Etude des mécanismes de résistance à l'apoptose induits par le virus d'Epstein-Barr et mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des lymphomes B

Anaïs Pujals

▶ **To cite this version:**

Anaïs Pujals. Etude des mécanismes de résistance à l'apoptose induits par le virus d'Epstein-Barr et mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des lymphomes B. Biologie cellulaire. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA11T054 . tel-00767146

HAL Id: tel-00767146

https://theses.hal.science/tel-00767146

Submitted on 19 Dec 2012

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

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

UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS SUD

2012 N°attribué par la bibliothèque :

THESE
Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI
Champs Disciplinaires : Pharmacologie, Biologie cellulaire et moléculaire
ECOLE DOCTORALE DE CANCEROLOGIE

Présentée et soutenue publiquement par
Anaïs PUJALS
Le 4 octobre 2012

Etude des mécanismes de résistance à l'apoptose induits par le virus d'Epstein-Barr et mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des lymphomes B

Directrice de thèse : Dr Joëlle Wiels

Jury

Dr Patrice CODOGNO	Président
Pr Véronique LEBLOND	Rapporteuse
Dr Bernard MIGNOTTE	Rapporteur
Dr Patricia VRIGNAUD	Examinatrice
Dr Henri GRUFFAT	Examinateur
Dr Joëlle WIELS	Directrice de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail. Je remercie sincèrement le Docteur Patrice Codogno qui me fait l'honneur de présider le jury de cette thèse. J'adresse également toute ma gratitude aux Professeurs Véronique Leblond et Bernard Mignotte pour le temps qu'ils ont consacré à l'examen de ce manuscrit. Enfin, je remercie chaleureusement les Docteurs Patricia Vrignaud et Henri Gruffat pour leur présence en qualité d'examinateurs au sein de ce jury.

Je remercie très sincèrement le Docteur Joëlle Wiels de m'avoir donné l'opportunité de réaliser une thèse au sein de son équipe. Merci Joëlle pour tes conseils, pour la liberté que tu m'as accordée afin de mener ce travail. Je te remercie de m'avoir fait confiance, notamment en ce qui concerne les expériences *in vivo*. Je tiens également à te remercier de m'avoir permis d'élargir mes connaissances sur mon sujet en participant à plusieurs congrès en France ou à l'étranger. Un grand merci enfin pour ta sympathie.

Je remercie très chaleureusement le Docteur Evelyne May, pour ses nombreux conseils très enrichissants durant ces quatre années de thèse mais également pour le travail de relecture et de correction réalisé sur ce manuscrit. Un grand merci Evelyne pour votre gentillesse et pour votre aide très précieuse.

J'exprime également ma reconnaissance au Docteur Marc Lipinski pour son soutien et ses conseils. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné l'opportunité de m'initier à l'enseignement en M2 !

Je tiens à remercier plus particulièrement les membres de mon équipe. Je remercie très sincèrement le Professeur Martine Raphaël pour ses conseils sur le côté clinique et appliqué de ce travail mais également pour avoir initié cette belle collaboration avec l'équipe de Françoise Guéritte. Mille mercis à Aude Robert, dont l'aide et le soutien ont été très précieux pendant ces quatre années. Merci pour tes conseils, pour les multiples discussions scientifiques ou non qui m'ont permis d'avancer…Merci pour les heures passées entre l'animalerie de l'IGR ou de la Pitié à mesurer, tatouer ou traiter nos petites souris. Merci aussi pour les moments sympas passés entre Tours, Beaune, Amsterdam ou même à la salle de sport de l'IGR (la grenouille et le héron me manqueront) ! Je te suis extrêmement reconnaissante et te souhaite plein de réussite et de bonnes choses pour la suite. Je remercie également Sonia Chelouah, qui a partagé avec moi pendant ces quatre années les joies et les peines de la thèse ! Je te souhaite plein de bonheur avec ta petite famille et ton petit Loulou et un bel avenir dans la recherche. Un grand merci à Loetitia Favre qui m'a beaucoup aidée pour faire avancer ce projet durant ses deux stages de master. Merci pour ton aide et pour ta gentillesse. C'est maintenant à toi que revient la tâche d'élucider les mystères restés inexpliqués…je te fais confiance pour ça! Je te souhaite un bel avenir, plein de bonnes choses et que la force soit avec toi pour les 3 ou 4 années à venir. Je remercie très chaleureusement Justine Debernardi qui a rejoint l'équipe pour son M2 et qui se lance aussi dans l'aventure de la thèse ! Merci pour ta gentillesse, ta bonne humeur et ton grand talent de mime interprète !

Mes pensées vont également vers ceux qui sont partis de l'équipe : Je remercie Thomas Désille pour le travail et l'aide qu'il m'a apportée en fin de thèse. Merci pour ces quelques mois passés en grande partie à l'animalerie dans la bonne humeur (et la chanson souvent)!!! Un grand merci à Sandy Balkaran qui a mis son internat entre parenthèse pour venir goûter aux joies de la recherche pendant plusieurs mois dans notre équipe. Merci à toi pour tes conseils sur la partie clinique du projet, pour ta bonne humeur et pour les papotages. Je te souhaite plein de courage pour ta soutenance puis un bon retour parmi les parisiens et beaucoup de réussite dans tes nouvelles fonctions. Je tiens à remercier également Emilie Holville pour son aide précieuse durant mes premières années de thèse, pour sa sympathie et sa bonne humeur. Je remercie également Cécile Tétaud pour ses multiples conseils sur l'art de la culture cellulaire, je te souhaite une agréable retraite sous le soleil !

Je voudrais également remercier chaleureusement les membres de l'unité. Je remercie Pierre Busson pour ses suggestions et ses conseils, notamment sur les questions relatives à EBV. Merci à Catherine Durieu qui a contribué au projet sur l'autophagie en nous permettant de réaliser les expériences de microscopie électronique. Un grand merci à Anso Jimenez-Pailhès qui m'a beaucoup conseillé pour réaliser les premières expériences *in vivo* sur le projet. Merci pour tes conseils, ton aide et pour les bons moments passés durant ces quatre années. Je remercie aussi Mélanie Gressette pour sa sympathie ! Merci d'animer l'ambiance dans le labo autour de sujets d'actualité !!! Merci à Benjamin et François pour leur sympathie, pour toutes les petites anecdotes sur le monde de l'hôpital, pour les cours d'anatomie sur la sphère ORL et ceux sur les codes vestimentaires…Merci à Aurore pour sa gentillesse et toutes ses petites attentions! Une pensée pour les futurs docteurs de l'unité Charles-Henri Gattolliat (ou PCP c'est comme on veut) et Romain Algret (mon voisin de Thiais). Je vous souhaite du courage pour cette fin de thèse et beaucoup de joie et de réussite pour après. Merci à tous les membres de l'unité Chloé, Emilie, Licia, Andrei, Alex et ceux que je n'ai pas cité mais qui participent aussi à la bonne ambiance et à la convivialité qui règne dans les différents labos. Je remercie très sincèrement Sokhon, Bérénice, Dominique, Anissa et Muriel qui rendent (ou ont rendu) la vie au laboratoire bien plus facile.

Je souhaite également remercier les membres des différentes plateformes de l'IGR qui ont contribué également à la réalisation de certains projets. Un grand merci aux membres de l'Unité de Génomique Fonctionnelle de l'IGR et notamment à Thomas Robert et Guillaume Meurice pour leur sympathie, leur patience et leurs nombreuses explications sur le monde (parfois obscur pour moi) des statistiques en génomique. Je remercie également les membres de l'animalerie de l'IGR pour leur gentillesse et leur disponibilité. Merci à Aurélie Gasnier et Mélanie Polrot pour leur sympathie et pour l'aide technique qu'elles m'ont apportée. Merci à Sophie Salomé-Desnoulez pour les heures passées dans la bonne humeur devant le micoscope confocal à s'extasier sur les cellules vertes!

Je remercie également très sincèrement les membres de l'équipe de Françoise Guéritte, de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles, avec lesquels j'ai eu la chance de collaborer durant la fin de ma thèse. Merci à Fanny Roussi pour sa gentillesse, pour ses explications et sa grande motivation pour le projet. Merci à Jérémy Dardenne, qui a synthétisé la « Dardenine » (autrement appelée JD468). J'espère que cette collaboration se poursuivra et qu'elle aboutira à de beaux résultats.

Mes pensées vont également vers mes « frères et sœurs de thèse », ceux qui ont partagé avec moi toutes les péripéties de cette aventure depuis le M2 de cancérologie. Mille mercis à mon colocataire de labo, Clément Barjon, pour son faux air bougon, pour son amitié, pour les innombrables heures de papotage et de délires. Merci pour ces parties de DS endiablés, pour ces paris toujours tenus (il en reste un au mois de septembre, n'oublie pas !), pour tes talents de pâtissier chocolatier, pour avoir jouer au « croclem » quand il le fallait…Je te souhaite beaucoup de courage pour cette dernière ligne droite et un avenir radieux dans le monde des anticorps monoclonaux, car j'ai bien compris que « c'est l'avenir de la cancérologie ». Une très grosse pensée pour Aurélie Dupuy, ma partenaire de joies et de galères de thèse. Merci d'avoir été là et de m'avoir soutenue depuis notre passage au sein de l'ex FRE2939. Merci pour toutes ces soirées (desperate ou non) et séjours sympas passés en colocation entre Saint-Malo, Roscoff, Nice ou Orcière Merlette, j'espère qu'il y en aura beaucoup d'autres. Je te souhaite pleins de bonnes choses pour la suite, tant sur le plan professionnel que personnel et puis, avec un peu de chance on échappera peut être aux chèvres dans le Larzac qui sait ? Un immense merci à Thibault Carré pour sa gentillesse, son soutien, pour les nombreux débats et discussions et surtout pour sa bonne humeur sans faille. Merci de nous avoir initiés aux joies des soirées Bretonnes sur les plages de Roscoff et Saint Malo…Je te souhaite bonne chance pour la soutenance et beaucoup de bonheur pour la suite. Je vous remercie sincèrement tous les trois, ces quatre années n'auraient pas été les mêmes sans votre présence !

Je remercie également tous les étudiants croisés entre le M2 et la thèse pour leur sympathie, pour les services rendus et les conseils apportés : Merci à Christian, Agathe, Marie, Zaeem, Aurélie. Une grande pensée pour Muriel Nicoletti qui veille avec gentillesse et dévouement sur tous les doctorants de l'ED de cancérologie. Merci pout ta disponibilité, ta sympathie et ton soutien durant ces années.

Mille merci à Loubna Chadli, « ma grognasse », qui depuis cette journée botanique en première année de Fac à Jussieu, m'a accompagné dans ce parcours que ce soit à l'ENS, à Istem ou à l'ED de cancérologie. Merci d'avoir été là et d'avoir partagé autant de choses avec moi pendant toutes ces années. Je ne sais pas si on « sauvera le monde » comme le disait Stéphane Le Crom mais je te souhaite un très bel avenir, parce que tu le vaux bien…Un grand merci à mes Magnaldettes, Emilie Warrick et Elodie Burty pour leur amitié depuis ce stage de M2 passé ensemble chez Thierry. Merci les filles pour votre soutien sans faille, pour toutes ces soirées et ces délires qui nous ont changé les idées pendant ces cinq années. Je remercie très sincèrement Claire Janvier, qui m'a formée aux joies des expériences *in vivo* durant mon stage de M2 chez Sanofi. Merci pour ta grande pédagogie, ta gentillesse, ton dynamisme et ton amitié depuis.

Je remercie très chaleureusement mes amis qui ont été d'un très grand soutien. Merci à Cécilia Manent qui est présente pour moi depuis le lycée, merci pour ton amitié et pour tout ce chemin parcouru ensemble depuis si longtemps. Merci de m'avoir encouragée, de m'avoir changé les idées durant ces innombrables soirées, vacances ou cours de Zumba déchainés! Merci à Elodie Robillard (ou doudounette pour les intimes) qui nous a rejoint depuis la première année de Fac. Merci Elo d'être la voisine idéale pour décompresser après le labo lors nos soirées Picard/télé. Merci pour ton soutien et ton amitié. Merci à Doudou (voisin idéal aussi) qui m'a aidé dans ma détresse lors de l'impression du manuscrit.

Merci à mes deux « Loulou » Caro et Ju (compagnon de thèse mais dans un domaine plus abstrait pour moi), à Choum, Sandra, Claire, Yann, Nath pour tous les bons moments que nous avons partagés et qui m'ont permis de m'échapper.

Pour finir, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude envers ma famille. Merci à ma belle-famille de m'avoir encouragée. Un grand merci à mes grands parents pour leurs encouragements et leur soutien. Je remercie de tout cœur mes parents et mon frère sans qui je ne serai jamais arrivée là. Merci d'avoir été toujours à mes côtés et d'avoir cru en moi dans toutes les circonstances. Je ne vous remercierai jamais assez… mille mercis à vous 3. Enfin, je remercie infiniment Jérôme qui m'a constamment soutenue, rassurée et encouragée durant ces quatre années (et toutes celles qui ont précédé). Merci d'être à mes côtés au quotidien, de m'apprendre à relativiser et de me redonner le sourire quand j'en ai besoin. Merci d'être là, tout simplement et de croire en moi.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

SOMMAIRE **1**

LISTE DES FIGURES **6**

Introduction 6

Résultats/Discussion 7

LISTE DES TABLEAUX **7**

LISTE DES ABBREVIATIONS **9**

RESUME **12**

INTRODUCTION **13**

A. Le virus d'Epstein-Barr et ses pathologies associées 13

1. Généralités 13

a) Historique 13

b) Taxonomie 14

c) Structure du virus 14

d) Caractéristiques du génome viral 15

2. Cycle biologique du virus d'Epstein Barr 16

a) Mode de transmission 16

b) Physiologie de l'infection 17

c) Latence et maintien du génome 18

d) Le cycle lytique 20

3. Pathologies associées à EBV 21

a) La mononucléose infectieuse 21

b) Les lymphoprolifération malignes 22

* Le lymphome de Burkitt 22

* Les lymphoprolifération des sujets transplantés 25

* La maladie de Hodgkin 28

* Le lymphome T/NK extranodal de type nasal 28

c) Les prolifération épithéliales malignes 29

* Le carcinome du nasopharynx (NPC) 29

* Les carcinomes gastriques 31

4. Description des produits des gènes de latence et de leur pouvoir oncogénique .32

a) La protéine EBNA-1 32

b) La protéine EBNA-2 34

c) Les protéines EBNA-3 (- 3 A, - 3 B et - 3 C) 35

d) EBNA-LP (Epstein Barr virus Nuclear Antigen Leader Protein) 37

e) La protéine LMP-1 38

* LMP1 et voie NF-κB : 39

* LMP-1 et voie des MAP kinases : 41

* LMP-1 et voie des PI3 kinases : 41

f) Les protéines LMP-2A et -2B 42

g) Les ARN non codants 43

h) Les microARN 44

i) La protéine BHRF1 45

B. L'apoptose et l'autophagie : deux voies impliquées dans la régulation de la mort cellulaire 46

1. L'apoptose 46

a) Rôle physiologique de l'apoptose 46

b) Caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose 46

c) Les différentes voies de l'apoptose 93

* La voie extrinsèque de l'apoptose 93

* La voie intrinsèque de l'apoptose 48

d) Les différents acteurs de l'apoptose 49

* Les récepteurs de mort 49

* Les caspases 49

* La famille de Bcl-2 51

* Les inhibiteurs de l'apoptose 53

e) Stratégies thérapeutiques ciblant les différents acteurs de l'apoptose en cancérologie 54

***** Cibler les membres de la famille Bcl-2 54

* Cibler les récepteurs à domaine de mort 56

* Cibler les IAPs 58

2. L'autophagie 60

a) Les différentes formes d'autophagie 60

b) Les différentes étapes de la macro-autophagie 60
* Protéines impliquées dans la formation de l'autophagosome 61
c) Voies de signalisations impliquées dans la régulation de l'autophagie 62
* Régulation de l'autophagie par la voie PI3K/Akt/mTor : 62
* Régulation de l'autophagie par la voie PKR/eIF2α 65
d) Fonctions biologiques de l'autophagie 65
e) Pathologies associées à l'autophagie 68
f) Stratégies thérapeutiques fondées sur l'autophagie en cancérologie 71
3. Mécanismes communs de régulation de l'autophagie et de l'apoptose 72
C. Le suppresseur de tumeur p53 75
1. Généralités 75
a) Historique 75
b) Structure du gène et motifs de la protéine 75
c) Régulation de l'activation de p53 77
* Régulations traductionnelles de p53 77
* Régulations post-traductionnelles de p53 79
d) Inhibition de l'activité de p53 par MDM2 80
* Structure de MDM2 : 81
* Interaction et régulation de l'activité de p53 par MDM2 : 81
2. Les différentes fonctions de p53 82
a) Rôle de p53 dans la régulation du cycle cellulaire 82
b) Mécanismes moléculaires influençant la réponse anti-prolifération ou pro-apoptotique induite par p53 84
c) Rôle de p53 dans la régulation de l'apoptose 85
* Rôle de p53 dans l'apoptose induite par la voie des récepteurs à domaines de mort 85
* Rôle de p53 dans l'apoptose induite par la voie intrinsèque 86
d) Rôle de p53 dans la régulation de l'autophagie 87
* Inhibition de l'autophagie par la fraction cytoplasmique de p53 87
* Activation de l'autophagie en réponse à un stress par la fraction nucléaire de p53 88
3. Stratégies thérapeutiques fondées sur l'activation de p53 en cancérologie 90
a) Inactivation de p53 dans les cancers 90
* Inhibition de p53 par mutations 90
* Inactivation de p53 par interaction avec des protéines virales 91

* Inactivation de p53 par interaction avec des protéines cellulaires....91

b) Approches de thérapie génique visant à restaurer les fonctions de p53....93

c) Approches visant à restaurer la fonction de p53 lorsqu'elle est mutée....94

d) Approches visant à inhiber l'activité ubiquitine-ligase de MDM2....95

e) Approches visant à inhiber l'interaction entre p53 et MDM2....96

OBJECTIFS DU TRAVAIL....100

MATERIEL ET METHODES....102

RESULTAT ET DISCUSSION....111

Partie 1 : Mécanismes impliqués dans la résistance à l'apoptose induite par p53 dans les cellules EBV (+) en latence III....111

1. Résultats....111

a) Résultats précédents....111

b) Article n°1: «Treatment with a BH3 mimetic overcomes the resistance of latency III EBV (+) cells to p53-mediated apoptosis»....112

c) Expériences complémentaires sur une lignée de NPC....113

d) Article n°2: «Autophagy is upregulated in EBV (+) latency III cells and protects them from nutline-3 induced apoptosis. »....114

e) Analyse du profil d'expression génique des cellules BL2 et BL2/B95 avant et après traitement avec la nutline-3....135

2. Discussion....137

a) Implication de p21 ^{WAF1} dans la résistance à l'étoposide et au melphalan des cellules EBV (+) en latence de type III traitées par la nutline-3....137

b) Implication de Bcl-2 dans la résistance à la nutline-3 des cellules EBV (+) en latence III....138

c) Induction des récepteurs de mort par la nutline-3....140

d) Rôle de l'activité non transcriptionnelle de p53 en réponse à la nutline-3

e) Implication de l'autophagie dans la résistance à l'apoptose des cellules EBV (+) en latence de type III....141

Partie 2 : Stratégies thérapeutiques fondées sur l'utilisation d'inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 dans le traitement des lymphomes B....145

1. Résultats....145

a) Evaluation de l'efficacité d'ABT-737 *in vitro* dans les LCL....145

b) Evaluation de l'efficacité d'ABT-737 en combinaison avec de la chimiothérapie *in vitro* dans une lignée de LB EBV (+) en latence de type III....146

c) Développement de nouvelles molécules ciblant la famille Bcl-2 et évaluation de leur activité dans les lymphomes B....147

d) Evaluation de l'efficacité d'ABT-737 *in vivo* dans le traitement des lymphomes B associés à EBV....150

* Evaluation de l'activité anti-tumorale d'ABT-737 chez des souris NOD/SCID xénogreffées avec des RPMI8866 et des LY47....151

* Détermination de la dose de Cyclophosphamide à utiliser en association avec ABT-737 chez des souris NOD/SCID xénogreffées avec des LY47....152

* Evaluation de l'efficacité de la combinaison Cyclophosphamide/ABT-737 chez des souris NOD/SCID xénogreffées avec des LY47....154

*Détermination de la dose de Rituximab à utiliser en association avec ABT-737 chez des souris nude xénogreffées avec des RPMI8866....155

* Evaluation de l'efficacité de la combinaison Rituximab/ABT-737 chez des souris nude xénogreffées en sous-cutanée avec des RPMI8866....156

* Evaluation de l'efficacité de la combinaison Rituximab/ABT-737 chez des souris SCID xénogreffées en IP avec des RPMI8866....158

2. Discussion....161

a) Mécanisme d'action d'ABT-737 dans les cellules de LB et les LCL in vitro....161

b) Développement de nouvelles molécules visant à inhiber les protéines Bcl-xL et Mcl-1 pour le traitement des lymphomes B....163

c) Evaluation pré-clinique d'ABT-737 pour le traitement du LB et des PTLD....164

* Modèle de souris xénogreffées avec des cellules de LB (LY47)....164

* Modèle de souris xénogreffées avec des LCL....166

BIBLIOGRAPHIE.... 167

ANNEXES.... 201

LISTE DES FIGURES

Introduction

Figure 1 : Classification des herpèsvirus
Figure 2 : Structure du virus d'Epstein-Barr.
Figure 3 : Organisation du génome du virus d'Epstein-Barr.
Figure 4 : Primo-infection par le virus d'Epstein-Barr.
Figure 5 : Mécanismes de fusion du virus avec la cellule hôte
Figure 6 : Latences exprimées lors de l'infection aiguë et persistante
Figure 7 : Epidémiologie du lymphome de Burkitt (LB).
Figure 8 : Caractéristique histologique du lymphome de Burkitt.
Figure 9 : Implication de c-myc dans le lymphome de Burkitt.
Figure 10 : Stratégie thérapeutique utilisée pour la prise en charge du lymphome de Burkitt à l'IGR.
Figure 11 : caractéristiques histologiques des PTLD
Figure 12 : Expression de la LMP-1 (coloration rouge) et des EBERs (coloration marron/noir) dans les cellules de Reed-Stemberg.
Figure 13 : Caractéristiques épidémiologiques et histologiques du carcinome du nasopharynx.
Figure 14 : structure de la protéine EBNA-1.
Figure 15 : Structure et fonction de la protéine EBNA-2.
Figure 16 : Structure des protéines de la famille des EBNA-3
Figure 17 : Structure de la protéine EBNA-LP
Figure 18 : Voies de signalisation induites par la LMP-1
Figure 19 : Structure des différents membres de la famille du facteur NF-κB.
Figure 20 : voies classiques et voie alternative de NF-κB.
Figure 21 : Voies de signalisation induites par NF-κB.
Figure 22 : Voie de signalisation des MAP-kinases
Figure 23 : Voies de signalisation induites par la LMP-2A.
Figure 24 : Structure secondaire des EBERs
Figure 25 : Comparaison des caractéristiques morphologiques des cellules en apoptose et en nécrose
Figure 26 : Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose
Figure 27 : Les récepteurs à domaine de mort.
Figure 28 : Complexes formés au niveau des récepteurs de mort lors de l'apoptose extrinsèque.
Figure 29 : Structure et activation des caspases effectrices et initiatrices de l'apoptose.
Figure 30 : Les membres de la famille Bcl-2.
Figure 31 : Régulation de l'apoptose par les membres de la famille de Bcl-2.
Figure 32 : Structure et fonctions de la famille des IAPs.
Figure 33: Stratégies thérapeutiques fondées sur l'induction de l'apoptose en cancérologie
Figure 34 : Les Différentes formes d'autophagie
Figure 35 : Mécanismes impliqués dans la formation des autophagosomes
Figure 36 : Structure de la protéine mTOR et des complexes mTORC1 et mTORC2

Figure 37 : Régulations et fonctions cellulaires des complexes mTORC1 et mTORC2.
Figure 38 : Induction de l'autophagie par la PKR en réponse à une infection virale
Figure 39 : Elimination des streptocoques du groupe A (GAS) et de M Tuberculosis par autophagie.
Figure 40 : Implication de l'autophagie dans la maladie de Crohn
Figure 41 : Rôle des protéines « BH3 only » dans la relation entre Bcl-2 et Bécline-1
Figure 42 : Apoptose induite par le clivage de Bécline-1 et d'Atg5
Figure 43 : Apoptose extrinsèque induite par Atg3 et la forme clivée d'Atg5
Figure 44 : Structure de la protéine p53
Figure 45 : Régulation post-traductionnelles de l'ARNm de p53
Figure 46 : Modifications post-traductionnelles de p53
Figure 47 : Structure de la protéine MDM2
Figure 48 : Rétrocontrôle négatif exercé par MDM2 sur p53
Figure 49 : Rôle de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire.
Figure 50 : Rôle de p53 dans la régulation des différentes voies de l'apoptose
Figure 51 : Double rôle de p53 dans la régulation de l'autophagie
Figure 52 : Différents rôle de p53 dans la régulation de l'autophagie liés à l'état de la cellule
Figure 53 : Mutations de p53
Figure 54 : Inhibiteurs de MDM2 de la famille des nutlines.
Figure 55 : Stratégies thérapeutiques fondées sur la réactivation de p53 en cancérologie

Résultats et Discussion

Figure 56 : Effet de la combinaison ABT-737/nutline-3 sur une lignée de NPC (C15)
Figure 57 : Comparaisons effectuées lors de l'analyse du profil d'expression génique réalisée dans les BL2 et BL2/B95 traitées ou mon avec la nutline-3
Figure 58 : Profil d'expression génique des gènes cibles de p53 après 16h de traitement avec la nutline-3 dans les BL2 et BL2/B95
Figure 59 : Profil d'expression génique des gènes impliqués dans la voie des MAP kinases après 16h de traitement avec la nutline-3
Figure 60 : Schéma illustrant les voies apoptotiques induites par la nutline-3 dans les lignées EBV (-) et dans les lignées EBV (+) en latence de type III
Figure 61 : Schéma illustrant les différents mécanismes impliqués dans la résistance à l'apoptose induite par p53 des cellules EBV (+) en latence de type III.
Figure 62 : Implication de JNK dans la régulation de l'autophagie.
Figure 63 : Evaluation de l'efficacité d'ABT-737 in vitro dans les LCL.
Figure 64 : Evaluation de l'activation de Bax en réponse au traitement par ABT-737
Figure 65 : Evaluation de l'association ABT-737/Melphalan dans les LY47
Figure 66 : Evaluation de l'efficacité du JD-468 et du Drimane sur plusieurs lignées de BL et LCL.
Figure 67 : Analyse de l'apoptose induite par le JD-468 et le Drimane par cytométrie en flux.
Figure 68 : Analyse du clivage de la caspase-3 et de la PARP dans des cellules traitées avec le JD-468 ou le Drimane

Figure 69 : Evaluation de l'activité anti-tumorale d'ABT-737 chez la souris NOD/SCID xénogreffée avec une lignée de LCL ou de LB.
Figure 70 : Détermination de la dose de Cyclophosphamide à utiliser en combinaison avec ABT-737 chez la souris NOD/SCID xénogreffée avec des LY47.
Figure 71 : Courbe de croissance tumorale et médiane de survie des souris NOD/SCID xénogreffées avec des LY47 et traitées avec différentes doses de cyclophosphamide
Figure 72 : Evaluation de l'efficacité de la combinaison Cyclophosphamide/ABT-737 chez des souris NOD/SCID xénogreffées avec des LY47
Figure 73 : Courbe de croissance tumorale et médiane de survie des souris NOD/SCID xénogreffées avec des LY47 et traitées avec ABT-737, le Cyclophosphamide ou l'association de ces 2 composés
Figure 74 : Détermination de la dose de Rituximab à utiliser en combinaison avec ABT-737 chez la souris nude xénogreffée avec des RPMI8866
Figure 75 : Evaluation de l'efficacité d'ABT-737, du Rituximab ou de la combinaison des 2 traitements chez des souris nudes implantées en sous-cutanée avec des RPMI8866.
Figure 76 : Evaluation de l'efficacité d'ABT-737 et du Rituximab par échographie.
Figure 77 : Coupes histologiques réalisées à partir d'une tumeur prélevée chez une souris contrôle
Figure 78 : Evaluation de l'efficacité d'ABT-737, du Rituximab ou de la combinaison des 2 traitements chez des souris SCID implantées en IP avec des RPMI8866.
Figure 79 : Modèle proposé par l'étude de Spender et al pour expliquer la diminution de Mcl-1 après traitement à la rapamycine
Figure 80 : Schéma d'administration utilisé lors de l'étude publiée par Mason *et al*
Figure 81 : Nouveau schéma d'administration proposé pour l'évaluation de l'efficacité de la combinaison ABT-737/Rituximab

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques biologiques et cliniques des formes endémique et sporadique du LB

Tableau 2 : Localisation des PTLD et signes cliniques associés

Tableau 3 : Caractéristiques des différentes formes de PTLD

Tableau 4 : Résultats de l'analyse du niveau d'expression des protéines de la famille de Bcl-2 dans un panel de lignées de BL et LCL

Tableau 5 : Molécules naturelles ou de synthèse ciblant le domaine BH3 de Bcl-xL et de Mcl-1

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN :	Acide désoxyribonucléique
AIF :	Apoptosis-inducing factor
AMM:	Autorisation de mise sur le marché
AMPK :	AMP-activated protein kinase
APAF :	Apoptotic protease activating factor
ARN :	Acide ribonucléique
ASK1:	Apoptosis signal-regulated kinase 1
ASPP :	Apoptosis-stimulating protein of p53
ATG:	Autophagy related genes
ATM :	Ataxia-telangiectasia mutated
ATP :	Adenosine 5'-triphosphate
ATR :	Ataxia-telangiectasia mutated and rad3-related
Bak :	Bcl-2 antagonist killer
BART:	BamHI A Rightward Transcripts
Bax :	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2 :	B-cell lymphoma 2
Bcl-xL:	B cell leukemia XL
BCR :	B-cell receptor
Caspases :	Cysteinyl aspartate specific protease
CBP :	CREB binding protein
CDC :	Cell division cycle
CDK:	Cyclin dependent kinase
CG :	Centres germinatifs
CHK :	Checkpoint kinase
CK :	Casein kinases
CMH :	Complexe majeur d'histocompatibilité
CTAR:	C-Terminal Activation Regions
CtBP :	C-terminal binding protein
DAXX :	Death domain-associated protein
DBD :	DNA binding domain
DD :	Death domain
DIABLO:	Direct Inhibitor of Apoptosis (IAP)-Binding protein with Low pI
DiOC6 :	3, 3'-Dihexyloxacarbocyanine, iodide
DISC:	Death Inducing Signaling Complex
DLBCL:	Diffuse Large B-Cell Lymphoma
DLT:	Dose Limiting Toxic effects
DNA-PK :	DNA protein kinase
DRAM:	Damage-regulated autophagy modulator
EBER :	Epstein-Barr encoding RNAs
EBNA :	Epstein-Barr nuclear antigen
EBNA-LP:	Epstein-Barr Nucleair Antigen Leader Protein
EBV :	Epstein-Barr virus
eIF2α:	eukaryote initiation factor 2 alpha
ERK:	Extracellular Regulated kinase
ERO:	Espèces réactives de l'oxygène
FADD :	Fas-associated death domain
FAP1:	Fas-associated phosphatase 1

FC:	Fold change
FITC :	Fluorescein isothiocyanate
GADD :	Growth arrest and DNA damage-inducible gene
HAUSP :	Herpesvirus-associated ubiquitin-specific protease
HHV:	Human Herpes Virus
IAP :	Inhibitor of apoptosis
ICAM :	Intercellular adhesion molecule
Ig :	Immunoglobulines
IκB:	Inhibitor of NFκB
IKK:	IκB kinase
IP :	Iodure de propidium
IR :	Internal repeats
IRES :	Internal ribosomal entry site
JMY :	Junction-mediating and regulatory protein
JNK:	c-Jun N-terminal kinase
KO:	Knock out
KSHV :	Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus
LAM :	Leucémie aigue myéloïde
LB :	Lymphome de Burkitt
LCL :	Lymphoblastoides cell lines
LF:	Lymphome folliculaire
LLC:	Leucémie lymphoïde chronique
LMP :	Latent Membrane proteins
MAPK :	Mitogen-activated protein kinases
MAP-LC3:	Microtubule-associated protein 1 light chain 3
MC:	Maladie de Crohn
MCL:	Mantle cell lymphoma
Mcl-1:	Myeloid cell lymphoma 1
MDC:	Monodansylcadaverine
MDM2 :	Murine double minute 2
MNI:	Mononucléose Infectieuse
MTD :	Maximum tolerated dose
mTOR :	mammalian Target of Rapamycin
NES :	Nuclear export signal
NFκB :	Nuclear factor-kappa B
NFS:	Numération de la formulation sanguine
NK:	Natural killer
NLS :	Nuclear localization sequence
NOD/SCID:	Nonobese diabetic/Severe combined immunodeficiency
NPC :	Nasopharyngeal carcinoma
Ori :	Origine de réplication
PARP :	Poly (ADP-ribose) polymerase
PBS:	Phosphate buffer saline
P/CAF :	P300/CBP associated factor
PCNA :	Proliferating cell nuclear antigen
PEA:	Phosphatidyléthanolamine
PIG :	P53-inducible gene
PI3K :	Phosphoinositide-3 kinase
PP2A :	Protein phosphatase 2A
PTLD :	Post transplant lymphoproliferative disorder
PI3K :	Phosphoinositide-3 kinase

PUMA:	P53-upregulated modulator of apoptosis
p53-AIP1:	P53 regulated apoptosis inducing protein
RE :	Réticulum endoplasmique
Rb :	Retinoblastome
RBP-Jκ :	Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin Kappa J region
RS :	Reed-Sternberg
RISC :	RNA-induced silencing complex
SESN :	Sestrine
SCID :	Severe combined immunodeficiency
SH :	Src homology domain
SIDA :	Syndrome d'immunodéficience acquis
SiRNA :	Small interfering RNA
SMAC:	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases
STAT :	Signal transducer and activator of transcription
TAD :	Transactivation domain
TAF :	TBP-associated factors
TBP :	TATA binding protein
TCL:	T cell leukemia
TCR :	T cell receptor
TGF-β1 :	Transforming growth facteur β1
TNF :	Tumor necrosis factor
TRADD :	TNFR-associated death domain
TRAF:	TNF Receptor Associated Factors
TRAIL :	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TSC2:	Tuberous Sclerosis protein 2
USP :	Ubiquitin specific peptidase
UV :	Ultra-violets
UVRAG :	UV irradiation resistance associated gene
VIH :	Virus de l'immunodéficience humain
ZEBRA :	Z Epstein-Barr virus replication activator

RESUME

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est un herpèsvirus associé à différentes tumeurs lymphoïdes ou épithéliales telles que le lymphome de Burkitt (LB), les syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation (PTLD) et le carcinome nasopharyngé (NPC). Notre équipe s'intéresse aux mécanismes d'apoptose, induits par différents traitements, dans plusieurs lymphomes associés à EBV. Les membres de l'équipe ont récemment étudié l'apoptose résultant de la dissociation du complexe p53/MDM2, en utilisant un inhibiteur synthétique, la nutline-3. Cette molécule appartient à la famille des cis-imidazole et entre spontanément dans les cellules afin de se fixer sur la poche hydrophobique de MDM2, qui constitue le site d'interaction avec p53. Les premiers résultats obtenus par l'équipe ont montré que le traitement de cellules de LB par la nutline-3 induit l'activation de p53 dans toutes les lignées testées. Cependant, les cellules EBV (-) et EBV (+) en latence I entrent massivement en apoptose, alors que les cellules EBV (+) en latence III sont beaucoup plus résistantes (Renouf et al., 2009).

Mon travail de thèse a consisté à étudier les mécanismes impliqués dans ce phénomène de résistance afin de mettre en place des stratégies pour les contourner. Nous avons réalisé une étude de transcriptome après traitement avec la nutline-3 dans deux lignées qui ne diffèrent que par leur statut EBV. Nous avons montré : 1) que l'autophagie est induite en réponse au traitement dans les cellules EBV (+) en latence de type III ; 2) que ces cellules expriment fortement Bécline-1 et présentent une activation constitutive de l'autophagie ; 3) que l'autophagie contribue à la résistance de ces cellules à l'apoptose. Par ailleurs, nos résultats indiquent que la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est également impliquée dans la résistance à l'apoptose des cellules EBV (+) en latence de type III et que l'utilisation d'ABT-737, un inhibiteur de Bcl-2, restaure leur sensibilité à la nutline-3. De plus, ABT-737 utilisé seul induit l'apoptose des LCL, utilisées comme modèle pour l'étude des PTLD. L'efficacité de ce composé a donc été évaluée *in vivo*, seul ou en combinaison avec des traitements conventionnels (Cyclophosphamide pour le LB et Rituximab pour les PTLD). Les résultats obtenus lors de ces études pré-cliniques montrent que : 1) ABT-737 réduit considérablement la croissance tumorale et augmente la survie de souris xénogreffées avec une lignée de LCL alors qu'il n'a pas d'effets chez les souris xénogreffées avec une lignée de LB ; 2) la combinaison ABT-737/Cyclophosphamide permet de limiter la croissance tumorale durant le traitement mais n'améliore pas la survie des souris xénogreffées avec une lignée de LB ; 3) l'association ABT 737/Rituximab est très efficace et induit une rémission complète chez 70% des souris xénogreffées avec une lignée de LCL.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

A. Le virus d'Epstein-Barr et ses pathologies associées

1. Généralités

a) Historique

Le virus d'Epstein-Barr, également appelé herpès virus humain de type 4 (HHV-4), appartient à la sous-famille des γ-herpèsvirus. La découverte de ce virus en 1964 fut l'aboutissement de plusieurs années de recherche menées par les virologues Anthony Epstein et Yvonne Barr en collaboration avec le chirurgien Denis Burkitt. Ce dernier, qui exerça pendant près de 20 ans en Ouganda, fut le premier à décrire la présence de tumeurs lymphoïdes localisées au niveau des maxillaires supérieures et de l'abdomen de jeunes enfants africains (Burkitt, 1958). Ce lymphome, dit de Burkitt (LB), représentait alors la tumeur la plus fréquemment rencontrée chez les enfants en Afrique de l'Est à endémie palustre. La distribution géographique des tumeurs ainsi que les conditions climatiques associées étaient, selon Denis Burkitt, en faveur de l'hypothèse d'un agent infectieux. Les données épidémiologiques collectées par le chirurgien et publiées en 1961, furent l'objet de nombreuses conférences au Royaume-Uni (Burkitt and O'Conor, 1961; Burkitt, 1961). Le virologue Anthony Epstein, qui travaillait à l'époque sur les virus oncogéniques chez le poulet, fut particulièrement intéressé par ces travaux et initia une collaboration avec le chirurgien afin de rechercher la présence de virus au sein de biopsies issues de tumeurs congelées. Quelques années plus tard, Epstein et son étudiante Yvonne Barr isolèrent des cellules lymphoïdes possédant une forte capacité de multiplication à partir d'un fragment de biopsie. Ils établirent ainsi la première lignée cellulaire dérivée d'un LB (Epstein and Barr, 1964). Avec l'aide de leur collègue Bert Achong, ils analysèrent ces cellules au microscope électronique et identifièrent immédiatement des particules virales ayant la morphologie des herpèsvirus. Ces travaux furent publiés en 1964 (Epstein et al., 1964) et ce nouvel agent infectieux fut baptisé : le virus d'Epstein-Barr. En 1968, des études séro-épidémiologiques démontrèrent qu'EBV infectait plus de 90% de la population mondiale et qu'il constituait l'agent étiologique de la mononucléose infectieuse (Henle et al., 1968). A la même période, les travaux de l'équipe de J. Hector Pope montrèrent que ce virus était capable d'immortaliser des lymphocytes B normaux *in vitro* en lignée cellulaire lymphoblastoïde (LCL), soulignant ainsi les propriétés oncogéniques du virus (Pope et al., 1968).

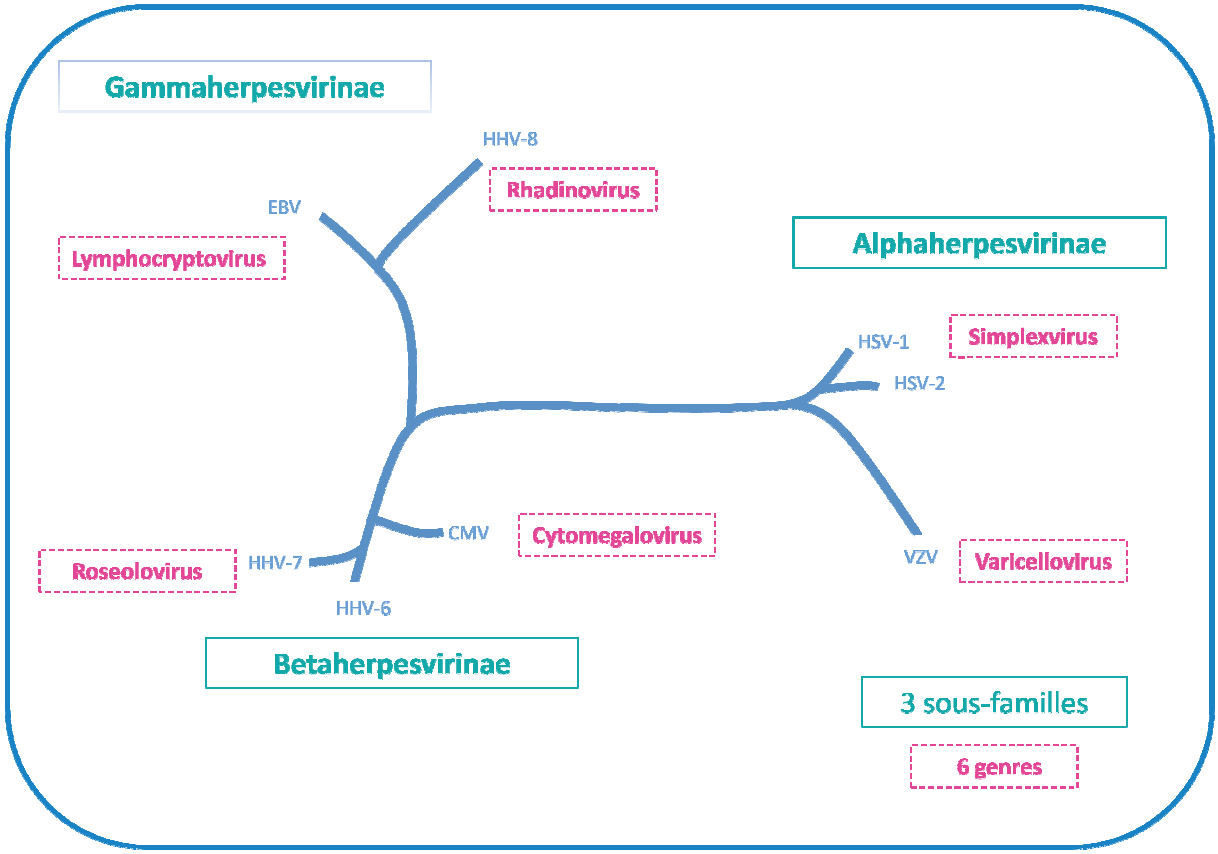


Figure 1 : Classification des herpèsvirus. (Schéma adapté à partir d'un cours de la faculté d'Angers (http://frontal.univ-angers.fr)). Les Herpesvirus humains sont classés en 3 sous-familles et 6 genres différents. On distingue la famille des Gammaherpesvirinae qui regroupe les lymphocryptovirus et les Rhadinovirus, la famille des Alphaherpesvirinae qui contient les Simplexvirus et les varicellovirus et la famille des Betaherpesvirinae composée des Roseolovirus et des cytomegalovirus

Dans les années 1970, le génome viral d'EBV fut retrouvé, en absence de particules virales, dans les cellules de LB et de carcinomes nasopharyngés (NPC), ce qui constitua un argument supplémentaire en faveur d'un lien étiologique entre le virus et ces pathologies malignes (Henle and Henle, 1970; zur Hausen et al., 1970). Depuis, il a été montré qu' EBV est impliqué dans de nombreuses pathologies bénignes ou malignes d'origine épithéliale ou lymphoïde que nous décrirons par la suite.

b) Taxonomie

EBV appartient à la famille des Herpesviridae qui est constituée d'une cinquantaine de virus dont huit strictement humains. Ces herpèsvirus ont une structure identique et sont caractérisés par leur cycle réplicatif complexe. L'infection initiale par un herpèsvirus est suivie d'une infection latente, entrecoupée d'infections secondaires, qui favorise une persistance du virus dans l'organisme. Ils sont répartis en trois sous-familles définies principalement selon leur tropisme cellulaire (Figure 1). On distingue donc :

- **les Alphaherpesvirinae** qui regroupent les herpèsvirus simplex de type 1 et 2 (HSV1 ou HHV-1 et HSV-2 ou HHV-2) et le virus de la varicelle et du zona (VZV ou HHV-3).
- **les Betaherpesvirinae** qui sont constitués du cytomégalovirus humain (HCMV ou HHV-5) ainsi que de deux roseolovirus correspondant aux herpèsvirus humains 6 et 7 (HHV-6 et HHV-7).
- **Les Gammaherpèsvirinae** qui sont représentés par deux genres de virus : les Lymphocryptovirus (HHV-4, ou EBV) et les Rhadinovirus (HHV-8, ou virus associé au sarcome de Kaposi).

c) Structure du virus

Le virion de l'EBV mesure 120 à 200 nm et présente une structure comparable à celle de tous les autres herpèsvirus. Les particules virales comportent (Figure 2) :

- le nucléoïde, qui est constitué d'une molécule d'ADN bicaténaire linéaire de 172 kpb enroulée autour d'une structure protéique fibrillaire appelée « core »
- une nucléocapside isocaédrique mesurant 100 à 120 nm de diamètre constituée de 162 sous-unités ou capsomères (Yamaguchi et al., 1967)
- un tégument, constitué d'une couche fibreuse de phospho-protéines, qui entoure la capside isocaédrique

- une enveloppe lipidique composée d'un double feuillet lipidique, dérivé des membranes plasmique ou nucléaire de la cellule hôte. Cette enveloppe contient de nombreux spicules formés de glycoprotéines virales. Ces glycoprotéines virales conditionnent l'efficacité des premières étapes de l'infection des HHV (adsorption, fusion et pénétration). Cette enveloppe externe, particulièrement sensible aux détergents, aux solvants et à la chaleur, constitue l'élément de fragilité du virus. Son pouvoir infectieux peut en effet être diminué si cette enveoppe est altérée. Ainsi, la transmission du virus nécessite des contacts humains très étroits.

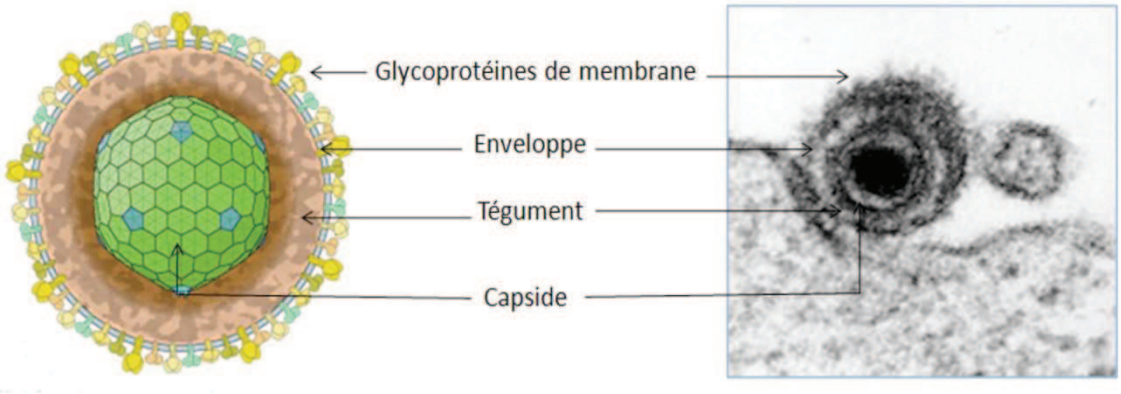


Figure 2 : Structure du virus d'Epstein-Barr. Schéma et photographie de microscopie électronique du virus (schéma adapté de http://anatopadhoe.wordpress.com). Le virus est constitué d'une capside isocaédrique, d'un tégument composé de phospho-protéines qui entoure cette capside et d'une enveloppe lipidique qui contient de nombreux spicules formés de glycoprotéines.

d) Caractéristiques du génome viral

Le génome d'EBV a été entièrement séquencé en 1984, à partir de la souche virale de référence B95.8 issue de lymphocytes B de marmoset infectés par EBV (Baer et al., 1984). Ce séquençage a été réalisé à partir d'une banque de fragments d'ADN viral, générés après digestion enzymatique par l'enzyme de restriction BamHI. Les fragments ainsi obtenus ont été clonés et séquencés. Les ORFs (Open Reading Frames ou cadres ouverts de lecture), les gènes et les sites d'initiation de la transcription et de la maturation des ARNs sont donc référencés par rapport aux fragments spécifiques BamHI, classés de A à Z en fonction de leur taille dans un ordre décroissant (le fragment A étant le plus grand et le fragment Z le plus petit) (figure 3 A).

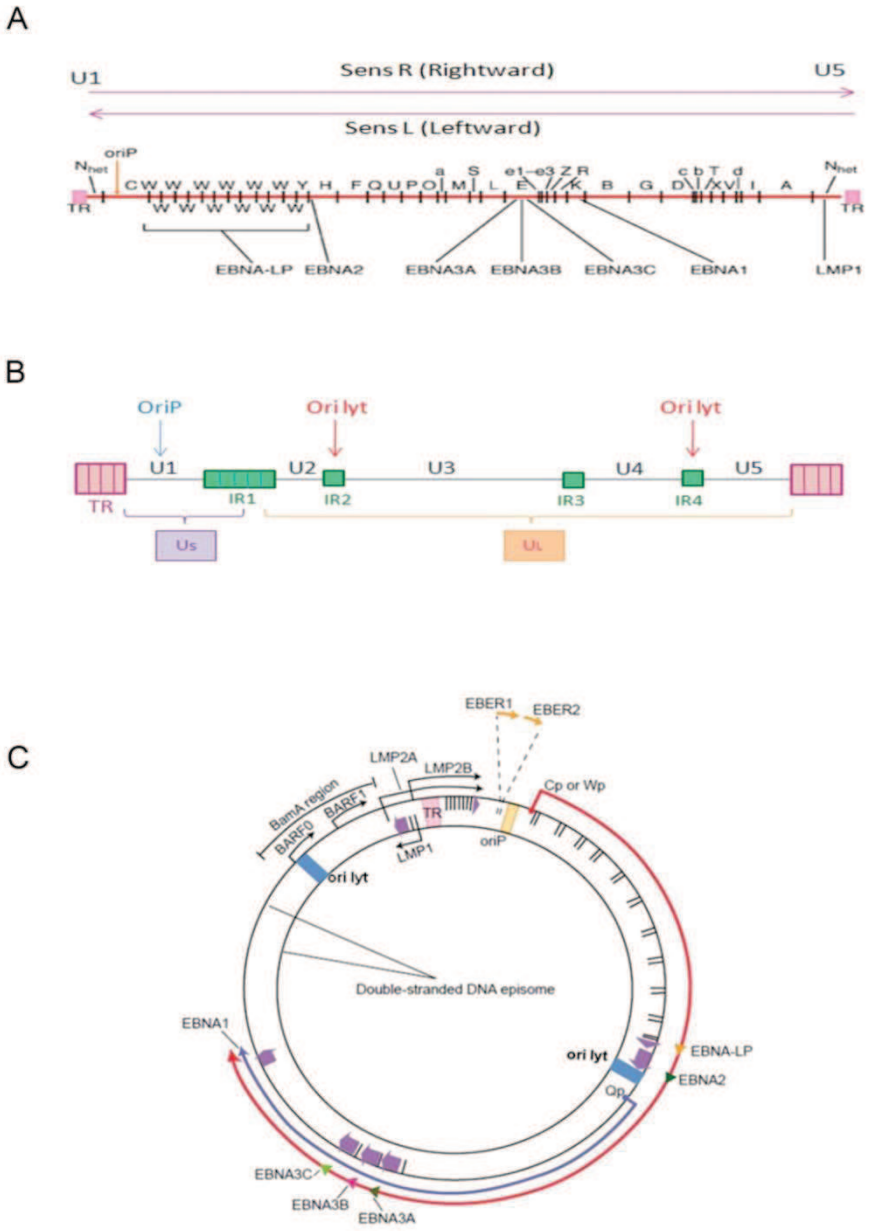


Figure 3 : Organisation du génome du virus d'Epstein-Barr. (Adapté de Young and Rickinson 2004) **A**. cadres de lecture ouverts des protéines de latence. Les fragments obtenus après digestion avec l'enzyme de restriction *Bam*HI sont classés par ordre de taille de A à Z. Les lettres minuscules désignent les fragments très courts. Les séquences TR permettent la transcription du gène codant pour la LMP-2 après la formation de l'épisome viral. **B**. Organisation génomique linéaire. La forme linéaire du génome est retrouvée dans le virion de l'EBV. TR= séquence répétées terminales, IR= Séquences répétées internes (IR1 à IR5), U= Région unique (U1 à U5), Orip et Orilyt=origines de réplication. Le sens de transcription R (Rightward) va d'U1 à U5 et le sens L (Leftward) va d'U5 à U1. **C**. Représentation schématique de l'organisation épisomale. Le réctangle orange représente l'origine de réplication. La longue flèche rouge représente l'ARNm codant pour les 6 EBNAs sous le contrôle des promoteurs Cp ou Wp, exprimés en latence III. La flèche bleue représente l'ARNm d'EBNA-1 sous le contrôle de son propre promoteur Qp, exprimé en latences I et II. Les flèches violettes représentent les exons codant pour chaque protéine latente : les EBNAs et les LMPs. Les TR (Terminal Repeat) sont les séquences répétées terminales nécessaires à la formation de l'épisome. Les petites flèches orange représentent les EBERs. La région *BamHI* A code pour des transcrits BARTs.

L'ADN est linéaire dans les particules virales et circulaire (épisomal) dans les cellules hôtes lors d'une infection latente. Il est flanqué à ses extrémités de séquences terminales répétées (Terminal Repeat ou TR) d'environ 500 pb, permettant la circularisation du génome sous forme d'épisome en une structure appelée Covalent Closed Circle (CCC). Il possède cinq domaines de séquence unique (U-1 à U-5) séparés par des séquences répétitives internes (IR ou Internal repeat) (Cheung and Kieff, 1982). La plus grande de ces séquences, appelée IR1, sépare le génome en deux régions uniques : une région courte (Short unique region ou US), contenant la séquence unique U1, et une région longue (Long Unique region ou UL), regroupant les séquences uniques U2 à U5 séparées par les régions répétés IR2, IR3, IR4 (figure 3B). Deux sens de lecture du génome linéaire sont possibles. La lecture de gauche à droite, c'est-à-dire d'U1 à U5 correspond au sens R (pour Rightward) et celle de droite à gauche, c'est-à-dire d'U5 à U1 au sens L (pour Leftward) (Figure 3 A et B).

Lors d'une infection latente, le génome viral se maintient sous sa forme épisomale grâce à une réplication initiée par l'origine de réplication «OriP», située au niveau de U1. Trois promoteurs de latence sont décrits : Cp, Wp et Qp. L'induction du cycle lytique nécessite la réplication de l'ADN à partir des deux origines de réplication «OriLyt» (Figure 3 C).

La comparaison des séquences génomiques des souches virales purifiées à partir de lignées cellulaires de LB africains avec la souche de référence B95.8 a révélé l'existence de deux variants de l'EBV (Miller and Lipman, 1973; Pizzo et al., 1978). Le virus peut donc être classé en 2 sous types viraux : EBV1 (ou EBV A) et EBV2 (ou EBV B), suivant le polymorphisme génétique porté par certains gènes de latence (Adldinger et al., 1985; Rowe et al., 1989). Des études épidémiologiques ont montré que le virus de type 1 est prédominant (mais pas exclusif) dans les pays occidentaux alors que les deux types viraux sont largement répandus en Afrique équatoriale et en Nouvelle Guinée (Young et al., 1987). Sur le plan fonctionnel, il n'y a pas de différences majeures entre les deux types viraux. Toutefois, des études *in vitro* ont montré que le pouvoir transformant du virus de type 1 est supérieur à celui de type 2 (Rickinson et al., 1987).

2. Cycle biologique du virus d'Epstein Barr

a) Mode de transmission

L'EBV, tout comme les autres virus à enveloppe, est un virus fragile. Sa transmission requiert par conséquent, un contact étroit avec des sécrétions muqueuses ou avec du sang contenant les particules virales.

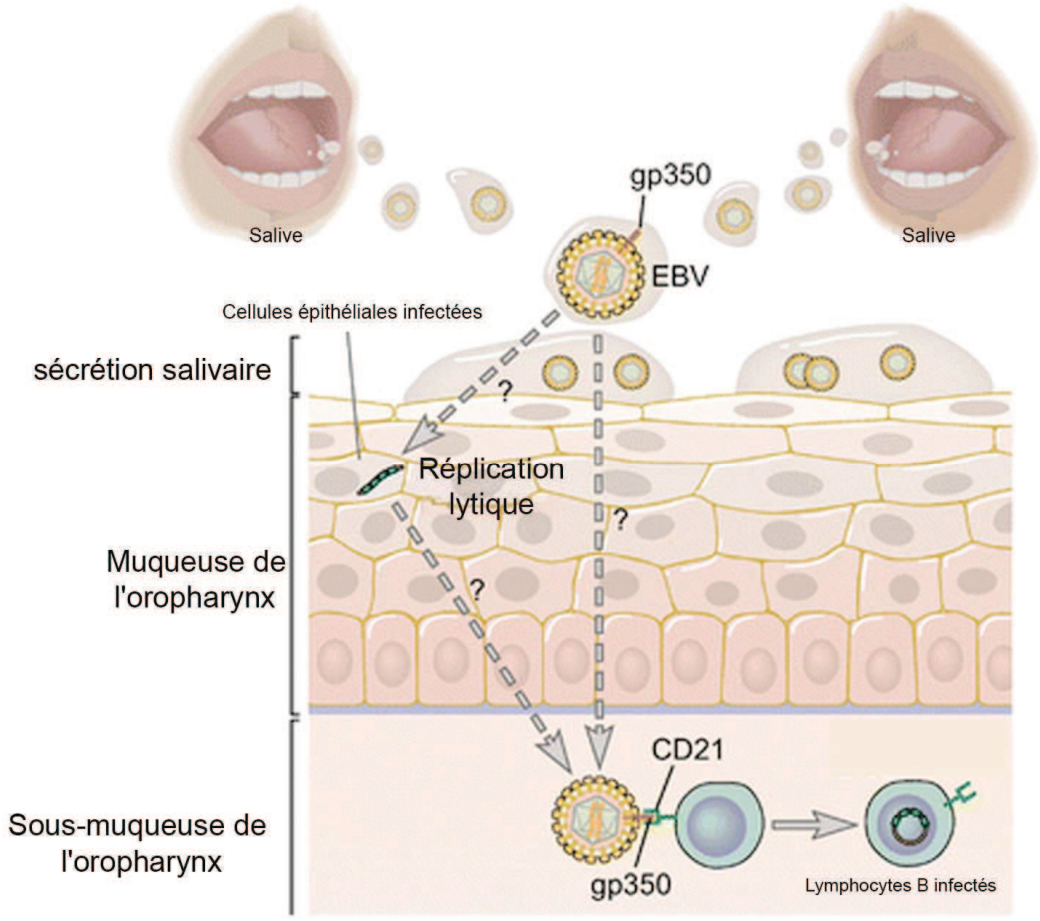


Figure 4 : Primo-infection par le virus d'Epstein-Barr. (Adapté de Kutok and Wang, 2006). Les particules virales présentes dans la salive des individus infectés entrent dans la cavité orale. Il existe une controverse concernant l'existence d'une réplication lytique virale dans les cellules épithéliales de la muqueuse de l'oropharynx. Le virus pourrait passer directement au niveau de la sous-muqueuse de l'oropharynx qui est riche en lymphocytes B. L'interaction entre le CD21 présent à la surface de ces cellules et la gp350 du virus permet à ce dernier d'infecter les lymphocytes B.

L'infection s'effectue le plus souvent par la salive ce qui permet au virus de franchir la muqueuse de l'oropharynx (Niederman et al., 1976). Le virus peut également être détecté au niveau du col utérin et ainsi être retrouvé dans des ulcérations vulvaires (Andersson-Ellstrom et al., 1997; Enbom et al., 2001; Portnoy et al., 1984). Toutefois, la transmission par voie sexuelle reste controversée car le virus est faiblement retrouvé dans les sécrétions génitales (Thomas et al., 2006). Des transmissions par transfusion sanguine (Tattevin et al., 2002), par greffe de moelle osseuse ou par transplantation d'organes ont aussi été décrites (Gratama et al., 1988). Le virus peut également se transmettre de la mère à l'enfant *in utero*, au cours de l'accouchement (Meyohas et al., 1996) ou de l'allaitement (Junker et al., 1991).

b) Physiologie de l'infection

Les organes cibles de la primo-infection semblent être majoritairement localisés dans la zone oropharyngée. Il a été montré que le virus pouvait infecter des lymphocytes B mais également des cellules épithéliales au niveau de cette zone (Kobayashi et al., 1998). Certaines études suggèrent qu'EBV infecterait en premier les cellules épithéliales dans lesquelles il établirait une réplication lytique (Hadinoto et al., 2009; Pegtel et al., 2004; Shannon-Lowe et al., 2006; Sixbey et al., 1984). Cette hypothèse est toutefois très controversée. En effet, d'autres études montrent que les virions peuvent infecter et se répliquer directement au niveau de leur cible principale : les lymphocytes B (Karajannis et al., 1997) (Figure 4).

* Infection des lymphocytes B : Les lymphocytes B sont classiquement considérés comme les cellules cibles d'EBV. Ces cellules constituent le réservoir viral chez une grande majorité des personnes infectées (1 à 10 cellules B mémoire infectées sur 100 000 (Thorley-Lawson and Gross, 2004)). De plus, ces cellules expriment fortement le récepteur principal d'EBV (CD21) et sont donc facilement infectables *in vitro*. L'infection par EBV de lymphocytes B humains va se traduire par une transformation cellulaire permettant l'obtention de lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL) (Pope et al., 1968).

L'infection est initiée par la fixation du virus sur la cellule cible, grâce à l'interaction entre une glycoprotéine majeure de l'enveloppe virale, la gp350/220, et la molécule cellulaire CD21 (aussi appelée CR2, récepteur des fractions C3d et C3g du complément), exprimée à la surface de tous les lymphocytes B (Tanner et al., 1987). Après fusion entre l'enveloppe virale et la membrane plasmique, la nucléocapside pénètre dans le cytosol (Figure 5 A).

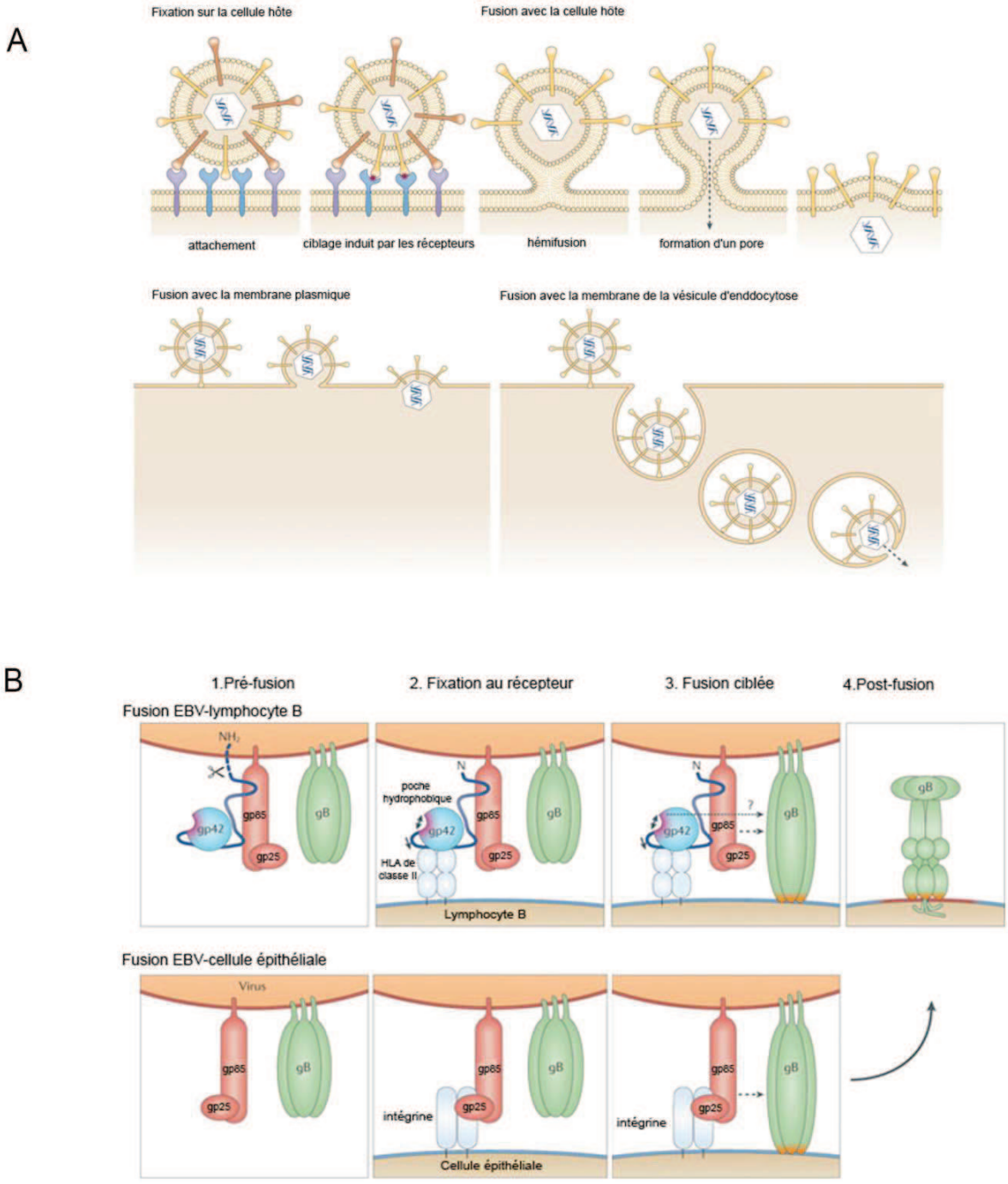


Figure 5 : Mécanismes de fusion du virus avec la cellule hôte. (Adapté de Connolly *et al*, 2011) **A**. Les étapes nécessaires à l'entrée du virus sont d'abord la fixation sur la cellule hôte puis la fusion avec la membrane de cette dernière. Le virus se fixe d'abord sur les récepteurs cellulaires (en bleu et violet) grâce aux glycoprotéines d'enveloppe. Cette fixation est suivie d'une hémifusion puis d'une fusion avec la membrane plasmique de la cellule permettant la libération de la capside virale au sein de celle-ci. EBV peut également fusionner avec la membrane d'une vésicule d'endocytose. **B**. Lors de la fusion d'EBV avec la membrane des lymphocytes B (LB), la gp42 est clivée au niveau de son domaine N-terminal et interagit avec le virion grâce au complexe gp25/gp85. Elle se fixe au niveau des molécules HLA de classe II et forme une poche hydrophobique. Elle subit ensuite un changement conformationnel qui va permettre l'insertion de la protéine gB dans la membrane du LB. La protéine gB change à son tour de conformation, permettant ainsi la fusion avec la membrane plasmique. Lorsqu' EBV fusionne avec les cellules épithéliales, le complexe gp25/gp85 se fixe au niveau de récepteurs cellulaires tels que les intégrines. Cette fixation induit l'interaction entre ce complexe et la protéine gB ce qui permet l'insertion et la fusion de cette protéine au niveau de la membrane plasmique.

Cette étape de fusion nécessite la présence d'un complexe de glycoprotéines virales constitué de gp85, gp25 et gp42 (Molesworth et al., 2000) (Figure 5 B). L'internalisation des virions requiert la coopération de la molécule gp42 avec les molécules du CMH de classe II qui jouent un rôle de co-récepteur dans l'infection des lymphocytes B par l'EBV (McShane et al., 2003). La nucléocapside est ensuite transportée jusqu'à la membrane nucléaire et est progressivement dégradée. Après décapsidation, le génome viral sous forme linéaire est transporté dans le noyau. A ce stade, le virus entre généralement en phase de latence.

* Infection des cellules épithéliales: Le mécanisme d'infection des cellules épithéliales par l'EBV est moins bien connu. Ceci s'explique par le fait que les cellules épithéliales n'expriment pas le récepteur CD21. Certains travaux suggèrent que l'attachement du virus sur les cellules épithéliales fait intervenir la glycoprotéine virale gp85. L'entrée du virus dans ces cellules, contrairement aux lymphocytes B qui nécessitent le complexe gp85/gp25/gp42, impliquerait un complexe composé uniquement des deux glycoprotéines gp85/gp25 (Molesworth et al., 2000), qui interagirait avec les intégrines (Figure 5B). Une autre glycoprotéine du virus a été décrite comme étant importante pour l'infection des cellules épithéliales : il s'agit de BMRF2. Cette dernière porte un motif RGD essentiel à l'interaction avec l'intégrine β1 exprimée du côté basolatéral des cellules épithéliales. D'après l'étude publiée par Tugizov *et al* en 2003, cette interaction serait indispensable à l'infection des cellules avec le virus libre (Tugizov et al., 2003). Cette même équipe a également montré qu'EBV est capable de se transmettre entre des cellules épithéliales adjacentes en passant au travers des membranes latérales à proximité des desmosomes et des jonctions serrées (Tugizov et al., 2003). L'ensemble de ces résultats apporte des arguments en faveur de l'hypothèse selon laquelle l'infection primaire pourrait prendre place au niveau des cellules épithéliales de l'oropharynx.

c) Latence et maintien du génome

La primo-infection des lymphocytes B est suivie par une entrée du virus en phase de latence. Celle-ci permet à l'EBV de persister à long terme dans la cellule hôte. La mise en place d'une infection latente repose sur deux événements : d'une part, la répression du cycle lytique et le maintien du génome viral sous sa forme épisomale, d'autre part, l'expression de gènes dits « de latence ».

Les produits des gènes de latence regroupent six protéines nucléaires EBNA (Epstein-Barr Nuclear Antigen) : EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C et -LP, trois protéines membranaires LMP (Latent Membrane Protein) : LMP-1, LMP-2A et LMP-2B, deux ARN nucléaires non polyadénylés EBER1 et EBER2 (EBV Encoded RNAs), les ARN BART (BamH1 A region's Rightward Transcripts) et les microARN BART et BHRF1. L'expression des protéines de latence contribue aux propriétés d'immortalisation et de transformation par l'EBV en influençant la machinerie cellulaire afin de contrôler la multiplication et la survie des cellules infectées. On distingue 4 types de latence (0, I, II, III), définies selon le profil d'expression des gènes viraux latents. Les ARN EBER1 et 2 s'expriment dans chacune des latences. Quant aux ARN BART, ils sont exprimés au moins en partie lors des latences I, II et III mais, aucune donnée n'existe sur leur statut durant la latence 0 (pour revue (Young and Rickinson, 2004).

- **La latence de type I** est caractérisée par l'expression unique de la protéine EBNA-1 et par un phénotype cellulaire particulier. En effet, les cellules expriment à leur surface les marqueurs CD10 et CD77, et peu ou pas d'antigènes d'activation cellulaire et de molécules d'adhésion (Gregory et al., 1990). Cette latence est majoritairement retrouvée dans le LB
- **La latence de type II** est caractérisée par l'expression des protéines EBNA-1, LMP-1, LMP-2A et LMP-2B. Les pathologies associées à la latence de type II sont le NPC, la maladie de Hodgkin, certains cancers du sein associés à l'EBV et les lymphomes T/NK.
- **La latence de type III** est caractérisée par l'expression de toutes les protéines de latence du virus. Elle est retrouvée *in vitro* dans les LCL et *in vivo* dans les lymphoprolifération malignes des sujets immunodéprimés après une greffe d'organe (également appelés lymphomes post-transplant) et dans certains cas de LB.

Ces trois types de latence sont donc associés à différentes pathologies malignes que nous décrirons dans la prochaine partie de ce chapitre. Cependant, en dehors de toute pathologie tumorale, ces trois programmes de latence semblent être caractéristiques des différentes étapes franchies par le virus lors d'une infection asymptomatique. En effet, durant la primo-infection des lymphoctes B, l'EBV induit l'expression de l'ensemble des gènes de latence (état de latence III) permettant ainsi la prolifération et l'expansion clonale de ces cellules dans le centre germinatif (CG) (Kurth et al., 2000). Ce mécanisme entraîne une réponse immunitaire de type cellulaire avec une expansion des cellules T CD8+ (Figure 6). Ces cellules T CD8+ reconnaissent principalement les antigènes du cycle lytique mais aussi les EBNA-3s. Elles éliminent donc l'immense majorité des cellules infectées (Caldwell et al., 1998; Klein et al., 1976).

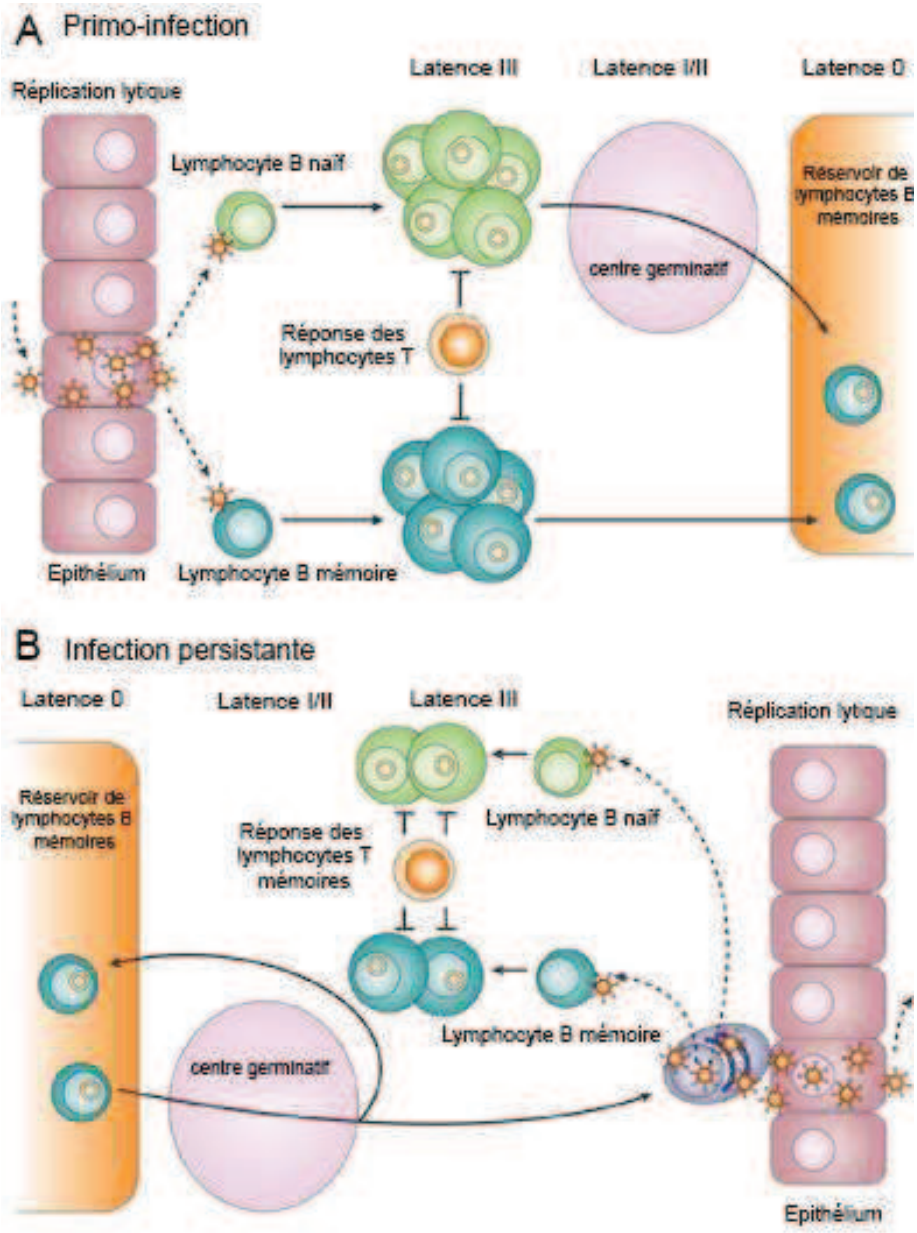


Figure 6 : Latences exprimées lors de l'infection aiguë et persistante. (D'après Young and Rickinson, 2004). **A** Lors de l'infection primaire, EBV met en place une réplication lytique au niveau de l'épithélium de l'oropharynx. Le virus infecte ensuite les tissus lymphoïdes où il établit une latence de type III dans les lymphocytes B (LB) naïfs. La plupart des LB infectés sont éliminés par les lymphocytes T (LT) mais certains d'entre eux, qui expriment peu les antigènes viraux, (latence I/II) échappent aux LT. Ils constituent alors un réservoir de LB mémoires contenant le génome du virus en réduisant encore l'expression des gènes viraux (latence 0). **B**. Ces LB mémoires peuvent occasionnellement être recrutés au niveau des centres germinatifs où ils expriment à nouveau certains programme de latence (latence I et II). Ils peuvent alors retourner au niveau des réservoirs de LB mémoires ou migrer vers les muqueuses de l'oropharynx où ils peuvent réactiver le cycle lytique du virus. Les virions ainsi produits peuvent induire une réplication lytique au niveau des cellules épithéliales et infecter de nouveaux LB naïfs (latence III). Cette nouvelle infection peut permettre d'alimenter le réservoir de LB mémoires. Toutefois, la plupart des LB infectés seront la cible des LT mémoires.

Pour échapper à cette réponse immunitaire et persister dans l'organisme, l'EBV établit un état de latence II (expression d'EBNA-1, LMP-1 et LMP-2a) (Babcock et al., 1998). Après la phase aiguë, les cellules B du CG se différencient en cellules B mémoire qui constituent le réservoir de l'EBV. Dans le sang périphérique, l'EBV est retrouvé exclusivement dans ces cellules (Babcock et al., 1998). Il y établit une latence de type 0, durant laquelle aucune protéine virale n'est exprimée, qui lui permet d'échapper au système immunitaire et de rester indéfiniment dans l'organisme (Middeldorp et al., 2003) (Figure 6). Au moment de la division des cellules B mémoires, l'expression d'EBNA-1 est indispensable au maintien de la réplication du génome viral (Hochberg et al., 2004). EBNA-1 est difficilement reconnue par le système immunitaire ce qui empêche l'élimination des cellules qui l'expriment.

Un autre type de latence a été décrit dans des cellules de LB endémiques associés à un sous-type d'EBV ayant un génome délété. Cette latence est caractérisée par l'expression de toutes les protéines nucléaires à l'exception d'EBNA-2 (la délétion du génome comprend le gène EBNA-2 et la partie 3' d'EBNA-LP) et par l'absence d'expression des protéines membranaires (LMPs). L'expression des transcrits EBNAs est sous le contrôle exclusif du promoteur «Wp». Cette latence est donc appelée «latence Wp restreinte». Elle est retrouvée dans environ 15% des LB associés à EBV (Kelly et al., 2002; Kelly et al., 2006; Kelly et al., 2005). Une autre caractéristique très importante de cette latence est l'expression de BHRF1, un homologue viral de Bcl-2 jusqu'alors considérée comme une protéine du cycle lytique (Kelly et al., 2009).

d) Le cycle lytique

Le cycle lytique correspond à la phase réplicative qui permet au virus de produire de nouvelles particules virales. Une réactivation spontanée peut être observée *in vitro* dans certaines lignées, comme la lignée P3HR1 (Agawa et al., 2002; Miller et al., 1985). Le cycle lytique peut également être induit par divers agents exogènes tels que le 12-*O*tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), l'acide butyrique (BA) ou le TGF-β1 (Transforming growth facteur β1) (Fahmi et al., 2000; Luka et al., 1979; zur Hausen et al., 1978). Ces signaux entraînent tous l'activation des deux gènes viraux *BZLF1* et *BRLF1* qui codent pour les facteurs de transcription ZEBRA et Rta responsables de l'activation du cycle productif d'EBV (Revue Manet et al, 2003). Ces derniers vont induire l'expression des gènes précoces à partir de l'origine de réplication lytique du virus.

Les gènes précoces codent pour des protéines nécessaires à la formation du complexe de réplication viral comme l'ADN polymérase BALF5, l'hélicase BBLF4 ou la primase BSLF1 (Holley-Guthrie et al., 1990). Les gènes tardifs, codant les protéines de la capside et les glycoprotéines de l'enveloppe, vont ensuite être traduits (Hummel and Kieff, 1982; Johannsen et al., 2004). Une réactivation lytique peut être observée occasionnellement dans les lymphocytes B mémoires infectés par l'EBV. Les stimuli responsables de cette réactivation virale *in vivo* sont très peu connus. Des particules virales sont alors retrouvées dans la salive et vont propager ainsi l'infection à d'autres individus. De cette façon, le virus établit un état de porteur sain caractérisé par une infection latente des lymphocytes B mémoire et une réactivation occasionnelle du cycle lytique.

3. Pathologies associées à EBV

a) La mononucléose infectieuse

La primo-infection par l'EBV, qui survient souvent tôt dans l'enfance, est souvent asymptomatique. Cependant, si l'infection se produit chez l'adolescent ou le jeune adulte, elle peut se traduire par le développement d'une maladie bénigne appelée mononucléose infectieuse (MNI). La MNI se manifeste dans 90% des cas par une fièvre qui persiste en moyenne 10 à 15 jours, associée à une asthénie prolongée. Elle s'accompagne aussi d'une angine dans plus de 80% des cas. Les patients peuvent également présenter une polyadénopathie ainsi qu'une splénomégalie (pour revue :(Godshall and Kirchner, 2000)). Sur le plan biologique, elle se traduit par une hyperleucocytose avec environ 10% de lymphocytes atypiques de grande taille et hyperbasophiles. Ces derniers correspondent aux lymphocytes T CD8+ induits par la prolifération polyclonale des lymphocytes B infectés. Bien que la MNI soit une pathologie bénigne, de rares complications peuvent parfois survenir comme une encéphalite, une myocardite, une thrombopénie ou une rupture spontanée de la rate.

De nombreuses pathologies malignes sont associées à l'EBV. Nous nous intéresserons ici plus particulièrement au LB, aux PTLD ainsi qu'aux NPC, qui serviront par la suite de modèle pour notre étude.

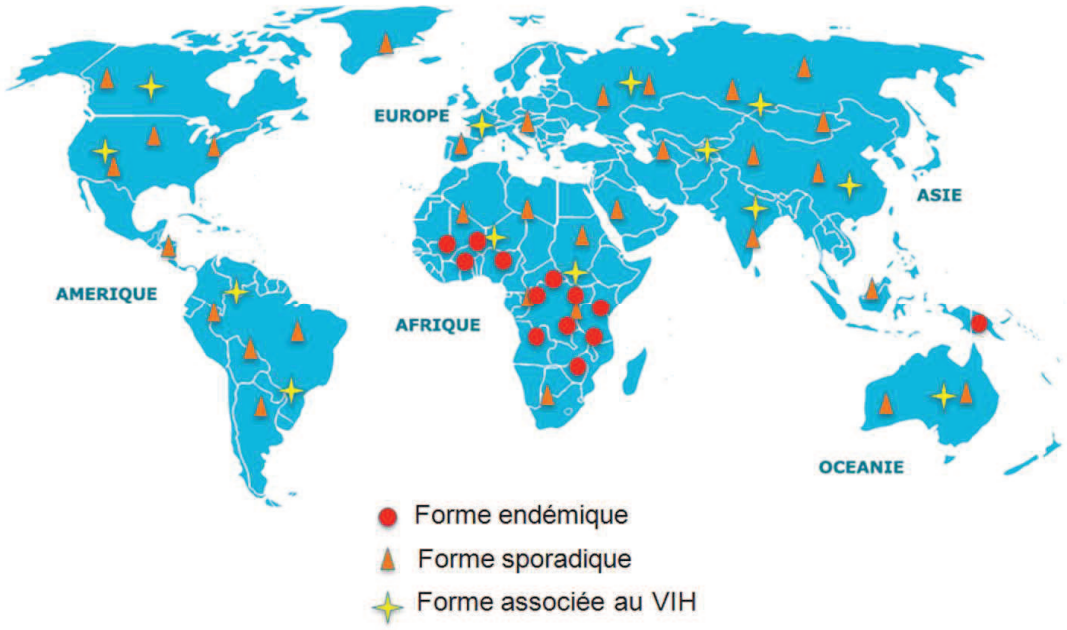


Figure 7 : Epidémiologie du lymphome de Burkitt (LB). Distribution géographique des différentes formes de LB.

Caractéristiques	Endémique	Sporadique
Géographie	Afrique Equatoriale, Papouasie-NouvelleGuinée	Reste du monde
Anatomo-Pathologie	Identique	Identique
Immunologie	Identique	Identique
Cytogénétique	Identique	Identique
Association avec EBV (% des tumeurs)	98%	15 à 20%
Biologie moléculaire	Translocations au niveau du gène c-myc	Translocations au niveau du gène c-myc
Clinique	Atteinte de la face, Atteinte neurologique: paraplégie sans envahissement du LCR	Atteinte de l'abdomen dans 90% des cas
Pronostic de l'atteinte neuro-méningée	meilleur	moins bon

Tableau 1 : Caractéristiques biologiques et cliniques des formes endémique et sporadique du LB

b) Les lymphoprolifératıons malignes

*Le lymphome de Burkitt

Epidémiologie :

Le LB est une prolifération monoclonale de lymphocyte B décrite pour la première fois par Denis Burkitt en 1958. Trois formes cliniques et épidémiologiques de LB sont aujourd'hui décrites par l'Organisation mondiale de la Santé (OMS) (Brady et al., 2007) (Figure 7 et Tableau 1) :

- **Une forme endémique** qui est retrouvée principalement en Afrique équatoriale et en Papouasie-Nouvelle Guinée, dans des zones où la malaria est endémique. Elle survient essentiellement chez les enfants de 4 à 7 ans. Elle est prédominante chez les garçons avec un ratio homme/femme de 2/1. Cette forme de LB est très fortement associée à EBV (98% des cas). Cliniquement, elle se manifeste par des tumeurs de la mâchoire mais également par des tumeurs de la cavité abdominale (reins, tractus gastro-intestinal et ovaires).
- **Une forme sporadique** décrite dans le reste du monde et complètement indépendante des conditions climatiques et des zones géographiques. Elle représente 1 à 2% des lymphomes de l'adulte et plus de 40% des lymphomes de l'enfant aux USA et en Europe de l'ouest (Blum et al., 2004). Elle affecte majoritairement les jeunes hommes (ratio homme/femme de 2.3/1 aux Etats-Unis et de 3.7/1 en France). Elle est associée à EBV dans 15 à 20% des cas (Brady et al., 2007; Kelly and Rickinson, 2007). Cliniquement, cette forme de LB se traduit majoritairement par la présence de tumeurs abdominales (80% des cas).
- **Une forme associée au syndrome d'immunodéficience**, survenant chez les patients infectés par le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine). Cette forme est associée avec EBV dans 30 à 40 % des cas (Brady et al., 2007; Kelly and Rickinson, 2007). L'atteinte est multiviscérale d'emblée.

La plupart des LB associé à EBV présentent une latence de type I. Toutefois, certains cas de latence de type III ont également été observés (Niedobitek et al., 1995).

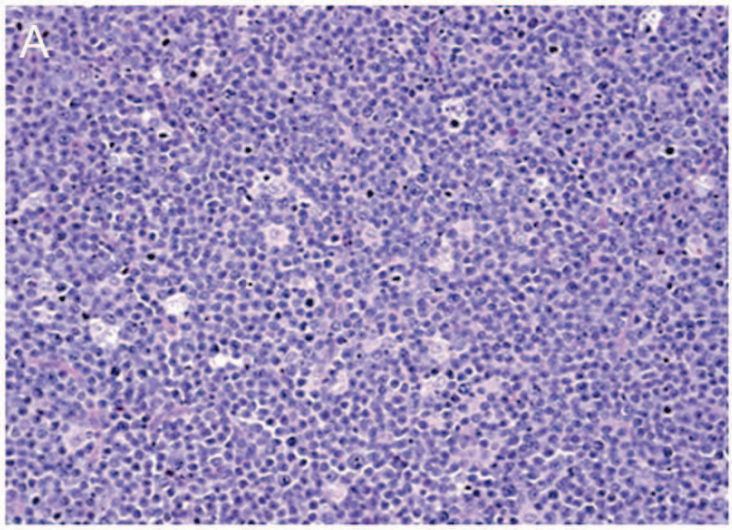


Figure 8 : Caractéristique histologique du lymphome de Burkitt. (Extrait de E M. Molyneux *et al*, 2012). Coupe histologique marquée avec de l'éosine et de l'hématoxyline illustrant l'aspect de ciel étoilé du LB dû aux macrophages infiltrant la tumeur.

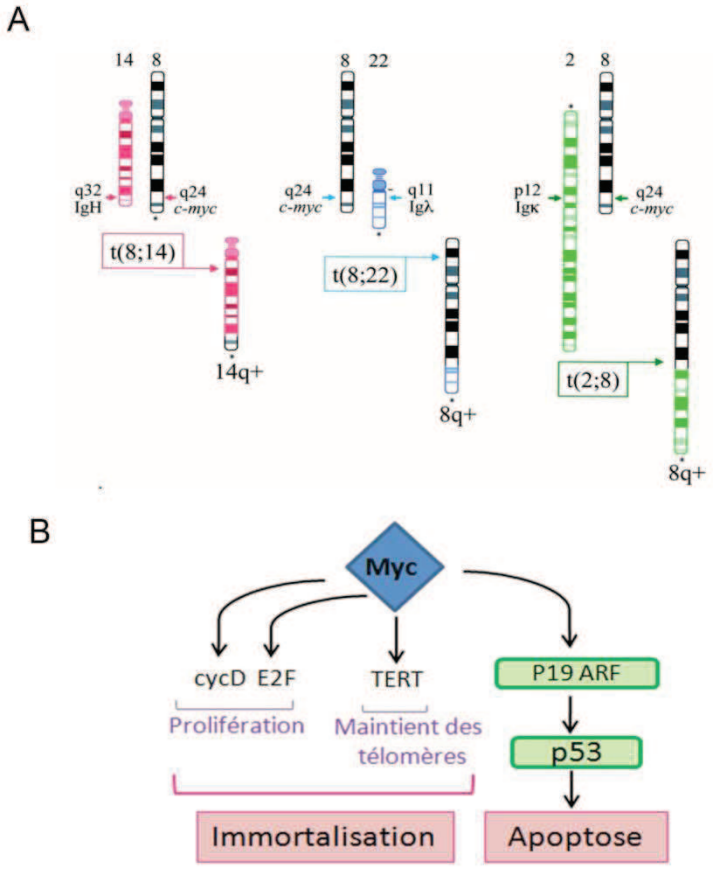


Figure 9 : Implication de c-myc dans le lymphome de Burkitt. A. Les translocations du gène *c-myc* sont des translocations réciproques impliquant le locus du gène *c-myc* porté par le chromosome 8 et l'un des trois loci des chaînes des immunoglobulines, soit les chaînes lourdes (IgH) portées par le chromosome 14, soit les chaînes légères (IgL) k ou λ portées par les chromosomes 2 et 22 respectivement. **B**. (Extrait de F. Bringold and M. Serrano, 2000) Les cibles transcriptionnelles de Myc sont impliquées dans la prolifération et le maintient des télomères ce qui conduit à l'immortalisation des cellules. C-Myc induit la transcription de p19 ARF qui stabilise p53 et favorise l'induction de l'apoptose.

Histologie et biologie :

Le LB est caractérisé par la présence de cellules tumorales rondes, parfois ovales, de taille variable (12 à 25 μm). Les noyaux sont arrondis et présentent deux à cinq nucléoles, entourés d'une fine couronne de cytoplasme contenant de nombreuses vacuoles lipidiques (Harris et al., 1994; Minowada et al., 1967). Cette tumeur est caractérisée par un taux de prolifération cellulaire très élevé ainsi qu'un nombre important de cellules apoptotiques. Des macrophages infiltrants, uniformément dispersés, sont également observés au sein de la tumeur, lui donnant ainsi un aspect de « ciel étoilé » (Figure 8). Les cellules de LB expriment plusieurs antigènes de différenciation des lymphocytes de la lignée B tels que CD19, CD20, CD22 et CD40. La très grande majorité de ces cellules expriment une IgM de surface mais l'expression d'une IgG a toutefois été observée dans certains cas (Gunven et al., 1980; Klein et al., 1968). En 1981, une étude réalisée au laboratoire a permis d'identifier un antigène spécifique des cellules de LB appelé BLA (Wiels et al., 1981). Par la suite, cet antigène de nature glycolipidique a été retrouvé à la surface des lymphocytes B du centre germinatif et il constitue maintenant un antigène de différenciation des lymphocytes B appelé CD77 (Murray et al., 1985).

Anomalies chromosomiques :

Les cellules de LB sont également caractérisées par la présence de translocations chromosomiques qui placent le proto-oncogène *c-myc* au voisinage des gènes codant les chaînes lourdes (IgH) ou légères (IgL) des immunoglobulines (Ig) (Figure 9). *C-myc* joue un rôle essentiel dans différentes fonctions biologiques telles que le développement embryonnaire, la croissance, l'apoptose et la prolifération cellulaire (Pour revue : (Dang, 2012)). Dans 80% des cas, la translocation intervient entre les chromosomes 8 et 14 (t(8;14) (q24;q32)) et juxtapose le gène *c-myc* (chromosome 8) avec les éléments activateurs des chaînes lourdes des Ig présents sur le chromosome 14. Des translocations t(2;8) (p12;q24) et t(8;22) (q24;q11) plaçant le proto-oncogène au voisinage des gènes codant les chaînes légères κ (chromosome 2) et λ (chromosome 22) des Ig sont également retrouvées dans 5 et 15% des cas respectivement (Neri et al., 1988) (Figure 9). Ces différentes translocations entraînent une surexpression systématique de c-myc, considérée comme l'un des événements majeurs menant à la pathogénèse du LB (Magrath, 1990). En effet, des expériences réalisées sur des modèles de souris transgéniques ont montré que a juxtaposition de l'élément activateur Eμ des IgH avec la séquence codante de *c-myc* est suffisante pour induire des tumeurs de type Burkitt chez la souris (Harris et al., 1988).

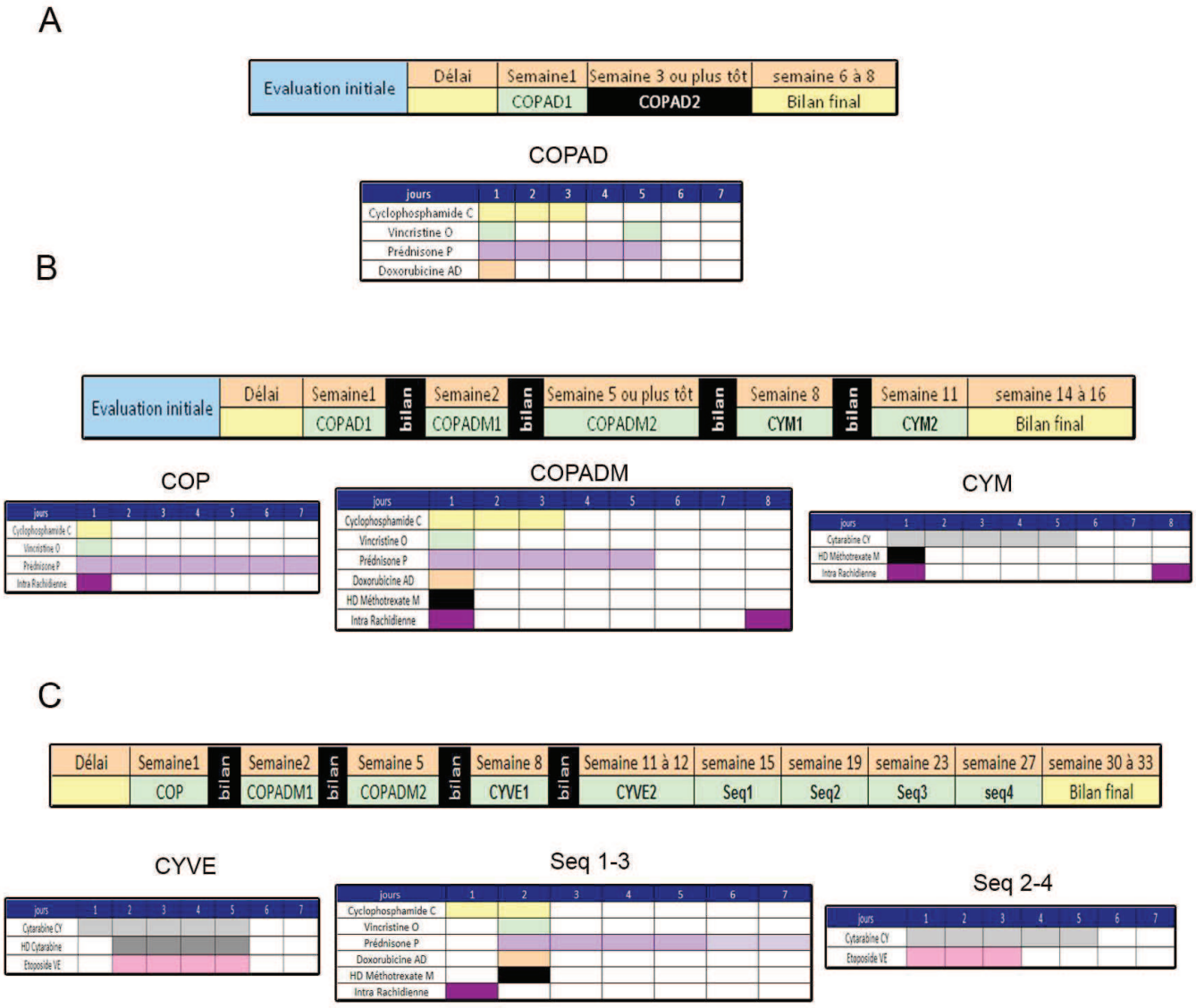


Figure 10 : Stratégie thérapeutique utilisée pour la prise en charge du lymphome de Burkitt à l'IGR. (Extrait de http://www.igr.fr/?p_m=pediatrie&p_id=2056). **A**. En France, le traitement des lymphomes de Burkitt localisés, complètement réséqués, est court et intensif. Il est basé sur deux cures de COPAD**. B.** Dans les formes avec extension loco-régionale, la chimiothérapie est renforcée et un traitement préventif de l'atteinte du système nerveux central est réalisé avec du méthotrexate à haute dose. **C**. Dans les formes avec atteinte médullaire et/ou du système nerveux central, la chimiothérapie est encore intensifiée.

Dans certains contextes cellulaires, la surexpression de c-myc peut induire une apoptose dépendante du suppresseur de tumeur p53 (Evan et al., 1992; Hermeking and Eick, 1994). Il a été montré que ce processus est régulé par l'une des cibles de c-myc, la protéine ARF, qui augmente la stabilité de p53 (Kim and Sharpless, 2006; Zindy et al., 1998).

Traitement du LB :

La prise en charge thérapeutique du LB est évaluée en fonction de l'âge du patient et des facteurs pronostiques qui dépendent de la masse tumorale et de l'atteinte méningée ou médullaire. A partir des années 1980, l'introduction de la doxorubicine (inhibiteur de la topoisomérase II), l'adjonction de cytarabine (antimétabolite inhibiteur de la phase S du cycle cellulaire) ainsi que l'augmentation des doses de cyclophosphamide (agent alkylant) et de méthotrexate (antimétabolite inhibiteur de la phase S du cycle cellulaire), ont permis d'améliorer considérablement la prise en charge des patients atteints de LB. Dans les pays développés, la stratégie thérapeutique est fondée sur un traitement court et intensif, associant plusieurs chimiothérapies et un corticoïde administrés en cures courtes et discontinues (Molyneux et al., 2012) (Figure 10). Le traitement des tumeurs très localisées et réséquées (représentant à peine 10 % des patients) est très court. Dans ce cas, deux cures de chimiothérapie composées de vincristine (alcaloïde empêchant la polymérisation des microtubulles), cyclophosphamide, doxorubicine (COPAD) et prednisone (corticostéroïde) sont réalisées (Patte et al., 2007). Pour les stades plus avancés de la maladie, le traitement se divise en plusieurs phases et repose en France sur les protocoles LMB (Lymphome Malin B) :

- **une phase cytoréductive** basée sur l'administration de cyclophosphamide, de prednisone et de vincristine (COP)
- **une phase d'induction**, comprenant deux cures successives de COPADM (cyclophosphamide, prednisone, vincristine, doxorubicine, méthotrexate)
- **une phase de consolidation**, où deux cures composées de cytarabine et de méthotrexate sont réalisées
- **une phase d'entretien** (COPADM)

Le risque de syndrome de lyse tumorale ainsi que la toxicité des chimiothérapies utilisées nécessitent la présence de soins de support efficaces, difficiles à mettre en place dans les pays en voie de développement. En Afrique, le traitement repose donc principalement sur l'injection intraveineuse de cyclophosphamide complétée par une injection intrarachidienne de methotrexate et d'hydrocortisone.

Bien que le pronostic du LB sporadique soit très favorable (90% de rémission en moyenne chez l'enfant et 70% chez l'adulte), de nouvelles stratégies thérapeutiques sont désormais évaluées. Ainsi, plusieurs essais cliniques ont été mis en place afin de tester l'efficacité du Rituximab, un anticorps monoclonal anti-CD20, chez des patients présentant un stade avancé de la maladie (Griffin et al., 2009).

* Les lymphoprolifératıons des sujets transplantés

Epidémiologie :

Les désordres lymphoprolifératifs post-transplantations (PTLD) surviennent dans le cadre de l'immunosuppression qui suit une transplantation d'organes ou de moelle osseuse. Le risque de survenu de ce syndrome varie en fonction du type d'organe transplanté. En effet l'incidence des PTLD est de 1% après transplantation rénale, de 1 à 2% après transplantation hépatique et peut atteindre 5 à 10% des cas de transplantation cardiaque (pour revue : Raphaël *et al,* 2007). Cette différence peut s'expliquer en partie par l'utilisation d'immunosuppresseurs différents mais aussi par une durée d'immunosuppression variable en fonction des organes transplantés. Les PTLD sont très fortement associés à EBV et le risque de survenu est donc 10 à 20 fois plus élevé lorsque le receveur est séronégatif pour l'EBV et que le donneur est séropositif (Cockfield et al., 1993). Cependant, cette association avec le virus semble beaucoup moins importante chez les patients qui développent une lymphoprolifération tardivement après la greffe (>5 ans) (Leblond et al., 1998). Dans la grande majorité des cas, les PTLD surviennent dans les 12 premiers mois post-transplantation (Gupta et al., 2010). Toutefois ce délai varie de nouveau en fonction de l'organe transplanté. La précocité de survenue (moins de 6 mois après la greffe) est considérée comme un facteur de mauvais pronostic (Choquet et al., 2002). Les PTLD sont plus fréquents chez l'enfant que chez l'adulte en raison des séroconversions EBV (Johnson et al., 2006).

Histologie et biologie :

Les PTLD sont très souvent disséminés et extra-ganglionnaires. Ces lymphoprolifératıons sont fréquemment retrouvées au niveau du tube digestif, du système nerveux central, du foie, des poumons ou de l'organe greffé (tableau 2). Une atteinte du greffon est décrite dans 60% des cas pour les greffes cœur/poumon et dans 15 à 30% pour les greffes de rein.

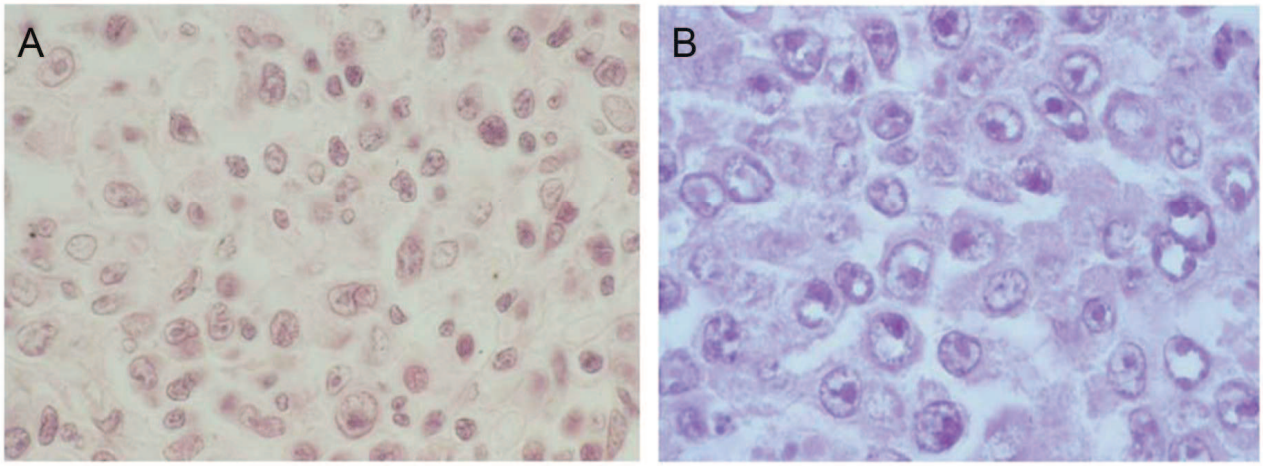


Figure 11 : caractéristiques histologiques des PTLD. (D'après M. Raphaël *et al*, 2007). **A**. Marquage Hématéine éosine x 400 : Lésion polymorphe : présence d'un spectre morphologique d'éléments lymphoïdes de taille et de formes variées. Certains éléments sont de grande taille avec des noyaux fortement nucléolés. **B**. Aspect de lymphome B diffus à grandes cellules. Les éléments cellulaires lymphoïdes de grande taille sont monomorphes et présentent un aspect immunoblastique, x 1000.

Localisation	Signes cliniques	Fréquence (%)
Ganglionnaire dont rate et MO	Adénopathies, hépatosplénomégalies, hypertrophie amygdalienne	30
Greffon	Gros reins, insuffisance rénale, obstacle, sténose artérielle, lymphocèle	20
Digestives	Hémorragies, perforations, occlusions, pancréatite	20
Cérébro-méningées	Déficit sensitivo-moteur, irritation pyramidale	14
Cutanéo-muqueuses	Tumeur cutannée ou gingivale	8
ORL	Obstruction des voies aériennes, envahissement sinusien	6
Séreuses	épenchement pleural, ascite	2,5
Ganglionnaires	Infiltrat parenchymateux	1,5

Tableau 2 : **Localisation des PTLD et signes cliniques associés**

catégorie de PTLD	début	caractéristiques histo-pathologiques	clonalité	mutation d'un oncogène
PTLD précoces: hyperplasies lymphocytaires hyperplasies lymphoïdes atypiques,syndromes apparentés aux mononucléoses infectieuses	Précoce (< 3 mois)	Préservation de l'architecture ganglionnaire Détection d'EBV	Polyclonal	Non
PTLD polymorphiques	variable	Destruction de l'architecture ganglionnaire Association de lymphocytes B et T Lymphocytes B à tous stades de maturation Détection d'EBV	Monoclonalité en grande majorité	Non
PTLD monomorphes: lymphomes B à grande cellules, lymphomes Burkitt like, lymphomes T	tardif (>3 mois > 10 ans)	Déstruction de l'architecture ganglionnaire atteintes extra-ganglionnaires EBV+ ou EBV-	Monoclonal	Oui: P53, Ras

Tableau 3 : Caractéristiques des différentes formes de PTLD

Malgré cette atteinte fréquente au niveau de l'organe greffé, la prolifération provient des cellules lymphoïdes du receveur dans 90% des cas (Weissmann et al., 1995). Les PTLD sont très majoritairement issus de la prolifération de lymphocytes B (90%) mais ils peuvent également provenir de lymphocytes T (Hanson et al., 1996) ou, très rarement, de cellules NK (Draoua et al., 2004). Ils sont fortement associés à l'infection par l'EBV où le virus établit essentiellement une latence de type III (Figure 11). Ils se caractérisent par un large spectre morpholgique et ont été classés par l'OMS en 2001 en fonctions de plusieurs critères histopathologiques en trois catégories (Tableau 3) :

- **les lésions précoces** qui comprennent l'hyperplasie plasmocytaire et les lésions de type MNI. L'hyperplasie plasmocytaire, caractérisée par la présence de nombreux plasmocytes, n'est pas toujours associée à l'EBV. Elle est considérée come une hyperplasie réactionnelle et non pas comme un authentique PTLD. En revanche, L'EBV est toujours associé aux lésions de type MNI. Ces dernières présentent de très nombreux immunoblastes ainsi que des lymphocytes T et des plasmocytes. Ces lésions précoces ne présentent pas d'anomalies cytogénétiques.

- **les lésions polymorphes** qui correspondent à des lymphoprolifératons monoclonales dans la grande majorité des cas. Ces lésions comportent un large spectre d'éléments lymphoïdes correspondant à tous les stades de maturation des lymphocytes B. La détection d'EBV est quasi constante dans ces lésions, ce qui permet de les distinguer d'un rejet de greffe. Les anomalies caryotypiques sont peu fréquentes et il n'est pas observé de mutations des oncogènes *Ras* et *Myc* ou du suppresseur de tumeur *p53* (Poirel et al., 2005).

- **les lésions monomorphes** qui se caractérisent par des lymphoprolifératons diffuses, constituées de grandes cellules correspondant à des immunoblastes, à des cellules anaplasiques ou à des cellules de type centroblastiques. Ces lésions sont monoclonales, quelle que soit leur nature B ou T. L'association avec l'EBV varie en fonction du délai de survenue de ces lymphoprolifératons. Une association avec le virus est observée dans 80% des cas lorsqu'elles surviennent dans un délai inférieur à 5 ans après la greffe. Dans les prolifératons plus tardives, développées plus de 5 ans après la greffe, la fréquence d'association avec l'EBV est de 50%. Ces lésions peuvent présenter des anomalies chromosomiques complexes. Ainsi, des mutations des oncogènes *c-myc, Bcl-2, Ras*, du suppresseur de tumeur *p53* et du gène *Bcl-6* ont été décrites (Cesarman et al., 1998; Knowles et al., 1995).

Traitement des PTLD :

La prise en charge des PTLD repose sur plusieurs stratégies dont la levée de l'immunosuppression, permettant la guérison par restauration d'une réponse immunitaire antivirale efficace (Rees et al., 1998; Starzl et al., 1984). Toutefois, cette stratégie thérapeutique expose le patient à un risque de rejet de greffe qui peut lui être fatal. Des traitements antiviraux ont également été utilisés à titre préventif ou curatif (Hocker et al., 2012). Les résultats obtenus sont controversés et dépendent de l'activité thymidine-kinase observée en cas de réplication virale. L'une des stratégies envisagée aujourd'hui chez les patients présentant une lymphoprolifération associée à l'EBV, consiste à induire le cycle lytique du virus pour ensuite utiliser un antiviral comme le ganciclovir ou l'aciclovir. L'interferon α possède des propriétés anti-virales et anti-prolifératives. Son efficacité a donc été testée pour le traitement des PTLD, en association avec la levée de l'immunosuppression. Cette étude a donné des résultats concluants avec une rémission complète chez 8 patients sur 14 traités (Davis et al., 1998).

Le Rituximab est également utilisé pour le traitement des PTLD. Cet anticorps monoclonal chimérique de type IgG1 est dirigé contre le CD20, un marqueur de surface spécifique des lymphocytes B normaux et tumoraux. Les régions constantes de cet anticorps monoclonal chimérique correspondent à des séquences humaines et les régions variables à des séquences souris. Son activité anti-tumorale provient de sa capacité à lyser les cellules cancéreuses par l'activation de certains mécanismes immunitaires comme l'ADCC (Antibody-Dependant Cell Cytotoxicity : Cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps) et la cytotoxicité médiée par le complément. Son efficacité a été prouvée au cours de nombreuses études, dont une réalisée en France, qui a donné des résultats très satisfaisants avec 65% de réponse chez les patients ayant subit une transplantation d'organe et 83% de réponse chez les patients ayant subi une greffe de moelle osseuse (Milpied et al., 2000). Une autre étude de phase II, réalisée chez 43 patients présentant une lymphoprolifération B qui ne répondaient pas à la levée de l'immunosuppression, a montré que le Rituximab induisait une rémission chez 44% des patients avec un taux de survie global de 67% à 1 an (Choquet et al., 2006). Toutefois, certains patients ne répondent pas à ce traitement. Dans ce cas, une polychimiothérapie composée de cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisone (COPAD) est envisagée.

Malgré la mise en place de stratégies thérapeutiques de plus en plus efficaces, le pronostic des PTLD reste sombre. En effet, la survie globale des patients atteints de PTLD est de 40 à 60% suite à une greffe d'organe (Caillard et al., 2006; Choquet et al., 2007) et de 10 % suite à une greffe de moelle osseuse.

* La maladie de Hodgkin

La maladie de Hodgkin se manifeste généralement sous forme d'une adénopathie. Les biopsies révèlent alors une rupture de l'architecture des ganglions lymphatiques ainsi que la présence de grandes cellules atypiques binuclées, appelées cellules de Reed-Sternberg (RS), qui constituent 1 à 5% de la masse tumorale (Figure 12). L'origine des cellules de RS a été largement controversée mais il semblerait qu'elles dérivent d'une lignée lymphocytaire B du centre germinatif (Kanzler et al., 1996). Il existe 2 formes de la maladie : une forme nodulaire à prédominance lymphocytaire (5% des cas) et une forme classique retrouvée dans 95% des cas. La MNI semble constituer un facteur de risque pour le développement de la maladie de Hodgkin (Gutensohn and Cole, 1981). Plusieurs études ont montré que l'EBV était impliqué dans le développement de cette pathologie (Hjalgrim et al., 2007). Le virus est retrouvé dans 40% des cellules de RS issues d'une forme classique de cette maladie où il établit une latence de type II avec expression des protéines EBNA-1, LMP-1 et LMP-2A (Jarrett and MacKenzie, 1999). Lorsque cette maladie survient chez des patients atteints de SIDA, l'association avec EBV est supérieure à 95%.

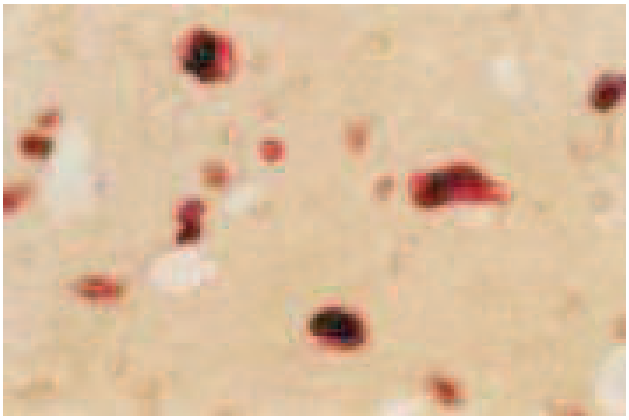
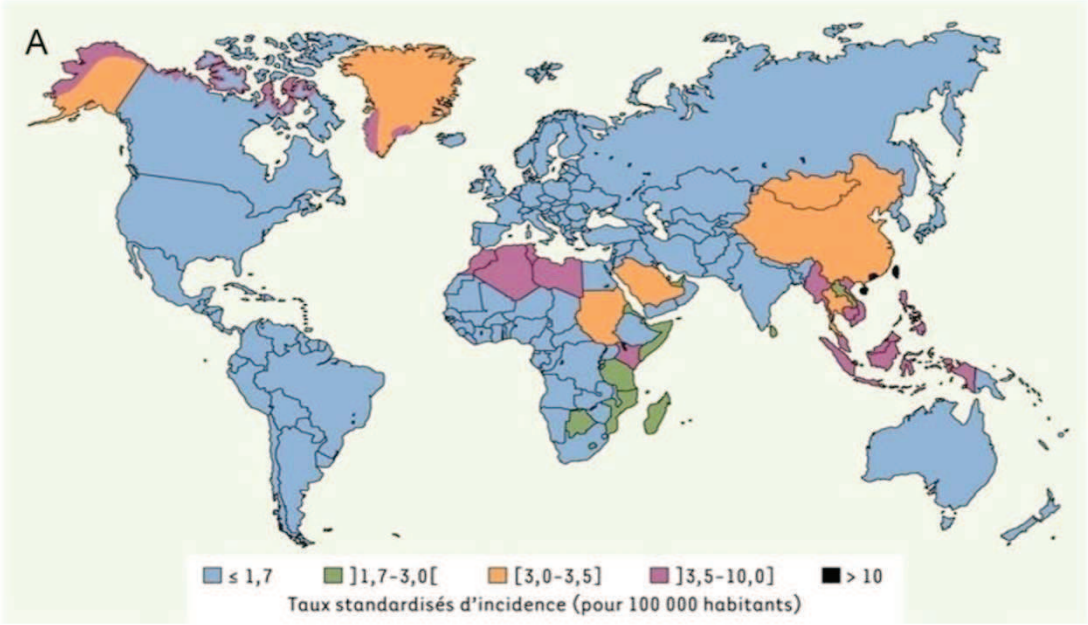
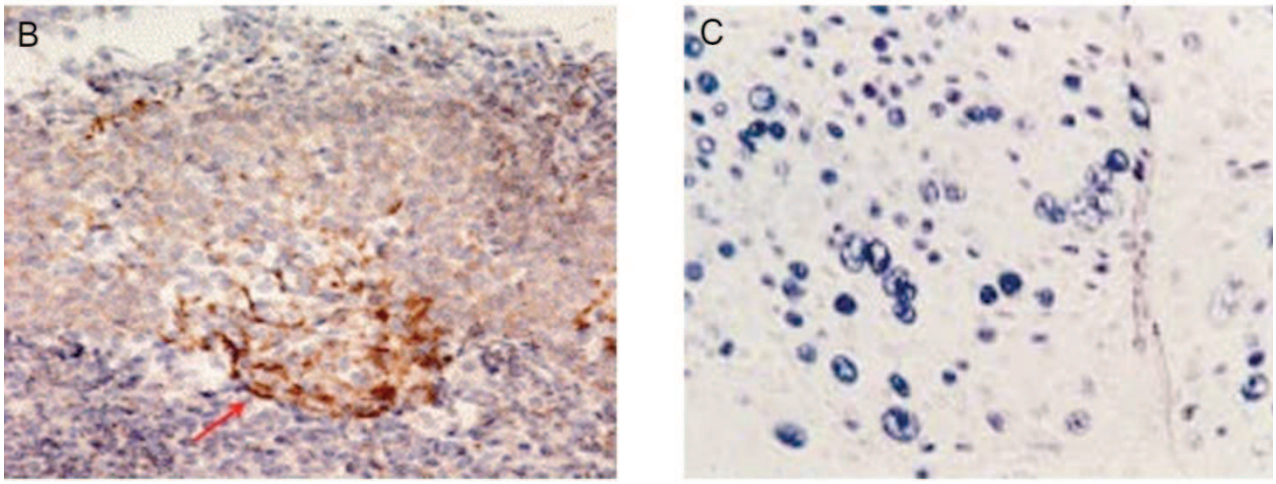


Figure 12 : Expression de la LMP-1 (coloration rouge) et des EBERs (coloration marron/noir) dans les cellules de Reed-Stemberg. (Extrait de K R N. Baumforth et al, 1999).

