Homo sapiens GN=CTNNA1 PE=1 SV=1	CTNA1_HUMAN	2	2	2							
sp P40429 RL13A_HUMAN 60S ribosomal protein L13a OS=Homo sapiens GN=RPL13A PE=1 SV=2	RL13A_HUMAN	4	2	2							
sp P62857 RS28_HUMAN 40S ribosomal protein S28 OS=Homo sapiens GN=RPS28 PE=1 SV=1	RS28_HUMAN	5	2	2							
sp Q5QJE6 TDIF2_HUMAN Deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein 2 OS=Homo sapiens GN=DNTTIP2 PE=1 SV=2	TDIF2_HUMAN	2	2	2							
sp Q8NI36 WDR36_HUMAN WD repeat-containing protein 36 OS=Homo sapiens GN=WDR36 PE=1 SV=1	WDR36_HUMAN	2	6	7							
sp Q8TDN6 BXDC2_HUMAN Brix domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=BXDC2 PE=1 SV=2	BXDC2_HUMAN	3	2	2							
sp Q8WTT2 NOC3L_HUMAN Nucleolar complex protein 3 homolog OS=Homo sapiens GN=NOC3L PE=1 SV=1	NOC3L_HUMAN	2	2	3							
sp Q8WXF1 PSPC1_HUMAN Paraspeckle component 1 OS=Homo sapiens GN=PSPC1 PE=1 SV=1	PSPC1_HUMAN	3	3	3							
sp Q969X6 CIR1A_HUMAN Cihrin OS=Homo sapiens GN=CIRH1A PE=1 SV=1	CIR1A_HUMAN	3	2	2							
sp Q9BVJ6 UT14A_HUMAN U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A OS=Homo sapiens GN=UTP14A PE=1 SV=1	UT14A_HUMAN	2	4	4							
sp Q9H6R4 NOL6_HUMAN Nucleolar protein 6 OS=Homo sapiens GN=NOL6 PE=1 SV=2	NOL6_HUMAN	2	4	4							
sp Q9UMS4 PRP19_HUMAN Pre-mRNA-processing factor 19 OS=Homo sapiens GN=PRPF19 PE=1 SV=1	PRP19_HUMAN	3	2	2							
tr B4E3B6 B4E3B6_HUMAN cDNA FLJ54408, highly similar to Heat shock 70 kDa protein 1 OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	B4E3B6_HUMAN		2	4	4						
tr Q96RE1 Q96RE1_HUMAN Elongation factor 1-alpha OS=Homo sapiens GN=EEF1A1L14 PE=2 SV=1	Q96RE1_HUMAN		3	4	5						
sp P11413 G6PD_HUMAN Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=G6PD PE=1 SV=4	G6PD_HUMAN		3	4	4						
sp P26641 EF1G_HUMAN Elongation factor 1-gamma OS=Homo sapiens GN=EEF1G PE=1 SV=3	EF1G_HUMAN		3	4	4						
sp P68371 TBB2C_HUMAN Tubulin beta-2C chain OS=Homo sapiens GN=TUBB2C PE=1 SV=1	TBB2C_HUMAN		3	3	4						
sp Q71U36 TBA1A_HUMAN Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1A PE=1 SV=1	TBA1A_HUMAN		3	2	2						
sp P07900 HS90A_HUMAN Heat shock protein HSP 90-alpha OS=Homo sapiens GN=HSP90AA1 PE=1 SV=5	HS90A_HUMAN							2	6	7	
sp P14625 ENPL_HUMAN Endoplasmic reticulum protein OS=Homo sapiens GN=HSP90B1 PE=1 SV=1	ENPL_HUMAN							2	2	2	
sp P10809 CH60_HUMAN 60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2	CH60_HUMAN							3	2	2	
tr B2RDE1 B2RDE1_HUMAN cDNA, FLJ96568, highly similar to Homo sapiens tropomyosin 3 (TPM3), mRNA OS=Homo sapiens PE=2 SV=1	B2RDE1_HUMAN							4	3	3	
sp P00338 LDHA_HUMAN L-lactate dehydrogenase A chain OS=Homo sapiens GN=LDHA PE=1 SV=2	LDHA_HUMAN							4	3	3	
sp P60660 MYL6_HUMAN Myosin light polypeptide 6 OS=Homo sapiens GN=MYL6 PE=1 SV=2	MYL6_HUMAN							5	2	2	
sp P14649 MYL6B_HUMAN Myosin light chain 6B OS=Homo sapiens GN=MYL6B PE=1 SV=1	MYL6B_HUMAN							6	2	3	