* Le lymphome T/NK extranodal de type nasal

Le lymphome T/NK à localisation nasale est une prolifération tumorale extra-ganglionnaire très fréquente en Asie et plus rare en Occident. Ce lymphome touche préférentiellement les hommes avec un ratio homme/femme de 3/1. Il se manifeste par la présence d'une lésion ulcérée, souvent unique, touchant la cavité nasale, le rhinopharynx et le palais.





<u>Figure 13</u> : Caractéristiques épidémiologiques et histologiques du carcinome du nasopharynx. A. (Extrait de Busson et *al,* 2004). Distribution géographique des NPC chez les individus de sexe masculin. Document établi par l'unité d'épidémiologie génétique du Centre international de recherche sur le cancer (CIRC, Lyon) d'après GLOBOCAN 2000. **B.** (Extrait de Kwok-Wai Lo *et al*, 2012). Expression de la LMP1 (flèche rouge) au sein de lésions épithéliales de haut grade du nasopharynx (NPIL). **C**. (Extrait de K R N. Baumforth et al, 1999). Marquage des EBERs sur une coupe de NPC indifférencié.

Il peut exister une extension vers les sinus de la face, l'oropharynx, l'orbite et la base du crâne. Ces tumeurs expriment le marqueur CD56 (marqueur des cellules NK) mais n'expriment pas le CD3. De plus, elles ne présentent pas de réarrangements au niveau des gènes qui codent pour le TCR. Ces caractéristiques montrent que ces lymphomes ont pour origine les cellules NK (Cheung et al., 2003; Jaffe et al., 1996). Ces lymphoprolifération monoclonales sont associées à EBV dans quasiment 100% des cas. Les cellules présentent une infection clonale et un profil de latence de type I/II (Kanegane et al., 1998). Peu de choses sont actuellement connues sur le rôle de l'EBV dans ces pathologies. Ceci est dû au manque de modèles de cellules T immortalisées par l'EBV.

Ce lymphome est particulièrement agressif et le pronostic est défavorable puisque la survie globale à 5 ans ne dépasse pas les 40%.

c) Les prolifération épithéliales malignes

* Le carcinome du nasopharynx (NPC)

Épidémiologie :

Le carcinome du nasopharynx (NPC) est une tumeur maligne se développant à partir des cellules épithéliales du nasopharynx. Son association avec EBV est systématique. La répartition géographique du NPC est très inégale. En effet, cette tumeur maligne est très rare dans la plupart des pays du monde et notamment en Europe où l'incidence annuelle est inférieure à 1/100 000. Les foyers de forte incidence se situent en extrême Orient, principalement en Chine du Sud. Il existe également des zones d'incidence intermédiaire telles que l'Afrique du Nord, l'Indonésie, le Vietnam, le Kenya ou le Groenland (Yu and Yuan, 2002) (Figure 13 A). La distribution des NPC peut s'expliquer par l'existence de facteurs de prédisposition génétique, par la diffusion de souches d'EBV plus agressives dans certaines populations ainsi que par certains facteurs environnementaux qui peuvent favoriser l'apparition de la maladie. Une étude a mis en évidence l'existence d'un risque majeur lié à la consommation de poissons et de viandes conservés par salaison. D'autres facteurs alimentaires sont incriminés comme l'utilisation de certains condiments ou de certaines graisses animales (graisse de mouton, beurre rance) (Jeannel et al., 1990; Laouamri et al., 2001; Yu and Yuan, 2002).

Le NPC est une tumeur de l'adulte avec un pic d'incidence vers 40-60 ans. De plus, les hommes sont plus touchés que les femmes avec un ratio homme/femme de 3/1.

Biologie et histologie du NPC :

Le lien entre l'EBV et le NPC a été suggéré sur la base de tests sérologiques (Henle and Henle, 1976) et a été confirmé par la mise en évidence d'ADN viral dans le noyau de toutes les cellules malignes (Klein et al., 1974). Le NPC est ainsi le premier carcinome à avoir été associé au virus. Les gènes viraux les plus abondamment transcrits dans les NPC sont ceux qui codent pour les EBER1 et 2. Plusieurs protéines de latence sont également détectées au sein de ces tumeurs comme EBNA-1, exprimée dans 100% des cas et la LMP1, exprimée dans 50% des cas (Figure 13 B et C). D'autres gènes viraux, tels que ceux codant pour LMP-2, BARF0 et BARF1, sont transcrits dans les NPC. Toutefois, les protéines correspondantes sont difficilement détectable (pour revue, (Busson et al., 2004)).

Le carcinome du nasopharynx est une tumeur qui se développe aux dépens de l'épithélium de la cavité rétronasale. Il est caractérisé, d'un point de vue histologique, par la présence de cellules carcinomateuses indifférenciées et d'un infiltrat lymphocytaire très abondant, nécessaire à la croissance des cellules tumorales. Il est classé par l'OMS en trois types histologiques selon le degré de maturation épithéliale :

- le type I correspond au degré maximum de différentiation (carcinome épidermoïde kératinisant)
- le type II est le carcinome épidermoïde non kératininisant (absence de kératine extracellulaire)
- le type III comprend les carcinomes indifférenciés du rhinopharynx (UCNT pour Undifferentiated Carcinoma of Nasopharyngeal Type)

Traitement des NPC

Les NPC se développent dans une cavité anatomique peu accessible. Ainsi, la chirurgie n'est pas une option thérapeutique envisagée pour la prise en charge de ces carcinomes. De plus, les NPC sont en général plus radiosensibles et chimiosensibles que les autres carcinomes des voies aérodigestives supérieures. Ainsi, la radiothérapie constitue le traitement de base de la tumeur primitive.

Elle peut être associée à une chimiothérapie basée essentiellement sur le cisplatine (agent alkylant) qui peut être utilisé en combinaison avec d'autres agents comme le 5-Fluoro-Uracile (5-FU, antimétabolite) (Wolff et al., 2010). Toutefois, les rechutes métastatiques et les récidives locales sont encore fréquentes. Ainsi, de nouvelles stratégies thérapeutiques, basées essentiellement sur l'utilisation de traitements ciblés, sont actuellement évaluées. Ces nouvelles molécules (capécitabine, gemcitabine...) sont actuellement en cours d'essais dans les formes récidivantes et métastatiques pour lesquelles il n'existe toujours pas de traitement standard satisfaisant (Li et al., 2008b; Ma et al., 2009). Le pronostic du NPC est très bon (survie globale de 75%) si le diagnostic est précoce mais il est beaucoup plus sévère en cas d'extension tumorale à distance, notamment au niveau de la base du crâne.

* Les carcinomes gastriques

Les carcinomes gastriques représentent 10% des cancers dans le monde et sont considérés comme étant la seconde cause de mortalité par cancer (Ferlay et al., 2007). Les taux d'incidence les plus élevés (>40/100 000 habitants) ont été rapportés au Japon, en Chine, en Corée, en Europe de l'Est et dans certains pays d'Amérique latine tandis que les taux les plus bas sont rencontrés aux Etats-Unis, en Afrique et en Australie (Parkin et al., 2005). Les hommes sont plus touchés par cette maladie que les femmes avec un ratio homme/femme de 3/2.

L'EBV a tout d'abord été recherché dans les carcinomes gastriques de type lympho-épithélial car ils possèdent des caractéristiques histologiques communes avec les NPC indifférenciés. Le virus a alors été trouvé dans 80% des cas. L'extension des études à d'autres types histologiques a montré que l'EBV est présent dans les cellules tumorales dans 4 à 18% des cas, selon l'origine géographique des patients étudiés (Tokunaga et al., 1993). Dans ces tumeurs, l'infection est monoclonale et se traduit par l'expression d'un programme de latence de type I (Yanai et al., 1997). Les transcrits des gènes *BARF1* ont également été détectés. Plusieurs études suggèrent qu'EBV pourrait avoir un rôle étiologique dans la carcinogénèse. En effet, l'infection par l'EBV de lignées épithéliales gastriques permet une meilleure prolifération cellulaire et une croissance en agar (Nishikawa et al., 1999). De plus, les carcinomes gastriques infectés par EBV sont plus résistants à l'apoptose induite par divers stimuli (Kume et al., 1999).

* Les cancers du sein

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment rencontré chez la femme. Plusieurs facteurs sont impliqués dans le développement de cette maladie, tels que des facteurs environnementaux, génétiques, hormonaux et alimentaires. L'EBV a été mis en évidence par des techniques de PCR conventionnelle dans 20 à 50% de tissus cancéreux mammaires (Bonnet et al., 1999; Fina et al., 2001; Labrecque et al., 1995; Luqmani and Shousha, 1995). Dans ces tumeurs, la charge virale est faible, rendant ainsi la détection du virus difficile. De plus, la distribution du génome viral est très hétérogène au sein d'une même tumeur et d'une tumeur à l'autre (Arbach et al., 2006). Des transcrits de certains gènes latents ont été détectés par RT-PCR au sein des tumeurs mammaires EBV positives tels que des transcrits *EBNA1*, retrouvés dans 80% des cas et les transcrits des deux oncogènes viraux *LMP1* et *BARF1*, détectés respectivement dans 20% et 57% des cas. Une étude a également révélée que l'infection par EBV provoque une résistance des cellules de carcinomes mammaires au traitement avec le paclitaxel (Arbach et al., 2006). Néanmoins, d'autres travaux n'ont pas réussi à mettre en évidence la présence du virus au sein de ces tumeurs (Chu et al., 1998; Glaser et al., 1998). Ainsi, l'association entre EBV et cancers du sein reste très controversée.

4. Description des produits des gènes de latence et de leur pouvoir oncogénique

La présence de l'EBV à l'état latent dans les cellules peut altérer certaines fonctions cellulaires et conduire à la transformation tumorale. Ce sont principalement les protéines EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3C ainsi que les LMP qui sont impliquées dans l'oncogénèse associée au virus.

a) La protéine EBNA-1

La protéine EBNA-1 est codée par le gène viral *BKRF*. La transcription de ce gène se fait sous le contrôle de promoteurs différents en fonction du programme de latence dans lequel se trouve la cellule. Elle est réalisée à partir du promoteur Wp, au moment de la circularisation du génome viral. Puis, lorsque la transformation cellulaire est établie la transcription passe sous le contrôle du promoteur Cp, comme pour les autres protéines EBNA.

Durant les phases de latence de type I et II, où la protéine EBNA-1 est la seule des protéines EBNA à être produite, les promoteurs Cp et Wp sont éteints par méthylation. Le promoteur Qp prend donc le relais (Schaefer et al., 1997).

D'un point de vue structurel, EBNA-1 est composé de 641 acides aminés. Elle présente un domaine amino-terminal basique, riche en répétition Glycine-Alanine (Figure 14). Ce motif empêche la dégradation de la protéine par le protéasome, ainsi que sa présentation par le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe I (Levitskaya et al., 1997). De cette façon, EBNA-1 n'est pas reconnue par les lymphocytes T cytotoxiques. Elle possède également un deuxième domaine basique qui contient un signal de localisation nucléaire ainsi qu'un domaine carboxy-terminal hydrophobe au sein duquel se situent le domaine de dimérisation et un domaine de fixation à l'ADN (Ambinder et al., 1991).

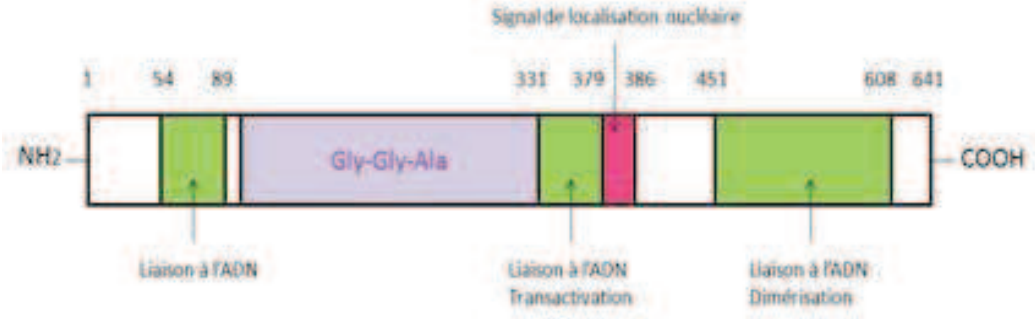


Figure 14 : structure de la protéine EBNA-1. (D'après Iwakiri et al, 2006)**.** EBNA-1 est constitué de différents domaines : trois domaines de liaison à l'ADN (vert), un domaine riche en résidus Glycine et Alanine (violet), une séquence signal de localisation nucléaire (rose), un domaine de transactivation (vert) et un domaine de dimérisation (vert)

La protéine EBNA-1 est retrouvée dans tous les types de latence et, de ce fait, dans toutes les pathologies associées à EBV. Cette dernière se fixe sur une région du génome viral constituée de répétitions, située dans l'origine de réplication plasmidique (oriP) et également sur les chromosomes de la cellule hôte lors de la mitose (Wu et al., 2002). La liaison d'EBNA-1 à l'ADN permet la réplication et le maintien du génome viral dans les cellules en division. La protéine EBNA-1 peut également agir en tant qu'activateur transcriptionnel en se fixant sur certains promoteurs viraux tels que les promoteurs Qp, Cp et LMP-1p. Elle peut induire l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, comme celui codant la cycline D1.

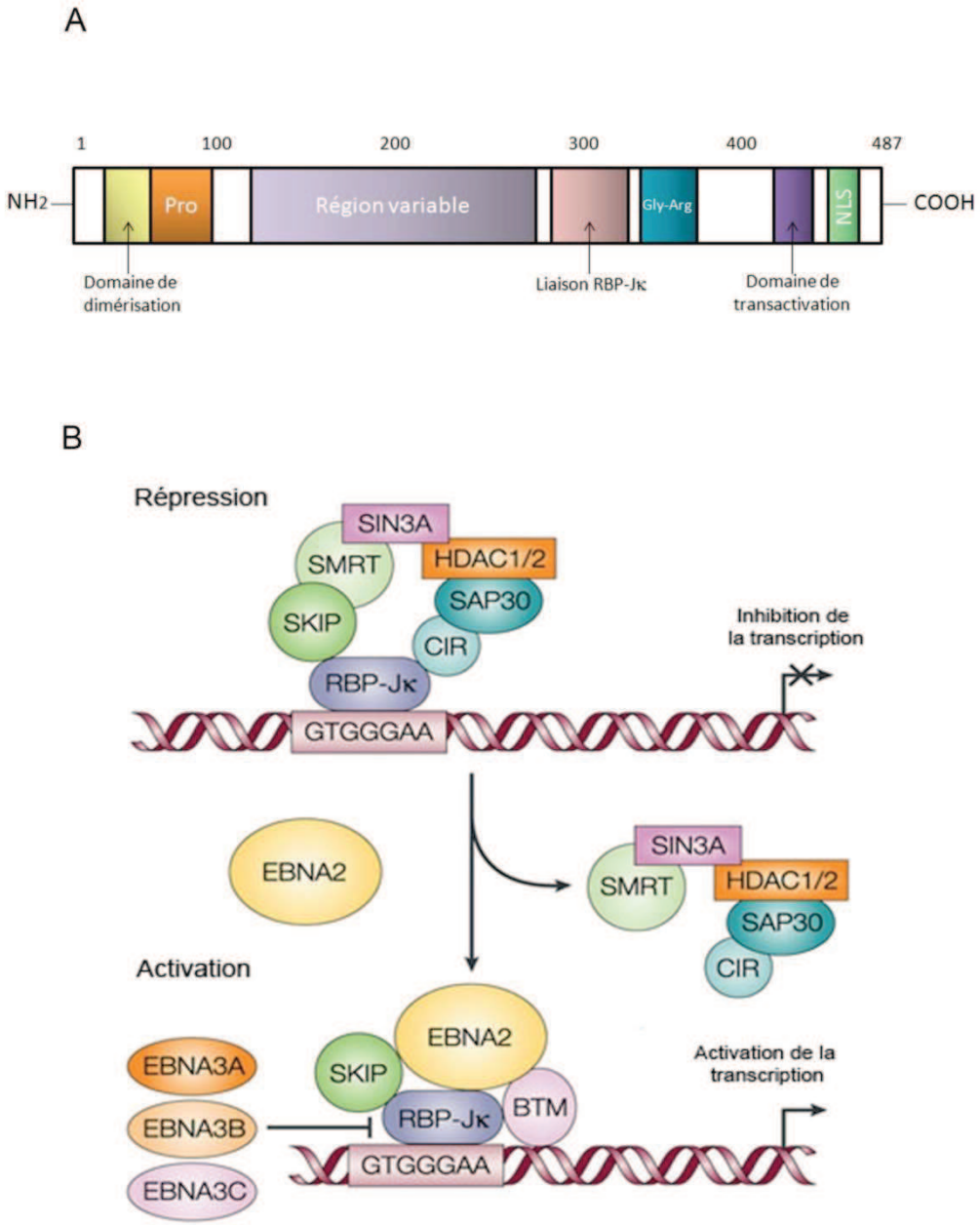


Figure 15 : Structure et fonction de la protéine EBNA-2. A. (Adapté de U Zimber-Strobl and L J. Strobl, 2001). EBNA-2 est constituée de différents domaines : un domaine d'homodimérisation (jaune), une région riche en proline (Pro, en orange), une région variable selon le type de variants EBNA-2A ou EBNA-2B, un domaine d'interaction avec la protéine RBP-Jκ (rose), une région riche en Arginine et Glycine (Gly-Arg, bleu), un domaine de transactivation (violet) et une séquence signal de localisation nucléaire (vert). **B**. (Adapté de Young and Rickinson 2004). EBNA-2 est un activateur transcriptionnel qui interagit avec le facteur RBP-Jκ et inhibe ainsi la répression de la transcription exercée par plusieurs facteurs tels que SMAT, SIN3A ainsi que les histones désacétylases HDAC1 et HDAC2. SKIP (Ski Interacting Protein) interagit avec le facteur RBP-Jκ et avec le complexe formé par les répresseurs transcriptionnels. EBNA-2 lève l'inhibition de la transcription médiée par RBP-Jκ en entrant en compétition avec ce complexe répresseur et en interagissant avec RBP-Jκ et SKIP. EBNA-2 recrute alors la machinerie transcriptionnelle pour activer la transcription. La famille des EBNA-3 module l'activité d'EBNA-2 en se liant à RBP-Jκ à la place de cette dernière.

Elle régule également l'expression des gènes codant les chimiokines CCL3 et CCL4 (Hebner et al., 2003; Leight and Sugden, 2000)et serait donc impliquée dans le processus de migration cellulaire. Plusieurs études ont montré l'importance d'EBNA1 pour la transformation cellulaire. Ainsi, l'expression de cette protéine dans les cellules B de souris transgéniques augmente l'incidence de lymphomes B et de leucémies, suggérant un rôle oncogénique d'EBNA-1 *in vivo* (Wilson et al., 1996; Wilson and Levine, 1992). D'autres travaux montrent que l'expression de cette protéine dans une lignée de NPC augmente ses propriétés tumorigènes et métastatiques (Sheu et al., 1996). EBNA-1 semble également impliquée dans l'inhibition de l'apoptose des cellules B infectées par l'EBV quelque soit le type de latence (Kennedy et al., 2003). D'après les travaux de l'équipe de Robertson, elle protégerait les cellules en induisant la surexpression d'une protéine anti-apoptotique, la survivine (Lu et al., 2011).

b) La protéine EBNA-2

La protéine EBNA-2 est codée par le gène *BYRF-1*. Elle est la première protéine virale exprimée lors de l'infection, sous le contrôle du promoteur Wp. EBNA-2 contient, en position amino-terminale, une région DIM d'homo-dimérisation (1-58) suivie d'un motif poly-proline (58-97). Dans la région carboxy-terminale d'EBNA-2 quatre régions ont été décrites : une région d'interaction avec le facteur CBF1/RBP-Jkappa (280-337), une région riche en résidus Arginine/Glycine (RG, 341-355), un domaine de transactivation (TAD, 437-475) et une région contenant une séquence de localisation nucléaire (NLS, 477-483) (Figure 15 A).

EBNA-2 est un puissant activateur transcriptionnel qui recrute par son domaine TAD (TransActivation Domain) des protéines de la machinerie transcriptionnelle telles que des facteurs de transcription (comme TFIIB, TFIIH, TAF40, p100), des protéines constituant le complexe histone acétyltransférase HAT, comme CAF (p300/CBP-Associated Factor), et des protéines comme CBP/p300 (CREB-Binding Protein/p300) (Tong et al., 1995; Wang et al., 2000). Elle recrute également les facteurs de remodelage de la chromatine du complexe Swi/Snf (Wu et al., 1996; Wu et al., 2000). EBNA-2 stimule ainsi la transcription de certains gènes viraux tels que ceux codant la LMP-1 et la LMP-2 (Wang et al., 1990). Elle est également responsable de la surexpression de certains gènes cellulaires comme *c-myc, c-fgr* ou ceux codant les protéines membranaires CD21 (récepteur d'EBV) et CD23 (marqueur d'activation des lymphocytes B) (Cordier et al., 1990; Kaiser et al., 1999).

EBNA2 est aussi impliquée dans la transition entre les promoteurs Wp et Cp, observée précocement dans l'infection de lymphocyte B (Woisetschlaeger et al., 1990).

EBNA-2 ne se fixe pas directement sur l'ADN, son activité dépend donc de son interaction avec certaines protéines cellulaires comme le facteur de liaison à l'ADN RBP-Jκ (Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin Kappa J region) (Grossman et al., 1994. RBP-J est impliqué dans la transduction du signal du récepteur Notch. Cette voie est importante pour la régulation de la survie et de la prolifération cellulaire et sa dérégulation contribue au développement de lymphomes T chez l'homme {Artavanis-Tsakonas, 1995 #675). L'interaction du récepteur Notch avec ses ligands induit un ensemble de clivages protéolytiques à l'origine du relargage dans le cytoplasme de la partie active du récepteur, NotchIC (Notch IntraCellulaire). Ce dernier va être ensuite transloqué dans le noyau et interagir avec le facteur RBP-Jκ (Brou et al., 2000; De Strooper et al., 1999). EBNA-2, tout comme NotchIC, interagit avec le facteur RBP-Jκ pour activer l'expression de ses gènes cibles. En absence d'EBNA-2 ou de NotchIC, RBP-Jκ fonctionne comme un répresseur transcriptionnel en interagissant avec un complexe répresseur de la transcription (Hayward, 2004; Olave et al., 1998). EBNA-2 peut donc être considéré comme l'homologue constitutivement actif du récepteur Notch (Figure 15 B).

c) Les protéines EBNA-3 (- 3 A, - 3 B et - 3 C)

Les protéines EBNA-3A, EBNA-3B et EBNA-3C sont codées par les cadres de lectures *BLRF3/BERF, BERF2a/BERF2b et BERF3/BERF4,* localisés en tandem sur le génome viral. Tout comme EBNA-1 et EBNA-2, la transcription des gènes codant les EBNA-3 est sous le contrôle des promoteurs Wp et Cp (Bodescot et al., 1986). Les EBNA-3 sont des protéines nucléaires localisées au niveau de la matrice nucléaire et du nucléoplasme (Joab et al., 1987). Elles contiennent des répétitions d'heptade de leucine, d'isoleucine ou de valine qui peuvent agir en tant que domaines de dimérisation (Figure 16). Ces trois protéines ne possèdent pas les mêmes fonctions cellulaires. EBNA-3A et EBNA-3C sont essentielles pour l'immortalisation des LCLs (Tomkinson et al., 1993) contrairement à EBNA-3B (Tomkinson and Kieff, 1992). En effet, la délétion de l'exon codant EBNA-3B ne perturbe ni l'immortalisation, ni la croissance des lymphocytes B *in vitro* (Chen et al., 2005).

Comme EBNA-2, les EBNA-3 se fixent indirectement à l'ADN par l'intermédiaire du facteur RBP-Jκ (Robertson et al., 1996) (Figure 16).

Cependant, les fixations d'EBNA-2 et des EBNA-3 à RBP-Jκ, semblent mutuellement exclusives (Johannsen et al., 1996; Waltzer et al., 1996). Ainsi, en se fixant à RBP-Jκ, les EBNA-3A et EBNA-3C déplacent la liaison de ce facteur à l'ADN et inhibent la transactivation des gènes cibles d'EBNA-2. De plus, EBNA-3C exerce un rôle de répresseur transcriptionnel en recrutant des histones désacétylases (HDACs) comme HDAC1 et HDAC2 qui répriment la transcription par des modifications épigénétiques et par le remodelage de la chromatine. Cette protéine interagit également avec des co-répresseurs de la transcription tels que CtBP, mSin3A et NCoR (Knight et al., 2003; Radkov et al., 1999; Touitou et al., 2001).

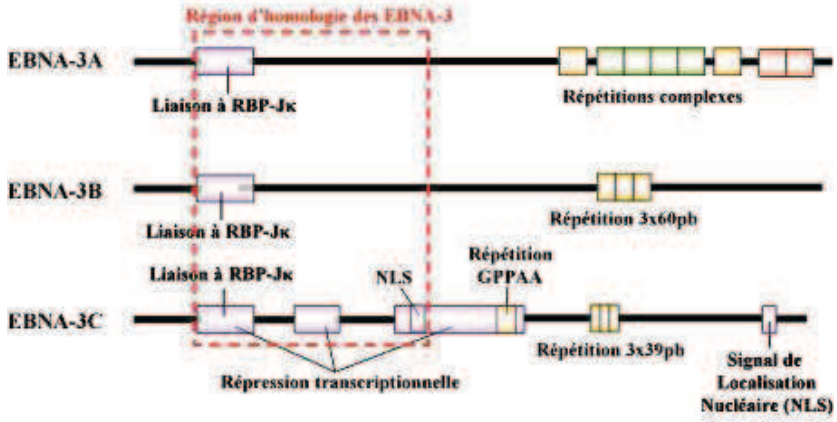


Figure 16 : Structure des protéines de la famille des EBNA-3. Les 3 EBNA-3 présentent un domaine d'homologie qui contient le domaine de liaison à RBP-Jκ. Ces protéines sont nucléaires grâce à leur séquence NLS. Elles contiennent des répétitions d'heptade de leucine, d'isoleucine ou de valine qui peuvent agir en tant que domaines de dimérisation

EBNA-3C joue un rôle essentiel dans la tumorigénèse associé à EBV en régulant la prolifération, le cycle cellulaire et les capacités métastasiques des cellules infectées par ce virus. En effet, il a été montré que cette protéine est capable d'interagir avec *c-myc*, permettant ainsi la stabilisation de cet oncogène et l'augmentation de la transcription de ses gènes cibles (Bajaj et al., 2008). EBNA-3C est également capable de réguler le suppresseur de tumeur Rb (rétinoblastome) en favorisant sa phosphorylation (Knight and Robertson, 2004; Knight et al., 2004) et sa dégradation (Knight et al., 2005a). Cette dégradation permet la libération du facteur E2F et la progression du cycle cellulaire de la phase G1 vers la phase S (Subramanian et al., 2002). EBNA-3C peut aussi agir sur un autre inhibiteur du cycle cellulaire, p27Kip en empêchant son accumulation (Parker et al., 2000) et en augmentant sa dégradation (Knight et al., 2005b). Par ailleurs, il a été montré qu'EBNA-3C pouvait stabiliser la protéine MDM2. Ce mécanisme favorise la dégradation du suppresseur de tumeur p53, dont nous reparlerons dans les prochains chapitres, permettant alors la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'apoptose (Saha et al., 2009).

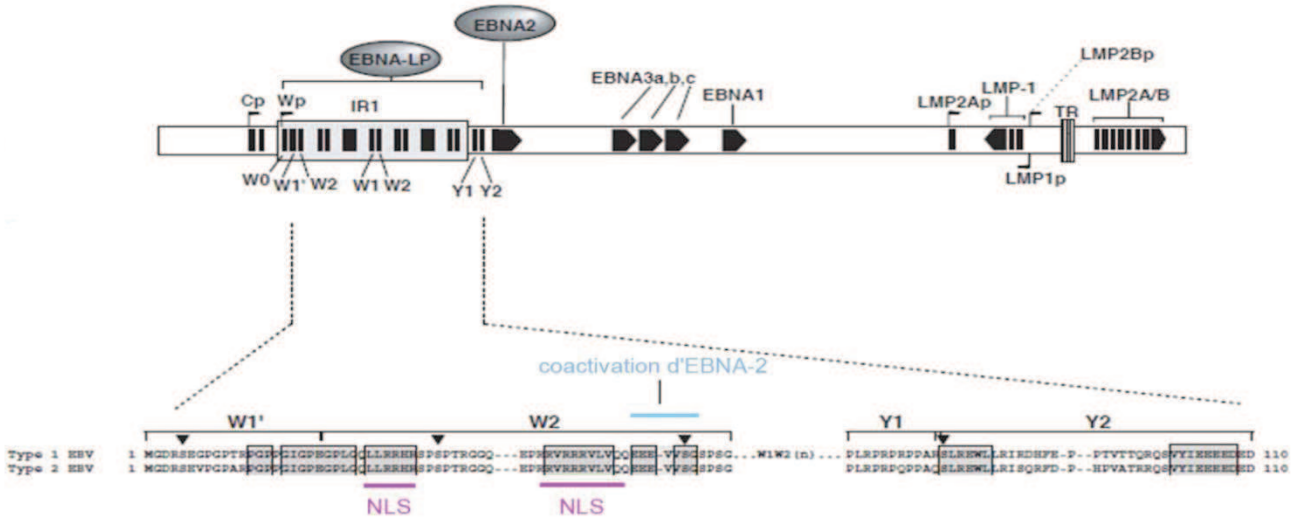


Figure 17 : Structure de la protéine EBNA-LP. (Extrait de Ling *et al*, 2005). La protéine EBNA-LP est exprimée à partir des séquences répétées internes 1 (IR1) sous le contrôle des promoteurs «Cp» ou «Wp». Elle est constituée de domaines W1W2 répétés en tandem, et d'un domaine unique Y1Y2 en C-terminal. EBNA-LP possède une séquence de localisation nucléaire (NLS) bipartite située sur les domaines W2.

Les protéines EBNA-3A et C peuvent inhiber l'apoptose par un autre mécanisme. En effet, de récentes études ont montré que ces deux protéines sont capables de diminuer la transcription de la protéine pro-apoptotique Bim en recrutant le complexe PCR2, impliqué dans la répression de la transcription, au niveau du promoteur de Bim (Anderton et al., 2008; Clybouw et al., 2005; Paschos et al., 2012). Enfin, EBNA-3C augmente les capacités métastasiques des cellules infectées par l'EBV en interagissant avec le suppresseur de métastases, Nm23-H1 (Subramanian et al., 2001). Cette interaction neutralise d'une part la fonction de Nm23-H1 et induit, d'autre part, l'expression de la métalloprotéase MMP-9 connue pour son implication dans les lymphomes aggressifs (Kuppers et al., 2005).

d) EBNA-LP (Epstein Barr virus Nuclear Antigen Leader Protein)

La protéine EBNA-LP est codée par le gène *BWRF1*. Elle est la première, avec EBNA-2, à être exprimée à partir du promoteur Wp lors de l'infection. Cette protéine est constituée d'une partie amino-terminale composée de répétitions en tandem de 66 acides aminés codés par deux exons W1 (22 aa) et W2 (44 aa), dérivés de la région IR1. Elle comporte également un domaine unique en C-terminal codés par deux exons Y1 et Y2, situés en aval du domaine IR1 (Dillner et al., 1986). EBNA-LP possède, au sein des exons W2 et plus spécifiquement des régions conservées CR1 et CR2 (Conserved Region 1 et 2), des séquences bipartites de localisation nucléaire (Peng et al., 2000) (Figure 17). Sa localisation sub-cellulaire reste toutefois controversée. En effet, certaines études ont montré qu'EBNA-LP est essentiellement nucléaire et qu'elle se concentre au niveau des corps nucléaires PML (ProMyelocytic Leukemia) *(Szekely et al., 1996)*. En revanche, d'autres travaux ont montré que cette protéine peut interagir avec des protéines cytoplasmiques telles que HAX-1, Bcl-2 et son homologue viral BHRF1 (Kawaguchi et al., 2000; Matsuda et al., 2003). Une étude réalisée par Ling *et al* pourrait expliquer en partie ces résultats contradictoires. Les auteurs ont, en effet, montré que les isoformes d'EBNA-LP inférieures à 42kDa peuvent être exportées du noyau vers le cytoplasme de façon passive alors que celles supérieures à 62 kDa ne possèdent pas cette propriété et restent donc dans le noyau (Ling et al., 2009).

EBNA-LP n'est pas indispensable au processus d'immortalisation mais elle en augmente l'efficacité (Mannick et al., 1991). Une de ses fonctions principales est de coopérer avec EBNA-2 afin de potentialiser son activité transcriptionnelle. Il a notamment été montré que l'interaction entre EBNA-LP et EBNA-2 active l'expression du gène codant la LMP-1 (Nitsche et al., 1997) ainsi que celui codant la cycline D2.

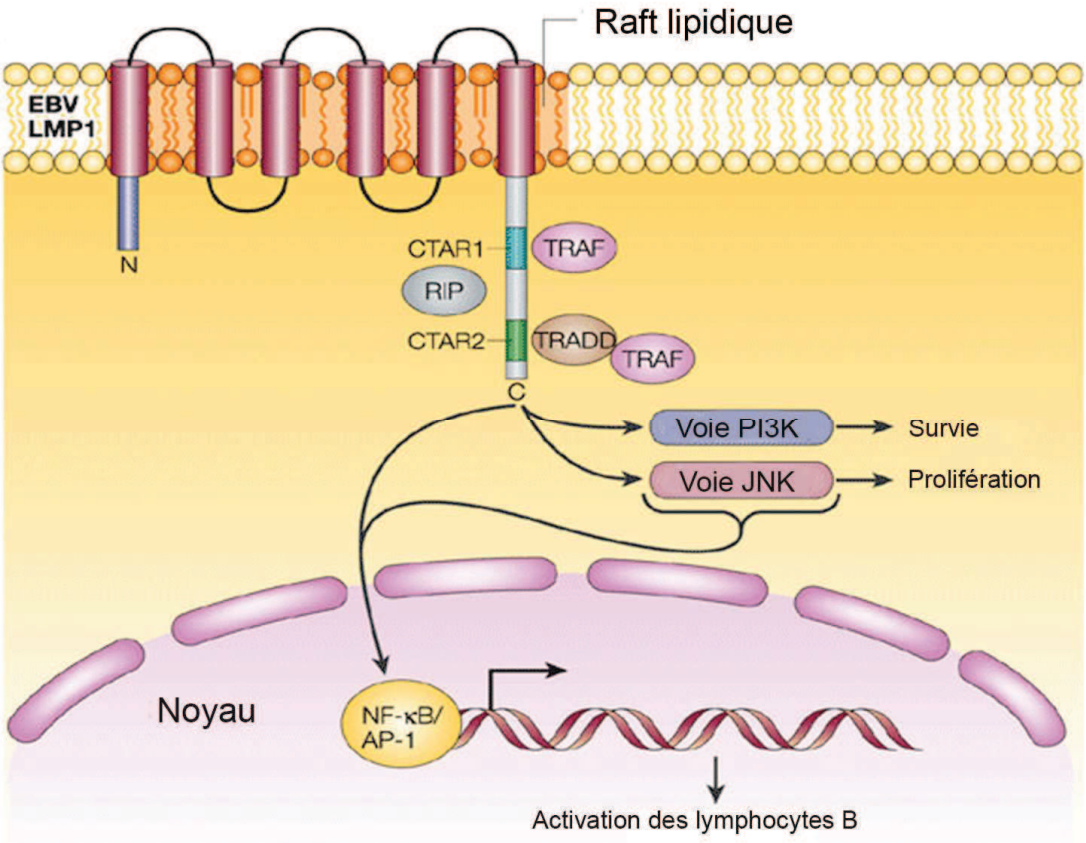


Figure 18 : Voies de signalisation induites par la LMP-1. (D'après B. Damania, 2004). La LMP-1 est une protéine transmembranaire constituée de trois domaines : un domaine N-terminal cytoplasmique essentiel à l'immortalisation des cellules B par l'EBV, un domaine transmembaranaire constitué de six boucles hydrophobiques impliquées dans l'auto-aggrégation de la LMP-1 et un domaine C-terminal responsable de l'induction des différentes voies de signalisation. Ce domaine contient deux régions fonctionnelles distinctes appelées CTAR1 et 2 (C-Terminal Activation Regions). Grâce aux régions CTAR1 et 2, la LMP-1 recrute les protéines TRAFs (TNF Receptor Associated Factors) et induit de nombreuses voies de signalisation de manière constitutive. Parmi ces voies on note la voie NFκB, la voie des MAP kinases (JNK, ERK et p38), la voie JAK/STAT et la voie PI3-K (phosphatidylinositol 3-kinase).

Ce mécanisme induit la transition de la phase G0 à la phase G1 du cycle cellulaire, ce qui permet aux lymphocytes B de sortir de leur état de quiescence (Sinclair et al., 1994).

Par ailleurs, cette protéine interagit avec de nombreuses protéines cellulaires comme pRB, p53, p14ARF, HA95, Sp100 ou CBP, ce qui laisse supposer qu'elle est impliquée dans la régulation de la transcription, du cycle cellulaire et de l'apoptose (Bandobashi et al., 2001; Han et al., 2001; Kashuba et al., 2003; Ling et al., 2005; Szekely et al., 1993).

Une étude menée dans notre laboratoire s'est intéressée aux fonctions attribuées à la forme tronquée d'EBNA-LP délétée de la région unique Y1Y2 (EBNA-LPt). Celle-ci est exprimée dans certaines lignées comme P3HR1, une lignée de LB infectée par une souche variante d'EBV délétée du gène codant pour la protéine EBNA-2 et de la partie 3' du gène codant pour EBNA-LP. Cette souche du virus induit la latence « Wp restreinte » précedemment décrite. Les résultats obtenus lors de cette étude ont montré que cette forme tronquée d'EBNA-LP interagit avec la protéine phosphatase 2A (PP2A), inhibant l'activité de cette dernière en réponse à un stimulus apoptotique (Garibal et al., 2007). D'autres travaux plus récents, menés au sein de notre équipe par Sonia Chelouah, ont montré qu'EBNA-LPt forme également des complexes avec d'autres protéines impliquées dans de nombreux processus cellulaires, notamment dans l'apoptose et dans la régulation transcriptionnelle. De plus, d'autres résultats obtenus par Sonia Chelouah suggèrent que les deux formes d'EBNA-LP sont capables de réguler l'expression des gènes cellulaires indépendamment du contexte viral. Certains de ces gènes sont communs aux deux formes d'EBNA-LP alors que d'autres sont spécifiques de chaque forme. Parmi ces gènes, on retrouve celui codant pour la protéine ID1, qui est impliquée dans la stabilisation de la LMP-1 et dans l'immortalisation cellulaire (Chelouah *et al*, en préparation).

e) La protéine LMP-1

La LMP-1 est codée par le gène *BNLF1*. Cette protéine est constituée de 3 domaines : un domaine N-terminal cytoplasmique de 24 aa, un domaine transmembranaire de 162 aa, composé de 6 hélices α, et un domaine C-terminal cytoplasmique de 200 aa. Les domaines N terminal et transmembranaire sont responsables de l'ancrage de la LMP-1 à la membrane. Le domaine C-terminal cytoplasmique est, quant à lui, impliqué dans l'activation des voies de signalisation cellulaires induites par LMP-1.

La LMP-1 est considérée comme l'oncogène majeur d'EBV (Eliopoulos and Young, 2001). Ses propriétés oncogéniques ont été montrées *in vitro* et *in vivo*.

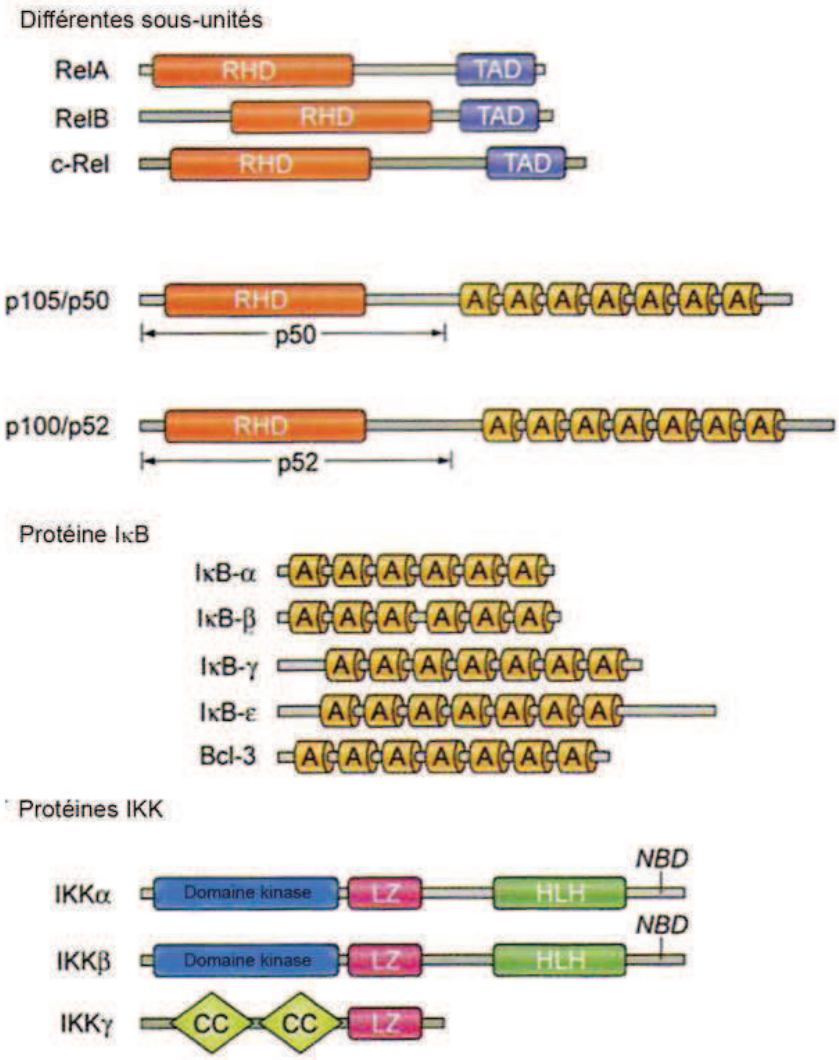


Figure 19 : Structure des différents membres de la famille du facteur NF-κB. (Adapté de P. Jost, 2007). Plusieurs membres de la famille de NF-κB ont été décrits : p50 et son précurseur p105 (NF-κB1), p52 et son précurseur p100 (NF-κB2), RelA (p65), RelB et c-Rel. Ces derniers possèdent un domaine N-terminal conservé (RHD) qui permet leur dimérisation et leur localisation nucléaire. RelA, RelB et c-Rel possèdent également un domaine de transactivation au niveau de leur région C-terminale (TAD). Les membres de cette famille sont capables de réaliser des homodimères ou des hétérodimères, qui sont retenus dans le cytoplasme par les molécules de la famille IκB. Les membres de cette famille sont caractérisés par la présence de 6 ou 7 répétitions ankyrine (A) qui favorisent les interactions protéines-protéines. Le motif ankyrine se fixe sur la séquence de localisation nucléaire de NF-κB et est donc important pour la séquestration de ce dernier dans le cytoplasme. Le complexe IKK est composé de deux sous-unités qui contiennent une activité kinase (IKKα et IKKβ) et présentent un domaine Hélice-Boucle-Hélice (HLH) ainsi qu'un motif leucine zipper (LZ). Ce complexe possède également une sous-unité régulatrice IKKγ (NEMO) qui interagit avec les sous-unités catalytiques grâce à leur domaine NBD (Nemo Binding Domain). IKKγ présente un motif coiled-coil (CC) ainsi qu'un domaine leucine zipper (LZ).

Les premières données obtenues *in vitro* ont montré que l'expression de la LMP-1 dans des lignées de fibroblates de rongeurs, induit la transformation de ces cellules (inhibition de la différenciation, augmentation de la prolifération, diminuation de l'apoptose, réduction du besoin en sérum, perte de l'inhibition de contact) (Wang et al., 1985). Plusieurs études ont ensuite été réalisées *in vivo* sur des souris transgéniques exprimant cette protéine sous le contrôle de différents promoteurs. Les premières expériences ont été effectuées sur un modèle de souris transgéniques exprimant la LMP-1 sous le contrôle du promoteur du polyomavirus. Dans ces souris, l'expression de la protéine est restreinte aux cellules de la peau. Elle induit une hyperplasie avec altération de l'expression des gènes de kératines (Wilson et al., 1990). Le groupe de Nancy Raab-Traub a ensuite établi les premières lignées de souris transgéniques permettant l'expression de la LMP-1 dans les lymphocytes B, grâce à l'utilisation du promoteur des chaînes lourdes des immunoglobulines. Les trois lignées de souris ainsi obtenues ont développé des lymphomes B avec un niveau d'expression de LMP-1 très élevé par rapport au tissu lymphoïde sain (Kulwichit et al., 1998). D'autres expériences, réalisées à partir de ces lignées de souris transgéniques, ont montré que la LMP-1 mimait le récepteur CD40 (Uchida et al., 1999). Contrairement aux récepteurs cellulaires dont l'activation dépend d'un ligand, la LMP-1 est constitutivement active (Gires et al., 1997). Son activation se traduit par un détournement et une dérégulation de voies de signalisations impliquées notamment dans des processus prolifératifs ou de résistance à l'apoptose (Eliopoulos and Young, 2001). Ces signaux de transduction sont transmis par sa partie carboxy-terminale qui interagit avec les membres de la famille TRAF (TNFR-associated factor) et avec TRADD (TNRF-associated death domain protein). La première voie qui a été décrite comme étant régulée par la LMP-1 a été la voie NF-κB (Herrero et al., 1995). Depuis, d'autres voies de signalisation majeures ont été associées à la LMP-1 comme la voie des MAP-kinases (mitogen-activated protein kinases) et celle des PI3-kinases ((phosphatidyl-Inositide 3 kinases) (Figure 18).

* LMP1 et voie NF-κB :

Initialement décrit dans les lymphocytes B, le facteur NF-κB est ubiquitaire. Il est impliqué dans de nombreux processus cellulaires tels que la réponse immunitaire, la prolifération et l'apoptose. Plusieurs membres de la famille de NF-κB ont été décrits : p50 et son précurseur p105 (NF-κB1), p52 et son précurseur p100 (NF-κB2), RelA (p65), RelB et c-Rel. Les membres de cette famille forment des homodimères ou des hétérodimères qui sont retenus dans le cytoplasme par les protéines de la famille IκB (inhibitor of NF-κB) (Figure 19).

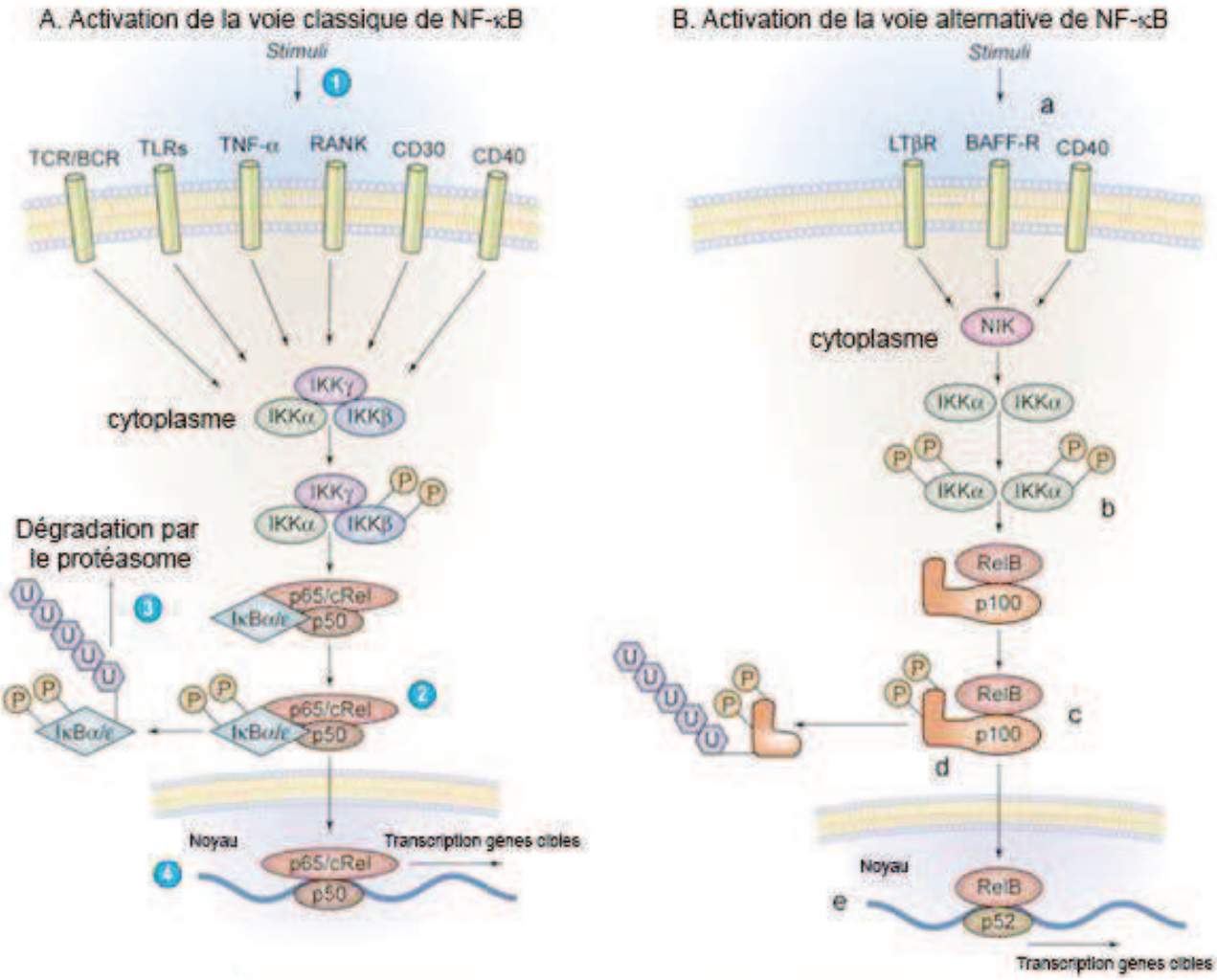


Figure 20 : voies classiques et voie alternative de NF-κB. (Adapté de P. Jost, 2007). **A**. Plusieurs stimuli activent la voie classique de NF-κB (1) tels que des cytokines comme le TNFα ou l'IL-1. La fixation de ces dernières sur leurs récepteurs se caractérise par l'activation du complexe IKK qui va alors phosphoryler les résidus sérines présents au niveau N-terminal des protéines de la famille IκB (2). Ceci entraîne une poliubiquitinylation de ces protéines (3) qui vont être dégradées par le protéasome. Les complexes p50/Rel A ou c-Rel sont alors libérés et vont migrer vers le noyau où ils pourront activer la transcription de leurs gènes cibles. **B**. L'activation de certains récepteurs comme le CD40 peut induire la voie alternative d'activation de NF-κB (a). Cela se traduit par une stabilisation de la kinase NIK qui va phosphoryler la kinase IκBα (b). IκBα activée phosphoryle à son tour p100 (c) ce qui conduit à son ubiquitinylation et à sa dégradation par le protéasome (d). Rel B est alors libéré et le complexe p52/ Rel B est transloqué dans le noyau afin d'induire la transcription de ses gènes cibles (e).

Par ses domaines CTAR1 et CTAR2, la LMP-1 induit les deux voies de signalisation conduisant à l'activation des différents complexes de la famille de NF-κB (Laherty et al., 1992; Luftig et al., 2004). Le domaine CTAR2 induit la voie classique de NF-κB. Ce domaine fixe les adaptateurs TRADD, RIP et TRAF6, permettant le recrutement de la kinase TAK1 (TGF-β Associated Kinase I) et des protéines TAB (TAKI-Binding proteins) (Izumi and Kieff, 1997). Ces protéines sont responsables de la phosphorylation de la sous-unité IKKβ du complexe IKK. Le complexe IKK phosphoryle l'inhibiteur de NF-κB, IκBα, qui est alors dégradé par le protéasome après polyubiquitinylation (pour revue (Karin and Ben-Neriah, 2000)). Les complexes NF-κB, contenant principalement les sous-unités RelA, p50 et c-Rel sont alors transloqués dans le noyau (Figure 20). La LMP-1 induit également la voie alternative de NF-κB par l'intermédiaire du domaine CTAR1 qui interagit avec les protéines TRAF1, 2, 3 et 5 (Devergne et al., 1996; Mosialos et al., 1995). Le recrutement de TRAF3 induit l'activation de la kinase NIK (NF-κB inducing kinase) qui phosphoryle IKKα. La formation du complexe NIK/IKKα/p100 permet la phosphorylation et l'ubiquitinylation du précurseur p100, aboutissant ainsi à la formation de la sous-unité active p52. Cette dernière peut alors s'associer à la sous-unité RelB (Atkinson et al., 2003) (Figure 20).

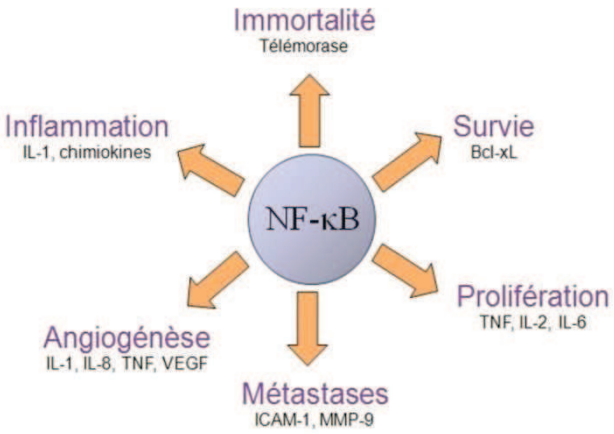


Figure 21 : Voies de signalisation induites par NF-κB. NF-κB cible les promoteurs de gènes impliqués dans de nombreux processus cellulaire physiologiques et pathologiques tels que l'inflammation, l'immortalisation, la survie, l'angiogénèse, la prolifération et l'invasion métastatique.

NF-κB possède plus de 150 gènes cibles impliqués dans diverses grandes fonctions physiologiques. Il régule notamment plusieurs gènes indispensables pour la réponse inflammatoire tels que ceux codant pour le TNFα ou pour les interleukines IL-6 et IL-8 (Collart et al., 1990; Kang et al., 2007).

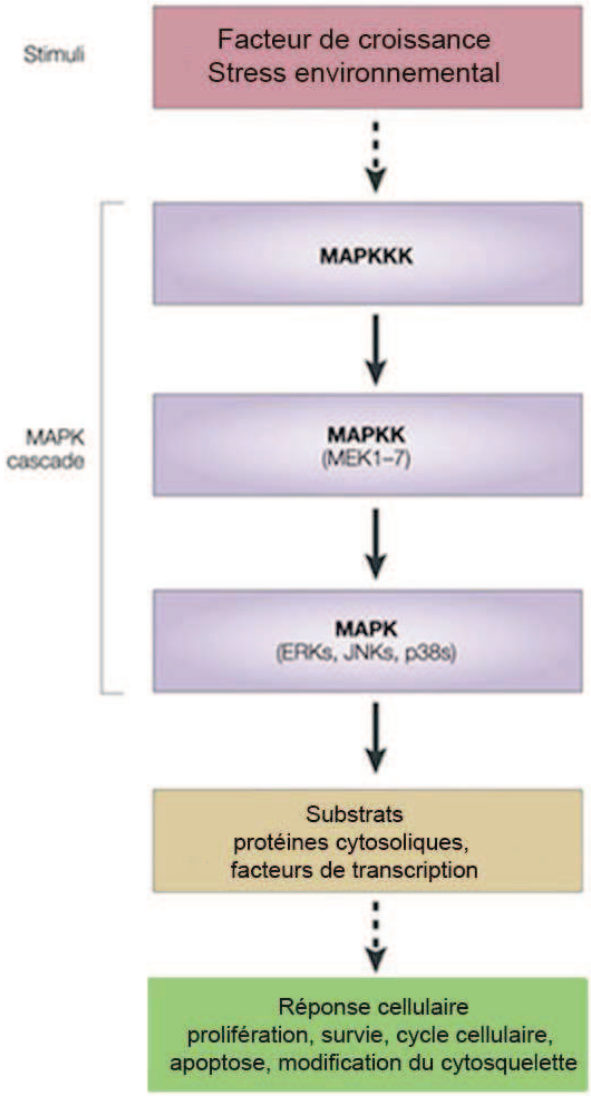


Figure 22 : Voie de signalisation des MAP-kinases. (Adapté de S. Kumar *et al*, 2003). Les MAP-Kinases (MAPK) sont des protéines kinases induites par des événements mitogènes tels que les facteurs de croissance, les lipopolysaccharides ou les cytokines inflammatoires. Elles interviennent dans la régulation de très nombreuses fonctions cellulaires en phosphorylant différents substrats cytoplasmiques ou nucléaires. Le principe de transmission du signal repose sur l'activation en cascade, par phosphorylation, des kinases impliquées dans cette voie : la MAPKKK phosphoryle et active la MAPKK (MEK1-7) qui en retour active les MAPK ERK, JNK ou p38. Les cibles de ses kinases sont des protéines cytosoliques ou des facteurs de transcription impliqués dans plusieurs processus cellulaires tels que la prolifération, la survie, le cycle cellulaire ou l'apoptose.

NF-κB contrôle également l'expression de gènes qui participent à la régulation du cycle cellulaire comme ceux codant les cyclines D1 et D2 ainsi que CDK6 (Cyclin Dependant Kinase 6) (Iwanaga et al., 2008). Il régule aussi l'expression de gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 et A20 (Catz and Johnson, 2001; Krikos et al., 1992). Certains facteurs angiogéniques, comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth factor), ont également été définis comme étant des cibles de NF-κB (Chilov et al., 1997). Enfin, NF-κB joue également un rôle dans l'invasion et la migration cellulaire en induisant l'expression des protéines MMP-9 (Matrix MetalloProteinase 9) VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule I) et ICAM-1 IntraCellular Adhesion Molecule) (Iademarco et al., 1992; van de Stolpe et al., 1996; Yan et al., 2004) (Figure 21).

* LMP-1 et voie des MAP kinases :

Les MAP-Kinases (MAPK) sont des protéines kinases induites par des événements mitogènes. Elles interviennent dans la régulation de très nombreuses fonctions cellulaires en phosphorylant différents substrats cytoplasmiques ou nucléaires. Le principe de transmission du signal repose sur l'activation en cascade, par phosphorylation, des kinases impliquées dans cette voie : la MAPKKK (MAP-Kinase-Kinase-Kinase, MAP kinase d'ordre 3 ou MAP3K) phosphoryle et active la MAPKK (MAP-Kinase-Kinase, MAP kinase d'ordre 2, MAP2K ou MEK) qui en retour active une MAPK. LMP-1 est capable d'induire les trois principales MAPK : JNK (c-Jun amino-terminal Kinase), ERK (Extracellular Regulated Kinase) et p38. L'activation de JNK et p38 par la LMP-1 se fait par l'intermédiaire du domaine CTAR2 dans les cellules épithéliales mais elle peut être également médiée par CTAR1 dans les lymphocytes (Eliopoulos and Young, 1998; Wan et al., 2004). ERK est, quant à elle, activée par le domaine CTAR1, probablement grâce aux adaptateurs TRAF2, TRAF3 et TRAF5 (Chuang et al., 2005; Dawson et al., 2008; Mainou et al., 2007) (Figure 22).

* LMP-1 et voie des PI3 kinases :

Les PI3-kinases forment une vaste famille d'enzymes phosphorylant des phospholypides membranaires, les phosphoinositides (PI), sur la position 3 du groupement inositol. Cette voie est essentielle pour la prolifération des LCL (Brennan et al., 2002).

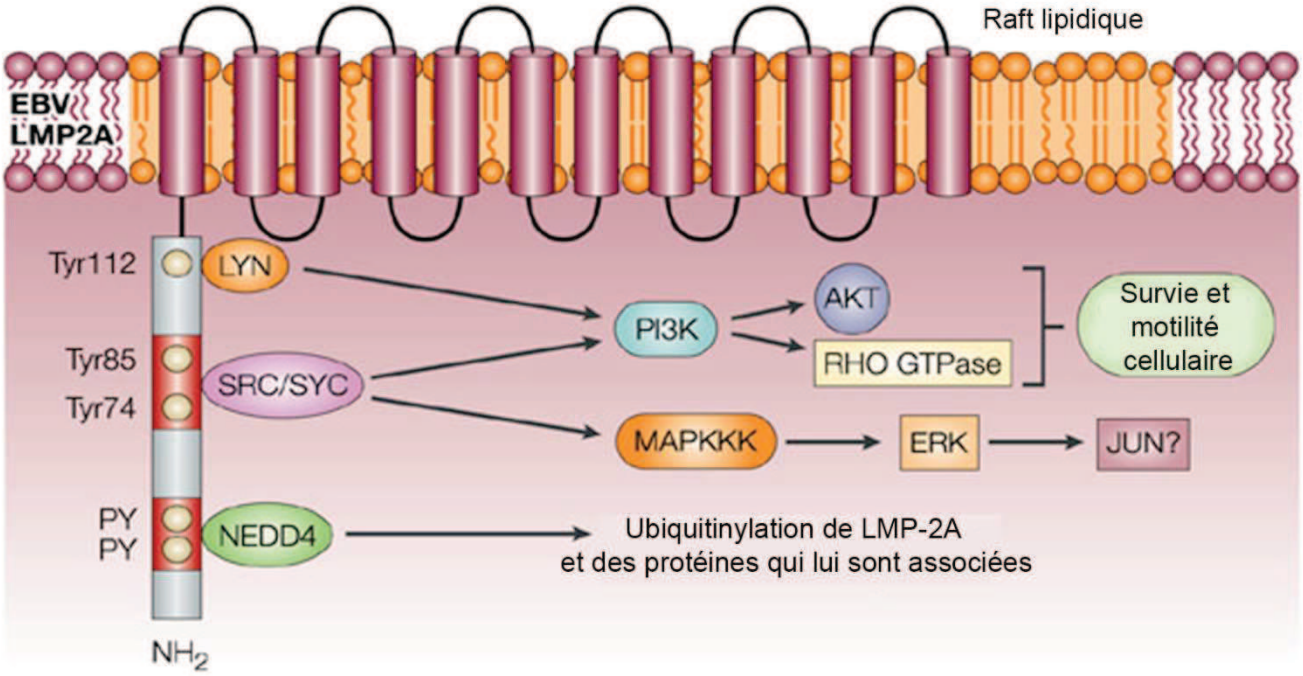


Figure 23 : Voies de signalisation induites par la LMP-2A. (Adapté de Young and Rickinson 2004). La LMP-2A est une protéine transmembranaire constituée de trois domaines : un domaine N-terminal cytoplasmique, douze domaines transmembranaires et un domaine C-terminal. La phosphorylation des tyrosines Tyr74 et Tyr85, situées au niveau de son domaine N-terminal, induit le recrutement des protéines tyrosines kinases SYC et SRC. La LMP-2A interagit également avec LYN au niveau de sa tyrosine 112. Elle induit ainsi l'activation de la voie des MAPK et de la voie PI3K, impliquées dans la survie et l'invasion cellulaire. Les motifs riches en résidus proline (PY) permettent le recrutement de l'ubiquitine ligase NEDD4, favorisant ainsi l'ubiquitinylation de la LMP-2A et des protéines qui lui sont associées.

L'activation de la voie PI3K par la LMP-1 serait induite par le domaine CTAR1 (Dawson et al., 2003; Mainou et al., 2005). Différentes études ont montré que certains processus cellulaires contrôlés par la LMP-1 nécessitent l'induction de la voie PI3K. Parmi ces processus, certains sont impliqués dans la survie cellulaire (Dawson et al., 2003), le remodelage du cytosquelette (Dawson et al., 2003), la migration des cellules épithéliales (Shair et al., 2008) et la production d'IL10 (Lambert and Martinez, 2007).

f) Les protéines LMP-2A et -2B

Les protéines LMP-2A et LMP-2B sont codées par le même gène mais sont transcrits à partir de promoteurs différents. Leur transcription ne peut se faire que lorsque le génome est sous sa forme circulaire car elle est initiée au niveau des régions répétées terminales (Laux et al., 1988). La structure des deux protéines est similaire : elles sont toutes deux constituées de 12 domaines transmembranaires et d'une queue C-terminale de 27 aa. La LMP-2A (54kDa) se distingue toutefois de la LMP-2B (40kDa) par la présence d'un domaine N-terminal de 119 aa comprenant 8 résidus tyrosine (Longnecker and Kieff, 1990). Ce domaine N-terminal de la LMP-2A permet la signalisation. Contrairement à la LMP-2B dont on ne connaît pas la fonction exacte, il a été montré que le LMP-2A pouvait avoir de multiples fonctions, même si les mécanismes précis mis en jeu reste encore mal connus. Elle joue notamment un rôle important dans le maintien à l'état latent du virus *in vivo* (Merchant et al., 2001). En effet, la LMP-2A possède des motifs ITAM (Immunoreceptor Tyrosinebased Activation Motifs) qui lui permettent de lier et de séquestrer les tyrosines kinases Lyn et Syk nécessaires à la signalisation du récepteur des lymphocytes B (BCR) (Longnecker et al., 1991). De plus, la protéine LMP-2A peut recruter des ubiquitines ligases (E3) comme Nedd4 qui vont ubiquitinyler Lyn et Syk, favorisant ainsi leur dégradation par le protéasome (Winberg et al., 2000). L'ensemble de ces mécanismes inhibe la signalisation du BCR qui , dans certaines conditions, peut induire le passage de la latence au cycle lytique (Merchant et al., 2001). Des travaux réalisés sur des souris transgéniques LMP-2A montrent que cette protéine ne présente pas de propriété oncogénique mais qu'elle confère un signal de survie aux lymphocytes B, leur permettant d'échapper à l'apoptose en absence de sélection dans les centres germinatifs (Caldwell et al., 2000; Caldwell et al., 1998). Le rôle de cette protéine dans la résistance à l'apoptose serait lié à sa capacité à induire la voie PI3K (Scholle et al., 2000) (Figure 23). De plus, cette protéine membranaire peut activer l'oncogène Ras de façon constitutive, favorisant ainsi la survie des lymphocytes B.

Par ailleurs, l'activation de Ras par la LMP-2A permettrait l'augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL (Portis and Longnecker, 2004). Enfin, il a été montré que la protéine LMP-2A pouvait augmenter l'adhésion et la motilité des cellules épithéliales (Allen et al., 2005).

g) Les ARN non codants

* Les EBER (EBV Encoded RNAs) **:** EBER-1 et EBER-2 sont des petits ARN non polyadénylés (166 et 172 nucléotides), transcrits par l'ARN polymérase III (Rosa et al., 1981). Ils sont très abondants dans les cellules infectées (10^5 à 10^7 copies par cellule) et sont caractérisés par une structure secondaire en forme de trèfle (Rymo, 1979) (Figure 24). Ils sont complexés à des protéines nucléaires pour former des complexes ribonucléoprotéiques très stables. Il a été montré que les EBER pouvaient contribuer à la croissance des lymphocytes B transformés ainsi qu'à leur transformation (Yajima et al., 2005). Une étude réalisée sur des LCL a montré qu'EBER-2 possède un pouvoir transformant plus important que celui d'EBER-1(Wu et al., 2007). Les EBERs semblent induire l'expression de l'IL-10, une cytokine immuno-suppressive qui permet de maintenir la croissance des cellules de LB (Samanta et al., 2008).Cette cytokine peut également induire l'expression de la LMP-1 et inhiber l'activité cytotoxique des cellules T (Kis et al., 2006).

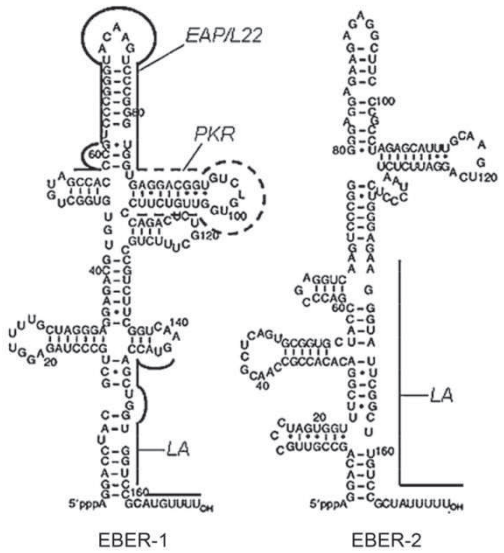


Figure 24 : Structure secondaire des EBERs. (Extrait de K. Tagada, 2011 et reproduit de Rosa *et al*, 1981). EBER-1 et EBER-2 sont des petits ARN non polyadénylés dont la structure secondaire est en forme de trèfle.

* Les ARN BART (BamHI-A rightward transcripts) : Ces ARNs ont été découverts initialement dans le NPC mais sont également retrouvés dans d'autres pathologies malignes associées à l'EBV comme le lymphome de Hodgkin ou le LB. Ils présentent, au niveau de leur extrémité carboxy-terminale un cadre de lecture ouvert : BARF0. Des études réalisées *in vitro*, après surexpression d'une des protéines BARF0 (RK-BARF0), montrent que cette dernière pourrait induire la transcription de la LMP-1 en l'absence d'EBNA-2 grâce à son interaction avec le précurseur du récepteur Notch (Kusano and Raab-Traub, 2001). L'expression des protéines BARF0 n'a toutefois jamais été retrouvée *in vivo* (van Beek et al., 2003). Deux autres transcrits sont générés à partir de la région BART. Le premier, appelé RPMS1, se fixe au co-répresseur CIR pour inhiber les transactivations dépendantes de Notch et d'EBNA-2 (Zhang et al., 2001). Le deuxième, BARF1, est l'homologue soluble du récepteur au CSF-1 (Colony Stimulating Factor 1) dont l'expression est restreinte aux tumeurs d'origine épithéliale. BARF1 est considéré comme un oncogène car il est capable d'induire l'expression de molécules anti-apoptotiques comme Bcl-2 (Sheng et al., 2001) ainsi que celle de la cyline D1 (Wiech et al., 2008). Enfin, c'est dans la région BART au sein des introns, qu'ont été découverts les premiers microARN (miARN) de l'EBV (Pfeffer et al., 2004).

h) Les microARN

Les miARNs d'EBV sont parfaitement conservés au cours de l'évolution et sont divisés en 2 groupes. Trois d'entre eux, nommés miR-BHRF1-1, 2 et 3, sont localisés au niveau des régions non codantes de l'ARNm du gène viral *BHRF1*. Les autres sont situés dans les introns du gène viral *BART* . On dénombre actuellement 22 miR-BarT. Le rôle exact de ces miARN dans la pathogenèse liée à l'EBV reste à élucider. Toutefois, une étude a montré que les trois miR BHRF1 sont impliqués dans la transformation des lymphocytes B et participent ainsi aux propriétés oncogéniques du virus (Feederle et al., 2011a; Feederle et al., 2011b). D'autres travaux ont souligné l'implication des miR-BART dans la régulation de l'expression des protéines de latence (Lo et al., 2007; Pfeffer et al., 2004). En effet, certains miARN tels que les miR-BART16, miR-BART17-5p et miR-BART1-5p interagissent avec la région 3' non traduite du transcrit LMP-1 pour réguler négativement son expression (Lo et al., 2007). Par ailleurs, miR-BART2 cible l'ADN polymérase virale codée par le gène *BALF5*, empêchant le passage du cycle de latence au cycle lytique (Barth et al., 2008). Le miRBART22, fortement exprimé dans les cellules de NPC, diminue quant à lui l'expression de la LMP-2A, favorisant ainsi l'échappement au système immunitaire des cellules infectées par l'EBV (Lung et al., 2009).

Enfin, d'autres travaux, ont monté que le miR-BART5 inhibe l'expression de la protéine pro-apoptotique PUMA, qui est une cible transcrptionelle de p53 (Choy et al., 2008).

i) La protéine BHRF1

L'EBV code pour un homologue viral de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, appelé BHRF1 (Cleary et al., 1986). BHRF1 partage 38 % d'homologie de séquence avec Bcl-2, et présente trois domaines BH (BH1, BH2 et BH3), caractéristiques des protéines de la famille Bcl-2. Cette protéine a une extrémité C-terminale hydrophobe qui lui permet de s'ancrer dans les membranes intracellulaires. Toutefois, contrairement aux autres membres de la famille Bcl-2, elle n'a pas le sillon hydrophobe nécessaire à l'interaction avec les membres pro-apoptotiques de cette famille. Ces données suggèrent que le mécanisme anti-apoptotique de BHRF1 serait différent de celui des protéines Bcl-2 et Bcl-xL (Huang et al., 2003). BHRF1 a d'abord été considérée comme une protéine précoce du cycle lytique de l'EBV (Cox et al., 1990; Hardwick et al., 1988). En effet, son rôle est d'inhiber l'apoptose durant le cycle réplicatif pour permettre l'amplification virale (Henderson et al., 1993). En 2009, une étude a montré pour la première fois que BHRF1 était exprimée dans les cellules en latence, en dehors du cycle lytique (Kelly et al., 2009). Il a ensuite été montré que BHRF1 était essentiel à la survie des P3HR1 (Watanabe et al., 2010). Toutefois, les mécanismes impliqués dans la résistance à l'apoptose induite par BHRF1 ne sont pas clairement défini.

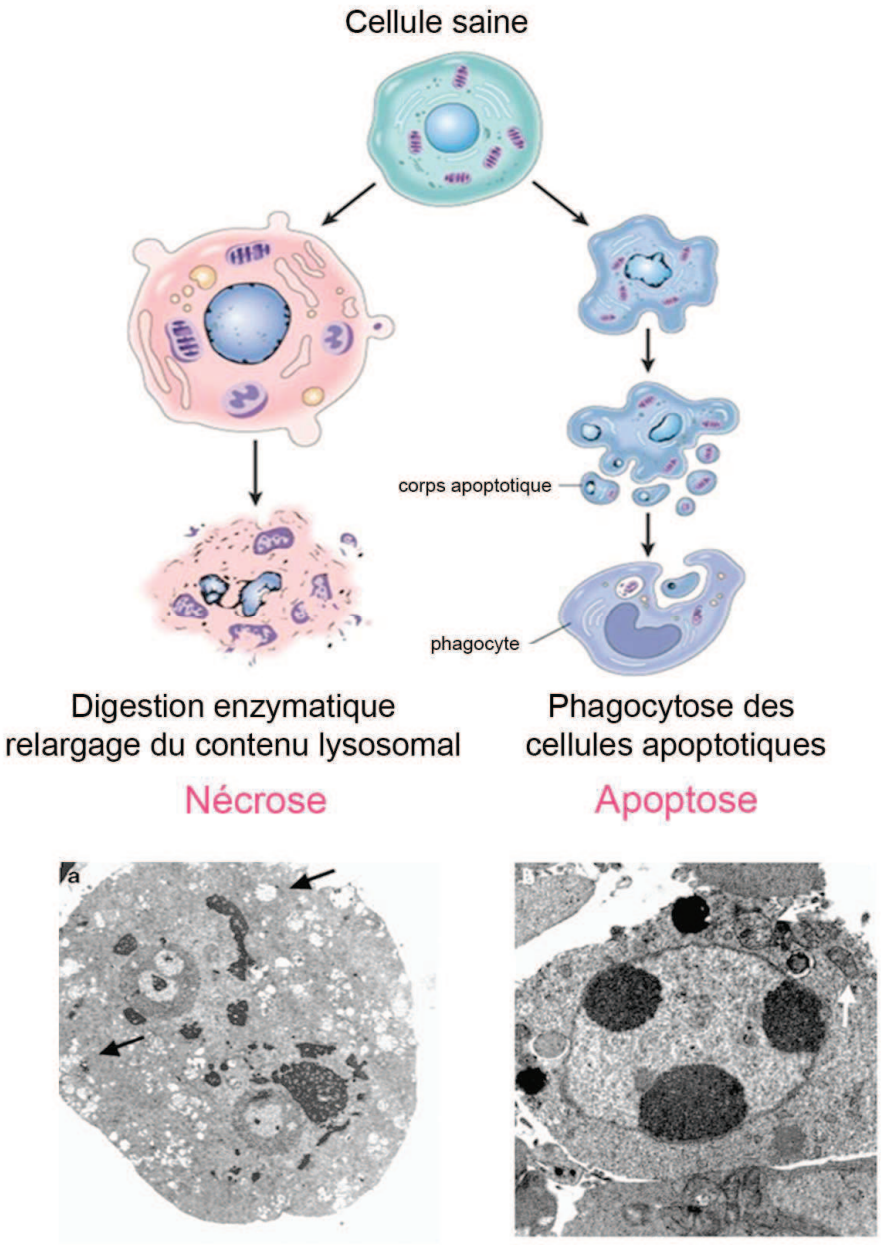


Figure 25 : Comparaison des caractéristiques morphologiques des cellules en apoptose et en nécrose. (Schéma extrait de http://www.scribd.com/doc/3417084/Chapter-01-Robin-Kumar-Basic-Pathology, photographies de microscopie électronique issues de Kroemer et *al*, 2005). Les cellules apoptotiques diminuent de taille, leurs membranes restent intègres. Elles bourgeonnent et forment des corps apoptotiques qui sont phagocytés par les macrophages. Les cellules nécrotiques gonflent, leurs membranes se rompent libérant le contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire La photographie de microscopie électronique (a) représente une cellule épithéliale en nécrose suite à un stress oxydatif, les mitochondries altérées ainsi que les vacuoles sont indiquées par une flèche noire (grossissement 400X). La seconde photographie (b) représente une cellule irradiée en apoptose. La chromatine est condensée mais les mitochondries ne sont pas encore altérées (flèche blanche).

B. L'apoptose et l'autophagie : deux voies impliquées dans la régulation de la mort cellulaire

1. L'apoptose

En 1972, Les travaux de Kerr ont défini deux types de mort cellulaire (Kerr et al., 1972). Le premier, connu sous le nom de nécrose, se caractérise par une augmentation rapide du volume cellulaire, la perte précoce de l'intégrité membranaire et mitochondriale, et le relargage du contenu lysosomal dans l'environnement intercellulaire. Ce processus provoque ainsi une lésion et une réaction inflammatoire au niveau du tissu environnant. Le second, appelé apoptose, est défini comme une mort cellulaire programmée. Ce mécanisme requiert des signaux cellulaires spécifiques qui permettent à la cellule de contrôler sa propre destruction de manière non inflammatoire (Figure 25).

a) Rôle physiologique de l'apoptose

L'apoptose est impliquée dans de nombreux processus physiologiques. Elle permet notamment l'élimination des cellules surnuméraires lors de l'embryogenèse ainsi que le renouvellement tissulaire et cellulaire. Lors du développement du système immunitaire, l'apoptose joue un rôle crucial dans la sélection lymphocytaire, puisqu'elle permet de supprimer les lymphocytes T et B auto-immuns. Ainsi, la présence d'anomalies au sein des voies de signalisation apoptotiques peut induire des pathologies bénignes ou malignes. En effet, un excès d'apoptose peut être impliqué dans certaines maladies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer, ou dans certains déficits immunitaires comme le SIDA (Ameisen et al., 1995; Cotman and Anderson, 1995). A l'inverse, un défaut d'apoptose peut favoriser l'émergence de maladies auto-immunes ou de cancers. En effet, les cellules tumorales présentent fréquemment des défauts au sein des voies apoptotiques, ce qui favorise leur prolifération et peut leur conférer une résistance aux traitements par chimiothérapie (Golstein et al., 1991; Williams, 1991).

b) Caractéristiques morphologiques et biochimiques de l'apoptose

D'un point de vu morphologique, l'apoptose est caractérisée par une condensation du cytoplasme, accompagné d'une diminution du volume cellulaire. On observe également, lors de ce processus, une condensation de la chromatine ainsi qu'une fragmentation du noyau.

Les fragments de noyau et les organites intacts sont progressivement inclus dans des vésicules qui bourgeonnent à partir de la membrane plasmique, puis sont expulsés sous forme de « corps apoptotiques ». Ces vésicules vont ensuite être phagocytées par les macrophages circulants (Kerr, 2002).

Les changements morphologiques survenant lors de l'apoptose sont accompagnés d'altérations biochimiques spécifiques. Les mitochondries des cellules apoptotiques vont subir de nombreuses modifications telles qu'une diminution de leur potentiel membranaire ($\Delta\Psi m$) et une modification de leur perméabilité ((Marchetti et al., 1996; Zamzami et al., 1996) qui favorise le relargage du cytochrome c de l'espace intermembranaire vers le cytoplasme (Kluck et al., 1997; Yang et al., 1997). L'apoptose est également caractérisée par la perte de l'asymétrie des phospholipides de la membrane plasmique. Ainsi, les phosphatidylsérines (PS), phospholipides anioniques présents uniquement dans le feuillet interne de la membrane plasmique des cellules saines, vont se déplacer dans le feuillet externe et être externalisés à la surface cellulaire. Ce mécanisme permet la reconnaissance des cellules apoptotiques par les macrophages et leur élimination par phagocytose (Fadok et al., 1992). D'un point de vue biochimique, l'apoptose est associée à l'activation de protéases spécifiques, les caspases, et à la fragmentation internucléosomique de l'ADN (Wyllie et al., 1981; Zakeri et al., 1993).

L'apoptose est un processus rapide qui requiert de l'énergie et dépend de la transcription de gènes codant des protéines pro-apoptotiques (Leist et al., 1997). Elle peut être induite par deux grandes voies de signalisation. La première, dite extrinsèque, est déclenchée par la liaison de ligands aux récepteurs de morts présents à la surface des cellules. La deuxième, dite intrinsèque ou voie mitochondriale, est activée par une altération de certains organites tels que les mitochondries, le réticulum endoplasmique (RE) ou le noyau.

c) Les différentes voies de l'apoptose

* <u>La voie extrinsèque de l'apoptose</u>

La voie extrinsèque est initiée par la fixation d'un ligand extracellulaire sur son récepteur à domaine de mort, situé à la surface de la membrane plasmique. Ces derniers appartiennent à la superfamille des récepteurs au TNF (Tumour Necrosis Factor Receptor) et possèdent un motif intracellulaire très conservé, d'environ 80 acides aminés, nommé « domaine de mort » (death domain). Ce motif est nécessaire à l'activation du processus de mort cellulaire en réponse à l'engagement du récepteur.

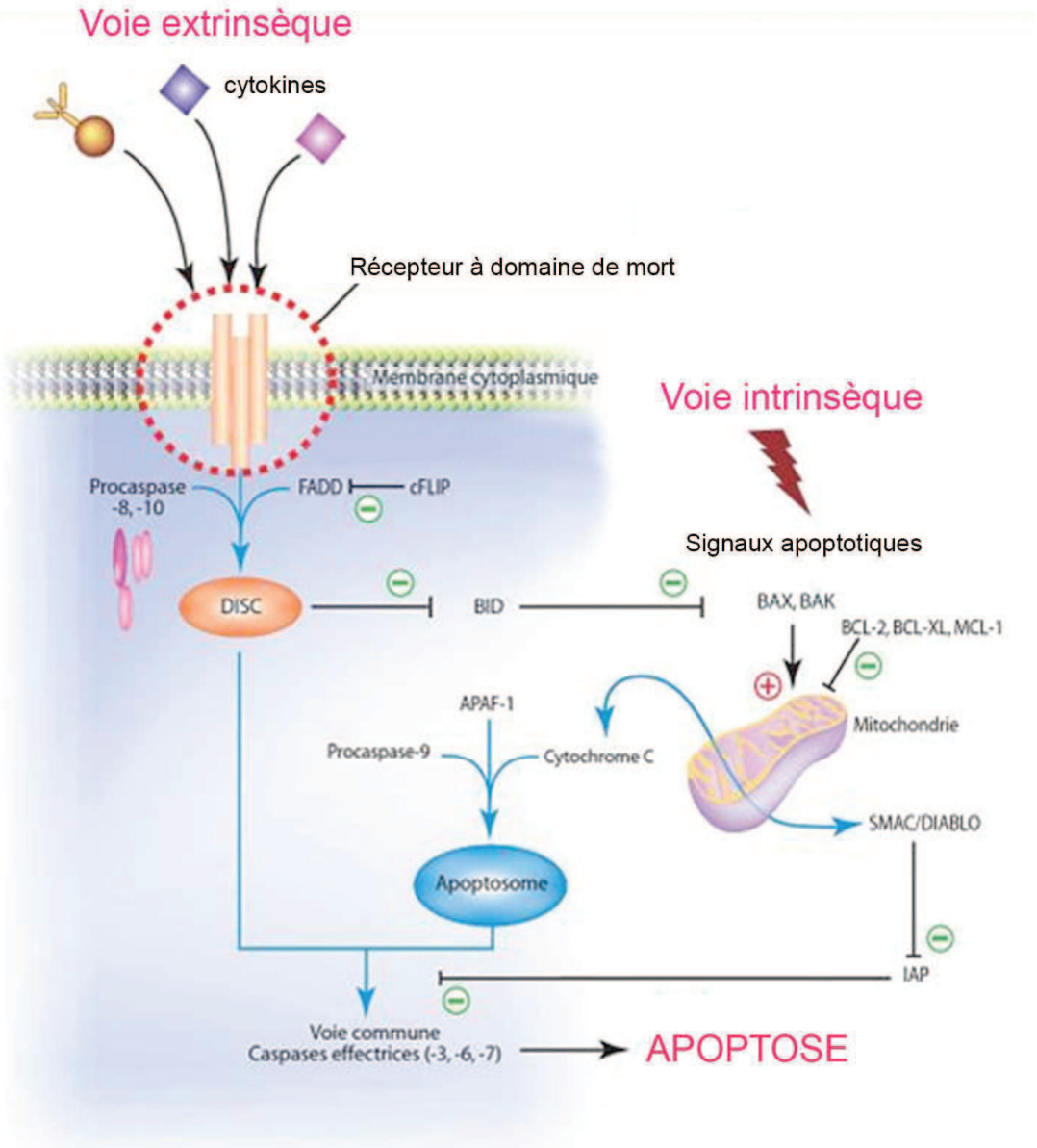


Figure 26 : Voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose. (Adapté à partir du livre, les cibles membranaires de la cellule tumorale, de J Y. Blay). La voie extrinsèque de l'apoptose correspond à l'induction de l'apoptose en réponse à un signal extracellulaire et implique l'activation des récepteurs à domaine de mort. Les principaux ligands connus pour activers ces récepteurs sont le TNFα, TRAIL ou le ligand de Fas (Fas_L) et les principaux récepteurs identifiés sont DR4, DR5, FAS/CD95 et le récepteur au TNF. L'activation de ces récepteurs de mort permet le recrutement de la protéine FADD et des pro-caspases 8 et 10 qui vont former le complexe DISC. Une fois activées, les caspases 8 et 10 vont activer les caspases effectrices de l'apoptose (-3,-6,-7). L'induction de la voie intrinsèque par différents signaux favorise la relocalisation de Bax à la mitochondrie où il va pouvoir s'homodimériser ou s'hétérodimériser avec Bak, formant ainsi des pores au niveau de la membrane mitochondriale.Le cytochrome c est alors libéré dans le cytoplasme où il interagit avec APAF-1 et la pro-caspase 9, formant ainsi l'apoptosome. La caspase 9 va ensuite activer les caspases effectrices de l'apoptose. D'autres molécules comme SMAC/DIABLO sont également libérées dans le cytoplasme lors de la voie intrinsèque de l'apoptose et vont inhiber les protéines anti-apoptotiques comme les IAP. Sur le schéma, les signes (–) en vert illustrent une inhibition et les signes (+) en rouge une activation

La liaison du ligand à son récepteur entraîne la trimérisation de celui-ci et le recrutement de molécules adaptatrices comme FADD (Fas-Associated Protein with Death Domain) ou TRADD (TNFR-Associated Death Domain protein) qui vont elles-mêmes recruter les caspases initiatrices de l'apoptose, formant ainsi un complexe oligomérique appelé DISC (Death Inducing Signaling Complex) (Kischkel et al., 1995; Peter and Krammer, 2003). La formation de ce complexe permet l'activation des caspases initiatrices de l'apoptose, notamment la caspase-8, qui va induire, à son tour, le clivage et l'activation des caspases dites «effectrices» de l'apoptose comme la caspase-3. L'activation de ces protéases entraîne le clivage de différents substrats aboutissant à la mort cellulaire (Nagata, 1999) (Figure 26). Les différents acteurs impliqués dans ce processus seront décrits.en détail par la suite.

***** La voie intrinsèque de l'apoptose

La voie intrinsèque, également connue sous le nom de voie mitochondriale, est induite par divers stimuli comme la présence de dommages à l'ADN, induits par exemple par des radiations ionisantes, une privation en facteurs de survie, une activation d'oncoprotéines ou de suppresseur de tumeurs comme la protéine p53. La mitochondrie possède un rôle central dans l'activation de cette voie finement régulée par les membres de la famille de Bcl-2 (Wang, 2001). L'initiation de la voie intrinsèque se traduit d'abord par une chute du potentiel mitochondrial. La perméabilité de la mitochondrie est alors modifiée, favorisant le passage de nombreuses molécules de l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytoplasme. Parmi ces molécules, on distingue la protéine Smac (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases)/DIABLO (Direct Inhibitor of Apoptosis (IAP)-Binding protein with Low pI), le facteur AIF (Apoptosis-Inducing Factor), l'endonucléase G (EndoG), la protéine Omi/HtrA2 (High-Temperature-Requirement protein A2) ainsi que le cytochrome c. Ce dernier interagit dans le cytoplasme avec l'ATP et la protéine APAF-1 (Apoptotic Protease-Activating Factor-1) permettant ainsi son activation *via* un changement de conformation (Li et al., 1997). APAF-1 peut alors interagir et activer la caspase-9 pour former l'apoptosome (Jiang and Wang, 2000). La caspase-9 va à son tour activer les caspases effectrices de l'apoptose comme la caspase-3 et la caspase-7, rejoignant ainsi la voie extrinsèque (Figure 26) (Slee et al., 1999).

Ces deux voies de mort cellulaire peuvent, dans certains cas, être complémentaires. En effet, la voie mitochondriale peut être activée pour amplifier le signal apoptotique déclenché par la voie extrinsèque.

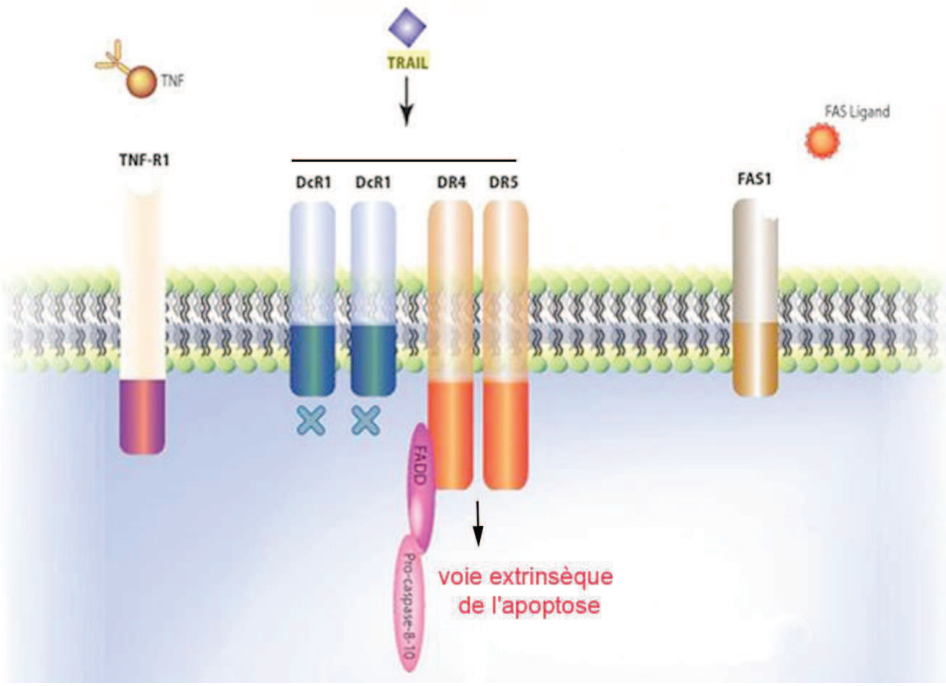


Figure 27 : Les récepteurs à domaine de mort. (Adapté à partir du livre, les cibles membranaires de la cellule tumorale, de J Y. Blay). Trail se fixe sur les récepteurs à domaine de mort DR4 et DR5 ainsi que sur les « récepteurs leurres » DcR1 et DcR2 qui assurent une fonction de régulation en inhibant la cytokine. Le TNF et Fas ligand possèdent également leur propre récepteur.

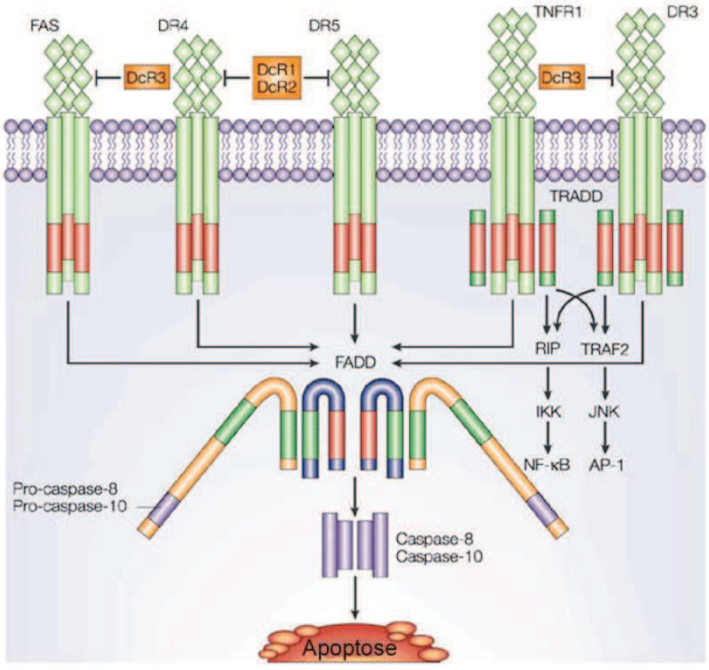


Figure 28 : Complexes formés au niveau des récepteurs de mort lors de l'apoptose extrinsèque. (Extrait de Avi Ashkenazi, 2002). Fas ligand interagit avec le récepteur Fas lorsque celui-ci est trimérisé. Fas peut alors recuter FADD et la pro-caspase-8 formant ainsi le complexe DISC. **B.** Trail active ses récepteurs DR4 et DR5 d'une façon semblable. L'interaction TNF/TNF-R1 permet à TNF-R1 de recruter TRADD. Deux complexes peuvent alors se former : l'un conduit à l'activation de la voie NFκB et l'autre permet l'activation de la caspase 8.

d) Les différents acteurs de l'apoptose

* Les récepteurs de mort

Les membres de la superfamille des récepteurs au TNF (TNFR) sont impliqués dans le contrôle du système immunitaire, de l'homéostasie cellulaire et du développement. Ils peuvent également activer la différenciation, la survie ou la mort par apoptose (Schneider and Tschopp, 2000). Huit récepteurs de mort sont actuellement connus : TNF-R1 (DR1), Fas (CD95/APO-1/DR2), DR3 (APO-3/TRAMP/WSL1/LARD), DR4 (TRAILR1/APO-2), DR5 (TRAILR2 /KILLER/TRICK2), DR6 (Pan et al., 1998) le récepteur à l'ectodysplasine A (ou EDA-R) et le récepteur au NGF (Nerve Growth Factor) (Bhardwaj and Aggarwal, 2003; Lavrik et al., 2005; Wajant, 2003)(Figure 27). Les voies de signalisation apoptotiques activées par les récepteurs de mort sont présentées sur la figure 28. Elles conduisent, d'une manière générale, à l'activation des caspases initiatrices puis effectrices de l'apoptose.

Il existe également un autre sous-groupe de récepteurs homologues au récepteur du TNF appelés les "decoy" récepteurs (DcR). Parmi les membres de ce groupe, on distingue le DcR1 (Sheridan et al., 1997) et le DcR2 (Marsters et al., 1997) qui sont des récepteurs membranaires ainsi que le DcR3 (Pitti et al., 1998) qui est une protéine soluble secrétée. Ces récepteurs ne sont pas capables de transmettre un signal de mort cellulaire et sont plutôt considérés comme des inhibiteurs des récepteurs de mort. En effet, les domaines extra-cellulaires de DcR1 et DcR2 sont tous les deux capables de fixer le ligand TRAIL et entrent ainsi en compétition avec les récepteurs DR4 et DR5 (Figure 27). Cependant, DcR1 ne possède pas de région cytoplasmique, et celle de DcR2, plus courte qu'un domaine de mort typique, ne permet pas la transmission d'un signal apoptotique. DcR3 peut se fixer à Fas L avec la même affinité que Fas. De ce fait, DcR3 inhiberait, par compétition avec Fas, l'apoptose induite par Fas L.

* Les caspases

La mort cellulaire par apoptose nécessite l'activation d'une famille de protéases à cystéine appelées caspases, en raison de leur nature et de la spécificité de leur site actif (cystein aspartic acid-specific proteases). A ce jour, 18 caspases ont été identifiées chez les mammifères. Treize d'entre elles sont fonctionnelles chez l'homme : les caspases -1 à -10, -12, -14 et la caspase -16, dont la fonction n'est pas encore bien caractérisée (Eckhart et al., 2008).

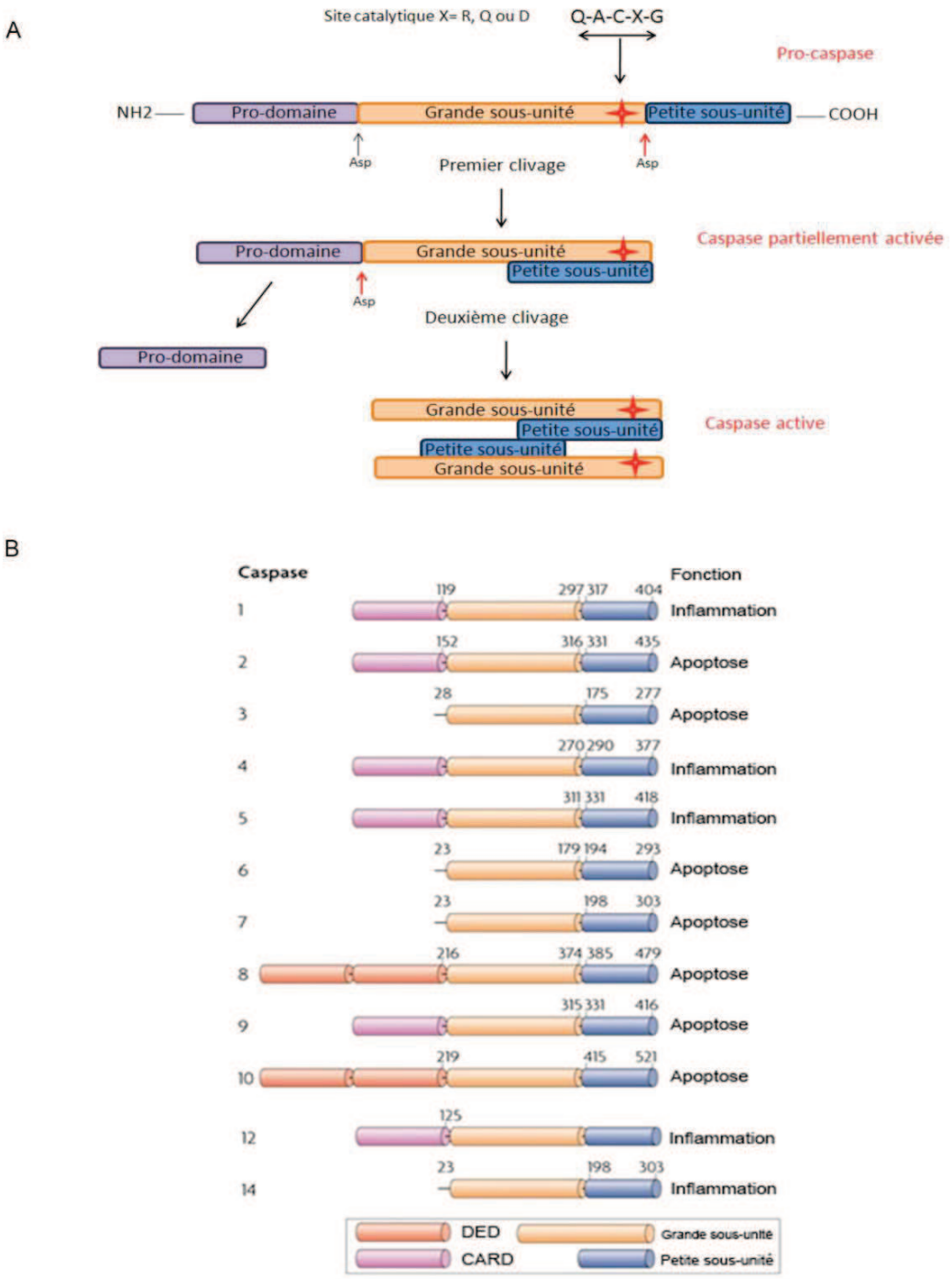


Figure 29 : Structure et activation des caspases effectrices et initiatrices de l'apoptose. A. (Adapté de Lavrik *et al*, 2009). Les pro-caspases sont constituées d'un pro-domaine N-terminal de taille variable, d'un domaine central correspondant à la grande sous unité contenant le site catalytique Q-A-C-X-G (X = R, Q ou D) et d'un domaine C-terminal correspondant à la petite sous unité. Leur activation débute par le clivage de la petite sous unité puis de la grande au niveau des résidus aspartates (Asp). Ceci permet la formation d'un tétramère catalytiquement actif.**B.** (Adapté de R C. Taylor et al, 2008)**.** Les caspases impliquées dans l'apoptose sont les caspases-3, -6, -7, -8, -9 et 10. Les caspases effectrices (caspases -3, -6 et -7) présentent un pro-domaine court. Les caspases initiatrices (caspases - 2, -8, -9 et -10) présentent un pro-domaine long et possèdent des domaines de recrutement protéiques de type DED (Death Effector Domain) pour les caspases-8 et -10 ou CARD (CAspase Recruitment Domain) pour les caspases-2 et -9.

Ces protéases possèdent toutes un site catalytique comprenant un résidu cystéine inclus dans une séquence peptidique très conservée de type Gln-Ala-Cys-X-Gly (X pour un résidu arginine, glutamine ou acide aspartique). Elles reconnaissent, puis clivent les chaînes polypeptidiques de leurs substrats au niveau d'un résidu aspartique en position P1. Leur structure primaire comprend un pro-domaine amino-terminal de taille variable, un domaine central, qui deviendra après clivage la grande sous-unité (20 kDa) de la caspase, et un domaine carboxy terminal qui deviendra après clivage la petite sous-unité (10 kDa). Ces enzymes sont synthétisées dans le cytoplasme sous forme de zymogène inactif (pro-caspase). Elles sont activées par un double clivage, l'un éliminant le prodomaine N-terminal et l'autre séparant les 2 sous-unités. L'assemblage de deux grandes sous-unités, qui contiennent le site actif, avec deux petites sous-unités aboutit à la formation d'un hétérotétramère enzymatiquement actif (Nicholson and Thornberry, 1997; Rotonda et al., 1996) (Figure 29 A).

Une classification des caspases a été suggérée selon trois critères différents : la spécificité de reconnaissance du site de clivage sur leur substrat, la longueur de leur prodomaine et leur place dans la cascade apoptotique. Les caspases -1, -4, -12 et -14 constituent un groupe de caspases impliquées dans les mécanismes de l'inflammation et de la différenciation. Les autres caspases sont toutes impliquées dans l'apoptose et sont divisées en deux classes. On distingue les caspases initiatrices (caspases -2, -8, -9 et -10) qui possèdent un prodomaine long, des caspases exécutrices (caspases -3, -6 et -7) qui présentent au contraire un prodomaine court (Figure 29 B).

Le prodomaine des caspases initiatrices possèdent des domaines de type DED (Death Effector Domain) pour les caspases-8 et -10, ou CARD (Caspase Recruitment Domain) pour les caspases-2 et -9 qui permettent leur recrutement au niveau de complexes multiprotéiques comme le DISC dans le cas des caspases-8 et -10 ou l'apoptosome dans le cas de la caspase-9 (Kischkel et al., 1995; Li et al., 1997). Les caspases, alors activées par hétéro-tétramérisation et clivage autoprotéolytique, vont cliver à leur tour les caspase-3, -6 et -7. Ainsi les caspases initiatrices font la liaison entre les signaux déclencheurs de l'apoptose et la phase d'exécution assurée par les caspases effectrices.

A ce jour, de nombreux substrats des caspases effectrices ont été identifiés. La plupart sont impliqués dans le maintien de l'intégrité cellulaire (actine, lamines nucléaires, fodrine), dans les mécanismes de réparation de l'ADN (PARP pour Poly ADP-Ribose Polymérase, DNA-PKs pour DNA-dependent Protein Kinase, ATM pour Ataxia Telangiectasia Mutated) ou dans la régulation du cycle cellulaire (pRB, p27, MDM2) (Danial and Korsmeyer, 2004). L'activation des caspases effectrices constitue un point de non-retour dans la cascade de signalisation conduisant à la mort des cellules par apoptose.

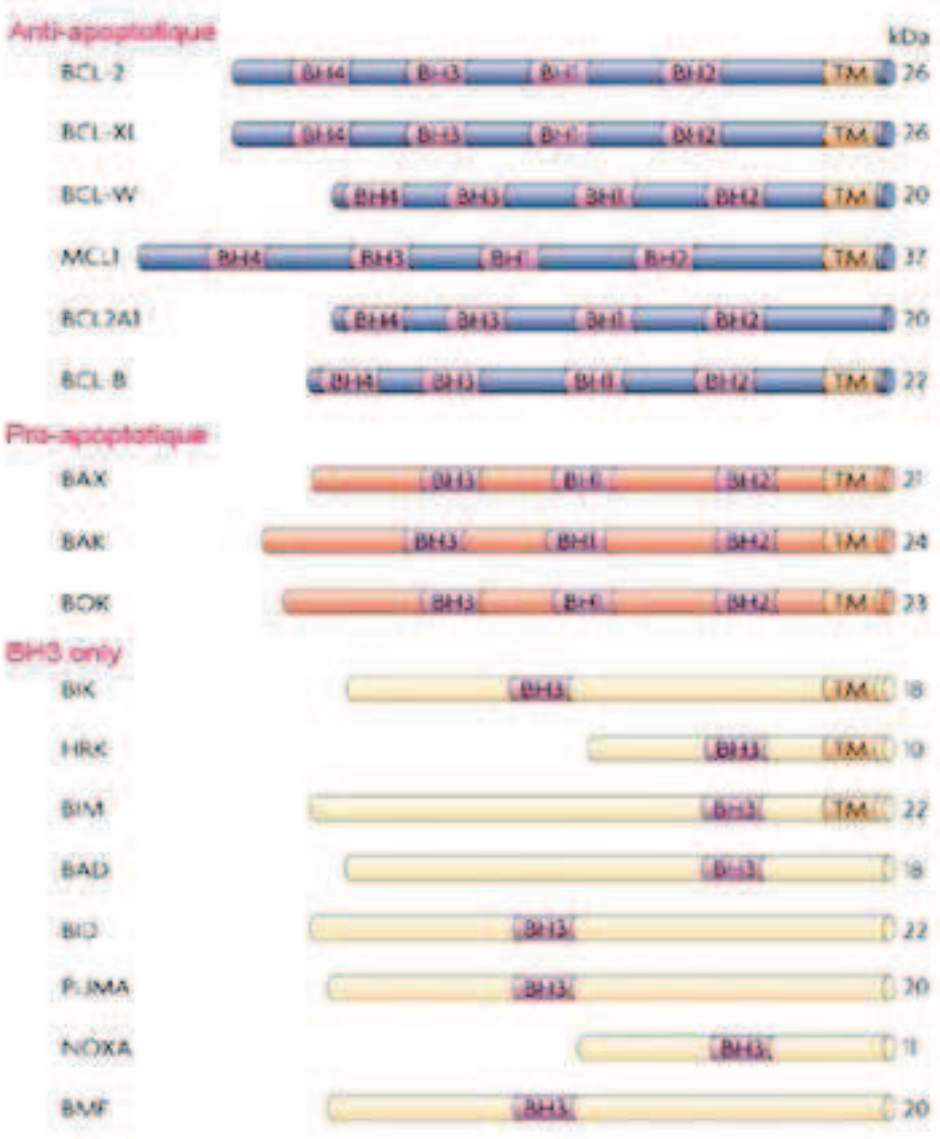


Figure 30 : Les membres de la famille Bcl-2. (Adapté de R C. Taylor et al, 2008). Ils peuvent être subdivisés en trois groupes en fonction du nombre de domaines BH et de leurs fonctions (anti- ou pro-apoptotiques). La majorité de ces protéines contiennent un domaine transmembrannaire (TM) qui favorise leur association aux membranes. Le groupe des protéines anti-apoptotiques est représenté par Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, Bcl2-A1, Bcl-B et Mcl-1. Ces protéines sont constituées de quatre domaines BH. Les protéines pro-apoptotiques sont classées en deux groupes: celui représenté par les protéines Bax, Bak et Bok, constituées de trois domaines BH (BH1, BH2 et BH3) et celui des protéines «BH3-only» ne comprenant que le domaine BH3 tels que Bid, Bad, Bim, Bik, Puma, Bmf, Hrk et Noxa.

* La famille de Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'apoptose, notamment de la voie intrinsèque. Bcl-2 a été identifiée en 1984 comme proto-oncogène dans les lymphomes B folliculaires (Croce et al., 1984). Dans ces lymphomes, la translocation chromosomique t(14 ;18)(q23 ;q21) conduit à l'expression constitutive de cette protéine. Depuis, de nombreux homologues de Bcl-2 ont été identifiés, l'ensemble constituant la famille Bcl-2. Chez les mammifères, cette famille est composée d'une vingtaine de membres caractérisés par la présence d'au moins un des quatre motifs hautement conservés : BH1, BH2, BH3 et BH4 (Bcl-2 Homology Domain) (Reed et al., 1996). Certains de ces domaines sont impliqués dans les interactions entre les différents membres de la famille pour former des homo- ou des hétéro-dimères. Cette famille de protéine est divisée en trois groupes sur la base de leur structure, du nombre de motifs BH, et de l'activité fonctionnelle (Youle and Strasser, 2008) (Figure 30) :

- **Les membres anti-apoptotiques** sont principalement représentés par Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1 et Mcl-1. Ces protéines possèdent des structures très similaires et comportent (à l'exception de A1) un domaine C-terminal hydrophobe et transmembranaire (TM). Ce dernier permet l'ancrage des protéines dans la membrane externe de la mitochondrie ou du réticulum endoplasmique (RE).
- **Les membres pro-apoptotiques «Bax-like»** sont représentés par Bax, Bak et Bok. Leur structure se caractérise par la présence des trois domaines BH1, BH2 et BH3.
- **Les membres pro-apoptotiques «BH3 only»** sont représentés par Bid, Bad, Bim, Bik, Puma, Bmf, Hrk et Noxa. Ces protéines sont caractérisées par la présence d'un seul motif BH, le domaine central BH3, essentiel pour leur fonction pro-apoptotique.

La localisation subcellulaire des différents membres de la famille Bcl-2 varie en fonction de leur structure et de leur état d'activation. En dehors de toute stimulation apoptotique, certains comme Bcl-2, Mcl-1, Bak et Bik sont constitutivement présents à la membrane des mitochondries et/ou du réticulum endoplasmique (RE). Bcl-xl et Bcl-w sont retrouvées à la fois dans la membrane mitochondriale et de manière diffuse dans le cytosol. La protéine Bax est quant à elle essentiellement cytosolique et se trouve dans une conformation monomérique fermée. Son domaine C-terminal est alors séquestré par une poche hydrophobique formée par ses domaines BH1, BH2 et BH3. Lorsque l'apoptose est stimulée, Bax change de conformation et s'insère dans la membrane externe des mitochondries grâce à son domaine C-terminal (Nechushtan et al., 1999) (Figure 31).

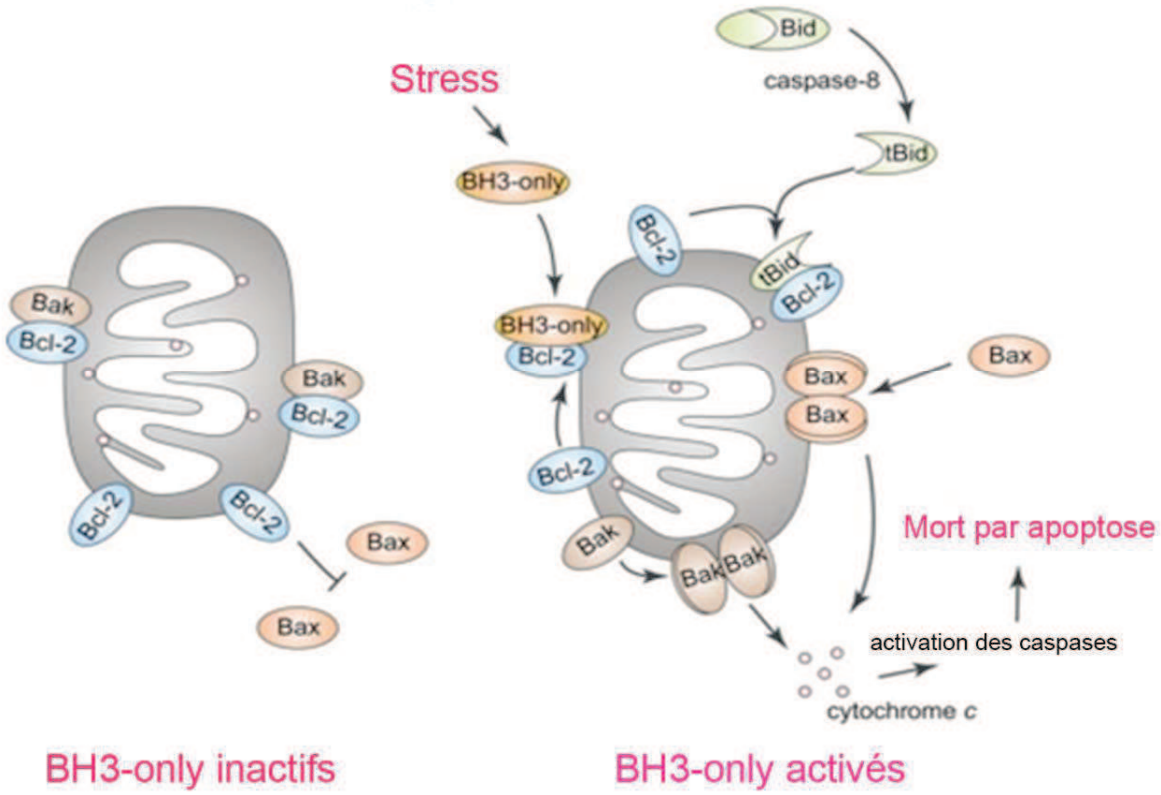


Figure 31 : Régulation de l'apoptose par les membres de la famille de Bcl-2. (Schéma extrait d'un cours de l'université d'Angers : ad.univ angers.fr/~jaspard/Page2/COURS). En absence de stimuli apoptotique, la protéine Bax est maitenue sous forme inactive dans le cytoplasme. La protéine Bak est quant à elle localisée à la mitochondrie où elle est séquestrée par les protéines anti-apoptotiques. En réponse a divers stimuli apoptotique, les protéines BH3 only sont activées et relocalisées à la mitochondrie où elles vont se fixer sur les protéines anti-apoptotiques et libérer Bax et Bak. Ces dernièrers vont pouvoir former des homodimères ou des hétérodimères permettant ainsi le relargage du cytochrome c.

Plusieurs travaux suggèrent que les protéines Bax et Bak sont capables de former des homo ou hétéro-oligomères permettant ainsi la formation de canaux dans la membrane externe des mitochondries et le relargage dans le cytoplasme des molécules pro-apoptotiques nécessaires à l'activation des caspases. Elles sont donc considérées comme les protéines effectrices de l'apoptose.

L'activité de Bax et Bak est régulée négativement par les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Leur surexpression protège les cellules en culture contre une grande variété de stimuli apoptotique (Danial and Korsmeyer, 2004; Strasser et al., 2000). Certaines modifications post-traductionnelles peuvent réguler leur activité. C'est le cas de Bcl-2 dont les fonctions anti-apoptotiques peuvent êtres modulées par phosphorylation (Blagosklonny, 2001). Néanmoins, les conséquences de la phosphorylation de Bcl-2 sur son activité anti-apoptotique sont controversées, certains travaux montrent que Bcl-2 non phosphorylée, exerce une activité anti-apoptotique (Torcia et al., 2001), alors que d'autres suggèrent au contraire, que sa phosphorylation est nécessaire au maintien de ses propriétés anti-apoptotiques (Ito et al., 1997; Ruvolo et al., 1998).

A l'inverse, les protéines « BH3 only » favorisent l'activation de Bax et de Bak. Deux mécanismes d'activation ont été proposés. Le modèle d'activation directe est basé sur une association et activation de Bax/Bak par certains « BH3-only » tels que tBid ou Bim. Le modèle d'activation indirect repose sur l'association et la neutralisation des fonctions des protéines anti-apoptotiques par les protéines « BH3-only ». En absence de stimuli apoptotique, les protéines « BH3 only » sont maintenues dans une forme inactive par divers mécanismes. Par exemple, Bim et Bmf sont séquestrées au niveau du cytosquelette par interaction avec la dynéine. Ces dernières sont libérées dans le cytoplasme suite à un signal apoptotique (Puthalakath et al., 1999). La relocalisation des protéines « BH3 only » à la mitochondrie peut survenir suite à un clivage activateur. Ainsi le clivage de Bid en tBid par la caspase-8 expose son domaine C-terminal hydrophobe et permet son insertion dans la membrane mitochondriale (Oh et al., 2005). Des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation ou la déphosphorylation permettent également la relocalisation ou l'activation de ces protéines, Ainsi la protéine Bim peut être activée par phosphorylation par la kinase JNK (Lei and Davis, 2003). En réponse à une stimulation apoptotique, la protéine Bad, qui est phosphorylée et séquestrée par la protéine 14-3-3 est déphosphorylée par des phosphatases telles que la PP2A et la calcineurine ce qui entraîne son activation et sa relocalisation à la mitochondrie. (Chiang et al., 2001; Wang et al., 1999).

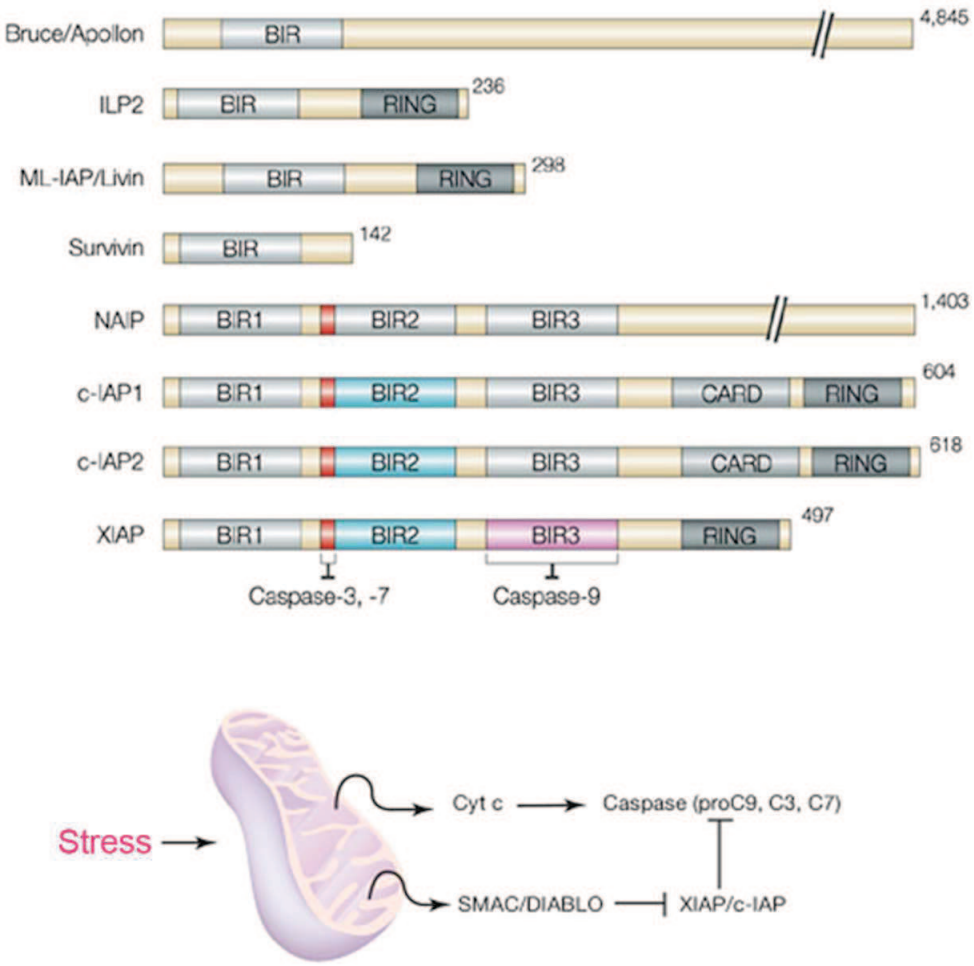


Figure 32 : Structure et fonctions de la famille des IAPs. (Adapté de S J.Rield and Y. Shi, 2004 et extrait du livre « Le concept de cible en cancérologie » écrit par E. Raymond). La famille des IAP est constituée de Bruce/Apollon, ILP2, ML-IAP/Livin, la Survivin, NAIP, c-IAP1, c-IAP2 et XIAP. Ces protéines possèdent toutes des domaines BIR (BIR1, BIR2, BIR3) qui leur permettent d'intéragir avec les caspase. Certaines présentent un domaine RING en C-terminal qui possède une activité E3 ubiquitine ligase pemettant la poly-ubiquitinylation et la dégradation des caspases par le protéasome. En réponse à un stress, les IAP peuvent être inhibées par la protéine SMAC/DIABLO qui est libérée dans le cytoplasme en même temps que le cytochrome c.

* Les inhibiteurs de l'apoptose

La protéine c-FLIP

Plusieurs régulateurs naturels de l'apoptose ont été décrits. L'étape d'initiation de la voie extrinsèque de l'apoptose est, par exemple, régulée par la protéine c-FLIP (cellular FLICE Inhibitoy Protein) (Irmler et al., 1997). En effet, c-FLIP et son homologue viral v-FLIP, sont capables d'inhiber l'activation des procaspase-8 et 10 par l'intermédiaire de leurs deux domaines DED. Ces domaines leur permettent d'interagir avec l'adaptateur FADD et avec les procaspase-8 et -10, empêchant ainsi leurs recrutements aux récepteurs de mort (Irmler et al., 1997).On distingue trois isoformes de c-FLIP : deux isoformes courtes, c-$FLIP_s$ (Short) et c-$FLIP_R$ (RAJI) et une isoforme plus longue c-$FLIP_L$ (Long), qui possède en plus des deux domaines DED, un domaine équivalent au domaine catalytique de la caspase-8. Cependant, c-$FLIP_L$ ne présente pas d'activité enzymatique (la cystéine catalytique est substituée par une tyrosine) (Djerbi et al., 2001; Uchida et al., 1999).

Les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP)

Les protéines c-FLIP ne sont pas les seules molécules impliquées dans l'inhibition des caspases initiatrices. Les protéines de la famille des IAPs (Inhibitor of Apoptosis) peuvent aussi inhiber l'activité enzymatique des caspases et parfois induire leur dégradation par le protéasome (Salvesen and Duckett, 2002). Cette famille regroupe huit membres chez l'homme : NAIP/BIRC1, c-IAP1/BIRC2, c-IAP2/BIRC3, XIAP/BIRC4, survivin/BIRC5, Apollon/Bruce/BIRC6, Livin/ML-IAP/BIRC7 et ILP2/BIRC8 (Figure 32). Ces protéines possèdent toutes des domaines BIR (Baculoviral IAP Repeat) (BIR1, BIR2, BIR3) qui leur permettent d'interagir avec les caspases (Eckelman et al., 2006). Elles présentent également un domaine RING (domaine liant le Zn^{2+}) en C-terminal qui possède une activité E3 ubiquitine ligase à l'origine de la poly-ubiquitinylation et de la dégradation des caspases par le protéasome (Morizane et al., 2005; Riedl and Shi, 2004; Shi, 2002). Les IAPs peuvent être inhibées par les deux protéines mitochondriales Smac/DIABLO et Omi/HtrA2, qui sont libérées dans le cytosplasme en même temps que le cytochrome c au cours de la réponse apoptotique (Figure 32). Ces deux protéines, en interagissant avec les IAPs inhibent leur capacité à se lier aux caspases, qui peuvent alors induire l'apoptose (Du et al., 2000; Verhagen et al., 2000; Yang et al., 2003).

e) Stratégies thérapeutiques ciblant les différents acteurs de l'apoptose en cancérologie

Plusieurs études ont montré que l'apparition et la croissance des tumeurs ne sont pas uniquement la conséquence d'une prolifération cellulaire excessive mais sont le résultat d'un déséquilibre entre la prolifération et la mort cellulaire (Martin and Green, 1995; Reed, 1999). Par ailleurs, la plupart des stratégies thérapeutiques utilisées en cancérologie, comme la radiothérapie ou la chimiothérapie, visent à induire l'apoptose des cellules tumorales. La présence d'altérations au niveau des protéines impliquées dans le contrôle de l'apoptose peuvent donc modifier la réponse cellulaire aux agents anticancéreux et rendre les cellules résistantes aux traitements (Hickman, 1996; Reed, 1995; Schmitt et al., 1997). Cette résistance résulte, dans la plupart des cas, d'une surexpression de protéines anti-apoptotiques et de l'inactivation des effecteurs de l'apoptose. L'activation des voies apoptotiques au sein des cellules cancéreuses constitue donc une stratégie thérapeutique particulièrement attractive. Les différents acteurs précédemment décrits représentent des cibles potentielles pour induire l'apoptose des cellules tumorales et ont fait l'objet de nombreuses études ces dernières années, notamment depuis l'émergence des thérapies ciblées en cancérologie. L'enjeu de ces nouvelles approches consiste à déclencher sélectivement l'apoptose dans les cellules tumorales sans affecter les cellules saines.

***** Cibler les membres de la famille Bcl-2

L'une des premières molécules ayant fait l'objet d'une tentative thérapeutique ciblant les voies de l'apoptose en cancérologie est la protéine Bcl-2. Cette approche a été la première à être développée car cette protéine anti-apoptotique est fréquemment surexprimée dans les cellules cancéreuses. Ainsi, un oligonucléotide antisens, complémentaire de la séquence des 6 premiers codons de l'ARNm de Bcl-2 a été synthétisé. Plusieurs études ont montré que ce composé, nommé « sodium oblimersen » (Genasense ®), était capable de sensibiliser les cellules tumorales à l'apoptose induite par divers stimuli *in vitro*. L'efficacité de cette molécule a ensuite été testée lors d'essais cliniques. Les résultats obtenus en phase III ont montré que l'oblimersen était bien toléré mais qu'il ne présentait pas d'activité anti-tumorale directe et ne permettait pas de sensibiliser les cellules tumorales à la chimiothérapie (Mavromatis and Cheson, 2004; Raffo et al., 2004; Waters et al., 2000).

D'autres stratégies ont donc été mises en place afin d'inhiber les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2.

Plusieurs peptides naturels ou de synthèse, mimant l'action des protéines « BH3 only », ont été développés. Par exemple, l'antimycine A, un inhibiteur du complexe II de la chaîne respiratoire, a été décrit comme étant capable d'induire la mort cellulaire en se fixant sur Bcl-2. Il a été montré par la suite que des dérivés de l'antimycine A pouvaient également se fixer sur Bcl-xL et induire l'apoptose des cellules surexprimant sélectivement cette molécule (Tzung et al., 2001). De la même façon, des études ont montré que la chélérythrine, un alcaloïde décrit comme étant un inhibiteur naturel de la protéine kinase C (PKC), était capable de déstabiliser les complexes Bcl-xL/Bax *in vitro* (Chan et al., 2003). De nombreuses études se sont également intéressées au gossypol. Ce pigment, retrouvé dans les semences de coton, possède de multiples applications pharmaceutiques (contraceptive, antivirale, antiparasitaire…). Par ailleurs, certains travaux ont montré que cette molécule inhibait la croissance de nombreuses lignées cellulaires tumorales *in vitro*. Les propriétés antitumorales du gossypol ont d'abord été attribuées à une activité anti-mitochondriale, et à l'inhibition du métabolisme énergétique de la cellule. Toutefois, de récentes études ont montré que ce composé était capable de se fixer et d'inhiber l'activité de plusieurs membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1) (Dodou et al., 2005a; Dodou et al., 2005b).

Bien que ces composés naturels soient capables d'induire la mort par apoptose de cellules tumorales, leur spécificité reste toutefois contestée. En effet, la cytotoxicité induite par ces molécules n'est pas toujours due à une inhibition spécifique des membres de la famille Bcl-2. Plusieurs études ont montré que ces composés induisaient également la nécrose, l'autophagie ainsi que des modifications du métabolisme de la cellule, qui pourraient être à l'origine des effets anti-tumoraux observés (Zhang et al., 2007). D'autres peptides plus spécifiques ont par la suite été synthétisés. L'un de ces peptides de synthèse mime le domaine BH3 de Bid. Ce composé induit l'apoptose de nombreuses lignées cellulaires tumorales et retarde la croissance des tumeurs chez des souris xénogreffées avec des cellules malignes (leucémie) (Walensky et al., 2004). Une étude a montré que l'efficacité de ce composé serait directement lié à sa capacité d'induire l'oligomérisation de Bax (Walensky et al., 2006).

Une autre stratégie a consisté à rechercher des molécules organiques capables de se lier à la poche hydrophobique des protéines anti-apoptotiques, qui correspond à la région ou se fixe le domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques. L'une des molécules les plus prometteuses identifiée par cette approche, est l'ABT-737. Ce composé, développé par les laboratoires Abbott, mime les effets de Bad. Il se lie à Bcl-2, Bcl-xL et Bcl-w avec une affinité de l'ordre du nanomolaire ($Ki<1$ nM) mais n'a pas d'effet sur Mcl-1 et A1 (Oltersdorf et al., 2005).

ABT-737 induit l'apoptose de cellules primaires humaines issues de lymphomes folliculaires ainsi que de nombreuses lignées tumorales. De plus, ce composé sensibilise les cellules malignes à l'effet pro-apoptotique de multiples agents cytotoxiques et induit la régression complète de tumeurs xénogreffées chez la souris (pour revue : (Labi et al., 2008)). Pour faciliter le développement de cette molécule en clinique, les laboratoires Abbott ont synthétisé un analogue d'ABT-737 pouvant être administré par voie orale, l'ABT-263 (Navitoclax). L'efficacité de ce composé est actuellement évaluée en clinique. Plusieurs essais de phase I ont été réalisés sur des tumeurs solides, notamment dans le cancer du poumon à petite cellules (Gandhi et al., 2011), mais surtout sur des tumeurs hématologiques. Une étude multicentrique de phase I a été réalisée entre novembre 2006 et novembre 2009, afin de déterminer la MTD (Maximum Tolerated Dose) et la DLT (Dose Limiting Toxic effects) d'ABT-263. Plusieurs patients traités antérieurement et atteints de lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL), de lymphome du manteau (MCL), de lymphome folliculaire (LF), de leucémie lymphoïde chronique (LLC), de lymphome de Hodgkin ou de lymphome T/NK, ont ainsi reçu ABT-263 (Wilson et al., 2010). La principale toxicité observée, limitant la dose à administrer lors de cet essai, était une thrombopénie réversible dès l'arrêt du traitement. Les résultats obtenus lors de cette étude sont extrêmement prometteurs (survie sans progression (PFS) de 455 jours chez les patients répondeurs) et des études de phase II sont en cours pour évaluer l'efficacité d'ABT-263 seul ou en combinaison avec les traitements conventionnels (Rudin et al., 2012).

D'autres molécules ayant un mode d'action similaire à celui d'ABT-737 ont été étudiées. C'est le cas de l'Obatoclax (GX015-070), un pan inhibiteur de la famille de Bcl-2 développé par GeminX Pharmaceuticals, qui fait l'objet de multiples essais cliniques de phase I et II (O'Brien et al., 2009; Schimmer et al., 2008). De nombreuses études ont montré que ce composé induisait l'apoptose *in vitro* de multiples lignées cellulaires tumorales, notamment de cancer du poumon, de MCL, de myélome multiple, de leucémie aigue myéloïde et de mélanome (Konopleva et al., 2008; Li et al., 2008a; Perez-Galan et al., 2007). Des expériences menées *in vivo* ont prouvé l'efficacité de l'Obatoclax dans de nombreux modèles tumoraux mais ont aussi malheureusement mis en évidence l'existence de toxicités neurologiques associées à ce traitement (Trudel et al., 2007).

* Cibler les récepteurs à domaine de mort

Plusieurs agonistes de récepteurs pro-apoptotiques, activant sélectivement la voie extrinsèque, ont également été développés.

Ainsi, le TNF α-1a recombinant (tasonermine), composé de 3 chaînes polypeptidiques de 157 acides aminés, a obtenu une AMM en 1999 pour le traitement des sarcomes des tissus mous des membres. La tasonermine est administrée, en association avec le melphalan, sous anesthésie générale en perfusion du membre siège du sarcome et induit une inhibition directe de la prolifération des cellules tumorales par effet cytostatique et cytotoxique (Landry and Gies, 2008).

La cytokine TRAIL, qui se fixe sur les récepteurs DR4 et DR5, fait également l'objet de nombreuses études. En effet, il a été montré que l'injection de TRAIL recombinante soluble (Dulanermin) induisait la régression de nombreuses tumeurs humaines xénogreffées chez la souris (Ashkenazi et al., 1999; Pollack et al., 2001). Ce composé a été testé lors d'essais cliniques de phase I réalisés chez des patients présentant des tumeurs solides avancées. Le premier essai a montré que le traitement était bien toléré et qu'il induisait une réponse anti-tumorale chez certains patients atteints de chondrosarcomes (Herbst et al., 2010). Des résultats similaires ont été obtenus lors d'un deuxième essai de phase I réalisé afin de tester l'efficacité de la cytokine recombinante en association avec de la chimiothérapie (Paclitaxel et Carboplatine) ou des thérapies ciblées (Bevacizumab, anticorps monoclonal anti-VEGF) (PCB), chez des patients atteints de cancers du poumon non à petite cellule (Soria et al., 2010).Plus récemment, une étude randomisée de phase II a été menée et les résultats obtenus ont montré que l'adjonction de la cytokine recombinante au PCB n'améliorait pas le pronostic des patients (Soria et al., 2011). Au cours des dernières années, la résistance des cellules tumorales au traitement par cette cytokine recombinante a été largement étudiée.Les résultats ont montré que cette résistance pouvait être due à un défaut d'expression de DR4 et DR5 à la surface des cellules tumorales, à la mutation de ces récepteurs ou à l'expression des récepteurs Dcr1 et DcR2 (pour revue : (Mahalingam et al., 2009)).

Une autre stratégie, consistant à utiliser des anticorps agonistes des récepteurs DR4 et DR5, a été développée. Depuis quelques années, de nombreux anticorps ont donc été synthétisés (Feng et al., 2010; Kang et al., 2011; Lee et al., 2012; Nagane et al., 2010). Certains d'entre eux ont donné des résultats encourageant lors d'études *in vitro* ou pré-cliniques et sont actuellement évalués chez l'homme. C'est le cas du Lexatumumab ou de l'Apomab, deux agonistes de DR5, qui ont tous deux été testés lors d'essais cliniques de phase I (Plummer et al., 2007). Lors de ces essais, les deux anticorps ont montré une toxicité hépatique ainsi qu'une activité limitée en monothérapie. Le développement de ces agonistes de DR5 est maintenant axé sur des approches combinatoires.

Des études de phase II réalisées avec le Lexatumumab en association avec du 5-FU, de l'Irinotécan ou de la doxorubicine ont abouti à des réponses partielles.

Un anticorps monoclonal ciblant DR4, le Mapatumumab, est également testé en clinique. Les résultats d'esssais de phase I ont montré que ce composé était bien toléré lorsqu'il était utilisé seul (Hotte et al., 2008; Tolcher et al., 2007) ou en combinaison avec la gemcitabine et le cis-platine (Mom et al., 2009). Toutefois, le Mapatumab n'a pas montré d'activité anti-tumorale en monothérapie lors d'essais de phase II. L'efficacité de cet anticorps monoclonal devrait donc être prochainement testée en association avec la chimiothérapie (Trarbach et al., 2010).

* Cibler les IAPs

Les IAPs, protéines inhibitrices des caspases, inhibent les voies extrinsèque et intrinsèque de l'apoptose et constituent donc une cible particulièrement intéressante en cancérologie. En effet, la résistance des cellules cancéreuses aux traitements actuels est liée, au moins en partie, à une surexpression d'IAPs. Nous avons vu précédemment que les IAP pouvaient être inhibées par la protéine mitochondriale SMAC/Diablo, libérée dans le cytoplasme au cours de la réponse apoptotique. Plusieurs peptides, analogues au domaine N-terminal de SMAC, responsable de la fixation de cette protéine au domaine BIR des IAPs, ont donc été synthétisés. Ces peptides empêchent l'interaction des IAPs avec les caspases et sensibilisent les cellules tumorales à divers stimuli apoptotiques (pour revue : (Fulda and Vucic, 2012)). Une étude a également montré que l'association d'un de ces mimétique de SMAC avec la cytokine recombinante TRAIL permettait de diminuer significativement la croissance tumorale d'une lignée de gliome xénogreffée chez la souris (Fulda et al., 2002). Toutefois, ces peptides ne possédent pas les propriétés pharmacologiques nécessaires à un développement en clinique. Plusieurs travaux ont donc été menés afin de modifier leur structure dans le but d'améliorer d'une part leur propriétés pharmacologiques et d'autre part leur affinité pour les IAPs (Fulda and Vucic, 2012). Trois pan antagonistes des IAP sont actuellement testés en clinique : le HGS1029 développé par Aegera Therapeutics, l'AT-406 développé par Ascenta therapeutics et le TL32711 développé par Tetralogic pharmaceutical). Les premiers résultats de phase I montrent que ces composés sont bien tolérés mais on ne dispose pas encore de données concernant leur efficacité anti-tumorale.

La majorité des études réalisées sur les IAP concerne la protéine XIAP, surexprimée dans de nombreuses lignées cellulaires tumorales ainsi que dans de nombreuses tumeurs humaines primaires.

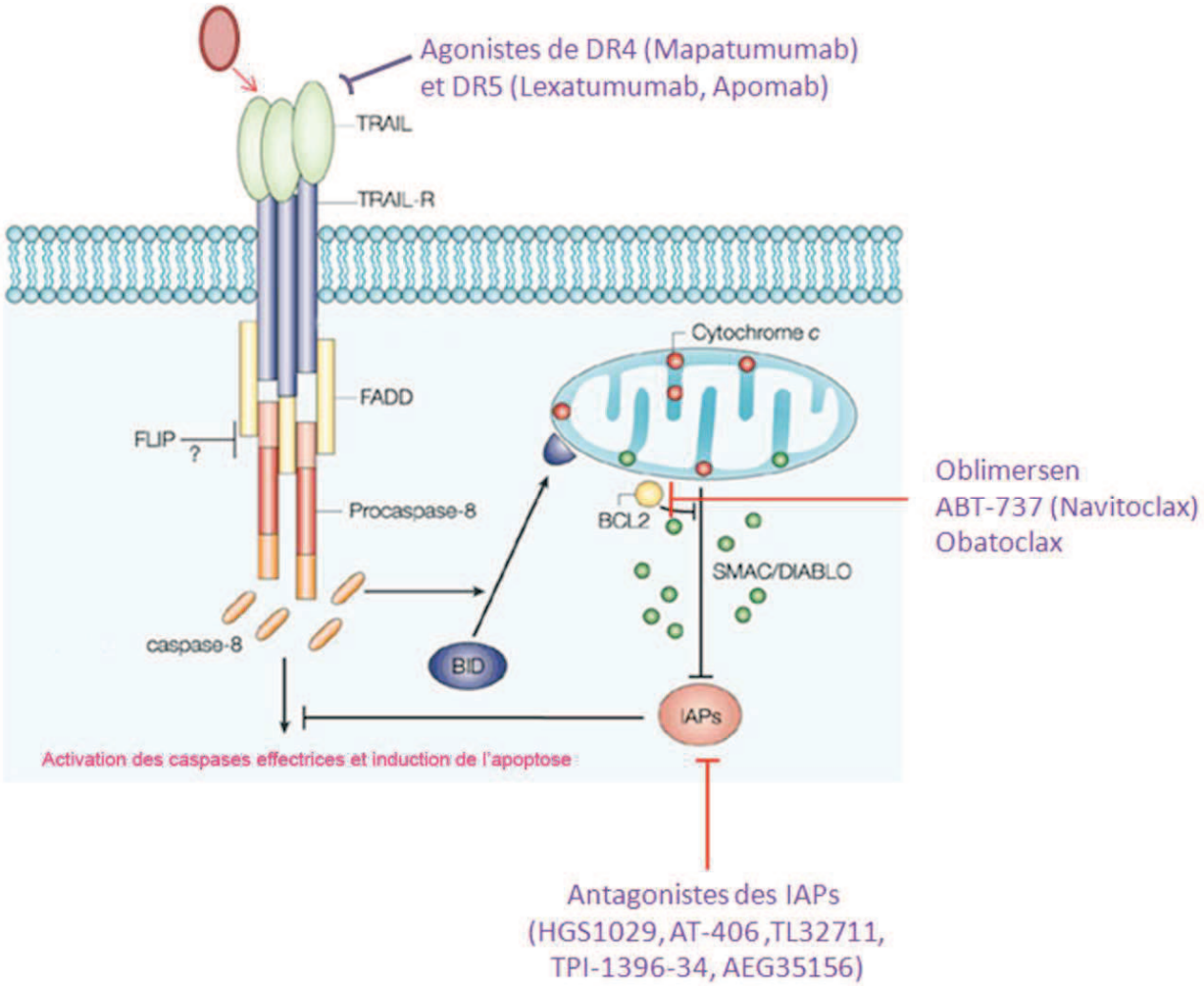


Figure 33: Stratégies thérapeutiques fondées sur l'induction de l'apoptose en cancérologie. (Adapté de P. Hersey and X D. Zhang, 2001). Plusieurs composés ont été développés afin d'inhiber les protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2. Ainsi, l'efficacité d'ABT-737 (inhibiteur de Bcl-2, Bcl-w et Bcl-xl), de l'Oblimersen (oligonucléotide antisens dirigé contre Bcl-2) et de l'Obatoclax (pan inhibiteur de la famille de Bcl-2) sont actuellement évalués lors d'essais cliniques. D'autres molécules ont été synthétisées afin de diminuer l'activité des inhibiteurs de l'apoptose tels que les IAP. Plusieurs antagonistes des IAP, également appelés « SMAC mimetics », sont actuellement testés en clinique. Enfin, de mutliples agonistes des récepteurs de mort DR4 et DR5 ont été développés afin d'activer la voie extrinsèque de l'apoptose. Certains anticorps monoclonaux comme le Mapatumumab, le Lexatumumab ou l'Apomab ont été évalués lors d'essais cliniques.

La surexpression de cette protéine chez les patients est à l'origine d'une résistance à la chimiothérapie et à la radiothérapie et est associé à un mauvais pronostic. XIAP constitue donc une cible très attractive et plusieurs inhibiteurs de cette protéine ont été développés.

Un inhibiteur de XIAP , le TPI-1396-34, permet d'augmenter l'activité de la caspase-3 et d'induire l'apoptose de nombreuses lignées cellulaires tumorales *in vitro*. *In vivo*, ce composé présente une activité anti-tumorale chez des souris xénogreffées avec une lignée de cancer du colon (Schimmer et al., 2004). Une autre approche, basée sur l'utilisation d'oligonucléotides antisens, a été mise en place pour inhiber la protéine XIAP. L'un de ses oligonucléotides (AEG35156) est particulièrement efficace puisqu'il permet de diminuer le niveau d'expression de la protéine XIAP (60 à 80% d'inhibition à 500 nM selon les lignées) et possède une activité anti-tumorale sur un pannel de lignées (cancers de la prostate, des ovaires, du colon et des poumons) xénogreffées chez la souris. L'utilisation de ce composé, en combinaison avec le Docetaxel, a permis d'obtenir des régressions complètes dans un modèle de souris xénogreffées avec une lignée cellulaire de cancer de la prostate (LaCasse et al., 2006). Ce composé, développé par Aegera Therapeutics, a ensuite été évalué chez l'homme lors d'essais cliniques de phase I et II. Les résultats montrent que cet oligonucléotide antisens est bien toléré et qu'il induit, chez les patients atteints d'une leucémie aigue myéloïde (LAM), une diminution du taux d'ARNm de XIAP (42 à 100% d'inhibition selon les patients). Cet effet s'accompagne d'une induction de l'apoptose des cellules souches leucémiques (CD34+, CD38-) chez 5 patients sur 9 traités (Carter et al., 2011). L'utilisation de ce composé en combinaison avec la chimiothérapie lors d'une étude de phase I/II non randomisée a permis d'obtenir une régression complète chez 10 patients atteints de LAM sur les 11 traités (Schimmer et al., 2009). Toutefois, une deuxième étude de phase II randomisée n'a pas permis de confirmer ces résultats (Schimmer et al., 2011) .

Les différentes stratégies utilisées pour induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses sont résumées sur la figure 33.

La seconde partie de ce chapitre est consacré à une autre voie impliquée dans la régulation de la survie et de la mort cellulaire. Ce mécanisme, appelé autophagie, a également fait l'objet de nombreuses études en cancérologie.

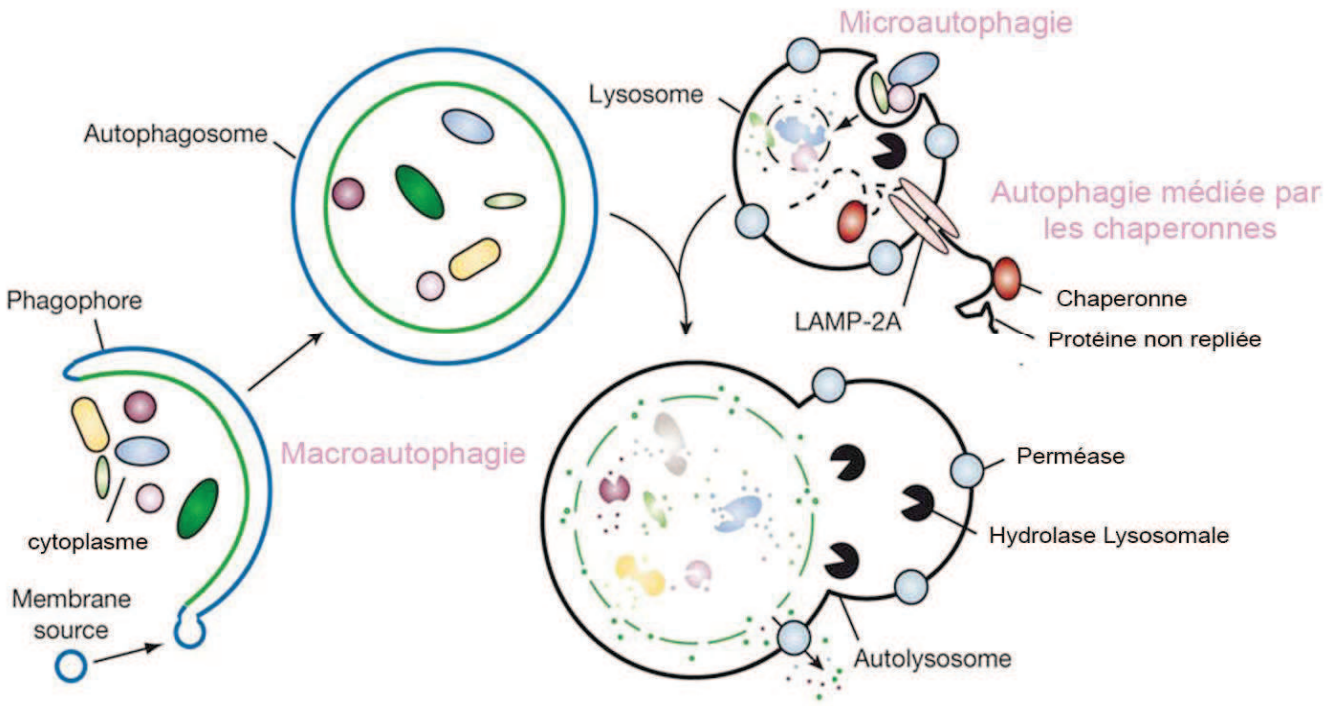


Figure 34 : Les Différentes formes d'autophagie. (D'après N. Mizushima *et al*, 2008). La microautophagie correspond à la pénétration directe, dans les lysosomes, de molécules présentes dans le cytoplasme après une invagination de la membrane. La macroautophagie correspond à la séquestration du matériel cytoplasmique au sein d'une structure présentant une double membrane lipidique nommée autophagosome. Les autophagosomes fusionnent avec des endosomes ou des lysosomes qui contiennent des hydrolases. L'hydrolyse de la membrane interne et du contenu des autophagosomes se produit dans les autolysosomes. Les molécules qui en résultent sont libérées dans le cytoplasme par des perméases membranaires. La pénétration sélective de protéines peut se faire par l'intermédiaire de chaperonnes telles que les chaperonnes cytoplasmique hsc73 et lysosomiale hsc70. L'autophagie médiée par les chaperonnes fait également intervenir la protéine LAMP-2 (Protéine membranaire de type 2A associée au lysosome) qui permet le transport des protéines cibles du cytoplasme vers le lysosome.

2. L'autophagie

a) Les différentes formes d'autophagie

L'autophagie est une voie catabolique qui permet de réguler finement l'homéostasie cellulaire en dégradant et recyclant continuellement les protéines et organites cytoplasmiques. Ce processus peut être stimulé en conditions de stress, telles que la carence en nutriments, l'absence de facteurs de croissance ou l'hypoxie et peut favoriser l'adaptation et la survie cellulaire. Trois formes d'autophagie ont été décrites : la micro-autophagie, l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA pour chaperone-mediated autophagy) et la macro-autophagie (Figure 34).

* **La micro-autophagie** correspond à la pénétration directe dans les lysosomes de molécules présentes dans le cytosoplasme après une invagination de la membrane (Mijaljica et al., 2011).

* **L'autophagie médiée par les chaperonnes** permet l'élimination sélective de protéines possédant une séquence pentapeptidique cible bien définie (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln), en condition de privation prolongée en nutriments ou de stress oxidatif (Kaushik and Cuervo, 2008). Ces protéines sont reconnues dans le cytoplasme par la protéine chaperonne hsc-73 puis la protéine LAMP2A (Lysosomal-associated membrane protein 2A), située au niveau de la membrane lysosomale, interagit avec le complexe protéine cible/hsc-73. Elle permet le transport dans la matrice lysosomale de la protéine cible qui sera ensuite prise en charge par une autre chaperonne, nommée hsc-70, avant d'être dégradée.

* **La macro-autophagie**, communément appelée autophagie, est un mécanisme vacuolaire de dégradation du matériel intracellulaire. La macro-autophagie est la seule forme qui permet de dégrader massivement des macromolécules et des organites (Cuervo, 2004). Nous étudierons exclusivement cette forme d'autophagie dans la suite du chapitre.

b) Les différentes étapes de la macro-autophagie

Lors de l'initiation du processus autophagique, les protéines et les organites devant être dégradés sont d'abord rassemblés au sein de structures membranaires, les phagophores, qui fusionnent ensuite par leurs extrémités pour former des structures vacuolaires à double membrane appelées autophagosomes.

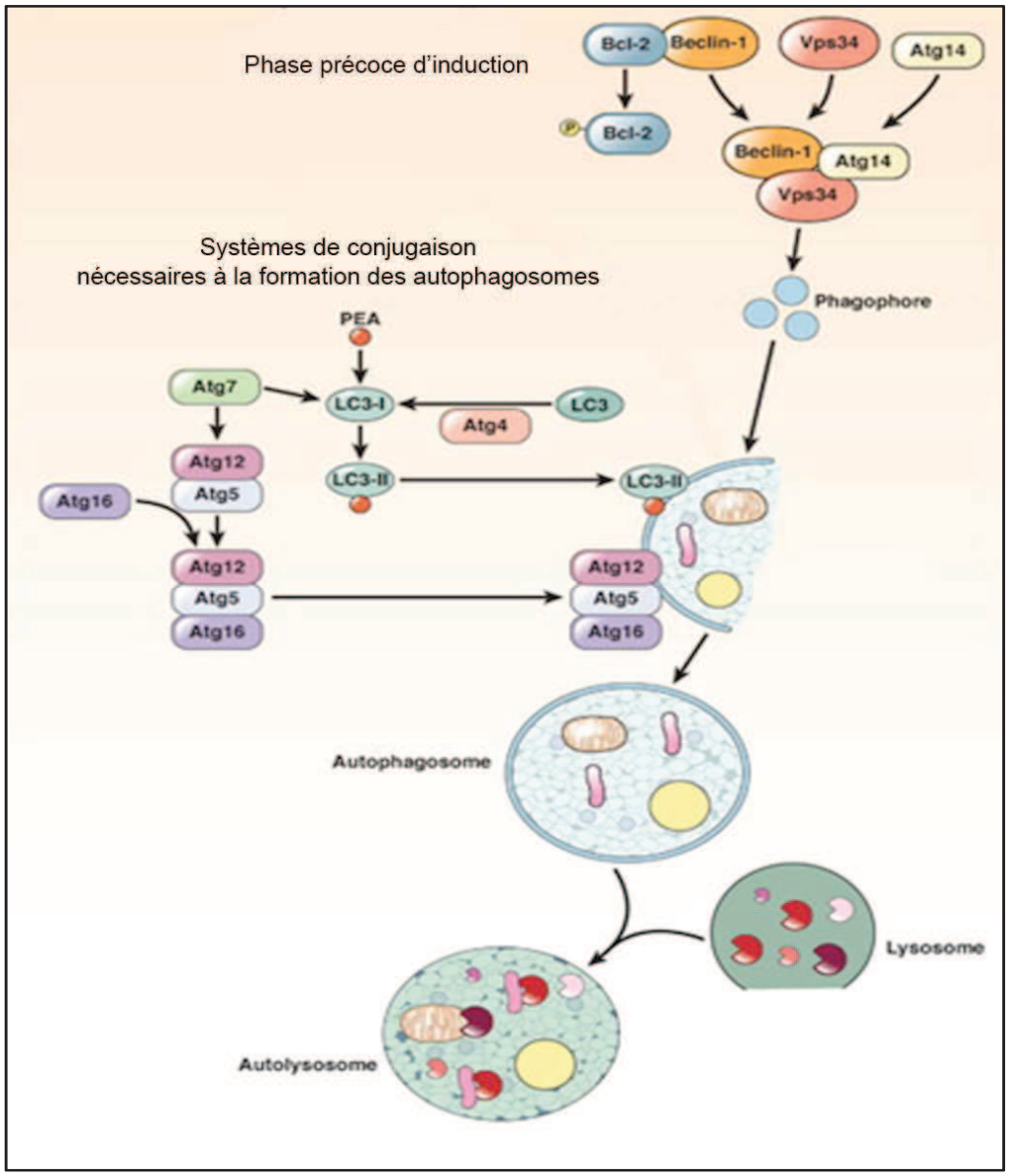


Figure 35 : Mécanismes impliqués dans la formation des autophagosomes. (Adapté de M J. Czaja, 2011). La phase précoce d'induction (formation de la membrane d'isolation) nécessite la formation du complexe protéique Bécline-1 (Atg6)/Vps34, une phosophatidylinositol 3-kinase de classe III. Bcl-2 peut également se fixer sur Bécline-1 et induire, au contraire une inhibition de l'autophagie. En absence de Bcl-2, la formation du complexe Bécline-1/Vps34 va permettre la production de phosphatidyl inositol 3-phosphate et entraîner le recrutement du système de conjugaison. La formation de l'autophagosome repose essentiellement sur deux systèmes de conjugaison. Le premier conjugué protéique formé est le complexe Atg5-Atg12. Il est nécessaire au recrutement du deuxième système, qui résulte de la conjugaison en carboxyterminal de la protéine Atg8 (LC3) par la phosphatidyléthanolamine (PEA), au niveau de la membrane pré-autophagosomale. La protéine Atg4 va ensuite hydrolyser la liaison entre Atg8 et la PEA. Seule une fraction du complexe Atg8-PEA reste alors associée à la membrane interne de l'autophagosome, constituant ainsi un marqueur spécifique de cet organite. Une fois arrivé à maturation l'autophagosome fusionne avec le lysosome pour donner l'autolysosome.

Ces derniers fusionnent alors avec les lysosomes primaires qui contiennent des enzymes hydrolytiques. Cette fusion entraîne la formation d'autolysosomes, au sein desquels le matériel cytoplasmique séquestré va être dégradé par les enzymes lysosomales. Le contenu de la vacuole est alors recyclé, fournissant ainsi à la cellule une source en énergie et en acides aminés (Kroemer and Jaattela, 2005; Xie and Klionsky, 2007).

* Protéines impliquées dans la formation de l'autophagosome

La formation des autophagosomes est sous le contrôle des gènes *ATG* (autophagy related genes), initialement découverts chez la levure *Saccharomyces cerevisae* (pour revue : (Codogno, 2004)). Une quinzaine de protéines Atg, pour la plupart conservées de la levure à l'homme, sont nécessaires à sa biogenèse. Ce mécanisme peut être divisé en plusieurs étapes distinctes (Figure 35).

La phase précoce d'induction (formation de la membrane d'isolation) nécessite la formation du complexe protéique Bécline-1 (Atg6)/Vps34. Bécline-1 est une protéine de 450 acides aminés qui possèdent quatre domaines : un domaine d'interaction avec Bcl-2 (88-150), un domaine coiled-coil (150-224), un domaine ECD (evolutionarily-conserved domain, 244-337) et un signal d'export nucléaire (180-190). Bécline-1 peut donc être retrouvée dans le cytoplasme ou le noyau de la cellule. Toutefois, seule la forme cytoplasmique est impliquée dans le processus d'autophagie (Liang et al., 2001). Elle interagit avec la protéine Vsp34, une phosophatidylinositol 3-kinase de classe III, et son adaptateur Vsp15 par l'intermédiaire de son domaine ECD. Une autre protéine, nommée UVRAG (pour UV irradiation Resistance-Associated Gene), intervient également au niveau de ce complexe. UVRAG se lie directement à Bécline-1 par l'intermédiaire de son domaine coiled-coil, renforçant de ce fait, l'association de cette dernière avec Vps34 (Pattingre et al., 2008). Par ailleurs, Bcl-2 peut également se fixer sur Bécline-1 et induire, au contraire une inhibition de l'autophagie. En absence de Bcl-2, la formation du complexe Bécline-1/UVRAG/Vps34 va permettre la production de phosphatidyl inositol 3-phosphate et entraîner le recrutement du premier système de conjugaison (Atg12-Atg5). En effet, la formation de l'autophagosome repose essentiellement sur deux systèmes de conjugaison. Le premier conjugué protéique formé est le complexe Atg5-Atg12. Ce dernier est nécessaire au recrutement du deuxième système, qui résulte de la conjugaison en carboxyterminal de la protéine Atg8 (MAP-LC3 chez les mammifères) par la phosphatidyléthanolamine (PEA), au niveau de la membrane pré-autophagosomale. Le complexe Atg5-Atg12 est recyclé vers le cytoplasme avant la formation complète de l'autophagosome.

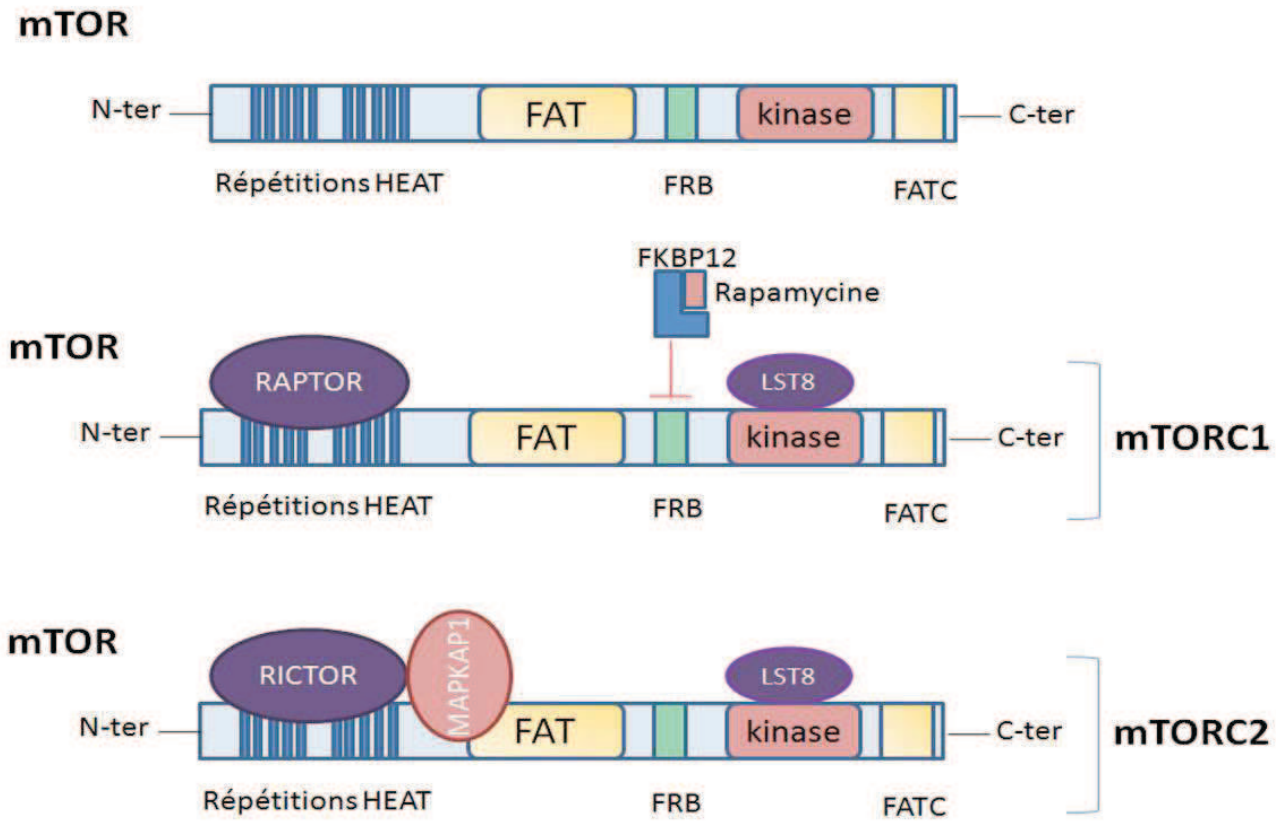


Figure 36 : Structure de la protéine mTOR et des complexes mTORC1 et mTORC2. (D'après Q. Yang and K L.Guang, 2007 et A W. Thomson *et al*, 2009). mTOR appartient à la famille des phosphatidylinosithol kinase-related kinase (PIKK). Elle présente, au niveau de son domaine N-terminal, des motifs répétés HEAT, impliqués dans les interactions protéine-protéine. Elle est constituée de quatre domaines fonctionnels : un domaine FAT (FRAP, ATM, TRAP) qui permet de réguler son activité kinase, un domaine FRB (FKBP-Rapamycin Binding site) qui permet la liaison à la rapamycine, un domaine kinase et un domaine FATC (second domaine FAT situé en C-terminal de la protéine). mTOR est le centre catalytique de deux complexes multiprotéiques fonctionnellement distincts : mTORC1 et mTORC2. mTORC1 est connu pour être sensible à la rapamycine. Dans ce complexe mTOR est associé à Raptor (Regulatory Associated Protein of mTOR) et mLST8 (mammalian lethal with sec13 protein 8). mTORC2, est insensible à la rapamycine. Dans ce complexe mTOR interagit avec les protéines Rictor (rapamycinin sensitive companion of TOR), Sin1 (également appelée MAPKAP1) et mLST8.

La cystéine protéase Atg4 va ensuite hydrolyser Atg8 et la dissocier de la membrane. Seule une fraction du complexe Atg8-PE reste alors associée à la membrane interne de l'autophagosome, constituant ainsi un marqueur spécifique de cet organite (Figure 35). Lorsque l'autophagosome est arrivé à maturation, il fusionne avec le lysosome. Cette fusion passe fréquemment par l'intermédiaire d'une fusion avec un endosome avant d'aboutir finalement à l'autophagolysosome. Plusieurs études ont montré que ce mécanisme impliquait les protéines Rab7 et Vps4 (pour revue : (Eskelinen, 2005))

c) Voies de signalisations impliquées dans la régulation de l'autophagie

L'autophagie est une voie catabolique impliquée dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. De nombreuses voies de signalisation sont donc impliquées dans sa régulation. Ainsi, la voie PI3K/Akt/mTOR agit en tant que régulateur négatif alors que la voie PKR/eIF2α est un régulateur positif de l'autophagie.

* Régulation de l'autophagie par la voie PI3K/Akt/mTor :

La protéine mTOR (mammalian Target Of Rapamycine), aussi appelée FRAP1 (FKBP12-Rapamycin-Associated Protein), RAPT (Rapamycin Target) ou SEP (Sirolimus Effector Protein), est une protéine ubiquitaire de 289 kDa dont le gène est situé sur le chromosome 1p36.2. Cette sérine thréonine kinase, initialement mise en évidence en 1991 dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, possède une structure hautement conservée de la levure au mammifère, avec 95% d'homologie de séquence entre la souris, le rat et l'homme. Son activité kinase est inhibée spécifiquement par la rapamycine, une lactone macrocyclique, produite par la bactérie *Streptomyces hygroscopicus* qui présente des propriétés antifungiques, antiprolifératives et immunosuppressives (Heitman et al., 1991). mTor appartient à la famille des phosphatidylinosithol kinase-related kinase (PIKK) (pour revue : (Bhaskar and Hay, 2007)). Elle présente, au niveau de son domaine N-terminal, des motifs répétés HEAT (Huntington-Elongation factor 1A-protein phosphatase 2A-A subunit-TOR) qui sont impliqués dans les interactions protéine-protéine. Elle est également constituée de quatre domaines fonctionnels : un domaine FAT (FRAP, ATM, TRAP) spécifique des PIKK qui permet de réguler son activité kinase, un domaine FRB (FKBP-Rapamycin Binding site) qui permet la liaison à la rapamycine, un domaine kinase et un domaine FATC (correspond à un second domaine FAT situé en C-terminal de la protéine) (Figure 36).

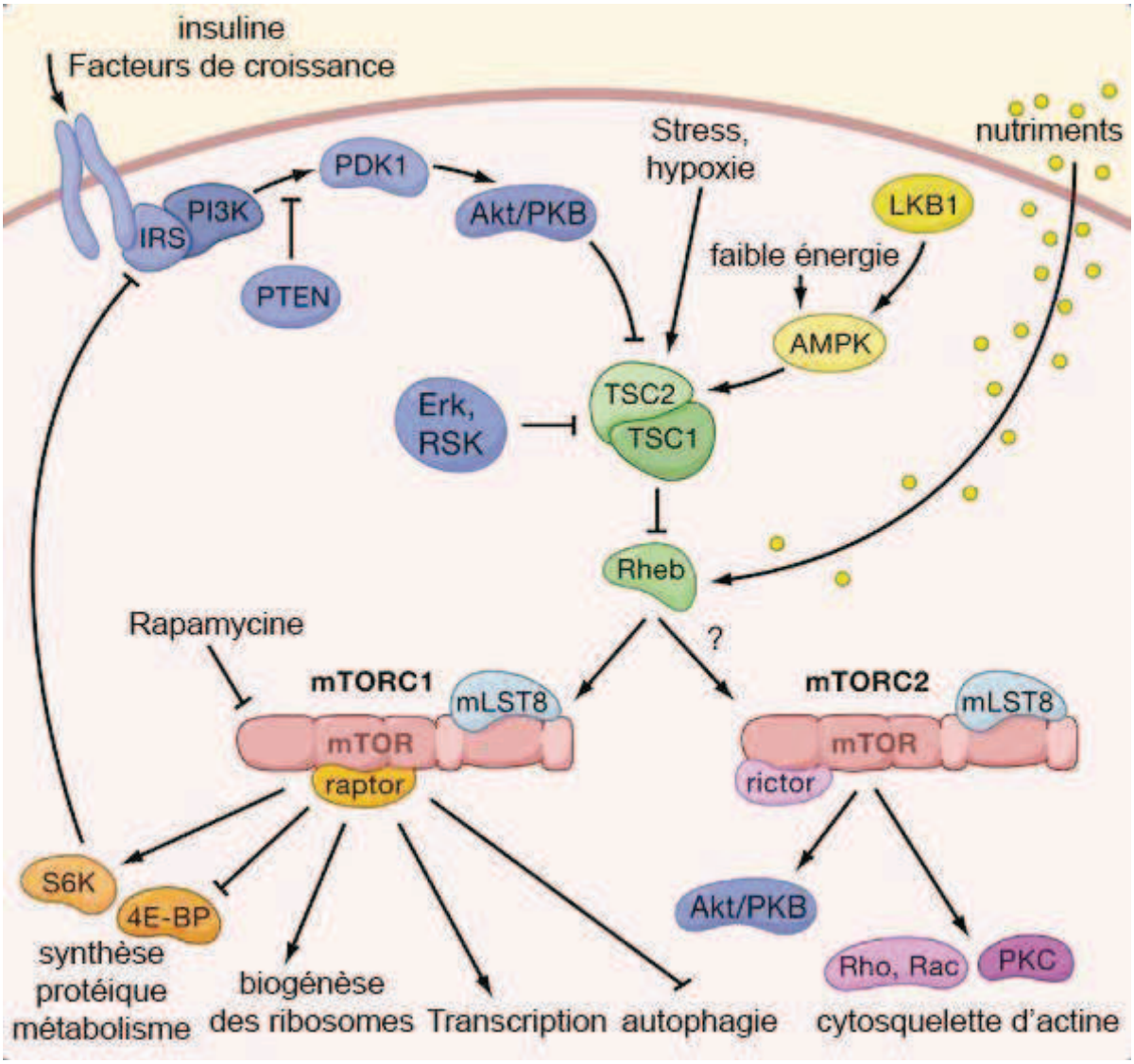


Figure 37 : Régulations et fonctions cellulaires des complexes mTORC1 et mTORC2. (Adapté de Wullschleger *et al*, 2006). La sérine/thréonine kinase mTOR fait partie de deux complexes fonctionnellement distincts définis par leurs sous-unités spécifiques, Raptor (mTORC1) et Rictor (mTORC2). Le récepteur de l'insuline active PI3K, ce qui entraîne l'activation d'Akt. Une fois activé, Akt phosphoryle et inhibe TSC2, ce qui induit l'activation de Rheb et de mTORC1. mTORC1 est la cible de la rapamycine. Il régule la synthèse protéique en phosphorylant 4E-BP et S6K. L'absence d'acides aminés, l'hypoxie ainsi que de faibles niveaux d'ATP inhibent l'activation de mTORC1 en activant TSC2.

mTOR joue un rôle central dans la régulation de la croissance et de la prolifération cellulaire. En effet, cette protéine régule, par phosphorylation, plusieurs protéines impliquées dans le contrôle de la traduction protéique, de la transcription, de la biogenèse des ribosomes et du cycle cellulaire. Cette protéine kinase est le centre catalytique de deux complexes multiprotéiques fonctionnellement distincts, conservés chez tous les eucaryotes et nommés mTORC1 et mTORC2 (pour revue (Julien and Roux, 2010)). Nous nous intéresserons plus particulièrement au complexe mTORC1 qui est impliqué dans la régulation de l'autophagie.

- **mTORC1** est connu pour être sensible à la rapamycine. Dans ce complexe mTOR est associé à Raptor (Regulatory Associated Protein of mTOR) et mLST8 (mammalian lethal with sec13 protein 8) (Figure 36). mTORC1 interagit avec Deptor (DEP domaincontaining mTOR-interacting protein), FKBP38 et PRAS40 (prolinerich Akt substrate of 40 kDa), qui agissent en tant que régulateurs négatifs du complexe.

L'activité de mTORC1 est modulée par les facteurs de croissance, par l'état énergétique de la cellule et par la disponibilité en nutriments. Ainsi, l'activation de la PI3K par les facteurs de croissance mène à l'accumulation dans la membrane plasmique de phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3), un phospholipide important pour le recrutement et l'activation de PDK1 (Phosphoinositide Dependent Kinase-1) et de la protéine Akt. Une fois activée, Akt phosphoryle la protéine TSC2 (Tuberous sclerosis 2) ce qui entraine son inactivation. TSC2 forme un hétérodimère avec la protéine TSC1 et inhibe la protéine Rheb (Ras Homology Enriched in Brain), une petite GTPase qui, lorsqu'elle est liée au GTP, interagit avec mTOR et active spécifiquement la signalisation mTORC1. La phosphorylation de TSC2 par Akt lève donc l'inhibition que TSC2 exerce sur mTOR via Rheb (Huang and Manning, 2009) (Figure 37). Lorsque les niveaux énergétiques de la cellule sont faibles, l'AMPK (AMP-activated protein kinase) peut diminuer l'activité de mTORC1 en activant TSC2 (Inoki et al., 2003; Kimura et al., 2003). L'hypoxie inhibe également l'activité de ce complexe par l'intermédiaire d'un mécanisme impliquant les protéines Redd1 (regulated in development and DNA damage response gene 1) et Redd2 (Brugarolas et al., 2004). L'inhibition de mTORC1 en réponse à l'hypoxie empêche l'activation des voies de signalisation induisant la prolifération lorsque les conditions ne sont pas adéquates pour la croissance cellulaire. A l'inverse, les acides aminés peuvent activer mTORC1 en inhibant TSC1 et TSC2 ou en activant directement la GTPase Rheb (Hay and Sonenberg, 2004). Des travaux ont également montré que les acides aminés pouvaient activer mTORC1 grâce à une PI3K de classe III nommée hVps34 (human vacuolar protein sorting 34) (Gulati et al., 2008).

mTORC1 est impliqué dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la régulation de la traduction, la biosynthèse des ribosomes ainsi que l'inhibition de l'autophagie. Ce complexe est un régulateur majeur de la synthèse protéique puisqu'il régit la formation du complexe d'initiation de la traduction eIF4F (elongation initiation factor 4F). En effet, mTORC1 phosphoryle et inhibe les protéines 4E-BP dont l'activité empêche la formation du complexe eIF4F et l'initiation de la traduction. Le complexe mTORC1 phosphoryle également le motif hydrophobe de la kinase p70S6K (p70 ribosomal S6 kinase). Lorsqu'elle est activée, p70S6K phosphoryle plusieurs substrats comme la protéine ribosomale S6, impliquée dans la biogénèse du ribosome. Elle phosphoryle également le facteur eIF4B, nécessaire au recrutement des ribosomes au niveau de l'ARNm (pour revue : (Ma and Blenis, 2009)).

mTORC1 est un régulateur négatif de l'autophagie. En effet, de nombreux travaux ont montré que la rapamycine, en inhibant mTOR, induit l'autophagie, même lorsque les cellules sont dans des conditions riches en nutriments (Noda and Ohsumi, 1998; Paglin et al., 2005). Les mécanismes à l'origine de l'inhibition de l'autophagie par mTOR ne sont pas encore bien caractérisés. Une étude réalisée chez la levure a montré que TOR phosphorylait Atg13 et empêchait ainsi la formation du complexe Atg13/Atg1, essentiel pour le recrutement des protéines Atg à la membrane d'isolation (Kamada et al., 2000). D'autres travaux ont montré que la kinase p70S6K pouvait être impliquée dans ce processus. En effet, une corrélation entre la phosphorylation de la protéine ribosomale S6 et l'inhibition de l'autophagie a été rapportée dans des hépatocytes de rat, suggérant ainsi que l'activité de p70S6K était impliquée dans l'inhibition de l'autophagie (Blommaart et al., 1995). Cependant, il a été montré plus récemment chez la drosophile qu'en l'absence de nutriments, l'activation de cette kinase induisait l'autophagie (Scott et al., 2004). Le rôle de la p70S6K dans l'autophagie reste donc très controversé.

- **mTORC2**, est quant à lui, insensible à la rapamycine. Dans ce complexe mTOR interagit avec les protéines Rictor (rapamycininsensitive companion of TOR), Sin1 (stress-activated map kinase interacting protein 1) et mLST8 (Figure 36). mTORC2 s'associe avec Deptor, qui réprime son activité, ainsi qu'avec PPR5/Protor, dont la fonction demeure inconnue. Ce complexe est impliqué dans la mise en place du cytosquelette d'actine puisque la diminution de son expression empêche la polymérisation de l'actine et l'expansion cellulaire (Guertin and Sabatini, 2009). Il est également capable d'activer Akt par phosphorylation sur son résidu Ser^{473} (Sarbassov et al., 2006).

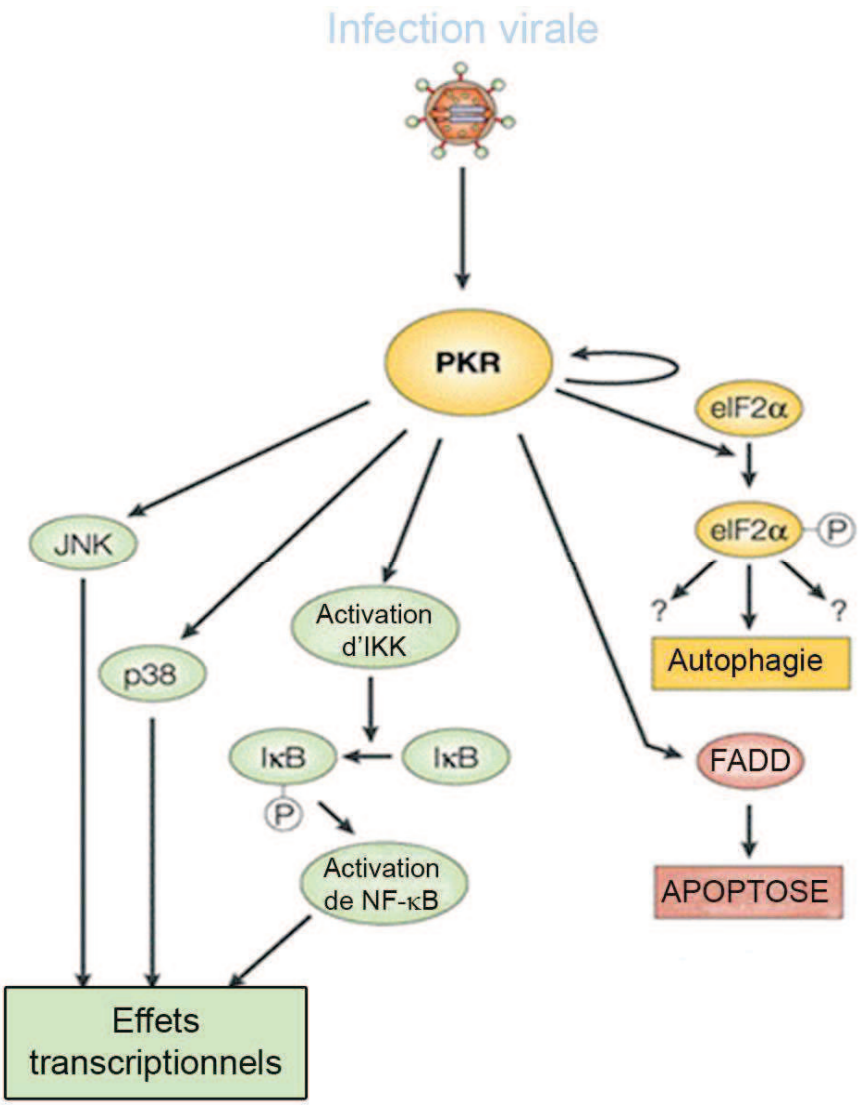


Figure 38 : Induction de l'autophagie par la PKR en réponse à une infection virale. (Adapté de K. Kirkegaard et al, 2004). La PKR, lorsqu'elle est activée suite à une infection virale, induit sa propre phosphorylation ainsi que celle de EIF2α. La phosphorylation de EIF2α induit une forme particulière d'autophagie, appelée xénophagie, qui contribue aux mécanismes de défense immunitaire en permettant la dégradation de pathogènes. La PKR active également d'autres voies de signalisation telles que la voie NF-κB et la voie des MAP kinases qui pourraient favoriser également la mise en place de mécanismes de défense de la cellule infectée. Par ailleurs, La PKR peut également induire l'apoptose.

* Régulation de l'autophagie par la voie PKR/eIF2α

Contrairement à la voie PI3K/Akt/mTOR, la voie PKR/eIF2α exerce une régulation positive de l'autophagie. Chez la levure, il a été montré que la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eIF2α par la kinase GCN2, est essentielle pour l'activation de l'autophagie lors de carences en nutriments (Talloczy et al., 2002). Dans les cellules de mammifères, c'est la PKR (kinase également impliquée dans la phosphorylation d'eIF2α) qui intervient dans l'induction de l'autophagie (Talloczy et al., 2002). Tallóczy *et al* ont notamment décrit l'importance de la voie PKR/eIF2α dans l'induction de l'autophagie suite à l'infection virale par HSV-1 (Figure 38). En effet, l'autophagie contribue aux mécanismes de défense immunitaire en permettant la dégradation de pathogènes. Ce mécanisme est appelé xénophagie. Les auteurs ont montré que le virus pouvait s'opposer à l'autophagie mise en place par la voie PKR grâce à la protéine virale ICP34.5. Cette dernière permet en effet de recruter une phosphatase cellulaire qui déphosphoryle eIF2α . Ils en ont conclu que l'HSV-1 bloquait la xénophagie induite par la PKR afin d'éviter la dégradation de ses virions (Talloczy et al., 2002; Talloczy et al., 2006).

D'autres travaux ont confirmé le rôle de la PKR dans l'induction de l'autophagie. La PKR serait notamment impliquée dans l'induction de l'autophagie observée après activation de la voie JNK dans des cellules du pancréas stimulées par les acides gras (Komiya et al., 2010). Une autre étude a montré que PERK, la PKR localisée dans le RE, induit l'autophagie et l'apoptose dans des cellules cancéreuses et dans des hépatocytes primaires, à la suite de différents traitements (Park et al., 2008a; Park et al., 2008b). L'équipe de Kim s'est intéressée aux mécanismes permettant d'induire l'autophagie dans des cellules irradiées. Elle a montré, d'une part, que le stress du RE était impliqué dans ce processus et d'autre part que PERK était essentielle pour l'induction de l'autophagie dans ces cellules (Kim et al., 2010).

d) Fonctions biologiques de l'autophagie

L'autophagie exerce de multiples fonctions physiologiques au sein de la cellule. Ce processus permet notamment le maintien de l'homéostasie cellulaire en favorisant le recyclage d'organites (mitochondrie, peroxisomes, membranes d'origine réticulaire ou golgienne) et de constituants cytoplasmiques (protéines, glycogène, lipides neutres, ARN et ribosomes). L'élimination de mitochondries endommagées ou non fonctionnelles est appelée mitophagie.

Ce mécanisme permet de limiter la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) par les mitochondries dysfonctionnelles, pouvant être à l'origine de l'apoptose ou de la nécrose de la cellule. Ainsi, la mitophagie est un processus important qui pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de la mort cellulaire (pour revue : (Wang and Klionsky, 2011)).

Par ailleurs, la production d'ERO par la mitochondrie est impliquée dans le vieillissement. En effet, ce mécanisme provoque une accumulation d'ADN mitochondrial et favorise la présence de dommages oxydatifs dans la mitochondrie. Ces phénomènes sont associés au vieillissement cellulaire et des défauts mitochondriaux sont retrouvés dans certaines maladies liées à l'âge (Wallace, 2005). Plusieurs études ont montré que les EROs, associés aux dommages oxydatifs, entrainent une modification du potentiel mitochondial et sont essentiels à l'induction de l'autophagie (Chen et al., 2007a; Rodriguez-Enriquez et al., 2004; Scherz-Shouval and Elazar, 2007). Cette voie catabolique permettrait donc également de prévenir le vieillissement cellulaire.

L'autophagie peut également être stimulée en condition de stress métaboliques tels que la carence en nutriments, l'absence de facteurs de croissance ou l'hypoxie. Ce processus permet de dégrader des lipides et des protéines qui ne sont pas essentiels, afin de fournir à la cellule les acides gras et acides aminés nécessaires pour la synthèse de macromolécules et d'ATP. L'autophagie va ainsi satisfaire les besoins métaboliques de la cellule, lui permettant alors de s'adapter et de survivre suite à un stress environnemental.

L'autophagie participe également au développement embryonnaire des eucaryotes inférieurs et supérieurs. L'importance de ce mécanisme a été montré à l'aide de délétions des gènes *Atg*, réalisées dans trois organismes différents : *S. cerevisiae*, *Dictyostelium discoideum* et *C. Elegans* (pour revue (Levine and Klionsky, 2004)). Ces expériences ont montré que cette voie catabolique est impliquée dans la sporulation, un mécanisme nécessaire à la reproduction, chez S. *cerevisiae (Schlumpberger et al., 1997)* ainsi que dans le cycle de développement de l'amibe *Dictyostelium discoideum* et du ver *C. Elegans*. D'autres travaux ont montré que l'autophagie joue également un rôle dans le développement précoce de la Drosophile et de la souris. En effet, chez la drosophile, l'inhibition par ARN interférence (ARNi) du gène *DrAUT1* empêche l'activation de l'autophagie et conduit à la mort de l'insecte durant l'étape de métamorphose (Juhasz et al., 2003). Chez la souris, l'inactivation par ARNi du gène codant Bécline-1 est responsable d'un arrêt précoce du développement de l'embryon qui pourrait être dû à un défaut au niveau de l'endoderme viscéral (Yue et al., 2003).

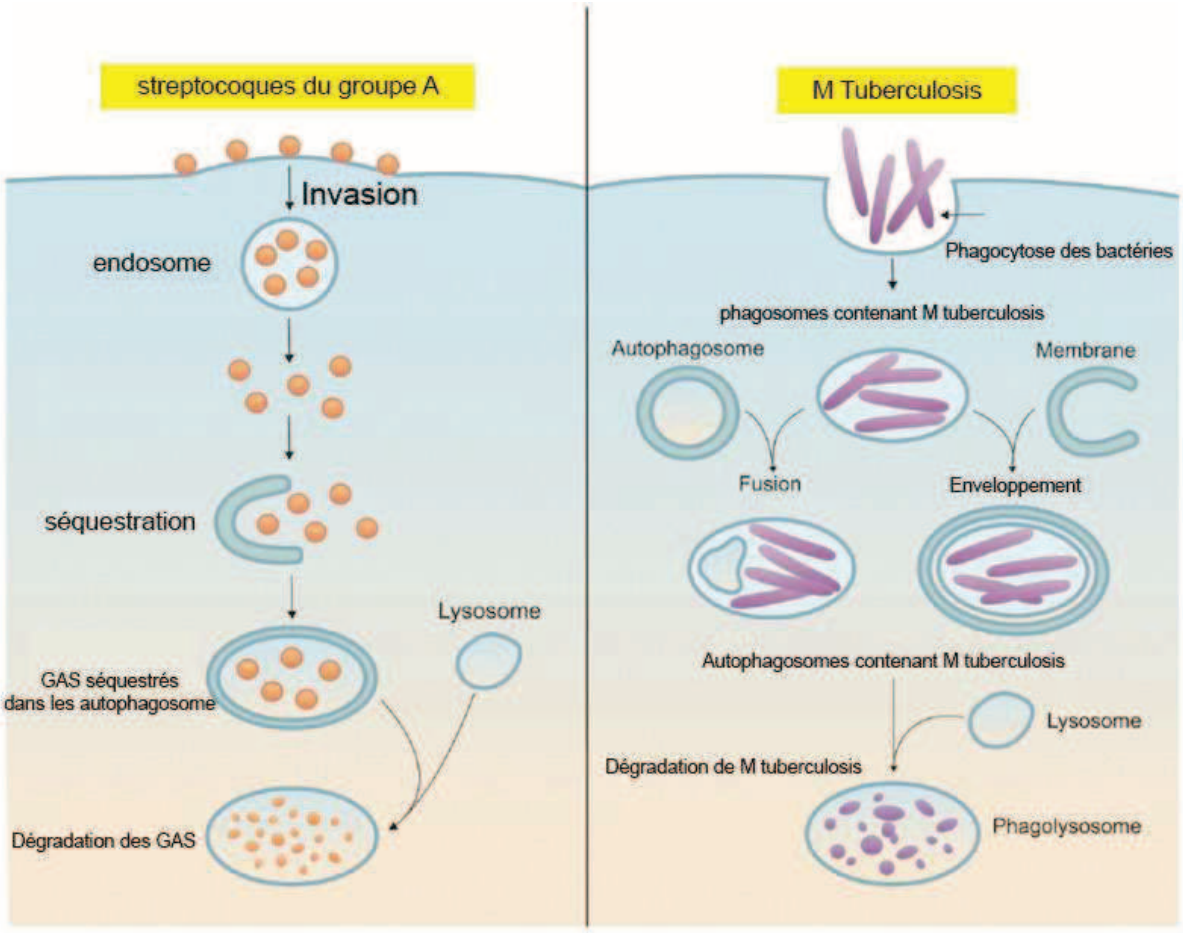


Figure 39 : Elimination des streptocoques du groupe A (GAS) et de M Tuberculosis par autophagie. (D'après B. Levine, 2005). Les GAS pénètrent dans le cytoplasme de la cellule infectée et sont séquestrés au sein d'autophagosomes. Ils seront dégradés par les hydrolases présentes dans les autolysosomes. M Tuberculosis est quant à lui d'abord phagocyté. Plusieurs hypothèse ont été émise afin d'expliquer la séquestration de cette bactérie dans les autophagosomes. Celle-ci pourrait être due à la formation d'une membrane d'isolation enveloppant les phagolysosomes ou pourrait être issue d'une fusion entre un autophagosome et un phagolysosome. Les autophagosomes contenant M Tuberculosis fusionnent ensuite avec les lysosomes et la bactérie est dégradée.

L'autophagie constitue un mécanisme de défense cellulaire en permettant la dégradation de pathogène lors de l'immunité innée. Ce processus permet donc d'éliminer certaines bactéries intracellulaires comme les streptocoques du groupe A ou la bactérie Mycobacterium tuberculosis (Nakagawa et al., 2004) (Figure 39). Il protège également les cellules des toxines produites par certains pathogènes comme Bacillus anthracis (Tan et al., 2009) ou Helicobacter Pilori (Terebiznik et al., 2009). Toutefois certaines bactéries, comme *Shigella flexneri,* mettent en place des stratégies pour échapper à l'autophagie. En effet, cette dernière sécrète un facteur, nommé IcsB, capable d'inhiber l'induction de cette voie catabolique. Les bactéries *Brucella abortus* et *Legionella pneumophila* peuvent, quant à elles, inhiber la maturation des autophagosomes en empêchant leur fusion avec les lysosomes.

Comme indiqué précedemment, l'autophagie est également impliquée dans les mécanismes de défense immunitaire mis en place lors d'infections virales. Ce mécanisme permet notamment de limiter la réplication virale et confère ainsi une protection à la cellule infectée. Toutefois les virus ont également développé des stratégies afin d'inhiber l'autophagie ou de la détourner à leur profit. Nous avons déjà vu que le virus HSV-1 est capable de contourner l'autophagie grâce à la protéine ICP34.5. Une autre étude a montré que le cytomégalovirus humain (HCMV) pouvait également prévenir ce processus en inhibant la formation des autophagosomes dans des fibroblastes primaires humains (Chaumorcel et al., 2008) et en activant la voie mTOR. Le virus du sarcome de Kaposi (Kaposi's sarcomaassociated herpesvirus, KSHV) et le virus murin γ-herpes-68 (γHV-68) codent pour une protéine homologue de Bcl-2 (viral Bcl-2, vBcl-2). Ces protéines virales, tout comme la protéine Bcl-2 cellulaire, interagissent directement avec Bécline-1, permettant ainsi d'inhiber l'autophagie (Ku et al., 2008; Sinha et al., 2008). A l'inverse certains herpèsvirus peuvent induire l'autophagie. Les travaux de Lee et Sugden montrent que la protéine LMP-1 de l'EBV peut induire l'autophagie afin de réguler son expression (Lee and Sugden, 2008). Lorsque le niveau de LMP-1 est faible, les cellules présentent un grand nombre d'autophagosomes et se trouvent dans un état d'autophagie précoce. En revanche, lorsque le niveau de LMP-1 est élevé, il y a accumulation d'autolysosomes. Par ailleurs, lorsque l'autophagie est inhibée, suite à une diminution de l'expression de Bécline-1 et Atg7 par siARN, la LMP-1 s'accumule, produisant ainsi un arrêt de croissance cellulaire et une diminution de la survie. Il semblerait donc que l'autophagie soit nécessaire à la régulation de l'expression de la LMP-1 dont le niveau est déterminant pour la survie optimale et la prolifération des cellules infectées par EBV.

Une autre étude a montré que le VZV, un membre de la sous famille alpha des herpèsvirus, induit l'autophagie par un mécanisme qui reste inconnu à ce jour (Takahashi et al., 2009).

L'autophagie semble également être impliquée dans l'immunité acquise. Le groupe de Munz a montré en 2005, que la protéine EBNA-1 d'EBV pouvait être transférée dans des autophagosomes et présentée sur des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (Paludan et al., 2005). Il est pourtant admis que les molécules du CMH de classe II présentent les antigènes extracellulaires dégradés par les lysosomes et que les molécules de CMH de classe I présentent des antigènes cytoplasmiques et nucléaires dégradés par le protéasome. Les travaux du groupe de Munz montrent donc que l'autophagie permet d'aller à l'encontre des lois fondamentales de la présentation antigénique en autorisant la présentation de protéines virales endogènes sur des molécules du CMH de classe II.

L'autophagie est donc fortement impliquée au sein de nombreuses fonctions physiologiques fondamentales pour la cellule. Sa dérégulation est associée à plusieurs pathologies neurodégénératives, inflammatoires ou malignes.

e) Pathologies associées à l'autophagie

L'autophagie est impliquée dans plusieurs maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, d'Alzheimer et de Huntington. Ces maladies sont caractérisées par la présence d'une accumulation de protéines intracytoplasmiques mutées ou toxiques qui s'agrègent dans les neurones, conduisant ainsi à la mort de ces cellules nerveuses. On distingue ainsi la présence d'agrégats d'α–synucléine pour la maladie de Parkinson, d'agrégats de polyglutamine pour la maladie de Huntington et d'agrégats de β-amyloïde et de protéine Tau dans le cas de la maladie d'Alzheimer. En condition normale, l'autophagie permet l'élimination de ces agrégats qui nuisent au fonctionnement des neurones. Chez les malades, un défaut d'exécution de l'autophagie serait à l'origine de la neurotoxicité observée. En effet, une accumulation d'autophagosomes, due à une inhibition de leur fusion avec les lysosomes, est observée dans le cerveau des patients atteints de maladies neurodégénératives (pour revue : (Cheung and Ip, 2011)). Il a été montré, dans le cas de la maladie de Huntington, qu'un traitement par la rapamycine diminue cette agrégation de protéines ainsi que la toxicité neuronale associée (Ravikumar et al., 2004).

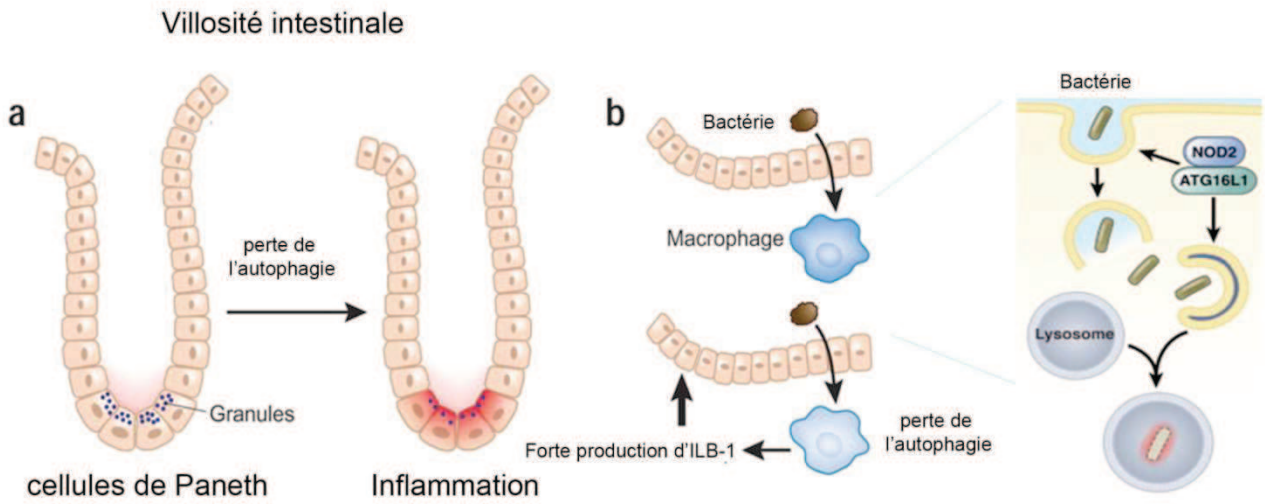


Figure 40 : Implication de l'autophagie dans la maladie de Crohn. (Adapté de T. Yano and S. Kurata, 2009 et de CR. Homer, 2010). **(a)** Les cellules de Paneth, présentes au niveau des villosités intestinales, contiennent des granules capables de sécréter des peptides anti-microbiens**. (b)** Les récepteurs cytoplasmiques Nod1 et Nod2 induisent l'autophagie lors d'une infection microbienne en interagissant avec ATG16L1 au site d'entrée des bactéries, permettant ainsi de séquestrer ces pathogènes au sein des autophagosomes. Le défaut d'autophagie au niveau des cellules de Paneth est associé à une diminution du nombre de granules et à une production massive d'ILβ-1, favorisant ainsi l'inflammation intestinale.

Un défaut d'autophagie peut également être responsable d'atrophies musculaires et de myopathies. Les muscles cardiaques et squelettiques sont des tissus qui ont la capacité de s'adapter et de se remodeler en condition de stress. L'autophagie semble impliquée dans ce processus en permettant notamment l'élimination de produits toxiques (ERO) générés dans les cellules musculaires en condition cataboliques, lors d'un exercice physique par exemple. De nombreux autophagosomes ont été retrouvés dans les muscles des patients atteints de dystrophies musculaires et de myopathies. Il a donc été suggéré qu'un défaut de maturation de ces derniers pourrait contribuer à l'apparition de ces maladies (Malicdan et al., 2008; Pasquali et al., 2010). Toutefois, le rôle de l'autophagie dans ces pathologies n'est pas clairement établi et on ne sait toujours pas si ce processus fait partie des mécanismes inducteurs de la dégénérescence musculaire ou est au contraire promoteur de leur survie. Une étude réalisée *in vivo* a récemment montré que le traitement de souris atteintes de dystrophie musculaire par la rapamycine augmentait la mort neuronale favorisant ainsi la dégénérescence musculaire et la progression de la maladie. Ces données suggèrent donc que l'autophagie semble être un mécanisme protecteur et que son inhibition contribue à la mort par apoptose des neurones (Zhang et al., 2011).

L'autophagie est également impliquée dans certaines pathologies inflammatoires comme la maladie de Crohn (MC), une maladie inflammatoire chronique de l'intestin. En effet, une centaine de gènes de susceptibilité aux maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) ont été identifiés, notamment par la cartographie d'études d'association sur le génome entier (Whole Genome Association Studies, WGA). Un polymorphisme au niveau des gènes *ATG16L1*, un gène impliqué dans l'autophagie, et *Nod2* a ainsi été retrouvé chez les patients atteints de MC. Une étude publiée en 2009 a montré que, les récepteurs cytoplasmiques Nod1 et Nod2 induisent l'autophagie lors d'une infection microbienne en interagissant avec ATG16L1 au site d'entrée des bactéries, permettant ainsi de séquestrer ces pathogènes au sein des autophagosomes (Figure 40). Dans les cellules homozygotes pour la mutation de *Nod2* associée à la MC, la formation d'autophagosomes dirigés contre les bactéries intracellulaires est diminuée. Ces résultats suggèrent que la dérégulation de la voie Nod2/ATG16L1, impliquée dans l'induction de l'autophagie, pourrait favoriser la survenue de la MC (Travassos et al., 2010). De plus, un travail récent a montré que la baisse d'expression du gène *ATG16L1* affecte la fonction anti-microbienne des cellules de Paneth dans l'intestin de souris (Cadwell et al., 2008) (Figure 40). Ces résultats sont très intéressants puisque des altérations similaires au niveau de ces cellules ont été observées dans des biopsies d'intestin de patients atteints de MC (Cadwell et al., 2008).

Ces données suggèrent fortement un défaut d'autophagie dans cette pathologie dont les conséquences sont, d'une part, l'absence d'élimination des bactéries qui ont été internalisées dans les cellules épithéliales de l'intestin et, d'autre part, l'altération des fonctions antimicrobiennes des cellules de Paneth, conduisant ainsi à la présence d'une réaction inflammatoire.

Il existe également une relation étroite entre l'autophagie et la progression tumorale. Les premières observations suspectant un rôle de l'autophagie dans le cancer ont été réalisées il y a environ 30 ans et ont montré que les cellules cancéreuses présentaient en général une capacité autophagique plus réduite que les cellules normales (pour revue : (Levine, 2007)). Les nombreux travaux effectués depuis ont permis de renforcer ce lien, notamment suite à la découverte du contrôle moléculaire de l'autophagie par des gènes suppresseurs de tumeurs et des oncogènes (pour revue : (Lorin et al., 2008)). Toutefois, le rôle de l'autophagie dans le cancer reste encore très controversé et dépend des modèles et des systèmes utilisés. Certaines études ont montré que ce processus pouvait avoir un rôle de suppresseur de tumeur, notamment grâce à son implication dans la prévention des dommages induits à l'ADN. En effet, des travaux réalisées dans des conditions de stress métabolique ont montré que l'inhibition de l'autophagie (par inactivation des gènes *Bécline-1* et *atg5)* augmente les dommages à l'ADN ainsi que l'instabilité chromosomique des cellules, provoquant ainsi une amplification génique et une accélération de la progression tumorale. D'autres études ont montré que des délétions monoalléliques du gène codant pour Bécline-1 sont fréquemment observées dans des tumeurs du sein, de l'ovaire et de la prostate (40 à 70 % des cas) (Aita et al., 1999; Gao et al., 1995; Russell et al., 1990). De plus, la réintroduction du gène codant pour Bécline-1 dans des cellules de tumeurs mammaires restaure leur capacité autophagique et inhibe leur pouvoir tumoral (Liang et al., 1999). Enfin, des expériences réalisées *in vivo* ont montré que l'invalidation mono-allélique du gène codant pour Bécline-1 chez la souris conduit au développement spontané de tumeurs dans plusieurs tissus (Yue et al., 2003). Ces résultats suggèrent que Bécline-1 pourrait être considérée comme un suppresseur de tumeur et que la diminution de son activité contribuerait au développement de cancers.

Bien que ces nombreuses études plaident en faveur du rôle suppresseur de tumeur de l'autophagie, d'autres données de la littérature montrent que l'autophagie peut également participer à progression tumorale et à la résistance des cellules malignes à l'apoptose. C'est notamment le cas des cellules tumorales exposées à des situations de stress métabolique. Les tumeurs solides subissent fréquemment ce genre de stress du fait de leur faible vascularisation qui limite l'apport en nutriments et en oxygène.

Le groupe de E. White a récemment montré, dans des modèles *in vivo*, que l'autophagie agit comme un mécanisme de survie des cellules tumorales localisées dans des régions hypoxiques, en permettant le maintien du métabolisme et de l'énergie nécessaire à leur survie (Mathew et al., 2009). Ainsi l'autophagie pourrait avoir un double rôle dans la progression tumorale. Dans les phases précoces, elle permettrait de restreindre la progression tumorale en limitant la prolifération cellulaire et les dommages à l'ADN. En revanche, lorsque la tumeur est établie mais que sa vascularisation est encore restreinte, elle favoriserait, au contraire, la survie des cellules tumorales.

f) Stratégies thérapeutiques fondées sur l'autophagie en cancérologie

Le rôle de l'autophagie a également été évalué dans le contexte des thérapies anticancéreuses. De nombreux traitements tels que le tamoxifène, la rapamycine, les analogues de la vitamine D ou l'étoposide, induisent l'autophagie dans les cellules tumorales. De multiples études ont montré que, selon le contexte cellulaire et le traitement utilisé, l'autophagie induite par ces traitements pourrait favoriser la mort des cellules ou, au contraire, jouer un rôle cytoprotecteur (pour revue : (Moretti et al., 2007)). Ainsi, une étude, réalisée chez des souris présentant des lymphomes induits par la surexpression de l'oncogène *c-Myc*, a montré que la résistance de certaines cellules à l'apoptose induite par p53 ou par des agents alkylants était due à une induction de l'autophagie. Les auteurs ont également montré que l'inhibition de l'autophagie, par un agent chimique comme la chloroquine, qui inhibe la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes, ou par des ARN interférents dirigés contre le gène *Atg5*, sensibilisait considérablement ces cellules à l'apoptose (Amaravadi et al., 2007). L'efficacité des composés capables d'inhiber l'autophagie comme la chloroquine ou la 3-méthyladénine est donc évaluée en cancérologie, en particulier lorsque cette voie catabolique constitue un mécanisme de résistance des cellules tumorales. De nombreuses études visent donc à tester le potentiel thérapeutique d'une association entre un traitement anti-cancéreux et un inhibiteur de l'autophagie (Livesey et al., 2009).

A l'inverse, des travaux réalisés dans des cellules de carcinomes mammaires ont montré que certains agents utilisés en chimiothérapie comme le tamoxifène et la vitamine D, peuvent induire une mort de type autophagique, indépendante des caspases (Hoyer-Hansen et al., 2005; Hwang et al., 2010). Certains composés ciblant l'apoptose, comme ABT-737 induisent également l'autophagie dans différentes lignées de cellules tumorales, en déstabilisant notamment l'interaction inhibitrice entre le domaine BH3 de Bécline-1 et la protéine Bcl-2 (Malik et al., 2011).

Ainsi, les différents inhibiteurs des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 peuvent induire simultanément l'apoptose et l'autophagie au sein des cellules, soulignant ainsi la présence de mécanismes communs dans la régulation de ces deux voies.

3. Mécanismes communs de régulation de l'autophagie et de l'apoptose

Une des particularités de l'autophagie tient au fait que ce mécanisme cytoprotecteur peut être également impliqué dans la mort cellulaire. Cette mort autophagique est indépendante de la voie des caspases et est caractérisée par une accumulation de vacuoles d'autophagie dans la cellule. Elle intervient principalement au cours du développement embryonnaire des organismes pluricellulaires mais peut également survenir en réponse à un stress ou dans un contexte pathologique. La distinction entre les deux types de mort, par apoptose (type 1) ou par autophagie (type 2), n'est pas toujours bien définie puisque l'autophagie peut contribuer dans certaines circonstances au déclenchement de l'apoptose. En effet, certains travaux ont montré que l'autophagie est impliquée dans la mort cellulaire lorsque les cellules présentent un défaut d'apoptose. Une étude, publiée dans *Science* en 2004, a proposé un modèle selon lequel l'inactivation de la caspase 8, par l'inhibiteur de caspase z-VAD, induisait une mort autophagique dépendante des protéines Atg7 et Bécline-1, par l'intermédiaire d'une voie de signalisation impliquant les MAPKinases JNK, c-Jun, MKK7 et la protéine RIP (Yu et al., 2004). Des résultats similaires ont été obtenus la même année lors d'une étude réalisée sur des fibroblastes Bax/Bak$^{-/-}$ traités par l'étoposide ou la staurosporine. En effet, les auteurs ont montré que ce traitement induit la mort autophagique de ces cellules par l'intermédiaire des protéines Atg5 et Bécline-1 (Shimizu et al., 2004). Toutefois, la notion de mort autophagique reste controversée, notamment dans le cadre des traitements anti-cancéreux. Le groupe de G. Kroemer a récemment réalisé une étude sur 1400 composés et a montré que certains d'entre eux induisaient bien l'autophagie dans les cellules tumorales mais que ce phénomène ne conduisait jamais à la mort des cellules (Shen et al., 2012).

Ces résultats apparemment contradictoires peuvent s'expliquer par la difficulté qui peut exister pour distinguer l'apoptose de la mort autophagique. En effet, des caractéristiques apoptotiques et autophagiques peuvent être retrouvées au sein d'une même cellule. De plus, la présence de vacuoles autophagiques est fréquemment observée dans les cellules apoptotiques. De même, certains acteurs de l'apoptose sont également impliqués dans la régulation de l'autophagie, ce qui renforce le lien étroit existant entre ces deux voies cataboliques.

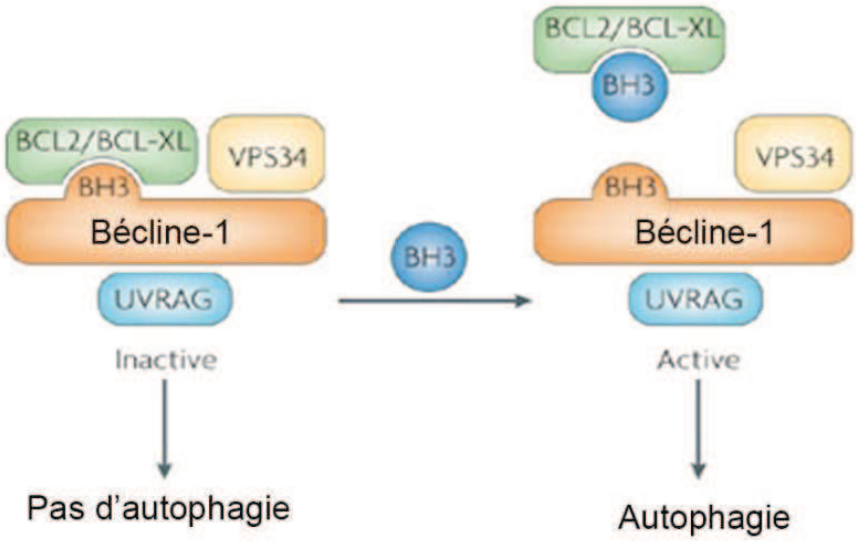


Figure 41 : Rôle des protéines « BH3 only » dans la relation entre Bcl-2 et Bécline-1. (Adapté de Maiuri *et al*, 2007). Lorsque les protéines Bcl-2/Bcl-xL sont liées à Bécline-1, l'autophagie ne peut pas avoir lieue. La fixation des protéines « BH3 only » ou des « BH3 mimetics » sur Bcl-2/Bcl-xL permet de libérer Bécline-1 et d'induire l'autophagie.

Plusieurs études ont montré que l'apoptose et l'autophagie peuvent être induites par les mêmes stimuli tels que les EROs, le céramide, la concentration intracellulaire en calcium, le TNFα, la cytokine TRAIL ou la formation du complexe FADD (Mills et al., 2004; Prins et al., 1998; Scarlatti et al., 2004; Thorburn et al., 2005). Parmi les acteurs communs aux deux mécanismes, on distingue la protéine p62 qui est fortement impliquée dans la dégradation sélective de nombreuses protéines par autophagie. Cette dernière interagit également avec plusieurs protéines qui contribuent à la mort de la cellule par apoptose comme TRAF6, la kinase ERK ou la caspase-8 (pour revue (Moscat and Diaz-Meco, 2009). Le lien entre la caspase-8 et p62 est particulièrement complexe puisqu'il a été montré, d'une part, que p62 joue un rôle crucial dans l'activation de la caspase-8 et d'autre part, que la caspase-8 induit le clivage de p62 en réponse à l'activation des récepteurs à domaines de mort. De plus, une étude récente a montré que la caspase-8 pouvait être dégradée par autophagie (Hou et al., 2010). Ces deux protéines pourraient donc contribuer à maintenir un équilibre entre autophagie et apoptose dans la cellule, pouvant être rompu en cas de stress.

Nous avons précédemment décrit l'existence d'une interaction entre les protéines anti-apoptotique Bcl-2 et Bcl-xL et le domaine BH3 de Bécline-1 (Pattingre et al., 2005). Cette interaction empêche l'activation de l'autophagie et constitue donc un point de contrôle important permettant à la cellule de s'orienter vers la mort ou la survie. En revanche, Bécline-1 n'interagit pas avec les protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 telles que Bax ou Bak (Erlich et al., 2007). Néanmoins, les protéines pro-apoptotiques « BH3 only » intéragissent avec Bcl-2, permettant ainsi de libérer Bécline-1 (Figure 41). L'effet exercé par Bcl-2 sur la régulation de l'autophagie et de l'apoptose dépend de sa localisation cellulaire et de son état de phosphorylation. En effet, la protéine Bcl-2 jouerait un rôle anti-apoptotique lorsqu'elle est localisée à la mitochondrie et inhiberait plutôt l'autophagie lorsqu'elle est située au niveau du RE (Rojas-Rivera et al., 2010). De plus, certains travaux ont montré que la protéine JNK est capable de phosphoryler Bcl-2 au niveau de son domaine BH3 et de déstabiliser son interaction avec Bécline-1, permettant ainsi l'induction de l'autophagie.

Wei *et al* ont proposé un modèle de régulation de l'activité de Bcl-2 qui dépendrait de son état de phosphorylation. Selon ces auteurs, la carence en nutriments induirait la phosphorylation de Bcl-2 par JNK, entraînant sa dissociation de Bécline-1 et l'induction de l'autophagie. Cependant, lorsque cette carence est prolongée, la phosphorylation de Bcl-2 survient au niveau de plusieurs sites, ce qui permet la libération de Bax et l'induction de l'apoptose (Wei et al., 2008).

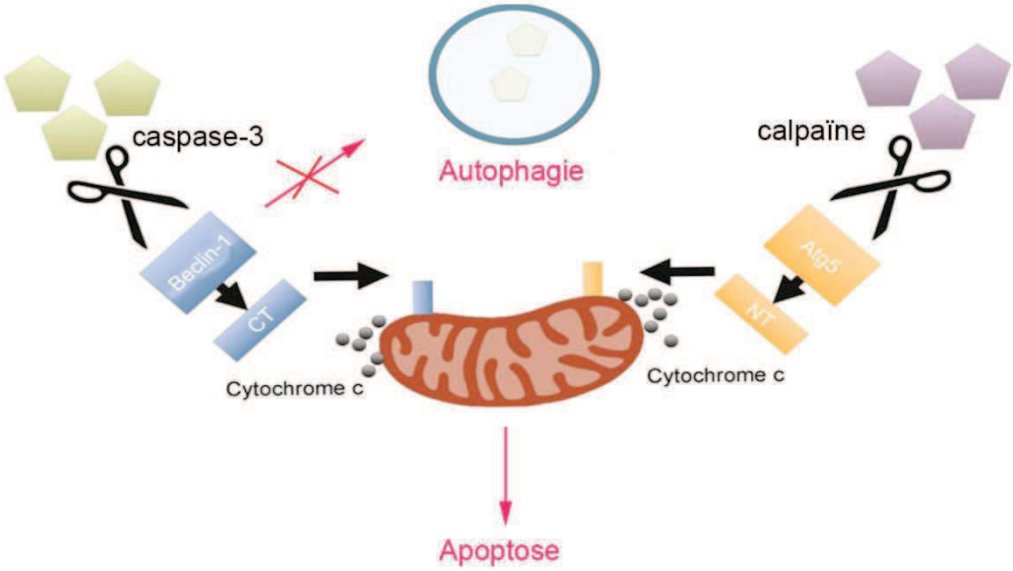


Figure 42 **: Apoptose induite par le clivage de Bécline-1 et d'Atg5.** (Adapté de C. Gordy and C-W. He, 2011). Bécline-1 est un substrat de la caspase-3. Cette caspase effectrice de l'apoptose clive Bécline-1 en 2 fragments, rendant alors impossible son interaction avec Vps34, nécessaire à l'induction de l'autophagie. De plus, le fragment C-terminal de Bécline-1 (CT), généré après clivage, est relocalisé à la mitochondrie et favorise la libération de cytochrome c. La protéine Atg5 joue également un double rôle dans l'autophagie et l'apoptose. En effet, le clivage de cette protéine par la calpaïne va permettre sa relocalisation du cytoplasme vers la mitochondrie, où elle interagit avec Bcl-xL, induisant ainsi la voie intrinsèque de l'apoptose

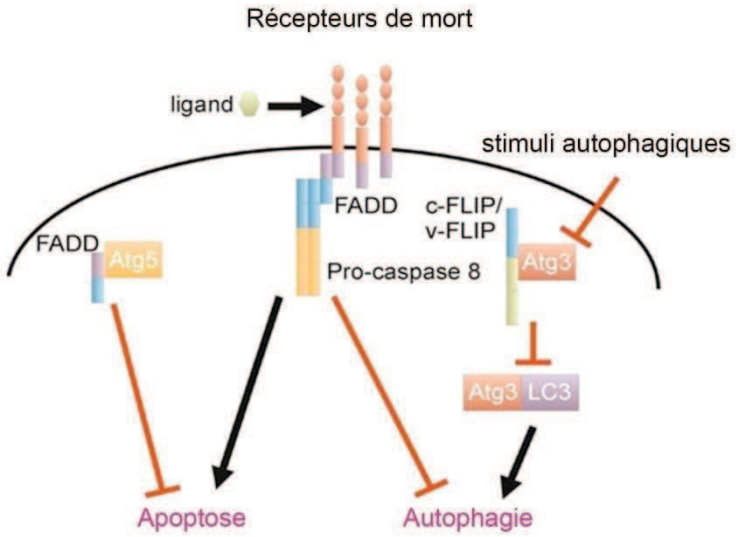


Figure 43 : Apoptose extrinsèque induite par Atg3 et la forme clivée d'Atg5. (Adapté de C. Gordy and C-W. He, 2011). Certaines protéines impliquées dans l'apoptose peuvent réguler négativement l'autophagie. C'est le cas de la protéine c-FLIP et de son homologue viral (v-FLIP) qui peuvent inhiber l'autophagie induite par un traitement avec la rapamycine en empêchant la conjugaison entre LC3 et Atg3. A l'inverse, le clivage d'Atg5 par la calpaïne favorise sont interaction avec le complexe FADD et induit une mort autophagique après traitement avec l'IFNγ.

La protéine NAF-1 (Nutrient deprivation-autophagy factor1) a récemment été décrite comme étant nécessaire à l'inhibition de l'autophagie médiée par Bcl-2. Cette dernière est localisée au niveau du RE, elle ne présente pas de domaine BH3 mais interagit directement avec Bcl-2 afin de stabiliser le complexe formé avec Bécline-1.

Une étude a montré que Bécline-1 est également un substrat de la caspase-3. Cette caspase effectrice de l'apoptose clive la protéine Bécline-1 en 2 fragments (N-terminal et C-terminal), rendant impossible son interaction avec Vps34 nécessaire à l'induction de l'autophagie (Djavaheri-Mergny et al., 2010). De plus, cette étude a montré que le fragment C-terminal de Bécline-1, généré après clivage, est relocalisé à la mitochondrie et favorise la libération de cytochrome c (Figure 42).

La protéine Atg5 joue également un double rôle dans l'autophagie et l'apoptose. En effet, le clivage de cette protéine par la calpaïne va permettre sa relocalisation du cytoplasme vers la mitochondrie, où elle interagit avec Bcl-xL, induisant ainsi la voie intrinsèque de l'apoptose (Yousefi et al., 2006) (Figure 42). Une autre étude a montré que le clivage d'Atg5 par la calpaïne favorise sont interaction avec le complexe FADD et induit une mort autophagique après traitement avec l'IFNγ (Pyo et al., 2005) (Figure 43).

En 2009, l'équipe de Lee *et al* a montré que la protéine c-FLIP et son homologue viral (v-FLIP) pouvait inhiber l'autophagie induite par un traitement avec la rapamycine en empêchant la conjugaison entre LC3 et Atg3 (Lee et al., 2009) (Figure 43).

Certains suppresseurs de tumeurs comme DAPK1 (Death Associated Protein kinase) et p53 sont impliqués dans la régulation de l'apoptose et de l'autophagie. La protéine DAPK est capable de phosphoryler Bécline-1 au niveau de son domaine BH3 et de libérer cette dernière de son interaction inhibitrice avec Bcl-2 et Bcl-xL (Zalckvar et al., 2009). Le rôle de P53 dans la régulation de l'apoptose et de l'autophagie fait l'objet du chapitre suivant.

C. Le suppresseur de tumeur p53

1. Généralités

a) Historique

La protéine p53 a été découverte de manière simultanée par trois équipes (Equipes de L. Crawford, A. Levine et P. May) en 1979, lors d'études menées sur le pouvoir oncogénique de l'antigène T du virus SV40 (Simien Virus 40). Les expériences de co-immunoprécipitation réalisées à cette époque montraient que cet antigène interagissait avec une protéine cellulaire de 53 kDa qui fut donc appelée p53 (Kress et al., 1979; Lane and Crawford, 1979; Linzer and Levine, 1979). P53 a d'abord été considérée comme un oncogène car une surexpression de cette protéine était observée dans de nombreuses cellules transformées (Eliyahu et al., 1984; Rotter et al., 1983). Ce n'est que quelques années plus tard que son rôle de régulateur négatif de la prolifération cellulaire a pu être mis en évidence. En effet, la plupart des travaux attribuant un pouvoir oncogénique à p53 avait été effectués à partir de cellules présentant une p53 mutée. Ce n'est donc qu'en 1989 que la protéine p53 a été intégrée à la famille des « suppresseurs de tumeurs » (Levine, 1989). Cette notion a ensuite été confirmée par plusieurs études effectués *in vivo* qui ont montré que l'invalidation des deux allèles du gène *TP53* chez la souris induisait une susceptibilité à développer des tumeurs (Harvey et al., 1993). De nombreux travaux ont par la suite révélé que cette protéine, induite en réponse à un stress, est un facteur de transcription dont la fonction est de protéger l'intégrité du génome en activant des voies de signalisation conduisant à l'arrêt de cycle cellulaire ou, en cas de lésions plus importantes de l'ADN, à l'entrée en apoptose. P53 a été qualifiée à ce titre, de « gardien du génome » en 1992 (Lane, 1992).

Son activité est principalement régulée par la protéine MDM2, dont il a été montré pour la première fois en 1992 qu'elle pouvait former des complexes avec p53, inhibant ainsi son activité transactivatrice (Momand et al., 1992).

b) Structure du gène et motifs de la protéine

Le gène *TP53*, qui code la protéine p53, est localisé sur le bras court du chromosome 17 (17p13). Ce gène est particulièrement conservé au cours de l'évolution. Il s'étend sur 23 kb et contient 11 exons et 10 introns. L'expression de p53 est constitutive et ubiquitaire.

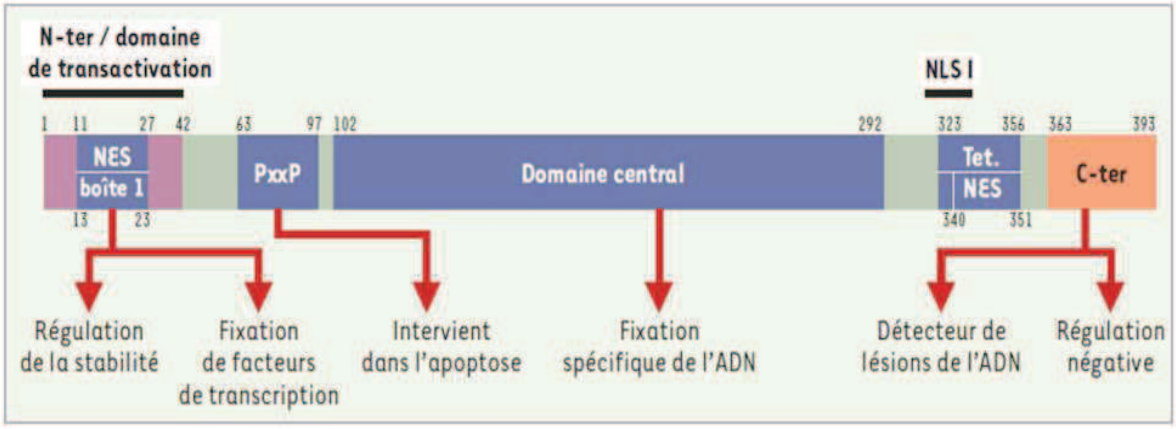


Figure 44 : Structure de la protéine p53. (Extrait de V. Leblanc et P. May, 2002). La protéine p53 est composée de 193 acides aminés. Elle comprend un domaine acide de transactivation (acides aminés 1 à 42), un domaine PxxP riche en Proline (acides aminés 63 à 92), un domaine central de liaison à l'ADN (acides aminés 102 à 292), un domaine de tétramérisation (acides aminés 335 à 356), et un domaine C-terminal de régulation négative de la liaison spécifique à l'ADN (acides aminés 363 à 393). Les acides aminés 300 à 323 et 323 à 351 correspondent à la séquence de localisation nucléaire (NLS) et d'export nucléaire (NES) respectivement.

P53 humaine est une phosphoprotéine de 393 acides aminés, constituée de 5 domaines structuraux hautement conservés (notés de I à V). Le domaine I se situe au niveau de la partie N-terminale de la protéine alors que les domaines II à V se trouvent dans région centrale de p53. Son organisation en domaines fonctionnels est caractéristique de celle d'un facteur de transcription (Figure 44):

- **La région N-terminale** (résidus 1-101) de p53 contient deux domaines de transactivation (résidus 20-42 et 43-63) qui permettent de recruter les protéines impliquées dans la machinerie transcriptionnelle. Parmi ces protéines, on distingue la sous-unité TBP (TATA binding protein), les protéines TAFII40 et TAFII60 (TBP-Associated Factors) et le facteur de transcription TFIID. Certaines protéines, telles que MDM2 (Michael and Oren, 2003), ou l'antigène viral E1B de l'adénovirus (Yew and Berk, 1992), répriment l'activité de p53 en interagissant avec ces domaines de transactivation. La région comprenant les résidus 61-94 constitue un domaine fonctionnel qui semble nécessaire pour permettre à la protéine E8 du virus papilloma humain de cibler et de dégrader p53 (Li and Coffino, 1996).

La région N-terminale contient également une région riche en proline, (entre les résidus 63 et 92) constituée d'une répétition de cinq copies du motif « PXXP », qui correspond à un site de fixation pour les protéines contenant un domaine SH3 (Src-homology 3). Ainsi, le cofacteur transcriptionnel p300, en interagissant avec ce domaine, contrôle l'acétylation de la partie C-terminale de p53 ce qui permet la stimulation de son activité transcriptionnelle (Dornan et al., 2003).

- **La région centrale** (résidus 102 à 292) comporte le domaine de liaison à l'ADN. P53 se fixe spécifiquement à une séquence consensus composées de deux motifs de 10 paires de bases [5'-Pu.Pu.Pu.C.(A/T) (A/T).G.Py.Py.Py-3', (Pu=A/G, Py=T/C)] (Bourdon et al., 1997). Cet élément de réponse est retrouvé dans tous les gènes cibles de p53. La plupart des mutations ponctuelles de la protéine identifiées dans les cellules tumorales, se trouve dans la région centrale de p53, majoritairement au niveau des quatre domaines conservés (II à V). Ces mutations inhibent la fixation de la p53 à son élément de réponse.

L'analyse cristallographique de la région centrale a permis de mieux caractériser l'interaction entre p53 et l'ADN. Ces études ont montré que le domaine de fixation est composé d'une armature de feuillets β qui supportent un ensemble de boucles et d'hélices flexibles, stabilisées par un ion Zn^{2+} (Cho et al., 1994). La capture de ce métal par un agent chélateur provoque un changement conformationnel et inhibe la fixation de la protéine sur l'ADN (Hainaut and Milner, 1993).

Ces travaux ont également montré que les domaines hautement conservés IV et V de p53 interagissent directement avec les petits et grands sillons de l'ADN, alors que les domaines moins conservés sont impliqués dans le maintien de la structure tertiaire de la protéine. De plus, la région centrale de p53 possède une activité 3'-5' exo-nucléase qui lui permet de dégrader l'ADN selon une polarité bien définie (Janus et al., 1999).

➢ **La région C-terminale** (résidus 293-393) contient trois domaines distincts (Figure 44) :

* un domaine de tétramérisation (résidus 335-356), permettant à p53 de s'oligomériser et de se lier à l'ADN avec une affinité optimale (Stenger et al., 1994). Un signal d'export nucléaire (NES2) est également localisé dans ce domaine de tétramérisation (résidus 323- 351)

* trois signaux de localisation nucléaires (NLS) (résidus 300-323, 370-376 puis 380-386)

* un domaine de régulation négative de l'activité transcriptionnelle (résidus 363-393) de p53. Cette région interagit avec l'ADN de manière non spécifique (indépendamment de la séquence consensus). La fixation spécifique sur l'ADN via la partie centrale induirait une forme active de p53, alors que sa liaison non spécifique à l'ADN par l'intermédiaire de la partie C-terminale, induirait une forme inactive (Bayle et al., 1995). D'autres études ont cependant montré que la partie C-terminale de p53 est aussi capable de réguler positivement la transactivation des gènes cibles de la protéine lors d'un stress génotoxique. En effet, cette région faciliterait la formation de complexes stables avec les lésions de l'ADN (délétions, insertions, mésappariements), ce qui pourrait augmenter la stabilité de p53 et stimuler ses propriétés transactivatrices lorsque l'ADN est endommagé (Lee et al., 1995; Reed et al., 1995).

c) Régulation de l'activation de p53

L'activation de p53 peut être modulée à plusieurs niveaux : en augmentant sa synthèse ainsi que sa demi-vie, en favorisant la conversion d'une forme latente en une forme active et enfin, en stimulant sa translocation du cytoplasme au noyau. P53 est principalement régulée par de multiples modifications post-traductionnelles en réponse aux divers stress environnementaux.

***** <u>Régulations traductionnelles de p53</u>

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la stabilisation de l'ARN messager de p53 et dans la régulation de sa traduction (pour revue : (Vilborg et al., 2010)) (Figure 45).

Ainsi l'ARN antisens Wrap53 (WD40-encoding RNA antisense to p53) ainsi que la protéine ribosomale RPL26 se lient à la partie 5' non traduite de l'ARNm de p53 et induisent sa traduction en présence de dommages au niveau de l'ADN. A l'inverse, la nucléoline inhibe la traduction de p53. Tout comme p53, la protéine RPL26 est une cible de MDM2 qui, en se fixant sur cette dernière, induit son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome. La protéine MDM2 semble également jouer un rôle dans la régulation traductionnelle de p53. En effet, une étude a montré que MDM2 peut se fixer au niveau de l'ARNm de p53 grâce à son domaine RING. Cette fixation induit, d'une part, la traduction de p53 et inhibe, d'autre part, la fonction ubiquitine-ligase de MDM2, ce qui permet également de stabiliser le suppresseur de tumeur. La protéine Wig-1, qui est une cible de p53, est à l'origine d'une boucle de rétrocontrôle positive puisqu'elle stabilise l'ARNm de p53 au niveau de la région 3' non traduite. La protéine Hur (Human Antigen R) présente une fonction similaire puisqu'elle se fixe également au niveau de cette région pour stabiliser l'ARNm de p53 en réponse à divers stress environnementaux. Les micro-ARN mir-125a et mir125b sont, au contraire, des régulateurs négatifs de p53. En se fixant à la région 3' non traduite de l'ARNm, ils diminuent le niveau d'expression du suppresseur de tumeur. Enfin, Il semblerait que la protéine p53 soit impliquée dans la régulation de la traduction de son propre ARNm. En effet, il a été montré que la fixation de p53 à la région 5' non traduite de son ARNm inhibe sa traduction en modifiant sa structure secondaire (Mosner et al., 1995).

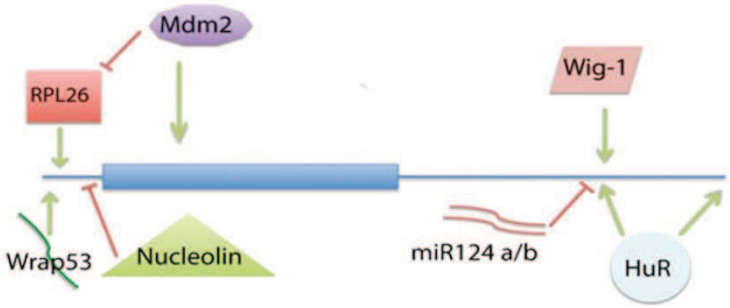


Figure 45 : Régulation post-traductionnelles de l'ARNm de p53. (Adapté de A. Vilborg *et al*, 2010). L'ARN antisens Wrap53 (WD40-encoding RNA antisense to p53) et la protéine ribosomale RPL26 se lient à la partie 5' non traduite de l'ARNm de p53 et induisent sa traduction contrairement à la nucléoline qui l'inhibe. MDM2 peut se fixer sur RPL26 et induire sa dégradation ainsi que sur p53 et activer sa traduction. Wig-1 est une cible de p53 qui stabilise son ARNm. Les micro-ARN mir-125a et mir125b sont, au contraire, des régulateurs négatifs de p53 qui se fixent sur la région 3' non traduite de son ARNm et diminuent son niveau d'expression.

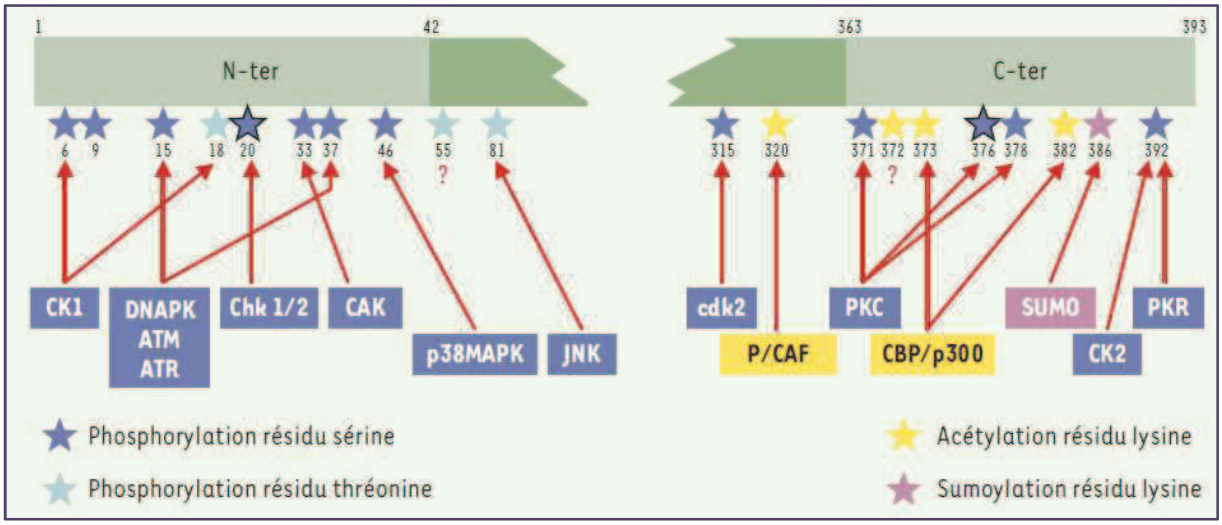


Figure 46 : Modifications post-traductionnelles de p53. (Extrait de V. Leblanc et P. May, 2002). En réponse à un stress génotoxique p53 subit de nombreuses modifications post-traductionnelles qui permettent son activation. Au niveau du domaine N-terminal, les phosphorylations des résidus sérines et thréonines par différentes kinases telles que CK1, ATM, ATR , Chk1 et 2, CAK, la DNAPK et les MAPkinases p38 et JNK contribuent généralement à stabiliser la protéine, par perte d'interaction avec MDM2, et à stimuler l'interaction avec ses co-activateurs transcriptionnels, les histone-acétyltransférases p300 et CBP (Creb Binding Protein). Le domaine C-terminal est également phosphorylé par cdk2, la PKC, CK2 et la PKR. La phosphorylation de l'extrémité C-terminale joue un rôle majeur dans la fixation spécifique de p53 à l'ADN. On retrouve également une acétylation de certains résidus lysine par P/CAF et CBP/p300 qui participe également à l'activation de p53. D'autre part, p53 peut également être sumoylé sur la lysine 386 par SUMO-1, une protéine de la famille des ubiquitines. Cette sumoylation pourrait moduler l'activité transcriptionnelle du suppresseur de tumeur en permettant notamment de le rediriger vers les corps nucléaires.

* Régulations post-traductionnelles de p53

En réponse à un dommage de l'ADN, à l'hypoxie ou à l'action d'agents chimiothérapeutiques, p53 subit de nombreuses modifications post-traductionnelles qui vont favoriser l'accumulation d'une protéine active sur le plan de la transcription (pour revue : (Dai and Gu, 2010)) (Figure 46). Les sites de phosphorylation sont regroupés aux extrémités N- (sérines 6, 9, 15, 20, 33, 37, 46 et thréonines 18, 55 et 81) et C-terminales de la protéine (sérines 315, 371, 376, 378 et 392) tandis que l'acétylation et l'ubiquitinylation ne concernent que son extrémité C-terminale au niveau des lysines 370, 372, 373, 381 et 382.

* La région N-terminale :

Parmi les protéines kinases connues pour phosphoryler p53 figure la DNA-PK (pour DNA-activated protein kinase). Cette sérine-thréonine kinase nucléaire est impliquée dans la réparation des cassures double brins de l'ADN et peut phosphoryler p53 sur les sérines 15 et 37. P53 peut aussi être phosphorylée par d'autres kinases activées par les lésions génotoxiques telles que ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated, phosphorylation sur la sérine 15) et ATR (Ataxia-Telangiectasia Mutated and Rad3-related, phosphorylations sur les sérines 15 et 37). De plus, la sérine 20 de p53 est phosphorylée par Chk1 et Chk2 (Checkpoint Kinase I et II), qui sont elles-mêmes activées par ATM et ATR après un dommage de l'ADN. Les MAP kinases (Mitogen Activated Protein), notamment p38 et JNK sont capables de phosphoryler p53 sur ses résidus 46 et 81, respectivement. Les résidus sérines 6 et 9 de p53 peuvent, quant à eux, être phoshorylés par la kinase CKI (caséine kinase I). Les phosphorylations de p53, retrouvées au niveau de la région N-terminale, contribuent généralement à stabiliser la protéine, par perte d'interaction avec MDM2, et à stimuler l'interaction avec ses co-activateurs transcriptionnels, les histone-acétyltransférases p300 et CBP (Creb Binding Protein).

* La région C-terminale :

Le domaine C-terminal de p53 est phosphorylé par plusieurs kinases comme la kinase dépendante des cyclines (Cdk2) qui agit sur la sérine 315, la PKC (protéine kinase C) qui phosphoryle p53 sur les sérines 376 et 378, la CKII (caséine kinase II) et la PKR (double-stranded-RNA-activated protein kinase) qui permettent la phosphorylation de p53 sur la sérine 392.

La phosphorylation des sérines 315, 376 et 378 augmente la fixation spécifique de p53 à l'ADN alors que celle de la sérine 392 favorise sa tétramérisation. Il apparaît donc que la phosphorylation de l'extrémité C-terminale joue un rôle majeur dans la fixation spécifique de p53 à l'ADN.

Plusieurs études ont montré que la phosphorylation de certains résidus en N-terminal (sérines 15, 33, 37) permet l'acétylation des lysines de la région C-terminale, au moyen du recrutement des protéines p300, CBP et PCAF (Lambert et al., 1998). Ces dernières sont reconnues comme étant des co-activatrices de nombreux facteurs de transcription dont p53. Elles permettraient notamment l'acétylation des histones au niveau des éléments de réponse des gènes cibles de p53 (Barlev et al., 2001). En effet, l'hyper-acétylation des histones conduit généralement à la déstabilisation des nucléosomes et au remodelage de la chromatine, permettant ainsi une meilleure accessibilité à l'ADN pour les facteurs de transcription. Par ailleurs, les protéines CBP et p300 sont également connues pour leur capacité à acétyler directement certains facteurs de transcription, dont p53 (Gu and Roeder, 1997). Ainsi, l'acétylation de la lysine 320 par PCAF ou des lysines 373 et 382 par p300/CBP participe également à l'activation de p53. L'acétylation de p53 semble affecter l'ubiquitinylation induite par MDM2 ce qui permettrait d'augmenter considérablement sa stabilité (pour revue : (Prives and Manley, 2001)).

P53 peut également être sumoylée sur la lysine 386 par SUMO-1, une protéine de la famille des ubiquitines. Cette sumoylation pourrait moduler l'activité transcriptionnelle du suppresseur de tumeur en permettant notamment de le rediriger vers les corps nucléaires (Melchior and Hengst, 2002). Enfin, des travaux ont montré que p53 pouvait être O-glycosylée sur son domaine C-terminal et que cette modification post-traductionnelle favorisait l'interaction avec ses gènes cibles (Shaw et al., 1996).

d) Inhibition de l'activité de p53 par MDM2

Nous avons déjà mentionné, au début de ce chapitre, que l'activité transcriptionnelle de p53 pouvait être réprimée par la fixation de la protéine MDM2 au niveau du domaine N-terminal.

* Structure de MDM2 :

MDM2 est une protéine de 491 acides aminés dont la structure est constituée (Figure 47) :

- d'une région N-terminale comprenant le domaine de fixation à p53, entre les acides aminés 19 et 108. Cette région est suivie par un signal de localisation nucléaire (NLS) et un signal d'export nucléaire (NES) qui permettent à MDM2 de transiter entre le noyau et le cytoplasme (Roth et al., 1998).
- d'un domaine riche en acides aminés acides (entre les acides aminés 237 à 300) (Argentini et al., 2001; Lohrum et al., 2000a).
- d'un domaine comportant des motifs en doigts de zinc (entre les acides aminés 301 et 332), qui lui permettrait d'interagir avec les protéines ribosomales L5 et L11 (Lindstrom et al., 2007).
- d'un domaine « RING-finger » (entre les résidus 433 et 488), qui confère à MDM2 son activité E3 ubiquitine ligase (Fang et al., 2000). Un signal de localisation nucléolaire est également retrouvé au niveau de ce domaine (Lohrum et al., 2000b).

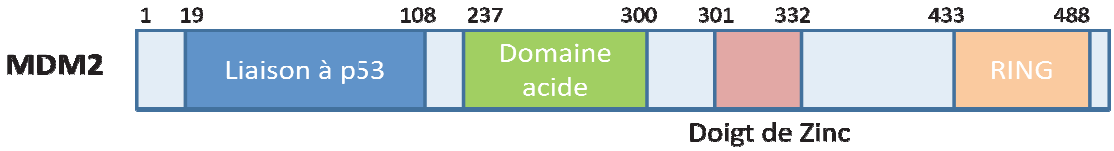


Figure 47 : Structure de la protéine MDM2. (Adapté de K. Linke *et al*, 2008). MDM2 contient une région N-terminale comprenant le domaine de liaison à l'ADN (acides aminés 19 à 108), un domaine riche en acides aminés acides (acides aminés 237 à 300), un domaine comportant des motifs en doigt de zinc (acides aminés 301 à 332) et un domaine « ring finger » qui lui confère sont activité E3 ubiquitine ligase.

* Interaction et régulation de l'activité de p53 par MDM2 :

Plusieurs études ont été réalisées afin d'obtenir la structure cristallographique du complexe entre la région N-terminale de la protéine MDM2 et p53. Ces travaux ont permis d'identifier très précisément les domaines d'interaction entre ces deux protéines. Les 14 acides aminés hydrophobes et aromatiques (Met^{50}, Leu^{54}, Leu^{57}, Gly^{58}, Ile^{61}, Met^{62}, Tyr^{67}, His^{73}, Val^{75}, Phe^{91}, Val^{93}, His^{96}, Ile^{99} et Tyr^{100}) de l'extrémité N-terminale de MDM2 forment une poche dans laquelle vient se loger le premier domaine transactivateur de p53, grâce à des liaisons de Van der Waals. Les trois acides aminés, Phe^{19}, Trp^{23} et Leu^{26}, de p53 sont essentiels à son interaction avec MDM2 (Kussie et al., 1996).

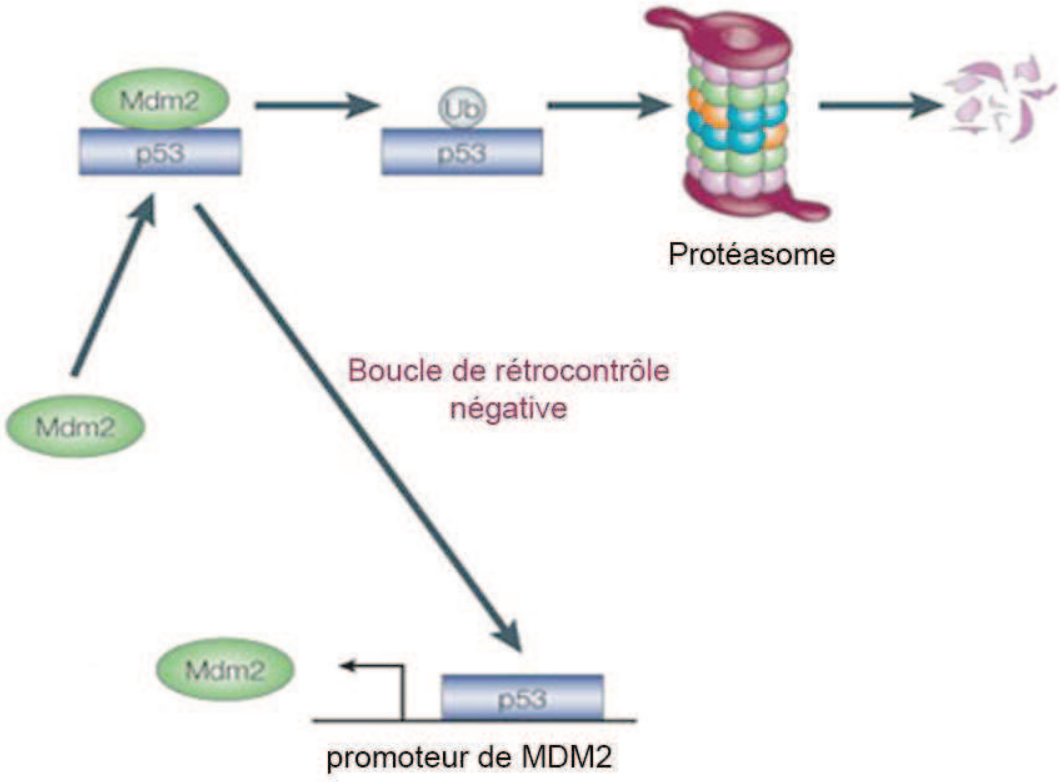


Figure 48 : Rétrocontrôle négatif exercé par MDM2 sur p53. (Adapté de R. Fahraeus , 2005). Le gène codant pour MDM2 est une cible directe de p53. P53 peut donc se fixer sur le promoteur de son régulateur négatif et induire sa transcription. MDM2 interagit alors avec p53 et va permettre, grâce à son activité ubiquitine E3 ligase, l'ubiquitinylation et la dégradation par le protéasome de p53. Ce mécansime constitue une boucle de rétrocontrôle négative.

Ces résidus sont également indispensables à l'activité transactivatrice du suppresseur de tumeur. L'interaction entre p53 et MDM2 inhibe cette fonction de p53 en empêchant la fixation des facteurs associés à TBP, TAFII31 et TAFII70 (Chen et al., 1993). MDM2 empêche également le recrutement de l'histone acétyl-transférase p300 par p53 (Wadgaonkar and Collins, 1999).

MDM2 possède une activité ubiquitine E3 ligase en son extrémité C-terminale qui permet l'ubiquitinylation de p53 et sa dégradation par le protéasome. Des travaux menés *in vitro*, suggèrent que lorsque le niveau d'expression de MDM2 est faible, cette dernière ne peut effectuer qu'une mono-ubiquitinylation de p53 qui ne serait pas suffisante pour induire sa dégradation mais permettrait son export nucléaire. En revanche, lorsque l'expression de MDM2 est forte, elle peut polyubiquitinyler p53 et provoquer sa dégradation (Li et al., 2003).

Il est important de noter que le gène codant pour MDM2 est une cible directe de p53. P53 peut donc stimuler l'expression de son propre régulateur négatif, ce qui constitue une boucle de rétrocontrôle négative (Momand et al., 2000) (Figure 48).

2. Les différentes fonctions de p53

La protéine p53 joue un rôle central dans le maintien de l'intégrité du génome en adaptant la réponse cellulaire en fonction de la nature du stress, de son intensité, de l'environnement cellulaire et de l'importance des lésions provoquées au niveau de l'ADN. Ainsi, p53 régule plusieurs processus physiologiques majeurs tels que l'arrêt de la progression du cycle cellulaire, l'apoptose, l'autophagie, la réparation de l'ADN, la sénescence, l'inhibition de l'angiogenèse ou la différenciation. Nous nous intéresserons principalement au rôle de p53 dans la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose et de l'autophagie.

a) Rôle de p53 dans la régulation du cycle cellulaire

Une régulation du cycle cellulaire est nécessaire afin de contrôler l'état de l'ADN au cours des différentes phases du cycle. Ainsi, lorsqu'un dommage de l'ADN est détecté, l'arrêt du cycle cellulaire donne à la cellule la possibilité de réparer l'ADN endommagé avant la réplication (blocage en G1) ou la mitose (blocage en G2).

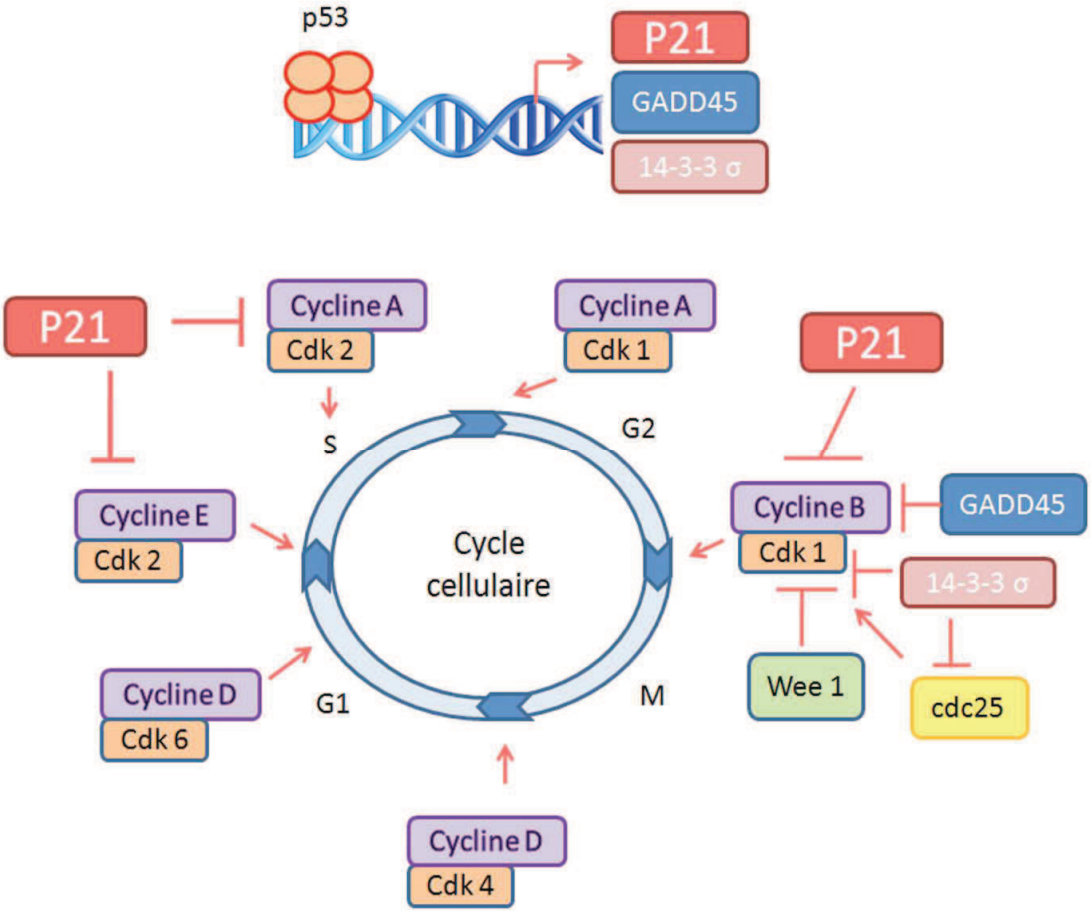


Figure 49 : Rôle de p53 dans l'arrêt du cycle cellulaire. En réponse à un stress génotoxique, p53 va induire l'expression de plusieurs gènes dont les produits sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire tels que p21 ^{WAF1}, GADD45 et 14-3-3 σ. La fonction principale de p21 ^{WAF1} est de réguler l'activité des complexes Cyclines/CDKs. p21^{WAF1} possède une spécificité large puisqu'il inhibe l'activité des complexes Cycline-E-A/CDK2 mais également celle du complexe Cycline B/CDK1, induisant ainsi un blocage des cellules en phase S ou en phase G2. GADD45 peut, quant à lui, se fixer sur CDK1, empêchant ainsi la formation du complexe Cycline B/CDK1 impliqué dans le passage en phase M. Cette interaction est donc à l'origine d'un blocage des cellules en phase G2. La protéine 14-3-3 σ peut induire un blocage du cycle cellulaire en G2, en inhibant l'activité de la CDK1 de deux manières différentes. Elle peut se fixer directement sur cette kinase dans le cytoplasme et la séquestrer au niveau de ce compartiment ou elle peut se fixer sur la phosphatase cdc25 et l'empêcher de déphosporyler la protéine CDK1

L'absence d'arrêt du cycle contribuerait à la propagation de mutations et à l'instabilité génomique et pourrait être favorable à la transformation des cellules.

Le cycle cellulaire est sous le contrôle d'une famille de sérine/thréonine kinases, les kinases dépendantes des Cyclines (CDK), qui régulent l'activité de nombreuses protéines par phosphorylation (pour revue : (Vermeulen et al., 2003)). Le niveau d'expression des CDKs est relativement constant au cours du cycle cellulaire, mais leur activité enzymatique et leur spécificité dépend de leur association avec une sous-unité régulatrice de la famille des Cyclines (Figure 49). Les Cyclines sont synthétisées puis dégradées, par une voie de protéolyse ubiquitine dépendante, à certains moments précis du cycle cellulaire, assurant ainsi un premier niveau de régulation des CDKs. Lorsque le complexe Cycline/CDK est formé, les CDK sont phosphorylées afin d'être activées, ce qui constitue un deuxième niveau de régulation.

L'entrée en G1 est contrôlée par le complexe Cycline D/CDK4-6 qui possède la propriété d'inhiber la protéine Rb par phosphorylation. L'inactivation de cette protéine favorise la libération du facteur de transcription E2F, responsable de l'expression d'un certain nombre de protéines impliquées dans la transition G1/S telles que la Cycline E. Le complexe Cycline E/CDK2 augmente le niveau de phosphorylation de Rb, permettant ainsi de recruter l'ADN polymérase sur le complexe de pré-réplication et d'initier la phase S. Le complexe Cycline B/CDK1 est, quant à lui, impliqué dans la transition G2/M et joue un rôle dans toutes les étapes de la mitose (rupture de l'enveloppe nucléaire, condensation chromosomique, formation du fuseau mitotique, ségrégation chromosomique).

Les CDKs peuvent être inactivées suite à la phosphorylation de leur site actif par une kinase de la famille Wee-1 (HWEE1 et HMYT1). Les phosphatases de la famille Cdc25 ont pour fonction de déphosphoryler le site actif des CDKs afin de les réactiver. Ainsi, Cdc25A active les complexes Cycline E/CDK2 alors que Cdc25B et C activent les complexes Cycline B/CDK1.

Parmi les gènes cibles de p53, certains sont impliqués dans le contôle de la progression du cycle cellulaire. C'est notamment le cas du gène *p21*^{WAF1}. Ce dernier fait partie de la famille des CKI (cyclin-dependent kinase inhibitors) dont la fonction principale est de réguler l'activité des complexes cyclines/CDKs. P21^{WAF1} possède une spécificité large puisqu'il inhibe l'activité des complexes Cycline-E-A/CDK2 mais également celle du complexe Cycline B/CDK1 (Harper et al., 1995) (Figure 49). Il constitue ainsi l'un des principaux médiateurs de l'arrêt du cycle cellulaire en phase S ou en phase G2, en réponse à différents stress génotoxiques.

Par ailleurs, $p21^{WAF1}$ présente, au niveau de sa région C-terminale, un site d'interaction avec la protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). PCNA est impliquée dans la réplication et dans la réparation de l'ADN. $P21^{WAF1}$, en se fixant sur cette protéine, déstabilise le complexe qu'elle forme avec la polymérase δ et inhibe ainsi la réplication de l'ADN (Gibbs et al., 1997). P53 est capable d'induire l'expression d'autres protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire telles que GADD45 et 14-3-3 σ. GADD45 possède la capacité de se fixer sur CDK1, empêchant ainsi la formation du complexe Cycline B/CDK1 impliqué dans le passage en phase M. Cette interaction est donc à l'origine d'un blocage des cellules en phase G2 (Zhan et al., 1999). La protéine 14-3-3 σ peut, quant à elle, induire un blocage du cycle cellulaire en G2, en inhibant l'activité de la CDK1 de deux manières différentes. Elle peut se fixer directement sur cette kinase dans le cytoplasme et la séquestrer au niveau de ce compartiment (Taylor and Stark, 2001), ou se fixer sur la phosphatase Cdc25 et l'empêcher de déphosporyler la protéine CDK1 (Lopez-Girona et al., 1999) (Figure 49). Enfin, 14-3-3 σ peut favoriser le blocage du cycle cellulaire en inhibant l'export de p53 du noyau au cytoplasme (Lee et al., 2006).

Lorsque les dommages au niveau de l'ADN sont trop importants et qu'ils ne peuvent pas être réparés, p53 possède la propriété d'induire l'apoptose. Les mécanismes moléculaires guidant le choix entre arrêt du cycle cellulaire ou apoptose sont encore mal compris.

b) Mécanismes moléculaires influençant la réponse anti-prolifération ou pro-apoptotique induite par p53

Certaines études montrent que le choix entre l'induction de l'apoptose ou de l'arrêt du cycle cellulaire dépend de la présence de divers co-facteurs. En effet, certaines protéines comme NF-κB contribuent à l'induction de l'apoptose suite à l'activation de p53, mais ne participent pas à l'arrêt du cycle cellulaire (pour revue : (Vousden, 2006)). De la même façon, les protéines ASPP1 et 2, de la famille ASPP (Apoptotic-Stimulating Proteins of p53), augmentent spécifiquement la transactivation des gènes codant pour les protéines pro-apoptotiques en se fixant sur le domaine de liaison à l'ADN de p53. En revanche, elles n'ont pas d'effet sur les gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire (Samuels-Lev et al., 2001). Un troisième membre de cette famille, nommé iASPP, déstabilise l'interaction entre ASPP1 ou 2 et p53 et inhibe ainsi l'apoptose (Bergamaschi et al., 2003). La protéine JMY, un cofacteur transcriptionnel de la p300, permet également de stimuler la transactivation de gènes pro-apoptotiques cibles de p53 (Shikama et al., 1999).

D'autres travaux ont permis l'élaboration d'un modèle selon lequel p53 induirait sélectivement ses gènes cibles. Il aurait une forte affinité pour les éléments de régulation des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et une affinité plus faible pour les éléments de réponse des gènes pro-apoptotiques. L'induction de l'apoptose pourrait donc dépendre de l'augmentation du taux intracellulaire et/ou de la présence de modifications post-traductionnelles et conformationnelles de p53 ainsi que de l'action des coactivateurs mentionnés précédemment (Vousden and Lu, 2002).

c) Rôle de p53 dans la régulation de l'apoptose

La protéine p53 possède un rôle déterminant dans l'induction de l'apoptose en réponse à un grand nombre de stress. Cette fonction est en partie due à l'activité transcriptionnelle du suppresseur de tumeur. La capacité transactivatrice de p53 intervient dans les deux voies principales de l'apoptose, la voie des récepteurs à domaines de mort et la voie intrinsèque.

* Rôle de p53 dans l'apoptose induite par la voie des récepteurs à domaines de mort

L'activation de p53 suite un à stress cellulaire peut stimuler l'expression de certains récepteurs à domaine de mort, tels que Fas, DR4 et DR5 (Figure 50). Cette propriété permet d'expliquer le fait que l'induction de l'apoptose par p53 puisse être atténuée par l'inhibition de la caspase-8 (Burns et al., 2001). Une étude a montré que ce suppresseur de tumeur pouvait, d'une part, activer directement la transcription du gène codant pour le récepteur Fas et d'autre part, induire une relocalisation transitoire de ce récepteur, normalement stocké dans le Golgi, à la surface des cellules (Bennett et al., 1998). Un autre gène de la voie extrinsèque, nommé PIDD (P53-induced protein with a death domain) est activé par p53 et servirait de médiateur pour la mise en place de la réponse apoptotique. Plusieurs études ont montré que PIDD pouvait se fixer sur la protéine adaptatrice RAIDD, par l'intermédiaire de son domaine de mort, ce qui permettrait le recrutement et l'activation de la caspase-2. Il est admis que cette dernière peut, d'une part, activer les caspases effectrices de l'apoptose et d'autre part, induire le clivage de Bid. Le complexe ainsi formé par PIDD, RAIDD et la caspase-2 a été appelé PIDDosome. Toutefois, l'activité pro-apoptotique de PIDD a récemment été remise en question suite aux résultats obtenus chez des souris déficientes pour cette protéine. Les cellules des souris « knockout » pour PIDD ne présentent pas de défaut d'activation de la caspase-2 et sont capable d'entrer en apoptose suite à un stress génotoxique (Manzl et al., 2009).

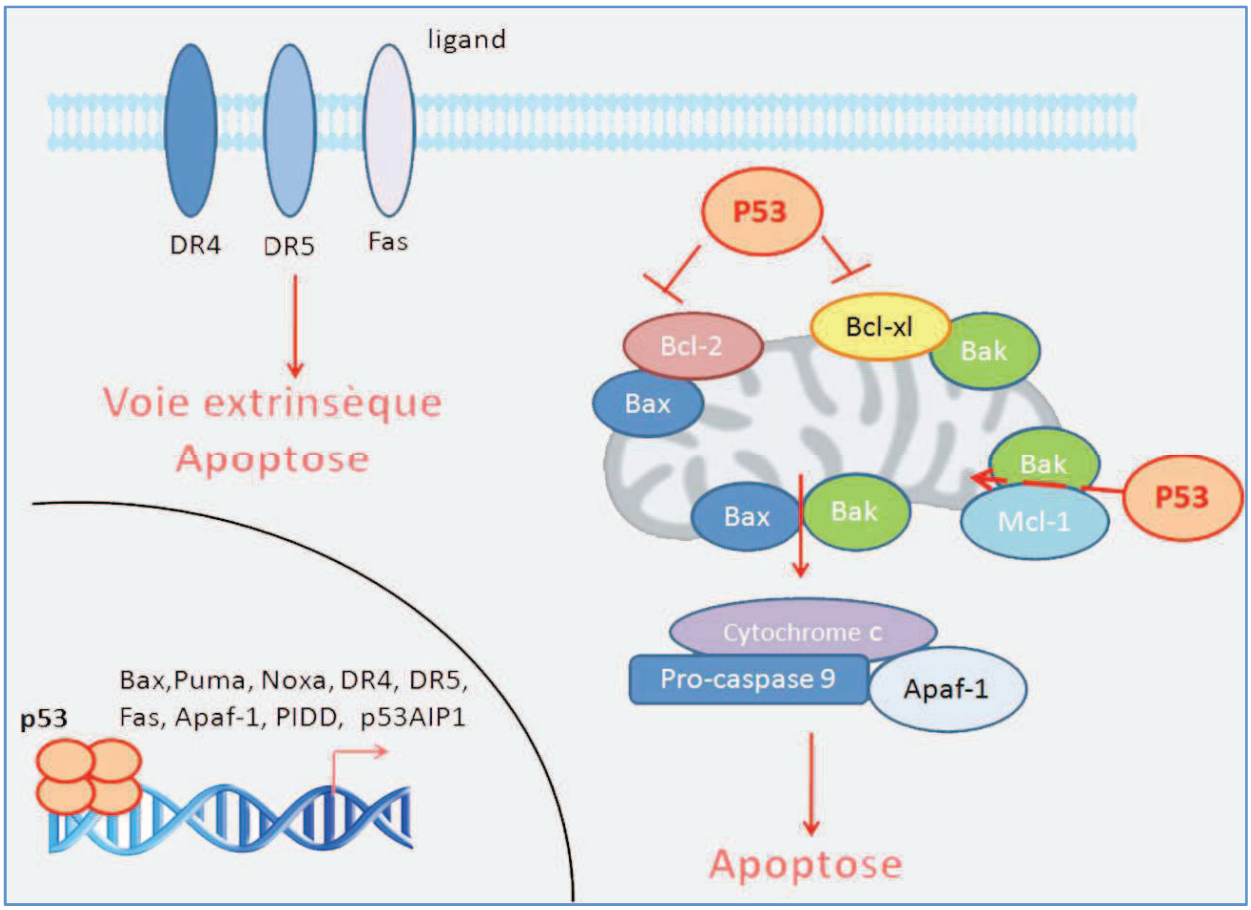


Figure 50 : Rôle de p53 dans la régulation des différentes voies de l'apoptose. P53, en réponse à un stress génotoxique, peut induire l'apoptose de différentes façons. Il peut induire l'expression de plusieurs gènes dont les produits sont des protéines pro-apoptotiques comme Bax, PUMA, NOXA, Apaf-1, PIDD ou p53AIP1. Il peut également induire l'expression des récepteurs à domaine de mort DR4, DR5 et Fas et activer ainsi la voie extrinsèque de l'apoptose. P53 peut également induire l'apoptose indépendamment de son activité transcriptionnelle. Il peut migrer vers la mitochondrie et interagir avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL afin de libérer Bax et Bak. Il peut également se fixer sur Bak afin d'empêcher son interaction avec Mcl-1. P53 peut donc agir comme une protéine « BH3 only » à la mitochondrie et activer la voire intrinsèque de l'apoptose.

Le rôle de PIDD dans l'induction de l'apoptose dépendante de p53 reste donc encore controversé mais certains travaux ont montré que cette protéine pouvait être impliquée dans d'autres fonctions cellulaires telles que l'activation de la voie NF-κB, la réparation de l'ADN ou l'arrêt du cycle cellulaire (pour revue : (Janssens and Tinel, 2012)). P53 peut également activer l'expression de DcR1, un « decoy » récepteur considéré comme étant un inhibiteur des récepteurs à domaine de mort. Ce mécanisme permettrait de moduler la réponse pro-apoptotique induite par p53. (Sheikh and Fornace, 2000).

* Rôle de p53 dans l'apoptose induite par la voie intrinsèque

P53 est fortement impliquée dans l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Ce suppresseur de tumeur est en effet capable de stimuler l'expression de plusieurs gènes codant pour des membres pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2. Bax fut le premier gène identifié comme étant une cible de p53 (Miyashita et al., 1994). D'autres études ont montré par la suite que l'expression des protéines « BH3 only » Puma et Noxa était également régulée par p53 (pour revue (Vousden, 2005)) (Figure 50). D'autres protéines, dont l'expression est stimulée par p53, agissent au niveau de la mitochondrie ou du cytoplasme mais n'appartiennent pas à la famille Bcl-2. Parmi ces protéines, on distingue APAF-1, qui est impliquée dans la formation de l'apoptosome, et p53-AIP1, une protéine mitochondriale capable d'interagir avec Bcl-2 et dont l'expression ectopique est suffisante pour induire l'apoptose de différentes lignées cellulaires transformées (Matsuda et al., 2002).

P53 peut également interagir physiquement avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL au niveau de la mitochondrie afin d'induire l'apoptose en réponse à un stress. Il se comporte alors comme une protéine « BH3 only » et favorise la libération des protéines effectrices de l'apoptose : Bax et Bak (Figure 50). Cette interaction est de nature électrostatique et se fait entre les résidus chargés positivement, présents au niveau du domaine central de p53, et ceux chargés négativement, retrouvés au niveau du domaine BH4 de Bcl-2 et des hélices alpha de Bcl-xL. Le domaine central de p53 peut se fixer également sur la protéine Bak, permettant ainsi de dissocier le complexe Bak/Mcl-1, à l'origine d'une inhibition de l'apoptose. Il semblerait que la mono-ubiquitinylation de p53 par MDM2 dans le cytoplasme soit responsable de sa translocation à la mitochondrie. P53 serait alors pris en charge par l'ubiquitine-protéase mitochondriale HAUSP (pour Herpesvirus Associated Ubiquitin Specific protéase) qui induirait son activation ainsi que ses fonctions pro-apoptotiques (pour revue (Vaseva and Moll, 2009)).

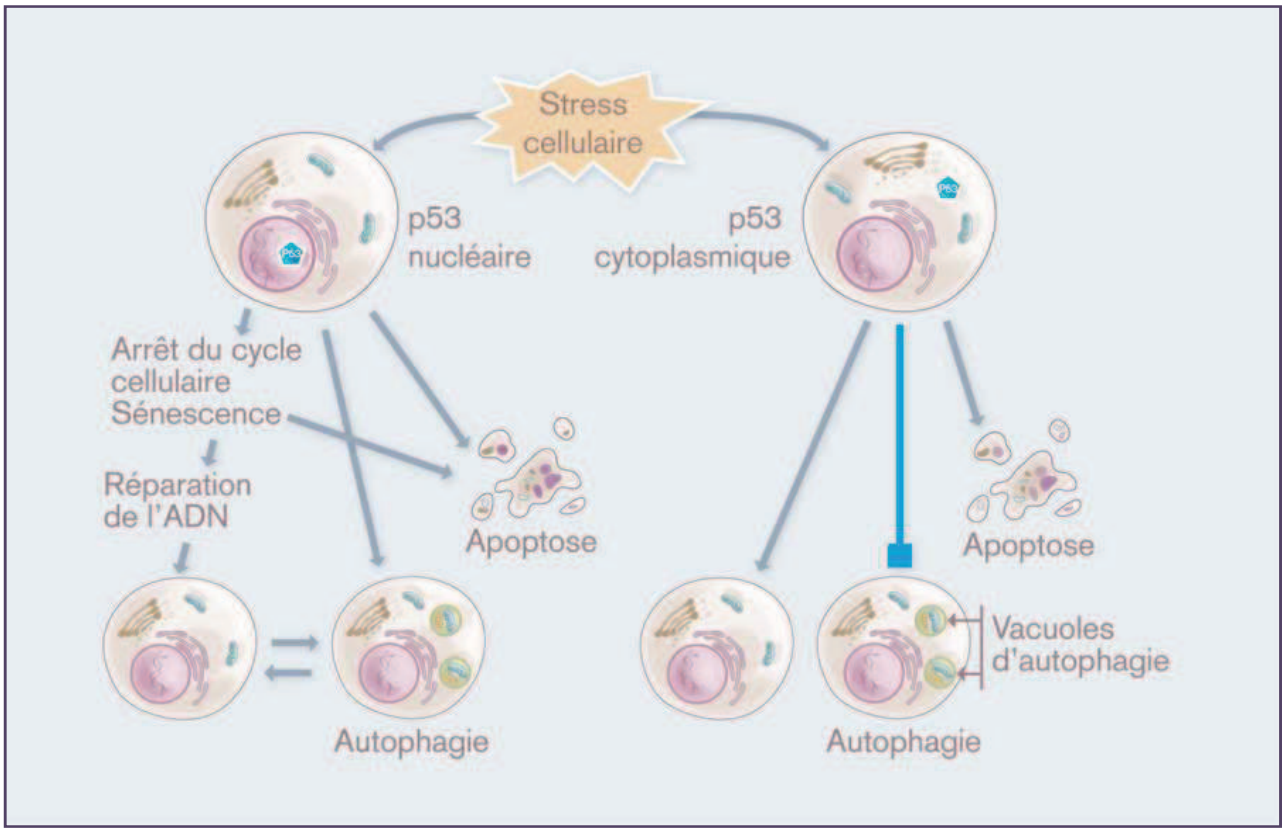


Figure 51 : Double rôle de p53 dans la régulation de l'autophagie. (G. Kromer *et al*, 2008). P53, lorsqu'elle est nucléaire, favorise la transcription de gènes pro-apoptotiques, est capable d'arrêter le cycle et peut agir comme un facteur de transcription induisant l'autophagie. En revanche, lorsque p53 est transloquée dans le cytoplasme, l'autophagie est inhibée. En l'absence de p53 cytoplasmique, ou si elle est dégradée, le processus d'autophagie peut avoir lieu

De manière interessante une autre activité de HAUSP a été décrite. En effet cette protéine peut stimuler la fixation de p53 à son élément de réponse et donc son activité transcriptionnelle (Sarkari et al., 2010). Parallèlement à l'activité exercée au niveau de la mitochondrie, p53 peut également induire la mort par apoptose en agissant sur les protéines de la famille de Bcl-2 dans le cytoplasme. Ainsi, un modèle a été proposé selon lequel p53 serait séquestré dans le cytoplasme par Bcl-xL en absence de stress. En réponse à un stress génotoxique, la fraction nucléaire de p53 activerait l'expression de Puma qui viendrait se fixer sur Bcl-xL, libérant ainsi le suppresseur de tumeur. Ce dernier pourrait alors interagir avec Bax dans le cytoplasme et favoriser son oligomérisation (pour revue (Vaseva and Moll, 2009)).

Nous avons vu, dans le chapitre précédant, que l'apoptose et l'autophagie sont deux processus étroitement liés qui présentent certains mécanismes de régulation communs. P53 fait partie des régulateurs communs aux deux voies.

d) Rôle de p53 dans la régulation de l'autophagie

De nombreux travaux, réalisés ces dernières années, ont montré que p53 pouvait être impliqué dans la régulation de l'autophagie, en conditions normales ou en réponse à différents stress génotoxiques ou métaboliques. Toutefois le rôle du suppresseur de tumeur dans le contrôle de cette voie catabolique est particulièrement complexe et dépend de sa localisation cellulaire et de l'état de la cellule. Plusieurs études ont montré que la protéine p53 inhibe l'autophagie lorsqu'elle est localisée dans le cytoplasme alors qu'elle l'induit lorsqu'elle se trouve dans le noyau (Figure 51).

* Inhibition de l'autophagie par la fraction cytoplasmique de p53

Une étude réalisée par l'équipe de G.Kroemer, a montré que l'inhibition de p53 par des ARN antisens ou par l'utilisation d'un antagoniste pharmacologique, la pifithrine α, provoquait une accumulation d'autophagosomes et d'autolysosomes dans la lignée de cancer du colon HCT116, traduisant ainsi l'induction de l'autophagie dans ces cellules (Tasdemir et al., 2008a; Tasdemir et al., 2008b). Ces résultats ont été retrouvés dans d'autres lignées tumorales (neuroblastome et cancer du col de l'utérus) mais également dans une lignée de fibroblastes humains non transformés.

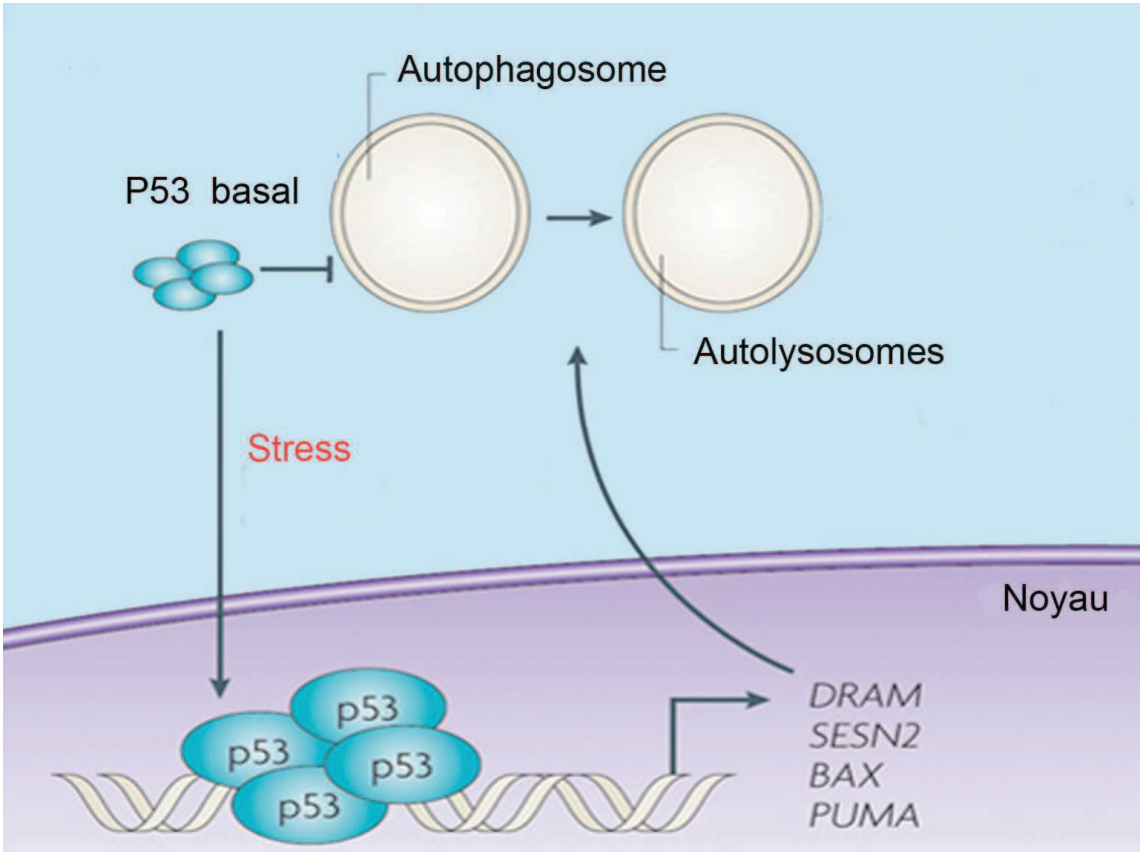


Figure 52 : Différents rôle de p53 dans la régulation de l'autophagie liés à l'état de la cellule. (Adapté de K H. Vousden and K M. Ryan, 2009). En conditions normales, p53 inhibe l'autophagie de façon indépendante de son activité transcriptionnelle. En revanche, p53 contribue à l'induction de cette voir métabolique en réponse à un stress en augmentant l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'autophagie tels que *DRAM* ou *SESN2*.

De plus, les auteurs ont montré que l'inhibition de cep-1, l'orthologue de p53 chez la levure, se traduisait également par une stimulation de l'autophagie dans cet organisme. Les résultats obtenus par cette équipe ont révélé que la neutralisation de p53 induisait la voie canonique de l'autophagie et que les protéines Atg5, Bécline-1, Atg10, Atg12 et hVps34 étaient indispensables pour l'activation de ce processus. Les cellules $p53^{-/-}$ étaient caractérisées, lors de cette étude, par une hyper-phosphorylation d'AMPK et de son substrat TSC2. A l'inverse la cible de mTOR, p70S6K ne présentait pas de phosphorylations, traduisant ainsi une inhibition de l'activité du complexe mTORC1. Ces résultats suggèrent donc que l'induction de l'autophagie observée après l'inhibition de p53 pourrait dépendre de la voie AMPK/mTOR. D'autres expériences, menées au cours de cette étude, ont révélé que la forme de p53 localisée au niveau du RE inhibait l'autophagie alors que la forme nucléaire de ce facteur de transcription ne possédait pas cette propriété. Ces résultats indiquent que dans des conditions normales l'inhibition de l'autophagie exercée par p53 ne dépendrait pas de son activité transcriptionnelle. Enfin, les auteurs ont montré qu'une carence en nutriments induisait l'autophagie dans les cellules de souris $p53^{+/+}$ alors que cette voie catabolique n'était pas activée dans les cellules murines $p53^{-/-}$, ce qui suggère qu'en condition de stress, p53 favoriserait l'activation de l'autophagie. L'ensemble de ces résultats laisse à penser que p53 présenterait un double rôle dans le contrôle de ce processus. En conditions normales p53 serait impliqué dans l'inhibition de l'autophagie, alors qu'en condition de stress métabolique il contribuerait à son induction (Figure 52). D'autres travaux ont, en effet, montré que le suppresseur de tumeur pouvait réguler positivement l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'activation de l'autophagie.

* Activation de l'autophagie en réponse à un stress par la fraction nucléaire de p53

P53 régule l'expression de plusieurs gènes tels que *Sestrine 1* et *2*, *AMPK* et *TSC2*, dont les produits sont tous impliqués dans une voie de signalisation qui conduit à l'inhibition de mTOR, le régulateur négatif de l'autophagie (Figure 52). En effet, p53 peut activer directement la transcription des sous-unités β (AMPK β1 et AMPK β2) de l'AMPK (Feng et al., 2005). En réponse à un stress génotoxique, les protéines Sestrine 1 et 2, peuvent se fixer sur AMPK et l'activer. Cette kinase phosphoryle alors la protéine TSC2, qui va ensuite inhiber l'activité de la protéine mTOR (Budanov and Karin, 2008). Par ailleurs, p53 peut induire l'expression de TSC2 mais cette activation transcriptionelle semble restreinte à certains tissus tels que les muscles squelettiques, le cœur, le foie ou les reins (Feng et al., 2007).

Ces données montrent donc que p53 peut inhiber l'activité de mTOR en réponse à un stress, et ainsi favoriser l'induction de l'autophagie. Une étude, réalisée par Crighton *et al* en 2008, a permis d'identifier un autre gène cible de p53 impliqué dans l'activation de l'autophagie (Crighton et al., 2006). Ce dernier code pour une protéine lysosomale appelée DRAM (Damage-Regulated Autophagy Regulator). P53 augmente l'expression de DRAM en réponse à un stress, favorisant ainsi l'activation de l'autophagie. Par ailleurs, l'inhibition de l'expression de DRAM par des ARN antisens provoque une diminution de la mort cellulaire induite par p53. Ainsi, DRAM serait impliquée à la fois dans l'activation de l'autophagie et dans la mort cellulaire induite par p53, ce qui souligne à nouveau le lien existant entre ces deux voies et le rôle possible de p53 dans le maintien de l'équilibre entre ces deux processus. Une autre étude a récemment montré que DRAM pouvait également être activée, en réponse au 2-methoxyestradiol (2-ME), par JNK et induire l'autophagie et l'apoptose de cellules de sarcomes d'Ewing. De plus, les auteurs ont montré que l'activation de JNK par le 2-ME est médiée par p53, ce qui met en évidence un autre mécanisme de régulation de DRAM par le suppresseur de tumeur (Lorin et al., 2009).

TP53INP1 est un autre gène cible de p53 impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire, la migration et la mort cellulaire. Très récemment il a été montré que TP53INP1 peut être localisée au niveau des autophagosomes et interagir avec LC3 par l'intermédiaire d'un motif LIR (LC3 Interacting Region) identifié en N-terminal de la molécule (Seillier et al., 2012).L'activation de l'autophagie médiée par TP53INP1 permettrait d'induire la mort de cellules d'ostéosarcomes.

Ces résultats illustrent le fait que l'induction de l'autophagie par p53 peut se traduire par la mort des cellules, soulignant ainsi le rôle anti-tumoral de ce mécanisme. Toutefois, d'autres études ont montré que l'induction de l'autophagie par p53 pouvait au contraire provoquer la résistance des cellules tumorales à différents traitements. Ainsi, Amaravadi *et al*, montre, dans un modèle murin de lymphome, que les cellules résistantes à l'apoptose induite par l'activation de p53 présentent un niveau élevé d'autophagie. L'utilisation d'un inhibiteur de l'autophagie restaure la sensibilité de ces cellules à l'apoptose. Ainsi, dans ce modèle, l'autophagie se traduit par une résistance des cellules tumorales aux différents traitements testés, soulignant de nouveau le rôle complexe du suppresseur de tumeur dans la régulation de la survie ou de la mort cellulaire (Amaravadi et al., 2007).

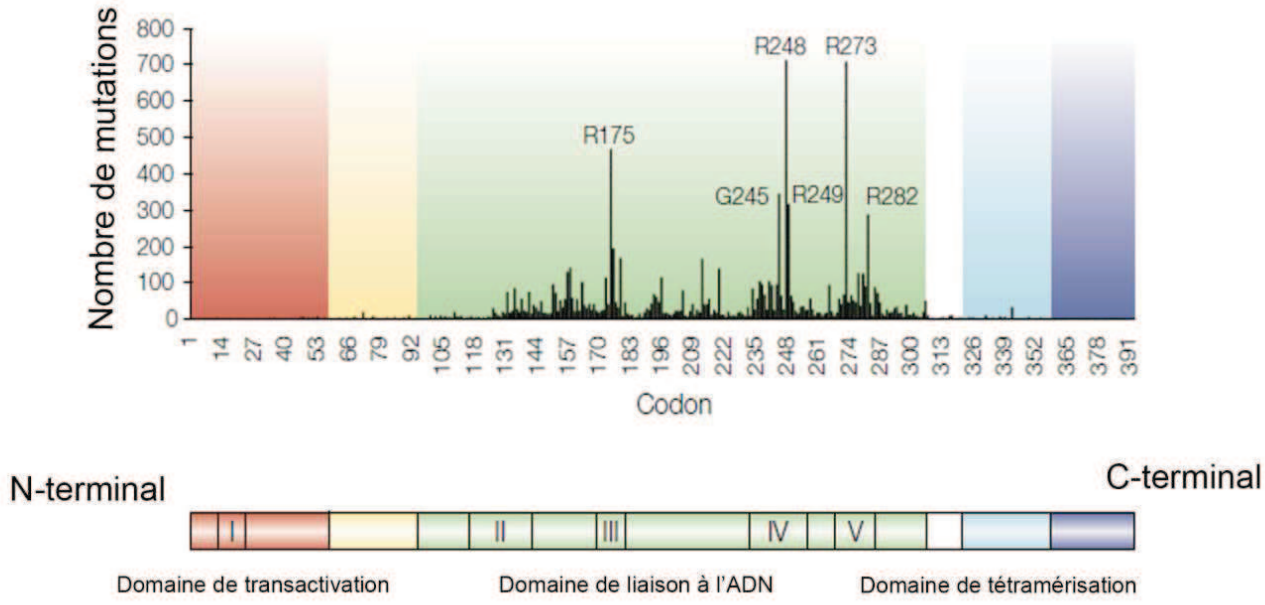


Figure 53 : Mutations de p53. (Adapté de A N. Bullock and A R.Fersht, 2001). La plupart des mutations de p53 observées dans les cancers sont situées au niveau du domaine de liaison avec l'ADN. Au sein de ce domaine, il existe des « points chauds de mutations» (codons 175, 245, 248, 273 et 282) qui sont le siège d'une majorité des mutations observées.

3. Stratégies thérapeutiques fondées sur l'activation de p53 en cancérologie

a) Inactivation de p53 dans les cancers

P53 est inactivée dans un très grand nombre de cancer, essentiellement par mutation mais également par interaction avec certaines protéines virales ou cellulaires.

* Inhibition de p53 par mutations

L'inactivation du gène codant pour p53 est essentiellement due à des mutations ponctuelles (faux-sens, non-sens, insertion/délétion) qui mènent à l'expression d'une protéine mutante dans 90% des cas ou à l'absence de la protéine dans 10% des cas. On distingue des cancers ayant une haute fréquence de mutations comme les cancers de l'ovaire (47%), du colon (43%), de la tête et du coup (42%) du poumon (37%) et du pancréas (37%) ; des cancers avec une fréquence de mutation intermédiaire tels que les cancers du sein (23%), de l'utérus (20%) ou les lymphomes (19%) ; et des cancers ayant une fréquence de mutations plus faible comme les leucémies (11%), les cancers du col de l'utérus (6%) et du rein (11%) (d'après la banque de données IARC TP53, novembre 2010). La grande majorité des mutations observées sont des mutations faux-sens (75%). La plupart d'entre elles sont localisées dans la région correspondant au domaine de liaison à l'ADN de la protéine. Ainsi, la région N-terminale, qui contient le domaine de transactivation, et la région C-terminale, qui contient les principaux sites de régulation, sont rarement affectées (moins de 5 % des cas).Cependant, ce pourcentage peut être sous évalué du fait que, dans un grand nombre de cas, seule la région centrale est analysée. Au sein du domaine de liaison à l'ADN, tous les résidus peuvent constituer des cibles potentielles de mutations. Toutefois, il existe des « points chauds de mutations», les codons 175, 245, 248, 249, 273 et 282 qui représentent près de 30 % des mutations observées (pour revue : (Bullock and Fersht, 2001)) (Figure 53). L'une des conséquences fonctionnelles principalement observée suite à la mutation du gène codant pour p53 est la perte de la liaison spécifique à l'ADN et, en conséquence, de l'activité transcriptionnelle de la protéine. Certaines mutations peuvent conduire à l'expression de protéines présentant des activités dominantes négatives. Dans ce cas, l'oligomérisation de la protéine mutée avec la protéine sauvage peut empêcher la fixation de p53 sur l'ADN et la transactivation de ses gènes cibles (Shaulian et al., 1992).

D'autres modèles montrent que la forme mutante est en compétition avec la forme sauvage pour l'interaction avec les différents cofacteurs. Les mutants de p53 peuvent également se caractériser par un gain de fonction, en induisant l'expression de gènes comme *MDR1* (Multi Drug Résistance), *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor), *c-myc, PCNA* ou *VEGF* (Vascular Endothelial Growth Factor) qui ne sont pas définis comme étant des cibles transcriptionnelles directe de p53 sauvage (Blagosklonny, 2000). La mutation du gène *Tp53* peut se traduire par une stabilisation et une accumulation de la protéine. En effet, la perte de l'activité transcriptionnelle de p53 empêche la transcription de MDM2 ce qui limite sa dégradation (pour revue :(Blagosklonny, 2000)).

Les mutations peuvent être héréditaires ou somatiques. Les mutations héréditaires ou germinales sont fréquemment associées au syndrome de Li-Fraumeni (LFS). Dans ce cas, les membres d'une même famille développent des tumeurs de type sarcomes, cancers du sein ou du cerveau avant l'âge de 45 ans (Frebourg, 1997).

* Inactivation de p53 par interaction avec des protéines virales

P53 peut être inactivée par liaison directe avec certaines oncoprotéines virales telles que l'antigène T de SV40, la protéine E6 des papillomavirus et la protéine E1B des adénovirus. Comme nous l'avons vu au début de ce chapitre, la fixation de p53 à l'antigène T a favorisé la découverte du suppresseur de tumeur en 1979. Cette interaction augmente considérablement la demi-vie et le taux de p53 dans la cellule. L'antigène T se fixe au niveau de la région centrale de p53 empêchant son interaction avec ses séquences cibles (Tan et al., 1986). La protéine E1B 55K de l'adénovirus se lie à la partie N-terminale de p53, inhibant ainsi sa fonction transactivatrice. Elle peut également séquestrer p53 au niveau du cytoplasme (Zhao and Liao, 2003). Enfin, la protéine virale E6 des papillomavirus est connue pour s'associer d'une part à une protéine du système d'ubiquitinylation E6AP (E6-associated protein) et d'autre part à p53. L'interaction entre E6 et p53 conduit à l'ubiquitinylation du suppresseur de tumeur et à sa dégradation par le protéasome (Scheffner et al., 1993).

* Inactivation de p53 par interaction avec des protéines cellulaires

L'activité de p53 peut être inhibée par des mutations ou une diminution de l'expression de certains gènes qui codent pour des régulateurs positifs de cette protéine.

Par exemple la kinase Chk2, qui est responsable de la phosphorylation et de l'activation de p53 en réponse aux dommages à l'ADN, est mutée dans certains cancers comme le carcinome du poumon, du sein, du colon et de l'ovaire ainsi que dans certains sarcomes et lymphomes (pour revue : (Bartek and Lukas, 2003)). Dans certaines lignées de lymphome de Burkitt exprimant une p53 sauvage, le locus *cdkn2a* est délété (Wilda et al., 2004). Ce locus code pour la protéine ARF qui possède la propriété de stabiliser p53 en interagissant avec MDM2 (Kim and Sharpless, 2006).

P53 peut également être inactivée par la surexpression de certains gènes codant pour des régulateurs négatifs de cette protéine tel que :

- l'inhibiteur iASPP surexprimé dans certaines tumeurs mammaires exprimant une p53 sauvage (Bergamaschi et al., 2003).
- la sécurine surexprimée dans certains hépatocarcinomes et cancers du sein (Fujii et al., 2006; Ogbagabriel et al., 2005). Cette protéine, impliquée dans la séparation des chromatides sœur lors de la mitose, est capable de se fixer sur p53 et d'inhiber son activité transcriptionnelle (Bernal et al., 2002).
- le protooncogène MDM2 surexprimé dans de nombreux cancers tels que les carcinomes de l'œsophage (Hsu et al., 2011), les carcinomes mammaires (McCann et al., 1995), les ostéosarcomes (Wunder et al., 1999), les leucémies lymphoblastiques (Hendy et al., 2009) et les carcinomes bronchique (Gorgoulis et al., 1996). Sa surexpression, due à une amplification génique ou à une augmentation de sa transcription ou de sa traduction, peut neutraliser l'activité de p53 (pour revue :(Rayburn et al., 2005)). Notre équipe a montré que certaines lignées de LB porteuses d'une p53 sauvage surexprimaient MDM2 et présentaient une altération de la voie p53 (Capoulade et al., 1998).

L'ensemble de ces données a conduit à attribuer à la perte de la fonction oncosuppressive de la protéine p53 un rôle déterminant de la progression tumorale. Aussi, de nombreuses approches à visée thérapeutique ont été développées dans le but de rétablir ses fonctions anti-tumorales dans les cellules tumorales.

b) Approches de thérapie génique visant à restaurer les fonctions de p53

Du fait de la grande fréquence de mutations retrouvées dans le gène codant pour p53, une approche consistant à restaurer les fonctions du suppresseur de tumeur par l'introduction d'une copie du gène sauvage a été développée.

Les rétrovirus qui ciblent les cellules présentant un index prolifératif élevé, ont d'abord été utilisés comme vecteurs pour la mise en place de thérapies géniques fondées sur p53. Plusieurs équipes ont ainsi montré que l'utilisation de vecteurs rétroviraux permettant l'expression de p53 sauvage, conduisait à une inhibition significative de la croissance des cellules tumorales lors d'études précliniques (pour revue (Roth et al., 1999)). Sur la base de ces observations, une étude clinique de phase I a été réalisée afin de déterminer quelle pouvait être la toxicité liée à l'injection de ces vecteurs rétroviraux chez des patients atteints de cancers du poumon non à petites cellules (NSCLC). Un vecteur rétroviral contenant le gène p53 sauvage sous le contrôle du promoteur de la β-actine a été injecté directement dans la tumeur. Les résultats ont montré que cette approche ne présentait pas de toxicité et qu'elle permettait d'augmenter l'index apoptotique au sein des tumeurs, permettant ainsi d'obtenir une régression tumorale (3 patients sur 7 évalués) ou une stabilisation de la maladie (3 patients sur 7 évalués) (Roth et al., 1996). Cependant, l'expression du transgène n'a pas été retrouvée dans les biopsies réalisées après le traitement.

Les adénovirus de sérotype 5, qui présentent une faible toxicité chez l'humain, ont également été utilisés comme vecteurs afin de développer une approche de thérapie génique fondée sur p53. Contrairement aux rétrovirus, les adénovirus ne s'intègrent pas dans le génome, ce qui permet d'écarter tout risque de mutagenèse insertionnelle dans les cellules infectées. L'Ad5CMV-p53 (Advexin, Introgen Therapeutics Inc. ; Gendicine, Shenzhen SiBiono GeneTch Co. Ltd) est un adénovirus du sérotype 5, dont le génome est délété de la région E1, qui code pour la protéine p53 sauvage sous le contrôle du promoteur CMV (cytomégalovirus). Plusieurs études réalisées *in vitro* ont montré que cet adénovirus recombinant permettait d'induire une expression efficace de la protéine p53 sauvage fonctionnelle capable d'inhiber la croissance cellulaire et de potentialiser l'effet cytotoxique de molécules anticancéreuses dans différents modèles cellulaires. Des expériences réalisées dans des modèles animaux ont confirmé le potentiel thérapeutique de l'Ad5CMV-p53 *in vivo*. Ce dernier a donc été testé lors de multiples essais cliniques réalisés chez des patients atteints de NSCLC.

Les résultats obtenus lors d'essais de phase I et II ont montré que l'Ad5CMV-p53 présentait des effets secondaires modérés (fièvre modérée, douleur au site d'injection) mais qu'il permettait d'induire une stabilisation de la maladie lorsqu'il était utilisé seul ainsi qu'une réponse partielle ou complète lorsqu'il était associé à la radiothérapie (pour revue (Bouchet et al., 2006)). Cet agent a également été évalué dans le cadre du traitement des carcinomes à cellules squameuses de la tête et du cou (HNSCC). Des études de phase I, II et III ont montré qu'il présentait une activité anti-tumorale dans ces cancers, notamment lorsqu'il était utilisé en combinaison avec la radiothérapie. Sur la base de ces résultats, l'Ad5CMV-p53 a reçu une autorisation de mise sur le marché par la SFDA (State Food and Drug Administration of China) en 2003, avec une indication dans le HNSCC, et est ainsi devenu le premier médicament de thérapie génique pour le traitement du cancer. Il a ensuite été testé dans d'autres types de tumeurs (cancers ovariens, glioblastomes, cancers de la vessie, cancers du sein, cancers œsophagiens et mélanomes) mais les résultats ont montré qu'il ne présentait qu'une activité faible à modérée. L'hétérogénéité ou la perte d'expression des récepteurs pour l'adénovirus de sérotype 5 (coxsackie-adenovirus receptor, CAR) et des corécepteurs (intégrines de classes $\alpha v\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$) dans les tumeurs pourrait expliquer de tels résultats. De plus, certains mécanismes (présence de dominants négatifs, dérégulation épigénétique) pourraient également induire une inactivation fonctionnelle du transgène dans les tumeurs.

c) Approches visant à restaurer la fonction de p53 lorsqu'elle est mutée

Nous avons vu que la plupart des mutations de p53 se trouve au niveau de son site de liaison à l'ADN. Ces mutations peuvent soit affecter un acide aminé directement en contact avec l'ADN, soit déstabiliser la structure de la protéine ce qui, dans les deux cas, rend impossible la fixation spécifique de p53 à sa séquence consensus localisée dans la région de régulation de ses gènes cibles. De nombreuses petites molécules chimiques ont été développées afin de restaurer et de stabiliser la structure de ce domaine dans sa conformation active. L'un de ces composés, le CP-31398, stabilise p53 dans sa forme active et favorise la transcription des gènes cibles du suppresseur de tumeur dans des lignées de gliomes présentant une protéine p53 sauvage ou mutée (Foster et al., 1999). Une étude a montré que le CP-31398 induisait la mort des cellules de gliomes mais que celle-ci n'était pas dépendante des caspases (Wischhusen et al., 2003). Un autre travail, réalisé dans une lignée de rhabdomyosarcomes, montre que cette molécule induit une relocalisation de p53 à la mitochondrie, provoquant ainsi une altération du potentiel membranaire mitochondrial, la formation d'ERO ainsi qu'un relargage de cytochrome c.

Le CP-31398 induit donc l'apoptose de ces cellules tumorales *in vitro* mais également *in vivo* chez des souris xénogreffées avec des cellules de rhabdomyosarcomes (Xu et al., 2010).

Quelques années plus tard, l'équipe de VJ. Bykov a effectué un crible sur un grand nombre de molécules afin d'identifier celles capables de restaurer la fonction de p53 dans une lignée dérivée d'un ostéosarcome humain (Bykov et al., 2002). Ils ont identifié une molécule, nommée PRIMA-1, capable de diminuer la survie des cellules de la lignée d'ostéosarcome utilisée pour le crible mais également d'autres lignées tumorales présentant une p53 mutée. PRIMA-1 semble agir en permettant à la protéine p53 mutée de retrouver une conformation proche de celle de la protéine sauvage, ce qui se traduit *in vitro* par une diminution de la prolifération cellulaire et une augmentation de l'expression des gènes cibles du suppresseur de tumeur. Les auteurs ont également montré que ce composé exerce une activité antitumorale *in vivo* et ne présente pas de toxicité lors d'études pré-cliniques réalisées chez des souris xénogreffées avec les cellules d'ostéosarcomes. L'effet de PRIMA-1 a ensuite été confirmé dans de nombreux modèles tumoraux. Ce composé est actuellement en essai clinique de phase I chez des patients atteints de pathologies hématologiques malignes et de cancer de la prostate.

d) Approches visant à inhiber l'activité ubiquitine-ligase de MDM2

De nombreuses stratégies thérapeutiques ont été développées afin d'inhiber l'ubiquitinylation de p53 par MDM2 ainsi que sa dégradation par le protéasome. Ces approches visent soit à inhiber la fonction ubiquitine-ligase de MDM2 soit à déstabiliser les interactions entre le suppresseur de tumeur et son régulateur négatif. Des inhibiteurs spécifiques de l'activité E3 ligase de MDM2 ont été synthétisés (Yang et al., 2005). Ces molécules empêcheraient de façon sélective l'ubiquitinylation de p53, tout en conservant l'auto-ubiquitinylation de MDM2, conduisant ainsi à l'apoptose des cellules tumorales (Lai et al., 2002). Il existe aujourd'hui peu d'études pré-cliniques évaluant ces composés. En effet, ces molécules sont encore peu spécifiques et nécessitent d'être optimisées afin de limiter les effets indépendant de p53. Toutefois, un composé dérivé de la tryptamine, le JNJ-26854165, a été évalué lors d'études *in vivo* et semble présenter une activité anti-tumorale (Chargari et al., 2011a; Smith et al., 2011). Kokjima *et al*, ont montré que cette molécule induisait une apoptose p53-dépendante dans des lignées de leucémies aiguës (LA) p53 sauvage ainsi que dans des cellules primaires de LA.

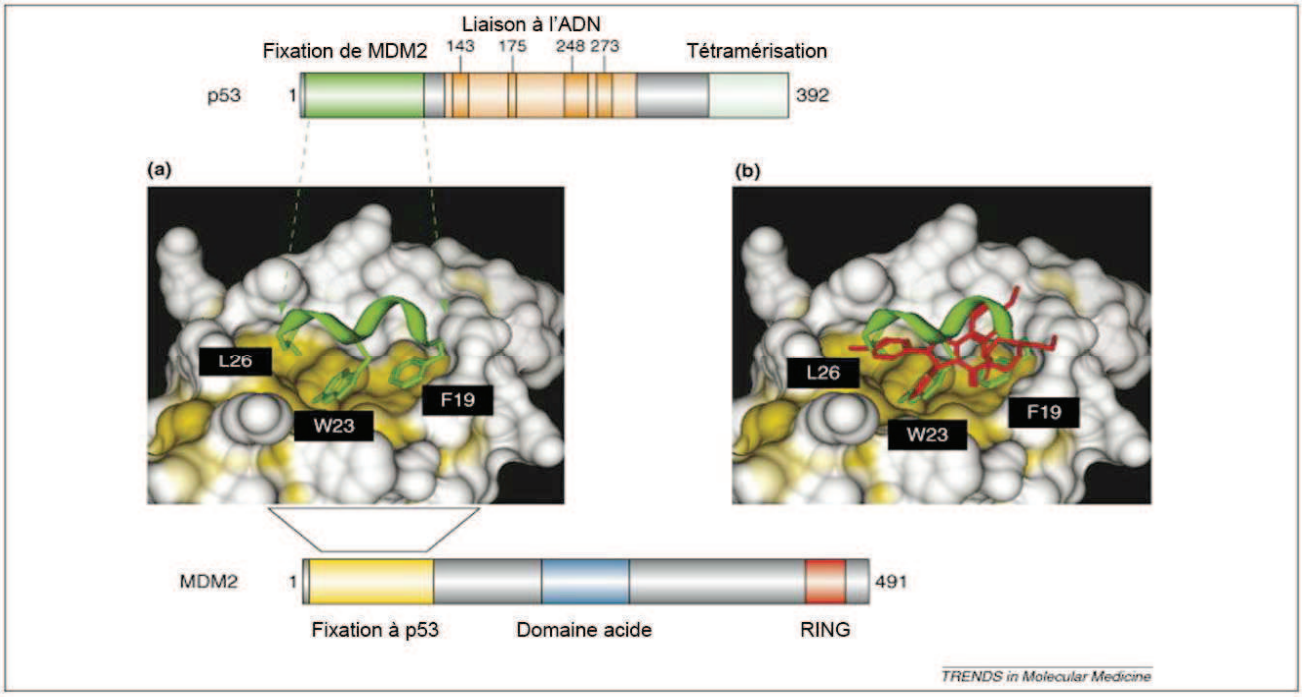


Figure 54 : Inhibiteurs de MDM2 de la famille des nutlines. (Extrait de L T. vassilev, 2006). (a) Structure du complexe p53/MDM2 illustrant l'interaction entre les acides aminés L26, W23 et F19 et la poche hydrophobique de MDM2. (b) Structure du complexe MDM2/nutline-2 (représentée en rouge) qui met en évidence le fait que cette petite molécule interagit avec les acides aminés impliqués dans l'interaction p53/MDM2.

Cependant, les auteurs ont révélé que cette activité n'était pas toujours strictement dépendante de la réactivation de p53 puisque la drogue favorisait un retard en phase S, associé à une augmentation de l'expression de E2F1 et induisait l'apoptose des cellules présentant une p53 mutée (Kojima et al., 2010). Des résultats publiés sous forme de résumé à l'ASCO (American Society of Clinical Oncology) par Stuhmer *et al* en 2008, ont montré que le JNJ-26854165 présentait également une activité pro-apoptotique dans plusieurs lignées cellulaires de myélome multiple dont certaines présentaient une p53 mutée (2 sur 6 lignées sensibles).

Ce composé a été évalué en phase I dans des tumeurs solides métastatiques réfractaires d'origines variées. Les résultats, présentés à l'ASCO par Tabernero *et al* en 2009, indiquent que ce composé provoque des effets indésirables de grade 1-2 tels que des nausées, des vomissements, une asthénie, une anorexie ainsi qu'une altération modérée des fonctions rénales et hépatiques. Par ailleurs, aucune activité anti-tumorale n'a été observée lors de cet essai.

e) Approches visant à inhiber l'interaction entre p53 et MDM2

Les études structurales, réalisées sur p53 et MDM2 ont permis de caractériser très précisément le domaine d'interaction entre ces deux protéines. Nous avons vu précédemment qu'un nombre limité d'acides aminés était impliqué dans la liaison entre MDM2 et p53 ce qui a motivé la recherche de petites molécules capables de déstabiliser l'interaction entre le suppresseur de tumeur et son régulateur négatif. L'équipe de Lane a été la première à isoler des peptides capable de dissocier le complexe p53/MDM2 (Bottger et al., 1996). Depuis de nombreux composés possédant la même propriété ont été synthétisés. Trois classes de molécules ont été principalement évaluées : les nutlines, les benzodiazépines et les spiro-oxindoles. Elles se fixent toutes sur MDM2 au niveau de son site d'interaction avec p53, ce qui induit le relargage de p53 et son activation transcriptionnelle. Parmi ces molécules, nous nous intéresserons plus particulièrement à la nutline-3 qui est celle qui a été la plus étudiée et que nous avons utilisé lors de nos travaux.

En 2004, l'équipe de LT. Vassilev a testé différents composés synthétiques afin de sélectionner ceux capables de se fixer au niveau de la poche hydrophobique de MDM2, correspondant au site de liaison avec p53, avec une grande affinité. Ils ont ainsi sélectionné une série d'analogues des cis-imidazolines, appelées nutlines (Vassilev, 2004) (Figure 54 et 55). Les nutlines-1, -2 et -3 sont des composés qui pénètrent de manière passive dans les cellules en culture et qui sont capables de dissocier le complexe p53/MDM2 à des concentrations de l'ordre de 100 à 300 nM.

Parmi ces molécules, la nutline-3 est celle qui présente la plus forte affinité pour MDM2 et qui possède donc l'activité la plus efficace. La nutline-3 a été synthétisée en mélange racémique puis séparée en deux énantiomères, nommés arbitrairement a et b. Il existe une différence d'activité entre ces 2 énantiomère puisque l'énantiomère « a » possède une affinité pour MDM2 150 fois plus élevée que celle de l'énantiomère « b ». Les auteurs ont montré que la nutlin-3a permet d'augmenter l'expression des gènes cibles de p53 et d'induire l'apoptose de lignées tumorales présentant une p53 sauvage alors qu'elle n'a pas d'effet sur les lignées possédant une p53 mutée.

L'équipe de LT Vassilev a également testé l'efficacité de ce composé *in vivo* chez des souris xénogreffées avec des cellules issues de la lignée d'ostéosarcome SJSA-1. La nutline-3a a été administrée par voie orale deux fois par jour pendant 10 jours. Les résultats obtenus lors de cet essai pré-clinique indiquent que ce composé est bien toléré chez la souris et qu'il présente une efficacité supérieure à celle de la doxorubicine. Depuis, d'innombrables études ont été réalisées afin de tester l'efficacité de la nutline-3 seule ou en association avec une chimiothérapie, une radiothérapie ou certaines thérapies ciblées (pour revues : (Chargari et al., 2011b; Secchiero et al., 2011)). Une molécule appartenant à la famille des nutlines, développée par le groupe pharmaceutique Roche, a été évaluée lors d'un essai clinique de phase I réalisé chez des patients atteints de pathologies hématologiques malignes (leucémies aigue myeloïdes (LAM) et lymphocytaires (LAL), leucémies myéloïdes (LMC) et lymphocytaires chronique (LLC)) ou de sarcomes. Cette molécule, nommée RG7112, présente le même mécanisme d'action que la nutline-3 mais possède une meilleure efficacité ainsi que des propriétés pharmacologiques améliorées. Les résultats ne sont pas encore publiés mais les premières données présentées par M. Andreef *et al* en 2010, au congrès de l'ASH (American Society of Hematolgy), sont très encourageantes. En effet, le traitement a permis d'obtenir des rémissions complètes chez certains patients atteints de LAM. Des régressions tumorales et une stabilisation de la maladie ont également été observées chez des patients atteints de LLC. Les résultats de cette étude indiquent également que le composé est bien toléré. Les principaux effets indésirables observés sont des nausées et des vomissements. D'autres études sont prévues pour évaluer l'efficacité de ce composé seul ou en association avec d'autres agents.

Les analogues des spiro-oxindoles, le MI-219 et son homologue, le MI-319, agissent également en se fixant à MDM2 et en empêchant son interaction avec p53. En 2009, Mohammad *et al* ont comparé l'efficacité de ces deux molécules à celle de la nutline-3 dans des lignées de lymphomes folliculaires (Mohammad et al., 2009).

Les auteurs ont montré que ces 3 composés induisaient, de façon similaire, une augmentation de l'expression des gènes cibles de p53, une diminution de la prolifération cellulaire ainsi qu'une activation des voies apoptotiques dans les différentes lignées testées. L'efficacité anti-tumorale du MI-319 a également été évaluée chez des souris xénogreffées avec des cellules issues de lignées de lymphomes folliculaires. Les résultats obtenus indiquent que ce composé est efficace puisqu'il diminue la croissance tumorale chez ces souris. Cependant, les données présentées dans l'article ne nous permettent pas de comparer son activité anti-tumorale *in vivo* à celle de la nutline-3. L'efficacité du MI-319 a également été testée dans le traitement du cancer du pancréas en association avec le cis-platine. La combinaison cis-platine/MI-319 réduit considérablement la prolifération cellulaire dans les trois lignées testées ainsi que la croissance tumorale chez des souris xénogreffées avec des cellules issues d'une lignée de tumeur de pancréas présentant une p53 sauvage (Azmi et al., 2010).

Certaines molécules de la famille des benzodiazepines possèdent également la propriété de déstabiliser le complexe p53/MDM2 (Grasberger et al., 2005). Ainsi, le TDP521252 et le TDP665759 ont été décrit comme étant capables de diminuer la prolifération de lignées de choriocarcinomes ainsi que d'induire l'apoptose dans une lignée de carcinome du foie. De plus, les auteurs ont montré que le TDP665759, utilisé en association avec la doxorubicine, provoquait une diminution de la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* (Koblish et al., 2006).

Enfin, l'équipe d'Issaeva *et al*, a utilisé une approche originale afin d'identifier d'autres molécules capable de rompre les interactions entre p53 et MDM2. Cette équipe a effectuée un crible sur un grand nombre de petites molécules appartenant à deux chimiothèques du « National Cancer Institute » en sélectionnant celles capables de bloquer la prolifération de cellules de la lignée de carcinome de colon HCT116 exprimant une p53 sauvage mais n'ayant pas d'effet sur la lignée HCT116 $p53^{-/-}$. Ce crible a conduit à la sélection du 2,5bis (5-hydroxyméthyl-2thiényl) furane, nommé RITA par les auteurs pour « Reactivation of p53 and Induction of Tumor cell Apoptosis » (Figure 55). Le groupe a montré que RITA était capable de se fixer au niveau du domaine N-terminal de p53 et de déstabiliser son interaction avec MDM2, induisant ainsi une inhibition de la croissance cellulaire dans la lignée HCT116. Les résultats de cette étude indiquent que RITA permet d'induire l'expression des gènes cibles de p53 tels que MDM2 et PUMA dans la lignée HCT116 mais pas dans la lignée HCT116 $p53^{-/-}$. De la même façon, cette molécule présente une activité anti-tumorale *in vivo* chez des souris SCID xénogreffées avec les cellules HCT116. L'effet observé chez les souris xénogreffées avec les cellules HTC116 $p53^{-/-}$ est beaucoup plus faible.

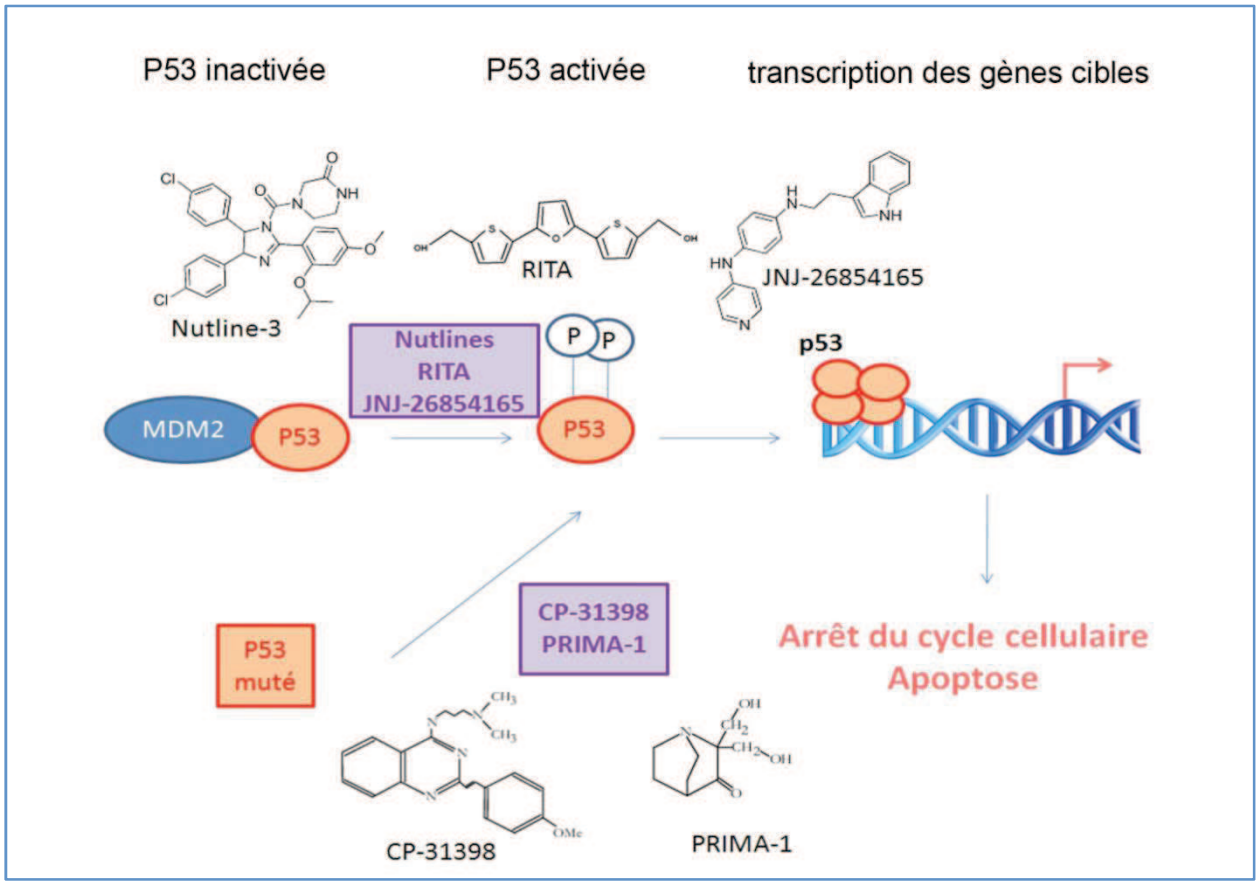


Figure 55 : Stratégies thérapeutiques fondées sur la réactivation de p53 en cancérologie. Le gène codant pour p53 est très fréquemment muté dans les tumeurs. Plusieurs molécules telles que CP-31398 ou PRIMA-1 ont été développées afin de réactiver les fonctions de p53 mutée, en permettant notamment un changement de conformation de la protéine. L'inhibition des fonctions de p53 peut également avoir lieu dans les tumeurs par surexepression de son régulateur négatif, MDM2, qui induit son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome. Certaines molécules ont été synthétisées afin d'inhiber l'activité E3 ligase de MDM2 comme le JNJ-26854165. Une autre stratégie très étudiée consiste à rompre l'interaction entre p53 et MDM2. Ainsi, RITA permet de déstabiliser ce complexe en se fixant sur p53. De multiples inhibiteurs de MDM2 ont également été développés dont les nutlines qui sont les plus étudiés.

De nombreux travaux ont été réalisés depuis avec cette molécule et ont permis de mieux caractériser son mode d'action. Une étude récemment publiée a montré que ce composé était capable d'induire la voie JNK dans des cellules de myélome multiple (Saha et al., 2012). D'après Lange *et al*, l'induction de l'apoptose par la nutline-3 et RITA corrèle avec l'induction de la voie de signalisation ATM et la phosphorylation de p53 sur la Ser46. La cible en aval d'ATM, la kinase chk2, serait fortement impliquée dans l'apoptose induite par RITA (de Lange et al., 2012). Une équipe a également rapporté que l'absence de phosphorylation de p53 sur la sérine 46 est à l'origine d'une résistance au traitement par la nutline-3 et RITA (Ma et al., 2012).

Les stratégies développées afin de réactiver les fonctions de p53 sont présentées sur la figure 55.

OBJECTIFS DU TRAVAIL

Notre équipe travaille depuis plusieurs années sur les mécanismes de l'apoptose induite par différents agents dans les cellules de LB et, plus récemment, dans les LCL, utilisées comme modèle pour l'étude des PTLD (Rowe et al., 1991). Elle s'est intéressée plus particulièrement au statut de p53 dans les cellules de LB et a montré que :

- les lignées exprimant une forme sauvage de p53 présentent une forte expression de MDM2 (Capoulade et al., 1998).
- l'inhibition de MDM2 par des oligonucléotides antisens induit l'apoptose de ces cellules (Capoulade et al., 2001).

Sur la base de ces observations, l'équipe a voulu tester l'efficacité de la nutline-3 dans des lignées de LB EBV (-) et EBV (+). Les résultats ainsi obtenus par le laboratoire indiquent que le traitement avec ce composé permet, d'une part, de stabiliser p53 et qu'il induit, d'autre part, l'activation des gènes cibles du suppresseur de tumeur dans toutes les lignées testées. Cependant cette étude montre également que les cellules EBV (-) entrent massivement en apoptose, alors que les cellules EBV(+) en latence III sont très résistantes au traitement (Renouf et al., 2009).**Le premier objectif de ma thèse a donc consisté à caractériser les mécanismes à l'origine de la résistance observée dans ces cellules**

Il est admis qu'EBV est capable d'induire une surexpression de plusieurs membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 dans les cellules qu'il infecte (Rowe et al., 1994; Wang et al., 1996). Nous avons donc évalué l'implication de ces protéines dans la résistance à l'apoptose des cellules EBV (+) en latence de type III. Pour élargir ce travail, nous avons réalisé une étude du transcriptome en collaboration avec l'Unité de Génomique Fonctionnelle (UGF) de l'Institut Gustave Roussy sur deux lignées qui ne diffèrent que par leur statut EBV, après différents temps de traitement avec la nutline-3.

Le deuxième objectif du travail a porté sur l'évaluation de l'efficacité de plusieurs inhibiteurs des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 pour le traitement des lymphomes B associées à EBV. Dans ce but, nous avons collaboré avec une équipe de l'Institut de Chimie de Substances Naturelles, qui a récemment criblé des extraits de plantes venant de zones sub-tropicales afin de sélectionner celles déplaçant l'interaction Bcl-xL/Bak.

L'efficacité de ces molécules a été testée pour la première fois dans notre laboratoire sur plusieurs lignées de LB EBV (-) et EBV (+) et de LCL. Par ailleurs, nous avons évalué l'efficacité d'ABT-737 (en collaboration avec les laboratoires Abbott), *in vivo* chez des souris immunodéprimées xénogreffées avec des cellules de LB ou des LCL. L'activité anti-tumorale de ce composé a été testée en monothérapie ou en combinaison avec les traitements conventionnels tels que le cyclophosphamide pour le LB ou le Rituximab pour les PTLD.

MATERIEL ET METHODES

MATERIEL ET METHODES

Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires de LB utilisées ont été établies à partir de LB endémiques ou sporadiques. Les lignées de LB BL2, BL7, BL28, BL40, BL2/B95, BL28/B95, BL40/B95 et LY47 ont été fournies par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC, Lyon, France). Les lignées de LB EBV(+) BL2/B95, BL28/B95 et BL40/B95 ont été générées à partir des lignées de LB EBV(-) BL2, BL28 et BL40, infectées *in vitro* par la souche sauvage B95.8. La lignée Séraphina a été donnée par le Prof. G. Klein (Stockholm, Suède). Les lignées lymphoblastoïdes (LCL) ont été obtenues après immortalisation de lymphocytes B normaux par EBV. La lignée RPMI8866, a été fournie par l'IARC et les lignées Priess et Remb1 par le Dr JG. Bodmer (Londres). La lignée IARC211 a été obtenue à partir de lymphocytes B normaux du patient BL40 et a été fournie par l'IARC. La lignée DG75 tTA LMP-1 correspond à un transfectant stable de la lignée DG75 dont l'expression de la LMP-1 est régulée par la présence de tétracycline (Floettmann et al., 1996). Elle a été fournie par le Dr Olivier Dellis (Orsay, France).

Ces lignées ont été cultivées en milieu RPMI 1640 (PAA) supplémenté en L-glutamine (2 mM, PAA), en pyruvate de sodium (1 mM, PAA), en glucose (20 mM), en pénicilline (100 U/ml, PAA), en streptomycine (100 µg/ml, PAA) et en sérum de veau foetal inactivé (SVF, 10%) (RPMI complet). Les cellules ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère comportant 5% de CO2 et saturée en eau. La tétracycline (1 µg/ml) a été ajoutée au milieu afin d'inhiber l'expression de la LMP1 dans la lignée DG75 tTA LMP-1.

Anticorps et réactifs

La nutline-3 a été fournie par le laboratoire Roche (Nutley, New Jersey) et ABT-737 par le laboratoire Abbott (Chicago, Illinois). L'étoposide, le melphalan, l'inhibiteur de CDK2 (SU9516) la chloroquine et la monodansylcadavérine proviennent de Sigma-Aldrich.

Les anticorps utilisés pour le Western-blot sont les suivants : l'anti-poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mAb de souris (Ab-2, clone c-2-10), l'anti-$p21^{WAF1}$ mAb de souris (Ab-1 OP64) et l'anti-p53 mAb de souris (Ab-6, OP43) proviennent de Calbiochem. L'anti-Bax pAb de lapin (N-20), l'anti-Bcl-2 mAb de souris (clone 100), l'anti-Mcl-1 mAb de souris (clone 22), l'anti-Bcl-xL pAb de lapin (L-19), l'anti-p65 mAb de souris (F-6) et l'anti-BZLF1 mAb de souris (BZ1) sont produits par Santa Cruz Biotechnology Inc.

L'Anti-vinculine mAb de souris (clone VIN-11-5) et l'anti-β actine mAb de souris (clone AC-74) proviennent de Sigma-Aldrich. L'Anti-LMP-1 mAb de souris (CS1-4) est produit par Dako France SAS. L'anti-Bécline-1 pAb de lapin et l'anti-sestrine-1 pAb de souris sont produits par Abcam. L'anti-p70S6K pAb de lapin, l'anti-phospho-p70S6K mAb de souris (Thr389, clone 1A5), l'anti-phospho-Bcl-2 mAb de lapin (Ser 70, clone 5H2) et l'anti-LC3B pAb de lapin proviennent de Cell Signaling technology. L'anti-topoisomerase II mAb de souris (clone KiS1) a été obtenu chez Chemicon. Enfin, les anticorps secondaires couplés à la HRP de lapin anti-IgG de souris et d'âne anti-IgG de lapin sont fournis par GE Healthcare. Pour l'immunoprécipitation, l'anticorps anti-Bax pAb de lapin (N20) et les IgG de lapin couplés à l'agorose, provenant de chez Santa Cruz Biotechnology Inc, sont utilisés. Pour la cytométrie en flux, l'anti-Bax mAb de souris reconnaissant la forme active de la protéine (clone 6A7, Sigma-Aldrich) est utilisé.

Induction et quantification de la mort cellulaire par annexine-V-FITC/IP

Les cellules ($5x10^5$) ont été ensemencées en plaque 12 puits puis traitées selon les besoins de l'expérience avec la nutline-3, ABT-737, la chloroquine ou les 2 inhibiteurs de Bcl-xL et Mcl-1 dans 1 ml de milieu RPMI complet. Pour certaines expériences, les cellules ont été pré-traitées avec ABT-737 ou avec la chloroquine pendant 1 et 2 heures respectivement puis la nutline-3 a été ajoutée pendant 24h.

Les cellules ont ensuite été lavées en PBS et resuspendues dans 100 µl de tampon annexine (10 mM d'HEPES/NaOH, pH 7.4, 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl2 et 1.8 mM de $CaCl_2$) supplémentées avec 2.5 µg/ml d'annexine V-FITC (Roche Apllied Science). Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, 200 µL de tampon annexine supplémenté avec 10 µg/ml d'iodure de propidium (IP, Sigma-Aldrich) ont été ajoutés. L'apoptose a ensuite été estimée en analysant les cellules par cytométrie en flux (FACSCalibur, Becton-Dickinson).

Quantification de la dépolarisation mitochondriale au DIOC6(3)

Les cellules ont été ensemencées et traitées selon les conditions décrites dans le paragraphe précédent. Le DIOC6(3) (40 nM) a été ajouté à la fin du traitement dans le milieu de culture puis les cellules ont été incubées 30 minutes à 37°C. Elles ont ensuite été lavées et resuspendues dans 300 µL de PBS supplémenté d'IP (10 µg/ml). Les cellules ont ensuite été analysées en cytométrie en flux.

Test de cytotoxicité MTT

Les cellules ont été ensemencées en triplicate dans 200 µL de milieu RPMI1640 dans une plaque 96 puits (200 000 cellules/puit). Elles ont été traitées avec les différents composés à évaluer pendant 24h. 25 µL de MTT (Sigma, 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium) ont ensuite été ajoutés à chaque puits et les plaques ont été incubées à 37°C pendant 2h.

Les sels de tétrazolium contenu dans ce réactif de couleur jaune sont réduits, par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes, en formozan. Ceci se traduit par la formation d'un précipité violet au niveau de l'organite. La quantité de cellules vivantes est donc évaluée par l'absorbance mesurée à 550 nm.

Les cellules ont finalement été incubées à 37°C sur la nuit dans un tampon de lyse (SDS 20%, Dimethylformamide 45%, pH=4.7). Le lendemain, la densité optique de chaque plaque a été lue par un lecteur de plaque à une longueur d'onde de 550 nm.

SiRNA et transfection

Les siRNA p65, dont la séquence est la suivante : 5'-CCCUUUACGUCAUCCCUGAtt-3', ainsi que les siRNA contrôles (Silencer Negative Control #1) proviennent de chez Ambion (life technologies). Les siRNA Bax, dont la séquence est : 3'-GGU GCC GGA ACU GAU CAG ATT-5' et les siRNA-contrôles : 5'-GAU UGA ACA GAU AGC GCG ATT-3' proviennent de chez Dharmacon.

Les cellules ($3x10^6$) ont été centrifugées puis resuspendues dans 100 µl de viaspan (Dupont Pharmaceuticals) afin d'être électroporées avec 20 nM de siRNA (25ms, 130V, pulsation électrique de type carré (electroporateur Biorad gene Pulser Xcell)) dans une cuve de 0.2 cm. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 24 heures et utilisées pour les différentes expériences.

Extraits cellulaires et analyses par Western-blot

Les extraits protéiques totaux ont été réalisés à partir de 10^6 cellules, traitées ou non selon les besoins de l'expérience. Les cellules ont été d'abord lavées en PBS 1X, puis lysées dans 70 µl de tampon RIPA (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,4, 5 mM EDTA, 1% NP40, 0,5% NaDoc, 0,1% SDS, Complete 1X) pendant 15 minutes à 4°C. Les lysats ont ensuite été soniqués 30 secondes puis les débris éliminés par centrifugation durant 20 minutes à 13000 tr/min à 4°C.

Le surnageant a été récupéré et constitue l'extrait protéique total. Il peut alors être quantifié et déposé sur un gel d'électrophorèse ou être conservé à -80°C.

Après extraction, les échantillons ont été dosés par spectrophotométrie selon la technique de Bradford (BioRad protein assay, Biorad). Les protéines (30 µg) ont été dénaturées en tampon Laemmli 1X (0.06M Tris Hcl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycérol, 1% β-mercaptoethanol, bleu de bromophénol, eau) puis mis à bouillir pendant 5 minutes. Elles ont ensuite été séparées par électrophorèse sur des gels d'acrylamide SDS PAGE (NuPAG, Invitrogen) à gradient 4-12%, à 10% dans un tampon MOPS (Invitrogen) et à 16% dans du tampon glycine (Accugene, Lonza). Elles ont été transférées sur membrane PVDF (Immobilon-P, Millipore) en liquide (25 mM Tris, 195 mM glycine, 20% méthanol) pendant 1h30 à 90V à 4°C. Les membranes ont été saturées 1 heure à température ambiante dans un tampon de saturation (PBS, 0,1% Tween 20, 3% lait écrémé régilait, 2% glycine). Elles ont été incubées 1 heure à température ambiante ou toute la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire, dilué selon les recommandations du fournisseur, dans le tampon de saturation. Après lavages, les membranes ont été incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire approprié, couplé à la HRP. Les membranes ont été lavées à nouveau puis révélées par chimioluminescence grâce à un substrat de la HRP (Millipore).

L'immuno- et la co-immunoprécipitation

Les cellules (5.10^6 pour l'immunoprécipitat (IP) et l'irrelevant (IRR); 2.10^6 pour l'input) ont été lavées en PBS 1X, puis lysées dans 1 ml de tampon CHAPS (1% CHAPS, 1M Hépes, 5 M NaCl ,Complete 10X) pour l'IP et l'IRR et dans 40 µl pour l'input. Les lysats cellulaires ont été incubés à 4°C sur une roue, avec 2 µg d'anticorps de lapin anti-Bax (N-20) ou 2µg d'IgG de lapin, couplés à l'agarose pendant une nuit. L'input a été conservé à -80°C. Les complexes anticorps/protéines ont ensuite été lavés en tampon de lyse à 4 °C et repris dans 20 µL de tampon Laemmli 4X. Les échantillons ont été bouillis durant 5 minutes et analysés par Western-blot.

Fractionnements cytosoliques et mitochondriaux

Les cellules ($2x10^6$), traitées selon les besoins de l'expérience, ont été resuspendues dans 100 µl de tampon CLAMI (250 mM sucrose, 70 mM KCl, 200 µg/ml de digitonine, PBS) puis incubées 5 minutes dans la glace et centrifugés 5 minutes à 1 000 g à 4 °C. Le surnageant, constituant la fraction cytoplasmique, a été conservé à –80°C.

Les culots ont été repris dans 50 µl de tampon IP (30 mM Tris Hcl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.2% Triton x100, 0.3 % NP40, Complete 1X), et ont ensuite été incubés 10 min dans la glace puis centrifugés 10 min à 10 000 g à 4 °C. Le surnageant, qui constitue la fraction mitochondriale, a été conservé à –80 °C. Les différents échantillons on ensuite été analysés par Western-blot.

Fractionnements cytosoliques et nucléaires

Les cellules (3.10^6), traitées selon les besoins de l'expérience, ont été lavées en PBS 1X, resuspendues dans 80 µl de tampon **A** (20mM Hépès pH 7,9, 10 mM KCl, 1mM EDTA, 0,2% NP40, 10% glycérol, complete 1X), incubées 5 min dans la glace et enfin centrifugées 5 min à 16 100 g à 4°C. Les surnageants, constituant les fractions cytosoliques, ont été récupérés et conservés à -80°C. Les culots ont ensuite été repris dans 80 µl de tampon **B** (350 mM NaCl, 20% glycérol, 20mM Hépès, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, complete 1X), vortexés et incubés 30 min dans la glace puis centrifugés 5 min à 16 100 g à 4°C. Les surnageants qui constituent les fractions nucléaires ont été récupérés et conservés à -80°C.

Immunofluorescence intracellulaire

Marquage de la forme conformationnellement active de Bax (6A7)

Les cellules ($2x10^6$), traitées ou non avec la nutline-3 (10 µM) ou ABT-737 (250 nM pour les LCL ou 10 µM pour les lignées de LB), ont été fixées en paraformaldéhyde 0.25% pendant 20 minutes à température ambiante. Elles ont ensuite été lavées en PBS puis incubées pendant 30 minutes à température ambiante avec 50 µl d'anticorps anti-Bax (6A7) dilué au $1/200^{ème}$ dans du PBS contenant de la digitonine (200µg/ml). Après un lavage en PBS, les cellules ont été incubées durant 30 minutes à température ambiante avec 50 µl d'anticorps secondaire (GAM-Alexa 488), dilué en PBS. La fluorescence a ensuite été analysée par cytométrie en flux.

Marquage des autophgosomes avec la Monodansylcadavérine (MDC)

Les cellules (10^6), traitées ou non pendant 16h avec la nutline-3 (10 µM), ont été marquées avec la MDC (100 µM, Sigma-Aldrich) pendant 10 minutes à 37°C.

Après 2 lavages en PBS, les cellules ont été déposées sur des lamelles pré-traitées avec de la poly-lysine (100 µg/mL) puis ont été fixées en paraformaldéhyde 3% pendant 10 minutes à température ambiante. Après 3 lavages en PBS, les lamelles ont été montées et les cellules ont été analysées en microscopie confocale (microscope confocal Leica SPE).

Microscopie électronique

Les culots de cellules, traitées ou non avec la nutline-3 (10 µM) pendant 7h, ont été fixés dans du tampon cacodylate (0.1 M, pH 7.4) contenant 2% de glutaraldéhyde (EMS, Hatfield, PA, USA) pendant 1 heure à température ambiante. Les culots cellulaires ont ensuite été post-fixés dans du tampon cacodylate (0.1 M) contenant 1% de tétroxyde d'osmium (EMS, Hatfield, PA, USA) et 1.5 % de ferrocyanide de potassium (Sigma-Aldrich) pendant 1 heure à température ambiante . Les cellules ont ensuite été déshydratées avec des concentrations croissantes d'éthanol. Une inclusion des échantillons ainsi obtenus a été réalisée dans l'Epon 812 (EMS, Hatfield, PA, USA). La polymérisation des échantillons a été effectuée pendant 72h à 56°C. Des coupes ultra-fines des culots (70 nM) ont ensuite été réalisées et ont été colorées à l'acétate d'uranyle (Merck, France) et au citrate de plomb. Les cellules ont été analysées avec le microscope électronique Zeiss 902.

Analyse du profil d'expression génique (Transcriptome)

Les ARNs totaux des lignées de LB BL2 et BL2/B95, traitées ou non avec la nutline-3 pendant différents temps (30 minutes, 1 heure, 3 heures, 7 heures ou 16 heures) ont été purifiés selon les recommandations fournies avec le Micro Kit RNeasy (Qiagen). Ces ARNs ont été hybridés en «Single Color» sur des puces Agilent Human GE 4X44K (Agilent Technologies, AMADID 014850). Les données ont été extraites des images ainsi obtenues par le logiciel « Feature Extraction 10.5.1.1» (Agilent). Ces données ont été transformées en logarithme de base 2 selon la méthode des quantiles. Plusieurs analyses statistiques ont ensuite été réalisées par la plateforme génomique de l'Institut Gustave Roussy (UGF) afin de ne garder que les gènes dont l'expression est significativement modifiée en réponse au traitement par la nutline-3.

Expérimentation animale

Conditions d'expérimentations des souris

Les souris Nude et NOD/SCID (NOD.CB17/Icr-*Prkdc*^{scid}/J*)* proviennent de l'animalerie de l'IGR. Les souris SCID proviennent de la société JANVIER (Le Genest Saint Isle, France). Les souris Nude sont caractérisées par une absence de poil et un thymus absent. Il en résulte une absence de lymphocytes T matures, un défaut partiel du développement des cellules B et une absence de réponses immunes à médiation cellulaire. En revanche, le système immunitaire innée n'est pas affecté (présence de macrophages, du complément, de cellules NK (Natural Killer) et des cellules présentatrices de l'antigène). Les souris SCID présentent une lymphopénie T et B profonde. Toutefois ces animaux ont une différenciation myéloïde normale et leur nombre de cellules NK (Natural Killer) n'est pas altéré. Les souris NOD/SCID résultent d'un croisement entre la lignée SCID et la lignée NOD caractérisée par un déficit fonctionnel en cellules NK, une absence d'activité hémolytique du complément et une fonction altérée des cellules présentatrices des antigènes. Ces lignées de souris immunodéficientes favorisent la prise de greffe de cellules humaines.

L'environnement des animaux est soigneusement contrôlé pour maintenir leur statut sanitaire. Les souris sont placées dans des racks ventilés, permettant une filtration de l'air à l'entrée des cages. Tout le matériel en contact avec les animaux est stérilisé par autoclavage. La litière et les biberons d'eau stérile sont changés une fois par semaine sous hotte à flux laminaire. Les animaux sont nourris à volonté avec des aliments contrôlés. Pour éviter la contamination des souris, le port de blouses à utilisation unique et de gants est obligatoire.

Greffe de cellules tumorales

Les cellules RMPI8866 ou LY47 ont été comptées à l'aide de l'analyseur cellulaire Vi-Cell (Beckman-Coulter) et ont été centrifugées pendant 5 min à 1600 rpm. Le culot a été repris dans 50% de milieu RPMI 1640 complet et 50% de matrigel (BD BioSciences), sur glace, afin d'injecter les cellules aux souris en sous-cutanée (sc) (100 µL/souris). Le nombre de cellules à injecter pour une prise de greffe optimale a été déterminé par des expériences préliminaires et correspond à $2x10^6$ cellules pour les RPMI8866 et 1.5 $x10^6$ cellules pour les LY47.

Lors de certaines expériences, les cellules ont été injectées en intra-péritonéal (IP). Dans ce cas, le culot de cellules RPMI8866 a été repris dans du PBS et le nombre de cellules injecté était alors de $10x10^6$ cellules par souris.

Les souris greffées en sc ont ensuite été surveillées quotidiennement jusqu'à l'apparition de tumeurs palpables (100 mm^3). Elles ont alors été réparties de façon homogène dans différentes cages, selon leur poids et la taille des tumeurs.

Une souris de chaque groupe injectée en IP a été suivie par échographie, durant les trois semaines qui ont suivies l'injection. L'évolution de la maladie a ensuite été évaluée par palpation de l'abdomen et vérification des signes cliniques visibles chez les souris.

Traitement des souris

Plusieurs traitements ont été administrés aux souris lors des différentes études pré-cliniques. Les doses utilisées et les schémas d'administration sont les suivants :

- Cyclophosphamide (Sigma-Aldrich) : doses testées : 25, 50, 100, 200 mg/kg, une seule injection en IP
- ABT-737 (fourni par Abbott) : utilisé à 75 mg/kg selon les recommandations du laboratoire Abbott, une injection quotidienne en IP durant 14 jours
- Rituximab (fourni par l'IGR) : doses testées : 5, 10, 20 mg/kg, une injection hebdomadaire en IP durant 4 semaines

Le volume d'administration est basé sur le poids corporel de chaque animal enregistré le jour de la randomisation. Le cyclophosphamide est repris dans du NaCl. ABT-737, sous forme de poudre, est repris dans la solution suivante : 65% D5W, 5% Tween 80, 30% Propylène Glycol, HCl, pH 1. Il est ensuite soniqué puis tamponné afin d'obtenir un pH à 4. Le Rituximab est déjà en solution lorsqu'il provient de l'hôpital. Il est donc dilué afin d'obtenir les différentes concentrations désirées.

Evaluation de la croissance tumorale

Les expériences et protocoles ont été réalisés en accord avec les règles éthiques appliquées à l'expérimentation animale. Pour chaque expérience, un suivi régulier de différents paramètres comme la mortalité journalière, la pesée et les observations cliniques a été effectué. Une dose est déclarée toxique lorsqu'elle entraîne une perte de poids supérieure ou égale à 20%, ou qu'elle provoque le décès de 10% des animaux. La mesure tumorale a été réalisée en deux dimensions au pied à coulisse, et le volume tumoral (mm^3) a été calculé de la manière suivante :

$$\text{Volume } (mm^3) = \frac{\text{Longueur (mm)} \times (\text{Largeur (mm)})^2}{2}$$

Pour évaluer l'effet des différents traitements sur les cellules sanguines, une numération de la formule sanguine (NFS) a été réalisée 2 fois par semaine. Le prélèvement de sang a été effectué au sinus rétro-orbitaire de l'animal sous anesthésie gazeuse. Vingt-cinq µL (3-5 gouttes) de sang ont été prélevés et placés dans un tube contenant de l'EDTA (Ethylen Diamin Tetraacetic Acid) pour éviter la coagulation. Le sang a ensuite été analysé directement par un appareil d'hématologie (*MS9* analyseur, Melet Schloesing)

Les souris ont été sacrifiées lorsque le volume tumoral était > à 2000 mm^3, lorsque la perte de poids était > à 20% ou qu'elles présentaient des signes cliniques trop sévères (paralysie, obstruction intestinale, déshydratation). Une analyse histologique a ensuite été réalisée lors de l'expérience réalisée chez les souris injectées avec des cellules RPMI8866 injectées en IP.

Histologie et immunohistochimie

Les tumeurs ont été prélevées, fixées en parafolmadéhyde 4% puis incluses en paraffine. Une coloration trichromique hématéine-éosine-safran (HES) a ensuite été réalisée sur les coupes de paraffine. Les coupes ont été incubées avec un anti-Ki67 mAb de lapin (Neomarkers, $1/200^{ème}$), pour évaluer l'index de prolifération et un anti-caspase-3 pAb de lapin (Cell Signaling, $1/100^{ème}$) pour détecter l'apoptose. Le signal a été visualisé à l'aide du kit « Rabbit PowerVision » (UltraVision Technologies). Les lames ont ensuite été observées au microscope Zeiss Axiophot.

Passage et dissociation de tumeurs

La lignée de NPC C15 fournie par le Dr P. Busson (Villejuif, France) ne pousse pas en culture et est entretenue lors de passages successifs chez l'animal. Pour cela, les souris porteuses de tumeurs ont été sacrifiées, les tumeurs ont été prélevées et coupées en plusieurs morceaux de taille homogène qui ont été greffés en sc chez des souris sur lesquelles une incision de la peau, au niveau des omoplates, a été réalisée. Ces passages ont été effectués une fois par mois.

Pour réaliser des expériences *in vitro* sur cette lignée, il est nécessaire d'effectuer une dissociation à partir de ces tumeurs. Pour cela, la souris est sacrifiée et la tumeur est prélevée et découpée en fragments d'environ 1 mm^3 dans une boîte de pétri contenant du milieu RPMI 1640. Après plusieurs lavages avec ce milieu, les fragments sont incubés pendant 3h à 37°C en présence de collagénase (8 mg/g de tumeur) et de DNase (20 µg/g de tumeur). La solution ainsi obtenue est filtrée puis plusieurs lavages successifs sont réalisés par centrifugation pendant 5 min à 600 g. Le culot, contenant les cellules de NPC est finalement repris dans du milieu RPMI 1640 complet et les cellules sont utilisées directement pour les différentes expériences.

RESULTATS ET DISCUSSION

RESULTATS ET DISCUSSION

Partie 1 : Mécanismes impliqués dans la résistance à l'apoptose induite par p53 dans les cellules EBV (+) en latence III

1. Résultats

a) Résultats précédents

Les premiers résultats obtenus par l'équipe montraient que l'utilisation de la nutline-3 permet d'induire une apoptose massive dans les lignées de LB EBV (-) et EBV (+) en latence I, alors que les lignées EBV (+) en latence III sont beaucoup plus résistantes. Les données obtenues indiquaient également que p53 est stabilisée dans l'ensemble des lignées testées et que l'expression de ses cibles ($p21^{WAF1}$, MDM2, Bax) augmente considérablement en réponse au traitement. Au moment de mon arrivée au laboratoire, la question était de savoir si l'activation de la p53, induite par un pré-traitement avec la nutline-3, pouvait sensibiliser les cellules aux agents génotoxiques connus pour induire une apoptose dépendante de p53, tel que l'Étoposide ou le Melphalan. Nous avons montré que le pré-traitement des cellules EBV (-) et EBV (+) en latence I avec une faible dose de nutline-3 (2 μM) sensibilise ces cellules aux agents génotoxiques. En revanche, ce pré-traitement présente un effet contraire dans les cellules EBV (+) en latence III et les rend plus résistantes à l'Étoposide et au Melphalan. Nous avons ensuite mis en évidence l'implication de la protéine $p21^{WAF1}$ dans ce mécanisme de résistance accrue aux agents génotoxiques induit par la nutline-3. En effet, dans les cellules EBV (+) en latence III, l'augmentation de l'expression de $p21^{WAF1}$ entraîne un arrêt du cycle cellulaire plutôt que l'apoptose. L'inhibition de $p21^{WAF1}$ par siARN, restaure la sensibilité de ces cellules aux agents génotoxiques. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication en 2009 présentée en annexe (Renouf et al., 2009).

Dans la seconde partie du travail nous avons cherché à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance à la nutline-3 des cellules EBV (+) en latence III. Pour ce faire, nous avons étudié, en plus des LB, la réponse au traitement des LCL afin de mieux appréhender l'effet propre au virus.

b) Article n°1: «Treatment with a BH3 mimetic overcomes the resistance of latency III EBV (+) cells to p53-mediated apoptosis»

L'étude a été réalisée sur 8 lignées de cellules de LB EBV (-) ou EBV (+) en latence III, ainsi que sur 3 lignées de LCL qui présentent également une latence de type III et sont généralement utilisées comme modèle pour étudier les PTLD. La première partie du travail a consisté à caractériser l'apoptose induite par la nutline-3 dans les différentes lignées. Nous avons montré que les LCL, tout comme les lignées de LB EBV (+) en latence de type III, sont beaucoup moins sensibles au traitement que les lignées de LB EBV (-). Nos résultats indiquent que dans les lignées EBV (-), le traitement par la nutline-3 entraîne une dépolarisation mitochondriale et une activation de la caspase-3 qui n'est pas observée dans les lignées EBV (+) en latence de type III.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression des protéines pro-apoptotiques cibles de p53 et plus particulièrement à la protéine Bax. Nous avons montré que dans les lignées EBV (-), Bax est activée après traitement par la nutline-3 et relocalisée à la mitochondrie. En revanche, dans les cellules EBV (+) en latence de type III, Bax, qui n'est pas activée, s'accumule dans les 2 compartiments.

Plusieurs protéines d'EBV ont été décrites comme ayant la capacité de stimuler l'expression de membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Rowe et al., 1994; Wang et al., 1996). Nous avons évalué le niveau d'expression endogène des protéines Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-xL dans les différentes lignées. Nos résultats indiquent que seul le niveau d'expression de la protéine Bcl-2 est augmenté dans les cellules EBV (+) en latence de type III par rapport aux cellules EBV(-). De plus, des expériences de co-immunoprécipitations ont montré que cette protéine interagit avec Bax alors que cette interaction n'est pas retrouvée dans les cellules EBV (-). Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la résistance des cellules au traitement pouvait être due à l'inactivation de Bax par Bcl-2 et nous avons donc étudié la capacité d'ABT-737 à restaurer la sensibilité de ces cellules à la nutline-3.

ABT-737 est un composé qui bloque l'hétérodimérisation de Bax et Bcl-2 (Oltersdorf et al., 2005). Dans nos cellules, nous avons montré que ce composé rompt l'interaction Bax/Bcl-2, augmentant ainsi la quantité de Bax activée et relocalisée dans la mitochondrie après traitement par la nutline-3. ABT-737 restaure également la sensibilité des cellules EBV (+) en latence de type III au traitement par la nutline-3. Enfin, nous avons observé qu'ABT-737, lorsqu'il est utilisé seul, induit fortement l'apoptose dans toutes les lignées de LCL. Ces résultats ont été publiés en 2011 dans le journal *Cell Death and Disease* et sont présentés ci-après.

Citation: Cell Death and Disease (2011) 2, e184; doi:10.1038/cddis.2011.67
© 2011 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 2041-4889/11
www.nature.com/cddis

Treatment with a BH3 mimetic overcomes the resistance of latency III EBV (+) cells to p53-mediated apoptosis

A Pujals[1,2], B Renouf[1,2,3], A Robert[1], S Chelouah[1], É Hollville[1,4] and J Wiels*[,1]

P53 inactivation is often observed in Burkitt's lymphoma (BL) cells due to mutations in the p53 gene or overexpression of its negative regulator, murine double minute-2 (MDM2). This event is now considered an essential part of the oncogenic process. Epstein–Barr virus (EBV) is strongly associated with BL and is a cofactor in its development. We previously showed that nutlin-3, an antagonist of MDM2, activates the p53 pathway in BL cell lines harboring wild-type p53. However, nutlin-3 strongly induced apoptosis in EBV (−) or latency I EBV (+) cells, whereas latency III EBV (+) cells were much more resistant. We show here that this resistance to apoptosis is also observed in latency III EBV (+) lymphoblastoid cell lines. We also show that, in latency III EBV (+) cells, B-cell lymphona 2 (Bcl-2) is selectively overproduced and interacts with Bcl-2-associated X protein (Bax), preventing its activation. The treatment of these cells with the Bcl-2-homology domain 3 mimetic ABT-737 disrupts Bax/Bcl-2 interaction and allows Bax activation by nutlin-3. Furthermore, treatment with these two compounds strongly induces apoptosis. Thus, a combination of Mdm2 and Bcl-2 inhibitors might be a useful anti-cancer strategy for diseases linked to EBV infection.
Cell Death and Disease (2011) **2**, e184; doi:10.1038/cddis.2011.67; published online 28 July 2011
Subject Category: Cancer

The p53 tumor suppressor is a transcription factor that is activated in response to DNA or cell damage, such as oncogene activation, radiation, mitotic stress, ribosomal stress or chemical challenge.[1] When activated, p53 has a key role in protecting against tumor development, by inducing cell cycle arrest or apoptosis.[2] This physiological function of p53 is frequently altered in malignant cells, through mutation, cytoplasmic sequestration, interaction with viral oncoproteins or an increase in interactions with its main cellular regulator murine double minute-2 (MDM2).[3] MDM2 is an E3 ubiquitin ligase that binds p53 and induces its ubiquitin-dependent degradation.[4] MDM2 also inhibits the transcriptional activity of p53 through direct protein–protein interactions.[5] MDM2 overproduction, leading to p53 inactivation, has been observed in various types of cancer.[6,7] Given the key role of p53 in determining cell fate, several strategies for disrupting the p53–MDM2 interaction have been explored.[8,9] Potent, stable and selective small-molecule antagonists of MDM2 have recently been synthesized. These molecules include nutlins, *cis*-imidazoline compounds that act by binding to the p53 pocket of MDM2, thereby overcoming the inhibitory effects of this molecule and inducing the release and activation of p53.[10] Nutlin treatment has been shown to enhance apoptosis in various tumor cells *in vitro*,[11,12] to inhibit tumor growth *in vivo*[10,13] and to act in synergy with genotoxic drugs or irradiation in cancer therapy (reviewed in Vassilev[14]).

The anti-cancer activity of p53 results principally from the ability of this molecule to induce apoptosis through the intrinsic mitochondrial pathway.[15] The crucial event in the initiation of this pathway is mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP), leading to the release of signaling molecules from the intermembrane space into the cytosol.[16] This process is controlled by members of the B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) protein family.[17] This family has pro-apoptotic members, classified into 'effectors' (Bcl-2-associated X protein (Bax) and Bak), which participate directly in membrane permeabilization, and 'Bcl-2-homology domain 3 (BH3)-only members' (Puma, Noxa, Bad, Bim and Bid), which act as 'direct activators' or 'sensitizers' of the apoptotic pathway.[18] However, this family also has anti-apoptotic members, such as Bcl-2, B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL) and myeloid cell factor-1 (Mcl-1), which antagonize MOMP. The levels of the pro-apoptotic Bcl-2 family proteins Bax, Noxa, Bid and Puma are directly regulated by p53.[19]

The p53 pathway is frequently disrupted in Burkitt's lymphoma (BL) cells, and this disruption is now considered

[1]UMR 8126 CNRS, Univ Paris-Sud, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France
*Corresponding author. J Wiels, UMR 8126 CNRS, Univ Paris-Sud, Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, Villejuif, Cedex 94805, France. Tel. +33 1 4211 4740, Fax: +33 1 4211 5494; E-mail: wiels@igr.fr
[2]These authors contributed equally to this work.
[3]Current address: INSERM U682, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg, France
[4]Current address: Molecular Cell Biology Laboratory, Department of Genetics, The Smurfit Institute, Trinity College, Dublin, Ireland
Keywords: p53; Bax; Bcl-2; EBV; apoptosis; Burkitt's lymphoma
Abbreviations: Bax, Bcl-2-associated X protein; Bcl-xL, B-cell lymphoma-extra large; Bcl-2, B-cell lymphoma 2; BH3, Bcl-2-homology domain 3; caspase, cysteinyl aspartate-specific protease; $DiOC_6(3)$, 3′-dihexyloxacarbocyanine iodide; BL, Burkitt's lymphoma; EBV, Epstein–Barr virus; PI, propidium iodide; LCL, lymphoblastoid cell lines; LMP, latent membrane protein; Mcl-1, myeloid cell factor-1; MDM2, murine double minute-2; MFI, mean fluorescence intensity; MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization; NF-κB, nuclear factor-κ B; PARP, poly (ADP-ribose) polymerase
Received 26.1.11; revised 15.6.11; accepted 16.6.11; Edited by A Stephanou

as an essential part of the tumorigenic process.[20] In a previous study, we therefore investigated the consequences of activating wt p53 and determined whether Epstein–Barr virus (EBV) infection of the cells had an effect on these consequences.[21] The EBV genome is present in the vast majority of BL cases. The virus remains latent in infected tumor cells, producing only a very small number of viral proteins.[22] Most EBV-infected BL cells harbor the latency I phenotype (Epstein–Barr nuclear antigen 1 (EBNA1) is the only viral protein produced). However, cases with the latency III profile (all latent EBV proteins are produced: EBNA1, 2, 3a, 3b, 3c, EBNA leader protein, latent membrane protein 1 (LMP1) and 2 (LMP2)) have also been identified.[23] Latent EBV does not specifically target p53, but it nonetheless interferes with cell cycle checkpoints regulated by p53 in the G1/S and G2/M phases[24] and modulates p53-induced apoptosis.[25] We have shown that, regardless of EBV status, the treatment of BL cells with nutlin-3 induces p53 activation, as shown by the induction of $p21^{WAF1}$ MDM2 and Bax. However, although nutlin-3-treated EBV (−) BL cells display massive apoptosis, latency III EBV (+) cells are much more resistant.[21]

In this study, we investigated the mechanism responsible for the resistance to p53-mediated apoptosis induced by EBV in lymphoid cells. We analyzed two types of EBV (+) latency III cells: BL cells and lymphoblastoid cell lines (LCLs), a recognized model for the study of post-transplantation lymphoproliferative disorders. Both types of cell were found to be more resistant to treatment with nutlin-3 than EBV (−) cells. In EBV (−) cells, Bax was activated by nutlin-3 treatment, promoting apoptosis. By contrast, in EBV (+) latency III cells, Bax accumulated in mitochondria but was poorly activated by nutlin-3. Our findings indicate that Bcl-2 is selectively overproduced in these cells and forms stable complexes with Bax. Treatment with nutlin-3 has no significant impact on these complexes. Finally, we also demonstrated that ABT-737, a potent and selective small molecule that binds and antagonizes Bcl-xl, Bcl-2 and Bcl-w, sensitizes EBV (+) latency III cells to nutlin-3 treatment.

Results

Latency III EBV (+) cells are more resistant than EBV (−) cells to p53-dependent apoptosis. We have previously shown that, in BL cell lines, the induction of apoptosis by nutlin-3 depends on the EBV status of the cells: EBV (−) and EBV (+) latency I cells are highly sensitive to this antagonist of MDM2, whereas EBV (+) latency III cells are much more resistant.[21] We investigated whether other EBV (+) latency III cells were also resistant to p53-dependent apoptosis by evaluating the response to nutlin-3 treatment in LCLs. All cell lines were treated with 10 μM nutlin-3 for 24 h and apoptosis was assessed by flow cytometry after labeling the cells with annexin-V-FITC and propidium iodide (PI). Nutlin-3 induced slightly higher levels of apoptosis in LCL (52 ± 10%, 49 ± 4%, 48 ± 7% apoptotic cells for RPMI8866, Priess and Remb1 cells, respectively) than in latency III BL cell lines (40 ± 4%, 18 ± 5%, 36 ± 2%, for BL2/B95, Seraphina and LY47 cells, respectively) but these levels of apoptosis remained lower than those in EBV (−) BL cell lines (76 ± 4%, 95 ± 4% for BL2 and BL28 cells, respectively; Figure 1a).

We characterized the apoptotic cell death induced by nutlin-3 in more detail by measuring the loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta_{\Psi m}$) by flow cytometry with the carbocyanine dye 3′-dihexyloxacarbocyanine iodide ($DiOC_6(3)$). Loss of $\Delta_{\Psi m}$ occurs early in apoptosis and was therefore measured after 16 h of treatment with nutlin-3. In EBV (−) BL cells treated with nutlin-3, mitochondrial depolarization was observed in 53 ± 6 % of BL2 cells and 89 ± 5% of BL28 cells (Figure 1b). By contrast, in EBV (+) latency III cells (BL and LCL), the loss of $\Delta_{\Psi m}$ was much milder, with 25 ± 2%, 9 ± 3%, 5 ± 4%, 19 ± 4%, 22 ± 1%, 23 ± 2 % mitochondrial depolarization in BL2/B95, Seraphina, LY47, RPMI8866, Priess and Remb1 cells, respectively.

We then carried out western blotting to assess the cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), a DNA repair enzyme directly targeted by caspase-3 (cysteinyl aspartate-specific protease-3). After 7 h of treatment with nutlin-3, the 85 kDa PARP cleavage product was observed in EBV (−) BL2 and BL28 cell extracts, whereas no cleavage was observed in EBV (+) BL and LCL extracts, except for Remb1 cells, in which low levels of cleavage were detected (Figure 1c). After 24 h of treatment, PARP was almost totally (BL2) or totally (BL28) cleaved in EBV (−) cells. By contrast, in EBV (+) cells, PARP cleavage occurred either at very low rates (BL2/B95, RPMI8866, Priess and Remb1 cells) or not at all (Seraphina and LY47 cells). Thus, both BL and LCL latency III EBV (+) cells are more resistant than EBV (−) cells to p53-mediated apoptosis.

The activation of p53 increases Bax levels similarly in EBV (−) and EBV (+) cell lines. In susceptible EBV (−) BL cells, nutlin-3-induced apoptosis involves permeabilization of the mitochondrial outer membrane. This mechanism is generally controlled and mediated by Bcl-2 family proteins. The pro-apoptotic protein Bax, encoded by a p53 target gene, is one member of this family. We showed in a previous study that nutlin-3 activated the p53 pathway similarly in all BL cell lines.[21] In this study, we measured the accumulation of Bax in both EBV (−) BL cell lines and EBV (+) latency III BL and LCL treated with nutlin-3 for various periods of time (3, 7 or 24 h). Western blot analysis was carried out to determine the levels of p53 (as a control of its activation) and of Bax. Bax-specific bands were quantified by densitometry and normalized with respect to β-actin levels. In all cell lines, treatment with nutlin-3 induced a gradual increase in Bax levels until 24 h of treatment (Figure 2). These results are consistent with our previous findings and confirm that the accumulation of Bax in response to p53 activation is not correlated with the EBV status of the cells and that the resistance of EBV (+) cells to apoptosis does not result from a defect in Bax accumulation.

Following p53 activation, Bax accumulates in the mitochondria of latency III EBV (+) cells but is not activated. For Bax to be active, it must be translocated from the cytosol (where it is found in healthy cells) to the outer mitochondrial membrane. The redistribution of Bax was assessed by western blot analysis of the mitochondrial and

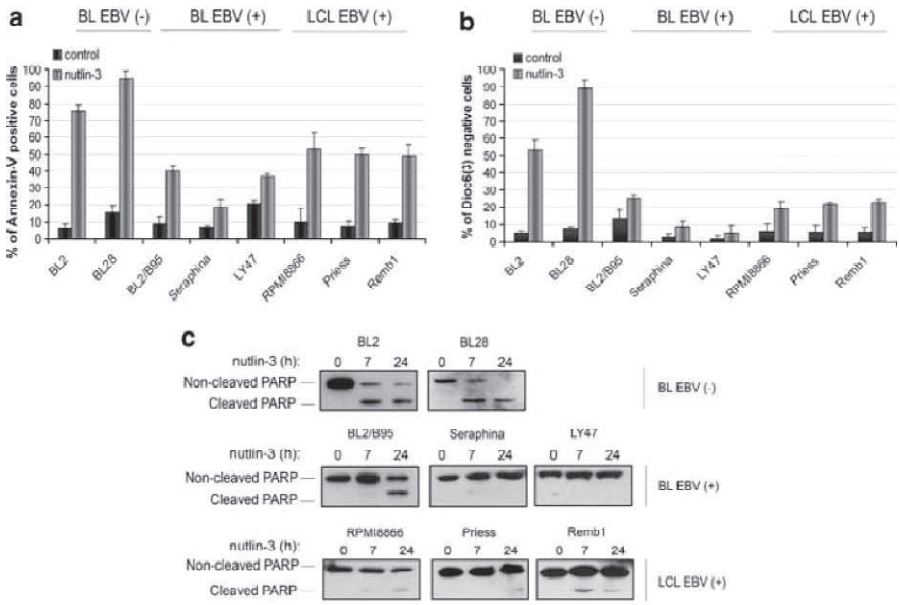


Figure 1 Effect of nutlin-3 treatment on the induction of apoptosis in Epstein–Barr virus (EBV) (−), EBV (+) Burkitt's lymphoma (BL) and lymphoblastoid cell lines (LCLs). (**a**) Cells were treated with 10 μM nutlin-3 or with the solvent dimethyl sulfoxide for 24 h. The cells were labeled with annexin V-FITC and PI and analyzed with a FACSCalibur flow cytometer to determine the percentage of cells that were apoptotic. The values presented (means ± s.d.) are from three independent experiments. (**b**) Cells were treated with 10 μM nutlin-3 or the solvent dimethyl sulfoxide for 16 h. The cells were stained with $DiOC_6(3)$ and analyzed on a FACSCalibur flow cytometer. $DiOC_6(3)$ stains mitochondria in a potential-dependent fashion. Cells with a low $\Delta\Psi_m$ are therefore only weakly fluorescent, and are described as '$DiOC_6(3)$ negative'. The values presented (means ± s.d.) are from three independent experiments. (**c**) Cells were treated with 10 μM nutlin-3 for the indicated periods of time. Apoptosis levels were determined by assessing polyadenosine diphosphate-ribose polymerase (PARP) cleavage on western blots. Results are representative of at least three independent experiments

cytosolic fractions of untreated cells and of cells treated with nutlin-3 for 24 h (Figure 3a). Fractionation quality was checked by probing blots with antibodies recognizing proteins known to be localized to mitochondria (Bcl-2) or the cytosol (vinculin). Bax-specific bands were then quantified by densitometry and the results were normalized with respect to Bcl-2 or vinculin levels. In EBV ( ) BL cells, nutlin-3 treatment either strongly decreased the amount of Bax in the cytosolic fractions (BL2) or resulted in this protein being undetectable (BL28) in these fractions, whereas Bax levels in the mitochondrial fractions clearly increased. By contrast, in EBV (+) cell lines (BL and LCL), Bax accumulated in both the cytosolic and mitochondrial fractions after treatment with nutlin-3.

We investigated whether the Bax accumulating in the mitochondria was in the activated form by labeling cells with the 6A7 conformation-specific Bax mAb (Figure 3b). This antibody recognizes an N-terminal epitope of Bax that is occluded in the inactive form of the protein but exposed after the activation and insertion of the protein into membranes.[26] After treatment with nutlin-3, 52% of EBV (−) BL2 cells were positive for 6A7 labeling (mean fluorescence intensity (MFI): 105 *versus* 48 for control), whereas latency III EBV (+) cells were only weakly stained (2% (MFI: 38 *versus* 36), 25% (MFI: 66 *versus* 39) and 32% (MFI: 68 *versus* 28) for LY47, BL2/B95 and Remb1 cells, respectively).

To confirm that the activation of Bax is involved in nutlin-3-mediated apoptosis of BL2 cells, we next inhibited the production of this protein with a specific small-interfering RNA, treated the cells with nutlin-3 and then measured apoptosis levels by assessing PARP cleavage on western blots. In BL2 cells with low levels of Bax, lower levels of PARP cleavage were observed than in controls cells (Supplementary Figure 1). These data show that, in EBV (−) cells treated with nutlin-3, Bax accumulates in mitochondria in its activated form and takes part in the apoptotic process. By contrast, in EBV ( ) latency III cells, most of the Bax accumulating in the mitochondria is not in the active conformation.

Bcl-2 is overproduced in latency III EBV (+) cells. At least three EBV-encoded proteins (LMP1, LMP2A and EBNA2) have been shown to induce the upregulation of various anti-apoptotic Bcl-2 family members able to sequester Bax.[27–29] We therefore carried out western blotting to evaluate the endogenous levels of these anti-apoptotic proteins (Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1) in our cell lines (Figure 4). There was no direct correlation between the EBV status of the various cell lines and basal levels of Bcl-xL or Mcl-1. By contrast, a strong correlation was observed between basal levels of Bcl-2 and EBV status: all latency III EBV (+) cells contained high levels of Bcl-2, whereas EBV (−) cells had low levels of this protein. To confirm that high levels of Bcl-2 were correlated with LMP1 expression,[28] we also assessed the level of this viral protein. Large amounts of LMP1 were observed in all EBV (+) cell lines except BL2/B95, which had only low levels of this protein. As LMP1 has also been shown to induce the downregulation of Bax,[30] we determined endogenous Bax levels in our various cell lines. No correlation was observed between the EBV status and Bax levels.

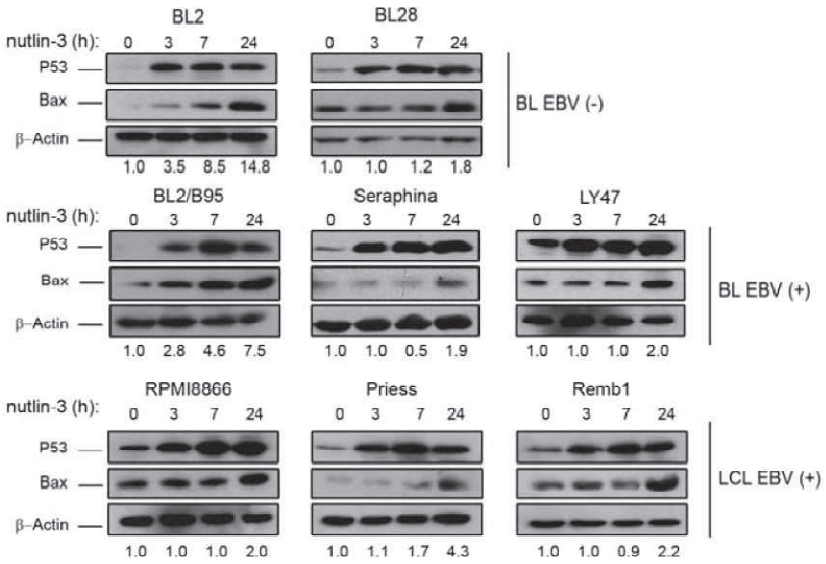


Figure 2 Effect of nutlin-3 treatment on p53 and Bax levels in Burkitt's lymphoma (BL) and lymphoblastoid cell lines (LCLs). Cells were treated with 10 μM nutlin-3 for the indicated periods of time. The levels of p53 and Bax protein were assessed by western blot analysis. Fold-change values for Bax *versus* the untreated control (0 h), normalized with respect to β-actin levels are shown under the blots

Bcl-2 interacts with Bax in latency III EBV (+) cells, but not in EBV (−) cells. We investigated the role of Bcl-2 in the resistance to apoptosis observed in latency III EBV (+) cells by studying the interactions between Bax and Bcl-2. BL2 EBV (−) cells and BL2/B95 EBV (+) cells (which differ only in terms of their EBV status) were left untreated or treated with nutlin-3 for 7 h. Proteins were then extracted and immunoprecipitation was carried out with an anti-Bax pAb. The immunoprecipitates were then probed for Bax and Bcl-2 (Figure 5). These western blots showed that treatment with nutlin-3 induced a stronger accumulation of Bax in BL2 than in BL2/B95 cells, but that Bcl-2 was coprecipitated with Bax only in BL2/B95 cells, with nutlin-3 treatment having no significant impact on this co-immunoprecipitation. Thus, in EBV (+) latency III cells, Bax and Bcl-2 form stable complexes that may be at least partly responsible for the resistance to apoptosis.

An inhibitor of Bcl-2 disrupts the interactions between Bax and Bcl-2 and allows Bax activation in BL2/B95 EBV (+) cells treated with nutlin-3. We investigated the involvement of interactions between Bax and Bcl-2 in resistance to nutlin-3-induced apoptosis using ABT-737, a BH3 mimetic that antagonizes pro-survival members of the Bcl-2 family, promoting the release of Bax.[31] We first investigated the effect of this Bcl-2 inhibitor on Bax/Bcl-2 interaction. BL2/B95 EBV (+) cells were treated for 1 h with ABT-737 (10 μM), incubated with nutlin-3 for 7 h and protein extracts were prepared. We then assessed Bax and Bcl-2 levels by western blotting and interaction between these two molecules by co-immunoprecipitation. Treatment with ABT-737 had no effect on Bcl-2 or Bax levels (Figure 6a), but abolished the co-immunoprecipitation of Bax with Bcl-2, in both untreated cells and cells treated with nutlin-3 (Figure 6b).

We also evaluated the effect of treatment with ABT-737 on the distribution of Bax in untreated cells and cells treated with nutlin-3. ABT-737 decreased the accumulation of Bax in the cytosol induced by nutlin-3 alone and concomitantly increased the level of Bax in the mitochondria (Figure 6c). We investigated whether the Bax accumulating in the mitochondria was in the activated form by labeling the cells with the 6A7 conformation-specific Bax mAb (Figure 6d). After treatment with ABT-737 alone or nutlin-3 alone, 10% (MFI: 39 *versus* 31) and 23% (MFI: 62) of BL2/B95 cells, respectively, were weakly positive for 6A7 labeling, whereas when the two compounds were used in combination, 41% (MFI: 74) of the cells were strongly labeled with the 6A7 mAb. Thus, a combined treatment with ABT-737 and nutlin-3 induces the release of Bax from the Bax/Bcl-2 complexes and its activation in mitochondria.

An inhibitor of Bcl-2 restores the susceptibility of latency III EBV (+) cells to p53-dependent apoptosis. We then used flow cytometry to determine whether treatment with ABT-737 sensitized the EBV (+) latency III BL and LCL cells to nutlin-3-induced apoptosis (Figure 7a). Consistent with our previous observations, treatment with nutlin-3 for 24 h induced $<50\%$ apoptosis in these cells. Treatment with ABT-737 (10 μM) alone had no cytotoxic effect on BL2/B95 and Seraphina cells but induced $42\pm7\%$ apoptosis in LY47 cells. An even stronger effect was observed in LCL cells, in which treatment with 10 μM ABT-737 for 24 h induced $>70\%$ apoptosis (data not shown). In these cell lines, we therefore decreased the concentration of ABT-737 used to reduce its cytotoxic effect. Treatment with 0.25 μM ABT-737 induced $32\pm8\%$, $47\pm3\%$ and $39\pm2\%$ apoptosis in RPMI8866, Priess and Remb1 cells, respectively. When the two drugs were used in combination, a synergic effect on the induction of apoptosis was observed in BL2/B95 and Seraphina cells ($78\pm5\%$ and $81\pm3\%$ apoptotic cells, respectively). In the other cell lines, no synergy between ABT-737 and nutlin-3 was observed, these

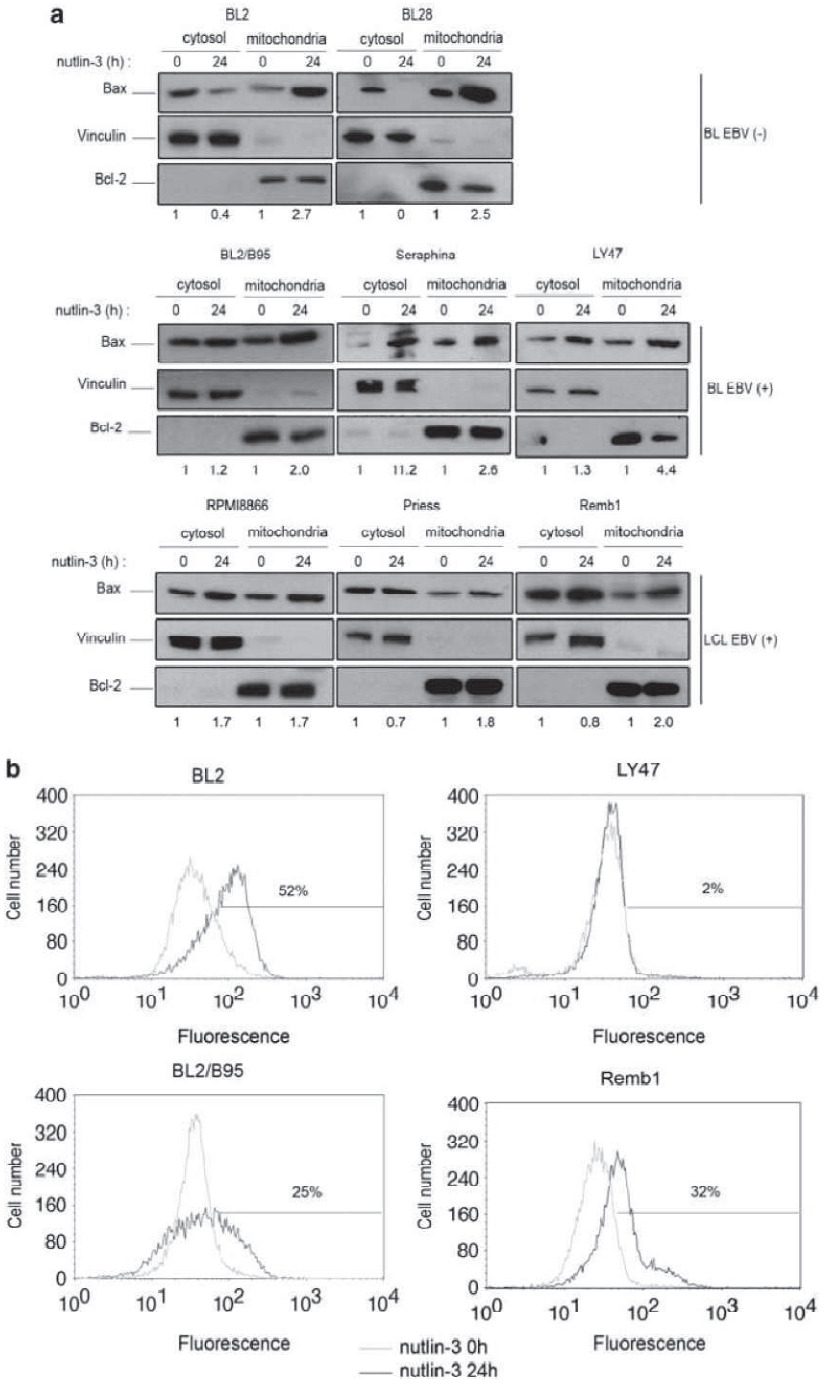


Figure 3 Effect of nutlin-3 treatment on Bax relocalization and activation in EBV (−) and EBV (+) cells. (**a**) Cells were treated with 10 μM nutlin-3 or the solvent dimethyl sulfoxide for 24 h. Cytosolic and mitochondrial fractions were analyzed by western blotting with an anti-Bax pAb. Vinculin and Bcl-2 were used as cytosolic and mitochondrial markers, respectively. Fold-change values *versus* the untreated control (0 h), after normalization with respect to vinculin or Bcl-2 protein levels, are shown under the blots. Results are representative of three independent experiments. (**b**) BL2 EBV (−) cells and BL2/B95, LY47 and Remb1 EBV (+) cells were treated with 10 μM nutlin-3 or the solvent dimethyl sulfoxide for 24 h. Cells were fixed in 0.25% paraformaldehyde and labeled with a conformation-specific 6A7 Bax antibody, which recognizes only the active conformation of the protein and Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG. Cells were then analyzed with a FACSCalibur flow cytometer

compounds instead having an additive effect (65 ± 1%, 71 ± 8%, 73 ± 7% and 81 ± 5% apoptosis in LY47, RPMI8866, Priess and Remb1 cells, respectively). We also evaluated the effect of nutlin-3 and ABT-737 on three cell lines originating from the same individual: BL40, BL40/B95 and IARC 211. BL2 and BL2/B95 were used as controls. Apoptosis was determined by assessing PARP cleavage on western blots (Figure 7b). No cleavage of PARP was

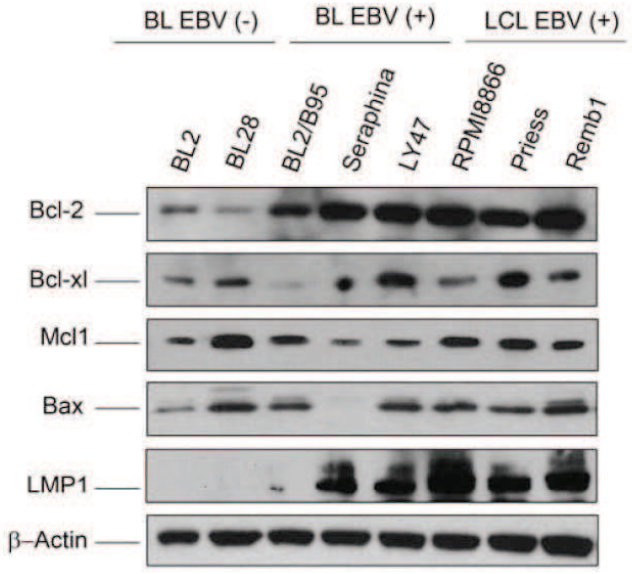


Figure 4 Levels of Bcl-2 family members in EBV (−) and EBV (+) lymphoid cell lines. Levels of the Bax, Bcl-2, Bcl-xl and Mcl-1 proteins as well as these of the viral LMP1 protein were assessed by western blot analysis

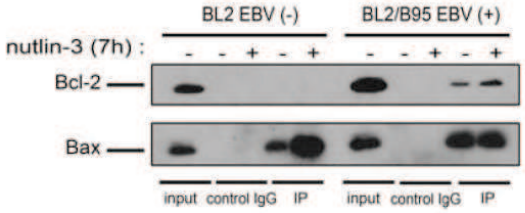


Figure 5 Interaction of Bax with Bcl-2 in BL2 EBV (−) and BL2/B95 EBV (+) cells untreated or treated with nutlin-3. Cells were treated with 10 μM nutlin-3 or the solvent dimethyl sulfoxide for 7 h. Lysates were subjected to immunoprecipitation with agarose-conjugated anti-Bax pAb (IP) or agarose-conjugated control rabbit IgG (IgG control) and then subjected to western blotting with an anti-Bcl-2 mAb or an anti-Bax pAb. As a control for protein levels before IP, a portion of cell lysate (input) corresponding to 15% of the input for IP was also included in the western blot. All results are representative of three independent experiments

observed after treatment with ABT-737 alone in BL2 and BL2/B95 cells, whereas a strong or partial cleavage was observed in BL40, BL40/B95 and IARC 211 cells. Treatment with nutlin-3 alone induced strong (BL2) or complete (BL40) cleavage of PARP in EBV (−) cell lines, moderate cleavage in BL2/B95 cells and almost no cleavage in BL40/B95 and IARC 211 cells. As expected, treatment with both compounds had an additive effect on cell viability and PARP was totally cleaved in all cell lines.

Finally, as EBV reactivation might also reduce cell viability, we tested the effects of nutlin-3 and ABT-737 on production of the viral BZLF1 protein, a transcriptional activator that mediates the transition between the latent and lytic cycles of EBV. Except in LY47 cells, in which nutlin-3 slightly increased the very low basal levels of BZLF1 protein, nutlin-3, ABT-737 and the combination of these two molecules were unable to induce the production of this protein in any of the EBV (+) cell lines tested, (Supplementary Figure 2). Thus, a combined treatment with ABT-737 and nutlin-3 efficiently induces the apoptosis of latency III EBV (+) cells producing large amounts of Bcl-2 protein, without affecting the latent stage of the virus.

Discussion

The activation of wt p53, or even the reactivation of mutant p53, alone or in combination with cytotoxic agents (chemotherapy drugs or radiation) is now considered a promising new approach for cancer treatment.[15,32] Various elements must be considered during the development of such new therapies, including the cellular context, which may greatly modulate the consequences of p53 activation. In this study, we showed that the type III latent EBV infection of lymphoid cells does not prevent the p53 activation induced by an inhibitor of Mdm2, but strongly decreases p53-induced apoptosis. We also found that the activation of p53 induced Bax accumulation similarly in all cell lines and that this pro-apoptotic member of the Bcl-2 family was involved in the apoptotic pathway in EBV (−) cell lines. Bax is primarily a cytosolic protein in healthy living cells. Following the induction of apoptosis, it undergoes a conformational change and is translocated to the mitochondria.[33] After nutlin-3 treatment, Bax underwent conformational changes and relocalization in EBV (−) cells, whereas in EBV (+) cells, it accumulated in both the cytosol and the mitochondria but underwent no conformational changes. Thus, the accumulation of Bax in the mitochondria of EBV (+) cells is not sufficient to induce apoptosis.

Several studies have shown that latent infection with EBV protects cells from apoptosis. For example, the viral proteins LMP1 and LMP2A have been shown to upregulate various anti-apoptotic members of the Bcl-2 family by activating the nuclear factor-κ B (NFκB) pathway,[28] or to inhibit the transcription of the pro-apoptotic Bax protein.[30] We determined the endogenous levels of Bax, Bcl-2, Bcl-xl and Mcl-1 in our cell lines. Consistent with the results of Rowe *et al.*,[28] we observed a strong correlation between basal Bcl-2 level and EBV status: all latency III EBV (+) cells had high levels of Bcl-2, whereas EBV (−) cells had low levels of this protein. By contrast, Bax levels, similar to those of Bcl-xl and Mcl-1, were variable in all cell lines, regardless of EBV status. It has been reported that Bcl-2 inhibits both changes in the conformation of the N-terminus of Bax and the translocation of Bax from the cytosol to the mitochondria.[34,35] Our results are consistent with these observations, as we observed no specific translocation of Bax to the mitochondria after the treatment with nutlin-3 of cells overproducing Bcl-2. We also showed that Bcl-2 interacted with Bax in EBV (+) cells, but not in EBV (−) cells. This sequestration of Bax may account, at least in part, for the resistance to nutlin-3 observed in EBV (+) latency III cells. Our results are also consistent with those of Forte and Luftig,[36] who previously showed that, in LCL, nutlin-3 induced p53 activation and a moderate level of apoptosis (around 40% of annexin-V (+) cells after 48 h of treatment), which was enhanced by previous treatment of the cells with an inhibitor of NFκB activity. They showed that NFκB activity controlled steady-state levels of MDM2 protein and concluded that the NFκB inhibitor sensitized cells to nutlin-3 by decreasing MDM2 levels. However, as the upregulation of

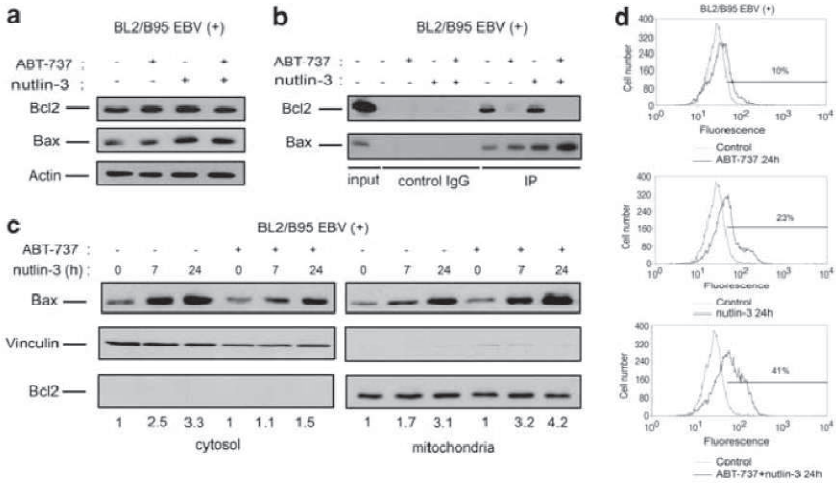


Figure 6 Effect of a combination of nutlin-3 and ABT-737 in the EBV (+) cell lines. BL2B95 EBV (+) cells were or were not subjected to prior treatment with 10 μM ABT-737 for 1 h, and were then treated with nutlin-3 for 7 h. (**a**) The levels of Bcl-2 and Bax proteins were assessed by western blot analysis. (**b**) Lysates were subjected to immunoprecipitation with agarose-conjugated anti-Bax pAb (IP) or agarose-conjugated control rabbit IgG (IgG control) and then subjected to western blotting with an anti-Bcl-2 mAb or an anti-Bax pAb. As a control for protein levels before IP, a portion of cell lysate (Input) corresponding to 15% of the input for IP was also included in the western blot. All results are representative of three independent experiments. (**c**) BL2/B95 EBV (+) cells were or were not subjected to prior treatment with 10 μM ABT-737 for 1 h and were then treated with nutlin-3 for the indicated periods of time. Cytosolic and mitochondrial fractions were analyzed by western blotting with an anti-Bax pAb. Vinculin and Bcl-2 were used as cytosolic and mitochondrial markers, respectively. Fold-change values *versus* the untreated control (0 h), after normalization with respect to the levels of vinculin or Bcl-2 protein, are shown under the blots. The results shown are representative of three independent experiments. (**d**) BL2/B95 cells were or were not subjected to prior treatment with ABT-737 for 1 h and were then left untreated or treated with nutlin-3 for 24 h. Cells were fixed in 0.25% paraformaldehyde and labeled with a conformation-specific 6A7 Bax antibody, which recognizes only the active conformation of the protein and Alexa 488-conjugated goat anti-mouse IgG. Cells were then analyzed with a FACSCalibur flow cytometer

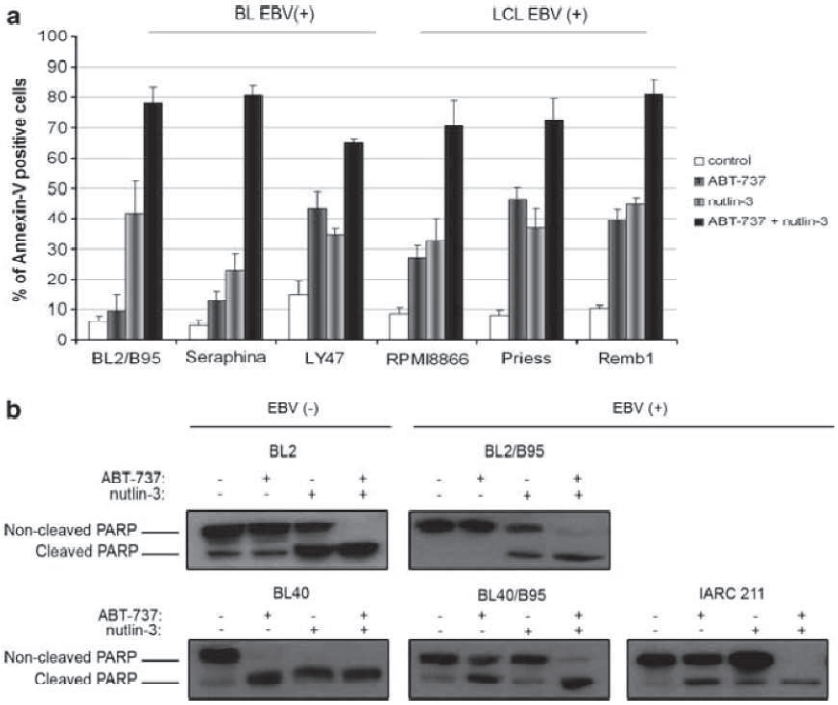


Figure 7 Effect of a combination of nutlin-3 and ABT-737 on the induction of apoptosis in EBV (+) Burkitt's lymphoma (BL) and lymphoblastoid cell lines (LCL). (**a**) EBV (+) cell lines were or were not subjected to prior treatment with ABT-737 (BL2/B95, Seraphina, LY47: 10 μM; 8866, Priess, Remb1: 0.25 μM) for 1 h and were then left untreated or treated with nutlin-3 for 24 h. The cells were labeled with annexin V-FITC and PI and analyzed with a FACSCalibur flow cytometer, to determine the percentage of cells that were apoptotic. The values presented (means ± s.d.) are from three independent experiments. (**b**) Cell lines were treated as in (**a**) and apoptosis levels were determined by assessing polyadenosine diphosphate-ribose polymerase (PARP) cleavage on western blots. Results are representative of at least three independent experiments

Bcl-2 in B cells containing LMP1 is due to NFκB activation,[28,37] it could also be deduced from their data that the NFκB inhibitor sensitizes cells by decreasing Bcl-2 levels.

ABT-737 is a BH3 mimetic that efficiently antagonizes various pro-survival members of Bcl-2 family and promotes the release of Bax and Bak.[31] In latency III EBV (+) cells, the disruption of Bax/Bcl-2 interaction by treatment with ABT-737 before nutlin-3 treatment promoted the relocalization of Bax to the mitochondria and its activation. Treatment with these two compounds also strongly induced the apoptosis of these cells. The combined inhibition of the MDM2 and Bcl-2 proteins has been reported to strongly induce apoptosis in acute myelogenous leukemia cells overproducing Bcl-2[38] and in tumors (including BL) in which Idmx limits the p53 activation induced by nutlin-3.[39] Combined treatment with nutlin-3 and an inhibitor of the anti-apoptotic members of the Bcl-2 family, such as ABT-737, may therefore constitute an attractive new treatment strategy for tumors harboring wild-type p53 but with defects in the p53-induced apoptotic pathway. *In vivo* studies in murine models are now required to evaluate the effects of this combined treatment in terms of side effects and tumor regression and to compare these effects with those of conventional chemotherapy.

Concerning latency III EBV (+) cells, it will also be interesting to use *in vivo* models to assess the efficiency of ABT-737 alone, as we found that, even at very low doses, this compound promoted apoptosis in LCL cells. This treatment may be particularly beneficial in patients with EBV (+) post-transplant lymphoproliferative disorder or nasopharyngeal carcinoma, because both these types of tumor overproduce Bcl-2 or Bcl-xL.[40]

Materials and Methods

Cell lines. All BL cell lines were originally established from endemic or sporadic cases of BL. BL2, BL28, BL40, BL2/B95, BL40/B95 and LY47 were kindly provided by the International Agency for Research on Cancer (IARC, Lyon); Seraphina cells were provided by Professor G Klein (Stockholm); BL2/B95 and BL40/B95 cells were generated by stable infection of the original EBV (−) BL2 and BL40 cells with the B95-8 EBV strain. LCLs were obtained by the *in vitro* immortalization of normal B lymphocytes. IARC 211 cells were established from the normal B lymphocytes of patient BL40 and were obtained from IARC. Priess and Rembl cells were kindly provided by Dr JG Bodmer (London). These cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (PAA) containing 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 20 mM glucose, 100 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin and supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum.

Antibodies and reagents. Nutlin-3 was obtained from Cayman Chemical (SPI-Bio, Montigny-le-Bretonneux, France); ABT-737 was kindly provided by Abbott Laboratories (Chicago, IL, USA).

PARP mAb (Ab-2, clone c-2-10) and anti-p53 mAb (Ab-6, OP43) were purchased from Calbiochem (Meudon, France). Anti-Bax pAb (N-20), anti-Bcl-2 mAb (clone 100), anti-Mcl-1 mAb (clone 22), anti-Bcl-xl mAb (7B2.5) and anti-BZLF1 mAb (BZ1) were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg, Germany). Anti-vinculin (clone VIN-11-5) and anti-β actin (clone AC-74) mAbs were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Anti-LMP1 mAb (CS1-4) was obtained from Dako France SAS (Trappes, France). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit anti-mouse IgG and HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG for western blotting were purchased from GE Healthcare (Velizy, France) and Jackson ImmunoResearch Laboratories (Newmarket, UK), respectively.

Induction and quantification of apoptosis. We treated 0.5×10^6 cells for various periods of time, at 37 °C, with nutlin-3 (10 μM), ABT-737 (10 μM) or both these compounds. Cells were washed in PBS, resuspended in annexin buffer (10 mM HEPES/NaOH (pH 7.4), 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1.8 mM $CaCl_2$) supplemented with 2.5 μg/ml FITC-labeled annexin-V (Roche Applied Science, Meylan, France) and incubated at room temperature for 10 min. Cells were then washed, resuspended in annexin buffer supplemented with PI (10 μg/ml) and analyzed by flow cytometry ($n = 10\,000$; FACSCalibur, Becton-Dickinson, Pont-de-Claix, France). Annexin-V-positive cells (PI negative or PI positive) were considered to be apoptotic.

Determination of mitochondrial membrane potential. After treatment with nutlin-3, ABT-737 or both these compounds, for various periods of time, $DIOC_6(3)$ was added (40 nm) and cells were incubated for an additional 30 min at 37 °C. Cells were washed, resuspended in PBS supplemented with PI and analyzed by flow cytometry ($n = 10\,000$; FACSCalibur, Becton-Dickinson).

Intracellular labeling. Cells (2×10^6), either untreated or treated with nutlin-3 (10 μM), were fixed by incubation in 0.25% paraformaldehyde for 20 min at room temperature. They were then washed twice and stained with primary antibody (monoclonal anti-Bax antibody, clone 6A7, Sigma-Aldrich) in digitonin (200 μg/ml) for 30 min at room temperature. The cells were then washed again with PBS and incubated for 30 min with goat anti-mouse IgG conjugated to Alexa 488 (GAM-Alexa-488, Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). Samples were than analyzed on a FACSCalibur flow cytometer. Cells labeled with GAM-Alexa-488 only were used as a control.

Preparation of mitochondrial and cytosolic fractions. We resuspended 2×10^6 cells in 100 μl of ice-cold cell lysis and mitochondria intact buffer (250 mM sucrose, 70 mM KCl, 200 μg/ml digitonin) and incubated the suspension at 4 °C for 5 min. The samples were then centrifuged at $1000 \times g$ for 5 min at 4 °C. The supernatants (cytosolic fractions) were recovered and stored at −80 °C. The pellets were resuspended in 50 μl of IP buffer (30 mM Tris HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.2% Triton × 100, 0.3% NP40, complete protease inhibitor cocktail) and incubated for 10 min at 4 °C. The suspension was then centrifuged at $10\,000 \times g$ for 10 min at 4 °C and the supernatants (mitochondrial fractions) were stored at −80 °C until use.

Immunoprecipitation. We subjected 5×10^6 cells to disruption by sonication (10 s on ice) in 1 ml of CHAPS buffer (1% CHAPS, 1 M Hepes, 5 M NaCl, complete protease inhibitor cocktail). We mixed the resulting lysates with 2 μg of agarose-conjugated rabbit anti-Bax pAb (clone N-20) or agarose-conjugated control rabbit IgG pAb (Santa Cruz Biotechnology Inc.) and incubated the mixture overnight at 4 °C, with end-over-end rotation. Immune complexes were washed twice with ice-cold CHAPS buffer, twice with PBS and resuspended in loading buffer. The samples were boiled for 5 min and the proteins were separated by electrophoresis in 4–12% Bis-Tris precast gels (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and analyzed by western blotting.

Western-blot analysis. A pellet containing 1×10^6 cells was solubilized by incubation in ice-cold lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris (pH 7.4), 5 mM EDTA, 0.1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, complete protease inhibitor cocktail) for 10 min. Sample loading buffer was added and the mixture was boiled for 5 min. Proteins were separated by electrophoresis in 12% polyacrylamide gels or 4–12% Bis-Tris precast gels (Invitrogen) and transferred to PVDF membranes (Millipore, Molsheim, France). Blots were blocked by incubation overnight at 4 °C in 3% non-fat milk powder, 2% glycine in PBS and incubated for 1 h at room temperature with primary antibodies. The blots were then washed and incubated with HRP-conjugated RAM-IgG or HRP-conjugated DAR-IgG. Antibody complexes were detected by enhanced chemiluminescence (Millipore).

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. This work was supported by grants from the Fondation de France 00012093 (JW), the Cancéropole and Région Ile-de-France (ERABL, IF09-2092/R), the Association pour la recherche sur le Cancer 3454 (JW and EH) and the Université Paris-Sud 11 (BQR 2009). We thank Yann Lécluse for expert technical assistance in performing flow cytometry analysis.

1. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; **358**: 15–16.
2. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; **88**: 323–331.
3. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 594–604.
4. Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 1997; **420**: 25–27.
5. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 1992; **69**: 1237–1245.
6. Capoulade C, Bressac-de Paillerets B, Lefrere I, Ronsin M, Feunteun J, Tursz T *et al*. Overexpression of MDM2, due to enhanced translation, results in inactivation of wild-type p53 in Burkitt's lymphoma cells. *Oncogene* 1998; **16**: 1603–1610.
7. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992; **358**: 80–83.
8. Dickens MP, Fitzgerald R, Fischer PM. Small-molecule inhibitors of MDM2 as new anticancer therapeutics. *Semin Cancer Biol* 2010; **20**: 10–18.
9. Yang Y, Ludwig RL, Jensen JP, Pierre SA, Medaglia MV, Davydov IV *et al*. Small molecule inhibitors of HDM2 ubiquitin ligase activity stabilize and activate p53 in cells. *Cancer Cell* 2005; **7**: 547–559.
10. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z *et al*. *In vivo* activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004; **303**: 844–848.
11. Stuhmer T, Chatterjee M, Hildebrandt M, Herrmann P, Gollasch H, Gerecke C *et al*. Nongenotoxic activation of the p53 pathway as a therapeutic strategy for multiple myeloma. *Blood* 2005; **106**: 3609–3617.
12. Sarek G, Kurki S, Enback J, Iotzova G, Haas J, Laakkonen P *et al*. Reactivation of the p53 pathway as a treatment modality for KSHV-induced lymphomas. *J Clin Invest* 2007; **117**: 1019–1028.
13. Van Maerken T, Ferdinande L, Taildeman J, Lambertz I, Yigit N, Vercruysse L *et al*. Antitumor activity of the selective MDM2 antagonist nutlin-3 against chemoresistant neuroblastoma with wild-type p53. *J Natl Cancer Inst* 2009; **101**: 1562–1574.
14. Vassilev LT. MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends Mol Med* 2007; **13**: 23–31.
15. Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2008; **7**: 979–987.
16. Spierings D, McStay G, Saleh M, Bender C, Chipuk J, Maurer U *et al*. Connected to death: the (unexpurgated) mitochondrial pathway of apoptosis. *Science* 2005; **310**: 66–67.
17. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**: 47–59.
18. Chipuk JE, Green DR. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* 2008; **18**: 157–164.
19. Schuler M, Green DR. Transcription, apoptosis and p53: catch-22. *Trends Genet* 2005; **21**: 182–187.
20. Lindstrom MS, Wiman KG. Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma. *Semin Cancer Biol* 2002; **12**: 381–387.
21. Renouf B, Hollville E, Pujals A, Tetaud C, Garibal J, Wiels J. Activation of p53 by MDM2 antagonists has differential apoptotic effects on Epstein-Barr virus (EBV)-positive and EBV-negative Burkitt's lymphoma cells. *Leukemia* 2009; **23**: 1557–1563.
22. Thompson MP, Kurzrock R. Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 803–821.
23. Rowe M, Rowe DT, Gregory CD, Young LS, Farrell PJ, Rupani H *et al*. Differences in B cell growth phenotype reflect novel patterns of Epstein-Barr virus latent gene expression in Burkitt's lymphoma cells. *EMBO J* 1987; **6**: 2743–2751.
24. O'Nions J, Allday MJ. Epstein-Barr virus can inhibit genotoxin-induced G1 arrest downstream of p53 by preventing the inactivation of CDK2. *Oncogene* 2003; **22**: 7181–7191.
25. Okan I, Wang Y, Chen F, Hu LF, Imreh S, Klein G *et al*. The EBV-encoded LMP1 protein inhibits p53-triggered apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* 1995; **11**: 1027–1031.
26. Hsu YT, Youle RJ. Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem* 1998; **273**: 10777–10783.
27. Portis T, Longnecker R. Epstein-Barr virus (EBV) LMP2A mediates B-lymphocyte survival through constitutive activation of the Ras/PI3K/Akt pathway. *Oncogene* 2004; **23**: 8619–8628.
28. Rowe M, Peng-Pilon M, Huen DS, Hardy R, Croom-Carter D, Lundgren E *et al*. Upregulation of *bcl-2* by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell-specific response that is delayed relative to NF-kappa B activation and to induction of cell surface markers. *J Virol* 1994; **68**: 5602–5612.
29. Wang S, Rowe M, Lundgren E. Expression of the Epstein Barr virus transforming protein LMP1 causes a rapid and transient stimulation of the Bcl-2 homologue Mcl-1 levels in B-cell lines. *Cancer Res* 1996; **56**: 4610–4613.
30. Grimm T, Schneider S, Naschberger E, Huber J, Guenzi E, Kieser A *et al*. EBV latent membrane protein-1 protects B cells from apoptosis by inhibition of BAX. *Blood* 2005; **105**: 3263–3269.
31. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA *et al*. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* 2005; **435**: 677–681.
32. Famebo M, Bykov VJ, Wiman KG. The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; **396**: 85–89.
33. Nechushtan A, Smith CL, Hsu YT, Youle RJ. Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J* 1999; **18**: 2330–2341.
34. Murphy KM, Ranganathan V, Farnsworth ML, Kavallaris M, Lock RB. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ* 2000; **7**: 102–111.
35. Murphy KM, Streips UN, Lock RB. Bcl-2 inhibits a Fas-induced conformational change in the Bax N terminus and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem* 2000; **275**: 17225–17228.
36. Forte E, Luftig MA. MDM2-dependent inhibition of p53 is required for Epstein-Barr virus B-cell growth transformation and infected-cell survival. *J Virol* 2009; **83**: 2491–2499.
37. Feuillard J, Schuhmacher M, Kohanna S, Asso-Bonnet M, Ledeur F, Joubert-Caron R *et al*. Inducible loss of NF-kappaB activity is associated with apoptosis and Bcl-2 down-regulation in Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes. *Blood* 2000; **95**: 2068–2075.
38. Kojima K, Konopleva M, Samudio IJ, Schober WD, Bornmann WG, Andreeff M. Concomitant inhibition of MDM2 and Bcl-2 protein function synergistically induce mitochondrial apoptosis in AML. *Cell Cycle* 2006; **5**: 2778–2786.
39. Wade M, Rodewald LW, Espinosa JM, Wahl GM. BH3 activation blocks Hdmx suppression of apoptosis and cooperates with Nutlin to induce cell death. *Cell Cycle* 2008; **7**: 1973–1982.
40. Murray PG, Swinnen LJ, Constandinou CM, Pyle JM, Carr TJ, Hardwick JM *et al*. BCL-2 but not its Epstein-Barr virus-encoded homologue, BHRF1, is commonly expressed in posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Blood* 1996; **87**: 706–711.

Cell Death and Disease **is an open-access journal published by** ***Nature Publishing Group*****. This work is licensed under the Creative Commons Attribution-Noncommercial-No Derivative Works 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/**

Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Disease website (http://www.nature.com/cddis)

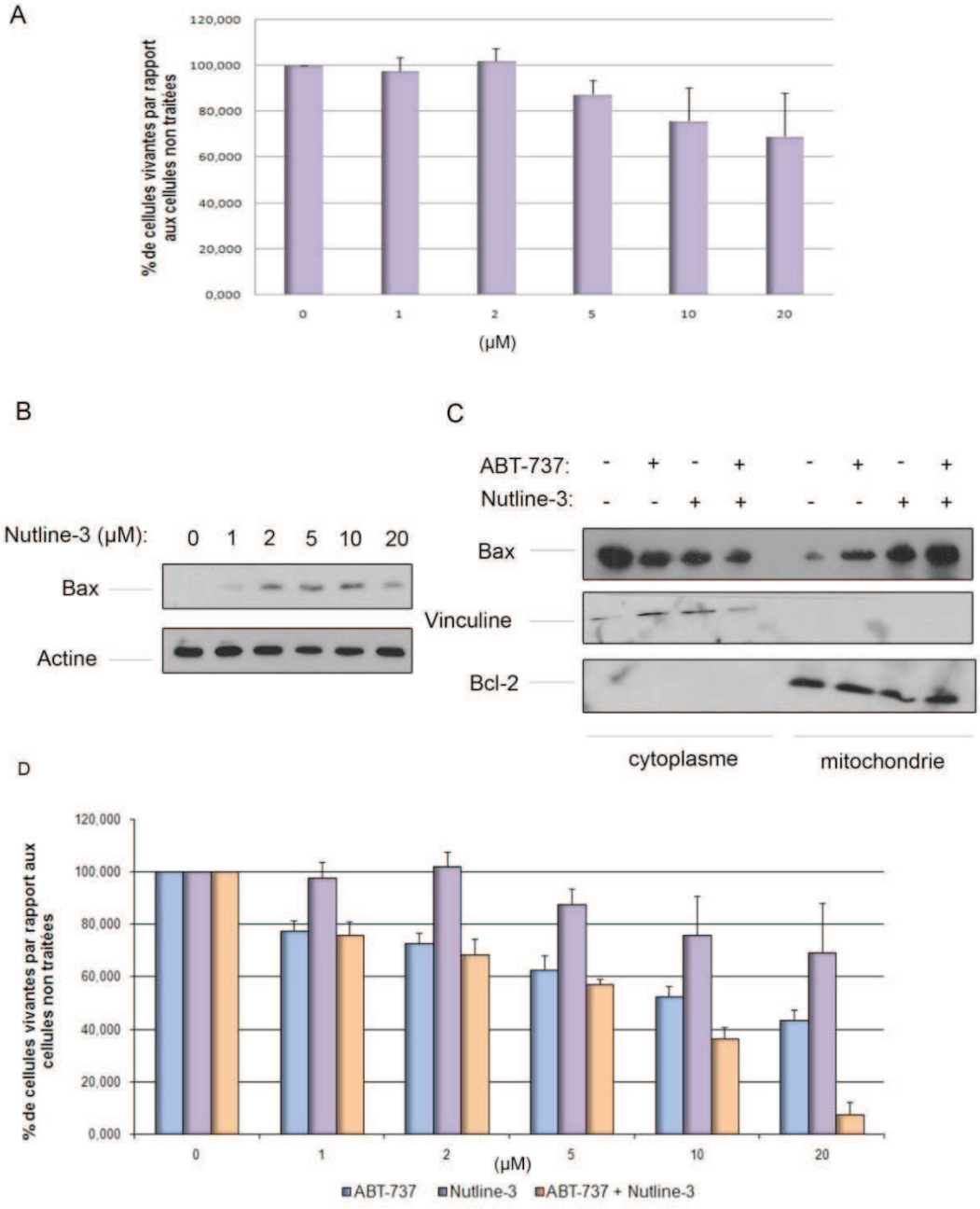


Figure 56 : Effet de la combinaison ABT-737/nutline-3 sur une lignée de NPC (C15). A. Les cellules (3 puits/conditions) ont été traitées ou non pendant 24h avec différentes concentrations de nutline-3 puis un marquage au MTT a été réalisé. Après lyse des cellules, la DO a été lue à 550 nm afin d'évaluer la viabilité cellulaire. Les résultats sont exprimés en % par rapport aux cellules non traitées. **B.** Les cellules ont été traitées pendant 24h avec différentes concentrations de nutline-3 puis un Western blot a été réalisé afin d'évaluer l'expression de Bax. **C**. Les cellules ont été traitées pendant 24h avec 10 µM de nutline-3 puis des fractionnements cytoplasmiques et mitochondriaux ont été réalisés. La vinculine et la protéine Bcl-2 ont été utilisées pour vérifier la pureté des fractions cytoplasmique et mitochondriale respectivement. **D.** Les cellules ont été pré-traitées on non pendant 1h avec ABT-737 puis incubées ou non pendant 24h avec la nutline-3. Un marquage au MTT a ensuite été réalisé selon les conditions décrites en A.

c) Expériences complémentaires sur une lignée de NPC

Pour valider nos résultats dans un autre modèle, nous avons testé l'effet de la nutline-3 et de la combinaison avec ABT-737 dans une lignée de NPC EBV (+) présentant une p53 sauvage. Cette lignée, appelée C15, ne pousse pas en culture et est entretenue par passages successifs chez la souris (Busson et al., 1988). Plusieurs études ont montré que les C15 expriment la LMP-1 ainsi que les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL (Hitt et al., 1989; Yip et al., 2005). Les expériences *in vitro* sont effectuées sur les cellules obtenues par dissociation de la tumeur xénogreffée et maintenues en culture pendant 48h.

Nous avons testé, dans un premier temps, l'effet de concentrations croissantes (1, 2, 5, 10, 20 μM) de nutline-3 à l'aide d'un test de cytotoxicité cellulaire (MTT). Les résultats présentés sur la figure 56 A montrent que ce composé, lorsqu'il est utilisé à des doses supérieures à 5 μM, induit une légère diminution du nombre de cellules vivantes par rapport aux cellules non traitées. Toutefois, les C15 ne semblent pas très sensibles au traitement puisque la viabilité est encore de 75% après 24h de traitement avec une dose de 10 μM. Les résultats précédemment obtenus avec les lignées de LB et les LCL indiquent que la protéine pro-apoptotique Bax est fortement impliquée dans l'apoptose induite par la nutline-3. Nous avons donc évalué l'expression de cette protéine par Western blot dans les C15, après traitement avec différentes doses (1, 2, 5, 10, 20 μM) de ce composé. Les résultats obtenus montrent que l'expression de Bax est augmentée de manière très significative dès la concentration de 1μM (Figure 56 B). Pour être active et exercer ses fonctions pro-apoptotiques, Bax doit être relocalisée du cytoplasme vers la mitochondrie. Les expériences menées avec les lignées de LB et les LCL EBV (+) montrent que la surexpression de Bcl-2 limite la translocation et l'activation de cette protéine pro-apoptotique en réponse au traitement et que l'utilisation de l'inhibiteur de Bcl-2 et de Bcl-xL, ABT-737, permet d'augmenter l'activation de Bax après traitement par la nutline-3. Nous savions, grâce à nos résultats et aux données de la littérature, que les C15 expriment fortement Bcl-2 et Bcl-xL. Nous avons donc vérifié la localisation sub-cellulaire (cytoplasmique ou mitochondriale) de Bax après traitement par la nutline-3 seule ou en association avec ABT-737. Pour cela, des fractionnements cytoplasmiques et mitochondriaux ont été préparés à partir de cellules traitées ou non avec ces composés (10 μM pour chacun) pendant 24h. La localisation de Bax a été analysée par Western blot. La pureté des fractions cytoplasmiques et mitochondriales a été contrôlée grâce à la vinculine, un marqueur du cytoplasme et à la protéine Bcl-2, utilisée comme marqueur des mitochondries. Les résultats, présentés sur la figure 56 C, montrent que Bax est partiellement relocalisée à la mitochondrie après traitement avec la nutline-3 ou ABT-737.

Par contre, l'addition de ces 2 composés au milieu de culture diminue fortement la forme cytoplasmique de Bax au profit de la forme mitochondriale. Ces résultats sont donc très proches de ceux observés dans les lignées de LB et les LCL EBV (+). Pour finir nous avons vérifié, grâce au test de cytotoxicité MTT, si le pré-traitement par ABT-737 (10 μM) pouvait sensibiliser les C15 à la nutline-3. Les résultats de la figure 56 D montrent qu'ABT-737, lorsqu'il est utilisé seul, est plus efficace que la nutline-3. En effet, pour une dose équivalente (10 μM), ABT-737 permet de diminuer la viabilité cellulaire de 45% alors que la diminution observée après traitement avec la nutline-3 n'est que de 25%. Ce résultat est similaire à celui observé dans les lignées de LCL. D'autre part, un effet additif est observé pour des doses en nutline-3 supérieures à 2 μM. Ainsi une concentration de 10 μM de chaque composé réduit la viabilité cellulaire de plus de 60%.

Au regard de ces différentes expériences, nous pouvons donc conclure que les résultats observés dans cette lignée de NPC sont proches de ceux obtenus avec les lignées de LCL :

- l'effet de la nutline-3 dans les C15 est limité par la présence de membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2
- l'utilisation d'un inhibiteur de Bcl-2 et Bcl-xL restaure la sensibilité de ces cellules
- ABT-737 utilisé seul diminue la viabilité cellulaire.

De nouvelles expériences devront être menées pour mieux caractériser le mode d'action d'ABT-737 dans ce modèle et évaluer dans quelle mesure il pourrait constituer une alternative thérapeutique pour le traitement des NPC.

d) Article n°2: «Autophagy is upregulated in EBV (+) latency III cells and protects them from nutline-3 induced apoptosis. »

Afin d'élargir notre étude et de mieux comprendre quels sont les mécanismes de résistance à l'apoptose induits par EBV, nous avons réalisé une étude du transcriptome en collaboration avec l'Unité de Génomique Fonctionnelle (UGF) de l'Institut Gustave Roussy. La réponse à différents temps de traitement par la nutline-3 (0, 30 min, 1h, 3h, 7h, 16h) a été analysée sur deux lignées: les BL2 EBV (-) et les BL2/B95 EBV (+) en latence de type III, qui ne diffèrent que par leur statut EBV (voir partie « lignées cellulaires » du chapitre matériel et méthodes). Pour cela, trois expériences indépendantes ont été réalisées, au cours desquelles les ARNm totaux des 2 lignées cellulaires, traitées ou non par la nutline-3, ont été purifiés et hybridés sur des puces Agilent (4 X 44K).

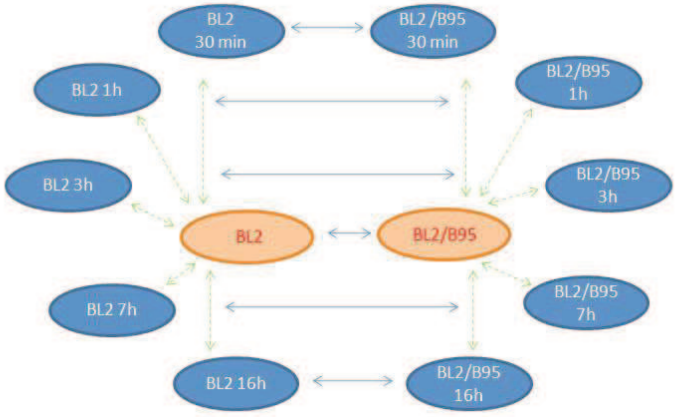


Figure 57 : Comparaisons effectuées lors de l'analyse du profil d'expression génique réalisée dans les BL2 et BL2/B95 traitées ou mon avec la nutline-3. L'hybridation des ARNm a été réalisée sur des puces Agilent (4 X 44K) en « single color » ce qui permet de comparer tous les échantillons entre eux. Cette étude a pour objectif de mettre en évidence les gènes différentiellement exprimés entre les cellules traitées (en bleu) et celles non traitées (en orange) au sein d'une même lignée. Elle permet également de comparer le profil d'expression génique des deux lignées pour un traitement donné.

Cette étude nous a permis de comparer d'une part le profil d'expression génique des cellules traitées à la nutline-3 à celui des cellules non traitées et de comparer, d'autre part, l'expression des gènes entre les deux lignées testées (Figure 57). Les gènes sont considérés comme différentiellement exprimés lorsqu'ils présentent un niveau d'expression (fold change « FC ») supérieur ou égale à 2 fois pour les gènes surexprimés ou inférieur ou égale à 2 fois pour les gènes sous-exprimés. Les données ainsi obtenues ont été analysées par le logiciel IPA du système ingenuity qui permet de regrouper les gènes selon les voies de signalisation auxquelles ils appartiennent.

L'analyse du transcriptome, après traitement par la nutline-3, met en évidence une induction rapide des différents gènes cibles de p53 impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose, aussi bien dans la lignée EBV (-) que dans la lignée EBV (+). Plusieurs gènes impliqués dans l'autophagie tels que *DRAM*, *Sesn1* et *2*, *AMPK* et *TSC2* sont également fortement stimulés en réponse au traitement. De plus, l'expression de ces gènes est plus fortement induite dans la lignée BL2/B95 EBV (+) que dans la lignée BL2 EBV (-). Une publication d'Amaravadi *et al* a montré que l'autophagie pouvait être à l'origine de la résistance à l'apoptose induite par p53 dans des cellules de lymphome. (Amaravadi et al., 2007).

Nous nous sommes donc intéressés à ce mécanisme et au rôle qu'il pouvait avoir dans les cellules de LB ou les LCL, traitées avec la nutline-3. Nous avons d'abord validé les résultats du transcriptome au niveau protéique par Western Blot. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux Sestrines, dont l'activation conduit à l'inhibition de mTOR, le régulateur négatif majeur de l'autophagie (Budanov and Karin, 2008). Nous avons montré que l'expression de la protéine Sestrine-1 augmente dès 3 et 5h de traitement dans les BL2/B95 et BL2 respectivement. Cette activation se traduit par une inhibition de l'activité de mTOR, observée après 3h de traitement dans les BL2/B95 et après 7h dans les BL2. Nous avons confirmé ces résultats dans d'autres lignées de LB et LCL et avons montré que le traitement par la nutline-3 induit une inhibition de mTOR dans l'ensemble des lignées testées.

Nous nous sommes ensuite demandés si l'inhibition de mTOR permettait d'induire l'autophagie dans les cellules traitées avec la nutline-3. Pour répondre à cette question nous avons évalué l'autophagie de plusieurs façons. Nous avons d'abord analysé la conversion du marqueur LC3 par Western blot. Ce dernier existe sous 2 formes : une forme libre dans le cytoplasme (LC3-I) et une forme associée aux autophagosomes (LC3-II). Nous avons également marqué les cellules par la monodansylcadavérine (MDC), un colorant spécifique des compartiments acides de la cellule qui marque les vacuoles d'autophagie. Les résultats obtenus montrent que le traitement par la nutline-3 induit, de façon transitoire (pour 3 et 7h de traitement), une accumulation de la forme LC3-II dans les BL2. En revanche, dans les BL2/B95, le niveau de LC3-II augmente progressivement et une conversion complète est observée après 24h de traitement. Ces résultats indiquent que la nutline-3 induit fortement l'autophagie dans les cellules EBV (+) (BL2/B95) alors que ce n'est pas le cas dans les cellules EBV (-) (BL2). Ces données ont été confirmées par marquage MDC ainsi que par une analyse en microscopie électronique qui a révélé la présence d'autophagosomes 7h après le traitement dans les BL2/B95 (EBV (+)). Cette observation n'a pas été retrouvée dans les BL2 (EBV (-)). Ainsi, l'infection par EBV semble favoriser l'induction de l'autophagie en réponse au traitement par la nutline-3. Nous nous sommes ensuite demandés si certaines protéines virales pouvaient être impliquées dans ce mécanisme.

Plusieurs études ont montré que la sous-unité p65/Rel A de NF-κB régule positivement l'autophagie (Nivon et al., 2009; Ryu et al., 2011). De plus, Copetti *et al* ont identifié un site de fixation de NF-κB sur le promoteur du gène codant pour Bécline-1 (Copetti et al., 2009a; Copetti et al., 2009b). Par ailleurs, il est admis que la LMP-1 induit une activation constitutive de la voie NF-κB.

Nous avons donc testé l'implication de cette protéine dans l'induction de l'autophagie observée dans les cellules EBV (+) en latence III. Nous avons montré d'une part que la présence de la LMP-1 dans ces cellules était bien corrélée à une augmentation de l'expression de p65. D'autres part, des expériences de fractionnements cytoplasmiques et nucléaires indiquent que p65 est plus fortement exprimée dans le noyau des cellules EBV (+) que dans celui des cellules EBV (-). Nos résultats révèlent également que l'activation constitutive de p65 se traduit par une augmentation de l'expression de Bécline-1 dans les cellules EBV (+) en latence III. Nous avons ensuite vérifié si l'augmentation du niveau d'expression de Bécline-1 dans ces cellules se traduisait par une induction de l'autophagie. Les résultats, obtenus par analyse de la conversion de LC3 et marquage avec la MDC, montrent que le niveau basal d'autophagie est beaucoup plus important dans les lignées EBV (+) en latence III que dans les lignées EBV (-). Ainsi, les cellules EBV (+) en latence de type III présentent une activation constitutive de l'autophagie, due à une augmentation du niveau d'expression de Bécline-1 par p65. Le traitement par la nutline-3 amplifie l'autophagie dans ces cellules en induisant la transcription des gènes cibles de p53 qui entraînent l'inhibition de mTOR.

Pour finir, nous avons inhibé l'autophagie dans ces cellules en utilisant la chloroquine, un composé qui empêche la fusion des autophagosomes avec les lysosomes. Nous avons ainsi montré que l'utilisation de la chloroquine n'a pas d'effet sur les cellules qui n'expriment pas ou peu la LMP-1. A l'inverse, l'inhibition de l'autophagie dans les cellules qui expriment fortement cette protéine de latence se traduit par une induction de l'apoptose. Nous avons également vérifié si le pré-traitement avec la chloroquine sensibilisait les cellules à la nutline-3. Nos résultats indiquent que l'utilisation de ces deux composés en combinaison a un effet additif sur l'induction de l'apoptose dans l'ensemble des cellules.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication, actuellement en soumission, qui est présentée dans les pages suivantes.

Constitutive autophagy in Epstein-Barr virus-positive latency III cells protects them from nutlin-3-induced apoptosis.

Running title: EBV-induced autophagy protects B cell lymphomas

Anaïs Pujals[1], Loetitia Favre [1], Catherine Pioche-Durieu[1], Aude Robert[1], Guillaume Meurice[2],Marion Le Gentil[2], Sonia Chelouah[1], Eric Le Cam[1], Lyubomir T Vassilev[3], Marc Lipinski[1] and Joëlle Wiels[1]

1 UMR 8126 CNRS, Univ Paris-Sud, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

2 Functional Genomic Platform, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

3 Roche Research Center, Hoffmann-La Roche Inc., Nutley, NJ 07110, USA

Correspondence: Joëlle Wiels, UMR 8126 CNRS, Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard Vaillant, 94805 Villejuif cedex, France. E-mail: wiels@igr.fr; phone: 33 1 42 11 47 40; fax: 33 1 42 11 54 94

Abbreviations: AMPK, AMP-responsive protein kinase; Bax, Bcl-2–associated X protein; Bcl-2, B-cell lymphoma 2; BL, Burkitt Lymphoma; DRAM, Damage-Regulated Autophagy Modulator; EBNA, Epstein-Barr nuclear antigen; EBV, Epstein-Barr Virus; PI, Propidium Iodure; LCL, Lymphoblastoid cell lines; LMP1, Latent membrane protein 1; MDC, Monodansylcadaverine; MDM2, Murine Double minute 2; mTOR, mammalian Target Of Rapamycin; NFκB, Nuclear factor-kappa B; PTLD, Post-transplant lymphoproliferative disorder; SiRNA, Small interfering RNA; TSC2, Tuberous sclerosis protein 2

Abstract

The Epstein-Barr virus (EBV) has been associated with various solid tumors and hematologic pathologies including Burkitt's lymphoma (BL) and other B cell disorders. Numerous viral proteins can be latently expressed in EBV-infected cells, the membrane protein LMP1 being the most oncogenic. We have previously demonstrated that treating wild type p53-expressing B cell lines with nutlin-3, an antagonist of the p53 regulator MDM2, activated the p53 pathway and induced apoptosis. However, this occurred in EBV-negative and EBV-positive latency I cells whereas EBV-positive latency III cells remained much more apoptosisresistant. Here, we demonstrate a constitutively high level of autophagy in these resistant cells, as shown by the presence of LC3-II and the number of autophagic vacuoles. In these cells, high expression of the pro-autophagic Beclin1 protein was shown to be dependent on an NF-ϰB signaling pathway activated by the LMP1 protein. A transcriptome analysis of nutlin-3-treated B cell lines revealed an upregulation of a subset of p53 target genes stimulating autophagy. Only in EBV-positive latency III cells did upregulated sestrins induce autophagy and this occurred through mTOR inhibition. Treating them with chloroquine, an inhibitor of autophagic protein degradation, induced apoptosis and potentiated the apoptotic effect of nutlin-3, thereby demonstrating that the resistance of these cells to p53-dependent apoptosis can be pharmacologically overcome.

Keywords: autophagy, EBV, p53, Beclin-1, nulin-3, Burkitt's lymphoma

Introduction

The Epstein-Barr virus (EBV), a γ-Herpes virus, is associated with various B cell malignancies including Burkitt's lymphoma (BL), Hodgkin's lymphoma and post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD). The ability of EBV to efficiently immortalize B lymphocytes and generate lymphoblastoid cell lines (LCL) underlies its central oncogenic role. In EBV-infected tumor cells, the virus remains latent, with only a small subset of viral proteins expressed including six nuclear antigens (EBNA) and three latent membrane proteins (LMP). Among the various EBV-associated tumors, these latent proteins are differentially expressed. For instance, the vast majority of EBV-positive BL cells only express EBNA-1 (latency I phenotype) while a few cases and all cases of PTLD express the full spectrum of latent proteins (latency III). Of the viral products, it is mostly the membrane protein LMP1 which has been implicated in tumor formation. This versatile protein initiates the activation of the mitogen-activated protein kinases JNK and p38, the JAK/STAT and the NF-κB signaling cascades, with an overall effect on cell survival.

P53 is a stress-activated transcription factor which plays a key role in protecting cells against tumor development by either promoting the inhibition of cell proliferation or inducing cell apoptosis (1). Mutation in the p53 coding sequence, cytoplasmic sequestration of its translation product or increased interactions with its main cellular regulator MDM2 are but a few of the possible ways altering its physiological functions observed in tumor cells (2). Recent studies have demonstrated that p53 is also involved in the regulation of autophagy, a lysosomal degradation pathway that contributes to cell homeostasis. The autophagy process starts with the formation of large double-membrane vesicles called autophagosomes. These in turn fuse with lysosomes to form autolysosomes whose internal content is then degraded by hydrolases, thus clearing the cell from damaged organelles and protein aggregates (3). Numerous proteins have been reported to regulate autophagy. On one hand, the serine/threonine kinase mTOR (mammalian target of rapamycin) is a key negative regulator. On the other hand, Beclin-1, a critical component in the class III PI3 kinase complexes, positively regulates autophagy by inducing the formation of autophagosomes (4). Other positive regulators of autophagy include transcriptional targets of p53 such as sestrins whose effects result in mTOR inhibition (5), or DRAM (Damage regulated autophagy modulator), a lysosomal protein also involved in apoptosis (6). When cytoplasmic, however, p53 has been shown to inhibit autophagy, implying that it plays a dual role in the modulation of this catabolic pathway (7). Given its key function in determining cell fate, several strategies have been developed to restore p53 activity in tumor cells.

Figure 1

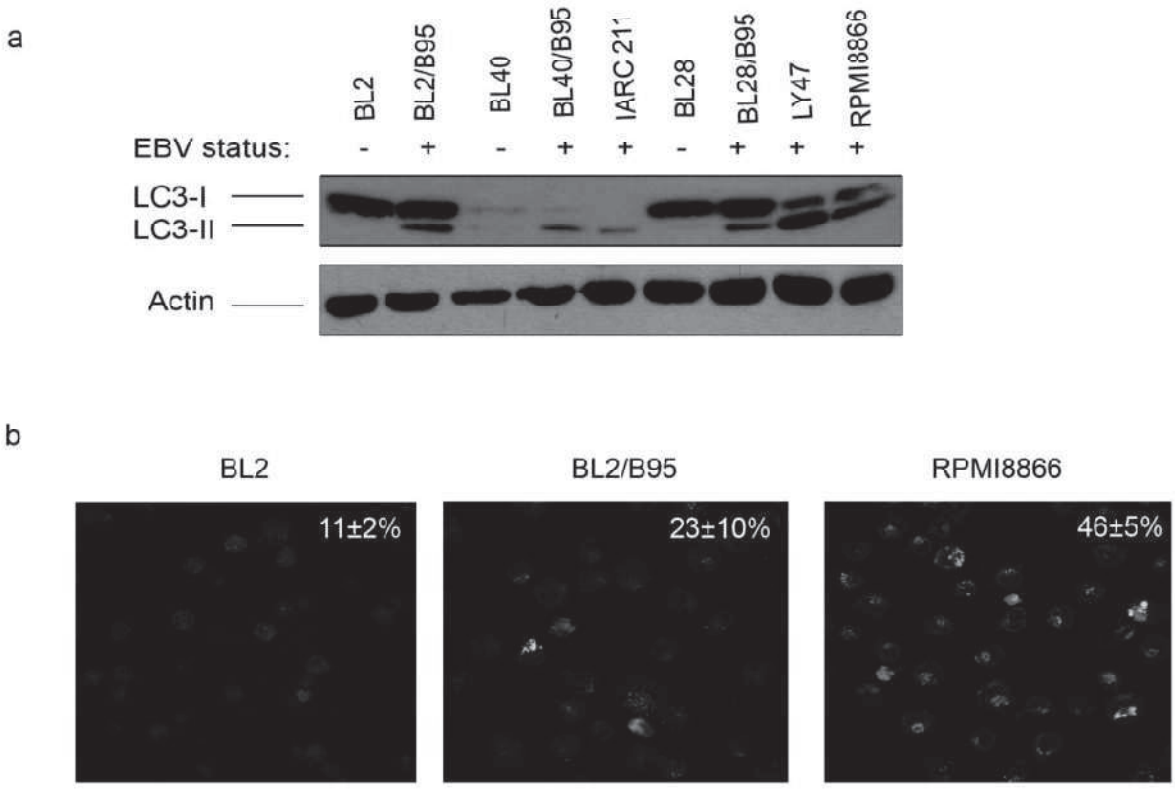


Figure 1. Analysis of constitutive autophagy in EBV-negative and -positive lymphoid cell lines. (a) Whole cell lysates prepared from the indicated cell lines were submitted to western blot analysis for detection of LC3-I, LC3-II and β-actin as a control. (b) Cells were stained with MDC and examined by fluorescence microscopy. The percentage of cells with MDC staining dots indicative of autophagy was assessed. The mean values indicated were calculated from three independent experiments.

Several low molecular mass compounds can disrupt its interaction with MDM2 (reviewed in (8, 9)). For example, nutlin-3, a *cis*imidazoline, binds the p53 pocket of MDM2 thereby inducing both the release and the activation of p53 (10). *In vitro*, nutlin-3 has been found to enhance apoptosis in various experimental systems (11-13). *In vivo*, a treatment with this drug inhibited tumor growth and could exert a synergic effect with genotoxic drugs or irradiation in cancer therapy (reviewed in (14)). This opened the way to phase I clinical trials which are currently carried out for various tumor types (15).

In previous studies, we have shown that EBV-negative and -positive cells treated with nutlin-3 exhibited p53 activation as assessed by the induction of p21WAF1, MDM2 and Bax. However, whereas nutlin-3-treated EBV-negative BL cells died massively by an apoptotic process involving Bax, EBV-positive latency III BL and LCL cells proved much more resistant (16), in relation with a strong level of expression of Bcl-2 (17). We also observed that treating latency III cells with an inhibitor of Bcl-2 only partially restored their sensitivity to nutlin-3 and this prompted us to further study these cells. Autophagy was found to be constitutively activated in EBV-positive latency III cells and participated in their mechanisms of resistance to nutlin-3-induced apoptosis. A treatment with chloroquine, an inhibitor of autophagy, provided an apoptosis-inducing effect complementary to the action of nutlin-3.

Results

Autophagy is constitutively activated in EBV-positive latency III cells

The LC3 protein exists under two forms. The cytosolic LC3-I moiety can be converted by lipidation into LC3-II which can then be recruited into the membrane of autophagosomes. A western blot analysis revealing the relative importance of these two forms in cell populations provides a convenient way to assess their level of basal autophagy. Since EBV is a known activator of the autophagic machinery (18), we tested the presence of the two LC3 forms in a panel of EBV-negative BL cell lines (BL2, BL28 and BL40) and their *in vitro* EBV-infected counterparts (BL2/B95, BL28/B95 and BL40/B95), in an EBV-positive latency III BL cell line LY47 and in two LCL (IARC211, derived from the same patient as BL40, and RPMI8866). As shown in Figure 1a, LC3-II was detected in the EBV-positive cells only, whereas the presence of LC3-I appeared unrelated to the EBV status of the cell lines. These results were confirmed by fluorescence confocal microscopy observations using monodansylcadaverine (MDC), an autofluorescent compound serving as a marker for autophagic vacuoles (19).

Figure 2

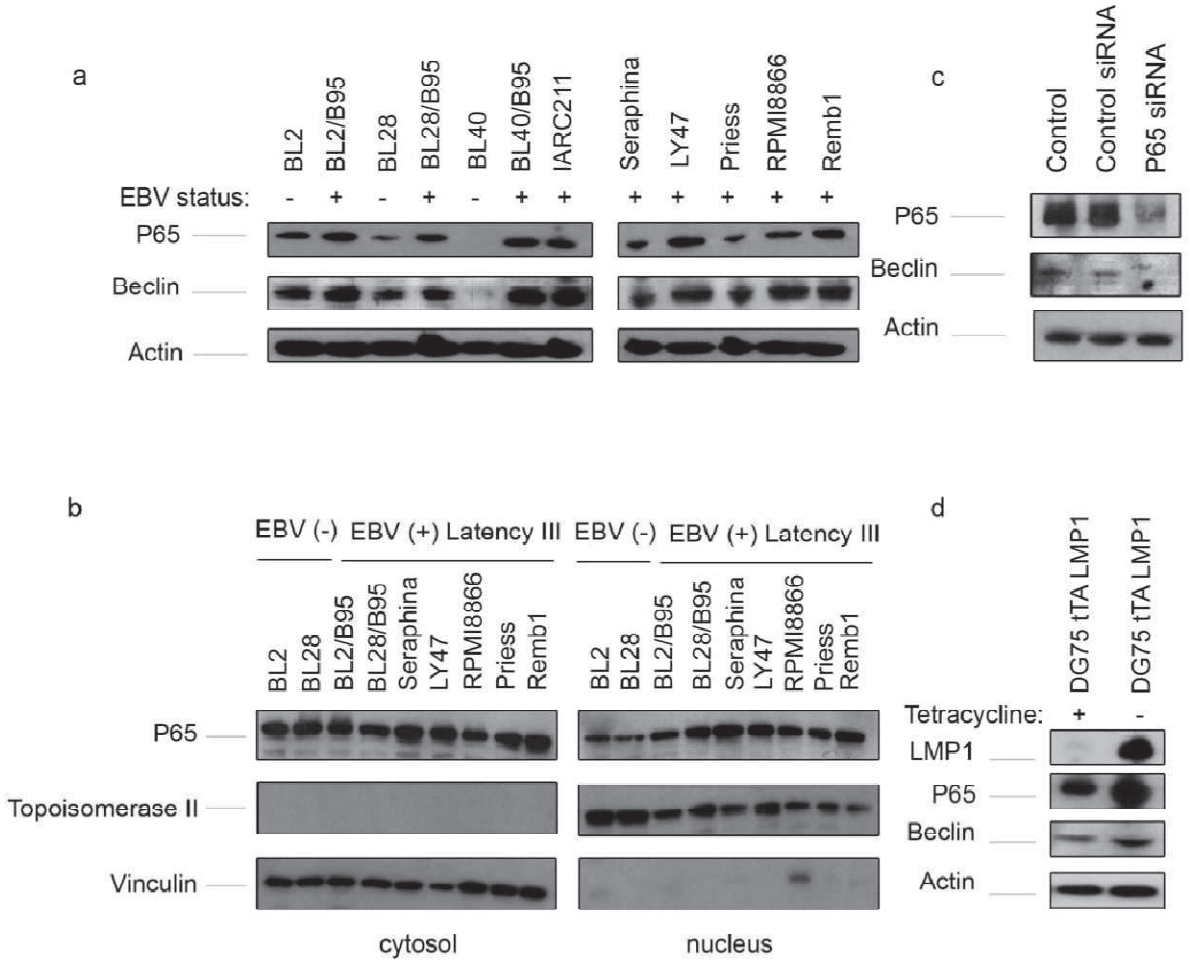


Figure 2. p65 activation and beclin-1 expression in EBV-negative and -positive lymphoid cell lines. (a) Whole cell lysates prepared from cell lines whose EBV status is indicated were analyzed by western blotting for expression of p65 and Beclin-1. (b) Cytosolic and nuclear fractions prepared from the cell lines indicated were checked for p65 expression and localization. Vinculin and topoisomerase II were used as cytosolic and nuclear markers, respectively. (c) Whole cell lysates prepared from RPMI8866 cells electroporated with an siRNA targeting p65 or with a control siRNA were submitted to western blot analysis for detection of p65 and beclin-1. (d) Whole cell lysates prepared from stable DG75 transfectants which express LMP1 in the absence of tetracycline were tested by western blot for expression of LMP1, p65 and beclin-1. The blots shown are representative of three independent experiments.

As shown in Figure 1b, higher levels of punctuate MDC staining were observed in BL2/B95 (23±10%) and RPMI8866 (46±5%), two EBV-positive latency III cell lines, than in EBV-negative BL2 cells (11±2 %). Together, these data suggest that the level of basal autophagy is higher in EBV-positive latency III cells than in EBV-negative cells.

Beclin-1 is upregulated in EBV-positive latency III cells through NF-κB activation

The viral LMP1 protein is a known inducer of the nuclear factor kappa B (NF-κB) signaling cascade (20, 21) which, under certain circumstances, positively modulates canonical autophagy (22, 23). We thus reasoned that NF-κB could play a part in the activation of autophagy in these cells. As expected, its p65/RelA subunit was found to be more abundant in the EBV-positive latency III cell lines than in the EBV-negative cell lines (Figure 2a). As p65 binds to and activates the *Beclin-1* gene promoter (24), we then tested the same cell lines for expression of the Beclin-1 protein which was found to follow that of p65 (Figure 2a). To examine p65 expression levels more precisely, cytosolic and nuclear extracts were prepared from the EBV-positive latency III and EBV-negative cell lines. As seen on the western blots shown in Figure 2b, high levels of p65 in the nuclear but not the cytosolic fractions correlated with the presence of EBV in the cell lines analyzed, consistent with p65 playing a role in the process through its transcription regulatory function. We next used an siRNA approach to inhibit expression of p65 in EBV-positive RPMI8866 cells chosen for their electroporation readiness. As seen in Figure 2c, a decrease of p65 expression was obtained 24 hours after treatment with the p65-specific but not the control siRNA. The expression of Beclin-1 was almost completely abolished in cells with lower levels of p65 but remained stable in cells treated with the control siRNA. Finally, stable transfectants of DG75 cells which express LMP1 only in the absence of tetracycline were tested for the expression of p65 and Beclin-1. In these conditions of LMP1 expression, levels of both p65 and Beclin-1 increased as compared to control cells cultivated in the presence of tetracycline (Figure 2d). Altogether, these data are consistent with an LMP1-dependent activation of the NF-κB signaling pathway in EBV-positive latency III cells, resulting in larger amounts of p65 present in the cell nucleus and increased expression of Beclin-1.

Treatment with nutlin-3 induces the expression of a subset of genes involved in autophagy in EBV-negative and EBV-positive latency III cells

We have previously shown that the induction of apoptosis by nutlin-3 depends on the EBV status of the cells:

Figure 3

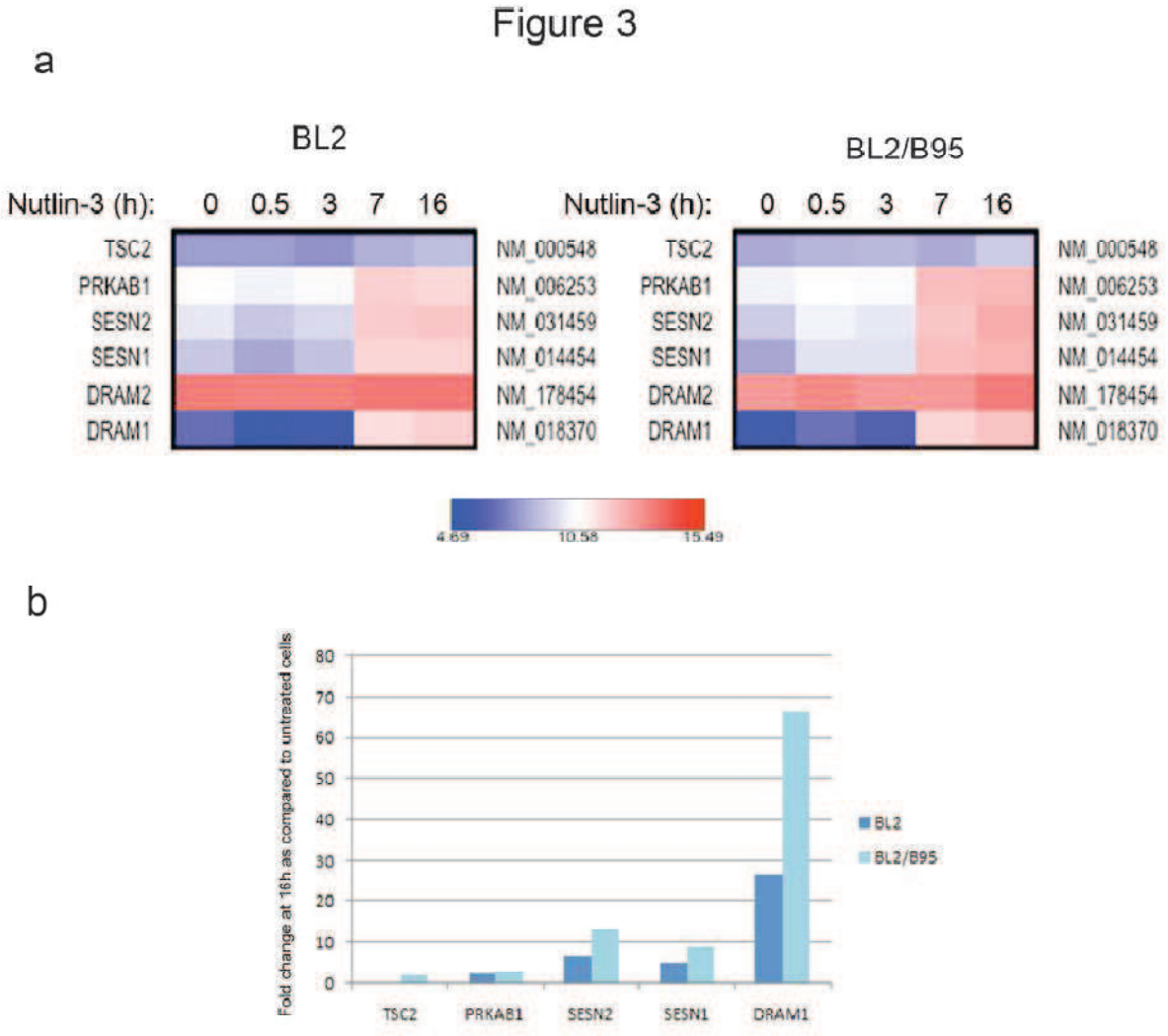


Figure 3. Global gene expression analysis of EBV-negative BL2 and EBV-positive BL2/B95 cells along nutlin-3 treatment. Cells were analyzed in triplicates at the indicated time of treatment. (a) Probes corresponding to genes relative to autophagy are represented using heatmap. (b) Fold change in the mRNA levels for genes related to autophagy in the two cell lines treated for 16h and compared to untreated cells.

EBV-negative and EBV-positive latency I cells are highly sensitive to this antagonist of MDM2, whereas EBV-positive latency III cells are much more resistant (16). Having detected higher levels of basal autophagy in the latter, we decided to examine the transcriptional effect of nutlin-3 treatment on EBV-negative BL2 and EBV-positive latency III BL2/B95 cells. A genome-wide transcriptome analysis was performed at various times of incubation in the presence of 10 μM nutlin-3. Over time, an increasing number of genes were found to be either down- or up-regulated in both cell lines (data not shown). As expected, known p53 target genes were upregulated, five of which have been previously implicated in the autophagy process. These are reported in Figure 3a where it can be seen that their mRNA expression levels increased during treatment in both cell types with an apparently more powerful induction in the BL2/B95 cell line than in its EBV-negative parent. Changes in the mRNA expression levels induced by 16h of treatment with nutlin-3 were then quantified as compared to untreated cells (Figure 3b). DRAM (Damage-Regulated Autophagy Modulator)-1, the p53 target gene most strongly induced in both BL2 and BL2/B95 (fold change 26.8 and 66.8, respectively) encodes a lysosomal protein which induces macroautophagy (6). Treatment with nutlin-3 of BL2 and BL2/B95 also induced higher transcription levels of Sestrin-1 (fold change 6.9 and 13.3), Sestrin-2 (fold change 5.2 and 9.2), PRKAB1, the β-1 regulatory subunit of AMPK (AMP-responsive protein kinase) (fold change 2.7 and 3) and TSC2 (Tuberous sclerosis protein 2) (fold change 2, only in BL2/B95). The proteins encoded by these genes are involved in a cascade of events (activation of AMPK by direct interaction with Sestrin-1 and Sestrin-2 induces phosphorylation of TSC2 which, in turn, inhibits mTOR) that lead to activation of autophagy (5). We thus conclude that a nutlin-3 treatment promotes autophagy in both EBV-negative and -positive cells but with a stronger effect in the latter.

Treatment with nutlin-3 inhibits mTOR activity in EBV-negative and EBV-positive latency III cells

To validate transcriptomic results, BL2 and BL2/B95 cells were again treated with 10 μM nutlin-3 and tested at various times for expression of Sestrin-1 (Figure 4a). Sestrin1-specific bands observed on western blot were quantified by densitometry and normalized to β-actin levels. In the EBV-positive BL2/B95 cells, increased amounts of sestrin-1 were readily detected at 3h of treatment with a further increase at 5h. An accumulation of Sestrin-1 was similarly detected in their EBV-negative BL2 counterparts but only after 5 hours of treatment.

Figure 4

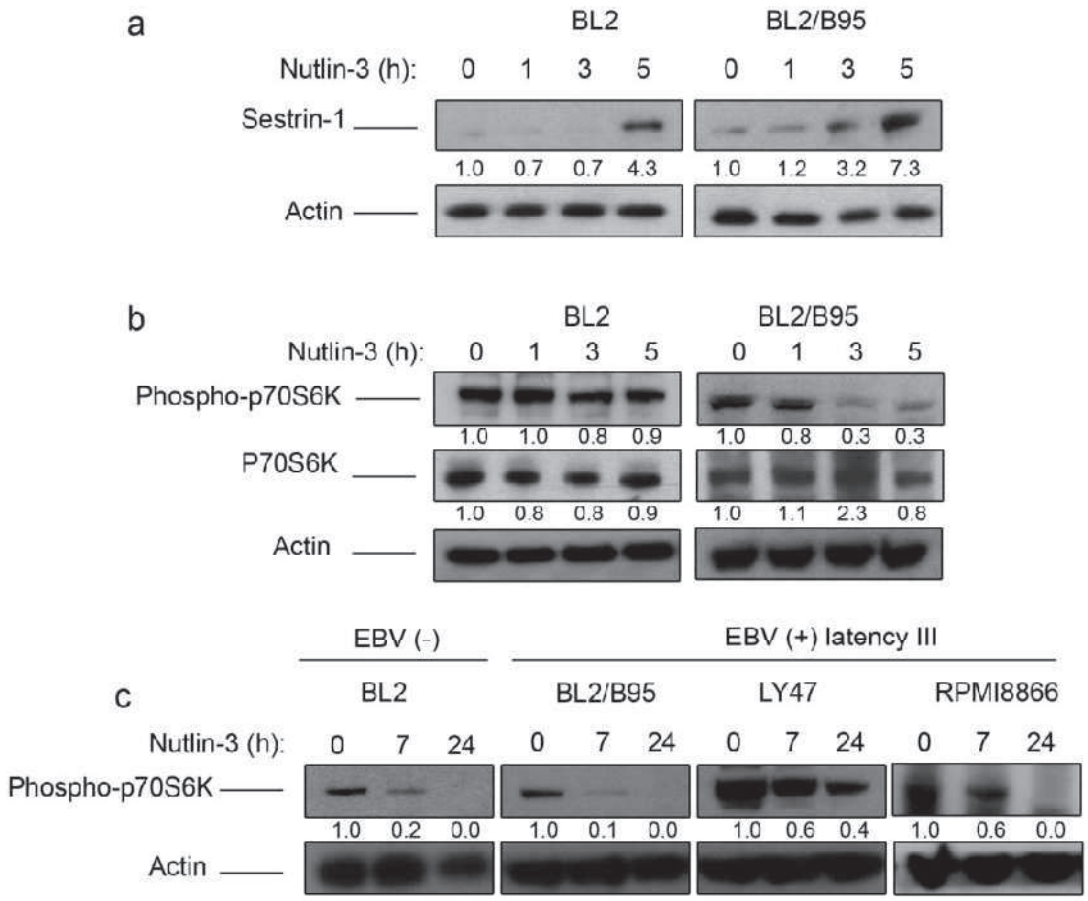


Figure 4. Effect of nutlin-3 treatment on sestrin-1 expression and mTor kinase activity in EBV-negative and -positive lymphoid cell lines. Expression of sestrin-1 (a), p70S6K (b) and phospho-P70S6K (b and c) was tested by western blotting of whole cell lysates prepared at the indicated times of nutlin-3 treatment. Fold-change values reported under each blot were calculated in reference to untreated (0h) controls and normalized to β-actin levels. The blots shown are representative of three independent experiments.

To determine whether induction of sestrin-1 expression inhibited mTOR kinase activity, we analyzed phosphorylation of its target p70S6K (25) using an anti-phospho-p70S6K (Thr389) antibody. The nutlin-3-dependent induction of sestrin1 expression translated into a strong inhibition of p70S6K phosphorylation in the EBV-positive BL2/B95 cells but had very little effect, if any, in the EBV-negative BL2 cells (Figure 4b). Re-blotting with an anti-p70S6K verified that the treatment with nutlin-3 had not resulted in a decrease of the endogenous levels of the protein (Figure 4b). We then extended this observation to other EBV-positive latency III (BL or LCL) cell lines and to 7 and 24h of nutlin-3 treatment. As exhibited in Figure 4c, this induced a gradual decrease in the level of p70S6K phosphorylation in all four cell lines regardless of their EBV status. Together, these results are consistent with the interpretation that treatment with nutlin-3 inhibits mTOR activity in both EBV-negative and EBV-positive latency III cells but with a more rapid kinetics in the latter.

Treatment with nutlin-3 promotes autophagy in EBV-positive latency III cells but not in EBV-negative cells

Since the nutlin-3-induced inhibition of mTOR occurs in both EBV-positive and –negative cells, this cannot account for the differences observed between these two cell types in their response to nutlin-3-induced apoptosis. We thus decided to test whether the inhibition of mTOR induced by nutlin-3 treatment promoted autophagy equally well in EBV-negative and-positive cells. To this end, BL2, BL2/B95 and RPMI8866 cells were treated with nutlin-3 for 3, 7 or 24h followed by assessment of their autophagy levels. It can be seen in Figure 5a that after 3 and 7h of treatment, the levels of the autophagosome-specific LC3-II form increased in all three cell lines but differed drastically after 24h of treatment. Indeed, LC3-II became undetectable in the EBV-negative BL2 cell line whereas it remained highly expressed in the two EBV-positive latency III lines (concomitantly with an almost complete disappearance of the cytosolic LC3-I form). BL2/B95 cells were examined by electron microscopy and typical autophagosomes were observed but only after nutlin-3 treatment (Figure 5b). In contrast, such autophagosomes could not be detected in BL2 cells (data not shown). Finally, EBV-negative and EBV-positive latency III cells were stained with MDC after 16h of treatment with nutlin- 3 (Figure 5c). When compared with results shown in Figure 1b, it can be seen that the percentage of MDC-stained vacuoles increased after treatment with nutlin-3, an increase that was much more pronounced in EBV-positive latency III cells (41±2% *vs* 23±10% and 65 ± 11 % *vs* 46±5% % cells stained in BL2/B95 and RPMI8866, respectively) than in EBV-negative BL2 cells (16±7 % cells stained *vs* 11±2%).

Figure 5

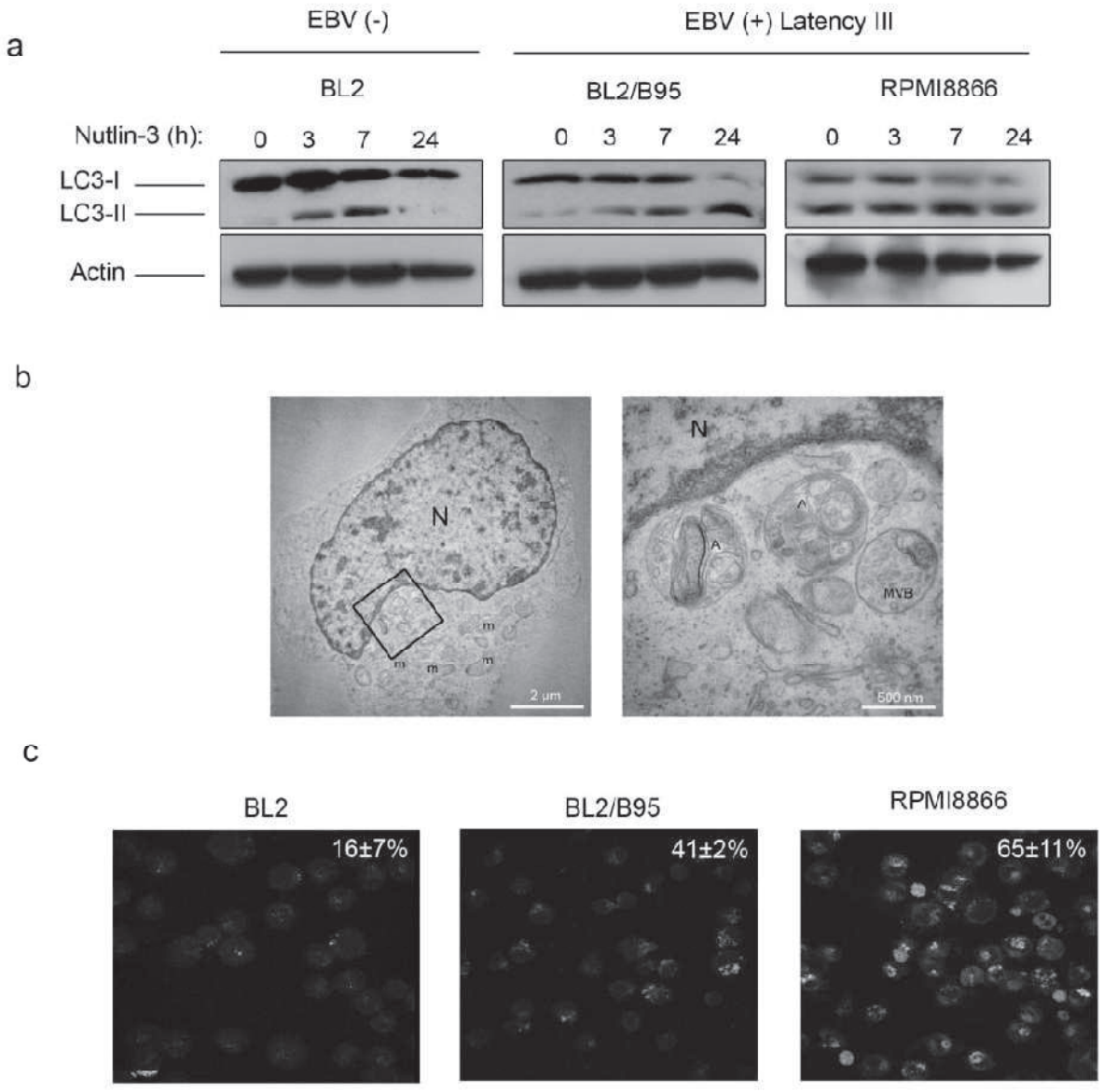


Figure 5. Effect of nutlin-3 treatment on autophagy induction in EBV-negative and positive lymphoid cell lines. (a) Detection of LC3-1 and LC3-II by western blot analysis of whole cell lysates at various times along nutlin-3 treatment. (b) BL2/B95 cells treated with nutlin-3 for 7h and observed by electron microscopy. Right panel is a higher magnification of the boxed area in the left panel. Nucleus (N), multivesicular body (MVB), mitochondria (m) and autophagosomes (A) as indicated. (c) Cells treated with nutlin-3 for 16h were stained with MDC and examined by fluorescence microscopy. The percentage of cells with MDC staining dots indicative of autophagy was assessed. Values represent means from three independent experiments.

These results are thus consistent with a differential effect of nutlin-3 treatment on the level of autophagy in EBV-negative and EBVpositive latency III cells.

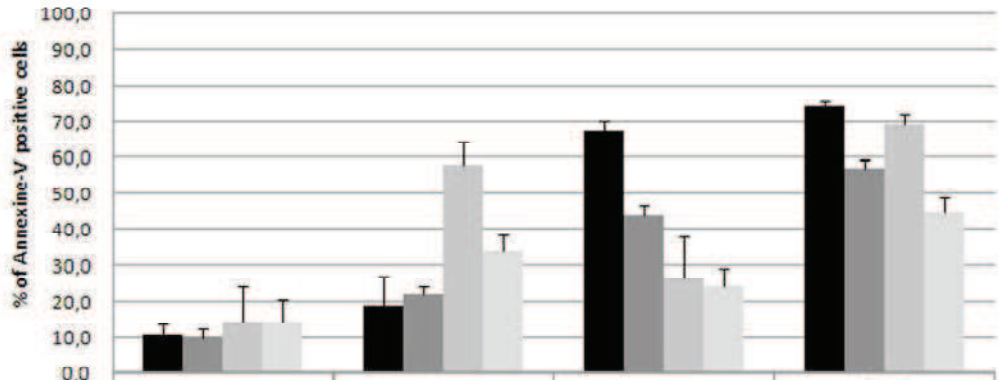
An inhibitor of autophagy induces apoptosis in EBV-positive latency III cells and enhances the effect of nutlin-3

Having observed that nutlin-3 induced higher levels of autophagy in EBV-positive latency III cells than in EBV-negative cells and since the former are much more resistant to nutlin-3-induced apoptosis than the latter, we wished to test the hypothesis that a high level of autophagy had a causative effect on the resistance to apoptosis induction. To this end, we used chloroquine to inhibit autophagy in EBV-positive latency III BL and LCL cells which were then submitted to nutlin-3 treatment for 24 hours. Chloroquine is a lysosomotropic agent which raises intralysosomal pH and impairs autophagic protein degradation, resulting in the accumulation of ineffective autophagosomes and blockade of autophagosomes-lysosomes fusion, with ensuing death in cells relying on autophagy for survival (26). In these experiments the level of apoptosis was assessed by flow cytometry analysis (Figure 6). Treatment with chloroquine alone had a variable effect on the four cell-lines tested. Apoptosis was induced to a very limited extent in BL2 and BL2/B95 cells (19±8 % and 22±2 %, respectively) whereas LY47 and RPMI8866 cells proved much more prone to apoptosis (58±6 % and 34±4 %, respectively). Consistent with our previous report (17), a 24h treatment with nutlin-3 alone also had a variable effect on the various cell lines, with the EBV-negative BL2 cells being very sensitive (68±2 % of apoptotic cells) and the EBV-positive latency III cells being more resistant (44±3%, 27±8% and 25±5% in BL2/B95, LY47 and RPMI8866, respectively). When the two drugs were used in combination, an additive effect on the induction of apoptosis was observed in all four cell lines. Altogether, these results show that in EBV-positive latency III cells which have a constitutive activation of autophagy and are poorly sensitive (BL2/B95) or even resistant (LY47 and RPM18866) to nutlin-3-induced apoptosis, inhibition of autophagy by a chloroquine treatment provides an alternative way to trigger cell death.

Discussion

In this study, we have further analyzed molecular mechanisms involved in the sensitivity of BL and LCL (which are a good model of PTLD) to nutlin-3-induced apoptosis. Previously, we had reported that EBV-positive latency III cells were highly resistant to such an induction.

Figure 6



	untreated	chloroquine	nutlin-3	nutlin-3 + chloroquine
BL2	11±3	19±8	68±2	75±1
BL2/B95	10±3	22±2	44±3	57±2
LY47	14±10	58±6	27±8	69±3
RPMI8866	15±6	34±4	25±5	45±4

Figure 6. Combined effect of nutlin-3 and chloroquine on apoptosis in EBV-negative and - positive lymphoid cell lines. The indicated cells were treated with chloroquine or not for 2h, followed by nutlin-3 or no treatment for 24h. Apoptosis was then measured by flow cytometry detection of annexin V-FITC-positive cells. Values represent means from three independent experiments.

Figure 7

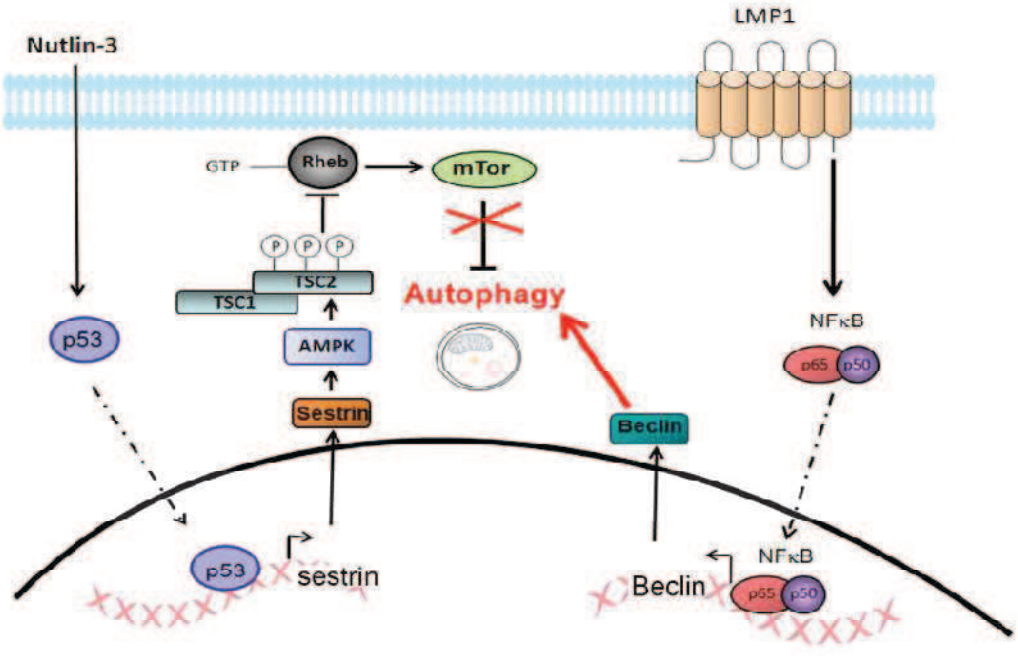


Figure 7. Schematic representation of autophagy activation in EBV-positive latency III cells. The viral LMP1 protein expressed in EBV-positive latency III cells activates p65 which translocates to the nucleus, binds the beclin-1 promoter and activates its transcription. The produced beclin-1 protein stimulates a constitutive level of autophagy in these cells. Activating p53 by a nutlin-3 treatment upregulates the production of sestrin-1 which activates the AMPK-mTOR pathway resulting in the inhibition of mTOR activity. This further enhances the autophagic activity in these EBV-positive latency III cells.

Here, these cells have been shown to possess a high level of constitutive autophagy that was further enhanced by the nutlin-3 treatment. As schematized in Figure 7, this relies on two distinct complementary pathways. In the first pathway, Beclin1 which directly stimulates autophagy is upregulated by NF-κB signaling in an LMP1-dependent way. In the second pathway, p53 activated by the nutlin-3 treatment enhances Sestrin1 transcription resulting in the inhibition of mTOR kinase activity and the delivery of an additional autophagic stimulation.

Lee and Sugden have previously reported that LMP1 enhanced autophagy of EBV-infected cells in a process that regulated its own level of expression (27). Contrasting with our own observations, this upregulation of autophagy by LMP1 was not NF-κB-dependent. Indeed, these authors showed that only the transmembrane domains 3 to 6 of the LMP1 protein, which are not involved in the activation of the NF-κB signaling pathway, were required for induction of autophagy. This difference between our two reports may be due to the distinct cell systems we have been using. In our study, the latency III EBV-positive cell lines which have been used contained the whole EBV genome; in Lee and Sugden's experiments, the effects of the different domains of LMP1 on autophagy were analyzed in cell lines expressing either a mutant or a wild type version of the LMP-1 protein. Furthermore, it is also conceivable that both the C-terminal and the transmembrane domains of LMP1 be involved in the induction of autophagy in EBV-positive cells, the former through activation of NF-κB, the latter via an unknown mechanism. Recent data from the Sugden's group have further emphasized the complexity of the signals activated by LMP1 (28). Thus, the six transmembrane domains of LMP1 were shown to trigger autophagy eventually leading to apoptosis in a process that was blocked by the signaling activated by its C-terminal domain.

Other recent studies have examined the role of autophagy during virus infections. For instance, autophagy was found to protect infected cells by degrading intracellular viruses through xenophagy, a form of autophagy whereby foreign molecules are degraded in autophagosomes, or by contributing to both the innate and adaptative immune responses. On the other hand, some viruses utilize mechanisms that counteract autophagy to escape these anti-viral processes or may even be able to use autophagy to promote their own replication (reviewed in (18, 29)). In the present study, we have shown that B cells latently infected by EBV have a high constitutive level of autophagy in contrast to EBV-negative cells. Most importantly, we have found that inhibiting autophagy in these EBV-positive latency III cells induced their apoptosis thereby suggesting that autophagy corresponds to a strategy developed by the Epstein-Barr virus to promote survival of its host cell. This process comes in addition to various other ways utilized by this virus to subvert the cellular machinery and induce transformation in B cells (30).

We have also reported here that once activated by nutlin-3 treatment, the p53 protein enhanced expression of several genes involved in autophagy. This was true in EBV-negative and -positive latency III cells. The nutlin-3 treatment inhibited mTOR activity through the Sestrin/AMPK pathway resulting in the induction of moderate levels of autophagy in EBVnegative cells. In contrast, in EBV-positive latency III cells, the inhibition of mTOR by nutlin-3 strongly enhanced the basal level of autophagy induced by Beclin-1.

Recent studies have highlighted the dual role played by p53 with regard to autophagy: when nuclear, p53 transactivates target genes stimulating autophagy (6, 31); when cytoplasmic, p53 negatively regulates autophagy by interacting with RB1CC1, the human ortholog of yeast Atg17 which is involved in autophagosome formation (32). We have analyzed the subcellular localization of p53 after nutlin-3 treatment in both EBV-negative and -positive cells. As expected, p53 accumulated in the nuclear fractions of both cell types but it also increased in their cytoplasmic fractions (data not shown). Since autophagy was enhanced in EBV-positive cells, it can be concluded that these cytoplasmic p53 moieties cannot inhibit autophagy. In EBVnegative cells where autophagy is not induced, it would be interesting to test the level of RB1CC1 to determine whether p53 could both initiate and inhibit this catabolic process. The role of autophagy in cancer is complex and controversial. Autophagy can result in tumor suppression through various mechanisms but it can also be involved in tumor survival and in resistance to cancer treatment (reviewed in (33, 34)). In this manuscript, we have reported that using chloroquine, an inhibitor of lysosome/autophagosome fusion, was sufficient to promote apoptosis in EBV-positive latency III cells. We have also found that a pretreatment with chloroquine sensitized these cells to nutlin-3-induced apoptosis. *In vitro* studies have demonstrated that chloroquine potentiates anti-tumoral treatments through its capacity to inhibit autophagy (35, 36). In various mouse xenograft tumor models, it has been shown that co-administrating chloroquine and chemotherapeutic drugs significantly retarded tumor growth and indeed, phase I or II clinical trials are now being performed with chloroquine used in combination with chemotherapeutic agents (37).

Finally it is worth noting that in the work reported by Amaravadi *et al.*, the induction of p53 in mice carrying a Myc-induced lymphoma promoted tumor cell apoptosis but with surviving tumor cells which displayed a high level of autophagy. In this murine model, inhibiting autophagy using chloroquine or ATG5 shRNA enhanced apoptosis and stimulated tumor regression (38). Our *in vitro* results, fully consistent with those obtained *in vivo*, confirm that the autophagy induced by p53 activation can result in tumor cell survival and resistance to treatment.

Since EBV-positive latency III cells have a high level of expression of Bcl-2, our results are also in accordance with those of MacLean *et al* showing that chloroquine-induced cell death of p53+/+ *Eμ-Myc* murine B cells was not impaired by over-expression of the antiapoptotic protein Bcl-2 (39). Using chloroquine thus appears interesting to prevent induction of autophagy and enhance cytotoxic efficacy of p53 activation in cells treated with nutlin-3 or other drugs which induce a p53-dependent apoptosis.

However, since such an induction of autophagy by p53 occurs only in cells with autophagy already activated due to high levels ofBeclin-1, it could be of interest to test for Beclin-1 expression levels prior to any chloroquine treatment.

Materials and Methods

Cell lines.

All BL cell lines were originally established from endemic or sporadic cases of BL. BL2,BL28, BL40, BL2/B95, BL28/B95, BL40/B95, and LY47 were kindly provided by the International Agency for Research on Cancer (IARC, Lyon, France); Seraphina cells were provided by Prof. G. Klein (Stockholm, Sweden); BL2/B95, BL28/B95 and BL40/B95 cells were generated by stable infection of the original EBV-negative BL2, BL28 and BL40 cells with the B95-8 EBV strain. LCL were obtained by the *in vitro* immortalization of normal B lymphocytes. IARC 211 cells were established from the normal B lymphocytes of patient BL40 and were obtained from IARC. Priess and Remb1 cells were kindly provided by Dr JG Bodmer (London, UK). DG75 tTA LMP1, a stable transfectant of the DG75 cell line with a tetracycline-regulated LMP1 expression (40), was kindly provided by Dr Olivier Dellis (Orsay, France). These cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (PAA, Les Mureaux,France) containing 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 20 mM glucose, 100 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin and supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum. Tetracycline (1 μg/ml) was used to silence tetracycline-regulated LMP1 expression in the DG75 tTA LMP1 cell line.

Antibodies and reagents.

Nutlin-3 was kindly provided by Roche Laboratories (Nutley, New Jersey, USA). Chloroquine was obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Anti-p65 mAb (F-6) was purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc (Heidelberg, Germany). Antivinculin (clone VIN-11-5) and anti-β actin (clone AC-74) mAbs were obtained from Sigma- Aldrich. Anti-sestrin-1 pAb was obtained from Abcam (Cambridge, UK).

Anti-beclin-1 pAb, anti-p70S6K pAb, anti-Phospho-p70S6K mAb (Thr389, clone 1A5) and anti-LC3II pAb were purchased from Cell Signaling technology (Ozyme, St Quentin en Yveline, France). Antitopoisomerase II mAb (clone KiS1) was obtained from Chemicon (Millipore, Molsheim, France). Anti-LMP1 mAb (CS1-4) was obtained from Dako France SAS (Trappes, France). Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit anti-mouse IgG and HRP-conjugated donkey anti-rabbit IgG were purchased from GE Healthcare (Velizy, France).

Induction and quantification of apoptosis.

5x105 cells were treated for 24h, at 37°C, with nutlin-3 (10 μM), chloroquine (100 μM) or both of these compounds. Cells were washed in PBS, resuspended in annexin buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1mM MgCl2, 1.8 mM CaCl2) supplemented with 2.5 μg/ml FITC-labeled annexin-V (Roche Applied Science, Meylan, France) and incubated at room temperature for 10 min. Cells were then washed, resuspended in annexin buffer supplemented with propidium iodide (PI) (10 μg/ml) and analyzed by flow cytometry (n=10,000) (FACSCalibur, Becton-Dickinson, Pont-de-Claix, France). Annexin-Vpositive cells (PI-negative or PI-positive) were considered to be apoptotic.

Preparation of nuclear and cytosplasmic fractions.

3 × 106 cells were washed, resuspended in ice-cold, low-salt buffer (20 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 0.2% NP40, 10% glycerol, complete protease inhibitor cocktail) and incubated for 10 min at 4°C. They were then centrifuged at 15 000 × *g* for 10 min. The cytoplasmic fractions (supernatants) were stored at −80°C, whereas the pellets were resuspended in high-salt buffer (350 mM NaCl, 20% glycerol, 20 mM HEPES, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, complete protease inhibitor cocktail) and incubated for 30 min at 4°C. The lysates were centrifuged at 15,000 × *g* for 15 min and the supernatants, containing the nuclear fractions, were stored at −80°C.

Western-blot analysis.

A pellet containing 1x106 cells was solubilized by incubation in ice-cold lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4, 5 mM EDTA, 0.1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, complete protease inhibitor cocktail) for 15 min or directly in loading buffer (60 mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 1% β-mercaptoethanol) for further detection of phospho-proteins. Sample loading buffer was added and the mixture was boiled for 5 min.

Proteins were separated by electrophoresis in 12% polyacrylamide gels or 4-12% MOPS precast gels (Invitrogen, Saint Aubin, France) and transferred to PVDF membranes (Millipore). Blots were blocked by incubation overnight at 4°C in 3% non fat milk powder, 2% glycine in PBS and incubated for 1 h at room temperature with primary antibodies. The blots were then washed and incubated with HRP-conjugated RAM-IgG or HRP-conjugated DAR-IgG. Antibody complexes were detected by enhanced chemiluminescence (Millipore)

SiRNA and transfection

P65 siRNA (Silencer Select Validated siRNA) and negative control siRNA (Silencer Negative Control #1 siRNA) were purchased from Ambion (Saint Aubin, France). 3x106 cells were electroporated (25 ms, 130V) with 20 nM of siRNA in 100 µl of Viaspan medium (Dupont Pharmaceuticals, Paris, France). Cells were then resuspended in complete RPMI medium, incubated for 24 hours and used for further experiments.

Immunofluorescence staining

EBV-positive latency III and EBV-negative cells were incubated or not with nutlin-3 (10 µM)for 16h at 37 °C. Cells were stained with MDC (100 µM, Sigma-Aldrich) for 10 min at 37 °C. After two washes in PBS, cells were plated on glass slides pre-treated with poly-D-lysine. Cells were then fixed in 3% paraformaldehyde for 20 min, washed and examined by fluorescence microscopy (Leica confocal microscope SPE). For each condition, the percentage of cells with characteristic MDC staining dots indicative of autophagy was assessed.

Gene expression analysis

Cells were treated with 10 µM nutlin-3 for various periods of time. Three replicates per condition were done. RNA extracted from each replicate (RNeasy Micro kit, Qiagen, Courtaboeuf, France) was used for gene expression with Agilent® 4x44 Human Gene Expression arrays (Agilent Technologies, Massy, France). After single color hybridization and array scanning, performed as recommanded by manufacturer, data were carrefully check using several quality control. Raw data were extracted from image with Feature Extraction (10.5.1.1, Agilent). These data were log2 transformed and then normalized using the quantile method. An unsupervised cluster was computed using Euclidian distance and Ward method for clusterisation, and validated by bootstrapping. PCA analysis was also performed to analysis sources of variance between samples. Supervised analysis of genes differentially expressed between groups of interest was performed using the moderated t-test from LIMMA package.

The expression profile of the set of significant differentially expressed genes was used to compute a supervised cluster using the same parameters as for unsupervised cluster.

Electron microscopy

Cells were treated or not with 10 μM nutline-3 for 7h. For Epon embedding, cells pellets were fixed for 1 hour at room temperature (RT) in 2% glutaraldehyde (EMS, Hatfield, PA, USA) in 0.1M cacodylate buffer, pH 7.4.
Cells pellets were post-fixed for 1 hour with 1% osmium tetroxide (EMS, Hatfield, PA, USA) in 0.1M cacodylate buffer and 1.5% potassium ferrocyanide (Sigma-Aldrich). Cells were dehydrated in increasing concentrations of ethanol and embedded in Epon812 (EMS). Polymerization was carried out for 72 hours at 56°C. Ultrathin sections (70 nm) were collected on collodion-carbon-coated copper grids. Sections were contrasted by uranyl acetate (Merck, Lyon, France) and lead citrate (staining solution by Reynold's). Cells were observed with Zeiss 902 electron microscopein filtered zero loss modeusing CCD Megaview III camera and SIS system (Olympus, Rungis, France).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Acknowledgments: This work was supported by grants from the Fondation de France 00012093 (JW), the Cancéropole and Région Ile-de-France (ERABL, IF09-2092/R), the Fondation pour la Recherche Médicale (doctoral fellowship to AP) and the Université Paris- Sud 11 (BQR 2009). We thank Sophie Salome-Desnoulez for expert technical assistance in performing confocal microscopy analysis and we are very grateful to Evelyne May and Martine Raphaël for helpful discussions and suggestions.

References

1. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; **88:** 323-331.
2. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002; **2:** 594-604.
3. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 2007; **21:** 2861-2873.
4. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* 2011; **18:** 571-580.

5. Budanov AV, Karin M. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* 2008; **134:** 451-460.

6. Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR*, et al.* DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 2006; **126:** 121-134.

7. Tasdemir E, Chiara Maiuri M, Morselli E, Criollo A, D'Amelio M, Djavaheri-Mergny M*, et al.* A dual role of p53 in the control of autophagy. *Autophagy* 2008; **4:** 810-814.

8. Dickens MP, Fitzgerald R, Fischer PM. Small-molecule inhibitors of MDM2 as new anticancer therapeutics. *Semin Cancer Biol* 2010; **20:** 10-18.

9. Vu BT, Vassilev L. Small-molecule inhibitors of the p53-MDM2 interaction. *Curr Top Microbiol Immunol* 2011; **348:** 151-172.

10. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z*, et al.* In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004; **303:** 844-848.

11. Stuhmer T, Chatterjee M, Hildebrandt M, Herrmann P, Gollasch H, Gerecke C*, et al.* Nongenotoxic activation of the p53 pathway as a therapeutic strategy for multiple myeloma. *Blood* 2005; **106:** 3609-3617.

12. Sarek G, Kurki S, Enback J, Iotzova G, Haas J, Laakkonen P*, et al.* Reactivation of the p53 pathway as a treatment modality for KSHV-induced lymphomas. *J Clin Invest* 2007; **117:** 1019-1028.

13. Secchiero P, Barbarotto E, Tiribelli M, Zerbinati C, di Iasio MG, Gonelli A*, et al.* Functional integrity of the p53-mediated apoptotic pathway induced by the nongenotoxic agent nutlin-3 in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* 2006; **107:** 4122-4129.

14. Vassilev LT. MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends Mol Med* 2007; **13:** 23-31.

15. Yuan Y, Liao YM, Hsueh CT, Mirshahidi HR. Novel targeted therapeutics: inhibitors of MDM2, ALK and PARP. *J Hematol Oncol* 2011; **4:** 16.

16. Renouf B, Hollville E, Pujals A, Tetaud C, Garibal J, Wiels J. Activation of p53 by MDM2 antagonists has differential apoptotic effects on Epstein-Barr virus (EBV)-positive and EBV negative Burkitt's lymphoma cells. *Leukemia* 2009; **23:** 1557-1563.

17. Pujals A, Renouf B, Robert A, Chelouah S, Hollville E, Wiels J. Treatment with a BH3 mimetic overcomes the resistance of latency III EBV (+) cells to p53-mediated apoptosis. *Cell Death Dis* 2011; **2:** e184.

18. Cavignac Y, Esclatine A. Herpesviruses and autophagy: catch me if you can! *Viruses* 2010; **2:** 314-333.

19. Biederbick A, Kern HF, Elsasser HP. Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol* 1995; **66:** 3-14.

20. Huen DS, Henderson SA, Croom-Carter D, Rowe M. The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene* 1995; **10:** 549-560.

21. Laherty CD, Hu HM, Opipari AW, Wang F, Dixit VM. The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J Biol Chem* 1992; **267:** 24157-24160.

22. Nivon M, Richet E, Codogno P, Arrigo AP, Kretz-Remy C. Autophagy activation by NFkappaB is essential for cell survival after heat shock. *Autophagy* 2009; **5:** 766-783.

23. Ryu HJ, Kim JE, Yeo SI, Kang TC. p65/RelA-Ser529 NF-kappaB subunit phosphorylation induces autophagic astroglial death (Clasmatodendrosis) following status epilepticus. *Cell Mol Neurobiol* 2011; **31:** 1071-1078.

24. Copetti T, Demarchi F, Schneider C. p65/RelA binds and activates the beclin 1 promoter. *Autophagy* 2009; **5:** 858-859.

25. Isotani S, Hara K, Tokunaga C, Inoue H, Avruch J, Yonezawa K. Immunopurified mammalian target of rapamycin phosphorylates and activates p70 S6 kinase alpha in vitro. *J Biol Chem* 1999; **274:** 34493-34498.

26. Glaumann H, Ahlberg J. Comparison of different autophagic vacuoles with regard to ultrastructure, enzymatic composition, and degradation capacity--formation of crinosomes. *Exp Mol Pathol* 1987; **47:** 346-362.

27. Lee DY, Sugden B. The latent membrane protein 1 oncogene modifies B-cell physiology by regulating autophagy. *Oncogene* 2008; **27:** 2833-2842.

28. Pratt ZL, Zhang J, Sugden B. The latent membrane protein 1 (LMP1) oncogene of Epstein-Barr virus can simultaneously induce and inhibit apoptosis in B-cells. *J Virol* 2012.

29. Kirkegaard K. Subversion of the cellular autophagy pathway by viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009; **335:** 323-333.

30. Klein G, Klein E, Kashuba E. Interaction of Epstein-Barr virus (EBV) with human Blymphocytes *Biochem Biophys Res Commun* 2010; **396:** 67-73.

31. Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102:** 8204-8209.

32. Morselli E, Shen S, Ruckenstuhl C, Bauer MA, Marino G, Galluzzi L*, et al.* p53 inhibits autophagy by interacting with the human ortholog of yeast Atg17, RB1CC1/FIP200. *Cell Cycle* 2011; **10:** 2763-2769.

33. Eskelinen EL. The dual role of autophagy in cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2011; **11:** 294- 300.

34. Rosenfeldt MT, Ryan KM. The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis* 2011; **32:** 955-963.

35. Guo XL, Li D, Hu F, Song JR, Zhang SS, Deng WJ*, et al.* Targeting autophagy potentiates chemotherapy-induced apoptosis and proliferation inhibition in hepatocarcinoma cells. *Cancer Lett* 2012.

36. Sasaki K, Tsuno NH, Sunami E, Tsurita G, Kawai K, Okaji Y*, et al.* Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells. *BMC Cancer* 2010; **10:** 370.

37. Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther* 2011; **10:** 1533-1541.

38. Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, Bui T, Christophorou MA, Evan GI*, et al.* Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest* 2007; **117:** 326-336.

39. Maclean KH, Dorsey FC, Cleveland JL, Kastan MB. Targeting lysosomal degradation induces p53-dependent cell death and prevents cancer in mouse models of lymphomagenesis. *J Clin Invest* 2008; **118:** 79-88.

40. Floettmann JE, Ward K, Rickinson AB, Rowe M. Cytostatic effect of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 analyzed using tetracycline-regulated expression in B cell lines. *Virology* 1996; **223:** 29-40.

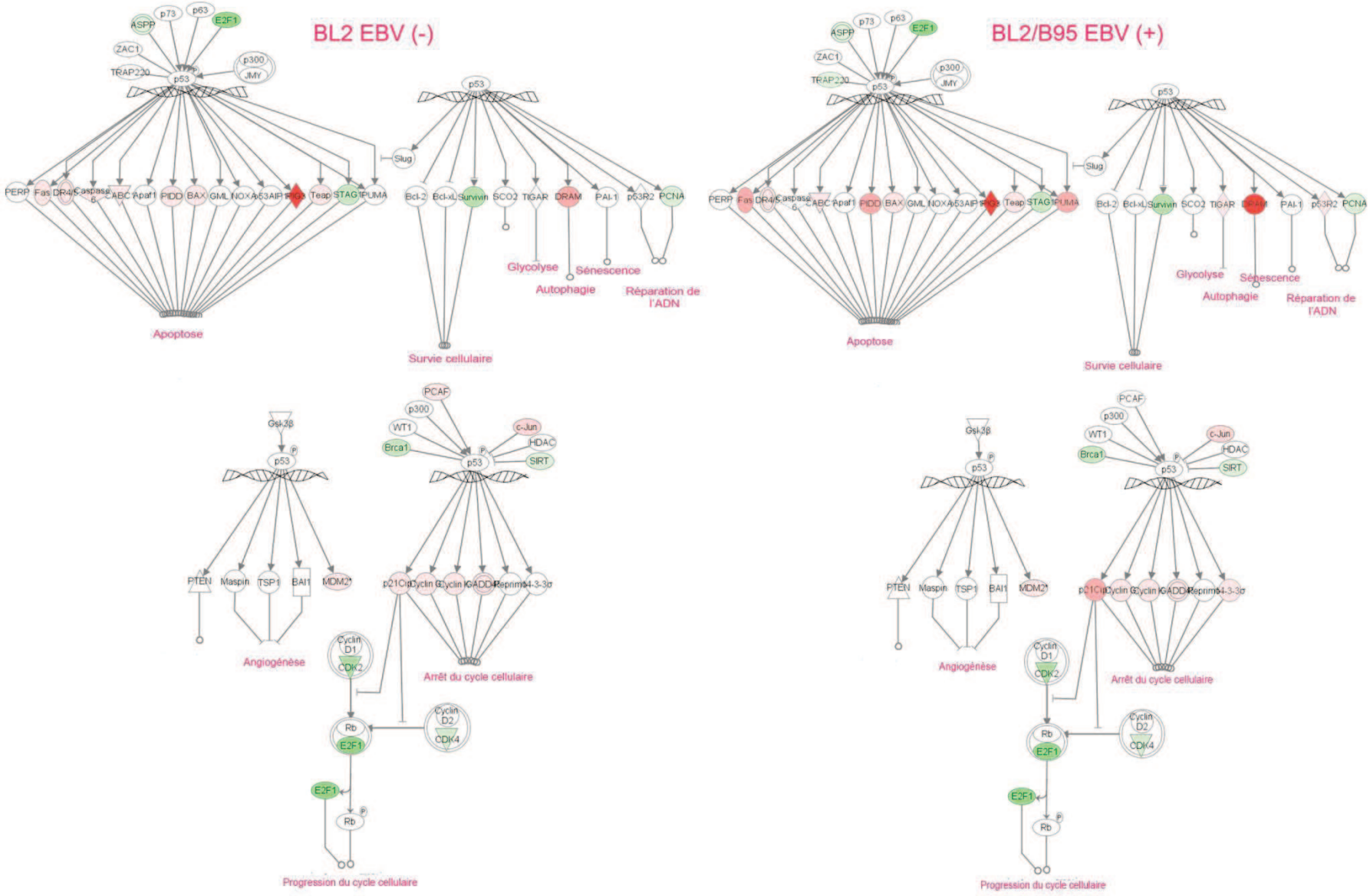


Figure 58 : Profil d'expression génique des gènes cibles de p53 après 16h de traitement avec la nutline-3 dans les BL2 et BL2/B95

e) Analyse du profil d'expression génique des cellules BL2 et BL2/B95 avant et après traitement avec la nutline-3

L'analyse du transcriptome, réalisée dans les BL2 et les BL2/B95 après traitement à la nutline-3, nous a permis d'identifier plusieurs gènes et voies de signalisation différemment régulés dans ces deux lignées qui n'ont pas été décrits dans l'article portant sur l'autophagie. Les résultats, présentés sur la figure 58 sont ceux obtenus pour des temps tardifs de traitement (16h). Nous pouvons remarquer que les gènes cibles de p53 induits par le traitement sont quasiment les mêmes dans les BL2 et les BL2/B95. Il existe toutefois quelques différences entre les cellules EBV (-) et EBV (+). L'expression du gène $p21^{WAF1}$, dont le produit est impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire, est plus fortement stimulé dans les BL2/B95 que dans les BL2 (FC=16.7 et 7.5 respectivement). Ce résultat est en accord avec ceux décrits dans la première partie de ce chapitre et dans l'article en annexe et pourrait expliquer le fait que le traitement par la nutline-3 induise un arrêt du cycle cellulaire dans les cellules EBV (+) alors que ce n'est pas le cas dans les cellules EBV (-). De la même façon, le gène codant pour la protéine 14-3-3σ, qui peut bloquer le passage du cycle en phase M (Hermeking et al., 1997), est surexprimé uniquement dans la lignée BL2/B95 après traitement par la nutline-3 (FC=2.2). L'expression du gène *p53R2* est également augmentée uniquement dans les BL2/B95. Le produit de ce gène est une ribonucléotide réductase, son activité permet de fournir les nucléotides nécessaires à la réparation de l'ADN et favorise la survie cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN ((Yamaguchi et al., 2001).

De nombreux gènes, dont les produits sont impliqués dans l'apoptose, tels que *FAS, DR5, PIDD, Bax,* ou *PIG3* sont induits dans les 2 lignées en réponse au traitement avec la nutline-3. Les gènes *PIDD, DR5* et *FAS*, dont les produits participent à l'apoptose induite par la voie des récepteurs à domaine de mort, sont plus fortement stimulés dans les BL2/B95 que dans les BL2 (FC= 16.5 vs 8.4 pour *PIDD,* 4.7 vs 2.8 pour *DR5* et 20.5 vs 9.1 pour *FAS* dans les BL2/B95 et BL2 respectivement).

Le traitement par la nutline-3 induit l'expression du gène codant pour la protéine « BH3 only » PUMA dans les BL2/B95 uniquement (FC=13.0). Ce résultat suggère que l'expression de cette protéine pro-apoptotique ne suffit pas à déstabiliser les complexes Bax/Bcl-2 puisque, comme indiqué précédemment, Bax est inactif dans ces cellules.

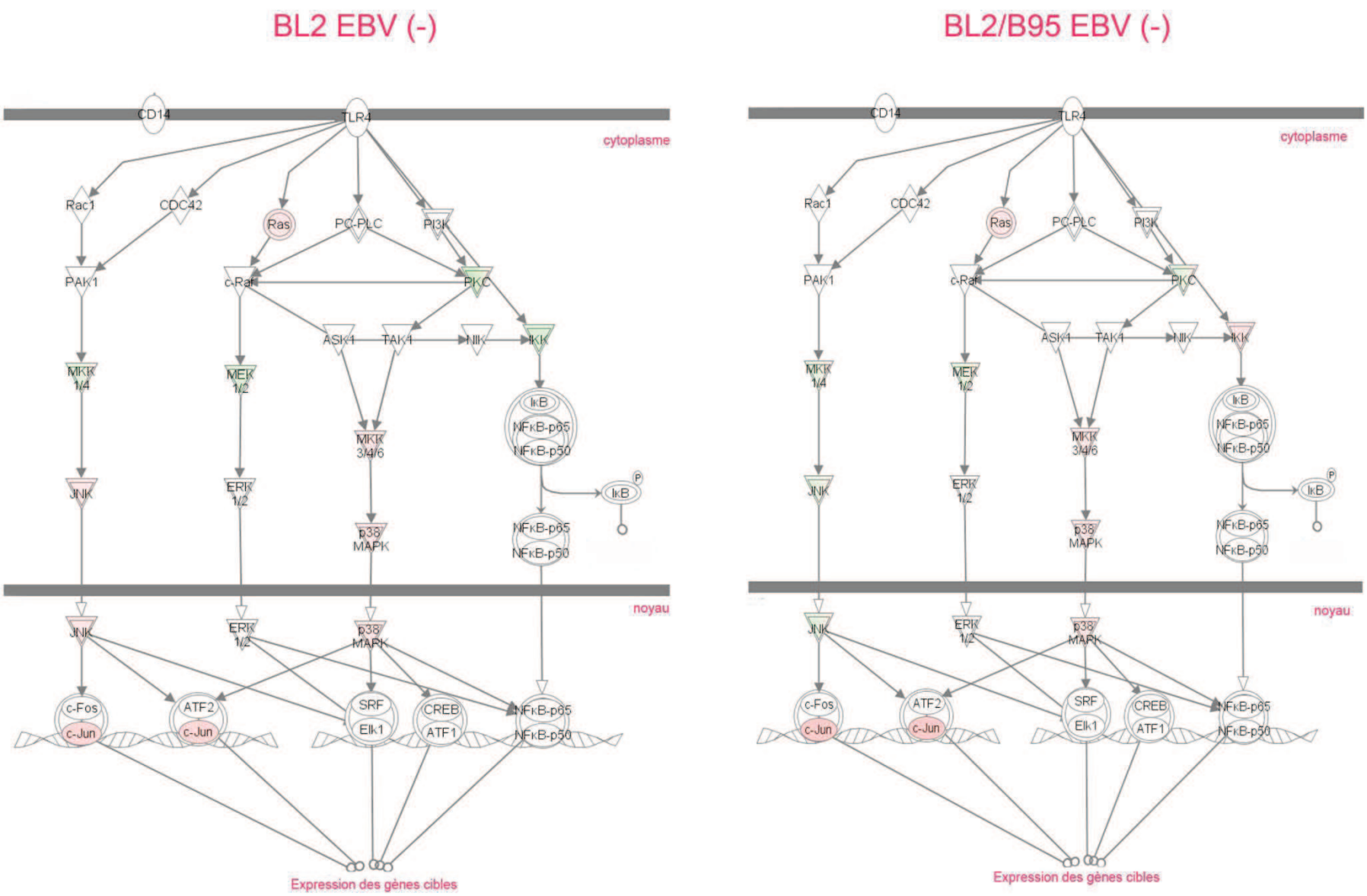


Figure 59 : Profil d'expression génique des gènes impliqués dans la voie des MAP kinases après 16h de traitement avec la nutline-3

Le gène codant pour la caspase-6 est, quant à lui, exprimé uniquement dans les BL2 (FC=2.6). Certaines études suggèrent que cette caspase, connue pour cliver la lamine A lors de l'apoptose, pourrait également jouer un rôle important dans les mécanismes précoces de l'apoptose induite par différents traitements anti-cancéreux (Loegering et al., 2006). Nos résultats sont en accord avec ces observations puisque l'expression du gène codant pour cette caspase est augmentée uniquement dans les cellules sensibles au traitement.

De nombreuses voies de signalisations sont modifiées en réponse au traitement avec la nutline-3. Nous nous intéresserons pour finir à celle des MAP kinases qui participe à la régulation de l'apoptose et de l'autophagie. La figure 59 illustre le profil d'expression des différents gènes impliqués dans cette voie après 16h de traitement avec la nutline-3. Ce composé induit, dans les 2 lignées, l'expression de *MAP2K4* (MAP kinase d'ordre 2) (FC= 2.1 pour BL2/B95 et BL2) ainsi que celle du gène codant pour la MAP kinase p38 (FC= 5.4 et 4 pour BL2/B95 et BL2 respectivement). L'activation de la voie p38 pourrait être due à l'augmentation de l'expression de H-Ras (FC= 3.8 et 4.1 pour BL2/B95 et BL2 respectivement). Une étude a montré que l'oncogène Ras était capable d'exercer un rétrocontrôle négatif sur son activité proliférative en induisant la voie des MAP kinase (Chen et al., 2000). Dans les BL2, l'expression du gène codant pour la MAPK JNK est également augmentée (FC= 2.1). Le facteur de transcription c-Jun est également induit en réponse au traitement par la nutline-3 dans les 2 lignées (FC=12.1 et 13.1 pour BL2/B95 et BL2 respectivement).

Pour finir il est important de noter qu'en absence de traitement avec la nutline-3, ASK1, le régulateur positif de la kinase JNK, est plus fortement exprimé dans les BL2/B95 que dans les BL2 (FC=3.1). Une étude a montré qu'en présence de TNFα, également plus exprimé dans les BL2/B95 que dans les BL2, ASK1 se fixe sur TRAF2 et active JNK (Nishitoh et al., 1998). On peu donc supposer que la présence de TNFα pourrait favoriser le recrutement de ASK1 et l'activation de JNK dans les lignées EBV (+) en latence III. L'activation de la voie des MAP kinase, à l'état basal ou en réponse au traitement par la nutline-3, peut avoir plusieurs conséquences sur la régulation de l'autophagie et de l'apoptose, qui seront discutées dans la prochaine partie de ce chapitre.

2. Discussion

Notre équipe s'intéresse aux mécanismes d'apoptose, induits par la réactivation de p53, dans plusieurs lymphomes B associés à EBV. Nous avons montré que les cellules EBV (+) en latence de type III sont beaucoup plus résistantes à la nutline-3 que les cellules EBV (-) ou EBV (+) en latence de type I. Ce phénomène est également retrouvé après traitement par divers agents génotoxiques. De plus, nos résultats indiquent que le pré-traitement des cellules EBV(+) en latence III par la nutline 3 accroît la résistance de ces celllules à ces composés. Dans ce contexte, la première partie de mon travail de thèse a consisté à caractériser les mécanismes de résistance à l'apoptose induite par p53 dans les cellules EBV (+) en latence de type III. Les résultats obtenus indiquent que $p21^{WAF1}$ est impliquée dans la résistance à l'Étoposide et au Melphalan induite par la nutline-3. Par ailleurs, la surexpression de Bcl-2 ainsi que le niveau élevé d'autophagie dans ces cellules inhibe l'apoptose induite par ce composé. Ces différentes données feront donc l'objet de notre discussion.

a) Implication de $p21^{WAF1}$ dans la résistance à l'étoposide et au melphalan des cellules EBV (+) en latence de type III traitées par la nutline-3

Nous nous sommes d'abord intéressés à l'implication de $p21^{WAF1}$, dont l'expression est régulée par p53, dans la résistance aux agents génotoxiques induite par la nutline-3. Les résultats indiquent que cette protéine est fortement exprimée en réponse au traitement dans les cellules EBV (+) en latence de type III. Nous avons émis une hypothèse selon laquelle le pré-traitement par la nutline-3 induirait un arrêt du cycle cellulaire qui serait responsable de la résistance à l'apoptose induite par les agents chimio-thérapeutiques dans ces cellules. Cette hypothèse a été confirmée par l'utilisation de siARN ciblant *$p21^{WAF1}$*. En effet, l'inhibition de ce gène dans les cellules EBV (+) en latence III traitées avec de la nutline-3, restaure leur sensibilité aux agents génotoxiques. Des résultats similaires ont été obtenus par une autre équipe qui a montré d'une part que la protéine $p21^{WAF1}$ exerçait un effet antagoniste sur la voie intrinsèque de l'apoptose et d'autre part que son inhibition sensibilisait une lignée de carcinome du colon à l'apoptose induite par différents agents génotoxiques (Javelaud and Besancon, 2002). Les données obtenues lors de l'analyse du transcriptome, réalisée dans les BL2 et BL2/B95 après traitement par la nutline-3, sont en accord avec l'ensemble de ces résultats et montrent que le gène *$p21^{WAF1}$* est plus fortement stimulé dans les BL2/B95 que dans les BL2. Les résultats du transcriptome montrent également que les gènes codant pour les protéines 14-3-3 σ et GADD45, impliquées dans l'arrêt du cycle cellulaire en G2, sont induit en réponse au traitement.

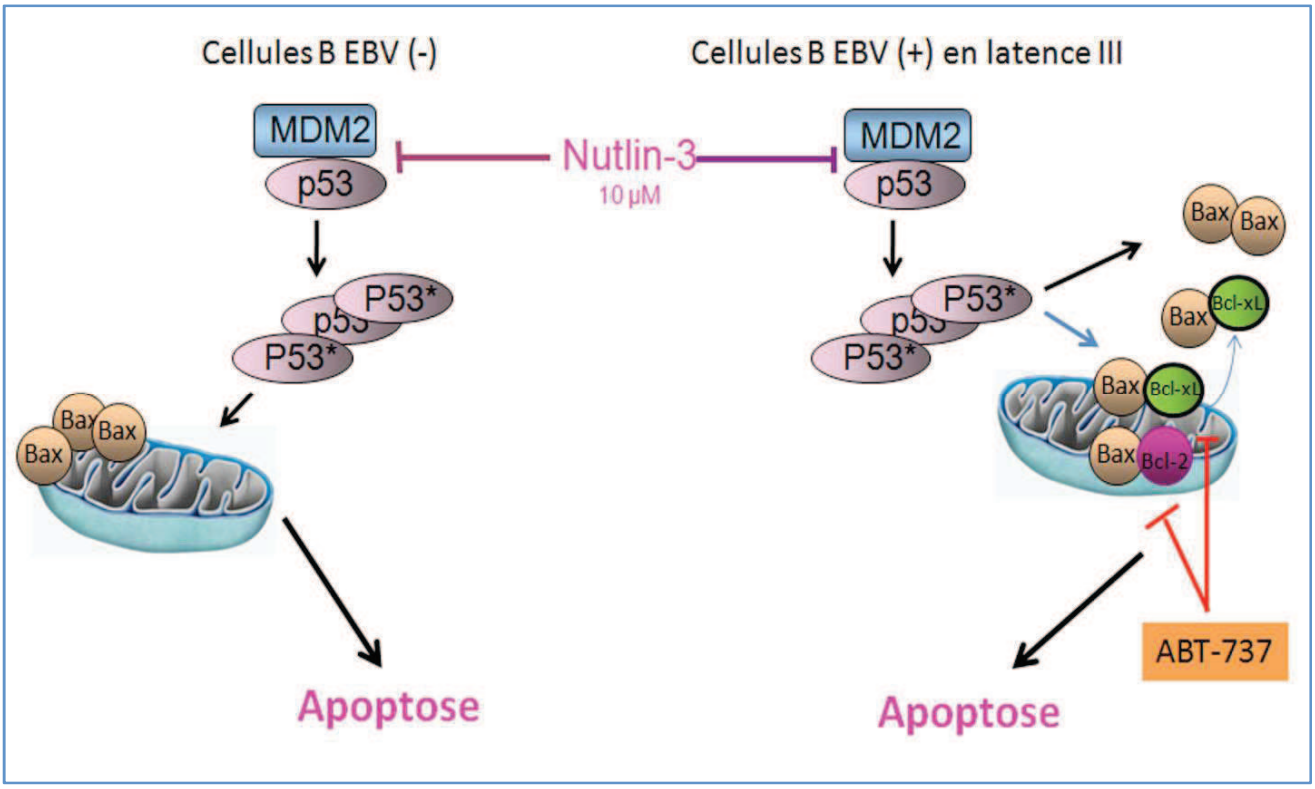
Toutefois, l'analyse du cycle cellulaire, réalisée après 24 h de traitement avec la nutline-3, ne montre pas d'arrêt en G2 dans nos cellules mais un arrêt très important en G1 (Figure 3 de l'article en annexe). Pour approfondir ce travail et expliquer ce résultat, nous envisageons de vérifier le niveau d'expression de ces protéines par Western Blot et de reproduire l'analyse du cycle cellulaire en utilisant des temps de traitements plus courts afin de déterminer si l'arrêt en G2 peut avoir lieu avant l'arrêt en G1.

Une augmentation de l'expression du gène *p53R2*, dont le produit est impliqué dans la réparation des dommages à l'ADN, est retrouvée uniquement dans les BL2/B95. D'autres études ont montré que l'induction de gènes cibles de p53 impliqués dans la réparation de l'ADN pouvait augmenter la survie des cellules (McKay et al., 2001). Il serait donc intéressant de tester l'effet, sur le plan fonctionnel, de l'induction de *p53R2* dans les BL2/B95.

L'ensemble de ces données montrent que le pré-traitement par la nutline-3 favorise un arrêt du cycle cellulaire en G1 dans les cellules EBV (+) en latence de type III, médié par la protéine $p21^{WAF1}$. Toutefois, nos résultats indiquent que l'utilisation de siARN inhibant l'expression de $p21^{WAF1}$ n'augmente que faiblement l'apoptose induite par la nutline-3 lorsqu'elle est utilisée seule. Nous avons donc cherché à identifier par la suite, les mécanismes de résistances à l'apoptose induite par p53 dans les cellules EBV (+) en latence de type III.

b) Implication de Bcl-2 dans la résistance à la nutline-3 des cellules EBV (+) en latence III

Nous avons poursuivi ce travail en utilisant des LCL qui présentent également une latence de type III et constituent un bon modèle pour l'étude des PTLD. Nous avons d'abord caractérisé l'apoptose induite par la nutline-3 dans les lignées de LB et les LCL. Nos résultats indiquent que les LCL ne sont pas aussi sensibles au traitement par la nutline-3 que les cellules EBV (-) ce qui souligne l'implication du virus dans ce mécanisme de résistance. Les résultats du transcriptome ainsi que ceux obtenus par Western blot montrent qu'un grand nombre de gènes pro-apoptotiques sont induits en réponse à la nutline-3 dans les cellules EBV (-) et EBV (+). Parmi ces gènes on retrouve celui codant pour la protéine pro-apoptotique Bax. Cette dernière est fortement impliquée dans l'apoptose induite par ce composé. En effet, nous avons montré que dans les lignées sensibles au traitement, la nutline-3 induit une relocalisation de Bax du cytoplasme vers la mitochondrie, ainsi qu'un changement de conformation qui lui permet d'être active et d'exercer ses propriétés pro-apoptotiques. De plus, l'inhibition de l'expression de *Bax* par des siRNA dans ces cellules diminue l'apoptose induite par la nutline-3.



<u>Figure 60</u> : Schéma illustrant les voies apoptotiques induites par la nutline-3 dans les lignées EBV (-) et dans les lignées EBV (+) en latence de type III. Le traitement des cellules par la nutline-3 induit la dissociation du complexe p53/MDM2 dans l'ensemble des lignées. L'activation de p53 se traduit par une augmentation de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax qui est activée et relocalisée à la mitochondrie dans les cellules EBV (-). L'activation de Bax permet d'induire l'apoptose de ces cellules. Dans les cellules EBV (+) en latence de type III, la surexpression de Bcl-2 inhibe l'activation de Bax. On peut supposer qu'elle induit également une rétro-translocation de cette protéine médiée par la protéine Bcl-xL. L'utilisation d'ABT-737 un inhibiteur de Bcl-2 et Bcl-xL, permet de restaurer l'apoptose des cellules EBV (+) en latence de type III.

En revanche, la relocalisation de Bax ainsi que son changement de conformation n'ont pas été observés dans les lignées EBV (+) en latence III. Plusieurs études ont montré qu'EBV pouvait augmenter l'expression de protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 (Rowe et al., 1994; Wang et al., 1996). Nous avons donc évalué le niveau d'expression de Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 dans les cellules de LB et les LCL et nous avons montré que seule Bcl-2 était surexprimée dans l'ensemble des lignées EBV (+) en latence de type III. Nos résultats indiquent également que cette protéine anti-apoptotique interagit avec Bax dans ces cellules, traitées ou non par la nutline-3. Ces données suggèrent que Bcl-2 pourrait être responsable de l'inactivation de Bax et pourrait s'opposer à la relocalisation mitochondriale de cette protéine. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons utilisé un inhibiteur de Bcl-2 et Bcl-xL, nommé ABT-737. Nos résultats indiquent que le pré-traitement des cellules EBV (+) en latence de type III avec ce composé permet d'augmenter la translocation de Bax à la mitochondrie et favorise le changement conformationnel de cette protéine. Pour finir, nous avons montré que l'utilisation d'ABT-737 et de la nutline-3 en combinaison permet de restaurer la sensibilité de ces cellules à l'apoptose induite par p53 (Figure 60).

Cette étude soulève certaines questions concernant l'inhibition de la relocalisation de Bax par la protéine Bcl-2. Nous nous sommes demandé comment cette protéine anti-apoptotique, localisée au niveau de la mitochondrie, pouvait exercer un tel effet sur la fraction cytoplasmique de Bax. Une étude, publiée très récemment par Edlich et *al* pourrait expliquer ce phénomène (Edlich et al., 2011). Les auteurs ont montré qu'il existait, à l'état basal, une rétro-translocation de Bax de la mitochondrie vers le cytoplasme. Ils ont ensuite testé l'effet d'ABT-737 sur cette rétro-translocation et ont montré que l'utilisation de ce composé réduisait ce phénomène de 75%. Ce résultat suggère donc qu'une interaction directe entre Bax et Bcl-2 ou Bcl-xL est nécessaire pour induire ce processus. Ils ont finalement montré que Bcl-xL, qui peut être localisée dans le cytoplasme ou la mitochondrie est impliquée dans ce mécanisme de rétro-translocation. Selon les auteurs, cette dernière s'associerait avec Bax à la mitochondrie et permettrait son export vers le cytoplasme. Les auteurs ont également montré que la surexpression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2, Mcl-1 et Bcl-xL favorisait ce mécanisme. On peut donc penser que dans notre modèle, le traitement par la nutline-3 augmente l'expression de Bax et induit sa relocalisation à la mitochondrie. La surexpression de Bcl-2 dans les cellules EBV (+) en latence III serait à l'origine de la rétro-translocation de cette protéine pro-apoptotique vers le cytoplasme par l'intermédiaire de Bcl-xL (Figure 60). Ce phénomène permet d'expliquer l'accumulation de Bax observée dans les deux compartiments cellulaires, après traitement par la nutline-3.

De plus, nos résultats sont parfaitement cohérents avec ceux d'Edlich et *al* puisque nous avons également observé que le traitement avec ABT-737 permettait d'augmenter la fraction mitochondriale de Bax. Pour confirmer notre hypothèse il serait intéressant de voir quel est l'effet de l'inhibition de Bcl-xL par des siRNA sur la relocalisation de Bax à la mitochondrie.

L'analyse du profil d'expression génique en réponse à la nutline-3 a également mis en évidence une surexpression du gène codant pour la protéine « BH3 only » PUMA dans les BL2/B95. Nos résultats suggèrent que la surexpression de Bcl-2 dans ces cellules limiterait les propriétés pro-apoptotique de cette protéine. En effet, l'augmentation de son expression ne permet pas d'activer Bax en réponse au traitement. Plusieurs études ont montré qu'ABT-737 induit la libération de PUMA des complexes PUMA/Bcl-2, provoquant ainsi l'activation de Bax et la perméabilisation mitochondriale des cellules (Letai, 2009). Ce mécanisme pourrait expliquer, au moins en partie, l'effet synergique observé entre la nutline-3 et ABT-737 dans les cellules EBV (+) en latence de type III.

c) Induction des récepteurs de mort par la nutline-3

Nous avons analysé les mécanismes induisant la voie mitochondriale de l'apoptose en réponse à l'activation de p53. Cependant, ce facteur de transcription peut également induire l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la voie extrinsèque de l'apoptose tels que *DR4, DR5, PIDD* ou *Fas*. Les données du transcriptome montrent qu'en réponse au traitement à la nutline-3, les gènes *PIDD DR5* et *FAS* sont plus fortement stimulés dans les BL2/B95 que dans les BL2. Une étude a montré que l'utilisation de la nutline-3 permettait de sensibiliser des cellules d'ostéosarcome et de cancers du colon à l'apoptose induite par la cytokine TRAIL (Hori et al., 2010). L'utilisation de TRAIL recombinant, en association avec la nutline-3, pourrait également être testée dans les cellules EBV (+) en latence de type III. L'induction de la voie extrinsèque pourrait en effet constituer une stratégie alternative pour induire la mort de ces cellules.

d) Rôle de l'activité non transcriptionnelle de p53 en réponse à la nutline-3

Depuis plusieurs années, il a été montré que p53 pouvait être localisée dans le cytoplasme et induire une apoptose indépendante de son activité transcriptionnelle. La p53 cytoplasmique relocalisée à la mitochondrie interagit avec Bcl-2 et Bcl-xL libérant ainsi les protéines effectrices de l'apoptose.

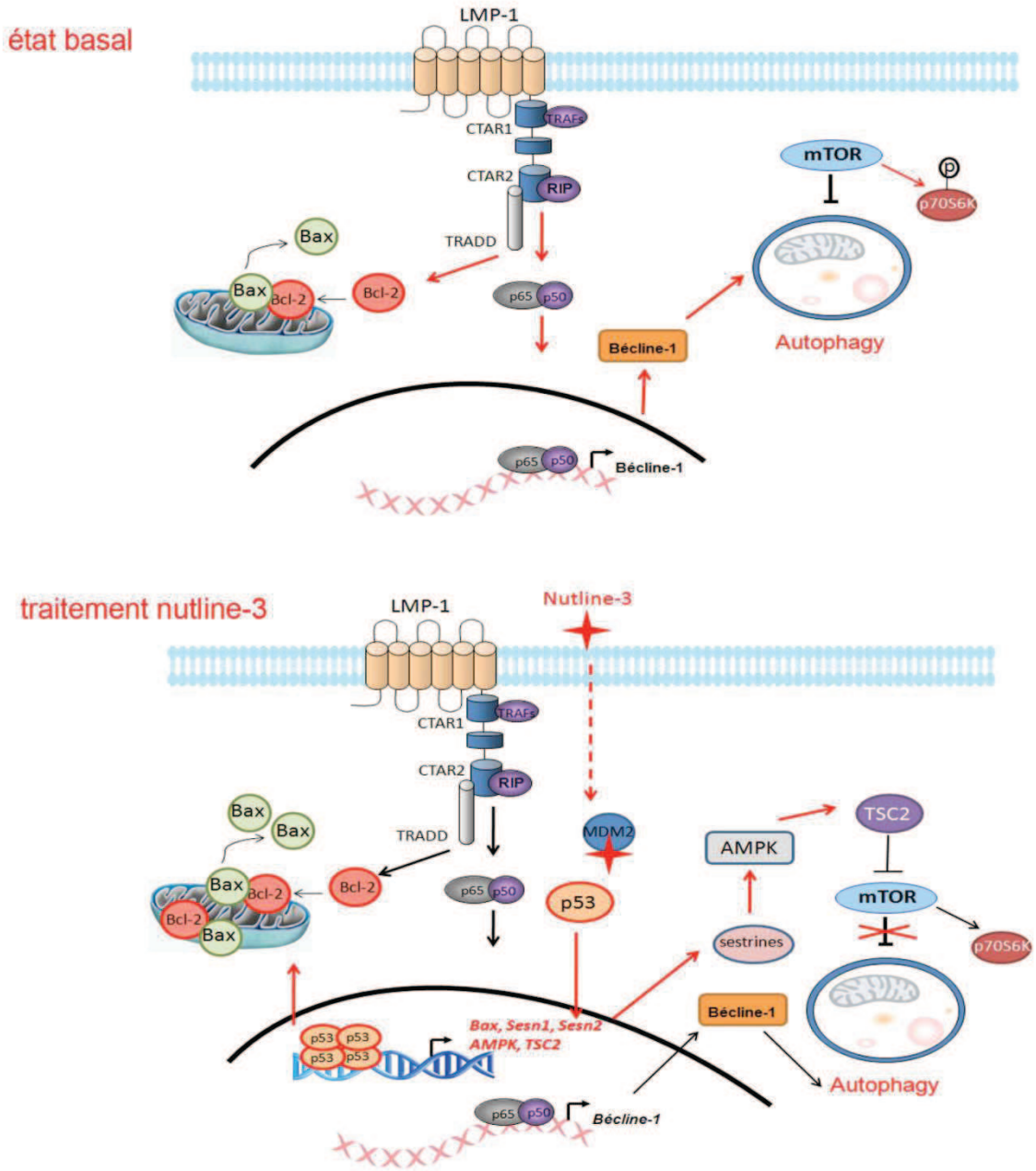


Figure 61 : Schéma illustrant les différents mécanismes impliqués dans la résistance à l'apoptose induite par p53 des cellules EBV (+) en latence de type III. A l'état basal, la LMP-1 induit l'expression de la protéine Bcl-2 qui interagit avec Bax. La LMP-1 active également p65 qui se fixe sur le promoteur de bécline-1 et augmente son expression. Ce mécanisme augmente le niveau d'autophagie dans ces cellules. Le traitement par la nutline-3 induit l'activation de p53 ce qui permet la transcription de ses gènes cibles qui peuvent être impliqués dans l'apoptose et l'autophagie. Dans ces cellules, l'augmentation de l'expression de Bax n'a pas d'effet car la protéine Bcl-2 inhibe l'activité pro-apoptotique de cette protéine. L'activation des Sestrines, de l'AMPK et de TSC2 induit une inhibition de mTOR ce qui lève l'inhibition de l'autophagie. Ce mécanisme contribue également à la résistance des cellules à l'apoptose.

D'après Leu *et al*, p53 peut également interagir avec la protéine mitochodriale Bak, conduisant ainsi à l'oligomérisation de cette protéine et à sa dissociation du complexe inhibiteur de l'apoptose, Bak/Mcl-1. Enfin, bien que l'interaction entre p53 et Bax n'ait jamais été observé, il semblerait que p53 soit capable d'activer directement Bax en l'absence d'autre protéine (Vaseva and Moll, 2009). En effet, l'équipe de Vaseva a montré en 2009 que la fraction mitochondriale de p53 contribue fortement à l'apoptose induite par la nutline-3 dans une lignée de LAM et de cancer du colon (Vaseva et al., 2009). Nos résultats préliminaires montrent que p53 s'accumule à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules EBV (-) et EBV (+) après traitement par la nutline-3. Nous envisageons de vérifier si la p53 est relocalisée à la mitochondrie et si elle interagit avec les membres de la famille Bcl-2 dans les cellules traitées ou non avec la nutline-3. D'autre part, nous chercherons à évaluer l'implication de l'activité non transcriptionnelle de p53 dans l'apoptose médiée par la nutline-3 dans les cellules EBV (-) et EBV (+) en latence III. Pour ce faire, l'apoptose induite par la nutline-3 sera évaluée en présence de pifithrine mu, une molécule capable d'inhiber la translocation de p53 à la mitochondrie.

e) Implication de l'autophagie dans la résistance à l'apoptose des cellules EBV (+) en latence de type III

L'étude du profil d'expression génique, réalisée dans les BL2 et les BL2/B95 après traitement par la nutline-3, a mis en évidence la surexpression de plusieurs gènes dont les produits sont impliqués dans l'autophagie. Nous avons montré que l'expression de la protéine Sestrine 1 est augmentée dans les deux lignées, conduisant ainsi à une inhibition de mTOR. Ce résultat a été retrouvé dans d'autres lignées EBV (+) en latence de type III (BL ou LCL). L'inhibition de mTOR se traduit par une induction de l'autophagie dans les cellules EBV (+) en latence III alors que ce processus n'est pas retrouvé dans les cellules EBV (-) (Figure 61). Nous nous sommes donc interrogés sur les mécanismes pouvant expliquer une telle différence entre ces lignées. Nos résultats indiquent que la LMP-1 induit l'activation de la sous-unité p65/Rel A du facteur NF-κB entrainant ainsi une augmentation de l'expression de Bécline-1 et une activation constitutive de l'autophagie dans les cellules EBV (+) en latence III. L'ensemble de ces résultats suggèrent que la présence d'un niveau élevé de Bécline-1 pourrait favoriser l'autophagie non seulement à l'état basal mais également en réponse au traitement par la nutline-3 dans les cellules EBV (+) en latence de type III (Figure 61).

Cette étude soulève des questions concernant le rôle de p53 dans la régulation de l'autophagie.

En effet, plusieurs travaux montrent que le suppresseur de tumeur peut avoir un double rôle dans la régulation de ce processus, en fonction de sa localisation cellulaire. Il participerait à l'induction de l'autophagie lorsqu'il est localisé dans le noyau et inhiberait ce processus lorsqu'il se trouve dans le cytoplasme (Tasdemir et al., 2008a). Dans notre modèle, le traitement avec la nutline-3 se traduit par une accumulation de p53 dans le cytoplasme et le noyau des cellules. Néanmoins, il semblerait que dans les cellules EBV (+) en latence III, l'activité transcriptionnelle de p53 soit plus efficace que l'activité inhibitrice exercée par la fraction cytoplasmique de cette protéine puisque le traitement augmente le niveau d'autophagie de ces cellules. A l'inverse, ces résultats suggèrent que l'activité de la fraction cytoplasmique de p53 pourrait être plus importante dans les cellules EBV (-) et favoriserait ainsi une inhibition de l'autophagie. L'équipe de Guido Kroemer a récemment montré que la fraction cytoplasmique de p53 pourrait inhiber l'autophagie en interagissant avec la protéine RB1CC1 (RB1 inducible coiled-coil protein 1), l'orthologue d'Atg 17 chez la levure (Morselli et al., 2011). Il serait donc intéressant de vérifier l'interaction p53/RB1CC1 dans les lignées EBV (-) et EBV (+) en latence III.

Ce travail soulève également des interrogations à propos du rôle exercé par Bcl-2 dans les cellules EBV (+) en latence de type III. Nous avons vu que cette protéine était impliquée dans la régulation de l'apoptose et de l'autophagie. Elle peut en effet se fixer sur les membres pro-apoptotiques afin d'inhiber leur activité mais elle peut également interagir avec la protéine Bécline-1 et empêcher l'initiation de l'autophagie. Or, nos résultats montrent qu'il existe un niveau important d'autophagie dans les cellules EBV (+) en latence III qui expriment fortement Bcl-2 alors que ce n'est pas le cas dans les cellules EBV (-) qui expriment peu cette protéine. Pour expliquer ce phénomène, nous nous sommes intéressés au modèle proposé par Wei *et al* qui suggère que l'activité de Bcl-2 est régulée par son état de phosphorylation (Wei et al., 2008). Selon ces auteurs, la MAP Kinase JNK, lorsqu'elle est activée, phosphoryle Bcl-2 ce qui provoque la déstabilisation du complexe Bcl-2/Bécline-1. Par ailleurs, ils ont également montré que l'activation de JNK permet, d'une part, d'activer le facteur de transcription c-Jun qui peut se fixer sur le promoteur de Bécline-1 et induire sa transcription et, d'autre part, de phosphoryler p53 induisant ainsi l'expression de DRAM et l'inhibition de mTOR. Les données obtenues lors de l'analyse du transcriptome montrent que la protéine ASK1, qui peut activer la kinase JNK, est plus fortement exprimée à l'état de base dans les BL2/B95 que dans les BL2. On peut donc supposer qu'il existe une activation de JNK dans ces cellules qui pourrait favoriser la phosphorylation de Bcl-2 (Figure 62). Au regard de ces résultats, nous avons testé la phosphorylation de Bcl-2 sur la Ser 70, cible de JNK. Bcl-2 est phosphorylé au niveau de ce résidu dans les cellules EBV (+) en latence III.

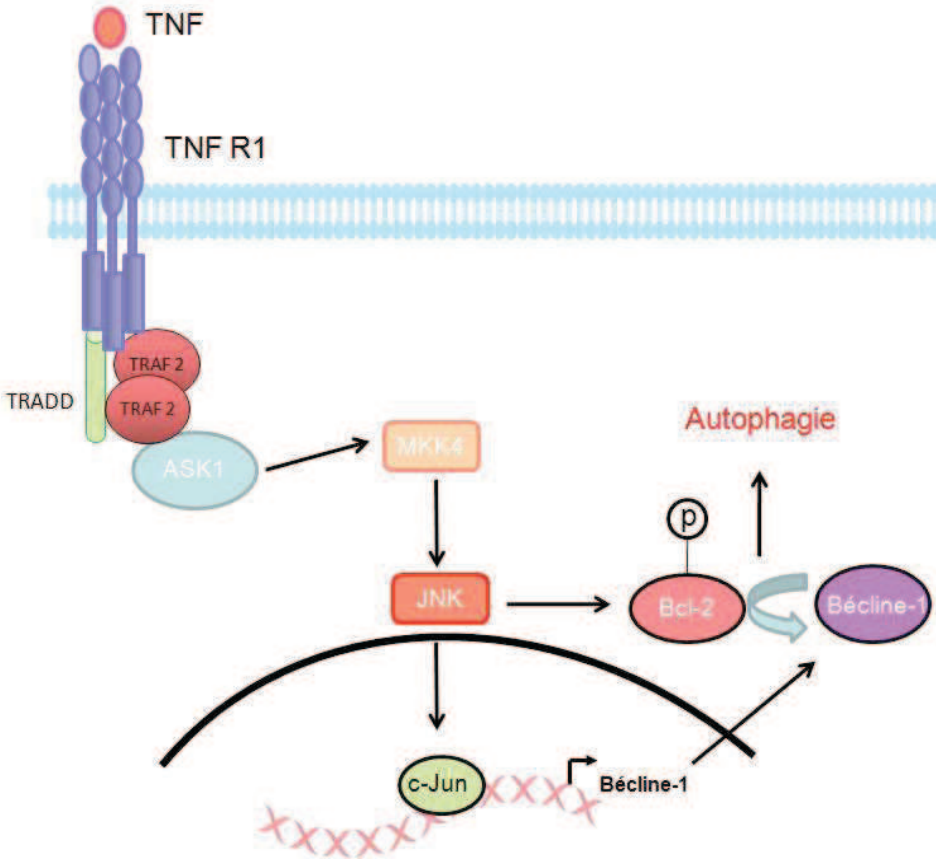


Figure 62 : Implication de JNK dans la régulation de l'autophagie. Nos résultats suggèrent que la MAP kinase JNK est activé par ASK1 à l'état basal dans les cellules EBV (+) en latence de type III. JNK induit la phosphorylation de Bcl-2 et de c-Jun qui peut alors se fixer sur le promoteur de Bécline-1 et induire sa trancription. Bcl-2 phosphorylée ne peut plus interagir avec Bécline-1 ce qui permet l'induction de l'autophagie.

Ces données suggèrent qu'il n'existe pas d'interaction entre Bécline-1 et Bcl-2 dans ces cellules et expliquent donc la présence d'autophagie malgré la surexpression de cette protéine. Toutefois, ces résultats nécessitent d'être validés par des expériences de co-immunoprécipitations. La suite du travail consistera à confirmer les données du transcriptome afin de vérifier le niveau d'expression de ASK1 et l'activation de JNK (par phosphorylation) dans ces cellules. Nous aimerions ainsi confirmer l'implication de cette kinase dans la phosphorylation de Bcl-2. De plus, il serait intéressant de vérifier si JNK, par l'intermédiaire de c-Jun, contribue également à l'augmentation du niveau d'expression de Bécline-1. Si cela était le cas, l'expression de Bécline-1 dans les cellules EBV(+) serait contrôlée à la fois par c-Jun et la voie NFκB.

L'analyse du transcriptome a également mis en évidence la surexpression de plusieurs gènes codant pour des membres de la famille des MAP kinase tels que p38 ou *MAP2K4* après traitement avec la nutline-3 dans les 2 lignées. Nous avons vu que ces kinases étaient fortement impliquées dans la régulation de l'apoptose et de l'autophagie. Nous pensons donc qu'il serait pertinent de valider ces résultats par Q-PCR et Western Blot et d'effectuer des tests fonctionnels afin de caractériser le rôle de ces protéines dans les cellules EBV (-) et EBV (+) traitées avec la nutline-3.

Notre étude montre que les cellules EBV (+) en latence de type III présentent un niveau élevé d'autophagie en absence de stress. La présence d'autophagie dans les cellules EBV (+) a déjà été observée par plusieurs équipes. Certaines ont proposé que ce mécanisme pourrait participer à l'immunité acquise, en permettant la présentation d'EBNA-1 par le CMH de classe II (Paludan et al., 2005). Par ailleurs, d'après Lee et Sugden, la protéine LMP-1 induirait l'autophagie pour réguler son expression (Lee and Sugden, 2008). Nous montrons ici que l'inhibition de l'autophagie par la chloroquine induit l'apoptose des cellules exprimant fortement la LMP-1. Ces données sont donc cohérentes avec celles de Lee et Sugden. On peut donc penser que la chloroquine favorise une accumulation de LMP-1, qui est toxique pour les cellules, et provoque leur mort par apoptose. Une étude a montré que la toxicité induite par l'accumulation de LMP-1 se traduit par l'induction de la voie extrinsèque de l'apoptose, due a une surexpression et une auto-activation du récepteur Fas (Le Clorennec et al., 2008). Il serait intéressant de valider cette hypothèse dans notre modèle expérimental en caractérisant la voie apoptotique induite par la chloroquine.

Nos résultats, ainsi que ceux obtenus par d'autres équipes, montrent que l'autophagie peut inhiber l'apoptose induite par l'activation de p53. Par ailleurs, plusieurs études ont montré qu'EBV induit une résistance à plusieurs agents chimio-thérapeutiques connus pour activer p53.

On peut donc se demander si l'autophagie induite par EBV et p53 peut contribuer à ce phénomène de résistance. Une étude publiée en 2011 par Xie *et al* est en faveur de cette hypothèse. Les auteurs ont montré que le traitement par l'étoposide induit une activation de p53 et d'AMPK dans des cellules d'hépatocarcinomes. Leurs résultats indiquent également que l'inhibition de l'autophagie par la 3-méthyladénine ou par des ARN antisens inhibant l'expression de Bécline-1, sensibilise ces cellules aux traitements par l'étoposide. Sur la base de ces résultats, il serait intéressant d'analyser la réponse des cellules EBV (+) en latence de type III à un traitement par l'étoposide en recherchant si ce traitement induit une augmentation de l'expression des gènes cibles de p53 impliqués dans l'autophagie ainsi qu'une conversion de LC3-I en LC3-II. Nous pourrions également déterminer si le pré-traitement de ces cellules avec de la chloroquine restaure leur sensibilité à l'étoposide.

Cette première partie du travail de thèse nous a permis de mieux caractériser les mécanismes de résistance à l'apoptose induite par p53 dans les lignées EBV (+) en latence de type III. Nous avons vu que la LMP-1 est en grande partie responsable de ce phénomène. En effet, cette protéine oncogénique est responsable, d'une part, de l'augmentation de l'autophagie dans ces cellules et induit, d'autre part, l'expression de protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Nos travaux indiquent également que l'utilisation d'ABT-737 permet de restaurer en partie la sensibilité des cellules EBV (+) en latence de type III (BL et LCL) à la nutline-3 et que de plus, il induit à lui seul une apoptose massive des LCL. Nous nous sommes donc intéressés au potentiel thérapeutique de cet inhibiteur de Bcl-2 dans le traitement des lymphomes associés à EBV.

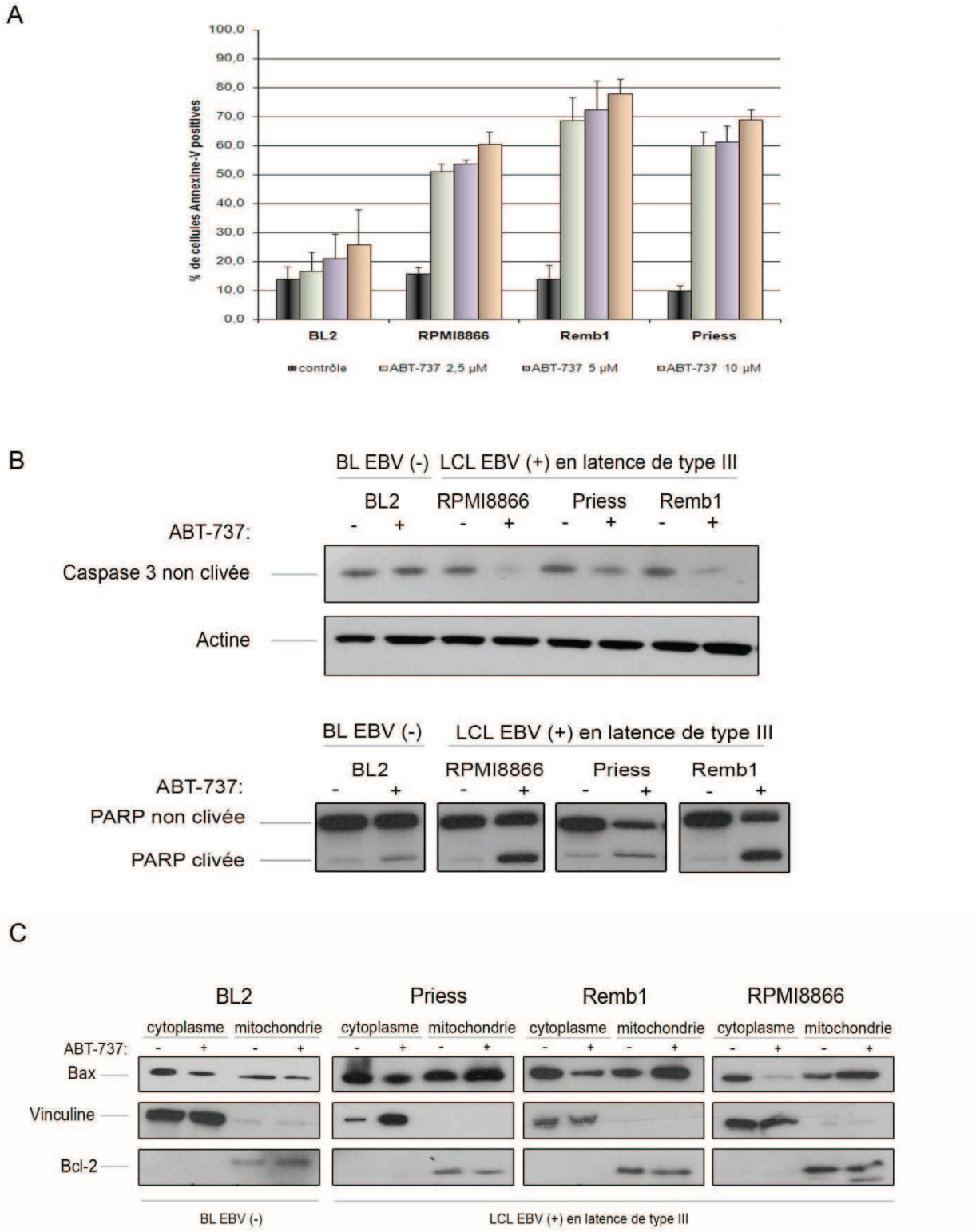


Figure 63 : Evaluation de l'efficacité d'ABT-737 in vitro dans les LCL. A. Les cellules ont été traitées avec différentes concentrations d'ABT-737 et analysée par cytométrie en flux après avoir été marquées à l'annexine-V et au PI. **B**. Les cellules ont été traitées au non avec 2.5 (LCL) ou 10 µM d'ABT-737 puis le clivage de la pro-caspase-3 et de la PARP a été évalué par Western Blot. **C** Les cellules ont été traitées ou non avec ABT-737 (2.5 et 10 µM pour les LCL et les BL2 respectivement) puis des fractionnements cytoplasmiques et mitochondriaux ont été réalisés afin d'analyser la localisation subcellulaire de Bax. La qualité des fractionnements a été contrôlée à l'aide d'un marqueur du cytoplasme (vinculine) et de la mitochondrie (Bcl-2).

Partie 2 : Stratégies thérapeutiques fondées sur l'utilisation d'inhibiteurs des protéines anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2 dans le traitement des lymphomes B

1. Résultats

a) Evaluation de l'efficacité d'ABT-737 *in vitro* dans les LCL

Au regard des résultats obtenus précédemment, nous avons testé l'efficacité d'ABT-737 *in vitro* afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de ce composé dans le traitement des lymphomes B associés à EBV. Nous avons comparé le comportement de la lignée BL2 EBV (-) qui exprime très peu Bcl-2 à celui de trois lignées de LCL (RPMI8866, Remb1 et Priess) qui expriment fortement cet oncogène. Ces cellules ont été traitées avec différentes concentrations d'ABT-737 pendant 24h. Le pourcentage de cellules apoptotiques a été évalué par cytométrie en flux (FACS) grâce à un double marquage annexine V/PI. Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 63 A. Nous observons que ce traitement induit faiblement l'apoptose dans la lignée EBV (-) (26 % de cellules marquées à la dose 10 μM). En revanche, conformément aux résultats obtenus précédemment, les LCL sont beaucoup plus sensibles au traitement [51, 58 et 60 % d'apoptose à la plus faible dose testée (2.5 μM)]. Ce pourcentage augmente légèrement lorsque ce composé est utilisé avec des concentrations plus élevées (61, 78 et 70 % de cellules mortes à la dose 10 μM dans les RPMI8866, Remb1 et Priess respectivement).

Nous avons ensuite testé l'activation de la caspase-3 en réponse au traitement. Pour ce faire, nous avons évalué par Western Blot, le clivage de cette caspase et de l'un de ses substrats, la PARP (Poly ADP-Ribose Polymérase). Les résultats présentés sur la figure 63 B sont cohérents avec ceux obtenus par FACS et montrent que le traitement avec ABT-737 (10 μM) n'augmente ni le clivage de la pro-caspase-3 ni celui de la PARP dans les BL2. A l'inverse, la forme non clivée de cette caspase est très fortement diminuée dans les 3 lignées de LCL. L'activation de cette caspase effectrice de l'apoptose se traduit également par un clivage de la PARP dans ces lignées.

Pour finir, nous avons vérifié si la déstabilisation des complexes Bax/Bcl-2 et Bax/Bcl-xL par ABT-737 pouvait induire une relocalisation de Bax du cytoplasme à la mitochondrie.

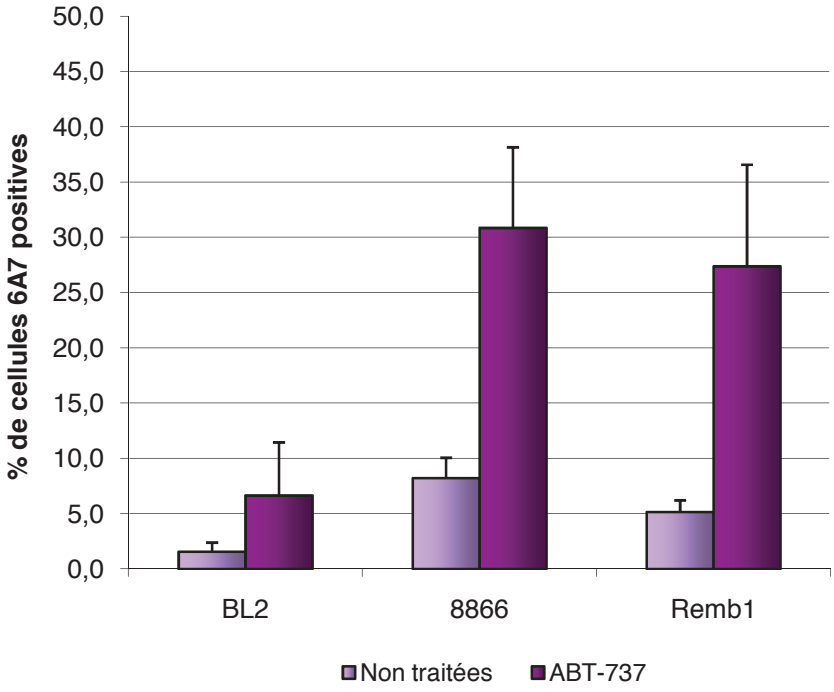


Figure 64 : Evaluation de l'activation de Bax en réponse au traitement par ABT-737. Les cellules ont été traitées on non avec ABT-737 pendant 24h (2.5 µM pour les LCL et 10 µM pour BL2 et BL2/B95) puis marquées avec un anticorps reconnaissant la partie N-terminale de Bax. Elles ont ensuite été analysées en cytométrie en flux.

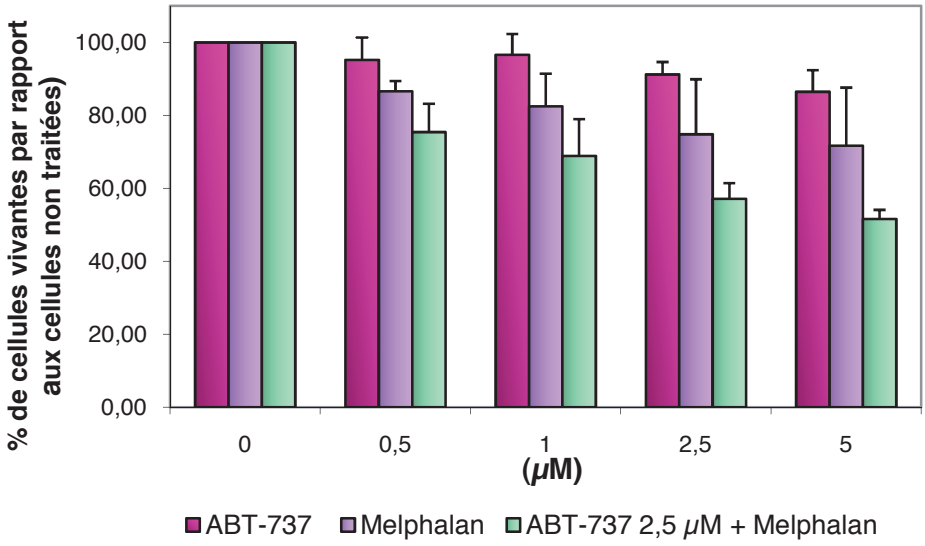


Figure 65 : Evaluation de l'association ABT-737/Melphalan dans les LY47. Les cellules ont été pré-traitées ou non avec 2.5 µM d'ABT-737 puis traitées ou non avec différentes doses de Melphalan. Un marquage au MTT a ensuite été réalisé. Après lyse des cellules, la DO a été lue à 550 nm afin d'évaluer la viabilité cellulaire. Les résultats sont exprimés en % par rapport aux cellules non traitées.

Pour cela, nous avons réalisé des fractionnements cytoplasmiques et mitochondriaux à partir de cellules traitées ou non avec ce composé afin d'évaluer la localisation subcellulaire de Bax par Western Blot. La pureté des extraits a été contrôlée par un marquage anti-vinculine pour la fraction cytoplasmique et anti-Bcl-2 pour la fraction mitochondriale. Les résultats présentés sur la figure 63 C montrent que la fraction cytoplasmique de Bax semble légèrement diminuée après traitement dans les BL2. Toutefois, cette diminution n'est pas accompagnée d'une augmentation de la forme mitochondriale de la protéine ce qui indique que Bax n'est pas activée dans ces cellules. A l'inverse, le traitement induit une relocalisation de cette protéine dans les 3 lignées de LCL. L'activation de Bax est associée à un changement de conformation conduisant notamment à l'exposition de son extrémité N-terminale. Nous avons donc analysé l'activation de Bax en cytométrie en flux grâce à un anticorps conformationnel (6A7) reconnaissant spécifiquement la région N-terminale de la protéine. Une activation de Bax peut être observée dans respectivement 31 et 27% des RPMI8866 et Remb1 traitées pendant 24h avec 2.5 µM d'ABT-737. En revanche, aucun changement conformationnel n'est détecté dans les BL2 traitées avec 10 µM de ce composé (Figure 64).

Nous pouvons donc conclure que l'utilisation d'ABT-737 induit la relocalisation et l'activation de Bax dans les LCL. Ce phénomène se traduit par une apoptose massive, dépendante de la voie des caspases, dans ces cellules. A l'inverse, ce composé n'a pas d'effet dans la lignée de LB EBV (-).

b) Evaluation de l'efficacité d'ABT-737 en combinaison avec de la chimiothérapie *in vitro* dans une lignée de LB EBV (+) en latence de type III

Nous avons ensuite recherché si ABT-737 pouvait potentialiser l'effet de chimiothérapies permettant d'activer p53 dans des cellules de LB. La drogue majoritairement utilisée pour traiter le LB est la Cyclophosphamide. Toutefois, celle-ci nécessite d'être métabolisée par le foie pour exercer son activité anti-tumorale. Nous avons donc utilisé le Melphalan, un autre composé appartenant également à la famille des agents alkylants, pour effectuer ces expériences *in vitro*. Les LY47 ont été pré-traitées pendant 1h avec 2.5 µM d'ABT-737 puis traitées pendant 24h avec différentes doses de Melphalan (0.5, 5, 2.5, 5 µM). L'effet de ces deux composés sur la viabilité cellulaire a été évalué par le test de cytotoxicité MTT. Les résultats présentés sur la figure 65, montrent que ces cellules sont peu sensibles au Melphalan et à l'ABT-737, lorsque ces composés sont utilisés seuls. Ces résultats sont cohérents avec ceux précédemment observés par notre équipe à l'aide d'autres techniques.

Toutefois l'utilisation de ces deux composés en association présente un effet additif et permet d'obtenir une diminution de la viabilité de 50% pour des concentrations de 2.5 µM d'ABT-737 et et 5 µM de Melphalan.

Les résultats obtenus avec ABT-737 seul dans les LCL ou en association dans la lignée de LB EBV (+) en latence III, nous ont conduits à poursuivre l'évaluation de ce composé *in vivo. Les* résultats de ces études pré-cliniques seront présentés dans la dernière partie de ce chapitre.

c) Développement de nouvelles molécules ciblant la famille Bcl-2 et évaluation de leur activité dans les lymphomes B

Nous avons vu, dans la première partie de ce chapitre, que les cellules B infectées par EBV expriment fortement la protéine anti-apoptotiques Bcl-2. L'utilisation d'ABT-737 restaure la sensibilité de ces cellules à l'apoptose induite par la réactivation de p53 mais n'a pas d'effet lorsqu'il est utilisé seul dans les lignées de LB. Plusieurs études ont montré que l'efficacité d'ABT-737 pouvait être limitée par la protéine Mcl-1. Nous avons donc caractérisé l'expression des différents membres de la famille Bcl-2 par immunohistochimie (grâce à la présence dans notre équipe du Professeur Martine Raphaël, qui dirige par ailleurs le Service d'Hématologie et Immunologie Biologiques du CHU du Kremlin-Bicêtre) dans un panel de lignées EBV (+) et EBV (-).

	Statut EBV	LMP-1	Bcl-2	Bim	Bcl-xL	Mcl-1	Bak	
BL2	-	-	+/-	-	- faible	++	++	
BL2B95	+	+	++	-	-	++	+++	
BL40	-	-	+/-	+	- (très faiblement +)	++	++	BL
BL40B95	+	+	++	++ s	-	++	++	
LY47	+	+	++	++	+ faible	++	++	
RPMI8866	+	++	++	-	+/-	++	++	
Iarc 211	+	++	++	++	+	++	++	
Rembl	+	+	++	-	+/-	++	+++	
1602	+	++	++	+/-	+/-	++	++	LCL
Pri97	+	++	++	+	+	++	++	
P 15	+	+	++	+	-	++	++	
P 17	+	+	++	+	-	++	++	

Tableau 4 : Résultats de l'analyse du niveau d'expression des protéines de la famille de Bcl-2 dans un panel de lignées de BL et LCL. (Collaboration avec l'équipe du Pr Martine Raphaël)

Les résultats sont en accord avec ceux précédemment observés en Western blot et montrent d'une part que Bcl-2 est fortement exprimée dans les cellules EBV (+) en latence de type III, d'autre part que les protéines Bak et Mcl-1 sont très fortement exprimées dans l'ensemble des lignées (Tableau 4).

L'équipe de chimistes de Françoise Guéritte, de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN) a récemment criblé des extraits de plantes venant de zones sub-tropicales afin de sélectionner celles déplaçant l'interaction Bcl-xL/Bak. Le criblage a été réalisé par un test d'affinité visant à mesurer en polarisation de fluorescence, après compétition avec un ligand, la liaison entre Bcl-xL et le domaine BH3 du peptide Bak marqué à la fluorescéine. Plusieurs extraits de différentes espèces, présentant une forte affinité pour Bcl-xL, ont été sélectionnés. Une étude en RMN (Résonnance Magnétique Nucléaire) a confirmé la liaison de ces composés naturels au domaine BH3 de Bcl-xL. Les chimistes de cette équipe ont alors entrepris de mettre au point, à partir de ces ligands naturels, des molécules plus actives ciblant Bcl-xL et Mcl-1 (Tableau 5) (Fotsop et al., 2010; Litaudon et al., 2009a; Litaudon et al., 2009b).

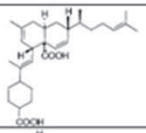
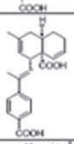
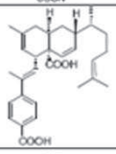
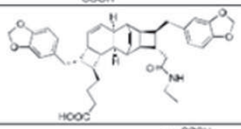
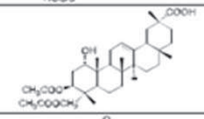
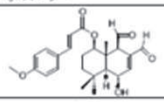
Ref. produit	Formule chimique Masse molaire	Origine	Structure
HB1-27-7 Meiogynine A	$C_{30}H_{44}O_4$ PM: 468.3	*Meiogyne cylindrocarpa*	
JD-493	$C_{22}H_{24}O_4$ PM : 352.42	Produit de synthèse	
JD-468	$C_{30}H_{38}O_4$ PM: 468.3	Produit de synthèse	
AL1-139-2 Kingianin L	$C_{40}H_{45}NO_7$ PM: 651.8	*Endriendia kingiana*	
SE3-110-3	$C_{34}H_{52}O_7$ PM : 572.3	*Combretum*	
SE2-190-6 drimane	$C_{25}H_{30}O_6$ PM : 426.2	*Zygogynum*	

Tableau 5 : Molécules naturelles ou de synthèse ciblant le domaine BH3 de Bcl-xL et de Mcl-1 (pour la Meiogynine A, le JD-493 et le drimane), fournies par l'équipe de Françoise Guéritte de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles

L'efficacité de ces molécules naturelles et synthétiques a été testée pour la première fois dans notre laboratoire sur plusieurs lignées de LB EBV (-) (BL2) et EBV (+) (BL2/B95 et LY47) et de LCL (Remb1 et 1602). Un crible a d'abord été réalisé par le test MTT pour sélectionner les molécules présentant une activité cytotoxique. Les cellules ont été traitées pendant 24h avec plusieurs concentrations (0, 1, 5, 10, 25 μM) des six composés à évaluer.

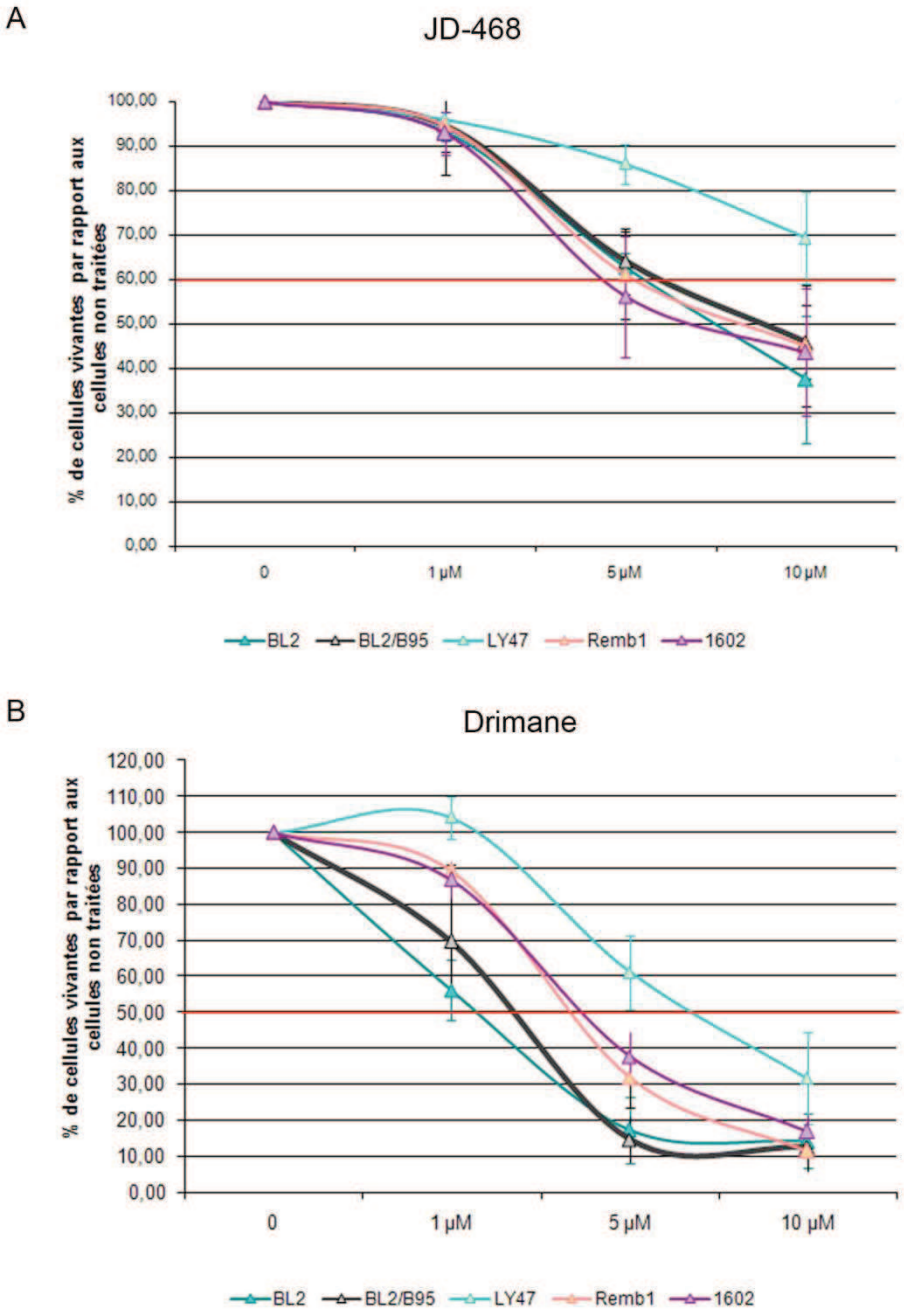


Figure 66 : Evaluation de l'efficacité du JD-468 et du Drimane sur plusieurs lignées de BL et LCL. Les cellules ont été traitées avec différentes concentration de JD-468 **(A)** ou de Drimane **(B)** pendant 24h puis un marquage au MTT a été réalisé. Après lyse des cellules, la DO a été lue à 550 nm afin d'évaluer la viabilité cellulaire. Les résultats sont exprimés en % par rapport aux cellules non traitées.

Les résultats obtenus indiquent que deux molécules, le JD-468 et le Drimane, sont capables de diminuer la viabilité cellulaire dans l'ensemble des lignées testées. Afin de confirmer ces résultats, le test a été reproduit 3 fois avec ces 2 composés. Les résultats obtenus à l'issue de ces quatre expériences sont présentés sur la figure 66. Ils montrent que la sensibilité des cellules pour ces deux composés ne dépend pas de leur statut EBV. Le JD-468 induit une forte diminution de la viabilité cellulaire des BL2, BL2/B95, Remb1 et 1602 avec un IC50 compris entre 6.5 et 7.5 µM. En revanche, les LY47 sont moins sensibles à ce traitement. Le Drimane est encore plus efficace que le JD-468 et diminue considérablement la viabilité cellulaire lorsqu'il est utilisé à faibles concentrations. Ainsi, l'IC50 de ce composé est de 1.25 µM pour les BL2 et BL2/B95, 3 µM pour les 2 lignées de LCL (1602 et Remb1) et 4 µM pour les LY47.

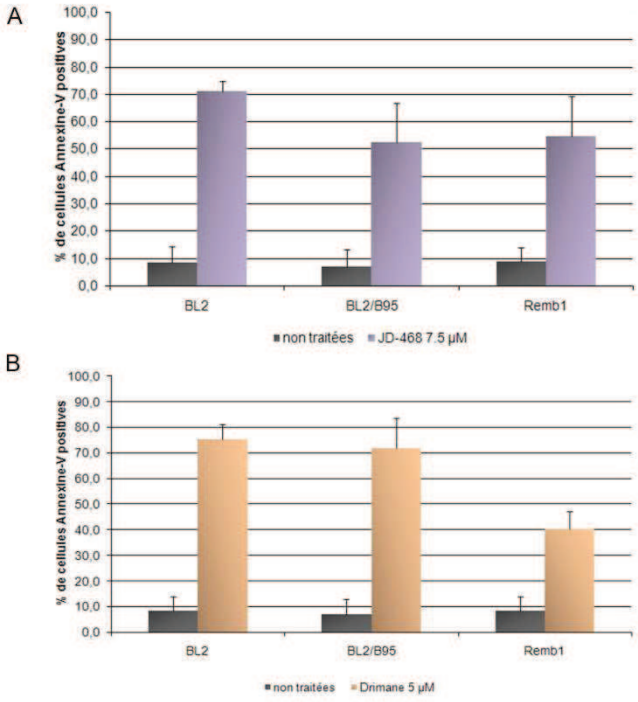


Figure 67 : Analyse de l'apoptose induite par le JD-468 et le Drimane par cytométrie en flux. Les cellules ont été traitées ou non avec le JD-468 à 7.5 µM (A) ou le Drimane à 5 µM **(B)** pendant 24h puis analysées par cytométrie en flux après avoir été marquées à l'annexine-V et au PI.

Nous avons ensuite vérifié si la diminution de la viabilité cellulaire observée lors du test MTT était bien due à une induction de l'apoptose par ces composés. Pour ce faire, les cellules BL2, BL2/B95 et Remb1 ont été traitées ou non avec le JD-468 (7.5 µM) ou le Drimane (5 µM) pendant 24h. Le pourcentage de cellules apoptotiques a été évalué par FACS par double marquage annexine V/PI. Les résultats montrent que le JD-468, utilisé à une concentration de 7.5 µM, induit 70 % d'apoptose dans les BL2 et 50% dans les BL2/B95 et les Remb1 (Figure 67 A).

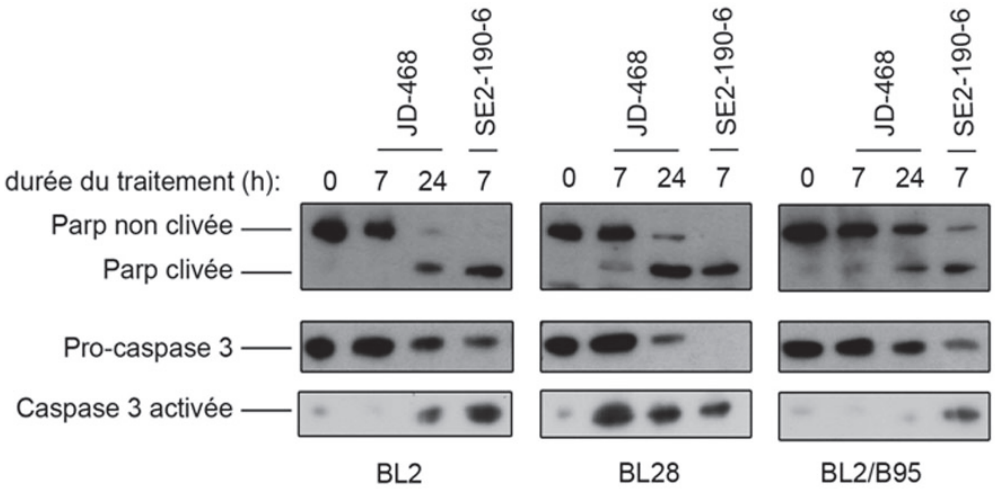


Figure 68 : Analyse du clivage de la caspase-3 et de la PARP dans des cellules traitées avec le JD-468 ou le Drimane. Les cellules ont été traitées ou non avec le JD-468 à 7.5 μM (A) ou le Drimane à 5 μM pendant 7 ou 24h puis le clivage de la caspase-3 et de la PARP a été analysé par Western Blot.

Le Drimane, a un effet comparable pour une concentration plus faible de 5 μM (70% d'apoptose dans les BL2 et les BL2/B95 et 40 % dans les Remb1, Figure 67 B). Ces deux composés induisent donc la mort cellulaire par apoptose aussi bien dans les cellules de LB et les LCL pour des concentrations inférieures à 10 μM. De plus, ces résultats montrent à nouveau que le Drimane présente une activité anti-prolifération plus importante que le JD-468.

Pour finir, nous avons testé l'implication de la caspase-3 dans l'apoptose induite par ces 2 composés. Pour cela, nous avons évalué par Western Blot, le clivage de cette caspase et de la PARP dans 2 lignées de LB EBV (-) (BL2 et BL28) et une lignée EBV (+) (BL2/B95) traitées ou non pendant 7 ou 24h avec le Drimane ou le JD-468. Les résultats présentés sur la figure 68 montrent que le traitement avec 7.5 μM de JD-468 entraîne un clivage massif de la caspase 3 et de la PARP à 24h dans les BL2 et les BL28. Dans les BL2/B95, l'activation de la caspase-3 semble moins efficace, ce qui se traduit par un clivage partiel de la PARP. L'effet du Drimane est, quant à lui, drastique puisqu'il induit un clivage total de la PARP dès 7h dans les trois lignées testées.

Cette étude préliminaire nous a donc permis de sélectionner un ligand naturel de Bcl-xL et de Mcl-1, le Drimane, ainsi qu'une molécule de synthèse dérivée de la Meiogynine A, le JD-468, capable d'induire l'apoptose dans plusieurs lignées de LB et de LCL. Ces résultats sont très encourageants mais d'autres expériences sont nécessaires afin de caractériser de façon plus précise le mode d'action de ces composés. Les perspectives de ce travail seront discutées à la fin de ce chapitre.

d) Evaluation de l'efficacité d'ABT-737 *in vivo* dans le traitement des lymphomes B associés à EBV

Afin de déterminer si l'utilisation d'ABT-737 pourrait constituer une alternative thérapeutique dans le traitement de lymphomes B associés à EBV, nous avons mis en place plusieurs études pré-cliniques pour tester l'activité anti-tumorale de ce composé seul ou en association avec les traitements conventionnels. Nous avons choisi d'évaluer l'efficacité d'ABT-737 *in vivo* sur une lignée de LCL, utilisée comme modèle pour les PTLD, et une lignée de LB en latence de type III.

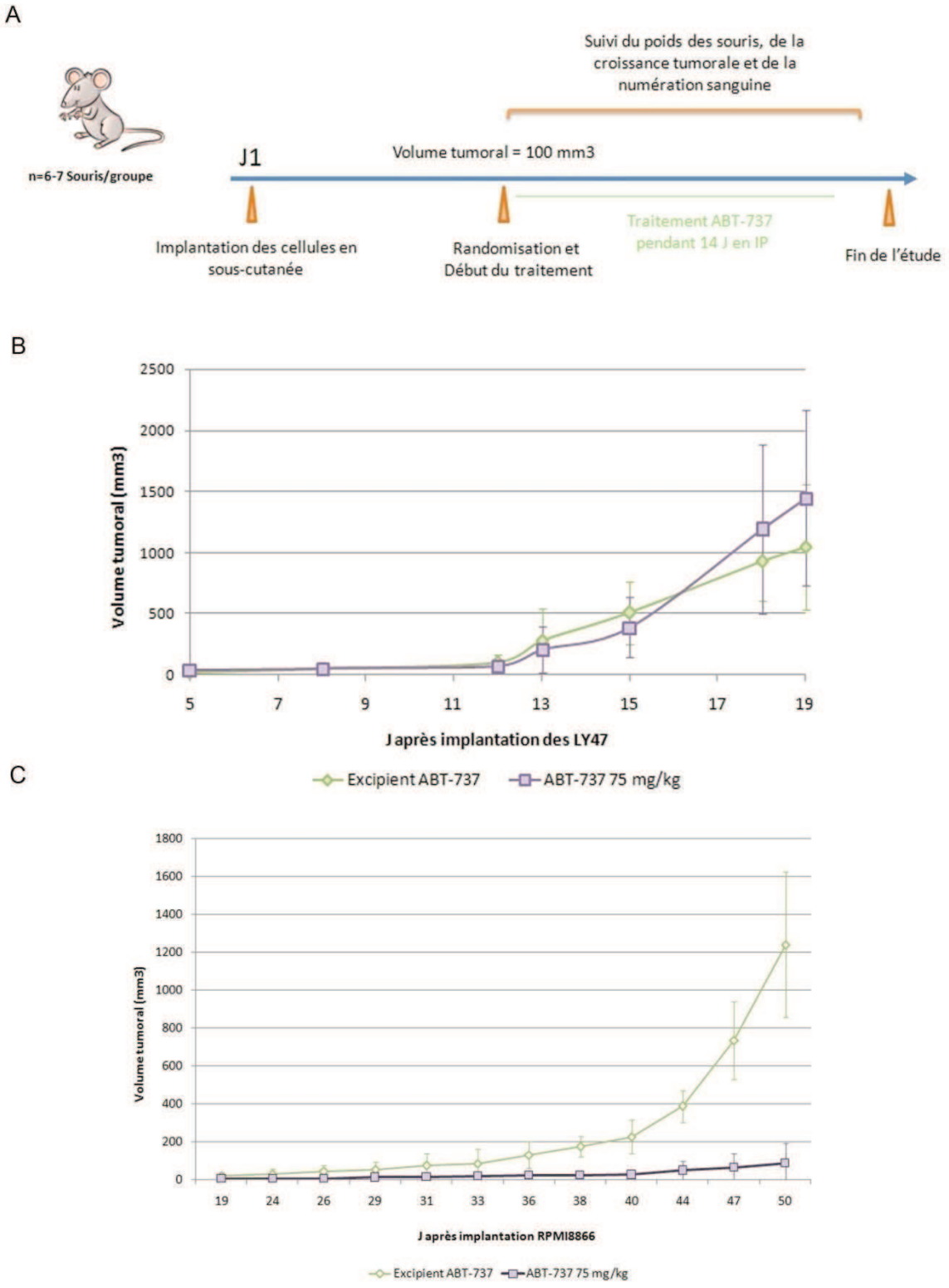


Figure 69 : Evaluation de l'activité anti-tumorale d'ABT-737 chez la souris NOD/SCID xénogreffée avec une lignée de LCL ou de LB. A. schéma récapitulatif de l'expérience : les souris NOD/SCID ont été implantées en sous-cutanée avec des RPMI8866 (LCL) ou des LY47 (BL). Une randomisation a été effectuée puis les souris ont été traitées avec l'excipient d'ABT-737 ou ABT-737 à 75 mg/kg. Le traitement a été effectué quotidiennement en IP pendant 14 J. Le volume tumoral et le poids des souris a été contrôlé tous les 2 jours. **B.** Courbe de croissance tumorale chez les souris NOD/SCID xénogreffées avec les LY47 **C**. Courbe de croissance tumorale chez les souris NOD/SCID xénogreffées avec les RPMI8866.

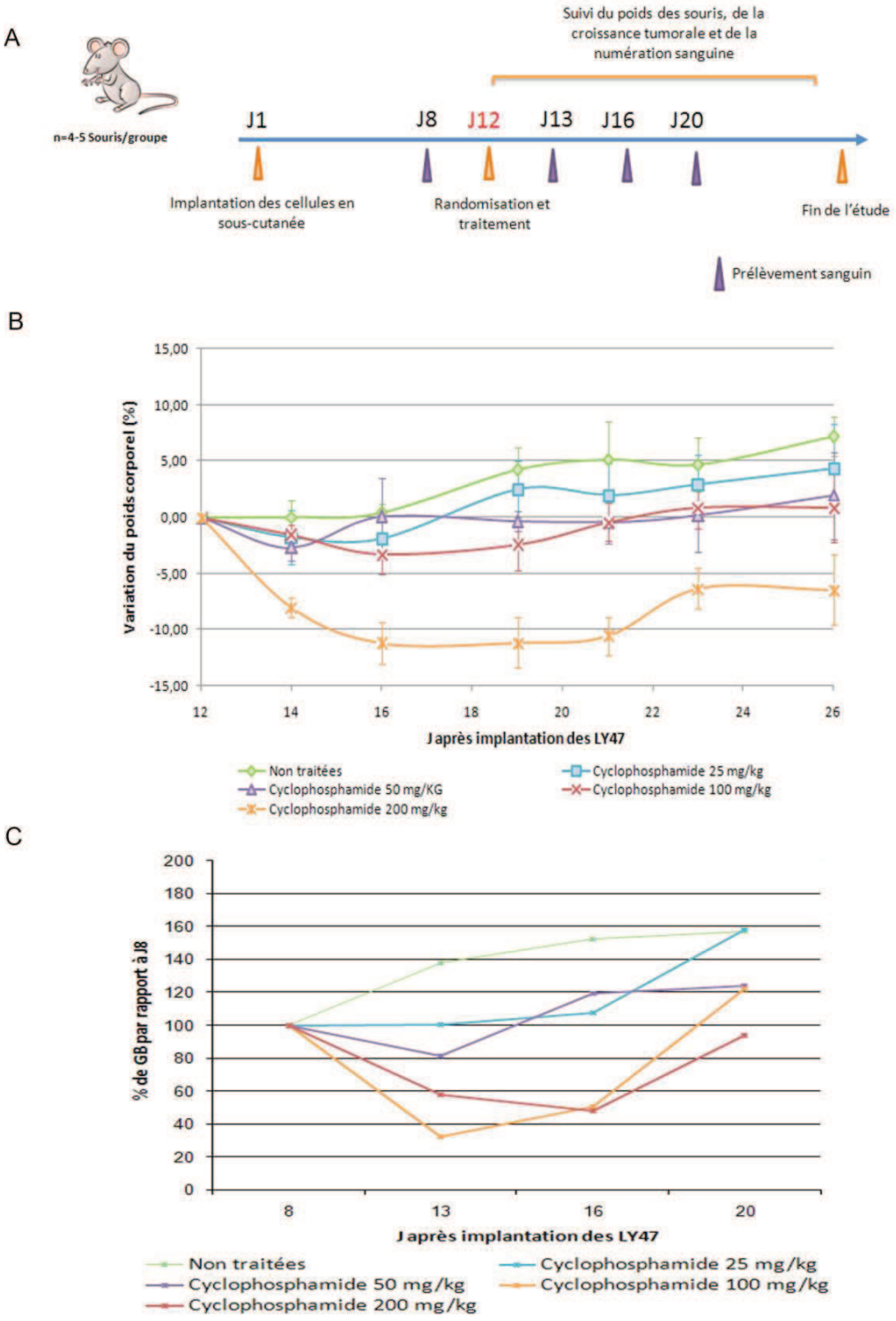
* Evaluation de l'activité anti-tumorale d'ABT-737 chez des souris NOD/SCID xénogreffées avec des RPMI8866 et des LY47

Dans un premier temps, nous avons testé les propriétés anti-tumorales de ce composé chez des souris NOD/SCID xénogreffées avec des cellules RPMI8866 (LCL) ou des LY47 (BL latence de type III). Pour cela, nous avons préalablement définis le nombre de cellules à implanter en sous-cutanée pour obtenir une prise de greffe optimale et homogène dans ces 2 lignées (2 et 1.5 x 10^6 cellules/souris pour les RPMI8866 et les LY47 respectivement). Lors de cette étude, une randomisation a été réalisée lorsque les souris présentaient des tumeurs d'environ 100 mm^3 afin d'obtenir des groupes de traitements avec un volume médian homogène. Les souris ont été traitées quotidiennement en intra-péritonéal (IP) avec ABT-737 (75 mg/kg) pendant 14 jours, selon les recommandations des laboratoires Abbott (Figure 69 A). Le volume des tumeurs ainsi que le poids des souris ont été contrôlés tous les deux jours. La formulation sanguine a été analysée toutes les semaines afin de vérifier la toxicité hématologique du composé (Figure 69 A). Les souris ont été euthanasiées et autopsiées lorsque le volume tumoral atteignait 2000 mm^3. Les résultats obtenus lors de cette étude sont les suivants (Figure 69):

- Dans le groupe contrôle, la médiane de survie est de 19.5J chez les souris xénogreffées avec les LY47 et de 54J chez les souris xénogreffées avec des RPMI8866. Les souris non traitées ne présentent pas d'effets secondaires, leur poids diminue légèrement au début du traitement.

- Dans le groupe traité avec ABT-737 (75 mg/kg), le traitement n'a pas d'effet sur la croissance tumorale et la survie des souris xénogreffées avec les LY47 (médiane = 22 J). En revanche, ABT-737 est très efficace chez les souris xénogreffées avec les RPMI8866. Il diminue considérablement la croissance tumorale, ce qui se traduit par une augmentation de la médiane de survie chez ces souris (médiane = 76J). Les souris traitées avec ABT-737 ne présentent pas d'effets secondaires visibles. Nous avons toutefois observé une légère perte de poids au début du traitement ainsi qu'une thrombopénie réversible dès l'arrêt du traitement.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus *in vitro* et montrent que le traitement avec ABT-737 pourrait constituer une stratégie thérapeutique alternative dans la prise en charge des PTLD.



<u>Figure 70</u> : Détermination de la dose de Cyclophosphamide à utiliser en combinaison avec ABT-737 chez la souris NOD/SCID xénogreffée avec des LY47. A. Schéma récapitulatif de l'expérience : les souris NOD/SCID ont été implantées en sous-cutanée avec des LY47. Une randomisation a été effectuée à J12 puis les souris ont été traitées avec différentes doses de cyclophosphamide en une seule injection. Des prélèvements sanguins ont été réalisés toutes les semaines afin de vérifier la NFS. Le volume tumoral et le poids des souris a été contrôlé tous les 2 jours. **B.** Courbes de poids obtenus lors de cette expériences pour les différents groupes. Les résultats sont exprimés en % par rapport à J12 **C.** Analyse du nombre de globules blancs à J8 (référence), J13, J16 et J20. Les résultats sont exprimés en % par rapport à J8.

En revanche, ce composé ne présente pas d'activité anti-tumorale lorsqu'il est utilisé seul dans le modèle de souris xénogreffées avec des cellules de LB EBV (+) en latence de type III. Nous avons donc poursuivi cette étude afin de tester si ABT-737 pouvait potentialiser les effets du cyclophosphamide, un composé utilisé en monothérapie pour le traitement des LB Africain ou associé à d'autres drogues dans les pays développés. Ce composé fait partie des agents alkylants de la famille des moutardes à azote.

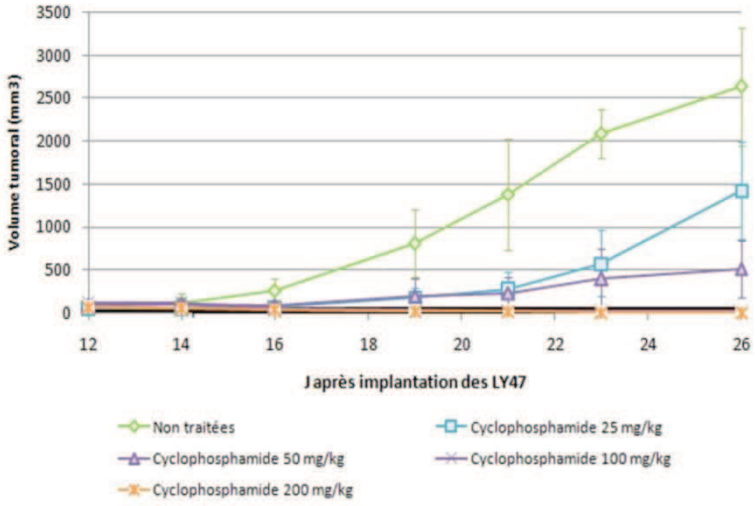
* Détermination de la dose de Cyclophosphamide à utiliser en association avec ABT-737 chez des souris NOD/SCID xénogreffées avec des LY47

La première étape du travail a consisté à déterminer la dose de Cyclophosphamide à utiliser lors des expériences de combinaison avec ABT-737. Notre objectif était de définir une dose présentant une activité anti-tumorale sans induction d'effets secondaires. Ainsi, les souris ont été implantées avec 1.5 x 10^6 cellules puis une randomisation a été effectuée à J12 afin de mettre en place 5 groupes de traitements correspondant aux 4 doses de Cyclophosphamide à tester (25, 50, 100 et 200 mg/kg) et au groupe contrôle (non traitées). Les souris ont reçu une seule administration de ce composé en IP à J12. Les différentes étapes de cette expérience sont schématisées sur la figure 70 A. Les résultats montrent que :

- Les souris non traitées ne présentent pas d'effets secondaires, leur poids augmente de J12 à J26 (Figure 70 B). Dans ce groupe, la médiane de survie est de 23J (Figure 71).
- Les souris traitées avec une dose de 25 mg/kg de Cyclophosphamide ne présentent pas d'effets secondaires, pas de perte de poids ni d'anomalies de la formule sanguine (Figure 70 B et C). Le traitement diminue la croissance tumorale et augmente légèrement la médiane de survie qui est de 28J (Figure 71).
- Les souris traitées avec une dose de 50 mg/kg de Cyclophosphamide ne présentent pas de perte de poids et l'analyse de la formule sanguine ne révèle aucune anomalie (Figure 70 B et C). Le traitement est plus efficace qu'à la dose 25 mg/kg avec une médiane de survie de 33J (Figure 71).
- Les souris traitées avec une dose de 100 mg/kg de Cyclophosphamide présentent plusieurs signes cliniques traduisant un mal être : elles sont prostrées, déshydratées et leur poil est hérissé.

Le traitement induit une toxicité qui se traduit également par une perte de poids (maximum à J16= -3.3 %) (Figure 70 B). et une baisse importante des globules blancs (GB) à J13 (-70%) (Figure 70 C). Le taux de GB augmente ensuite progressivement et redevient normal à J20 soit une semaine après l'injection de Cyclophosphamide. Cette dose permet d'obtenir une rémission complète chez toutes les souris jusqu'à J30 et augmente ainsi considérablement la médiane de survie (44 J) (Figure 71).

- Les souris traitées avec une dose de 200 mg/kg de Cyclophosphamide présentent les mêmes signes cliniques que celles traitées avec la dose 100 mg/kg. Une perte de poids est observée (maximum à J16= -11 %) ainsi qu'une diminution du taux de GB (maximum à J16=-50 %) (Figure 70 B et C). Cette dose permet également d'obtenir une rémission complète chez toutes les souris jusqu'à J35. La médiane de survie est de 50 J (Figure 71).



	Médiane de survie
Non traitées	23 J
Cyclophosphamide 25 mg/kg	28 J
Cyclophosphamide 50 mg/kg	33 J
Cyclophosphamide 100 mg/kg	44 J
Cyclophosphamide 200 mg/kg	50 J

Figure 71 : Courbe de croissance tumorale et médiane de survie des souris NOD/SCID xénogreffées avec des LY47 et traitées avec différentes doses de cyclophosphamide

Ce travail montre que le traitement avec le Cyclophosphamide induit une réponse anti-tumorale proportionnelle à la dose administrée. Une toxicité est observée pour les fortes doses (100 et 200 mg/kg) et se traduit principalement par une diminution du nombre de GB et une perte de poids. Ces effets secondaires ont également été décrits en clinique.

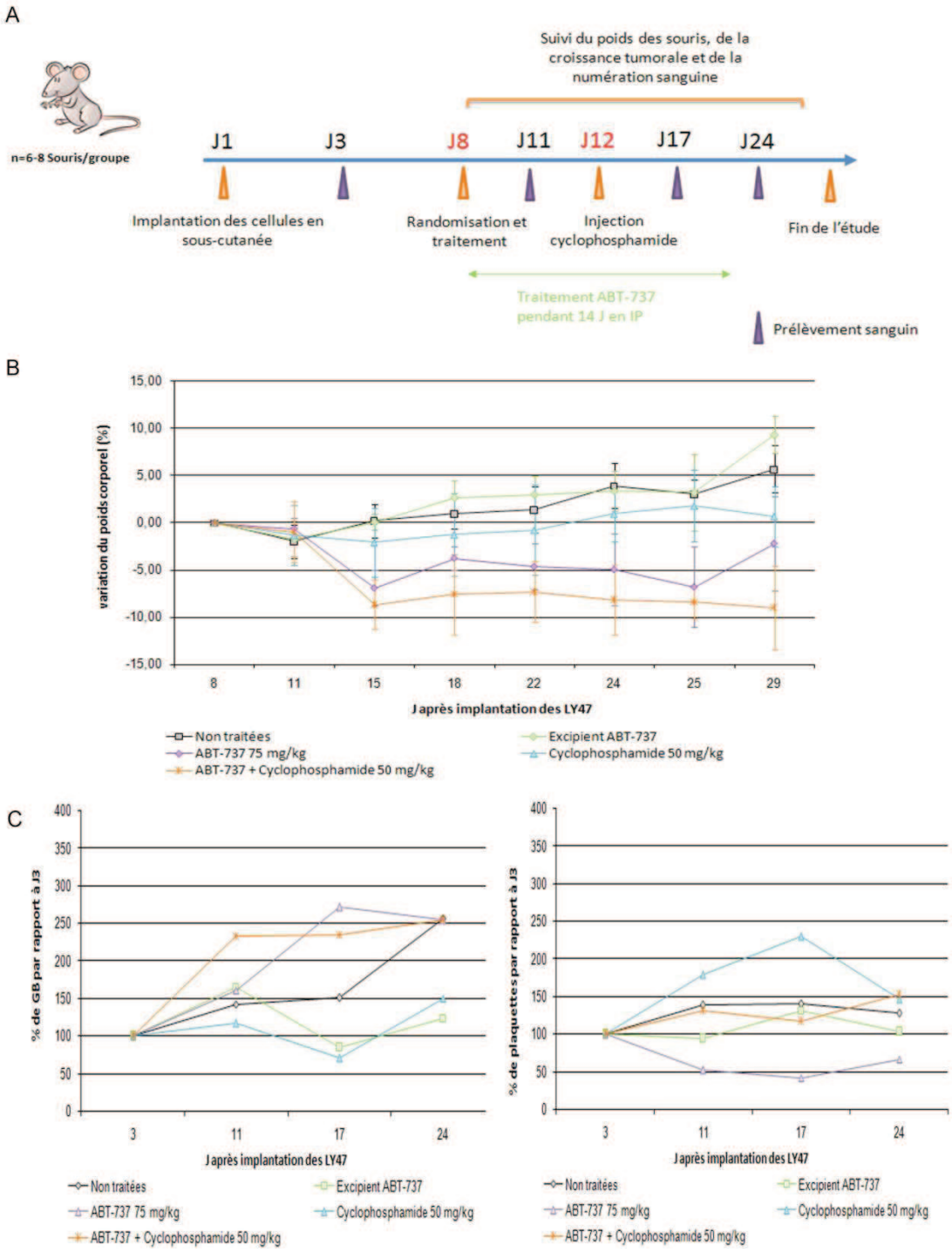


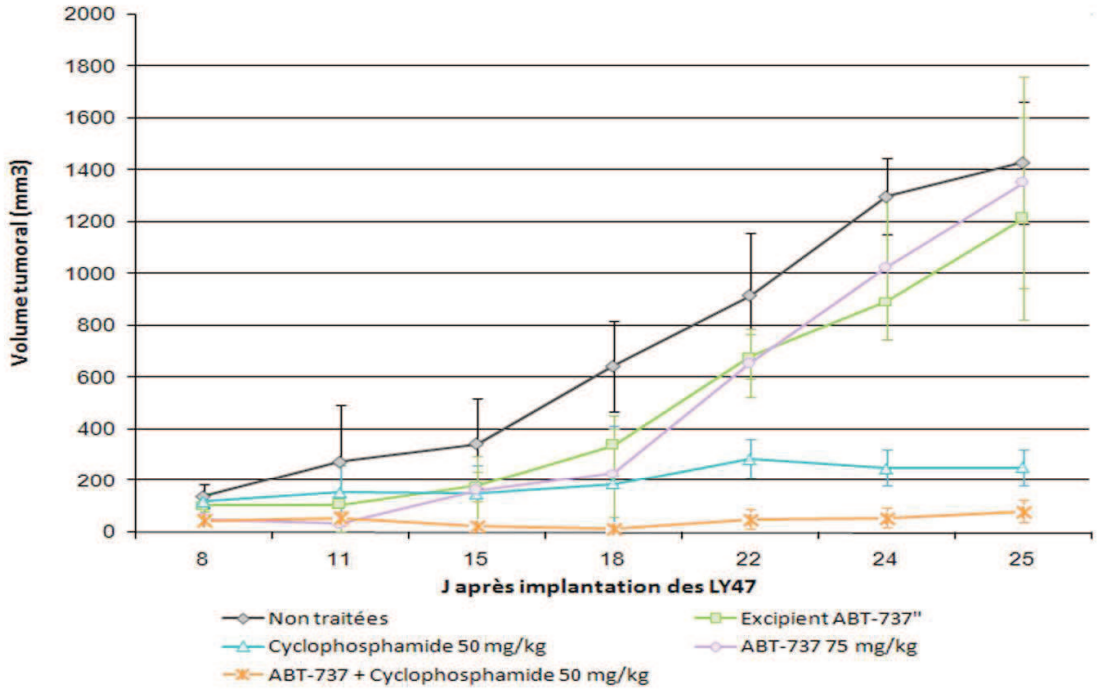
Figure 72 : Evaluation de l'efficacité de la combinaison Cyclophosphamide/ABT-737 chez des souris NOD/SCID xénogreffées avec des LY47. A. schéma récapitulatif de l'expérience : les souris NOD/SCID ont été implantées en sous-cutanée avec des LY47. Une randomisation a été effectuée à J8 puis les souris ont été traitées pendant 14 J avec ABT-737. Le traitement avec le Cyclophosphamide a été effectué à J12 en une seule injection. Des prélèvements sanguins ont été réalisés toutes les semaines afin de vérifier la NFS. Le volume tumoral et le poids des souris a été contrôlé tous les 2 jours. **B.** Courbes de poids obtenus lors de cette expérience pour les différents groupes. Les résultats sont exprimés en % par rapport à J8 **C**. Analyse du nombre de globules blancs et de plaquettes à J3 (référence), J11, J17 et J24. Les résultats sont exprimés en % par rapport à J3

Pour tester l'efficacité de la combinaison avec ABT-737 nous avons choisi la dose 50 mg/kg, qui conduit à une augmentation de la médiane de survie de 10 J par rapport aux souris non traitées sans induire de toxicité.

* Evaluation de l'efficacité de la combinaison Cyclophosphamide/ABT-737 chez des souris NOD/SCID xénogreffées avec des LY47

La troisième partie de ce travail a donc consisté à tester l'association ABT-737/Cyclophosphamide chez des souris NOD/SCID xénogreffées avec des LY47. Pour ce faire, les souris ont été implantées avec des LY47 en sous-cutanée à J1 puis une randomisation a été effectuée à J8. Cinq groupes de souris ont ainsi été définies : 1) non traitées ; 2) excipient ABT-737 ; 3) ABT-737 75 mg/kg ; 4) Cyclophosphamide 50 mg/kg ; 5) ABT-737 + Cyclophosphamide 50 mg/kg. Les souris ont été traitées avec ABT-737 en IP de J8 à J22 et ont reçu une injection en IP de Cyclophosphamide à J12. Les différentes étapes de cette expérience sont résumées sur la Figure 72 A. Les résultats sont les suivants :

- Les souris des groupes contrôles « non traitées » et « excipient ABT-737 » ont une médiane de survie de 29 et 33 J respectivement (Figure 73).
- Comme observé précédemment, le traitement avec ABT-737 seul n'est pas efficace et ne présente pas d'effet sur la croissance tumorale et la survie des souris (médiane = 29 J) (Figure 73). Le traitement induit une perte de poids maximale à J15 (-6.9%) ainsi qu'une forte diminution des plaquettes (-60% à J17) (Figure 72 B et C).
- Le traitement avec le Cyclophosphamide 50 mg/kg induit un retard de la croissance tumorale et une augmentation de la médiane de survie des souris (médiane = 41.5 J) (Figure 73). Le traitement n'induit pas de perte de poids mais une légère diminution des globules blancs (-30% à J17) (Figure 72 B et C).
- La combinaison des 2 composés est responsable d'une perte de poids des souris maximale à J15 (-8.7%) (Figure 72 B). Une diminution des plaquettes (-60% à J17), due à ABT-737, est également observée dans ce groupe (Figure 72 C). L'association ABT-737/Cyclophosphamide diminue fortement la croissance tumorale de J8 à J22 et semble alors plus efficace que le Cyclophosphamide seul. Toutefois, dès l'arrêt du traitement avec ABT-737 (J22), le volume tumoral augmente et rejoint celui du groupe traité avec le Cyclophosphamide uniquement, notamment après J25 (données non montrées) (Figure 73).



	Médiane de survie
Non traitées	29 J
Excipient ABT-737	33 J
ABT-737 75 mg/kg	29 J
Cyclophosphamide 50 mg/kg	41, 5 J
Cyclophosphamide 50 mg/kg + ABT-737	40 J

Figure 73 : Courbe de croissance tumorale et médiane de survie des souris NOD/SCID xénogreffées avec des LY47 et traitées avec ABT-737, le Cyclophosphamide ou l'association de ces 2 composés

Finalement la combinaison ABT-737/ Cyclophosphamide ne permet pas d'améliorer la médiane de survie des souris qui est même inférieure (40 J) à celle observée dans le groupe traité uniquement avec le Cyclophosphamide (Figure 73).

Les résultats obtenus lors de cette étude montrent que l'association ABT-737/Cyclophosphamide retarde la croissance tumorale chez les souris xénogreffées avec des cellules de LB. Toutefois, l'arrêt du traitement avec ABT-737 se traduit, dans ce modèle, par une augmentation du volume tumoral. Ainsi, la combinaison de ces 2 traitements n'apporte pas de bénéfice, en termes de survie, par rapport aux souris traitées avec le Cyclophosphamide uniquement. Néanmoins, il serait intéressant de recommencer cette expérience en utilisant un autre schéma d'administration afin de réaliser plusieurs cycles de traitements. Cette stratégie pourrait permettre d'optimiser ces résultats et d'améliorer la médiane de survie des animaux.

*Détermination de la dose de Rituximab à utiliser en association avec ABT-737 chez des souris nude xénogreffées avec des RPMI8866

Les résultats décrits précédemment montrent qu'ABT-737 présente une activité anti-tumorale chez les souris xénogreffées avec des RPMI8866. Il permet de diminuer la croissance tumorale et d'augmenter la médiane de survie de ces animaux. Toutefois, ce composé, lorsqu'il est utilisé seul ne permet pas d'obtenir une rémission complète. Ainsi, nous avons voulu tester son efficacité en association avec le Rituximab, un anticorps monoclonal chimérique de type IgG1 dirigé contre le CD20. Ce composé améliore la survie des patients atteints de PTLD (Hutchinson, 2010) et constitue actuellement l'un des traitements de référence pour cette pathologie.

Cette expérience a été réalisée sur des souris nude qui, contrairement aux souris NOD/SCID avec lesquelles nous avons travaillé lors des expériences préliminaires, ne présentent aucune anomalie du système immunitaire inné (présence de cellules NK, de macrophages, du complément et des cellules présentatrices de l'antigène). Cette caractéristique est très importante puisque l'effet anti-tumoral du Rituximab dépend de l'ADCC et de la cytotoxicité médiée par le complément.

Dans un premier temps, nous avons défini la dose de Rituximab qui présente une activité anti-tumorale sans induire d'effets secondaires.

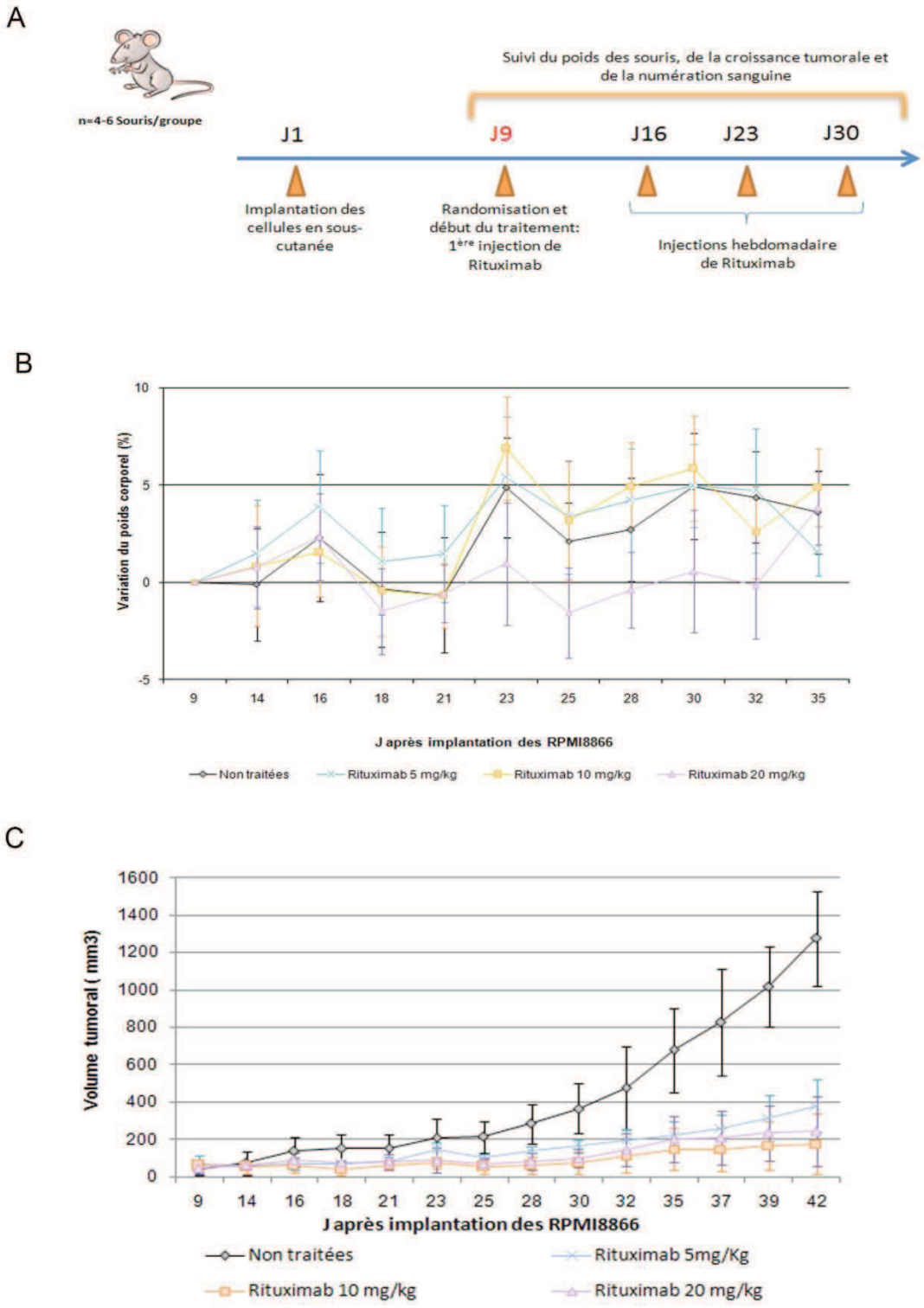


Figure 74 : Détermination de la dose de Rituximab à utiliser en combinaison avec ABT-737 chez la souris nude xénogreffée avec des RPMI8866. A. Schéma récapitulatif de l'expérience : les souris nude ont été implantées en sous-cutanée avec des RPMI8866. Une randomisation a été effectuée à J9 puis les souris ont été traitées de façon hebdomadaire avec différentes doses de Rituximab pendant 4 semaines. Des prélèvements sanguins ont été réalisés toutes les semaines afin de vérifier la NFS. Le volume tumoral et le poids des souris a été contrôlé tous les 2 jours. **B.** Courbes de poids obtenus lors de cette expérience pour les différents groupes. Les résultats sont exprimés en % par rapport à J9 **C**. Courbe de croissance tumorale des souris nudes xénogreffées avec des RPMI8866 et traitées avec différentes doses de Rituximab.

Les souris, implantées avec des RPMI8866, ont été randomisées afin de mettre en place 4 groupes correspondant aux différents traitements à administrer : non traitées ou traitées avec le Rituximab 5, 10 ou 20 mg/kg. Ces doses ont été choisies en fonction des données de la littérature (Dalle et al., 2009; Loomis et al., 2003). Les souris ont reçu une injection hebdomadaire de Rituximab (IP) pendant 4 semaines. Un schéma récapitulatif de cette expérience est présenté sur la figure 74 A. Les résultats obtenus lors de cette étude sont les suivants :

- Dans le groupe contrôle (souris non traitées) la médiane de survie est de 47,5 J (Figure 74 C)
- Dans les groupes traités avec les doses de 5 ou 10 mg/kg de Rituximab, les souris ne présentent pas d'effets secondaires. Leur poids augmente au cours de l'expérience (Figure 74 B) et leur numération sanguine reste inchangée. Le traitement induit une diminution de la croissance tumorale qui se traduit par une amélioration de la survie des souris avec une médiane de survie de 71 et 77 J pour les groupes traités avec 5 et 10 mg/kg de Rituximab respectivement (Figure 74 C).
- Dans le groupe traité avec une dose de 20 mg/kg de Rituximab, le traitement induit une très légère perte de poids (-1.5% à J25) (Figure 74 B). Par ailleurs, les souris ne présentent pas d'effets secondaires visibles ni d'anomalies lors de la formule sanguine. On peut toutefois remarquer que l'efficacité du traitement n'augmente pas avec cette dose (médiane de survie = 70 J) (Figure 74 C). L'efficacité maximale est donc atteinte pour 10 mg/kg.

Le Rituximab est donc très efficace, il permet de réduire considérablement la croissance tumorale sans induire de toxicité chez les animaux. La suite des expériences a été effectuée à la dose de 10mg/kg, qui est la plus efficace dans notre modèle expérimental puisqu'elle permet d'augmenter la médiane de survie des souris de 30 J.

* Evaluation de l'efficacité de la combinaison Rituximab/ABT-737 chez des souris nude xénogreffées en sous-cutanée avec des RPMI8866

Cette étude a été réalisée afin de pouvoir tester, d'une part, l'efficacité anti-tumorale de la combinaison ABT-737/Rituximab et, d'autre part, afin de comparer l'activité anti-tumorale exercée par ces deux agents lorsqu'ils sont utilisés en monothérapie.

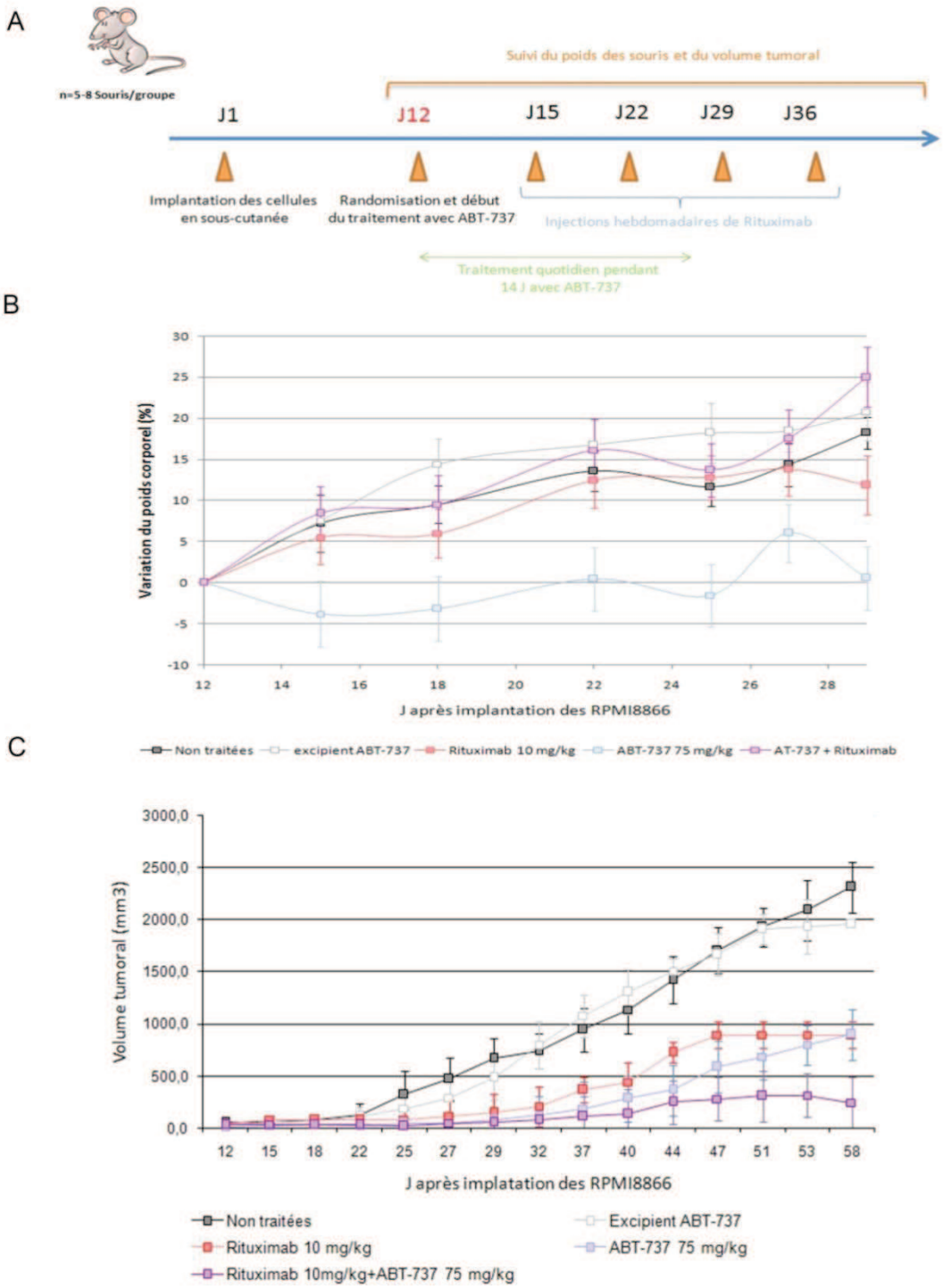


Figure 75 : Evaluation de l'efficacité d'ABT-737, du Rituximab ou de la combinaison des 2 traitements chez des souris nudes implantées en sous-cutanée avec des RPMI8866. A. Schéma récapitulatif de l'expérience. Les souris ont été injectées en sous-cutanée avec des RPMI8866 puis une randomisation a été effectuée à J12 et 5 groupes de traitements ont été mis en place : non traitées, excipient ABT-737, Rituximab 10 mg/kg (injection hebdomadaire pendant 4 semaines), ABT-737 75 mg/kg (injection quotidienne pendant 14 J) et ABT-737 + Rituximab. Les souris ont été pesées et le volume tumoral a été mesuré 3 fois par semaine. **B**. Courbe représentant la variation du poids corporel des souris, exprimés en % par rapport à J12. **C.** Courbes de croissance tumorale obtenues pour les différents groupes.

Les souris ont été xénogreffées en sous-cutanée puis randomisées à J12 afin de définir cinq groupes d'animaux présentant un poids et un volume tumoral homogène : 2 groupes contrôles (non traitées, excipient ABT-737), un groupe traité avec le Rituximab à 10 mg/kg, un groupe traité avec ABT-737 à 75 mg/kg et un groupe traité avec les deux composés en combinaison. Les souris ont été traitées avec ABT-737 en IP de J12 à J26 et ont reçu une injection hebdomadaire de Rituximab à J13, J20, J27, J34 (Figure 75 A). Les résultats obtenus lors de cette étude sont les suivants :

- Les souris des groupes contrôles « non traitées » ou « excipient ABT-737 » présentent une médiane de survie de 51 et 49.5 J respectivement.
- Les souris traitées avec le Rituximab 10 mg/kg ne présentent pas d'effets secondaires visibles, leur poids augmente au cours de l'étude (Figure 75 B). Le traitement diminue considérablement la croissance tumorale (Figure 75 C) ce qui se traduit par une augmentation de la médiane de survie dans ce groupe (110 J) par rapport aux groupes contrôles.
- Les souris traitées avec ABT-737 ne présentent pas d'effets secondaires visibles. Le traitement induit toutefois une légère perte de poids dans ce groupe maximale à J15 (-3,8%) (Figure 75 B). Ce composé induit également une forte diminution de la croissance tumorale (Figure 75 C), comparable à celle observée avec le Rituximab. La médiane de survie chez les souris traitées avec ABT-737 est de 102 J.
- Les souris traitées avec la combinaison des deux traitements ne présentent aucun effet secondaire. Le poids de ces animaux augmente progressivement de J12 à J29 (figure 75 B). L'association de ces deux composés présente un véritable bénéfice en termes de croissance tumorale (Figure 75 C) et de survie des animaux. En effet, une rémission complète a été observée dans ce groupe chez 4 souris sur 6. Les deux souris restantes ont présenté une rémission partielle et ont atteint le volume tumoral maximal toléré (2000 mm^3) à J85 et J89.

Les résultats de cette étude sont très encourageants. Ils montrent que, dans notre modèle et selon le schéma d'administration choisi, ABT-737 présente une activité anti-tumorale similaire à celle du Rituximab. Par ailleurs, l'association de ces composés est extrêmement efficace puisqu'elle permet d'obtenir une rémission complète chez 67% des animaux.

Ces résultats très prometteurs suggèrent que le traitement avec ABT-737, en monothérapie ou en association avec le Rituximab, pourrait constituer une alternative thérapeutique intéressante dans la prise en charge des PTLD. Nous avons donc décidé de confirmer ces données dans un autre modèle, chez des souris xénogreffées avec des RPMI8866 en IP.

* Evaluation de l'efficacité de la combinaison Rituximab/ABT-737 chez des souris SCID xénogreffées en IP avec des RPMI8866

L'injection de cellules tumorales en sous-cutanée chez des animaux immunodéprimés présente l'avantage de pouvoir suivre facilement la croissance tumorale. Toutefois, cette technique ne constitue pas un modèle physiologique de la maladie. En revanche, plusieurs études ont montré que l'injection de LCL en intra-péritonéal chez la souris SCID provoque l'apparition de tumeurs lymphoïdes dans l'abdomen des animaux, à l'origine du décès des souris entre 30 et 50 jours après l'injection. Ces tumeurs présentent les caractéristiques histopathologiques et moléculaires des PTLD rencontrés chez les patients immunodéprimés (Cannon et al., 1990; Rowe et al., 1991). Nous avons donc décidé de reproduire l'expérience précédente en utilisant ce modèle. Nous avons d'abord définis le nombre de cellules RPMI8866 à injecter en IP chez les souris SCID afin d'obtenir une prise homogène des tumeurs. L'injection de $10x10^6$ cellules/souris provoque l'apparition de masses au sein de l'abdomen de tous les animaux dans un délai d'environ 30 jours après l'injection. Cette expérience préliminaire a également permis de caractériser les signes cliniques de la maladie qui se traduit par l'apparition de tumeurs des intestins, de l'estomac ou de l'appareil génital des animaux. La présence d'occlusions intestinales et d'ascite dans l'abdomen des souris a également été observée lors des stades tardifs de la maladie.

Cette étude a été réalisée à partir de 50 souris SCID (10 souris par condition testée) injectées en IP avec des RPMI8866. Le schéma d'administration est le même que celui utilisé dans l'expérience précédente : les souris ont été traitées de J12 à J26 avec ABT-737 et ont reçu une injection hebdomadaire de Rituximab à J13, J20, J27, J34 (Figure 76 A). Afin de pouvoir suivre l'évolution précoce de la maladie, une échographie a été réalisée sur une souris de chaque groupe, une fois par semaine pendant les trois premières semaines de l'étude. Aucune anomalie n'est décelable chez les souris lors de la première échographie, effectuée 8 jours après l'injection des cellules.

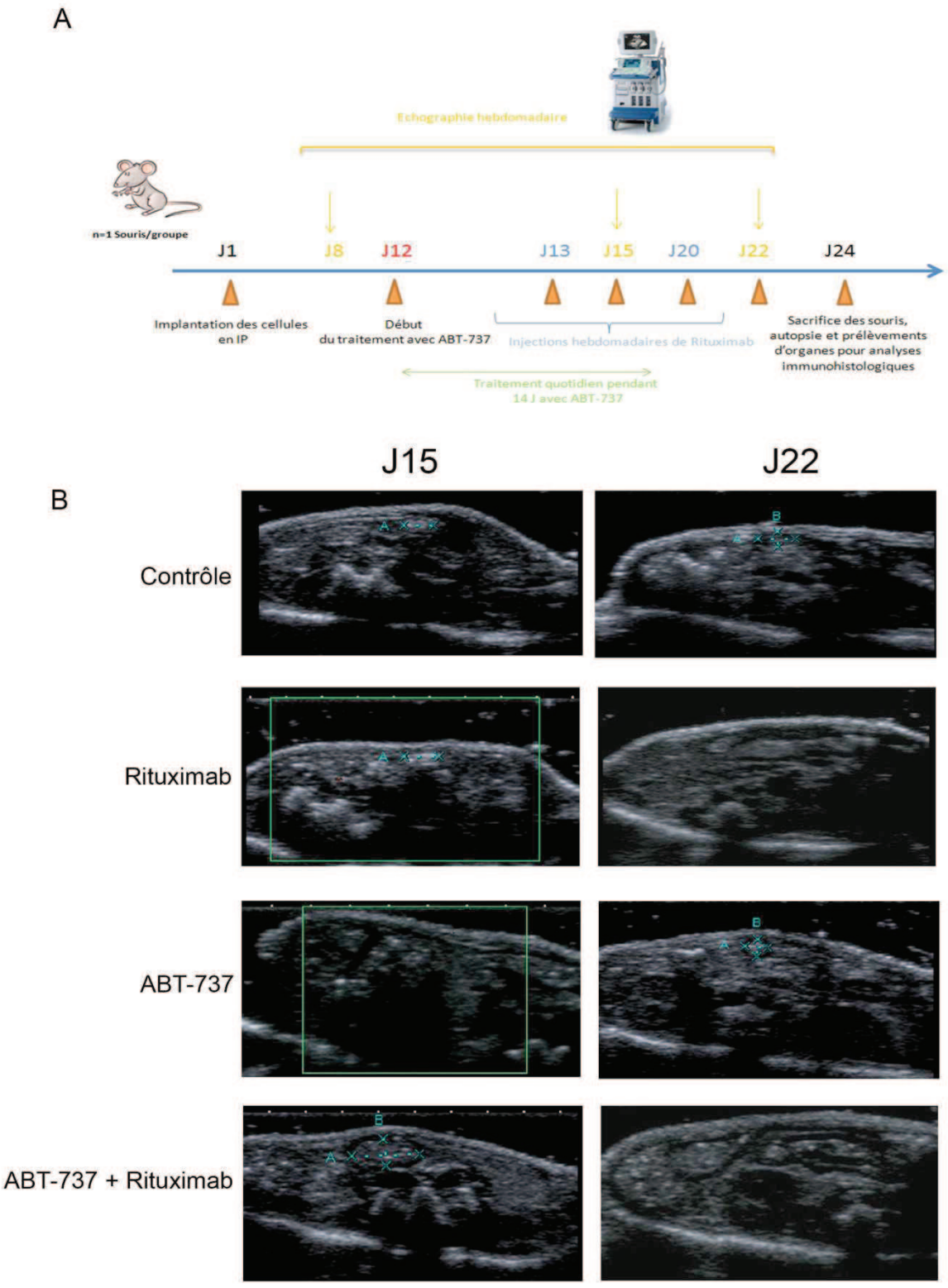


Figure 76 : Evaluation de l'efficacité d'ABT-737 et du Rituximab par échographie. A. Schéma récapitulatif de l'expérience. Les souris ont été injectées en IP avec des RPMI8866. 5 groupes de traitements ont été mis en place : non traitées, excipient ABT-737, Rituximab 10 mg/kg (injection hebdomadaire pendant 4 semaines), ABT-737 75 mg/kg (injection quotidienne pendant 14 J) et ABT-737 + Rituximab. Une souris de chaque lot a été suivie par échographie à J8, J15 et J22 afin d'évaluer la prise des tumeurs. **B** Clichés obtenus lors de l'échographie de l'abdomen pour les souris non traitées, traitées avec le Rituximab, ABT-737 ou la combinaison des 2 composés à J15 et J22. La présence de nodules est indiquée par des pointillés bleus.

Les résultats obtenus par échographie, présentés sur la figure 76 B, sont les suivants :

- A J15, de petits nodules sont décelés chez certaines souris (non traitées, Rituximab, ABT-737 + Rituximab). Ils sont généralement localisés sous la peau, au niveau de la paroi abdominale
- A J22, le volume du nodule présent chez la souris contrôle à J15 est légèrement augmenté. En revanche, les nodules observés à J15 ne sont plus visibles à J22 chez les souris traitées avec le Rituximab seul ou en association avec ABT-737.
- On observe la présence d'une petite masse, dont la nature n'est pas bien définie par l'échographe, chez la souris traitée avec ABT-737 seul.

Ces résultats nous renseignent sur la cinétique de croissance des tumeurs et montrent que les premières anomalies sont décelables à l'échographie 15 jours après la greffe. Par ailleurs, ils indiquent que le traitement avec le Rituximab, associé ou non à ABT-737, est efficace dans notre modèle puisqu'il permet la régression des nodules observés chez les souris à J15. Le nodule décelé à J22 chez la souris traitée avec ABT-737 diffère des autres de part sa densité. De plus, l'autopsie de cette souris, réalisée à J24, n'a montré aucune anomalie visible, ce qui suggère qu'il ne s'agissait pas d'une tumeur. De la même façon, les souris traitées avec le Rituximab ou avec la combinaison Rituximab/ABT-737 ne présentaient aucune anomalie lors de l'autopsie (J24). En revanche, une masse correspondant à celle observée à l'échographie a été retrouvée chez la souris non traitée. Celle-ci a été prélevée afin de réaliser une analyse histologique. Le marquage HES (Hématéine-Eosine-Safran), effectué sur les coupes réalisées à partir de cette tumeur montre un envahissement des fibres musculaires abdominales par les lymphocytes B (Figure 77 A et B). Un marquage avec un anticorps anti-Ki-67 révèle un index prolifératif très élevé, soulignant le caractère agressif de ce lymphome (Figure 77 C).

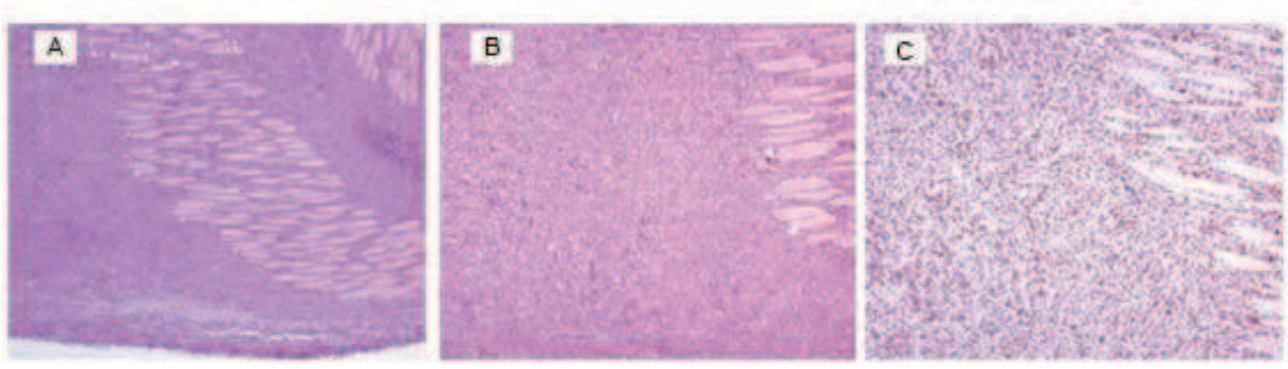


Figure 77 : Coupes histologiques réalisées à partir d'une tumeur prélevée chez une souris contrôle. A et **B** Marquage HES des fibres musculaires (rose) infiltrées par le lymphome (violet) au grossissement x50 et x100 pour A et B respectivement. **C.** Analyse de la prolifération des cellules tumorales par un marquage avec un anticorps anti-Ki67.

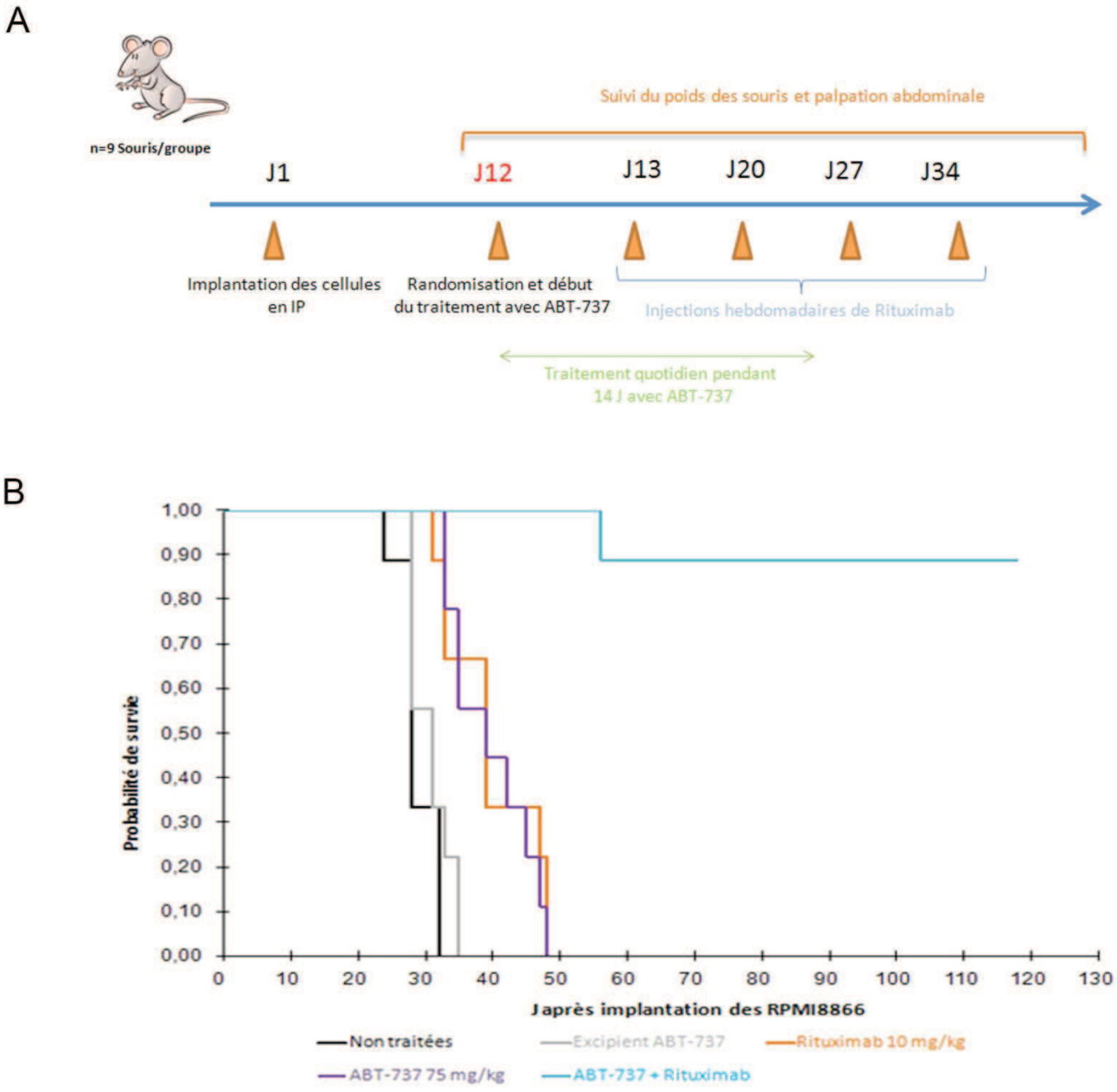


Figure 78 : Evaluation de l'efficacité d'ABT-737, du Rituximab ou de la combinaison des 2 traitements chez des souris SCID implantées en IP avec des RPMI8866. A. Schéma récapitulatif de l'expérience. Les souris ont été injectées en IP avec des RPMI8866. 5 groupes de traitements ont été mis en place : non traitées, excipient ABT-737, Rituximab 10 mg/kg (injection hebdomadaire pendant 4 semaines), ABT-737 75 mg/kg (injection quotidienne pendant 14 J) et ABT-737 + Rituximab. Les souris ont été palpées 3 fois par semaine et sacrifiées lorsqu'elles présentaient de nombreuses tumeurs abdominales associées à un gonflement de l'abdomen**. B** Courbes de survie Kaplan Meier obtenues lors de cette étude grâce au logiciel TIGRE développé par l'IGR.

Un schéma récapitulatif de l'expérience menée sur le reste des souris est donné en Figure 80 A. L'abdomen des souris a été palpé trois fois par semaine afin de vérifier la présence d'éventuelles tumeurs. Les stades tardifs de la maladie se manifestant par la présence d'ascite et d'occlusions intestinales, nous avons décidé de sacrifier les souris lorsqu'un gonflement anormal de l'abdomen était observé. Ce symptôme précède généralement la mort de l'animal et est accompagné de phénotypes secondaires tels que le hérissement des poils, la réduction de la mobilité ou l'accélération du rythme cardiaque. Les résultats de cette étude pré-clinique montrent que :

- Les premiers signes cliniques de la maladie se manifestent chez les souris contrôles (Non traitées ou excipient ABT-737) dès J20. Ce lymphome est très agressif et conduit à la mort de ces animaux (naturelle ou par sacrifice éthique) entre J26 et J36 avec une médiane de survie de 30 jours pour les 2 groupes (Figure 80 B).
- Les souris traitées avec le Rituximab ne présentent pas d'effets secondaires, leur poids reste constant lors de l'étude. Le traitement augmente la médiane de survie des souris qui est de 40 J dans ce groupe.
- Les souris traitées avec ABT-737 présentent les mêmes caractéristiques que celles traitées avec le Rituximab. La figure 80 B montre des courbes de Kaplan Meier très proches pour ces deux groupes. Ainsi, ABT-737 permet également d'augmenter la médiane de survie des animaux qui est de 42 J dans ce groupe.
- Les souris traitées avec les deux composés en association présentent une légère perte de poids au début du traitement (< à -5%). Les résultats présentés sur la figure 80 B montrent que l'utilisation de ces deux composés en combinaison est extrêmement efficace dans ce modèle puisqu'elle permet d'induire une rémission complète chez 85% des souris.

Ces résultats confirment ceux obtenus lors de l'expérience réalisée chez les souris xénogreffées en sous-cutanée et montre qu'ABT-737 est aussi efficace dans notre modèle que le Rituximab. Il diminue considérablement la croissance tumorale ce qui se traduit par une augmentation de la survie des souris. De plus, l'utilisation des 2 composés en combinaison donne des résultats extrêmement satisfaisants et prometteurs pour la prise en charge des PTLD. Les perspectives concernant ce travail et son éventuel application en clinique seront discutées dans la prochaine partie de ce chapitre.

2. Discussion

a) Mécanisme d'action d'ABT-737 dans les cellules de LB et les LCL *in vitro*

La deuxième partie du travail de thèse avait pour objectif principal d'évaluer l'efficacité d'ABT-737 pour le traitement des LB et des PTLD associés à EBV. Nous nous sommes d'abord intéressés au mode de fonctionnement de ce composé *in vitro*. Nous avons montré qu'il permet la relocalisation de Bax du cytoplasme vers la mitochondrie dans les LCL, induisant ainsi la voie intrinsèque de l'apoptose dans ces cellules. En revanche, ce mécanisme n'a pas été retrouvé dans les cellules de LB EBV (+). Cette différence de sensibilité ne pouvant pas s'expliquer par le statut EBV des cellules, nous nous sommes demandés quel mécanisme moléculaire pouvait conférer une résistance aux lignées de LB. Plusieurs études ont montré qu'une forte expression de la protéine anti-apoptotique Mcl-1, qui n'est pas ciblé par ABT-737, limite l'efficacité de ce composé (Chen et al., 2007b; Keuling et al., 2009; van Delft et al., 2006). Nous avons donc évalué le niveau d'expression de cette protéine dans nos lignées de LB et de LCL par Western Blot et par immunohistochimie et nous avons montré que toutes nos cellules expriment fortement Mcl-1. Ainsi, dans notre modèle, la sensibilité des cellules n'est pas corrélée à l'expression de cette protéine. Une autre étude a révélé qu'un ratio Bim/Bcl-2 élevé favorise l'apoptose induite par ABT-737 dans des lignées de CLL (Del Gaizo Moore et al., 2007). L'équipe de Letai a montré que Bcl-2 était fortement associé à Bim dans ces cellules. L'utilisation d'ABT-737 permet, selon les auteurs, de déstabiliser les interactions Bcl-2/Bim, permettant ainsi à cette protéine pro-apoptotique d'activer Bax, en absence de Mcl-1. De la même façon, Deng *et al* ont réalisé une étude dans plusieurs lignées de lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL) et ont définis trois mécanismes pouvant être à l'origine d'une résistance à l'apoptose:

1. Une inhibition de Bim par surexpression de Bcl-2
2. Une inhibition de l'expression de Bim
3. Une inhibition de l'expression de Bax et Bak

Les auteurs ont montré que les cellules appartenant au premier groupe sont très sensibles à ABT-737 alors que celles appartenant au second et troisième groupe sont beaucoup plus résistantes. Leurs résultats indiquent qu'il existe une corrélation directe entre le ratio Bim/Bcl-2 et la sensibilité des cellules à ce composé.

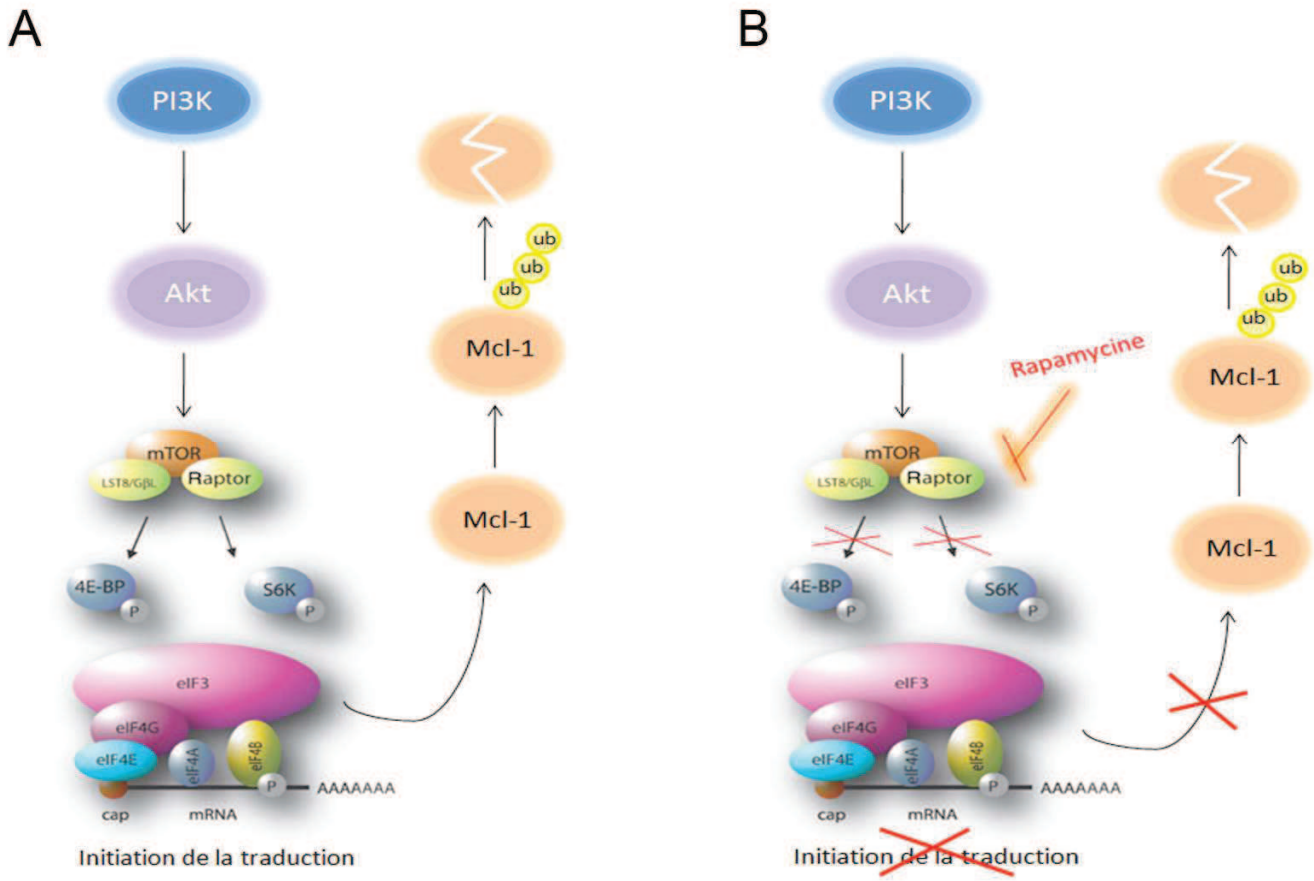


Figure 79 : Modèle proposé par l'étude de Spender et al pour expliquer la diminution de Mcl-1 après traitement à la rapamycine. A Selon les auteurs la voie PI3K/Akt/mTOR est activée dans les cellules de LB et participe à la régulation de la prolifération et de la survie de ces cellules. **B** L'utilisation de la rapamycine inhibe l'activité de mTOR et inactive également ses cibles, les facteurs 4E-BP et p70S6K impliqués dans l'initiation de la traduction. Mcl-1 ayant une demi-vie très courte, l'inhibition de la synthèse protéique par la rapamycine se traduit par une diminution du niveau d'expression de cette protéine. Ainsi, le traitement avec la rapamycine diminue l'expression de Mcl-1 et sensibilise les cellules de LB à ABT-737.

Ils ont également montré que l'inhibition de Bim par des shARN dans une lignée de DLBCL diminue considérablement l'apoptose induite par ABT-737 (Deng et al., 2007). L'ensemble de ces données met en évidence un rôle de Bim dans la réponse à ABT-737. Toutefois, les études d'immunohistochimie réalisées sur nos lignées (Tableau 4) ne montrent pas de corrélation entre l'expression de Bim et la sensibilité des cellules à ABT-737. En effet, les LCL qui sont très sensibles à ce composé expriment peu cette protéine pro-apoptotique. Par ailleurs, l'équipe de Martine Raphaël a récemment montré, lors de l'analyse de 60 biopsies de PTLD EBV (-) ou EBV (+), que l'infection par EBV induit une diminution de l'expression de Bim dans les PTLD (Ghigna et al, en préparation). Ainsi, ces résultats suggèrent que Bim n'influence pas la réponse à ABT-737 dans notre modèle.

Une étude publiée en mars 2012 s'est intéressée aux mécanismes influençant la sensibilité des cellules de LB à l'apoptose induite par ABT-737 (Spender and Inman, 2012). Les résultats obtenus par Spender *et al* montrent qu'ABT-737 induit l'apoptose dans certaines lignées de LB EBV (-) comme Ramos et L3055 alors que d'autres comme BL2 et BL40 sont beaucoup plus résistantes. Ils ont également montré qu'il n'existait pas de corrélation entre la sensibilité des cellules de LB à ABT-737 et l'expression des protéines Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bim, PUMA et Bid. Néanmoins, leurs résultats sont en accord avec ceux obtenus par Del Gaizo Moore *et al* puisqu'ils montrent que les cellules présentant un ratio Bim/Mcl-1 élevé sont sensibles à l'apoptose induite par ce composé. Les auteurs ont également mis en évidence l'implication de la voie PI3K/Akt/mTOR dans la régulation de la prolifération et de la survie des cellules de LB. Leurs travaux montrent que l'inhibition d'Akt et de mTOR diminue l'expression de Mcl-1 et potentialise l'effet d'ABT-737 dans ces cellules. L'inactivation de mTOR entraînerait une inhibition de la phosphorylation des facteurs 4E-BP1 et elF4E. Il en résulterait une inhibition de la synthèse de Mcl-1, une protéine très instable qui a une demi-vie très courte. Ainsi le traitement avec ABT-737, en association avec un inhibiteur de la voie PI3K/AKT/mTOR permettrait d'augmenter le ratio Bim/Mcl-1 et d'induire l'apoptose des cellules de LB (Figure 79). Cette étude indique également que l'inhibition du proto-oncogène *c-myc,* permettrait d'augmenter l'apoptose induite par ABT-737 dans les cellules de LB. Dans ce contexte, nous pourrions envisager de comparer l'effet de l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR dans les cellules de LB et les LCL. Toutefois nos résultats préliminaires montrent que mTOR est fortement activée dans les lignées EBV (+) en latence de type III, dont les LCL qui sont sensibles au traitement par ABT-737 (données non montrées). Ainsi, l'activation de cette voie ne semble pas limiter l'efficacité d'ABT-737 dans notre modèle.

Par contre, les données obtenues par Spender *et al* sur l'implication de c-myc dans la réponse des cellules de LB au traitement avec ABT-737 sont particulièrement intéressantes. Nous aimerions donc, dans un premier temps, reproduire les expériences de cette équipe avec nos lignées pour vérifier si l'inhibition du proto-oncogène *c-myc* permet de sensibiliser les cellules au traitement par ABT-737. Si c'est le cas, la suite du travail consistera à caractériser les mécanismes moléculaires induits par c-Myc limitant l'efficacité d'ABT-737 dans les cellules de LB.

b) Développement de nouvelles molécules visant à inhiber les protéines Bcl-xL et Mcl-1 pour le traitement des lymphomes B

Nos résultats, obtenus dans des lignées de LB et de LCL, ainsi que ceux obtenus par d'autres équipes à partir de cellules primaires, montrent que la protéine Mcl-1 est souvent surexprimée dans les lymphoprolifératons malignes (Cho-Vega et al., 2004). Sur la base de ces observations, nous avons entrepris une collaboration avec une équipe de chimiste de l'ICSN afin de développer de nouvelles molécules naturelles ou de synthèse capables de déplacer les interactions Bak/Bcl-xL et Bak/Mcl-1. Les résultats obtenus lors d'un crible effectué dans notre laboratoire sur 6 molécules montrent que deux d'entre elles, le JD-468 et le Drimane, induisent une apoptose dépendante des caspases dans plusieurs lignées de LB et de LCL lorsqu'elles sont utilisées à faibles concentrations.

Ces résultats bien que préliminaires sont très encourageants mais d'autres expériences sont nécessaires afin de caractériser précisément le mode d'action de ces composés. Nous envisageons, dans un premier temps, de vérifier la spécificité de ces molécules. D'après les expériences effectuées en RMN par les chimistes, ces molécules se fixent sur Bcl-xL et Mcl-1, empêchant ainsi l'interaction de ces protéines anti-apoptotiques avec les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Des expériences de co-immunoprécipitations doivent être réalisées pour confirmer ces données. Afin de compléter notre étude, nous envisageons également de comparer l'efficacité de ces molécules dans des lignées surexprimant Bcl-xL et/ou Mcl-1 ou au contraire dans des cellules présentant une inhibition (shRNA ou siRNA) de ces protéines. Si les expériences menées *in vitro* sont concluantes, nous poursuivrons ce travail *in vivo* sur les modèles de souris xénogreffées préalablement établis par l'équipe. La première étape consistera à identifier la dose maximale tolérée (MTD) chez des animaux non implantés. Plusieurs doses et schémas d'administration devront être testés avant d'évaluer l'efficacité de ces composés lors d'études pré-cliniques réalisées chez des souris implantées en sous-cutanée avec des cellules de LB ou chez des souris SCID xénogreffées en IP avec des LCL (modèle PTLD).

L'obtention d'inhibiteur spécifique de Mcl-1 pourrait constituer un véritable atout pour la prise en charge des lymphoprolifération malignes comme le LB ou les PTLD. En effet, plusieurs antagonistes de cette molécule ont récemment été identifiés mais la plupart d'entre eux, comme l'Obatoclax, sont des pan-inhibiteurs de la famille Bcl-2 (Mohammad et al., 2007; Nguyen et al., 2007). D'autres composés ciblant spécifiquement Mcl-1 ont été développés mais leur activité n'a pas encore été testée *in vivo (Stewart et al., 2010).*

Nous espérons que le travail de notre équipe, réalisé en étroite collaboration avec les chimistes et les cliniciens, aboutira au développement de l'un de ces composés en clinique.

c) Evaluation pré-clinique d'ABT-737 pour le traitement du LB et des PTLD

* Modèle de souris xénogreffées avec des cellules de LB (LY47)

La polychimiothérapie utilisée pour la prise en charge des patients atteints de LB permet d'obtenir des résultats très satisfaisants mais les doses utilisées sont très fortes et entraînent de nombreux effets secondaires chez les patients. De plus, il n'existe aucune stratégie thérapeutique alternative pour les malades qui ne répondent pas à la chimiothérapie. Dans ce contexte, l'objectif des études pré-cliniques réalisées chez les souris xénogreffées avec des LY47 était de déterminer si ce composé pouvait, d'une part, constituer une nouvelle stratégie pour le traitement des LB EBV (+) exprimant Bcl-2 et , d'autre part, potentialiser l'effet de la chimiothérapie. Nos résultats montrent que la combinaison Cyclophosphamide/ABT-737 permet de retarder la croissance tumorale chez ces souris. En revanche, le volume tumoral augmente considérablement lorsque le traitement avec ABT-737 prend fin et la survie des souris de ce groupe n'est pas augmentée par rapport à celle des souris traitées avec le cyclophosphamide en monothérapie. Par ailleurs, les différentes études réalisées avec ce modèle montrent qu'ABT-737, lorsqu'il est utilisé seul, ne présente aucune efficacité anti-tumorale chez les souris xénogreffées avec des LY47.

L'équipe de Mason a également testé l'efficacité anti-tumorale de la combinaison ABT-737/ Cyclophosphamide dans un modèle de souris transgénique (Eμ-myc) qui développent spontanément des lymphomes B (Mason et al., 2008). Les auteurs ont d'abord comparé l'efficacité de fortes doses de Cyclophosphamide (300 mg/kg) chez des souris (C57BL/6) implantées avec des tumeurs dérivées du modèle Eμ-Myc exprimant ou non Bcl-2. Ils ont montré que les souris Eμ-Myc/Eμ-Bcl-2 répondent beaucoup moins bien au traitement que les souris Eμ-Myc avec une médiane de survie de 32 et 98 jours respectivement.

Ils ont ensuite testé l'association Cyclophosphamide (50 mk/kg)/ABT-737 (75 mg/kg) chez les souris Eμ-Myc/Eμ-Bcl-2 en utilisant le schéma d'administration présenté sur la figure 80.

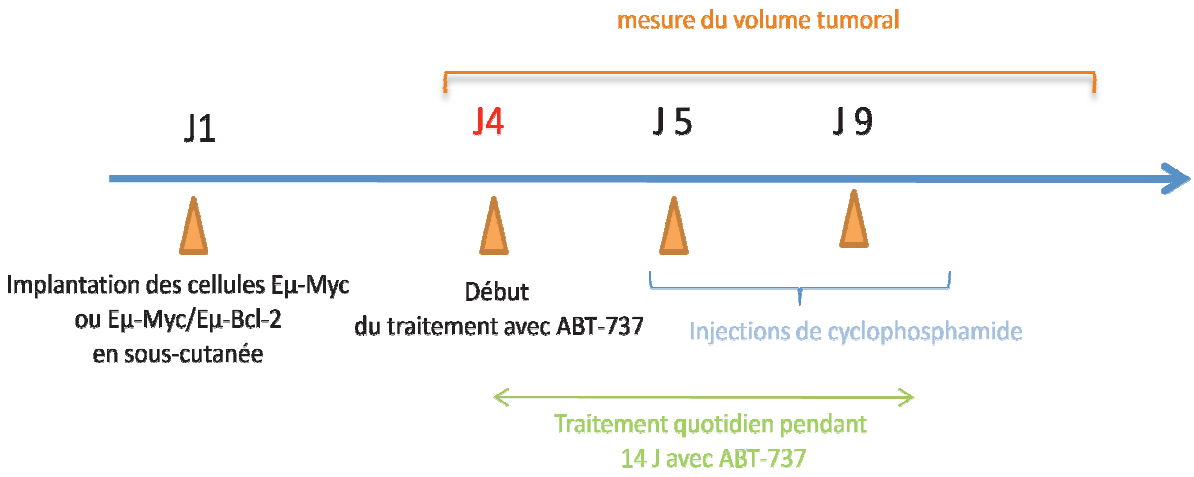


Figure 80 : Schéma d'administration utilisé lors de l'étude publiée par Mason *et al*

L'utilisation des 2 traitements en combinaison donne des rémissions complètes chez 14 des 18 souris traitées. Ces résultats diffèrent des nôtres et montrent que l'association ABT-737/Cyclophosphamide pourrait être utilisée pour le traitement des lymphomes présentant une dérégulation de *c-myc* associée à une forte expression de Bcl-2. Cette différence peut s'expliquer par plusieurs raisons :

1. Le modèle Eμ-Myc/Eμ-Bcl-2 induit des lymphomes « Burkitt like » qui expriment Bcl-2 mais ne présentent pas les mêmes caractéristiques que des cellules de LB infectées par EBV.
2. Dans ce modèle, le traitement avec ABT-737 débute très rapidement après la greffe (J4) sans que le volume tumoral ne soit indiqué. Or nous avons observé que ce paramètre a beaucoup d'influence sur la réponse à ABT-737.
3. Nos souris xénogreffées avec les LY47 ont été traitées avec une unique dose de Cyclophosphamide. Deux injections ont été réalisées dans l'étude publiée par l'équipe de Mason.

Sur la base de ces observations, nous pensons qu'il serait intéressant de tester de nouveau l'association ABT-737/Cyclophosphamide dans notre modèle en utilisant un schéma d'administration différent. De fait, la chimiothérapie est administrée en plusieurs cures pour le traitement du LB.

Nous pourrions donc reproduire cette expérience en utilisant le schéma d'administration présenté sur la figure 81. Par ailleurs, au regard des résultats obtenus *in vitro*, nous envisageons également de tester la combinaison ABT-737/ nutline-3 dans ce modèle.

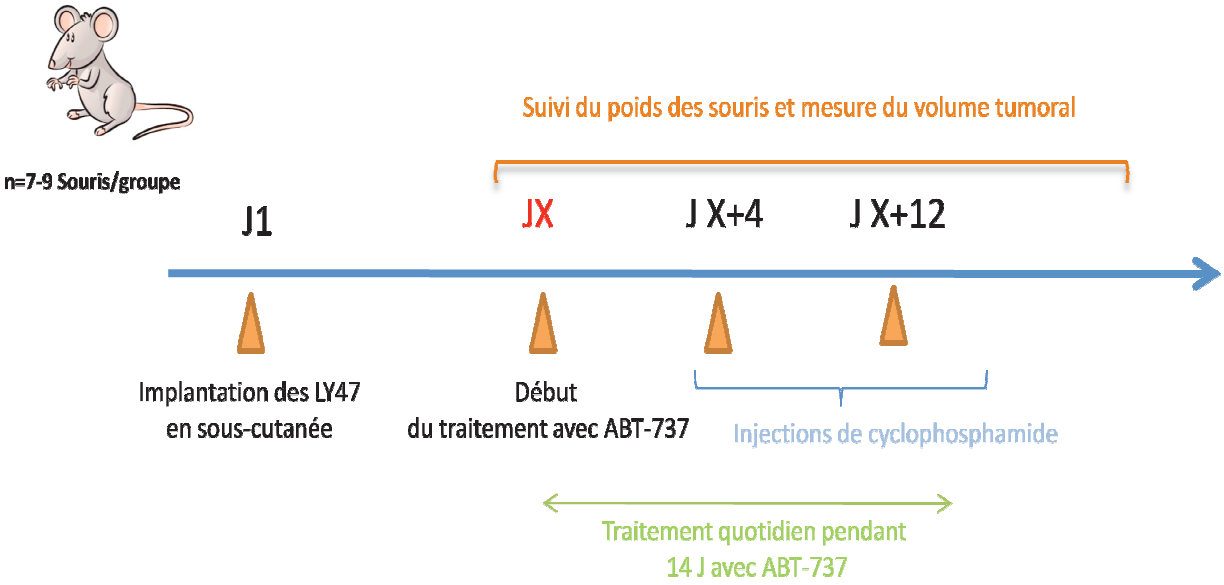


Figure 81 : Nouveau schéma d'administration proposé pour l'évaluation de l'efficacité de la combinaison ABT-737/Rituximab

* Modèle de souris xénogreffées avec des LCL

Nous avons également évalué l'efficacité d'ABT-737 dans un modèle de souris xénogreffées en sous-cutanée ou en IP avec des LCL. Nous avons montré que ce composé induit une diminution de la croissance tumorale, associée à une augmentation de la survie des souris. Cette approche semble très prometteuse pour la prise en charge des patients atteints de PTLD puisque nous montrons que ce composé est aussi efficace que le Rituximab qui constitue l'un des traitements de référence de cette pathologie. Par ailleurs, nos résultats indiquent que l'utilisation d'ABT-737 en combinaison avec le Rituximab permet d'améliorer considérablement la réponse à l'un ou l'autre des traitements en induisant des rémissions complètes (RC) chez 70% des souris xénogreffées en sous-cutanée ou en IP.

Une étude, publiée par Loomis *et al* en 2003, a évalué l'efficacité de l'Oblimersen, un antisens dirigé contre Bcl-2, en combinaison avec le Rituximab dans le modèle de souris SCID xénogreffées avec une lignée de LCL. Les résultats de cette équipe sont similaires aux nôtre. Les auteurs montrent que l'association Oblimersen/Rituximab entraîne une RC chez 79% des souris (Loomis et al., 2003).

Un essai clinique de Phase II a été mis en place afin de tester la combinaison de ces 2 composés chez des patients atteints de lymphomes non hodgkiniens (lymphome folliculaire, lymphome du manteau, DLBCL). Les résultats montrent que cette stratégie thérapeutique ne présente pas de toxicité et permet d'obtenir une réponse anti-tumorale chez 42 % des patients (Pro et al., 2008).

Les laboratoires Abbott ont également testé l'efficacité anti-tumorale d'ABT-263, qui correspond à la version orale d'ABT-737, en association avec le Rituximab pour le traitement des DLBCL *in vivo* (Tse et al., 2008). Leurs résultats indiquent que ces deux composés induisent une rémission complète chez 70% des souris xénogreffées avec une lignée de DLBCL. Depuis, un essai clinique de phase I a été réalisé chez des patients présentant différents types de lymphomes (lymphome folliculaire, DLBCL, CLL, lymphome d'Hodgkin). Les premiers résultats, présentés au congrès de l'ASH en 2011, indiquent que le traitement est bien toléré et que l'association des deux composés permet d'obtenir une réponse anti-tumorale chez ces patients. Un essai de phase II est en cours chez des patients atteints de CLL.

Nos résultats, ainsi que ceux obtenus pas d'autres équipes, suggèrent qu'ABT-737 pourrait constituer une alternative efficace pour le traitement des différentes pathologies malignes associées à EBV et plus particulièrement pour les tumeurs exprimant la LMP-1. En effet, nous avons vu que cette protéine oncogénique est en grande partie responsable de la résistance à l'apoptose des cellules tumorales. Nous envisageons de reproduire ces expériences chez des souris xénogreffées avec des lignées de NPC. L'efficacité d'ABT-737 pourra être testée en combinaison avec la radiothérapie qui est majoritairement utilisée pour traiter cette pathologie. Cette stratégie thérapeutique pourra également être évaluée pour le traitement des lymphomes NK/T, reconnus comme étant fortement associés à EBV et qui ont un très mauvais pronostic. De plus, les nombreuses études effectuées sur des séries de patients atteints de cette pathologie montrent que la LMP-1 est très souvent retrouvée dans ces tumeurs (70 % environ). L'activité anti-tumorale d'ABT-737 sera évaluée dans un premier temps *in vitro*. Si les résultats obtenus sont convaincants, des tests pré-cliniques seront envisagés.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Adldinger, H.K., H. Delius, U.K. Freese, J. Clarke, and G.W. Bornkamm. 1985. A putative transforming gene of Jijoye virus differs from that of Epstein-Barr virus prototypes. *Virology*. 141:221-234.

Agawa, H., K. Ikuta, Y. Minamiyama, M. Inoue, and T. Sairenji. 2002. Down-regulation of spontaneous Epstein-Barr virus reactivation in the P3HR-1 cell line by L-arginine. *Virology*. 304:114-124.

Aita, V.M., X.H. Liang, V.V. Murty, D.L. Pincus, W. Yu, E. Cayanis, S. Kalachikov, T.C. Gilliam, and B. Levine. 1999. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics*. 59:59-65.

Allen, M.D., L.S. Young, and C.W. Dawson. 2005. The Epstein-Barr virus-encoded LMP2A and LMP2B proteins promote epithelial cell spreading and motility. *J Virol*. 79:1789-1802.

Amaravadi, R.K., D. Yu, J.J. Lum, T. Bui, M.A. Christophorou, G.I. Evan, A. Thomas-Tikhonenko, and C.B. Thompson. 2007. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest*. 117:326-336.

Ambinder, R.F., M.A. Mullen, Y.N. Chang, G.S. Hayward, and S.D. Hayward. 1991. Functional domains of Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1. *J Virol*. 65:1466-1478.

Ameisen, J.C., J. Estaquier, T. Idziorek, and F. De Bels. 1995. The relevance of apoptosis to AIDS pathogenesis. *Trends Cell Biol*. 5:27-32.

Andersson-Ellstrom, A., T. Bergstrom, B. Svennerholm, and I. Milsom. 1997. Epstein-Barr virus DNA in the uterine cervix of teenage girls. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 76:779-783.

Anderton, E., J. Yee, P. Smith, T. Crook, R.E. White, and M.J. Allday. 2008. Two Epstein-Barr virus (EBV) oncoproteins cooperate to repress expression of the proapoptotic tumour-suppressor Bim: clues to the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Oncogene*. 27:421-433.

Arbach, H., V. Viglasky, F. Lefeu, J.M. Guinebretiere, V. Ramirez, N. Bride, N. Boualaga, T. Bauchet, J.P. Peyrat, M.C. Mathieu, S. Mourah, M.P. Podgorniak, J.M. Seignerin, K. Takada, and I. Joab. 2006. Epstein-Barr virus (EBV) genome and expression in breast cancer tissue: effect of EBV infection of breast cancer cells on resistance to paclitaxel (Taxol). *J Virol*. 80:845-853.

Argentini, M., N. Barboule, and B. Wasylyk. 2001. The contribution of the acidic domain of MDM2 to p53 and MDM2 stability. *Oncogene*. 20:1267-1275.

Ashkenazi, A., R.C. Pai, S. Fong, S. Leung, D.A. Lawrence, S.A. Marsters, C. Blackie, L. Chang, A.E. McMurtrey, A. Hebert, L. DeForge, I.L. Koumenis, D. Lewis, L. Harris, J. Bussiere, H. Koeppen, Z. Shahrokh, and R.H. Schwall. 1999. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest*. 104:155-162.

Atkinson, P.G., H.J. Coope, M. Rowe, and S.C. Ley. 2003. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus stimulates processing of NF-kappa B2 p100 to p52. *J Biol Chem*. 278:51134-51142.

Azmi, A.S., A. Aboukameel, S. Banerjee, Z. Wang, M. Mohammad, J. Wu, S. Wang, D. Yang, P.A. Philip, F.H. Sarkar, and R.M. Mohammad. 2010. MDM2 inhibitor MI-319 in combination with cisplatin is an effective treatment for pancreatic cancer independent of p53 function. *Eur J Cancer*. 46:1122-1131.

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.

Baer, R., A.T. Bankier, M.D. Biggin, P.L. Deininger, P.J. Farrell, T.J. Gibson, G. Hatfull, G.S. Hudson, S.C. Satchwell, C. Seguin, and et al. 1984. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*. 310:207-211.

Bajaj, B.G., M. Murakami, Q. Cai, S.C. Verma, K. Lan, and E.S. Robertson. 2008. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with and enhances the stability of the c-Myc oncoprotein. *J Virol.* 82:4082-4090.

Bandobashi, K., A. Maeda, N. Teramoto, N. Nagy, L. Szekely, H. Taguchi, I. Miyoshi, G. Klein, and E. Klein. 2001. Intranuclear localization of the transcription coadaptor CBP/p300 and the transcription factor RBP-Jk in relation to EBNA-2 and -5 in B lymphocytes. *Virology.* 288:275-282.

Barlev, N.A., L. Liu, N.H. Chehab, K. Mansfield, K.G. Harris, T.D. Halazonetis, and S.L. Berger. 2001. Acetylation of p53 activates transcription through recruitment of coactivators/histone acetyltransferases. *Mol Cell.* 8:1243-1254.

Bartek, J., and J. Lukas. 2003. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell.* 3:421-429.

Barth, S., T. Pfuhl, A. Mamiani, C. Ehses, K. Roemer, E. Kremmer, C. Jaker, J. Hock, G. Meister, and F.A. Grasser. 2008. Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. *Nucleic Acids Res.* 36:666-675.

Bayle, J.H., B. Elenbaas, and A.J. Levine. 1995. The carboxyl-terminal domain of the p53 protein regulates sequence-specific DNA binding through its nonspecific nucleic acid-binding activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:5729-5733.

Bennett, M., K. Macdonald, S.W. Chan, J.P. Luzio, R. Simari, and P. Weissberg. 1998. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science.* 282:290-293.

Bergamaschi, D., Y. Samuels, N.J. O'Neil, G. Trigiante, T. Crook, J.K. Hsieh, D.J. O'Connor, S. Zhong, I. Campargue, M.L. Tomlinson, P.E. Kuwabara, and X. Lu. 2003. iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human. *Nat Genet.* 33:162-167.

Bernal, J.A., R. Luna, A. Espina, I. Lazaro, F. Ramos-Morales, F. Romero, C. Arias, A. Silva, M. Tortolero, and J.A. Pintor-Toro. 2002. Human securin interacts with p53 and modulates p53-mediated transcriptional activity and apoptosis. *Nat Genet.* 32:306-311.

Bhardwaj, A., and B.B. Aggarwal. 2003. Receptor-mediated choreography of life and death. *J Clin Immunol.* 23:317-332.

Bhaskar, P.T., and N. Hay. 2007. The two TORCs and Akt. *Dev Cell.* 12:487-502.

Blagosklonny, M.V. 2000. p53 from complexity to simplicity: mutant p53 stabilization, gain-of-function, and dominant-negative effect. *FASEB J.* 14:1901-1907.

Blagosklonny, M.V. 2001. Unwinding the loop of Bcl-2 phosphorylation. *Leukemia.* 15:869-874.

Blommaart, E.F., J.J. Luiken, P.J. Blommaart, G.M. van Woerkom, and A.J. Meijer. 1995. Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem.* 270:2320-2326.

Blum, K.A., G. Lozanski, and J.C. Byrd. 2004. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood.* 104:3009-3020.

Bodescot, M., O. Brison, and M. Perricaudet. 1986. An Epstein-Barr virus transcription unit is at least 84 kilobases long. *Nucleic Acids Res.* 14:2611-2620.

Bonnet, M., J.M. Guinebretiere, E. Kremmer, V. Grunewald, E. Benhamou, G. Contesso, and I. Joab. 1999. Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *J Natl Cancer Inst.* 91:1376-1381.

Bottger, V., A. Bottger, S.F. Howard, S.M. Picksley, P. Chene, C. Garcia-Echeverria, H.K. Hochkeppel, and D.P. Lane. 1996. Identification of novel mdm2 binding peptides by phage display. *Oncogene.* 13:2141-2147.

Bouchet, B.P., C. Caron de Fromentel, A. Puisieux, and C.M. Galmarini. 2006. p53 as a target for anti-cancer drug development. *Crit Rev Oncol Hematol.* 58:190-207.

Bourdon, J.C., V. Deguin-Chambon, J.C. Lelong, P. Dessen, P. May, B. Debuire, and E. May. 1997. Further characterisation of the p53 responsive element--identification of new candidate genes for trans-activation by p53. *Oncogene*. 14:85-94.

Brady, G., G.J. MacArthur, and P.J. Farrell. 2007. Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *J Clin Pathol*. 60:1397-1402.

Brennan, P., A.M. Mehl, M. Jones, and M. Rowe. 2002. Phosphatidylinositol 3-kinase is essential for the proliferation of lymphoblastoid cells. *Oncogene*. 21:1263-1271.

Brou, C., F. Logeat, N. Gupta, C. Bessia, O. LeBail, J.R. Doedens, A. Cumano, P. Roux, R.A. Black, and A. Israel. 2000. A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell*. 5:207-216.

Brugarolas, J., K. Lei, R.L. Hurley, B.D. Manning, J.H. Reiling, E. Hafen, L.A. Witters, L.W. Ellisen, and W.G. Kaelin, Jr. 2004. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev*. 18:2893-2904.

Budanov, A.V., and M. Karin. 2008. p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell*. 134:451-460.

Bullock, A.N., and A.R. Fersht. 2001. Rescuing the function of mutant p53. *Nat Rev Cancer*. 1:68-76.

Burkitt, D. 1958. A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg*. 46:218-223.

Burkitt, D., and G.T. O'Conor. 1961. Malignant lymphoma in African children. I. A clinical syndrome. *Cancer*. 14:258-269.

Burkitt, D.P. 1961. Observations on the geography of malignant lymphoma. *East Afr Med J*. 38:511-514.

Burns, T.F., E.J. Bernhard, and W.S. El-Deiry. 2001. Tissue specific expression of p53 target genes suggests a key role for KILLER/DR5 in p53-dependent apoptosis in vivo. *Oncogene*. 20:4601-4612.

Busson, P., G. Ganem, P. Flores, F. Mugneret, B. Clausse, B. Caillou, K. Braham, H. Wakasugi, M. Lipinski, and T. Tursz. 1988. Establishment and characterization of three transplantable EBV-containing nasopharyngeal carcinomas. *Int J Cancer*. 42:599-606.

Busson, P., T. Ooka, and M. Corbex. 2004. [Nasopharyngeal carcinomas and Epstein-Barr virus: from epidemiology and detection to therapy]. *Med Sci (Paris)*. 20:453-457.

Bykov, V.J., N. Issaeva, G. Selivanova, and K.G. Wiman. 2002. Mutant p53-dependent growth suppression distinguishes PRIMA-1 from known anticancer drugs: a statistical analysis of information in the National Cancer Institute database. *Carcinogenesis*. 23:2011-2018.

Cadwell, K., J.Y. Liu, S.L. Brown, H. Miyoshi, J. Loh, J.K. Lennerz, C. Kishi, W. Kc, J.A. Carrero, S. Hunt, C.D. Stone, E.M. Brunt, R.J. Xavier, B.P. Sleckman, E. Li, N. Mizushima, T.S. Stappenbeck, and H.W.t. Virgin. 2008. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*. 456:259-263.

Caillard, S., C. Lelong, F. Pessione, and B. Moulin. 2006. Post-transplant lymphoproliferative disorders occurring after renal transplantation in adults: report of 230 cases from the French Registry. *Am J Transplant*. 6:2735-2742.

Caldwell, R.G., R.C. Brown, and R. Longnecker. 2000. Epstein-Barr virus LMP2A-induced B-cell survival in two unique classes of EmuLMP2A transgenic mice. *J Virol*. 74:1101-1113.

Caldwell, R.G., J.B. Wilson, S.J. Anderson, and R. Longnecker. 1998. Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity*. 9:405-411.

Cannon, M.J., P. Pisa, R.I. Fox, and N.R. Cooper. 1990. Epstein-Barr virus induces aggressive lymphoproliferative disorders of human B cell origin in SCID/hu chimeric mice. *J Clin Invest*. 85:1333-1337.

Capoulade, C., B. Bressac-de Paillerets, I. Lefrere, M. Ronsin, J. Feunteun, T. Tursz, and J. Wiels. 1998. Overexpression of MDM2, due to enhanced translation, results in inactivation of wild-type p53 in Burkitt's lymphoma cells. *Oncogene*. 16:1603-1610.

Capoulade, C., L.M. Mir, K. Carlier, Y. Lecluse, C. Tetaud, Z. Mishal, and J. Wiels. 2001. Apoptosis of tumoral and nontumoral lymphoid cells is induced by both mdm2 and p53 antisense oligodeoxynucleotides. *Blood.* 97:1043-1049.

Carter, B.Z., D.H. Mak, S.J. Morris, G. Borthakur, E. Estey, A.L. Byrd, M. Konopleva, H. Kantarjian, and M. Andreeff. 2011. XIAP antisense oligonucleotide (AEG35156) achieves target knockdown and induces apoptosis preferentially in CD34+38- cells in a phase 1/2 study of patients with relapsed/refractory AML. *Apoptosis.* 16:67-74.

Catz, S.D., and J.L. Johnson. 2001. Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. *Oncogene.* 20:7342-7351.

Cesarman, E., A. Chadburn, Y.F. Liu, A. Migliazza, R. Dalla-Favera, and D.M. Knowles. 1998. BCL-6 gene mutations in posttransplantation lymphoproliferative disorders predict response to therapy and clinical outcome. *Blood.* 92:2294-2302.

Chan, S.L., M.C. Lee, K.O. Tan, L.K. Yang, A.S. Lee, H. Flotow, N.Y. Fu, M.S. Butler, D.D. Soejarto, A.D. Buss, and V.C. Yu. 2003. Identification of chelerythrine as an inhibitor of BclXL function. *J Biol Chem.* 278:20453-20456.

Chargari, C., C. Leteur, E. Angevin, T. Bashir, B. Schoentjes, J. Arts, M. Janicot, J. Bourhis, and E. Deutsch. 2011a. Preclinical assessment of JNJ-26854165 (Serdemetan), a novel tryptamine compound with radiosensitizing activity in vitro and in tumor xenografts. *Cancer Lett.* 312:209-218.

Chargari, C., C. Leteur, C. Ferte, M. Deberne, B. Lahon, C. Rivera, J. Bourhis, and E. Deutsch. 2011b. [Pharmacological targeting of Mdm2: rationale and perspectives for radiosensitization]. *Cancer Radiother.* 15:316-322.

Chaumorcel, M., S. Souquere, G. Pierron, P. Codogno, and A. Esclatine. 2008. Human cytomegalovirus controls a new autophagy-dependent cellular antiviral defense mechanism. *Autophagy.* 4:46-53.

Chen, A., M. Divisconte, X. Jiang, C. Quink, and F. Wang. 2005. Epstein-Barr virus with the latent infection nuclear antigen 3B completely deleted is still competent for B-cell growth transformation in vitro. *J Virol.* 79:4506-4509.

Chen, G., M. Hitomi, J. Han, and D.W. Stacey. 2000. The p38 pathway provides negative feedback for Ras proliferative signaling. *J Biol Chem.* 275:38973-38980.

Chen, H., J.M. McCaffery, and D.C. Chan. 2007a. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell.* 130:548-562.

Chen, J., V. Marechal, and A.J. Levine. 1993. Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol.* 13:4107-4114.

Chen, S., Y. Dai, H. Harada, P. Dent, and S. Grant. 2007b. Mcl-1 down-regulation potentiates ABT-737 lethality by cooperatively inducing Bak activation and Bax translocation. *Cancer Res.* 67:782-791.

Cheung, A., and E. Kieff. 1982. Long internal direct repeat in Epstein-Barr virus DNA. *J Virol.* 44:286-294.

Cheung, M.M., J.K. Chan, and K.F. Wong. 2003. Natural killer cell neoplasms: a distinctive group of highly aggressive lymphomas/leukemias. *Semin Hematol.* 40:221-232.

Cheung, Z.H., and N.Y. Ip. 2011. Autophagy deregulation in neurodegenerative diseases - recent advances and future perspectives. *J Neurochem.* 118:317-325.

Chiang, C.W., G. Harris, C. Ellig, S.C. Masters, R. Subramanian, S. Shenolikar, B.E. Wadzinski, and E. Yang. 2001. Protein phosphatase 2A activates the proapoptotic function of BAD in interleukin- 3-dependent lymphoid cells by a mechanism requiring 14-3-3 dissociation. *Blood.* 97:1289-1297.

Chilov, D., E. Kukk, S. Taira, M. Jeltsch, J. Kaukonen, A. Palotie, V. Joukov, and K. Alitalo. 1997. Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C. *J Biol Chem.* 272:25176-25183.

Cho-Vega, J.H., G.Z. Rassidakis, J.H. Admirand, M. Oyarzo, P. Ramalingam, A. Paraguya, T.J. McDonnell, H.M. Amin, and L.J. Medeiros. 2004. MCL-1 expression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Hum Pathol.* 35:1095-1100.

Cho, Y., S. Gorina, P.D. Jeffrey, and N.P. Pavletich. 1994. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science.* 265:346-355.

Choquet, S., V. Leblond, R. Herbrecht, G. Socie, A.M. Stoppa, P. Vandenberghe, A. Fischer, F. Morschhauser, G. Salles, W. Feremans, E. Vilmer, M.N. Peraldi, P. Lang, Y. Lebranchu, E. Oksenhendler, J.L. Garnier, T. Lamy, A. Jaccard, A. Ferrant, F. Offner, O. Hermine, A. Moreau, S. Fafi-Kremer, P. Morand, L. Chatenoud, N. Berriot-Varoqueaux, L. Bergougnoux, and N. Milpied. 2006. Efficacy and safety of rituximab in B-cell post-transplantation lymphoproliferative disorders: results of a prospective multicenter phase 2 study. *Blood.* 107:3053-3057.

Choquet, S., B.M. Mamzer, O. Hermine, R. Porcher, Q.S. Nguyen, F. Davi, F. Charlotte, R. Dorent, B. Barrou, J.P. Vernant, M. Raphael, V. Levy, and V. Leblond. 2002. Identification of prognostic factors in post-transplant lymphoproliferative disorders. *Recent Results Cancer Res.* 159:67-80.

Choquet, S., R. Trappe, V. Leblond, U. Jager, F. Davi, and S. Oertel. 2007. CHOP-21 for the treatment of post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLD) following solid organ transplantation. *Haematologica.* 92:273-274.

Choy, E.Y., K.L. Siu, K.H. Kok, R.W. Lung, C.M. Tsang, K.F. To, D.L. Kwong, S.W. Tsao, and D.Y. Jin. 2008. An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. *J Exp Med.* 205:2551-2560.

Chu, J.S., C.C. Chen, and K.J. Chang. 1998. In situ detection of Epstein-Barr virus in breast cancer. *Cancer Lett.* 124:53-57.

Chuang, H.C., J.D. Lay, W.C. Hsieh, H.C. Wang, Y. Chang, S.E. Chuang, and I.J. Su. 2005. Epstein-Barr virus LMP1 inhibits the expression of SAP gene and upregulates Th1 cytokines in the pathogenesis of hemophagocytic syndrome. *Blood.* 106:3090-3096.

Cleary, M.L., S.D. Smith, and J. Sklar. 1986. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell.* 47:19-28.

Clybouw, C., B. McHichi, S. Mouhamad, M.T. Auffredou, M.F. Bourgeade, S. Sharma, G. Leca, and A. Vazquez. 2005. EBV infection of human B lymphocytes leads to down-regulation of Bim expression: relationship to resistance to apoptosis. *J Immunol.* 175:2968-2973.

Cockfield, S.M., J.K. Preiksaitis, L.D. Jewell, and N.A. Parfrey. 1993. Post-transplant lymphoproliferative disorder in renal allograft recipients. Clinical experience and risk factor analysis in a single center. *Transplantation.* 56:88-96.

Codogno, P. 2004. [ATG genes and macroautophagy]. *Med Sci (Paris).* 20:734-736.

Collart, M.A., P. Baeuerle, and P. Vassalli. 1990. Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol Cell Biol.* 10:1498-1506.

Copetti, T., C. Bertoli, E. Dalla, F. Demarchi, and C. Schneider. 2009a. p65/RelA modulates BECN1 transcription and autophagy. *Mol Cell Biol.* 29:2594-2608.

Copetti, T., F. Demarchi, and C. Schneider. 2009b. p65/RelA binds and activates the beclin 1 promoter. *Autophagy.* 5:858-859.

Cordier, M., A. Calender, M. Billaud, U. Zimber, G. Rousselet, O. Pavlish, J. Banchereau, T. Tursz, G. Bornkamm, and G.M. Lenoir. 1990. Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23. *J Virol.* 64:1002-1013.

Cotman, C.W., and A.J. Anderson. 1995. A potential role for apoptosis in neurodegeneration and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* 10:19-45.

Cox, M.A., J. Leahy, and J.M. Hardwick. 1990. An enhancer within the divergent promoter of Epstein-Barr virus responds synergistically to the R and Z transactivators. *J Virol.* 64:313-321.

Crighton, D., S. Wilkinson, J. O'Prey, N. Syed, P. Smith, P.R. Harrison, M. Gasco, O. Garrone, T. Crook, and K.M. Ryan. 2006. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell.* 126:121-134.

Croce, C.M., Y. Tsujimoto, J. Erikson, and P. Nowell. 1984. Chromosome translocations and B cell neoplasia. *Lab Invest.* 51:258-267.

Cuervo, A.M. 2004. Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem.* 263:55-72.

Dai, C., and W. Gu. 2010. p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol Med.* 16:528-536.

Dalle, S., S. Dupire, S. Brunet-Manquat, L. Reslan, A. Plesa, and C. Dumontet. 2009. In vivo model of follicular lymphoma resistant to rituximab. *Clin Cancer Res.* 15:851-857.

Dang, C.V. 2012. MYC on the Path to Cancer. *Cell.* 149:22-35.

Danial, N.N., and S.J. Korsmeyer. 2004. Cell death: critical control points. *Cell.* 116:205-219.

Davis, C.L., B.L. Wood, D.E. Sabath, J.S. Joseph, C. Stehman-Breen, and V.C. Broudy. 1998. Interferon-alpha treatment of posttransplant lymphoproliferative disorder in recipients of solid organ transplants. *Transplantation.* 66:1770-1779.

Dawson, C.W., L. Laverick, M.A. Morris, G. Tramoutanis, and L.S. Young. 2008. Epstein-Barr virus-encoded LMP1 regulates epithelial cell motility and invasion via the ERK-MAPK pathway. *J Virol.* 82:3654-3664.

Dawson, C.W., G. Tramountanis, A.G. Eliopoulos, and L.S. Young. 2003. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. *J Biol Chem.* 278:3694-3704.

de Lange, J., M. Verlaan-de Vries, A.F. Teunisse, and A.G. Jochemsen. 2012. Chk2 mediates RITA-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 19:980-989.

De Strooper, B., W. Annaert, P. Cupers, P. Saftig, K. Craessaerts, J.S. Mumm, E.H. Schroeter, V. Schrijvers, M.S. Wolfe, W.J. Ray, A. Goate, and R. Kopan. 1999. A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature.* 398:518-522.

Del Gaizo Moore, V., J.R. Brown, M. Certo, T.M. Love, C.D. Novina, and A. Letai. 2007. Chronic lymphocytic leukemia requires BCL2 to sequester prodeath BIM, explaining sensitivity to BCL2 antagonist ABT-737. *J Clin Invest.* 117:112-121.

Deng, J., N. Carlson, K. Takeyama, P. Dal Cin, M. Shipp, and A. Letai. 2007. BH3 profiling identifies three distinct classes of apoptotic blocks to predict response to ABT-737 and conventional chemotherapeutic agents. *Cancer Cell.* 12:171-185.

Devergne, O., E. Hatzivassiliou, K.M. Izumi, K.M. Kaye, M.F. Kleijnen, E. Kieff, and G. Mosialos. 1996. Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol.* 16:7098-7108.

Dillner, J., B. Kallin, H. Alexander, I. Ernberg, M. Uno, Y. Ono, G. Klein, and R.A. Lerner. 1986. An Epstein-Barr virus (EBV)-determined nuclear antigen (EBNA5) partly encoded by the transformation-associated Bam WYH region of EBV DNA: preferential expression in lymphoblastoid cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:6641-6645.

Djavaheri-Mergny, M., M.C. Maiuri, and G. Kroemer. 2010. Cross talk between apoptosis and autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1. *Oncogene.* 29:1717-1719.

Djerbi, M., T. Darreh-Shori, B. Zhivotovsky, and A. Grandien. 2001. Characterization of the human FLICE-inhibitory protein locus and comparison of the anti-apoptotic activity of four different flip isoforms. *Scand J Immunol.* 54:180-189.

Dodou, K., R.J. Anderson, W.J. Lough, D.A. Small, M.D. Shelley, and P.W. Groundwater. 2005a. Synthesis of gossypol atropisomers and derivatives and evaluation of their anti-proliferative and anti-oxidant activity. *Bioorg Med Chem.* 13:4228-4237.

Dodou, K., R.J. Anderson, D.A. Small, and P.W. Groundwater. 2005b. Investigations on gossypol: past and present developments. *Expert Opin Investig Drugs.* 14:1419-1434.

Dornan, D., H. Shimizu, N.D. Perkins, and T.R. Hupp. 2003. DNA-dependent acetylation of p53 by the transcription coactivator p300. *J Biol Chem.* 278:13431-13441.

Draoua, H.Y., L. Tsao, D.M. Mancini, L.J. Addonizio, G. Bhagat, and B. Alobeid. 2004. T-cell post-transplantation lymphoproliferative disorders after cardiac transplantation: a single institutional experience. *Br J Haematol.* 127:429-432.

Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li, and X. Wang. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 102:33-42.

Eckelman, B.P., G.S. Salvesen, and F.L. Scott. 2006. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family. *EMBO Rep.* 7:988-994.

Eckhart, L., C. Ballaun, M. Hermann, J.L. VandeBerg, W. Sipos, A. Uthman, H. Fischer, and E. Tschachler. 2008. Identification of novel mammalian caspases reveals an important role of gene loss in shaping the human caspase repertoire. *Mol Biol Evol.* 25:831-841.

Edlich, F., S. Banerjee, M. Suzuki, M.M. Cleland, D. Arnoult, C. Wang, A. Neutzner, N. Tjandra, and R.J. Youle. 2011. Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol. *Cell.* 145:104-116.

Eliopoulos, A.G., and L.S. Young. 1998. Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *Oncogene.* 16:1731-1742.

Eliopoulos, A.G., and L.S. Young. 2001. LMP1 structure and signal transduction. *Semin Cancer Biol.* 11:435-444.

Eliyahu, D., A. Raz, P. Gruss, D. Givol, and M. Oren. 1984. Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. *Nature.* 312:646-649.

Enbom, M., A. Strand, K.I. Falk, and A. Linde. 2001. Detection of Epstein-Barr virus, but not human herpesvirus 8, DNA in cervical secretions from Swedish women by real-time polymerase chain reaction. *Sex Transm Dis.* 28:300-306.

Epstein, M.A., B.G. Achong, and Y.M. Barr. 1964. Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet.* 1:702-703.

Epstein, M.A., and Y.M. Barr. 1964. Cultivation in Vitro of Human Lymphoblasts from Burkitt's Malignant Lymphoma. *Lancet.* 1:252-253.

Erlich, S., L. Mizrachy, O. Segev, L. Lindenboim, O. Zmira, S. Adi-Harel, J.A. Hirsch, R. Stein, and R. Pinkas-Kramarski. 2007. Differential interactions between Beclin 1 and Bcl-2 family members. *Autophagy.* 3:561-568.

Eskelinen, E.L. 2005. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy.* 1:1-10.

Evan, G.I., A.H. Wyllie, C.S. Gilbert, T.D. Littlewood, H. Land, M. Brooks, C.M. Waters, L.Z. Penn, and D.C. Hancock. 1992. Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell.* 69:119-128.

Fadok, V.A., D.R. Voelker, P.A. Campbell, J.J. Cohen, D.L. Bratton, and P.M. Henson. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.* 148:2207-2216.

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.

Fang, S., J.P. Jensen, R.L. Ludwig, K.H. Vousden, and A.M. Weissman. 2000. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem.* 275:8945-8951.

Feederle, R., J. Haar, K. Bernhardt, S.D. Linnstaedt, H. Bannert, H. Lips, B.R. Cullen, and H.J. Delecluse. 2011a. The members of an Epstein-Barr virus microRNA cluster cooperate to transform B lymphocytes. *J Virol.* 85:9801-9810.

Feederle, R., S.D. Linnstaedt, H. Bannert, H. Lips, M. Bencun, B.R. Cullen, and H.J. Delecluse. 2011b. A viral microRNA cluster strongly potentiates the transforming properties of a human herpesvirus. *PLoS Pathog.* 7:e1001294.

Feng, Y., X. Xiao, Z. Zhu, and D.S. Dimitrov. 2010. Identification and characterization of a novel agonistic anti-DR4 human monoclonal antibody. *MAbs.* 2:565-570.

Feng, Z., W. Hu, E. de Stanchina, A.K. Teresky, S. Jin, S. Lowe, and A.J. Levine. 2007. The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res.* 67:3043-3053.

Feng, Z., H. Zhang, A.J. Levine, and S. Jin. 2005. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:8204-8209.

Ferlay, J., P. Autier, M. Boniol, M. Heanue, M. Colombet, and P. Boyle. 2007. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol.* 18:581-592.

Fina, F., S. Romain, L. Ouafik, J. Palmari, F. Ben Ayed, S. Benharkat, P. Bonnier, F. Spyratos, J.A. Foekens, C. Rose, M. Buisson, H. Gerard, M.O. Reymond, J.M. Seigneurin, and P.M. Martin. 2001. Frequency and genome load of Epstein-Barr virus in 509 breast cancers from different geographical areas. *Br J Cancer.* 84:783-790.

Floettmann, J.E., K. Ward, A.B. Rickinson, and M. Rowe. 1996. Cytostatic effect of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 analyzed using tetracycline-regulated expression in B cell lines. *Virology.* 223:29-40.

Foster, B.A., H.A. Coffey, M.J. Morin, and F. Rastinejad. 1999. Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science.* 286:2507-2510.

Fotsop, D.F., F. Roussi, A. Leverrier, A. Breteche, and F. Gueritte. 2010. Biomimetic total synthesis of meiogynin A, an inhibitor of Bcl-xL and Bak interaction. *J Org Chem.* 75:7412-7415.

Frebourg, T. 1997. [Germline mutations of the p53 gene]. *Pathol Biol (Paris).* 45:845-851.

Fujii, T., S. Nomoto, K. Koshikawa, Y. Yatabe, O. Teshigawara, T. Mori, S. Inoue, S. Takeda, and A. Nakao. 2006. Overexpression of pituitary tumor transforming gene 1 in HCC is associated with angiogenesis and poor prognosis. *Hepatology.* 43:1267-1275.

Fulda, S., and D. Vucic. 2012. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 11:109-124.

Fulda, S., W. Wick, M. Weller, and K.M. Debatin. 2002. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nat Med.* 8:808-815.

Gandhi, L., D.R. Camidge, M. Ribeiro de Oliveira, P. Bonomi, D. Gandara, D. Khaira, C.L. Hann, E.M. McKeegan, E. Litvinovich, P.M. Hemken, C. Dive, S.H. Enschede, C. Nolan, Y.L. Chiu, T. Busman, H. Xiong, A.P. Krivoshik, R. Humerickhouse, G.I. Shapiro, and C.M. Rudin. 2011. Phase I study of Navitoclax (ABT-263), a novel Bcl-2 family inhibitor, in patients with small-cell lung cancer and other solid tumors. *J Clin Oncol.* 29:909-916.

Gao, X., A. Zacharek, A. Salkowski, D.J. Grignon, W. Sakr, A.T. Porter, and K.V. Honn. 1995. Loss of heterozygosity of the BRCA1 and other loci on chromosome 17q in human prostate cancer. *Cancer Res.* 55:1002-1005.

Garibal, J., E. Hollville, A.I. Bell, G.L. Kelly, B. Renouf, Y. Kawaguchi, A.B. Rickinson, and J. Wiels. 2007. Truncated form of the Epstein-Barr virus protein EBNA-LP protects against caspase-dependent apoptosis by inhibiting protein phosphatase 2A. *J Virol.* 81:7598-7607.

Gibbs, E., Z. Kelman, J.M. Gulbis, M. O'Donnell, J. Kuriyan, P.M. Burgers, and J. Hurwitz. 1997. The influence of the proliferating cell nuclear antigen-interacting domain of p21(CIP1) on DNA synthesis catalyzed by the human and Saccharomyces cerevisiae polymerase delta holoenzymes. *J Biol Chem*. 272:2373-2381.

Gires, O., U. Zimber-Strobl, R. Gonnella, M. Ueffing, G. Marschall, R. Zeidler, D. Pich, and W. Hammerschmidt. 1997. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J*. 16:6131-6140.

Glaser, S.L., R.F. Ambinder, J.A. DiGiuseppe, P.L. Horn-Ross, and J.L. Hsu. 1998. Absence of Epstein-Barr virus EBER-1 transcripts in an epidemiologically diverse group of breast cancers. *Int J Cancer*. 75:555-558.

Godshall, S.E., and J.T. Kirchner. 2000. Infectious mononucleosis. Complexities of a common syndrome. *Postgrad Med*. 107:175-179, 183-174, 186.

Golstein, P., D.M. Ojcius, and J.D. Young. 1991. Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev*. 121:29-65.

Gorgoulis, V.G., G.Z. Rassidakis, A.M. Karameris, H. Papastamatiou, R. Trigidou, M. Veslemes, A.N. Rassidakis, and C. Kittas. 1996. Immunohistochemical and molecular evaluation of the mdm-2 gene product in bronchogenic carcinoma. *Mod Pathol*. 9:544-554.

Grasberger, B.L., T. Lu, C. Schubert, D.J. Parks, T.E. Carver, H.K. Koblish, M.D. Cummings, L.V. LaFrance, K.L. Milkiewicz, R.R. Calvo, D. Maguire, J. Lattanze, C.F. Franks, S. Zhao, K. Ramachandren, G.R. Bylebyl, M. Zhang, C.L. Manthey, E.C. Petrella, M.W. Pantoliano, I.C. Deckman, J.C. Spurlino, A.C. Maroney, B.E. Tomczuk, C.J. Molloy, and R.F. Bone. 2005. Discovery and cocrystal structure of benzodiazepinedione HDM2 antagonists that activate p53 in cells. *J Med Chem*. 48:909-912.

Gratama, J.W., M.A. Oosterveer, F.E. Zwaan, J. Lepoutre, G. Klein, and I. Ernberg. 1988. Eradication of Epstein-Barr virus by allogeneic bone marrow transplantation: implications for sites of viral latency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85:8693-8696.

Gregory, C.D., M. Rowe, and A.B. Rickinson. 1990. Different Epstein-Barr virus-B cell interactions in phenotypically distinct clones of a Burkitt's lymphoma cell line. *J Gen Virol*. 71 (Pt 7):1481-1495.

Griffin, T.C., S. Weitzman, H. Weinstein, M. Chang, M. Cairo, R. Hutchison, B. Shiramizu, J. Wiley, D. Woods, M. Barnich, and T.G. Gross. 2009. A study of rituximab and ifosfamide, carboplatin, and etoposide chemotherapy in children with recurrent/refractory B-cell (CD20+) non-Hodgkin lymphoma and mature B-cell acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*. 52:177-181.

Grossman, S.R., E. Johannsen, X. Tong, R. Yalamanchili, and E. Kieff. 1994. The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivator is directed to response elements by the J kappa recombination signal binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:7568-7572.

Gu, W., and R.G. Roeder. 1997. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*. 90:595-606.

Guertin, D.A., and D.M. Sabatini. 2009. The pharmacology of mTOR inhibition. *Sci Signal*. 2:pe24.

Gulati, P., L.D. Gaspers, S.G. Dann, M. Joaquin, T. Nobukuni, F. Natt, S.C. Kozma, A.P. Thomas, and G. Thomas. 2008. Amino acids activate mTOR complex 1 via Ca2+/CaM signaling to hVps34. *Cell Metab*. 7:456-465.

Gunven, P., G. Klein, E. Klein, T. Norin, and S. Singh. 1980. Surface immunoglobulins on Burkitt's lymphoma biopsy cells from 91 patients. *Int J Cancer*. 25:711-719.

Gupta, S., F.J. Fricker, R.P. Gonzalez-Peralta, W.B. Slayton, P.M. Schuler, and V.R. Dharnidharka. 2010. Post-transplant lymphoproliferative disorder in children: recent outcomes and response to dual rituximab/low-dose chemotherapy combination. *Pediatr Transplant*. 14:896-902.

Gutensohn, N., and P. Cole. 1981. Childhood social environment and Hodgkin's disease. *N Engl J Med.* 304:135-140.

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.

Hainaut, P., and J. Milner. 1993. A structural role for metal ions in the "wild-type" conformation of the tumor suppressor protein p53. *Cancer Res.* 53:1739-1742.

Han, I., S. Harada, D. Weaver, Y. Xue, W. Lane, S. Orstavik, B. Skalhegg, and E. Kieff. 2001. EBNA-LP associates with cellular proteins including DNA-PK and HA95. *J Virol.* 75:2475-2481.

Hanson, M.N., V.A. Morrison, B.A. Peterson, K.T. Stieglbauer, V.L. Kubic, S.R. McCormick, R.C. McGlennen, J.C. Manivel, R.D. Brunning, and C.E. Litz. 1996. Posttransplant T-cell lymphoproliferative disorders--an aggressive, late complication of solid-organ transplantation. *Blood.* 88:3626-3633.

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.

Harper, J.W., S.J. Elledge, K. Keyomarsi, B. Dynlacht, L.H. Tsai, P. Zhang, S. Dobrowolski, C. Bai, L. Connell-Crowley, E. Swindell, and et al. 1995. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell.* 6:387-400.

Harris, A.W., C.A. Pinkert, M. Crawford, W.Y. Langdon, R.L. Brinster, and J.M. Adams. 1988. The E mu-myc transgenic mouse. A model for high-incidence spontaneous lymphoma and leukemia of early B cells. *J Exp Med.* 167:353-371.

Harris, N.L., E.S. Jaffe, H. Stein, P.M. Banks, J.K. Chan, M.L. Cleary, G. Delsol, C. De Wolf-Peeters, B. Falini, K.C. Gatter, and et al. 1994. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood.* 84:1361-1392.

Harvey, M., M.J. McArthur, C.A. Montgomery, Jr., J.S. Butel, A. Bradley, and L.A. Donehower. 1993. Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nat Genet.* 5:225-229.

Hay, N., and N. Sonenberg. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 18:1926-1945.

Hayward, S.D. 2004. Viral interactions with the Notch pathway. *Semin Cancer Biol.* 14:387-396.

Hebner, C., J. Lasanen, S. Battle, and A. Aiyar. 2003. The spacing between adjacent binding sites in the family of repeats affects the functions of Epstein-Barr nuclear antigen 1 in transcription activation and stable plasmid maintenance. *Virology.* 311:263-274.

Heitman, J., N.R. Movva, and M.N. Hall. 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science.* 253:905-909.

Henderson, S., D. Huen, M. Rowe, C. Dawson, G. Johnson, and A. Rickinson. 1993. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:8479-8483.

Hendy, O.M., D.M. Elghannam, J.A. El-Sharnouby, E.F. Goda, R. El-Ashry, and Y. Al-Tonbary. 2009. Frequency and prognostic significance of murine double minute protein-2 overexpression and p53 gene mutations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematology.* 14:335-340.

Henle, G., and W. Henle. 1976. Epstein-Barr virus-specific IgA serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer.* 17:1-7.

Henle, G., W. Henle, and V. Diehl. 1968. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-ytpe virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 59:94-101.

Henle, W., and G. Henle. 1970. Evidence for a relation of Epstein-Barr virus to Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. *Bibl Haematol*:706-713.

Herbst, R.S., S.G. Eckhardt, R. Kurzrock, S. Ebbinghaus, P.J. O'Dwyer, M.S. Gordon, W. Novotny, M.A. Goldwasser, T.M. Tohnya, B.L. Lum, A. Ashkenazi, A.M. Jubb, and D.S. Mendelson. 2010. Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol.* 28:2839-2846.

Hermeking, H., and D. Eick. 1994. Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science.* 265:2091-2093.

Hermeking, H., C. Lengauer, K. Polyak, T.C. He, L. Zhang, S. Thiagalingam, K.W. Kinzler, and B. Vogelstein. 1997. 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol Cell.* 1:3-11.

Herrero, J.A., P. Mathew, and C.V. Paya. 1995. LMP-1 activates NF-kappa B by targeting the inhibitory molecule I kappa B alpha. *J Virol.* 69:2168-2174.

Hickman, J.A. 1996. Apoptosis and chemotherapy resistance. *Eur J Cancer.* 32A:921-926.

Hitt, M.M., M.J. Allday, T. Hara, L. Karran, M.D. Jones, P. Busson, T. Tursz, I. Ernberg, and B.E. Griffin. 1989. EBV gene expression in an NPC-related tumour. *EMBO J.* 8:2639-2651.

Hjalgrim, H., K.E. Smedby, K. Rostgaard, D. Molin, S. Hamilton-Dutoit, E.T. Chang, E. Ralfkiaer, C. Sundstrom, H.O. Adami, B. Glimelius, and M. Melbye. 2007. Infectious mononucleosis, childhood social environment, and risk of Hodgkin lymphoma. *Cancer Res.* 67:2382-2388.

Hochberg, D., J.M. Middeldorp, M. Catalina, J.L. Sullivan, K. Luzuriaga, 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.

Hocker, B., S. Bohm, H. Fickenscher, U. Kusters, P. Schnitzler, M. Pohl, U. John, M.J. Kemper, H. Fehrenbach, M. Wigger, M. Holder, M. Schroder, R. Feneberg, S. Kopf-Shakib, and B. Tonshoff. 2012. (Val-)Ganciclovir prophylaxis reduces Epstein-Barr virus primary infection in pediatric renal transplantation. *Transpl Int.*

Holley-Guthrie, E.A., E.B. Quinlivan, E.C. Mar, and S. Kenney. 1990. The Epstein-Barr virus (EBV) BMRF1 promoter for early antigen (EA-D) is regulated by the EBV transactivators, BRLF1 and BZLF1, in a cell-specific manner. *J Virol.* 64:3753-3759.

Hori, T., T. Kondo, M. Kanamori, Y. Tabuchi, R. Ogawa, Q.L. Zhao, K. Ahmed, T. Yasuda, S. Seki, K. Suzuki, and T. Kimura. 2010. Nutlin-3 enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis through up-regulation of death receptor 5 (DR5) in human sarcoma HOS cells and human colon cancer HCT116 cells. *Cancer Lett.* 287:98-108.

Hotte, S.J., H.W. Hirte, E.X. Chen, L.L. Siu, L.H. Le, A. Corey, A. Iacobucci, M. MacLean, L. Lo, N.L. Fox, and A.M. Oza. 2008. A phase 1 study of mapatumumab (fully human monoclonal antibody to TRAIL-R1) in patients with advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res.* 14:3450-3455.

Hou, W., J. Han, C. Lu, L.A. Goldstein, and H. Rabinowich. 2010. Autophagic degradation of active caspase-8: a crosstalk mechanism between autophagy and apoptosis. *Autophagy.* 6:891-900.

Hoyer-Hansen, M., L. Bastholm, I.S. Mathiasen, F. Elling, and M. Jaattela. 2005. Vitamin D analog EB1089 triggers dramatic lysosomal changes and Beclin 1-mediated autophagic cell death. *Cell Death Differ.* 12:1297-1309.

Hsu, H.S., H.W. Chen, C.L. Kao, M.L. Wu, A.F. Li, and T.H. Cheng. 2011. MDM2 is overexpressed and regulated by the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in human squamous cell carcinoma of esophagus. *Ann Surg Oncol.* 18:1469-1477.

Huang, J., and B.D. Manning. 2009. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans.* 37:217-222.

Huang, Q., A.M. Petros, H.W. Virgin, S.W. Fesik, and E.T. Olejniczak. 2003. Solution structure of the BHRF1 protein from Epstein-Barr virus, a homolog of human Bcl-2. *J Mol Biol.* 332:1123-1130.

Hummel, M., and E. Kieff. 1982. Mapping of polypeptides encoded by the Epstein-Barr virus genome in productive infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:5698-5702.

Hutchinson, L. 2010. Hematology: Rituximab improves survival for solid organ transplant recipients with PTLD. *Nat Rev Clin Oncol.* 7:240.

Hwang, J.J., H.N. Kim, J. Kim, D.H. Cho, M.J. Kim, Y.S. Kim, Y. Kim, S.J. Park, and J.Y. Koh. 2010. Zinc(II) ion mediates tamoxifen-induced autophagy and cell death in MCF-7 breast cancer cell line. *Biometals.* 23:997-1013.

Iademarco, M.F., J.J. McQuillan, G.D. Rosen, and D.C. Dean. 1992. Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J Biol Chem.* 267:16323-16329.

Inoki, K., T. Zhu, and K.L. Guan. 2003. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell.* 115:577-590.

Irmler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J.L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L.E. French, and J. Tschopp. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature.* 388:190-195.

Ito, T., X. Deng, B. Carr, and W.S. May. 1997. Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. *J Biol Chem.* 272:11671-11673.

Iwanaga, R., E. Ozono, J. Fujisawa, M.A. Ikeda, N. Okamura, Y. Huang, and K. Ohtani. 2008. Activation of the cyclin D2 and cdk6 genes through NF-kappaB is critical for cell-cycle progression induced by HTLV-I Tax. *Oncogene.* 27:5635-5642.

Izumi, K.M., and E.D. Kieff. 1997. The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:12592-12597.

Jaffe, E.S., J.K. Chan, I.J. Su, G. Frizzera, S. Mori, A.C. Feller, and F.C. Ho. 1996. Report of the Workshop on Nasal and Related Extranodal Angiocentric T/Natural Killer Cell Lymphomas. Definitions, differential diagnosis, and epidemiology. *Am J Surg Pathol.* 20:103-111.

Janssens, S., and A. Tinel. 2012. The PIDDosome, DNA-damage-induced apoptosis and beyond. *Cell Death Differ.* 19:13-20.

Janus, F., N. Albrechtsen, U. Knippschild, L. Wiesmuller, F. Grosse, and W. Deppert. 1999. Different regulation of the p53 core domain activities 3'-to-5' exonuclease and sequence-specific DNA binding. *Mol Cell Biol.* 19:2155-2168.

Jarrett, R.F., and J. MacKenzie. 1999. Epstein-Barr virus and other candidate viruses in the pathogenesis of Hodgkin's disease. *Semin Hematol.* 36:260-269.

Javelaud, D., and F. Besancon. 2002. Inactivation of p21WAF1 sensitizes cells to apoptosis via an increase of both p14ARF and p53 levels and an alteration of the Bax/Bcl-2 ratio. *J Biol Chem.* 277:37949-37954.

Jeannel, D., A. Hubert, F. de Vathaire, R. Ellouz, M. Camoun, M. Ben Salem, H. Sancho-Garnier, and G. de-The. 1990. Diet, living conditions and nasopharyngeal carcinoma in Tunisia--a case-control study. *Int J Cancer.* 46:421-425.

Jiang, X., and X. Wang. 2000. Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem.* 275:31199-31203.

Joab, I., D.T. Rowe, M. Bodescot, J.C. Nicolas, P.J. Farrell, and M. Perricaudet. 1987. Mapping of the gene coding for Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen EBNA3 and its transient overexpression in a human cell line by using an adenovirus expression vector. *J Virol.* 61:3340-3344.

Johannsen, E., M. Luftig, M.R. Chase, S. Weicksel, E. Cahir-McFarland, D. Illanes, D. Sarracino, and E. Kieff. 2004. Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:16286-16291.

Johannsen, E., C.L. Miller, S.R. Grossman, and E. Kieff. 1996. EBNA-2 and EBNA-3C extensively and mutually exclusively associate with RBPJkappa in Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes. *J Virol*. 70:4179-4183.

Johnson, L.R., M.A. Nalesnik, and S.H. Swerdlow. 2006. Impact of Epstein-Barr virus in monomorphic B-cell posttransplant lymphoproliferative disorders: a histogenetic study. *Am J Surg Pathol*. 30:1604-1612.

Juhasz, G., G. Csikos, R. Sinka, M. Erdelyi, and M. Sass. 2003. The Drosophila homolog of Aut1 is essential for autophagy and development. *FEBS Lett*. 543:154-158.

Julien, L.A., and P.P. Roux. 2010. [mTOR, the mammalian target of rapamycin]. *Med Sci (Paris)*. 26:1056-1060.

Junker, A.K., E.E. Thomas, A. Radcliffe, R.B. Forsyth, A.G. Davidson, and L. Rymo. 1991. Epstein-Barr virus shedding in breast milk. *Am J Med Sci*. 302:220-223.

Kaiser, C., G. Laux, D. Eick, N. Jochner, G.W. Bornkamm, and B. Kempkes. 1999. The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol*. 73:4481-4484.

Kamada, Y., T. Funakoshi, T. Shintani, K. Nagano, M. Ohsumi, and Y. Ohsumi. 2000. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol*. 150:1507-1513.

Kanegane, H., A. Yachie, T. Miyawaki, and G. Tosato. 1998. EBV-NK cells interactions and lymphoproliferative disorders. *Leuk Lymphoma*. 29:491-498.

Kang, S.S., S.S. Woo, J. Im, J.S. Yang, C.H. Yun, H.R. Ju, C.G. Son, E.Y. Moon, and S.H. Han. 2007. Human placenta promotes IL-8 expression through activation of JNK/SAPK and transcription factors NF-kappaB and AP-1 in PMA-differentiated THP-1 cells. *Int Immunopharmacol*. 7:1488-1495.

Kang, Z., J.J. Chen, Y. Yu, B. Li, S.Y. Sun, B. Zhang, and L. Cao. 2011. Drozitumab, a human antibody to death receptor 5, has potent antitumor activity against rhabdomyosarcoma with the expression of caspase-8 predictive of response. *Clin Cancer Res*. 17:3181-3192.

Kanzler, H., R. Kuppers, M.L. Hansmann, and K. Rajewsky. 1996. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med*. 184:1495-1505.

Karajannis, M.A., M. Hummel, I. Anagnostopoulos, and H. Stein. 1997. Strict lymphotropism of Epstein-Barr virus during acute infectious mononucleosis in nonimmunocompromised individuals. *Blood*. 89:2856-2862.

Karin, M., and Y. Ben-Neriah. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*. 18:621-663.

Kashuba, E., K. Mattsson, K. Pokrovskaja, C. Kiss, M. Protopopova, B. Ehlin-Henriksson, G. Klein, and L. Szekely. 2003. EBV-encoded EBNA-5 associates with P14ARF in extranucleolar inclusions and prolongs the survival of P14ARF-expressing cells. *Int J Cancer*. 105:644-653.

Kaushik, S., and A.M. Cuervo. 2008. Chaperone-mediated autophagy. *Methods Mol Biol*. 445:227-244.

Kawaguchi, Y., K. Nakajima, M. Igarashi, T. Morita, M. Tanaka, M. Suzuki, A. Yokoyama, G. Matsuda, K. Kato, M. Kanamori, and K. Hirai. 2000. Interaction of Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein (EBNA-LP) with HS1-associated protein X-1: implication of cytoplasmic function of EBNA-LP. *J Virol*. 74:10104-10111.

Kelly, G., A. Bell, and A. Rickinson. 2002. Epstein-Barr virus-associated Burkitt lymphomagenesis selects for downregulation of the nuclear antigen EBNA2. *Nat Med*. 8:1098-1104.

Kelly, G.L., H.M. Long, J. Stylianou, W.A. Thomas, A. Leese, A.I. Bell, G.W. Bornkamm, J. Mautner, A.B. Rickinson, and M. Rowe. 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.

Kelly, G.L., A.E. Milner, G.S. Baldwin, A.I. Bell, and A.B. Rickinson. 2006. Three restricted forms of Epstein-Barr virus latency counteracting apoptosis in c-myc-expressing Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:14935-14940.

Kelly, G.L., A.E. Milner, R.J. Tierney, D.S. Croom-Carter, M. Altmann, W. Hammerschmidt, A.I. Bell, and A.B. Rickinson. 2005. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) gene deletion is consistently linked with EBNA3A, -3B, and -3C expression in Burkitt's lymphoma cells and with increased resistance to apoptosis. *J Virol.* 79:10709-10717.

Kelly, G.L., and A.B. Rickinson. 2007. Burkitt lymphoma: revisiting the pathogenesis of a virus-associated malignancy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*:277-284.

Kennedy, G., J. Komano, and B. Sugden. 2003. Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:14269-14274.

Kerr, J.F. 2002. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology.* 181-182:471-474.

Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26:239-257.

Keuling, A.M., K.E. Felton, A.A. Parker, M. Akbari, S.E. Andrew, and V.A. Tron. 2009. RNA silencing of Mcl-1 enhances ABT-737-mediated apoptosis in melanoma: role for a caspase-8-dependent pathway. *PLoS One.* 4:e6651.

Kim, K.W., L. Moretti, L.R. Mitchell, D.K. Jung, and B. Lu. 2010. Endoplasmic reticulum stress mediates radiation-induced autophagy by perk-eIF2alpha in caspase-3/7-deficient cells. *Oncogene.* 29:3241-3251.

Kim, W.Y., and N.E. Sharpless. 2006. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell.* 127:265-275.

Kimura, N., C. Tokunaga, S. Dalal, C. Richardson, K. Yoshino, K. Hara, B.E. Kemp, L.A. Witters, O. Mimura, and K. Yonezawa. 2003. A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. *Genes Cells.* 8:65-79.

Kis, L.L., M. Takahara, N. Nagy, G. Klein, and E. Klein. 2006. IL-10 can induce the expression of EBV-encoded latent membrane protein-1 (LMP-1) in the absence of EBNA-2 in B lymphocytes and in Burkitt lymphoma- and NK lymphoma-derived cell lines. *Blood.* 107:2928-2935.

Kischkel, F.C., S. Hellbardt, I. Behrmann, M. Germer, M. Pawlita, P.H. Krammer, and M.E. Peter. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J.* 14:5579-5588.

Klein, E., G. Klein, J.S. Nadkarni, J.J. Nadkarni, H. Wigzell, and P. Clifford. 1968. Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines. *Cancer Res.* 28:1300-1310.

Klein, G., B.C. Giovanella, T. Lindahl, P.J. Fialkow, S. Singh, and J.S. Stehlin. 1974. Direct evidence for the presence of Epstein-Barr virus DNA and nuclear antigen in malignant epithelial cells from patients with poorly differentiated carcinoma of the nasopharynx. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 71:4737-4741.

Klein, G., E. Svedmyr, M. Jondal, and P.O. Persson. 1976. EBV-determined nuclear antigen (EBNA)-positive cells in the peripheral blood of infectious mononucleosis patients. *Int J Cancer.* 17:21-26.

Kluck, R.M., E. Bossy-Wetzel, D.R. Green, and D.D. Newmeyer. 1997. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 275:1132-1136.

Knight, J.S., K. Lan, C. Subramanian, and E.S. Robertson. 2003. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C recruits histone deacetylase activity and associates with the corepressors mSin3A and NCoR in human B-cell lines. *J Virol.* 77:4261-4272.

Knight, J.S., and E.S. Robertson. 2004. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C regulates cyclin A/p27 complexes and enhances cyclin A-dependent kinase activity. *J Virol.* 78:1981-1991.

Knight, J.S., N. Sharma, D.E. Kalman, and E.S. Robertson. 2004. A cyclin-binding motif within the amino-terminal homology domain of EBNA3C binds cyclin A and modulates cyclin A-dependent kinase activity in Epstein-Barr virus-infected cells. *J Virol.* 78:12857-12867.

Knight, J.S., N. Sharma, and E.S. Robertson. 2005a. Epstein-Barr virus latent antigen 3C can mediate the degradation of the retinoblastoma protein through an SCF cellular ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:18562-18566.

Knight, J.S., N. Sharma, and E.S. Robertson. 2005b. SCFSkp2 complex targeted by Epstein-Barr virus essential nuclear antigen. *Mol Cell Biol.* 25:1749-1763.

Knowles, D.M., E. Cesarman, A. Chadburn, G. Frizzera, J. Chen, E.A. Rose, and R.E. Michler. 1995. Correlative morphologic and molecular genetic analysis demonstrates three distinct categories of posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Blood.* 85:552-565.

Kobayashi, R., H. Takeuchi, M. Sasaki, M. Hasegawa, and K. Hirai. 1998. Detection of Epstein-Barr virus infection in the epithelial cells and lymphocytes of non-neoplastic tonsils by in situ hybridization and in situ PCR. *Arch Virol.* 143:803-813.

Koblish, H.K., S. Zhao, C.F. Franks, R.R. Donatelli, R.M. Tominovich, L.V. LaFrance, K.A. Leonard, J.M. Gushue, D.J. Parks, R.R. Calvo, K.L. Milkiewicz, J.J. Marugan, P. Raboisson, M.D. Cummings, B.L. Grasberger, D.L. Johnson, T. Lu, C.J. Molloy, and A.C. Maroney. 2006. Benzodiazepinedione inhibitors of the Hdm2:p53 complex suppress human tumor cell proliferation in vitro and sensitize tumors to doxorubicin in vivo. *Mol Cancer Ther.* 5:160-169.

Kojima, K., J.K. Burks, J. Arts, and M. Andreeff. 2010. The novel tryptamine derivative JNJ-26854165 induces wild-type p53- and E2F1-mediated apoptosis in acute myeloid and lymphoid leukemias. *Mol Cancer Ther.* 9:2545-2557.

Komiya, K., T. Uchida, T. Ueno, M. Koike, H. Abe, T. Hirose, R. Kawamori, Y. Uchiyama, E. Kominami, Y. Fujitani, and H. Watada. 2010. Free fatty acids stimulate autophagy in pancreatic beta-cells via JNK pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 401:561-567.

Konopleva, M., J. Watt, R. Contractor, T. Tsao, D. Harris, Z. Estrov, W. Bornmann, H. Kantarjian, J. Viallet, I. Samudio, and M. Andreeff. 2008. Mechanisms of antileukemic activity of the novel Bcl-2 homology domain-3 mimetic GX15-070 (obatoclax). *Cancer Res.* 68:3413-3420.

Kress, M., E. May, R. Cassingena, and P. May. 1979. Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol.* 31:472-483.

Krikos, A., C.D. Laherty, and V.M. Dixit. 1992. Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements. *J Biol Chem.* 267:17971-17976.

Kroemer, G., and M. Jaattela. 2005. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer.* 5:886-897.

Ku, B., J.S. Woo, C. Liang, K.H. Lee, H.S. Hong, X. E, K.S. Kim, J.U. Jung, and B.H. Oh. 2008. Structural and biochemical bases for the inhibition of autophagy and apoptosis by viral BCL-2 of murine gamma-herpesvirus 68. *PLoS Pathog.* 4:e25.

Kulwichit, W., R.H. Edwards, E.M. Davenport, J.F. Baskar, V. Godfrey, and N. Raab-Traub. 1998. Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:11963-11968.

Kume, T., K. Oshima, T. Shinohara, H. Takeo, Y. Yamashita, T. Shirakusa, and M. Kikuchi. 1999. Low rate of apoptosis and overexpression of bcl-2 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Histopathology*. 34:502-509.

Kuppers, D.A., K. Lan, J.S. Knight, and E.S. Robertson. 2005. Regulation of matrix metalloproteinase 9 expression by Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and the suppressor of metastasis Nm23-H1. *J Virol*. 79:9714-9724.

Kurth, J., T. Spieker, J. Wustrow, G.J. Strickler, L.M. Hansmann, K. Rajewsky, and R. Kuppers. 2000. EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: viral strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency. *Immunity*. 13:485-495.

Kusano, S., and N. Raab-Traub. 2001. An Epstein-Barr virus protein interacts with Notch. *J Virol*. 75:384-395.

Kussie, P.H., S. Gorina, V. Marechal, B. Elenbaas, J. Moreau, A.J. Levine, and N.P. Pavletich. 1996. Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. *Science*. 274:948-953.

Labi, V., F. Grespi, F. Baumgartner, and A. Villunger. 2008. Targeting the Bcl-2-regulated apoptosis pathway by BH3 mimetics: a breakthrough in anticancer therapy? *Cell Death Differ*. 15:977-987.

Labrecque, L.G., D.M. Barnes, I.S. Fentiman, and B.E. Griffin. 1995. Epstein-Barr virus in epithelial cell tumors: a breast cancer study. *Cancer Res*. 55:39-45.

LaCasse, E.C., G.G. Cherton-Horvat, K.E. Hewitt, L.J. Jerome, S.J. Morris, E.R. Kandimalla, D. Yu, H. Wang, W. Wang, R. Zhang, S. Agrawal, J.W. Gillard, and J.P. Durkin. 2006. Preclinical characterization of AEG35156/GEM 640, a second-generation antisense oligonucleotide targeting X-linked inhibitor of apoptosis. *Clin Cancer Res*. 12:5231-5241.

Laherty, C.D., H.M. Hu, A.W. Opipari, F. Wang, and V.M. Dixit. 1992. The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J Biol Chem*. 267:24157-24160.

Lai, Z., T. Yang, Y.B. Kim, T.M. Sielecki, M.A. Diamond, P. Strack, M. Rolfe, M. Caligiuri, P.A. Benfield, K.R. Auger, and R.A. Copeland. 2002. Differentiation of Hdm2-mediated p53 ubiquitination and Hdm2 autoubiquitination activity by small molecular weight inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:14734-14739.

Lambert, P.F., F. Kashanchi, M.F. Radonovich, R. Shiekhattar, and J.N. Brady. 1998. Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP. *J Biol Chem*. 273:33048-33053.

Lambert, S.L., and O.M. Martinez. 2007. Latent membrane protein 1 of EBV activates phosphatidylinositol 3-kinase to induce production of IL-10. *J Immunol*. 179:8225-8234.

Landry, Y., and J.P. Gies. 2008. Drugs and their molecular targets: an updated overview. *Fundam Clin Pharmacol*. 22:1-18.

Lane, D.P. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 358:15-16.

Lane, D.P., and L.V. Crawford. 1979. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. 278:261-263.

Laouamri, S., M. Hamdi-Cherif, N. Sekfali, L. Mokhtari, and R. Kharchi. 2001. [Dietary risk factors of nasopharyngeal carcinoma in the Setif area in Algeria]. *Rev Epidemiol Sante Publique*. 49:145-156.

Laux, G., M. Perricaudet, and P.J. Farrell. 1988. A spliced Epstein-Barr virus gene expressed in immortalized lymphocytes is created by circularization of the linear viral genome. *EMBO J*. 7:769-774.

Lavrik, I., A. Golks, and P.H. Krammer. 2005. Death receptor signaling. *J Cell Sci*. 118:265-267.

Le Clorennec, C., T.S. Ouk, I. Youlyouz-Marfak, S. Panteix, C.C. Martin, J. Rastelli, E. Adriaenssens, U. Zimber-Strobl, J. Coll, J. Feuillard, and C. Jayat-Vignoles. 2008. Molecular basis of cytotoxicity of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 (LMP1) in EBV latency III B cells: LMP1 induces type II ligand-independent autoactivation of CD95/Fas with caspase 8-mediated apoptosis. *J Virol.* 82:6721-6733.

Leblond, V., F. Davi, F. Charlotte, R. Dorent, M.O. Bitker, L. Sutton, I. Gandjbakhch, J.L. Binet, and M. Raphael. 1998. Posttransplant lymphoproliferative disorders not associated with Epstein-Barr virus: a distinct entity? *J Clin Oncol.* 16:2052-2059.

Lee, B.S., S.U. Kang, H.S. Hwang, Y.S. Kim, E.S. Sung, Y.S. Shin, Y.C. Lim, and C.H. Kim. 2012. An agonistic antibody to human death receptor 4 induces apoptotic cell death in head and neck cancer cells through mitochondrial ROS generation. *Cancer Lett.*

Lee, D.Y., and B. Sugden. 2008. The latent membrane protein 1 oncogene modifies B-cell physiology by regulating autophagy. *Oncogene.* 27:2833-2842.

Lee, J.S., Q. Li, J.Y. Lee, S.H. Lee, J.H. Jeong, H.R. Lee, H. Chang, F.C. Zhou, S.J. Gao, C. Liang, and J.U. Jung. 2009. FLIP-mediated autophagy regulation in cell death control. *Nat Cell Biol.* 11:1355-1362.

Lee, M.H., S.W. Lee, E.J. Lee, S.J. Choi, S.S. Chung, J.I. Lee, J.M. Cho, J.H. Seol, S.H. Baek, K.I. Kim, T. Chiba, K. Tanaka, O.S. Bang, and C.H. Chung. 2006. SUMO-specific protease SUSP4 positively regulates p53 by promoting Mdm2 self-ubiquitination. *Nat Cell Biol.* 8:1424-1431.

Lee, S., B. Elenbaas, A. Levine, and J. Griffith. 1995. p53 and its 14 kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell.* 81:1013-1020.

Lei, K., and R.J. Davis. 2003. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:2432-2437.

Leight, E.R., and B. Sugden. 2000. EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Rev Med Virol.* 10:83-100.

Leist, M., B. Single, A.F. Castoldi, S. Kuhnle, and P. Nicotera. 1997. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med.* 185:1481-1486.

Letai, A. 2009. Puma strikes Bax. *J Cell Biol.* 185:189-191.

Levine, A.J. 1989. The p53 tumor suppressor gene and gene product. *Princess Takamatsu Symp.* 20:221-230.

Levine, B. 2007. Cell biology: autophagy and cancer. *Nature.* 446:745-747.

Levine, B., and D.J. Klionsky. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell.* 6:463-477.

Levitskaya, J., A. Sharipo, A. Leonchiks, A. Ciechanover, and M.G. Masucci. 1997. Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:12616-12621.

Li, J., J. Viallet, and E.B. Haura. 2008a. A small molecule pan-Bcl-2 family inhibitor, GX15-070, induces apoptosis and enhances cisplatin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 61:525-534.

Li, M., C.L. Brooks, F. Wu-Baer, D. Chen, R. Baer, and W. Gu. 2003. Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science.* 302:1972-1975.

Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S.M. Srinivasula, M. Ahmad, E.S. Alnemri, and X. Wang. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 91:479-489.

Li, X., and P. Coffino. 1996. High-risk human papillomavirus E6 protein has two distinct binding sites within p53, of which only one determines degradation. *J Virol.* 70:4509-4516.

Li, Y.H., F.H. Wang, W.Q. Jiang, X.J. Xiang, Y.M. Deng, G.Q. Hu, D.M. Xu, Y. Chen, Q. Lin, and Y.J. He. 2008b. Phase II study of capecitabine and cisplatin combination as first-line chemotherapy in Chinese patients with metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 62:539-544.

Liang, X.H., S. Jackson, M. Seaman, K. Brown, B. Kempkes, H. Hibshoosh, and B. Levine. 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature.* 402:672-676.

Liang, X.H., J. Yu, K. Brown, and B. Levine. 2001. Beclin 1 contains a leucine-rich nuclear export signal that is required for its autophagy and tumor suppressor function. *Cancer Res.* 61:3443-3449.

Lindstrom, M.S., C. Deisenroth, and Y. Zhang. 2007. Putting a finger on growth surveillance: insight into MDM2 zinc finger-ribosomal protein interactions. *Cell Cycle.* 6:434-437.

Ling, P.D., R.S. Peng, A. Nakajima, J.H. Yu, J. Tan, S.M. Moses, W.H. Yang, B. Zhao, E. Kieff, K.D. Bloch, and D.B. Bloch. 2005. Mediation of Epstein-Barr virus EBNA-LP transcriptional coactivation by Sp100. *EMBO J.* 24:3565-3575.

Ling, P.D., J. Tan, and R. Peng. 2009. Nuclear-cytoplasmic shuttling is not required for the Epstein-Barr virus EBNA-LP transcriptional coactivation function. *J Virol.* 83:7109-7116.

Linzer, D.I., and A.J. Levine. 1979. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell.* 17:43-52.

Litaudon, M., H. Bousserouel, K. Awang, O. Nosjean, M.T. Martin, M.E. Dau, H.A. Hadi, J.A. Boutin, T. Sevenet, and F. Gueritte. 2009a. A Dimeric sesquiterpenoid from a Malaysian Meiogyne as a new inhibitor of Bcl-xL/BakBH3 domain peptide interaction. *J Nat Prod.* 72:480-483.

Litaudon, M., C. Jolly, C. Le Callonec, D.D. Cuong, P. Retailleau, O. Nosjean, V.H. Nguyen, B. Pfeiffer, J.A. Boutin, and F. Gueritte. 2009b. Cytotoxic pentacyclic triterpenoids from Combretum sundaicum and Lantana camara as inhibitors of Bcl-xL/BakBH3 domain peptide interaction. *J Nat Prod.* 72:1314-1320.

Livesey, K.M., D. Tang, H.J. Zeh, and M.T. Lotze. 2009. Autophagy inhibition in combination cancer treatment. *Curr Opin Investig Drugs.* 10:1269-1279.

Lo, A.K., K.F. To, K.W. Lo, R.W. Lung, J.W. Hui, G. Liao, and S.D. Hayward. 2007. Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:16164-16169.

Loegering, D.A., S. Ruchaud, W.C. Earnshaw, and S.H. Kaufmann. 2006. Evaluation of the role of caspase-6 in anticancer drug-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 13:346-347.

Lohrum, M.A., M. Ashcroft, M.H. Kubbutat, and K.H. Vousden. 2000a. Contribution of two independent MDM2-binding domains in p14(ARF) to p53 stabilization. *Curr Biol.* 10:539-542.

Lohrum, M.A., M. Ashcroft, M.H. Kubbutat, and K.H. Vousden. 2000b. Identification of a cryptic nucleolar-localization signal in MDM2. *Nat Cell Biol.* 2:179-181.

Longnecker, R., B. Druker, T.M. Roberts, and E. Kieff. 1991. An Epstein-Barr virus protein associated with cell growth transformation interacts with a tyrosine kinase. *J Virol.* 65:3681-3692.

Longnecker, R., and E. Kieff. 1990. A second Epstein-Barr virus membrane protein (LMP2) is expressed in latent infection and colocalizes with LMP1. *J Virol.* 64:2319-2326.

Loomis, R., R. Carbone, M. Reiss, and J. Lacy. 2003. Bcl-2 antisense (G3139, Genasense) enhances the in vitro and in vivo response of Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease to rituximab. *Clin Cancer Res.* 9:1931-1939.

Lopez-Girona, A., B. Furnari, O. Mondesert, and P. Russell. 1999. Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature.* 397:172-175.

Lorin, S., A. Borges, L. Ribeiro Dos Santos, S. Souquere, G. Pierron, K.M. Ryan, P. Codogno, and M. Djavaheri-Mergny. 2009. c-Jun NH2-terminal kinase activation is essential for DRAM-dependent induction of autophagy and apoptosis in 2-methoxyestradiol-treated Ewing sarcoma cells. *Cancer Res.* 69:6924-6931.

Lorin, S., P. Codogno, and M. Djavaheri-Mergny. 2008. [Autophagy: a new concept in cancer research]. *Bull Cancer.* 95:43-50.

Lu, J., M. Murakami, S.C. Verma, Q. Cai, S. Haldar, R. Kaul, M.A. Wasik, J. Middeldorp, and E.S. Robertson. 2011. Epstein-Barr Virus nuclear antigen 1 (EBNA1) confers resistance to apoptosis in EBV-positive B-lymphoma cells through up-regulation of survivin. *Virology.* 410:64-75.

Luftig, M., T. Yasui, V. Soni, M.S. Kang, N. Jacobson, E. Cahir-McFarland, B. Seed, and E. Kieff. 2004. Epstein-Barr virus latent infection membrane protein 1 TRAF-binding site induces NIK/IKK alpha-dependent noncanonical NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:141-146.

Luka, J., B. Kallin, and G. Klein. 1979. Induction of the Epstein-Barr virus (EBV) cycle in latently infected cells by n-butyrate. *Virology.* 94:228-231.

Lung, R.W., J.H. Tong, Y.M. Sung, P.S. Leung, D.C. Ng, S.L. Chau, A.W. Chan, E.K. Ng, K.W. Lo, and K.F. To. 2009. Modulation of LMP2A expression by a newly identified Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART22. *Neoplasia.* 11:1174-1184.

Luqmani, Y., and S. Shousha. 1995. Presence of epstein-barr-virus in breast-carcinoma. *Int J Oncol.* 6:899-903.

Ma, B.B., E.P. Hui, S.C. Wong, S.Y. Tung, K.K. Yuen, A. King, S.L. Chan, S.F. Leung, M.K. Kam, B.K. Yu, B. Zee, and A.T. Chan. 2009. Multicenter phase II study of gemcitabine and oxaliplatin in advanced nasopharyngeal carcinoma--correlation with excision repair cross-complementing-1 polymorphisms. *Ann Oncol.* 20:1854-1859.

Ma, T., S. Yamada, S.J. Ichwan, S. Iseki, K. Ohtani, M. Otsu, and M.A. Ikeda. 2012. Inability of p53-reactivating compounds Nutlin-3 and RITA to overcome p53 resistance in tumor cells deficient in p53Ser46 phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun.* 417:931-937.

Ma, X.M., and J. Blenis. 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:307-318.

Magrath, I. 1990. The pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Adv Cancer Res.* 55:133-270.

Mahalingam, D., E. Szegezdi, M. Keane, S. de Jong, and A. Samali. 2009. TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL? *Cancer Treat Rev.* 35:280-288.

Mainou, B.A., D.N. Everly, Jr., and N. Raab-Traub. 2005. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 CTAR1 mediates rodent and human fibroblast transformation through activation of PI3K. *Oncogene.* 24:6917-6924.

Mainou, B.A., D.N. Everly, Jr., and N. Raab-Traub. 2007. Unique signaling properties of CTAR1 in LMP1-mediated transformation. *J Virol.* 81:9680-9692.

Malicdan, M.C., S. Noguchi, I. Nonaka, P. Saftig, and I. Nishino. 2008. Lysosomal myopathies: an excessive build-up in autophagosomes is too much to handle. *Neuromuscul Disord.* 18:521-529.

Malik, S.A., I. Orhon, E. Morselli, A. Criollo, S. Shen, G. Marino, A. BenYounes, P. Benit, P. Rustin, M.C. Maiuri, and G. Kroemer. 2011. BH3 mimetics activate multiple pro-autophagic pathways. *Oncogene.* 30:3918-3929.

Mannick, J.B., J.I. Cohen, M. Birkenbach, A. Marchini, and E. Kieff. 1991. The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation. *J Virol.* 65:6826-6837.

Manzl, C., G. Krumschnabel, F. Bock, B. Sohm, V. Labi, F. Baumgartner, E. Logette, J. Tschopp, and A. Villunger. 2009. Caspase-2 activation in the absence of PIDDosome formation. *J Cell Biol.* 185:291-303.

Marchetti, P., M. Castedo, S.A. Susin, N. Zamzami, T. Hirsch, A. Macho, A. Haeffner, F. Hirsch, M. Geuskens, and G. Kroemer. 1996. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med.* 184:1155-1160.

Marsters, S.A., J.P. Sheridan, R.M. Pitti, A. Huang, M. Skubatch, D. Baldwin, J. Yuan, A. Gurney, A.D. Goddard, P. Godowski, and A. Ashkenazi. 1997. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Curr Biol.* 7:1003-1006.

Martin, S.J., and D.R. Green. 1995. Apoptosis and cancer: the failure of controls on cell death and cell survival. *Crit Rev Oncol Hematol.* 18:137-153.

Mason, K.D., C.J. Vandenberg, C.L. Scott, A.H. Wei, S. Cory, D.C. Huang, and A.W. Roberts. 2008. In vivo efficacy of the Bcl-2 antagonist ABT-737 against aggressive Myc-driven lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:17961-17966.

Mathew, R., V. Karantza-Wadsworth, and E. White. 2009. Assessing metabolic stress and autophagy status in epithelial tumors. *Methods Enzymol.* 453:53-81.

Matsuda, G., K. Nakajima, Y. Kawaguchi, Y. Yamanashi, and K. Hirai. 2003. Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen leader protein (EBNA-LP) forms complexes with a cellular anti-apoptosis protein Bcl-2 or its EBV counterpart BHRF1 through HS1-associated protein X-1. *Microbiol Immunol.* 47:91-99.

Matsuda, K., K. Yoshida, Y. Taya, K. Nakamura, Y. Nakamura, and H. Arakawa. 2002. p53AIP1 regulates the mitochondrial apoptotic pathway. *Cancer Res.* 62:2883-2889.

Mavromatis, B.H., and B.D. Cheson. 2004. Novel therapies for chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev.* 18:137-148.

McCann, A.H., A. Kirley, D.N. Carney, N. Corbally, H.M. Magee, G. Keating, and P.A. Dervan. 1995. Amplification of the MDM2 gene in human breast cancer and its association with MDM2 and p53 protein status. *Br J Cancer.* 71:981-985.

McKay, B.C., C. Becerril, and M. Ljungman. 2001. P53 plays a protective role against UV- and cisplatin-induced apoptosis in transcription-coupled repair proficient fibroblasts. *Oncogene.* 20:6805-6808.

McShane, M.P., M.M. Mullen, K.M. Haan, T.S. Jardetzky, and R. Longnecker. 2003. Mutational analysis of the HLA class II interaction with Epstein-Barr virus glycoprotein 42. *J Virol.* 77:7655-7662.

Melchior, F., and L. Hengst. 2002. SUMO-1 and p53. *Cell Cycle.* 1:245-249.

Merchant, M., R. Swart, R.B. Katzman, M. Ikeda, A. Ikeda, R. Longnecker, M.L. Dykstra, and S.K. Pierce. 2001. The effects of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A on B cell function. *Int Rev Immunol.* 20:805-835.

Meyohas, M.C., V. Marechal, N. Desire, J. Bouillie, J. Frottier, and J.C. Nicolas. 1996. Study of mother-to-child Epstein-Barr virus transmission by means of nested PCRs. *J Virol.* 70:6816-6819.

Michael, D., and M. Oren. 2003. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin Cancer Biol.* 13:49-58.

Middeldorp, J.M., A.A. Brink, A.J. van den Brule, and C.J. Meijer. 2003. Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit Rev Oncol Hematol.* 45:1-36.

Mijaljica, D., M. Prescott, and R.J. Devenish. 2011. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy.* 7:673-682.

Miller, G., L. Heston, and J. Countryman. 1985. P3HR-1 Epstein-Barr virus with heterogeneous DNA is an independent replicon maintained by cell-to-cell spread. *J Virol.* 54:45-52.

Miller, G., and M. Lipman. 1973. Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 70:190-194.

Mills, K.R., M. Reginato, J. Debnath, B. Queenan, and J.S. Brugge. 2004. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:3438-3443.

Milpied, N., B. Vasseur, N. Parquet, J.L. Garnier, C. Antoine, P. Quartier, A.S. Carret, D. Bouscary, A. Faye, B. Bourbigot, Y. Reguerre, A.M. Stoppa, P. Bourquard, B. Hurault de Ligny, F. Dubief, A. Mathieu-Boue, and V. Leblond. 2000. Humanized anti-CD20 monoclonal antibody (Rituximab) in post transplant B-lymphoproliferative disorder: a retrospective analysis on 32 patients. *Ann Oncol.* 11 Suppl 1:113-116.

Minowada, J., G. Klein, P. Clifford, E. Klein, and G.E. Moore. 1967. Studies of Burkitt lymphoma cells. I. Establishment of a cell line (B35M) and its characteristics. *Cancer.* 20:1430-1437.

Miyashita, T., S. Krajewski, M. Krajewska, H.G. Wang, H.K. Lin, D.A. Liebermann, B. Hoffman, and J.C. Reed. 1994. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene.* 9:1799-1805.

Mohammad, R.M., A.S. Goustin, A. Aboukameel, B. Chen, S. Banerjee, G. Wang, Z. Nikolovska-Coleska, S. Wang, and A. Al-Katib. 2007. Preclinical studies of TW-37, a new nonpeptidic small-molecule inhibitor of Bcl-2, in diffuse large cell lymphoma xenograft model reveal drug action on both Bcl-2 and Mcl-1. *Clin Cancer Res.* 13:2226-2235.

Mohammad, R.M., J. Wu, A.S. Azmi, A. Aboukameel, A. Sosin, S. Wu, D. Yang, S. Wang, and A.M. Al-Katib. 2009. An MDM2 antagonist (MI-319) restores p53 functions and increases the life span of orally treated follicular lymphoma bearing animals. *Mol Cancer.* 8:115.

Molesworth, S.J., C.M. Lake, C.M. Borza, S.M. Turk, and L.M. Hutt-Fletcher. 2000. Epstein-Barr virus gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells. *J Virol.* 74:6324-6332.

Molyneux, E.M., R. Rochford, B. Griffin, R. Newton, G. Jackson, G. Menon, C.J. Harrison, T. Israels, and S. Bailey. 2012. Burkitt's lymphoma. *Lancet.* 379:1234-1244.

Mom, C.H., J. Verweij, C.N. Oldenhuis, J.A. Gietema, N.L. Fox, R. Miceli, F.A. Eskens, W.J. Loos, E.G. de Vries, and S. Sleijfer. 2009. Mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody that targets TRAIL-R1, in combination with gemcitabine and cisplatin: a phase I study. *Clin Cancer Res.* 15:5584-5590.

Momand, J., H.H. Wu, and G. Dasgupta. 2000. MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene.* 242:15-29.

Momand, J., G.P. Zambetti, D.C. Olson, D. George, and A.J. Levine. 1992. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell.* 69:1237-1245.

Moretti, L., E.S. Yang, K.W. Kim, and B. Lu. 2007. Autophagy signaling in cancer and its potential as novel target to improve anticancer therapy. *Drug Resist Updat.* 10:135-143.

Morizane, Y., R. Honda, K. Fukami, and H. Yasuda. 2005. X-linked inhibitor of apoptosis functions as ubiquitin ligase toward mature caspase-9 and cytosolic Smac/DIABLO. *J Biochem.* 137:125-132.

Morselli, E., S. Shen, C. Ruckenstuhl, M.A. Bauer, G. Marino, L. Galluzzi, A. Criollo, M. Michaud, M.C. Maiuri, T. Chano, F. Madeo, and G. Kroemer. 2011. p53 inhibits autophagy by interacting with the human ortholog of yeast Atg17, RB1CC1/FIP200. *Cell Cycle.* 10:2763-2769.

Moscat, J., and M.T. Diaz-Meco. 2009. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer. *Cell.* 137:1001-1004.

Mosialos, G., M. Birkenbach, R. Yalamanchili, T. VanArsdale, C. Ware, and E. Kieff. 1995. The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell.* 80:389-399.

Mosner, J., T. Mummenbrauer, C. Bauer, G. Sczakiel, F. Grosse, and W. Deppert. 1995. Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. *EMBO J.* 14:4442-4449.

Murray, L.J., J.A. Habeshaw, J. Wiels, and M.F. Greaves. 1985. Expression of Burkitt lymphoma-associated antigen (defined by the monoclonal antibody 38.13) on both normal and malignant germinal-centre B cells. *Int J Cancer.* 36:561-565.

Nagane, M., S. Shimizu, E. Mori, S. Kataoka, and Y. Shiokawa. 2010. Predominant antitumor effects by fully human anti-TRAIL-receptor2 (DR5) monoclonal antibodies in human glioma cells in vitro and in vivo. *Neuro Oncol.* 12:687-700.

Nagata, S. 1999. Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet.* 33:29-55.

Nakagawa, I., A. Amano, N. Mizushima, A. Yamamoto, H. Yamaguchi, T. Kamimoto, A. Nara, J. Funao, M. Nakata, K. Tsuda, S. Hamada, and T. Yoshimori. 2004. Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science.* 306:1037-1040.

Nechushtan, A., C.L. Smith, Y.T. Hsu, and R.J. Youle. 1999. Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *EMBO J.* 18:2330-2341.

Neri, A., F. Barriga, D.M. Knowles, I.T. Magrath, and R. Dalla-Favera. 1988. Different regions of the immunoglobulin heavy-chain locus are involved in chromosomal translocations in distinct pathogenetic forms of Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85:2748-2752.

Nguyen, M., R.C. Marcellus, A. Roulston, M. Watson, L. Serfass, S.R. Murthy Madiraju, D. Goulet, J. Viallet, L. Belec, X. Billot, S. Acoca, E. Purisima, A. Wiegmans, L. Cluse, R.W. Johnstone, P. Beauparlant, and G.C. Shore. 2007. Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:19512-19517.

Nicholson, D.W., and N.A. Thornberry. 1997. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* 22:299-306.

Niederman, J.C., G. Miller, H.A. Pearson, J.S. Pagano, and J.M. Dowaliby. 1976. Infectious mononucleosis. Epstein-Barr-virus shedding in saliva and the oropharynx. *N Engl J Med.* 294:1355-1359.

Niedobitek, G., A. Agathanggelou, M. Rowe, E.L. Jones, D.B. Jones, P. Turyaguma, J. Oryema, D.H. Wright, and L.S. Young. 1995. Heterogeneous expression of Epstein-Barr virus latent proteins in endemic Burkitt's lymphoma. *Blood.* 86:659-665.

Nishikawa, J., S. Imai, T. Oda, T. Kojima, K. Okita, and K. Takada. 1999. Epstein-Barr virus promotes epithelial cell growth in the absence of EBNA2 and LMP1 expression. *J Virol.* 73:1286-1292.

Nishitoh, H., M. Saitoh, Y. Mochida, K. Takeda, H. Nakano, M. Rothe, K. Miyazono, and H. Ichijo. 1998. ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol Cell.* 2:389-395.

Nitsche, F., A. Bell, and A. Rickinson. 1997. Epstein-Barr virus leader protein enhances EBNA-2-mediated transactivation of latent membrane protein 1 expression: a role for the W1W2 repeat domain. *J Virol.* 71:6619-6628.

Nivon, M., E. Richet, P. Codogno, A.P. Arrigo, and C. Kretz-Remy. 2009. Autophagy activation by NFkappaB is essential for cell survival after heat shock. *Autophagy.* 5:766-783.

Noda, T., and Y. Ohsumi. 1998. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem.* 273:3963-3966.

O'Brien, S.M., D.F. Claxton, M. Crump, S. Faderl, T. Kipps, M.J. Keating, J. Viallet, and B.D. Cheson. 2009. Phase I study of obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 113:299-305.

Ogbagabriel, S., M. Fernando, F.M. Waldman, S. Bose, and A.P. Heaney. 2005. Securin is overexpressed in breast cancer. *Mod Pathol.* 18:985-990.

Oh, K.J., S. Barbuto, N. Meyer, R.S. Kim, R.J. Collier, and S.J. Korsmeyer. 2005. Conformational changes in BID, a pro-apoptotic BCL-2 family member, upon membrane binding. A site-directed spin labeling study. *J Biol Chem.* 280:753-767.

Olave, I., D. Reinberg, and L.D. Vales. 1998. The mammalian transcriptional repressor RBP (CBF1) targets TFIID and TFIIA to prevent activated transcription. *Genes Dev.* 12:1621-1637.

Oltersdorf, T., S.W. Elmore, A.R. Shoemaker, R.C. Armstrong, D.J. Augeri, B.A. Belli, M. Bruncko, T.L. Deckwerth, J. Dinges, P.J. Hajduk, M.K. Joseph, S. Kitada, S.J. Korsmeyer, A.R. Kunzer, A. Letai, C. Li, M.J. Mitten, D.G. Nettesheim, S. Ng, P.M. Nimmer, J.M. O'Connor, A. Oleksijew, A.M. Petros, J.C. Reed, W. Shen, S.K. Tahir, C.B. Thompson, K.J. Tomaselli, B. Wang, M.D. Wendt, H. Zhang, S.W. Fesik, and S.H. Rosenberg. 2005. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature.* 435:677-681.

Paglin, S., N.Y. Lee, C. Nakar, M. Fitzgerald, J. Plotkin, B. Deuel, N. Hackett, M. McMahill, E. Sphicas, N. Lampen, and J. Yahalom. 2005. Rapamycin-sensitive pathway regulates mitochondrial membrane potential, autophagy, and survival in irradiated MCF-7 cells. *Cancer Res.* 65:11061-11070.

Paludan, C., D. Schmid, M. Landthaler, M. Vockerodt, D. Kube, T. Tuschl, and C. Munz. 2005. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science.* 307:593-596.

Park, M.A., G. Zhang, A.P. Martin, H. Hamed, C. Mitchell, P.B. Hylemon, M. Graf, M. Rahmani, K. Ryan, X. Liu, S. Spiegel, J. Norris, P.B. Fisher, S. Grant, and P. Dent. 2008a. Vorinostat and sorafenib increase ER stress, autophagy and apoptosis via ceramide-dependent CD95 and PERK activation. *Cancer Biol Ther.* 7:1648-1662.

Park, M.A., G. Zhang, J. Norris, P.B. Hylemon, P.B. Fisher, S. Grant, and P. Dent. 2008b. Regulation of autophagy by ceramide-CD95-PERK signaling. *Autophagy.* 4:929-931.

Parker, G.A., R. Touitou, and M.J. Allday. 2000. Epstein-Barr virus EBNA3C can disrupt multiple cell cycle checkpoints and induce nuclear division divorced from cytokinesis. *Oncogene.* 19:700-709.

Parkin, D.M., F. Bray, J. Ferlay, and P. Pisani. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 55:74-108.

Paschos, K., G.A. Parker, E. Watanatanasup, R.E. White, and M.J. Allday. 2012. BIM promoter directly targeted by EBNA3C in polycomb-mediated repression by EBV. *Nucleic Acids Res.*

Pasquali, L., R. Ruffoli, F. Fulceri, S. Pietracupa, G. Siciliano, A. Paparelli, and F. Fornai. 2010. The role of autophagy: what can be learned from the genetic forms of amyotrophic lateral sclerosis. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 9:268-278.

Patte, C., V. Ribrag, and L. Brugieres. 2007. [Non Hodgkin's lymphoma in adolescents]. *Bull Cancer.* 94:339-348.

Pattingre, S., L. Espert, M. Biard-Piechaczyk, and P. Codogno. 2008. Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie.* 90:313-323.

Pattingre, S., A. Tassa, X. Qu, R. Garuti, X.H. Liang, N. Mizushima, M. Packer, M.D. Schneider, and B. Levine. 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell.* 122:927-939.

Pegtel, D.M., J. Middeldorp, and D.A. Thorley-Lawson. 2004. Epstein-Barr virus infection in ex vivo tonsil epithelial cell cultures of asymptomatic carriers. *J Virol.* 78:12613-12624.

Peng, R., J. Tan, and P.D. Ling. 2000. Conserved regions in the Epstein-Barr virus leader protein define distinct domains required for nuclear localization and transcriptional cooperation with EBNA2. *J Virol.* 74:9953-9963.

Perez-Galan, P., G. Roue, N. Villamor, E. Campo, and D. Colomer. 2007. The BH3-mimetic GX15-070 synergizes with bortezomib in mantle cell lymphoma by enhancing Noxa-mediated activation of Bak. *Blood.* 109:4441-4449.

Peter, M.E., and P.H. Krammer. 2003. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ.* 10:26-35.

Pfeffer, S., M. Zavolan, F.A. Grasser, M. Chien, J.J. Russo, J. Ju, B. John, A.J. Enright, D. Marks, C. Sander, and T. Tuschl. 2004. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*. 304:734-736.

Pitti, R.M., S.A. Marsters, D.A. Lawrence, M. Roy, F.C. Kischkel, P. Dowd, A. Huang, C.J. Donahue, S.W. Sherwood, D.T. Baldwin, P.J. Godowski, W.I. Wood, A.L. Gurney, K.J. Hillan, R.L. Cohen, A.D. Goddard, D. Botstein, and A. Ashkenazi. 1998. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*. 396:699-703.

Pizzo, P.A., I.T. Magrath, S.K. Chattopadhyay, R.J. Biggar, and P. Gerber. 1978. A new tumour-derived transforming strain of Epstein-Barr virus. *Nature*. 272:629-631.

Plummer, R., G. Attard, S. Pacey, L. Li, A. Razak, R. Perrett, M. Barrett, I. Judson, S. Kaye, N.L. Fox, W. Halpern, A. Corey, H. Calvert, and J. de Bono. 2007. Phase 1 and pharmacokinetic study of lexatumumab in patients with advanced cancers. *Clin Cancer Res*. 13:6187-6194.

Poirel, H.A., A. Bernheim, A. Schneider, M. Meddeb, S. Choquet, V. Leblond, F. Charlotte, F. Davi, D. Canioni, E. Macintyre, M.F. Mamzer-Bruneel, I. Hirsch, O. Hermine, A. Martin, P. Cornillet-Lefebvre, M. Patey, O. Toupance, J.L. Kemeny, P. Deteix, and M. Raphael. 2005. Characteristic pattern of chromosomal imbalances in posttransplantation lymphoproliferative disorders: correlation with histopathological subcategories and EBV status. *Transplantation*. 80:176-184.

Pollack, I.F., M. Erff, and A. Ashkenazi. 2001. Direct stimulation of apoptotic signaling by soluble Apo2l/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand leads to selective killing of glioma cells. *Clin Cancer Res*. 7:1362-1369.

Pope, J.H., M.K. Horne, and W. Scott. 1968. Transformation of foetal human keukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *Int J Cancer*. 3:857-866.

Portis, T., and R. Longnecker. 2004. Epstein-Barr virus (EBV) LMP2A mediates B-lymphocyte survival through constitutive activation of the Ras/PI3K/Akt pathway. *Oncogene*. 23:8619-8628.

Portnoy, J., G.A. Ahronheim, F. Ghibu, B. Clecner, and J.H. Joncas. 1984. Recovery of Epstein-Barr virus from genital ulcers. *N Engl J Med*. 311:966-968.

Prins, J.B., E.C. Ledgerwood, P. Ameloot, P. Vandenabeele, P.R. Faraco, N.A. Bright, S. O'Rahilly, and J.R. Bradley. 1998. Tumor necrosis factor-induced cytotoxicity is not related to rates of mitochondrial morphological abnormalities or autophagy-changes that can be mediated by TNFR-I or TNFR-II. *Biosci Rep*. 18:329-340.

Prives, C., and J.L. Manley. 2001. Why is p53 acetylated? *Cell*. 107:815-818.

Pro, B., B. Leber, M. Smith, L. Fayad, J. Romaguera, F. Hagemeister, A. Rodriguez, P. McLaughlin, F. Samaniego, J. Zwiebel, A. Lopez, L. Kwak, and A. Younes. 2008. Phase II multicenter study of oblimersen sodium, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with rituximab in patients with recurrent B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*. 143:355-360.

Puthalakath, H., D.C. Huang, L.A. O'Reilly, S.M. King, and A. Strasser. 1999. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Mol Cell*. 3:287-296.

Pyo, J.O., M.H. Jang, Y.K. Kwon, H.J. Lee, J.I. Jun, H.N. Woo, D.H. Cho, B. Choi, H. Lee, J.H. Kim, N. Mizushima, Y. Oshumi, and Y.K. Jung. 2005. Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. *J Biol Chem*. 280:20722-20729.

Radkov, S.A., R. Touitou, A. Brehm, M. Rowe, M. West, T. Kouzarides, and M.J. Allday. 1999. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with histone deacetylase to repress transcription. *J Virol*. 73:5688-5697.

Raffo, A., J.C. Lai, C.A. Stein, P. Miller, S. Scaringe, A. Khvorova, and L. Benimetskaya. 2004. Antisense RNA down-regulation of bcl-2 expression in DU145 prostate cancer cells does not diminish the cytostatic effects of G3139 (Oblimersen). *Clin Cancer Res.* 10:3195-3206.

Ravikumar, B., C. Vacher, Z. Berger, J.E. Davies, S. Luo, L.G. Oroz, F. Scaravilli, D.F. Easton, R. Duden, C.J. O'Kane, and D.C. Rubinsztein. 2004. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet.* 36:585-595.

Rayburn, E., R. Zhang, J. He, and H. Wang. 2005. MDM2 and human malignancies: expression, clinical pathology, prognostic markers, and implications for chemotherapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 5:27-41.

Reed, J.C. 1995. Bcl-2: prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. *Hematol Oncol Clin North Am.* 9:451-473.

Reed, J.C. 1999. Dysregulation of apoptosis in cancer. *J Clin Oncol.* 17:2941-2953.

Reed, J.C., H. Zha, C. Aime-Sempe, S. Takayama, and H.G. Wang. 1996. Structure-function analysis of Bcl-2 family proteins. Regulators of programmed cell death. *Adv Exp Med Biol.* 406:99-112.

Reed, M., B. Woelker, P. Wang, Y. Wang, M.E. Anderson, and P. Tegtmeyer. 1995. The C-terminal domain of p53 recognizes DNA damaged by ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:9455-9459.

Rees, L., A. Thomas, and P.L. Amlot. 1998. Disappearance of an Epstein-Barr virus-positive post-transplant plasmacytoma with reduction of immunosuppression. *Lancet.* 352:789.

Renouf, B., E. Hollville, A. Pujals, C. Tetaud, J. Garibal, and J. Wiels. 2009. Activation of p53 by MDM2 antagonists has differential apoptotic effects on Epstein-Barr virus (EBV)-positive and EBV-negative Burkitt's lymphoma cells. *Leukemia.* 23:1557-1563.

Rickinson, A.B., L.S. Young, and M. Rowe. 1987. Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *J Virol.* 61:1310-1317.

Riedl, S.J., and Y. Shi. 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:897-907.

Robertson, E.S., J. Lin, and E. Kieff. 1996. The amino-terminal domains of Epstein-Barr virus nuclear proteins 3A, 3B, and 3C interact with RBPJ(kappa). *J Virol.* 70:3068-3074.

Rodriguez-Enriquez, S., L. He, and J.J. Lemasters. 2004. Role of mitochondrial permeability transition pores in mitochondrial autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 36:2463-2472.

Rojas-Rivera, D., B. Caballero, S. Zamorano, F. Lisbona, and C. Hetz. 2010. Alternative functions of the BCL-2 protein family at the endoplasmic reticulum. *Adv Exp Med Biol.* 687:33-47.

Rosa, M.D., E. Gottlieb, M.R. Lerner, and J.A. Steitz. 1981. Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII. *Mol Cell Biol.* 1:785-796.

Roth, J., M. Dobbelstein, D.A. Freedman, T. Shenk, and A.J. Levine. 1998. Nucleo-cytoplasmic shuttling of the hdm2 oncoprotein regulates the levels of the p53 protein via a pathway used by the human immunodeficiency virus rev protein. *EMBO J.* 17:554-564.

Roth, J.A., D. Nguyen, D.D. Lawrence, B.L. Kemp, C.H. Carrasco, D.Z. Ferson, W.K. Hong, R. Komaki, J.J. Lee, J.C. Nesbitt, K.M. Pisters, J.B. Putnam, R. Schea, D.M. Shin, G.L. Walsh, M.M. Dolormente, C.I. Han, F.D. Martin, N. Yen, K. Xu, L.C. Stephens, T.J. McDonnell, T. Mukhopadhyay, and D. Cai. 1996. Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat Med.* 2:985-991.

Roth, J.A., S.G. Swisher, and R.E. Meyn. 1999. p53 tumor suppressor gene therapy for cancer. *Oncology (Williston Park).* 13:148-154.

Rotonda, J., D.W. Nicholson, K.M. Fazil, M. Gallant, Y. Gareau, M. Labelle, E.P. Peterson, D.M. Rasper, R. Ruel, J.P. Vaillancourt, N.A. Thornberry, and J.W. Becker. 1996. The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nat Struct Biol.* 3:619-625.

Rotter, V., H. Abutbul, and D. Wolf. 1983. The presence of p53 transformation-related protein in Ab-MuLV transformed cells is required for their development into lethal tumors in mice. *Int J Cancer.* 31:315-320.

Rowe, M., M. Peng-Pilon, D.S. Huen, R. Hardy, D. Croom-Carter, E. Lundgren, and A.B. Rickinson. 1994. Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell-specific response that is delayed relative to NF-kappa B activation and to induction of cell surface markers. *J Virol.* 68:5602-5612.

Rowe, M., L.S. Young, K. Cadwallader, L. Petti, E. Kieff, and A.B. Rickinson. 1989. Distinction between Epstein-Barr virus type A (EBNA 2A) and type B (EBNA 2B) isolates extends to the EBNA 3 family of nuclear proteins. *J Virol.* 63:1031-1039.

Rowe, M., L.S. Young, J. Crocker, H. Stokes, S. Henderson, and A.B. Rickinson. 1991. Epstein-Barr virus (EBV)-associated lymphoproliferative disease in the SCID mouse model: implications for the pathogenesis of EBV-positive lymphomas in man. *J Exp Med.* 173:147-158.

Rudin, C.M., C.L. Hann, E.B. Garon, M. Ribeiro de Oliveira, P.D. Bonomi, D.R. Camidge, Q. Chu, G. Giaccone, D. Khaira, S.S. Ramalingam, M.R. Ranson, C. Dive, E.M. McKeegan, B.J. Chyla, B.L. Dowell, A. Chakravartty, C.E. Nolan, N. Rudersdorf, T.A. Busman, M.H. Mabry, A.P. Krivoshik, R.A. Humerickhouse, G.I. Shapiro, and L. Gandhi. 2012. Phase 2 Study of Single Agent Navitoclax (ABT-263) and Biomarker Correlates in Patients with Relapsed Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.*

Russell, S.E., G.I. Hickey, W.S. Lowry, P. White, and R.J. Atkinson. 1990. Allele loss from chromosome 17 in ovarian cancer. *Oncogene.* 5:1581-1583.

Ruvolo, P.P., X. Deng, B.K. Carr, and W.S. May. 1998. A functional role for mitochondrial protein kinase Calpha in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J Biol Chem.* 273:25436-25442.

Rymo, L. 1979. Identification of transcribed regions of Epstein-Barr virus DNA in Burkitt lymphoma-derived cells. *J Virol.* 32:8-18.

Ryu, H.J., J.E. Kim, S.I. Yeo, and T.C. Kang. 2011. p65/RelA-Ser529 NF-kappaB subunit phosphorylation induces autophagic astroglial death (Clasmatodendrosis) following status epilepticus. *Cell Mol Neurobiol.* 31:1071-1078.

Saha, A., M. Murakami, P. Kumar, B. Bajaj, K. Sims, and E.S. Robertson. 2009. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C augments Mdm2-mediated p53 ubiquitination and degradation by deubiquitinating Mdm2. *J Virol.* 83:4652-4669.

Saha, M.N., H. Jiang, Y. Yang, X. Zhu, X. Wang, A.D. Schimmer, L. Qiu, and H. Chang. 2012. Targeting p53 via JNK pathway: a novel role of RITA for apoptotic signaling in multiple myeloma. *PLoS One.* 7:e30215.

Salvesen, G.S., and C.S. Duckett. 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:401-410.

Samanta, M., D. Iwakiri, and K. Takada. 2008. Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces IL-10 through RIG-I-mediated IRF-3 signaling. *Oncogene.* 27:4150-4160.

Samuels-Lev, Y., D.J. O'Connor, D. Bergamaschi, G. Trigiante, J.K. Hsieh, S. Zhong, I. Campargue, L. Naumovski, T. Crook, and X. Lu. 2001. ASPP proteins specifically stimulate the apoptotic function of p53. *Mol Cell.* 8:781-794.

Sarbassov, D.D., S.M. Ali, S. Sengupta, J.H. Sheen, P.P. Hsu, A.F. Bagley, A.L. Markhard, and D.M. Sabatini. 2006. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell.* 22:159-168.

Sarkari, F., Y. Sheng, and L. Frappier. 2010. USP7/HAUSP promotes the sequence-specific DNA binding activity of p53. *PLoS One*. 5:e13040.

Scarlatti, F., C. Bauvy, A. Ventruti, G. Sala, F. Cluzeaud, A. Vandewalle, R. Ghidoni, and P. Codogno. 2004. Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *J Biol Chem*. 279:18384-18391.

Schaefer, B.C., J.L. Strominger, and S.H. Speck. 1997. Host-cell-determined methylation of specific Epstein-Barr virus promoters regulates the choice between distinct viral latency programs. *Mol Cell Biol*. 17:364-377.

Scheffner, M., J.M. Huibregtse, R.D. Vierstra, and P.M. Howley. 1993. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. 75:495-505.

Scherz-Shouval, R., and Z. Elazar. 2007. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol*. 17:422-427.

Schimmer, A.D., E.H. Estey, G. Borthakur, B.Z. Carter, G.J. Schiller, M.S. Tallman, J.K. Altman, J.E. Karp, J. Kassis, D.W. Hedley, J. Brandwein, W. Xu, D.H. Mak, E. LaCasse, C. Jacob, S.J. Morris, J. Jolivet, and M. Andreeff. 2009. Phase I/II trial of AEG35156 X-linked inhibitor of apoptosis protein antisense oligonucleotide combined with idarubicin and cytarabine in patients with relapsed or primary refractory acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 27:4741-4746.

Schimmer, A.D., W. Herr, M. Hanel, G. Borthakur, A. Frankel, H.A. Horst, S. Martin, J. Kassis, P. Desjardins, K. Seiter, W. Fiedler, R. Noppeney, A. Giagounidis, C. Jacob, J. Jolivet, M.S. Tallman, and S. Koschmieder. 2011. Addition of AEG35156 XIAP antisense oligonucleotide in reinduction chemotherapy does not improve remission rates in patients with primary refractory acute myeloid leukemia in a randomized phase II study. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 11:433-438.

Schimmer, A.D., S. O'Brien, H. Kantarjian, J. Brandwein, B.D. Cheson, M.D. Minden, K. Yee, F. Ravandi, F. Giles, A. Schuh, V. Gupta, M. Andreeff, C. Koller, H. Chang, S. Kamel-Reid, M. Berger, J. Viallet, and G. Borthakur. 2008. A phase I study of the pan bcl-2 family inhibitor obatoclax mesylate in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin Cancer Res*. 14:8295-8301.

Schimmer, A.D., K. Welsh, C. Pinilla, Z. Wang, M. Krajewska, M.J. Bonneau, I.M. Pedersen, S. Kitada, F.L. Scott, B. Bailly-Maitre, G. Glinsky, D. Scudiero, E. Sausville, G. Salvesen, A. Nefzi, J.M. Ostresh, R.A. Houghten, and J.C. Reed. 2004. Small-molecule antagonists of apoptosis suppressor XIAP exhibit broad antitumor activity. *Cancer Cell*. 5:25-35.

Schlumpberger, M., E. Schaeffeler, M. Straub, M. Bredschneider, D.H. Wolf, and M. Thumm. 1997. AUT1, a gene essential for autophagocytosis in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *J Bacteriol*. 179:1068-1076.

Schmitt, E., A.T. Sane, A. Steyaert, G. Cimoli, and R. Bertrand. 1997. The Bcl-xL and Bax-alpha control points: modulation of apoptosis induced by cancer chemotherapy and relation to TPCK-sensitive protease and caspase activation. *Biochem Cell Biol*. 75:301-314.

Schneider, P., and J. Tschopp. 2000. Apoptosis induced by death receptors. *Pharm Acta Helv*. 74:281-286.

Scholle, F., K.M. Bendt, and N. Raab-Traub. 2000. Epstein-Barr virus LMP2A transforms epithelial cells, inhibits cell differentiation, and activates Akt. *J Virol*. 74:10681-10689.

Scott, R.C., O. Schuldiner, and T.P. Neufeld. 2004. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the Drosophila fat body. *Dev Cell*. 7:167-178.

Secchiero, P., R. Bosco, C. Celeghini, and G. Zauli. 2011. Recent advances in the therapeutic perspectives of Nutlin-3. *Curr Pharm Des*. 17:569-577.

Seillier, M., S. Peuget, O. Gayet, C. Gauthier, P. N'Guessan, M. Monte, A. Carrier, J.L. Iovanna, and N.J. Dusetti. 2012. TP53INP1, a tumor suppressor, interacts with LC3 and ATG8-family proteins through the LC3-interacting region (LIR) and promotes autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ.*

Shair, K.H., C.I. Schnegg, and N. Raab-Traub. 2008. EBV latent membrane protein 1 effects on plakoglobin, cell growth, and migration. *Cancer Res.* 68:6997-7005.

Shannon-Lowe, C.D., B. Neuhierl, G. Baldwin, A.B. Rickinson, and H.J. Delecluse. 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., A. Zauberman, D. Ginsberg, and M. Oren. 1992. Identification of a minimal transforming domain of p53: negative dominance through abrogation of sequence-specific DNA binding. *Mol Cell Biol.* 12:5581-5592.

Shaw, P., J. Freeman, R. Bovey, and R. Iggo. 1996. Regulation of specific DNA binding by p53: evidence for a role for O-glycosylation and charged residues at the carboxy-terminus. *Oncogene.* 12:921-930.

Sheikh, M.S., and A.J. Fornace, Jr. 2000. Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis. *Leukemia.* 14:1509-1513.

Shen, S., O. Kepp, and G. Kroemer. 2012. The end of autophagic cell death? *Autophagy.* 8:1-3.

Sheng, W., G. Decaussin, S. Sumner, and T. Ooka. 2001. N-terminal domain of BARF1 gene encoded by Epstein-Barr virus is essential for malignant transformation of rodent fibroblasts and activation of BCL-2. *Oncogene.* 20:1176-1185.

Sheridan, J.P., S.A. Marsters, R.M. Pitti, A. Gurney, M. Skubatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan, C.L. Gray, K. Baker, W.I. Wood, A.D. Goddard, P. Godowski, and A. Ashkenazi. 1997. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science.* 277:818-821.

Sheu, L.F., A. Chen, C.L. Meng, K.C. Ho, W.H. Lee, F.J. Leu, and C.F. Chao. 1996. Enhanced malignant progression of nasopharyngeal carcinoma cells mediated by the expression of Epstein-Barr nuclear antigen 1 in vivo. *J Pathol.* 180:243-248.

Shi, Y. 2002. A conserved tetrapeptide motif: potentiating apoptosis through IAP-binding. *Cell Death Differ.* 9:93-95.

Shikama, N., C.W. Lee, S. France, L. Delavaine, J. Lyon, M. Krstic-Demonacos, and N.B. La Thangue. 1999. A novel cofactor for p300 that regulates the p53 response. *Mol Cell.* 4:365-376.

Shimizu, S., T. Kanaseki, N. Mizushima, T. Mizuta, S. Arakawa-Kobayashi, C.B. Thompson, and Y. Tsujimoto. 2004. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol.* 6:1221-1228.

Sinclair, A.J., I. Palmero, G. Peters, and P.J. Farrell. 1994. EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *EMBO J.* 13:3321-3328.

Sinha, S., C.L. Colbert, N. Becker, Y. Wei, and B. Levine. 2008. Molecular basis of the regulation of Beclin 1-dependent autophagy by the gamma-herpesvirus 68 Bcl-2 homolog M11. *Autophagy.* 4:989-997.

Sixbey, J.W., J.G. Nedrud, N. Raab-Traub, R.A. Hanes, and J.S. Pagano. 1984. Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med.* 310:1225-1230.

Slee, E.A., M.T. Harte, R.M. Kluck, B.B. Wolf, C.A. Casiano, D.D. Newmeyer, H.G. Wang, J.C. Reed, D.W. Nicholson, E.S. Alnemri, D.R. Green, and S.J. Martin. 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol.* 144:281-292.

Smith, M.A., R. Gorlick, E.A. Kolb, R. Lock, H. Carol, J.M. Maris, S.T. Keir, C.L. Morton, C.P. Reynolds, M.H. Kang, J. Arts, T. Bashir, M. Janicot, R.T. Kurmasheva, and P.J. Houghton. 2011. Initial testing of JNJ-26854165 (Serdemetan) by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer*.

Soria, J.C., Z. Mark, P. Zatloukal, B. Szima, I. Albert, E. Juhasz, J.L. Pujol, J. Kozielski, N. Baker, D. Smethurst, Y.J. Hei, A. Ashkenazi, H. Stern, L. Amler, Y. Pan, and F. Blackhall. 2011. Randomized phase II study of dulanermin in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 29:4442-4451.

Soria, J.C., E. Smit, D. Khayat, B. Besse, X. Yang, C.P. Hsu, D. Reese, J. Wiezorek, and F. Blackhall. 2010. Phase 1b study of dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 28:1527-1533.

Spender, L.C., and G.J. Inman. 2012. Phosphoinositide 3-kinase/AKT/mTORC1/2 signaling determines sensitivity of Burkitt's lymphoma cells to BH3 mimetics. *Mol Cancer Res*. 10:347-359.

Starzl, T.E., M.A. Nalesnik, K.A. Porter, M. Ho, S. Iwatsuki, B.P. Griffith, J.T. Rosenthal, T.R. Hakala, B.W. Shaw, Jr., R.L. Hardesty, and et al. 1984. Reversibility of lymphomas and lymphoproliferative lesions developing under cyclosporin-steroid therapy. *Lancet*. 1:583-587.

Stenger, J.E., P. Tegtmeyer, G.A. Mayr, M. Reed, Y. Wang, P. Wang, P.V. Hough, and I.A. Mastrangelo. 1994. p53 oligomerization and DNA looping are linked with transcriptional activation. *EMBO J*. 13:6011-6020.

Stewart, M.L., E. Fire, A.E. Keating, and L.D. Walensky. 2010. The MCL-1 BH3 helix is an exclusive MCL-1 inhibitor and apoptosis sensitizer. *Nat Chem Biol*. 6:595-601.

Strasser, A., L. O'Connor, and V.M. Dixit. 2000. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*. 69:217-245.

Subramanian, C., M.A. Cotter, 2nd, and E.S. Robertson. 2001. Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA-3C interacts with the human metastatic suppressor Nm23-H1: a molecular link to cancer metastasis. *Nat Med*. 7:350-355.

Subramanian, C., J.S. Knight, and E.S. Robertson. 2002. The Epstein Barr nuclear antigen EBNA3C regulates transcription, cell transformation and cell migration. *Front Biosci*. 7:d704-716.

Szekely, L., K. Pokrovskaja, W.Q. Jiang, H. de The, N. Ringertz, and G. Klein. 1996. The Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-5 accumulates in PML-containing bodies. *J Virol*. 70:2562-2568.

Szekely, L., G. Selivanova, K.P. Magnusson, G. Klein, and K.G. Wiman. 1993. EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:5455-5459.

Takahashi, M.N., W. Jackson, D.T. Laird, T.D. Culp, C. Grose, J.I. Haynes, 2nd, and L. Benetti. 2009. Varicella-zoster virus infection induces autophagy in both cultured cells and human skin vesicles. *J Virol*. 83:5466-5476.

Talloczy, Z., W. Jiang, H.W.t. Virgin, D.A. Leib, D. Scheuner, R.J. Kaufman, E.L. Eskelinen, and B. Levine. 2002. Regulation of starvation- and virus-induced autophagy by the eIF2alpha kinase signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:190-195.

Talloczy, Z., H.W.t. Virgin, and B. Levine. 2006. PKR-dependent autophagic degradation of herpes simplex virus type 1. *Autophagy*. 2:24-29.

Tan, T.H., J. Wallis, and A.J. Levine. 1986. Identification of the p53 protein domain involved in formation of the simian virus 40 large T-antigen-p53 protein complex. *J Virol*. 59:574-583.

Tan, Y.K., H.A. Vu, C.M. Kusuma, and A. Wu. 2009. Implications of autophagy in anthrax pathogenicity. *Autophagy*. 5:734-735.

Tanner, J., J. Weis, D. Fearon, Y. Whang, and E. Kieff. 1987. Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell.* 50:203-213.

Tasdemir, E., M. Chiara Maiuri, E. Morselli, A. Criollo, M. D'Amelio, M. Djavaheri-Mergny, F. Cecconi, N. Tavernarakis, and G. Kroemer. 2008a. A dual role of p53 in the control of autophagy. *Autophagy.* 4:810-814.

Tasdemir, E., M.C. Maiuri, L. Galluzzi, I. Vitale, M. Djavaheri-Mergny, M. D'Amelio, A. Criollo, E. Morselli, C. Zhu, F. Harper, U. Nannmark, C. Samara, P. Pinton, J.M. Vicencio, R. Carnuccio, U.M. Moll, F. Madeo, P. Paterlini-Brechot, R. Rizzuto, G. Szabadkai, G. Pierron, K. Blomgren, N. Tavernarakis, P. Codogno, F. Cecconi, and G. Kroemer. 2008b. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol.* 10:676-687.

Tattevin, P., A.C. Cremieux, D. Descamps, and C. Carbon. 2002. Transfusion-related infectious mononucleosis. *Scand J Infect Dis.* 34:777-778.

Taylor, W.R., and G.R. Stark. 2001. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene.* 20:1803-1815.

Terebiznik, M.R., D. Raju, C.L. Vazquez, K. Torbricki, R. Kulkarni, S.R. Blanke, T. Yoshimori, M.I. Colombo, and N.L. Jones. 2009. Effect of Helicobacter pylori's vacuolating cytotoxin on the autophagy pathway in gastric epithelial cells. *Autophagy.* 5:370-379.

Thomas, R., K.F. Macsween, K. McAulay, D. Clutterbuck, R. Anderson, S. Reid, C.D. Higgins, A.J. Swerdlow, N. Harrison, H. Williams, and D.H. Crawford. 2006. Evidence of shared Epstein-Barr viral isolates between sexual partners, and low level EBV in genital secretions. *J Med Virol.* 78:1204-1209.

Thorburn, J., F. Moore, A. Rao, W.W. Barclay, L.R. Thomas, K.W. Grant, S.D. Cramer, and A. Thorburn. 2005. Selective inactivation of a Fas-associated death domain protein (FADD)-dependent apoptosis and autophagy pathway in immortal epithelial cells. *Mol Biol Cell.* 16:1189-1199.

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.

Tokunaga, M., C.E. Land, Y. Uemura, T. Tokudome, S. Tanaka, and E. Sato. 1993. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma. *Am J Pathol.* 143:1250-1254.

Tolcher, A.W., M. Mita, N.J. Meropol, M. von Mehren, A. Patnaik, K. Padavic, M. Hill, T. Mays, T. McCoy, N.L. Fox, W. Halpern, A. Corey, and R.B. Cohen. 2007. Phase I pharmacokinetic and biologic correlative study of mapatumumab, a fully human monoclonal antibody with agonist activity to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor-1. *J Clin Oncol.* 25:1390-1395.

Tomkinson, B., and E. Kieff. 1992. Use of second-site homologous recombination to demonstrate that Epstein-Barr virus nuclear protein 3B is not important for lymphocyte infection or growth transformation in vitro. *J Virol.* 66:2893-2903.

Tomkinson, B., E. Robertson, and E. Kieff. 1993. Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol.* 67:2014-2025.

Tong, X., R. Drapkin, R. Yalamanchili, G. Mosialos, and E. Kieff. 1995. The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain forms a complex with a novel cellular coactivator that can interact with TFIIE. *Mol Cell Biol.* 15:4735-4744.

Torcia, M., G. De Chiara, L. Nencioni, S. Ammendola, D. Labardi, M. Lucibello, P. Rosini, L.N. Marlier, P. Bonini, P. Dello Sbarba, A.T. Palamara, N. Zambrano, T. Russo, E. Garaci, and F. Cozzolino. 2001. Nerve growth factor inhibits apoptosis in memory B lymphocytes via inactivation of p38 MAPK, prevention of Bcl-2 phosphorylation, and cytochrome c release. *J Biol Chem.* 276:39027-39036.

Touitou, R., M. Hickabottom, G. Parker, T. Crook, and M.J. Allday. 2001. Physical and functional interactions between the corepressor CtBP and the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA3C. *J Virol.* 75:7749-7755.

Trarbach, T., M. Moehler, V. Heinemann, C.H. Kohne, M. Przyborek, C. Schulz, V. Sneller, G. Gallant, and S. Kanzler. 2010. Phase II trial of mapatumumab, a fully human agonistic monoclonal antibody that targets and activates the tumour necrosis factor apoptosis-inducing ligand receptor-1 (TRAIL-R1), in patients with refractory colorectal cancer. *Br J Cancer.* 102:506-512.

Travassos, L.H., L.A. Carneiro, M. Ramjeet, S. Hussey, Y.G. Kim, J.G. Magalhaes, L. Yuan, F. Soares, E. Chea, L. Le Bourhis, I.G. Boneca, A. Allaoui, N.L. Jones, G. Nunez, S.E. Girardin, and D.J. Philpott. 2010. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol.* 11:55-62.

Trudel, S., Z.H. Li, J. Rauw, R.E. Tiedemann, X.Y. Wen, and A.K. Stewart. 2007. Preclinical studies of the pan-Bcl inhibitor obatoclax (GX015-070) in multiple myeloma. *Blood.* 109:5430-5438.

Tse, C., A.R. Shoemaker, J. Adickes, M.G. Anderson, J. Chen, S. Jin, E.F. Johnson, K.C. Marsh, M.J. Mitten, P. Nimmer, L. Roberts, S.K. Tahir, Y. Xiao, X. Yang, H. Zhang, S. Fesik, S.H. Rosenberg, and S.W. Elmore. 2008. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res.* 68:3421-3428.

Tugizov, S.M., J.W. Berline, and J.M. Palefsky. 2003. Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells. *Nat Med.* 9:307-314.

Tzung, S.P., K.M. Kim, G. Basanez, C.D. Giedt, J. Simon, J. Zimmerberg, K.Y. Zhang, and D.M. Hockenbery. 2001. Antimycin A mimics a cell-death-inducing Bcl-2 homology domain 3. *Nat Cell Biol.* 3:183-191.

Uchida, J., T. Yasui, Y. Takaoka-Shichijo, M. Muraoka, W. Kulwichit, N. Raab-Traub, and H. Kikutani. 1999. Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science.* 286:300-303.

van Beek, J., A.A. Brink, M.B. Vervoort, M.J. van Zijp, C.J. Meijer, A.J. van den Brule, and J.M. Middeldorp. 2003. In vivo transcription of the Epstein-Barr virus (EBV) BamHI-A region without associated in vivo BARF0 protein expression in multiple EBV-associated disorders. *J Gen Virol.* 84:2647-2659.

van de Stolpe, A., N. Jacobs, W.J. Hage, L. Tertoolen, Y. van Kooyk, I.R. Novakova, and T. de Witte. 1996. Fibrinogen binding to ICAM-1 on EA.hy 926 endothelial cells is dependent on an intact cytoskeleton. *Thromb Haemost.* 75:182-189.

van Delft, M.F., A.H. Wei, K.D. Mason, C.J. Vandenberg, L. Chen, P.E. Czabotar, S.N. Willis, C.L. Scott, C.L. Day, S. Cory, J.M. Adams, A.W. Roberts, and D.C. Huang. 2006. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell.* 10:389-399.

Vaseva, A.V., N.D. Marchenko, and U.M. Moll. 2009. The transcription-independent mitochondrial p53 program is a major contributor to nutlin-induced apoptosis in tumor cells. *Cell Cycle.* 8:1711-1719.

Vaseva, A.V., and U.M. Moll. 2009. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta.* 1787:414-420.

Vassilev, L.T. 2004. Small-molecule antagonists of p53-MDM2 binding: research tools and potential therapeutics. *Cell Cycle.* 3:419-421.

Verhagen, A.M., P.G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L.M. Connolly, G.E. Reid, R.L. Moritz, R.J. Simpson, and D.L. Vaux. 2000. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* 102:43-53.

Vermeulen, K., D.R. Van Bockstaele, and Z.N. Berneman. 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 36:131-149.

Vilborg, A., M.T. Wilhelm, and K.G. Wiman. 2010. Regulation of tumor suppressor p53 at the RNA level. *J Mol Med (Berl)*. 88:645-652.

Vousden, K.H. 2005. Apoptosis. p53 and PUMA: a deadly duo. *Science*. 309:1685-1686.

Vousden, K.H. 2006. Outcomes of p53 activation--spoilt for choice. *J Cell Sci*. 119:5015-5020.

Vousden, K.H., and X. Lu. 2002. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*. 2:594-604.

Wadgaonkar, R., and T. Collins. 1999. Murine double minute (MDM2) blocks p53-coactivator interaction, a new mechanism for inhibition of p53-dependent gene expression. *J Biol Chem*. 274:13760-13767.

Wajant, H. 2003. Death receptors. *Essays Biochem*. 39:53-71.

Walensky, L.D., A.L. Kung, I. Escher, T.J. Malia, S. Barbuto, R.D. Wright, G. Wagner, G.L. Verdine, and S.J. Korsmeyer. 2004. Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science*. 305:1466-1470.

Walensky, L.D., K. Pitter, J. Morash, K.J. Oh, S. Barbuto, J. Fisher, E. Smith, G.L. Verdine, and S.J. Korsmeyer. 2006. A stapled BID BH3 helix directly binds and activates BAX. *Mol Cell*. 24:199-210.

Wallace, D.C. 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*. 39:359-407.

Waltzer, L., M. Perricaudet, A. Sergeant, and E. Manet. 1996. Epstein-Barr virus EBNA3A and EBNA3C proteins both repress RBP-J kappa-EBNA2-activated transcription by inhibiting the binding of RBP-J kappa to DNA. *J Virol*. 70:5909-5915.

Wan, J., L. Sun, J.W. Mendoza, Y.L. Chui, D.P. Huang, Z.J. Chen, N. Suzuki, S. Suzuki, W.C. Yeh, S. Akira, K. Matsumoto, Z.G. Liu, and Z. Wu. 2004. Elucidation of the c-Jun N-terminal kinase pathway mediated by Estein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1. *Mol Cell Biol*. 24:192-199.

Wang, D., D. Liebowitz, and E. Kieff. 1985. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell*. 43:831-840.

Wang, F., S.F. Tsang, M.G. Kurilla, J.I. Cohen, and E. Kieff. 1990. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivates latent membrane protein LMP1. *J Virol*. 64:3407-3416.

Wang, H.G., N. Pathan, I.M. Ethell, S. Krajewski, Y. Yamaguchi, F. Shibasaki, F. McKeon, T. Bobo, T.F. Franke, and J.C. Reed. 1999. Ca2+-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science*. 284:339-343.

Wang, K., and D.J. Klionsky. 2011. Mitochondria removal by autophagy. *Autophagy*. 7:297-300.

Wang, L., S.R. Grossman, and E. Kieff. 2000. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 interacts with p300, CBP, and PCAF histone acetyltransferases in activation of the LMP1 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:430-435.

Wang, S., M. Rowe, and E. Lundgren. 1996. Expression of the Epstein Barr virus transforming protein LMP1 causes a rapid and transient stimulation of the Bcl-2 homologue Mcl-1 levels in B-cell lines. *Cancer Res*. 56:4610-4613.

Wang, X. 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 15:2922-2933.

Watanabe, A., S. Maruo, T. Ito, M. Ito, K.R. Katsumura, and K. Takada. 2010. Epstein-Barr virus-encoded Bcl-2 homologue functions as a survival factor in Wp-restricted Burkitt lymphoma cell line P3HR-1. *J Virol*. 84:2893-2901.

Waters, J.S., A. Webb, D. Cunningham, P.A. Clarke, F. Raynaud, F. di Stefano, and F.E. Cotter. 2000. Phase I clinical and pharmacokinetic study of bcl-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 18:1812-1823.

Wei, Y., S. Pattingre, S. Sinha, M. Bassik, and B. Levine. 2008. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell*. 30:678-688.

Weissmann, D.J., J.A. Ferry, N.L. Harris, D.N. Louis, F. Delmonico, and I. Spiro. 1995. Posttransplantation lymphoproliferative disorders in solid organ recipients are predominantly aggressive tumors of host origin. *Am J Clin Pathol*. 103:748-755.

Wiech, T., E. Nikolopoulos, S. Lassman, T. Heidt, A. Schopflin, M. Sarbia, M. Werner, Y. Shimizu, E. Sakka, T. Ooka, and A. zur Hausen. 2008. Cyclin D1 expression is induced by viral BARF1 and is overexpressed in EBV-associated gastric cancer. *Virchows Arch.* 452:621-627.

Wiels, J., M. Fellous, and T. Tursz. 1981. Monoclonal antibody against a Burkitt lymphoma-associated antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78:6485-6488.

Wilda, M., J. Bruch, L. Harder, D. Rawer, A. Reiter, A. Borkhardt, and W. Woessmann. 2004. Inactivation of the ARF-MDM-2-p53 pathway in sporadic Burkitt's lymphoma in children. *Leukemia.* 18:584-588.

Williams, G.T. 1991. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell.* 65:1097-1098.

Wilson, J.B., J.L. Bell, and A.J. Levine. 1996. Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. *EMBO J.* 15:3117-3126.

Wilson, J.B., and A.J. Levine. 1992. The oncogenic potential of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in transgenic mice. *Curr Top Microbiol Immunol.* 182:375-384.

Wilson, J.B., W. Weinberg, R. Johnson, S. Yuspa, and A.J. Levine. 1990. Expression of the BNLF-1 oncogene of Epstein-Barr virus in the skin of transgenic mice induces hyperplasia and aberrant expression of keratin 6. *Cell.* 61:1315-1327.

Wilson, W.H., O.A. O'Connor, M.S. Czuczman, A.S. LaCasce, J.F. Gerecitano, J.P. Leonard, A. Tulpule, K. Dunleavy, H. Xiong, Y.L. Chiu, Y. Cui, T. Busman, S.W. Elmore, S.H. Rosenberg, A.P. Krivoshik, S.H. Enschede, and R.A. Humerickhouse. 2010. Navitoclax, a targeted high-affinity inhibitor of BCL-2, in lymphoid malignancies: a phase 1 dose-escalation study of safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics, and antitumour activity. *Lancet Oncol.* 11:1149-1159.

Winberg, G., L. Matskova, F. Chen, P. Plant, D. Rotin, G. Gish, R. Ingham, I. Ernberg, and T. Pawson. 2000. Latent membrane protein 2A of Epstein-Barr virus binds WW domain E3 protein-ubiquitin ligases that ubiquitinate B-cell tyrosine kinases. *Mol Cell Biol.* 20:8526-8535.

Wischhusen, J., U. Naumann, H. Ohgaki, F. Rastinejad, and M. Weller. 2003. CP-31398, a novel p53-stabilizing agent, induces p53-dependent and p53-independent glioma cell death. *Oncogene.* 22:8233-8245.

Woisetschlaeger, M., C.N. Yandava, L.A. Furmanski, J.L. Strominger, and S.H. Speck. 1990. Promoter switching in Epstein-Barr virus during the initial stages of infection of B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:1725-1729.

Wolff, H.A., R.M. Rodel, B. Gunawan, T. Overbeck, M.K. Herrmann, S. Hennies, A. Hille, H. Vorwerk, C. Matthias, C.F. Hess, and H. Christiansen. 2010. Nasopharyngeal carcinoma in adults: treatment results after long-term follow-up with special reference to adjuvant interferon-beta in undifferentiated carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol.* 136:89-97.

Wu, D.Y., G.V. Kalpana, S.P. Goff, and W.H. Schubach. 1996. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 (EBNA2) binds to a component of the human SNF-SWI complex, hSNF5/Ini1. *J Virol.* 70:6020-6028.

Wu, D.Y., A. Krumm, and W.H. Schubach. 2000. Promoter-specific targeting of human SWI-SNF complex by Epstein-Barr virus nuclear protein 2. *J Virol.* 74:8893-8903.

Wu, H., P. Kapoor, and L. Frappier. 2002. Separation of the DNA replication, segregation, and transcriptional activation functions of Epstein-Barr nuclear antigen 1. *J Virol.* 76:2480-2490.

Wu, Y., S. Maruo, M. Yajima, T. Kanda, and K. Takada. 2007. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded RNA 2 (EBER2) but not EBER1 plays a critical role in EBV-induced B-cell growth transformation. *J Virol.* 81:11236-11245.

Wunder, J.S., K. Eppert, S.R. Burrow, N. Gokgoz, R.S. Bell, and I.L. Andrulis. 1999. Co-amplification and overexpression of CDK4, SAS and MDM2 occurs frequently in human parosteal osteosarcomas. *Oncogene.* 18:783-788.

Wyllie, A.H., G.J. Beattie, and A.D. Hargreaves. 1981. Chromatin changes in apoptosis. *Histochem J.* 13:681-692.

Xie, Z., and D.J. Klionsky. 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol.* 9:1102-1109.

Xu, J., L. Timares, C. Heilpern, Z. Weng, C. Li, H. Xu, J.G. Pressey, C.A. Elmets, L. Kopelovich, and M. Athar. 2010. Targeting wild-type and mutant p53 with small molecule CP-31398 blocks the growth of rhabdomyosarcoma by inducing reactive oxygen species-dependent apoptosis. *Cancer Res.* 70:6566-6576.

Yajima, M., T. Kanda, and K. Takada. 2005. Critical role of Epstein-Barr Virus (EBV)-encoded RNA in efficient EBV-induced B-lymphocyte growth transformation. *J Virol.* 79:4298-4307.

Yamaguchi, J., Y. Hinuma, and J.T. Grace, Jr. 1967. Structure of virus particles extracted from a Burkitt lymphoma cell line. *J Virol.* 1:640-642.

Yamaguchi, T., K. Matsuda, Y. Sagiya, M. Iwadate, M.A. Fujino, Y. Nakamura, and H. Arakawa. 2001. p53R2-dependent pathway for DNA synthesis in a p53-regulated cell cycle checkpoint. *Cancer Res.* 61:8256-8262.

Yan, C., H. Wang, B. Aggarwal, and D.D. Boyd. 2004. A novel homologous recombination system to study 92 kDa type IV collagenase transcription demonstrates that the NF-kappaB motif drives the transition from a repressed to an activated state of gene expression. *FASEB J.* 18:540-541.

Yanai, H., J. Nishikawa, Y. Mizugaki, N. Shimizu, K. Takada, K. Matsusaki, T. Toda, Y. Matsumoto, M. Tada, and K. Okita. 1997. Endoscopic and pathologic features of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Gastrointest Endosc.* 45:236-242.

Yang, J., X. Liu, K. Bhalla, C.N. Kim, A.M. Ibrado, J. Cai, T.I. Peng, D.P. Jones, and X. Wang. 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* 275:1129-1132.

Yang, Q.H., R. Church-Hajduk, J. Ren, M.L. Newton, and C. Du. 2003. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev.* 17:1487-1496.

Yang, Y., R.L. Ludwig, J.P. Jensen, S.A. Pierre, M.V. Medaglia, I.V. Davydov, Y.J. Safiran, P. Oberoi, J.H. Kenten, A.C. Phillips, A.M. Weissman, and K.H. Vousden. 2005. Small molecule inhibitors of HDM2 ubiquitin ligase activity stabilize and activate p53 in cells. *Cancer Cell.* 7:547-559.

Yew, P.R., and A.J. Berk. 1992. Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature.* 357:82-85.

Yip, K.W., J.D. Mocanu, P.Y. Au, G.T. Sleep, D. Huang, P. Busson, W.C. Yeh, R. Gilbert, B. O'Sullivan, P. Gullane, C. Bastianutto, and F.F. Liu. 2005. Combination bcl-2 antisense and radiation therapy for nasopharyngeal cancer. *Clin Cancer Res.* 11:8131-8144.

Youle, R.J., and A. Strasser. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:47-59.

Young, L.S., and A.B. Rickinson. 2004. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer.* 4:757-768.

Young, L.S., Q.Y. Yao, C.M. Rooney, T.B. Sculley, D.J. Moss, H. Rupani, G. Laux, G.W. Bornkamm, and A.B. Rickinson. 1987. New type B isolates of Epstein-Barr virus from Burkitt's lymphoma and from normal individuals in endemic areas. *J Gen Virol.* 68 (Pt 11):2853-2862.

Yousefi, S., R. Perozzo, I. Schmid, A. Ziemiecki, T. Schaffner, L. Scapozza, T. Brunner, and H.U. Simon. 2006. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol.* 8:1124-1132.

Yu, L., A. Alva, H. Su, P. Dutt, E. Freundt, S. Welsh, E.H. Baehrecke, and M.J. Lenardo. 2004. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science*. 304:1500-1502.

Yu, M.C., and J.M. Yuan. 2002. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol*. 12:421-429.

Yue, Z., S. Jin, C. Yang, A.J. Levine, and N. Heintz. 2003. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:15077-15082.

Zakeri, Z.F., D. Quaglino, T. Latham, and R.A. Lockshin. 1993. Delayed internucleosomal DNA fragmentation in programmed cell death. *FASEB J*. 7:470-478.

Zalckvar, E., H. Berissi, M. Eisenstein, and A. Kimchi. 2009. Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and Bcl-XL. *Autophagy*. 5:720-722.

Zamzami, N., P. Marchetti, M. Castedo, T. Hirsch, S.A. Susin, B. Masse, and G. Kroemer. 1996. Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett*. 384:53-57.

Zhan, Q., M.J. Antinore, X.W. Wang, F. Carrier, M.L. Smith, C.C. Harris, and A.J. Fornace, Jr. 1999. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene*. 18:2892-2900.

Zhang, J., H. Chen, G. Weinmaster, and S.D. Hayward. 2001. Epstein-Barr virus BamHi-a rightward transcript-encoded RPMS protein interacts with the CBF1-associated corepressor CIR to negatively regulate the activity of EBNA2 and NotchIC. *J Virol*. 75:2946-2956.

Zhang, M., H. Liu, Z. Tian, B.N. Griffith, M. Ji, and Q.Q. Li. 2007. Gossypol induces apoptosis in human PC-3 prostate cancer cells by modulating caspase-dependent and caspase-independent cell death pathways. *Life Sci*. 80:767-774.

Zhang, X., L. Li, S. Chen, D. Yang, Y. Wang, Z. Wang, and W. Le. 2011. Rapamycin treatment augments motor neuron degeneration in SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Autophagy*. 7:412-425.

Zhao, L.Y., and D. Liao. 2003. Sequestration of p53 in the cytoplasm by adenovirus type 12 E1B 55-kilodalton oncoprotein is required for inhibition of p53-mediated apoptosis. *J Virol*. 77:13171-13181.

Zindy, F., C.M. Eischen, D.H. Randle, T. Kamijo, J.L. Cleveland, C.J. Sherr, and M.F. Roussel. 1998. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev*. 12:2424-2433.

zur Hausen, H., F.J. O'Neill, U.K. Freese, and E. Hecker. 1978. Persisting oncogenic herpesvirus induced by the tumour promotor TPA. *Nature*. 272:373-375.

zur Hausen, H., H. Schulte-Holthausen, G. Klein, W. Henle, G. Henle, P. Clifford, and L. Santesson. 1970. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature*. 228:1056-1058.

ANNEXES

Leukemia (2009) 23, 1557–1563
© 2009 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0887-6924/09 $32.00
www.nature.com/leu

ORIGINAL ARTICLE

Activation of p53 by MDM2 antagonists has differential apoptotic effects on Epstein–Barr virus (EBV)-positive and EBV-negative Burkitt's lymphoma cells

B Renouf[1], É Hollville, A Pujals, C Tétaud, J Garibal and J Wiels

UMR 8126 CNRS, Univ Paris-Sud, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

p53 inactivation is often observed in Burkitt's lymphoma (BL) cells, because of either mutations in *p53* gene or an overexpression of the p53-negative regulator MDM2. Epstein–Barr virus (EBV) is present in virtually 100% of BL cases occurring in endemic areas, but in only 10–20% of sporadic cases. In EBV(−) BL cells, reactivation of p53, induced by reducing MDM2 protein level, led to apoptosis. We show here that nutlin-3, a potent antagonist of MDM2, activates the p53 pathway in all BL cell lines harboring wild-type p53, regardless of EBV status. However, nutlin-3 strongly induced apoptosis in EBV(−) or latency I EBV(+) cells, whereas latency III EBV(+) cells were much more resistant. Prior treatment with sublethal doses of nutlin-3 sensitizes EBV(−) or latency I EBV(+) cells to apoptosis induced by etoposide or melphalan, but protects latency III EBV(+) cells. $p21^{WAF1}$ which is overexpressed in the latter, is involved in this protective effect, as siRNA-mediated inhibition of $p21^{WAF1}$ restores sensitivity to etoposide. Nutlin-3 protects latency III BL cells by inducing a $p21^{WAF1}$-mediated G1 arrest. Most BL patients with wild-type p53 tumors could therefore benefit from treatment with nutlin-3, after a careful determination of the latency pattern of EBV in infected patients.
Leukemia (2009) **23,** 1557–1563; doi:10.1038/leu.2009.92; published online 7 May 2009
Keywords: p53; nutlin-3; Burkitt's lymphoma; EBV; $p21^{WAF1}$

Introduction

The p53 tumor suppressor is a transcription factor that is activated in response to DNA damage or cellular stress and regulates many target genes involved in controlling DNA repair, cell-cycle arrest and apoptosis.[1,2] This physiological function of p53 is frequently altered in tumor cells through mutation, cytoplasmic sequestration, interaction with viral oncoproteins or increased interactions with its main cellular regulator, MDM2.[3]

MDM2 is a 90-kDa protein that binds to the NH_2 terminus of p53, blocking its transcriptional activities. It is also an E3-ubiquitin ligase involved in the ubiquitination of p53, leading to both proteasomal degradation and relocation of p53 from the nucleus to the cytoplasm. However, MDM2 is the product of a *p53*-inducible gene, so these two proteins constitute an autoregulatory feedback loop that plays an essential role in the activation of p53.[4,5] The overexpression of MDM2, leading to p53 inactivation, has been observed in various types of cancer.[6–9] Given the key role of p53 in determining cell fate, several strategies for disrupting the p53–MDM2 interaction have been explored.[10,11] Recently, potent, stable and selective small-molecule antagonists of MDM2 have been synthesized. Among these molecules, nutlins are *cis*-imidazoline compounds that bind to MDM2, thereby preventing its molecular interaction with p53 and inducing activation of the p53 pathway.[12] Nutlin-3 has been shown to trigger apoptosis in various tumor cells *in vitro*,[13,14] to inhibit tumor growth *in vivo*[12] and to synergize with genotoxic drugs (such as alkylating agents or topoisomerase II inhibitors) and irradiation in cancer therapy.[15–20]

Burkitt's lymphoma (BL) is a monoclonal B-cell tumor characterized by chromosomal translocations affecting the proto-oncogene *c-myc* locus and the immunoglobulin (Ig) heavy or light chain genes, thereby leading to deregulation of *c-myc*. In addition, most BL cell lines and at least 30% of BL biopsy samples display p53 mutations, resulting in the inactivation of this gene.[21] We and others earlier investigated the status of MDM2 and p53 in BL cell lines or biopsy samples and found that, in several cases containing wild-type (wt) p53, the function of this protein was compromised by the overexpression of MDM2.[8,22] Finally, another study has shown that $p14^{ARF}$, which regulates the function of p53, is frequently altered in BL cell lines carrying wt p53.[23] All these data clearly demonstrate that disruption of the p53 pathway contributes to BL development.[24,25] They also suggest that the restoration of wt p53 function in BL cells may be an efficient treatment strategy, at least in patients with cancers resistant to standard chemotherapy treatments. Using anti sense (AS) oligodeoxynucleotides, we showed earlier that AS against MDM2 indeed induced p53-dependent apoptosis in BL cells containing wt p53 and large amounts of MDM2.[26]

The aim of this study was to investigate further the consequences of activating wt p53 in BL cell lines and to determine whether Epstein–Barr virus (EBV) infection of these cells had any effect on these consequences. Indeed, the EBV genome is present in more than 95% of endemic BL cases (in Equatorial Africa and Papua New Guinea) and in 10–20% of all sporadic cases worldwide. The viral infection remains latent in tumor cells, with only a very small number of viral proteins produced.[27] Most EBV-infected BL cells have the latency I phenotype (Epstein-Barr nuclear antigen 1 (EBNA1) is the only viral protein produced). However, cases with the latency III profile (all latent EBV proteins are produced: EBNA1, 2, 3a, 3b, 3c, Epstein-Barr nuclear antigen-leader protein (EBNA-LP), latent membrane protein 1 (LMP1) and LMP2)) or with unusual forms of latency have also been identified.[28,29]

Latent EBV does not specifically target p53, but it nonetheless interferes with cell-cycle checkpoints regulated by p53 in the G1/S and G2/M phases[30,31] and modulates p53-induced apoptosis.[32] We show here that, regardless of EBV status, the treatment of BL cells with nutlin-3 induces p53 activation. However, we also show that induction of apoptosis or sensitization to genotoxic drugs by nutlin-3 is clearly different between EBV(−) or EBV(+) latency I BL cells and EBV(+) latency III cells.

Correspondence: Dr J Wiels, UMR CNRS 8126, Institut Gustave Roussy, rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif cedex, France.
E-mail: wiels@igr.fr
[1]Current address: INSERM U682, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg, France
Received 1 September 2008; revised 23 March 2009; accepted 31 March 2009; published online 7 May 2009

Materials and methods

Cell lines

All cell lines were originally established from endemic or sporadic cases of BL. BL2, BL7, BL28, BL2/B95 and LY47 were kindly provided by the International Agency for Research on Cancer (IARC, Lyon, France); Seraphina and P3HR1 were a gift from Professor G Klein (Karolinska Institute, Stockholm, Sweden); Ramos was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, IN, USA). BL2/B95 cells were generated by stable infection of the original EBV(−) BL2 cells with the B95-8 EBV strain. These cell lines were cultured in RPMI 1640 medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) containing 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 20 mM glucose, 20 μg/ml gentamycin and supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum.

Antibodies and reagents

Nutlin-3 was obtained from Cayman Chemical (SPI-Bio, Montigny-le-Bretonneux, France); etoposide (an inhibitor of topo-isomerase II), melphalan (an alkylating agent) and Cdk2 inhibitor (SU 9516) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Antibodies and their sources were as shown in Supplementary information.

Small interfering RNA (siRNA) and transfection

$p21^{WAF1}$ siRNA stealth (5′-GGACCUGUCACUGUCUUGU ACCCUU-3′) and negative control siRNA (GC medium control) were purchased from Invitrogen. We electroporated (25 ms, 130 V) 2×10^6 cells with 3 μg of siRNA in 100 μl of Viaspan medium (Dupont Pharmaceuticals, Paris, France). Cells were incubated for 24 h and used for further experiments.

Induction of apoptosis and its quantification

We treated 0.5×10^6 cells for various periods of time at 37 °C with nutlin-3 (2 or 10 μM), etoposide (2.5 or 10 μM) or melphalan (12.5 μM) in 1 ml of complete RPMI medium. Cells were washed in PBS, resuspended in annexin buffer (10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)/NaOH, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$ and 1.8 mM $CaCl_2$) supplemented with 2.5 μg/ml FITC-labeled annexin-V (Roche Applied Science, Meylan, France) and incubated at 4 °C for 10 min. Cells were then washed, resuspended in annexin buffer supplemented with propidium iodide (PI) (10 μg/ml) and analyzed by flow cytometry (FACSCalibur, Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France).

Cell-cycle analysis

Cells were fixed by incubating in 70% ethanol at –20 °C for at least 30 min, washed twice in PBS and incubated for 30 min at 37 °C in 20 mM EDTA, 100 μg/ml RNase A (Sigma-Aldrich) and 10 μg/ml PI in PBS. DNA content was determined by flow cytometry.

Western-blot analysis

A pellet containing 0.5×10^6 cells was solubilized by incubating in ice-cold lysis buffer (25 mM Tris-HCl, pH 6.8, 1% SDS, 50 mM dithiothreitol and complete protease inhibitor) for 10 min. Sample loading buffer was added and the mixture was boiled for 5 min. Proteins were separated by electrophoresis in 12% polyacrylamide gels or 4–12% Bis–Tris precast gels (Invitrogen) and then transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore, Molsheim, France). Blots were blocked by incubation overnight at 4 °C in 3% non-fat milk powder, 2% glycine in PBS and incubated for 1 h at room temperature with primary antibodies. The blots were washed and incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit anti-mouse (RAM)-IgG or HRP-conjugated donkey anti-rabbit (DAR)-IgG. Antibody complexes were detected by enhanced chemiluminescence (Millipore).

Results

Nutlin-3 induces high levels of apoptosis in EBV(−) or EBV(+) latency I BL cells and moderate levels in EBV(+) latency III cells

As we aimed to determine whether the EBV status of BL cells played a role in their fate following p53 activation, we first assessed the levels of various latent EBV proteins in six cell lines containing wt p53.[8] Western-blot analysis of protein extracts showed that BL2 and BL28 cells contained none of the EBNA proteins tested, BL7 contained only EBNA1, whereas BL2/B95, LY47 and Seraphina contained different isoforms of EBNA1, EBNA2 and EBNA-LP (Figure 1a). These results confirmed that BL2 and BL28 cells were EBV(−),[33] and indicated that BL7 cells displayed type I latency, whereas BL2/B95, LY47 and Seraphina cells displayed type III latency. These cell lines, together with the EBV(−) Ramos and EBV(+) P3HR1 cell lines, both of which carrying a mutant *p53* gene, were then treated with nutlin-3 (10 μM) for 24 h and apoptosis was assessed (by flow cytometry, after labeling the cells with annexin-V-FITC and PI). As shown in Figure 1b, BL2, BL28 and BL7 were highly sensitive to nutlin-3 treatment (93 ± 4, 100 ± 0 and 89 ± 1% apoptotic cells, respectively), whereas BL2/B95, Seraphina and LY47 were more resistant (28 ± 1, 27 ± 4 and 39 ± 7% apoptotic cells, respectively). As expected, Ramos and P3HR1 were totally resistant to nutlin-3 treatment.

Nutlin-3 activates the p53 pathway similarly in all BL cell lines

The differences observed in the apoptotic responses of BL cells carrying wt p53 and having different EBV status raised questions as to whether nutlin-3 activates p53 similarly in all these cell lines. We treated the six BL cell lines with nutlin-3 for various periods of time and then carried out western blotting to determine the levels of p53, $p21^{WAF1}$, MDM2 and Bax, the last three of these proteins being encoded by *p53* target genes (Figure 1c). Specific bands were then quantified by densitometric analysis and normalized to β-actin level. Protein levels after 3, 7 and 24 h of treatment relative to levels before treatment are shown in Supplementary Figure 1. In all BL cell lines, 3 h of treatment with nutlin-3 induced the accumulation of p53, which then either remained stable or gradually increased (except in BL28, in which p53 level decreased after 24 h). Treatment with nutlin-3 for 3 or 7 h induced an increase in MDM2 levels, followed by a decrease in all cell lines except in Ly47 (in which MDM2 level remained high). The ability of MDM2 to ubiquitinate itself and induce its own degradation[4] is probably responsible for this decrease in MDM2 levels. $p21^{WAF1}$ protein accumulated in all cell lines after 3 and 7 h of treatment with nutlin-3 and then decreased (BL28), remained stable (BL2, BL7and BL2/B95) or increased (Seraphina and Ly47). In all BL cell lines, treatment with nutlin-3 induced a slower, but gradual increase in Bax levels until 24 h of treatment. This observation of a slower induction of Bax by p53, as compared with $p21^{WAF1}$

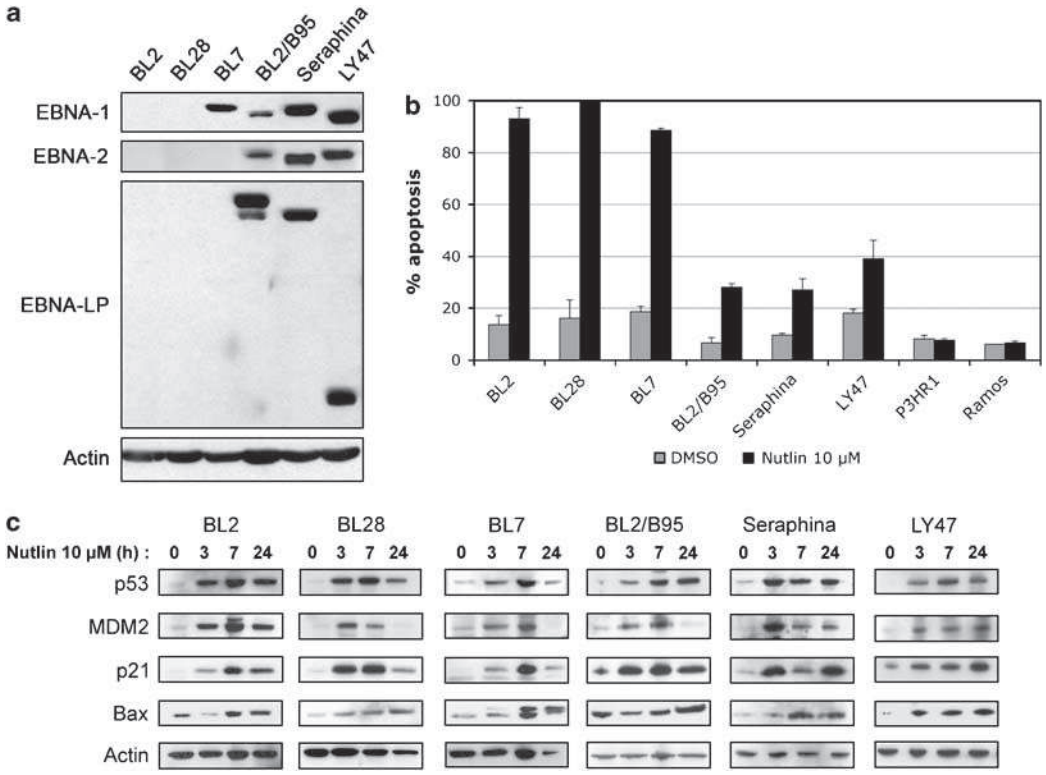


Figure 1 Effect of nutlin-3 on p53 activation and apoptosis induction in Epstein–Barr virus (EBV)(−) and EBV(+) Burkitt's lymphoma (BL) cell lines. (**a**) Expression of various EBV latent proteins. Whole-cell lysates were subjected to western-blot analysis with 4D3 anti-EBNA-LP monoclonal antibody (mAb), 1H4 anti-EBNA1 mAb, PE2 anti-EBNA2 mAb or an anti-β-actin mAb (as a control for protein loading). (**b**) BL cells were treated with 10 µM of nutlin-3 or the solvent dimethyl sulfoxide (DMSO) for 24 h. The cells were labeled with annexin V-FITC and PI and analyzed with a FACSCalibur flow cytometer to determine the percentage of apoptotic cells. (**c**) BL cells were treated with 10 µM of nutlin-3 for the indicated periods of time. The levels of p53, MDM2, $p21^{WAF1}$ and Bax proteins were assessed by western-blot analysis (control for protein loading was done with an anti-β-actin mAb). The results of western blots are representative of three independent experiments.

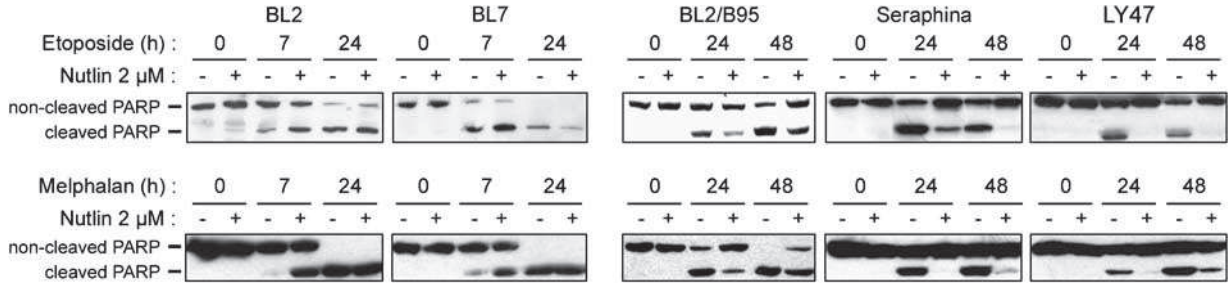


Figure 2 Nutlin-3 increases etoposide-induced apoptosis in Epstein–Barr virus (EBV)(−) and EBV(+) latency I Burkitt's lymphoma (BL) cells, but protects EBV(+) latency III cells. BL cells were treated or not with 2 µM of nutlin-3 for 24 h and then treated with etoposide (BL2, BL7 and BL2/B95: 2.5 µM; Seraphina and LY47: 10 µM) (upper panel) or with 12.5 µM of melphalan (lower panel) for the indicated periods of time. Apoptosis levels were determined by assessing polyadenosine diphosphate-ribose polymerase (PARP) cleavage on western blots and are representative of three independent experiments.

and MDM2, is in agreement with earlier results.[34] Altogether these results indicate that activation of the p53 pathway is not correlated with the EBV status of the cells.

Nutlin-3 increases drug-induced apoptosis in EBV(−) and EBV(+) latency I BL cells, but protects EBV(+) latency III cells

Synergistic effects of nutlin-3 and chemotherapeutic agents have been reported in various types of cancer with functional wt p53.[16–18] We therefore treated the BL cell lines with etoposide, with and without prior nutlin treatment. In order to compare the three types of BL cells, they were treated with a dose of nutlin-3 (2 µM), sublethal for all cell lines, but which, however, induced p53 activation (data not shown). After this initial treatment for 24 h, the cells were incubated for various periods of time (7, 24 and 48 h) with etoposide. Apoptosis levels were determined by assessing the cleavage of polyadenosine diphosphate ribose polymerase (PARP) by western blots (Figure 2 upper panel). EBV(−) BL2 and EBV(+) latency I BL7 cells were highly sensitive to 7 and 24 h of treatment with etoposide alone and prior treatment with nutlin-3 slightly increased the effect of this drug. Latency III cells were less sensitive to etoposide than EBV(−) or latency I cells and were thus treated for longer periods

of time (24 and 48 h), and for Seraphina and LY47 cells with higher doses of etoposide (10 μM instead of 2.5 μM). After 24 and 48 h of treatment with etoposide alone, the 85-kDa PARP cleavage product was detected in the protein extracts. Surprisingly, the pre-treatment of latency III cells with nutlin-3 did not sensitize these cells to etoposide-induced apoptosis. Instead, such prior treatment significantly protected the cells against apoptosis: PARP cleavage either occurred at much lower rates than in the absence of prior treatment or was not detectable. These differential effects of prior treatment with nutlin-3 on etoposide-induced apoptosis were then confirmed by quantifying apoptosis by flow cytometry analysis of the BL cells labeled with annexin-V-FITC and PI (Supplementary Figure 2).

We also investigated the effect of prior treatment with nutlin-3 on melphalan-induced apoptosis of BL cells. Apoptosis levels were determined by assessing PARP cleavage on western blots (Figure 2 lower panel). In EBV(−) BL2 and EBV(+) latency I BL7 cells, treatment with nutlin-3 did not induce PARP cleavage, but prior treatment with this compound strongly increased PARP cleavage induced by 7 h of treatment with melphalan. In contrast, prior treatment with nutlin-3 of latency III BL2/B95, Seraphina and LY47 cells reduced PARP cleavage induced by melphalan. Thus, in EBV(+) latency III BL cells, nutlin-3 and chemotherapeutic drugs did not synergize to induce apoptosis. Instead, nutlin-3 protected these tumor cells from drug-induced apoptosis.

Nutlin-3 induces cell-cycle arrest in EBV(+) latency III BL cells, but not in EBV(−) or latency I BL cells

$p21^{WAF1}$ protein, a cyclin-dependent kinase inhibitor, is a key regulator of the cell cycle and is also known to interfere with both p53-dependent and p53-independent apoptotic pathways.[35,36] We therefore investigated the role of this protein in our model of drug-induced apoptosis. We first compared basal levels of $p21^{WAF1}$ protein in the various BL cell lines. Latency III cells (BL2/B95, Seraphina and LY47) contained very large amounts of $p21^{WAF1}$, whereas EBV(−) and latency I cells (BL2 and BL7) had very low levels of this protein (Figure 3a). We then analyzed the effect of nutlin-3 treatment (at the sublethal dose of 2 μM) on cell-cycle progression of the various BL cells. As shown in Figure 3b, treatment with nutlin-3 for 24 h had almost no effect on EBV(−) BL2 and latency I BL7 cells (other than a slight increase in the number of sub-G1 apoptotic cells for BL2). By contrast, comparison of untreated and treated cells clearly shows that nutlin-3 induced the accumulation of latency III BL cells in G1 phase (78% *vs* 49% for BL2/B95, 76% *vs* 58% for Seraphina and 62% *vs* 50% for LY47). Thus, in EBV(+) latency III BL cells, which express high amount of $p21^{WAF1}$ protein, low doses of nutlin-3 induce cell-cycle arrest in G1 phase.

Etoposide resistance conferred by nutlin-3 pre-treatment depends on $p21^{WAF1}$ protein level and on induction of cell-cycle arrest

We next investigated the role of the $p21^{WAF1}$ protein in the protection against drug-induced apoptosis, generated in latency III BL cells by prior treatment with nutlin-3. To this end, we used cells in which $p21^{WAF1}$ expression had been inhibited by a specific siRNA. The cells were first electroporated with $p21^{WAF1}$ siRNA or control siRNA; 24 h later, cells were or were not treated with nutlin-3 for 24 h, and all cells were then treated with etoposide (2.5 or 10 μM) for 24 h. Apoptosis levels were determined by quantifying PARP cleavage on western blots (Figure 4a). In all latency III BL cells electroporated with control siRNA, etoposide treatment alone induced PARP cleavage and prior treatment with nutlin-3 gave complete protection against etoposide. The inhibition of $p21^{WAF1}$ expression with a specific

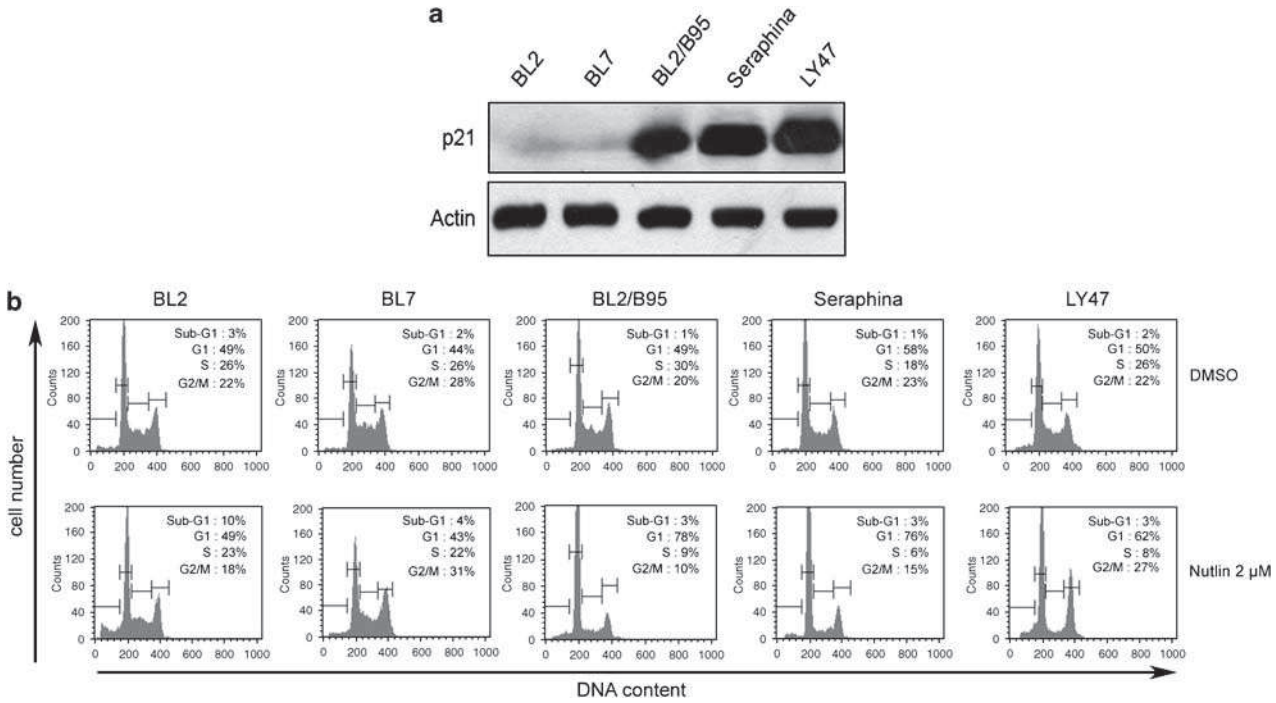


Figure 3 Nutlin-3 induces cell-cycle arrest in Epstein–Barr virus (EBV)(+) latency III Burkitt's lymphoma (BL) cells, but not in EBV(−) or latency I BL cells. (**a**) $p21^{WAF1}$ protein levels in the various BL cells. Whole-cell lysates were subjected to western-blot analysis with an anti-$p21^{WAF1}$ or an anti-β-actin monoclonal antibody (mAb) (as a control for protein loading). (**b**) Cell-cycle analysis after treatment with nutlin-3. BL cells were treated with 2 μM of nutlin-3 for 24 h and their DNA content was determined by PI labeling and flow cytometry analysis. Results shown are representative of three independent experiments.

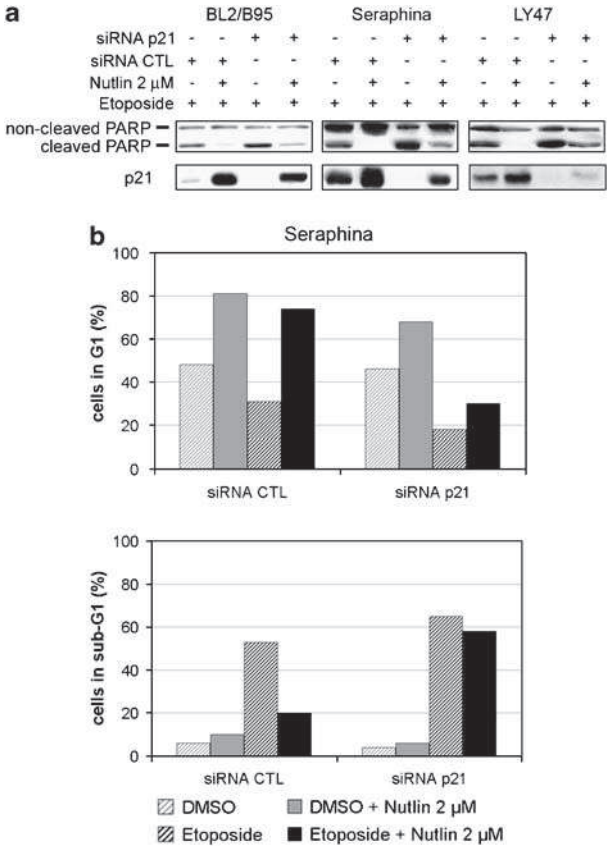


Figure 4 Resistance to etoposide induced by nutlin-3 depends on $p21^{WAF1}$ protein level and on induction of G1 arrest. (**a**) Latency III Epstein–Barr virus (EBV)(+) cells were electroporated with small interfering RNA (siRNA) targeting $p21^{WAF1}$ or with control siRNA and 24 h later, cells were treated or not with 2 μM of nutlin-3 for 24 h. All cells were then treated with etoposide BL2/B95: 2.5 μM; Seraphina and LY47: 10 μM) for 24 h. $P21^{WAF1}$ protein level and PARP cleavage were assessed by western blot analysis. (**b**) Seraphina cells were treated as in (**a**) except for etoposide treatment, which was for 48 h. Cells in G1 and sub-G1 phases were then quantified after PI labeling and flow cytometry analysis. Results shown are representative of at least three independent experiments.

siRNA increased the etoposide-induced PARP cleavage and decreased the protection against etoposide conferred by nutlin-3 (the PARP cleavage product was clearly detected in all cells). Western blots for $p21^{WAF1}$ confirmed that the $p21^{WAF1}$ siRNA efficiently inhibited the expression of this protein, even when its level was increased following activation of p53 by nutlin-3 treatment (Figure 4a). Altogether, our data indicate that BL cells with low levels of $p21^{WAF1}$ (BL2, BL7 and $p21^{WAF1}$ siRNA-treated latency III cells) are more sensitive to drug-induced apoptosis than cells with high levels of $p21^{WAF1}$ (latency III cells) and also that, in these latter cells, nutlin-3 further enhances their resistance by increasing the level of $p21^{WAF1}$.

We then determined whether the increased resistance to drugs, induced in the latency III BL cells by nutlin-3, is related to the ability of this compound to induce cell-cycle arrest. Seraphina cells were electroporated with $p21^{WAF1}$ siRNA or control siRNA and 24 h later, cells were or were not treated with nutlin-3 for another 24 h. Cells were then treated or not with etoposide for 48 h and the cell cycle was analyzed. The percentages of cells in G1 phase and in sub-G1 phase (apoptotic cells) are shown in Figure 4b. Prior treatment with nutlin-3 of

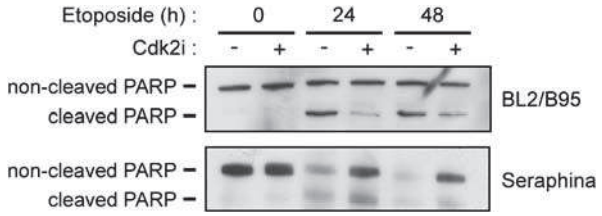


Figure 5 A cyclin-dependent kinase (Cdk2) inhibitor protects latency III Burkitt's lymphoma (BL) cells from etoposide-induced apoptosis. BL cells were treated with 4 μM of Cdk2 inhibitor SU 9516 for 24 h and then treated with etoposide (BL2/B95: 2.5 μM; Seraphina: 10 μM) for the indicated periods of time. Apoptosis levels were determined by assessing polyadenosine diphosphate-ribose polymerase (PARP) cleavage on western blots and are representative of three independent experiments.

cells electroporated with control siRNA induced a strong G1 arrest (81%), which persisted after etoposide treatment (74%). In these nutlin-3 pre-treated cells, etoposide induced a low level of apoptosis as compared with non-pre-treated cells (20% *vs* 53% of cells in sub-G1). By contrast, pre-treatment with nutlin-3 of cells with low levels of $p21^{WAF1}$ (cells electroporated with $p21^{WAF1}$ siRNA) induced a lower G1 arrest (68%) and this arrest was not maintained after etoposide treatment (30%). These nutlin-3 pre-treated cells entered apoptosis (58%) similar to non-pre-treated cells (65%). Together with the previous cell-cycle data, these results indicate that the $p21^{WAF1}$-mediated G1 arrest induced by nutlin-3 in latency III BL cells is responsible for the protective effect of this compound against drug-induced apoptosis. They also show that this protection highly depends on the high basal level of $p21^{WAF1}$ protein in the cells.

A cyclin-dependent kinase inhibitor protects latency III BL cells from etoposide-induced apoptosis

$p21^{WAF1}$ induces cell-cycle arrest by interacting with and inhibiting cyclin–cdk complexes, especially those containing Cdk2. We thus assessed the effect of a pharmacological inhibitor of Cdk2 on etoposide-induced apoptosis of latency III BL cells. Cells were treated for 24 h with an inhibitor of Cdk2 (Cdk2i) and then with etoposide for 24 and 48 h. Apoptosis was measured by flow cytometry after labeling the cells with annexin-V–FITC and PI (Supplementary Figure 3) and by assessing PARP cleavage on western blots (Figure 5). For LY47 cells, prior treatment with Cdk2i induced only a slight protection in cells treated with etoposide (mostly after 48 h), but for BL2/B95 and Seraphina cells, prior treatment with Cdk2i clearly induced resistance to etoposide. Indeed, in these cells, reduced numbers of apoptotic cells and decreased amounts of the 85-kDa cleaved PARP were observed after 24 and 48 h of treatment with etoposide, as compared with non-pre-treated cells. These results, showing that treatment with a specific inhibitor of Cdk2 protects latency III BL cells against drug-induced apoptosis, support our conclusion concerning the protective action of nutlin-3 through cell-cycle arrest.

Discussion

We showed that nutlin-3, a specific inhibitor of the p53–MDM2 interaction, stabilized and activated p53 in all BL cells containing wt p53. However, we also showed that the level of apoptosis induced by nutlin-3-mediated p53 activation depended on the EBV status of the cells. Nutlin-3 has been shown to synergize

with genotoxic drugs or radiation in several types of tumor cells containing wt p53.[16–20] We therefore investigated the effects of nutlin-3 in combination with various chemotherapeutic drugs, and showed that nutlin-3 sensitized EBV(−) or latency I EBV(+) BL cells to these drugs, but protected latency III EBV(+) cells against their effects. We also found that the siRNA-mediated inhibition of $p21^{WAF1}$ decreased the protection to drug-induced apoptosis conferred by treatment with nutlin-3. Finally, we showed that the ability of $p21^{WAF1}$ to arrest latency III EBV(+) cells in the G1 phase of the cell cycle after treatment with nutlin-3 was responsible for the protective effect of this compound.

The anti-tumoral action of nutlin-3 and its synergistic effects with various types of drugs or radiation have been amply demonstrated by both *in vitro* studies on human cells and *in vivo* studies in animal models.[37] As p53 is rarely mutated in hematologic malignancies, many studies have been carried out on various types of tumor cell, including chronic lymphocytic leukemia B cells (B-CLL),[18,20] myeloma,[14] Kaposi sarcoma herpes virus (KHSV)-induced lymphoma[13,38] and Hodgkin's lymphoma.[19] In some cases, nutlin-3 is also able to induce apoptosis in p53-inactivated cells through a p73-dependent mechanism[39] and, as shown recently in a mantle cell lymphoma cell line carrying mutated p53, to synergize with drugs.[40] All these studies have suggested that nutlin-3 may indeed be considered, alone or in combination with various genotoxic drugs, as a novel therapeutic approach for patients. We show here that this approach could also be considered for patients with BL, at least for those who are not infected with EBV. For EBV(+) latency I BL cells, more samples would need to be tested before considering to use such treatments. However, it is interesting to note that recent reports on primary effusion lymphoma (PEL) cells treated with nutlin-3 are in line with our results.[13,38] PEL cells are always infected with a transforming human γ herpes virus (HHV) called Kaposi's sarcoma herpes virus (KSHV/HHV8) and often co-infected with EBV.[41] These cells, which have a latency I phenotype, as well as EBV(−) PEL cells are very sensitive to nutlin-3-induced apoptosis.

Our data also showed that nutlin-3 had different cytotoxic properties in different cells. In particular, this compound may sensitize cells to chemotherapy or, on the contrary, partially protect tumor cells from chemotherapy. Other studies have reported protective effects of nutlin-3 against drugs. For example, nutlin-3 has been reported to have a p53-independent cytoprotective effect: the treatment of normal kidney with nutlin-3 blocks Bax and Bak activation, abolishing the apoptosis induced by cisplatin.[42] However, it has also been suggested that the cell-cycle arrest function of p53 induced by nutlin-3 could be used to eliminate unwanted side effects of chemotherapy in patients with cancer cells expressing a mutant p53. The treatment of normal human fibroblasts (or tumor cells containing wt p53) with nutlin-3 has been shown to induce cell-cycle arrest, protecting these cells against the effects of mitotic inhibitors or S-phase-specific chemotherapy. By contrast, prior treatment with nutlin-3 did not prevent tumor cells containing mutant p53 from undergoing apoptosis after chemotherapy of this type, because the cells were not blocked in the G1- or G2-phases.[43,44] These data highlight the importance of identifying patients with tumors containing both wt p53 and a preserved downstream p53 apoptotic signaling before treatment.

Our results demonstrate a previously unknown aspect of the anti-tumor potential of nutlin-3 combined with drug treatment. Indeed, we showed that functional $p21^{WAF1}$ protein levels may be considered as an indicator of nutlin-3 efficiency. In cells with very high basal levels of $p21^{WAF1}$, nutlin-3 treatment increased $p21^{WAF1}$ levels further, resulting in a strong G1-phase arrest and a decrease in the number of cells undergoing genotoxic drug-induced apoptosis. $p21^{WAF1}$ has been described as a negative regulator of p53-dependent apoptosis. For example, $p21^{WAF1}$ overexpression has been shown to protect osteosarcoma cells from etoposide treatment[45] and $p21^{WAF1}$-null tumor cells have been reported to undergo apoptosis after treatment with doxorubicin, whereas cells with intact or transfected $p21^{WAF1}$ do not.[46,47] In BL cells, the intrinsically low sensitivity of EBV(+) latency III cells to etoposide and melphalan (see Figure 2) is probably, at least partly, because of the high levels of $p21^{WAF1}$ in these cells.

The precise role of EBV in the $p21^{WAF1}$ overexpression and differential sensitivity of cells remains to be determined. The EBNA2 viral protein has been shown to induce $p21^{WAF1}$ production in various types of cell.[48] It, therefore, could be hypothesized that EBNA2 is involved in the resistance of latency III BL cells to drugs. However, other studies have shown that lymphoblastoid cell lines (LCLs) and EBV-infected primary B cells, both of which have a latency III phenotype (and therefore produce EBNA2), undergo apoptosis in response to various DNA-damaging agents.[30,49,50] These studies also reported that p53 is activated, but newly synthesized $p21^{WAF1}$ does not accumulate in treated cells. In accordance with these observations, we recently obtained preliminary data showing that, in contrast to what has been observed in latency III BL cells, the treatment of various lymphoblastoid cell lines (LCLs) (that also have high basal levels of $p21^{WAF1}$) with nutlin-3, rather than protecting cells against etoposide, actually had a synergistic effect with this drug in the induction of apoptosis. Our results therefore indicate that $p21^{WAF1}$-mediated inhibition of drug-induced apoptosis in cells containing wt p53 is dependent on a certain specific cellular context.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Fondation de France 2002004543 (JW); Association pour la recherche sur le Cancer 3454 (JW and EH); Société Française du cancer and Société Française d'Hématologie (BR). We thank Yann Lécluse for expert technical assistance in performing flow cytometry analysis.

References

1 Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 2005; **24**: 2899–2908.
2 Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; **408**: 307–310.
3 Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 594–604.
4 Iwakuma T, Lozano G. MDM2, an introduction. *Mol Cancer Res* 2003; **1**: 993–1000.
5 Bond GL, Hu W, Levine AJ. MDM2 is a central node in the p53 pathway: 12 years and counting. *Curr Cancer Drug Targets* 2005; **5**: 3–8.
6 Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992; **358**: 80–83.
7 Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC *et al*. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* 2004; **119**: 591–602.
8 Capoulade C, Bressac-de Paillerets B, Lefrere I, Ronsin M, Feunteun J, Tursz T *et al*. Overexpression of MDM2, due to enhanced translation, results in inactivation of wild-type p53 in Burkitt's lymphoma cells. *Oncogene* 1998; **16**: 1603–1610.

9 Landers JE, Cassel SL, George DL. Translational enhancement of MDM2 oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein. *Cancer Res* 1997; **57**: 3562–3568.
10 Zhang R, Wang H. MDM2 oncogene as a novel target for human cancer therapy. *Curr Pharm Des* 2000; **6**: 393–416.
11 Yang Y, Ludwig RL, Jensen JP, Pierre SA, Medaglia MV, Davydov IV *et al.* Small molecule inhibitors of HDM2 ubiquitin ligase activity stabilize and activate p53 in cells. *Cancer Cell* 2005; **7**: 547–559.
12 Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z *et al. In vivo* activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004; **303**: 844–848.
13 Sarek G, Kurki S, Enback J, Iotzova G, Haas J, Laakkonen P *et al.* Reactivation of the p53 pathway as a treatment modality for KSHV-induced lymphomas. *J Clin Invest* 2007; **117**: 1019–1028.
14 Stuhmer T, Chatterjee M, Hildebrandt M, Herrmann P, Gollasch H, Gerecke C *et al.* Non-genotoxic activation of the p53 pathway as a therapeutic strategy for multiple myeloma. *Blood* 2005; **106**: 3609–3617.
15 Ambrosini G, Sambol EB, Carvajal D, Vassilev LT, Singer S, Schwartz GK. Mouse double minute antagonist Nutlin-3a enhances chemotherapy-induced apoptosis in cancer cells with mutant p53 by activating E2F1. *Oncogene* 2007; **26**: 3473–3481.
16 Barbieri E, Mehta P, Chen Z, Zhang L, Slack A, Berg S *et al.* MDM2 inhibition sensitizes neuroblastoma to chemotherapy-induced apoptotic cell death. *Mol Cancer Ther* 2006; **5**: 2358–2365.
17 Cao C, Shinohara ET, Subhawong TK, Geng L, Woon Kim K, Albert JM *et al.* Radiosensitization of lung cancer by Nutlin, an inhibitor of murine double minute 2. *Mol Cancer Ther* 2006; **5**: 411–417.
18 Coll-Mulet L, Iglesias-Serret D, Santidrian AF, Cosialls AM, de Frias M, Castano E *et al.* MDM2 antagonists activate p53 and synergize with genotoxic drugs in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2006; **107**: 4109–4114.
19 Drakos E, Thomaides A, Medeiros LJ, Li J, Leventaki V, Konopleva M *et al.* Inhibition of p53-murine double minute 2 interaction by Nutlin-3A stabilizes p53 and induces cell cycle arrest and apoptosis in Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 3380–3387.
20 Secchiero P, Barbarotto E, Tiribelli M, Zerbinati C, di Iasio MG, Gonelli A *et al.* Functional integrity of the p53-mediated apoptotic pathway induced by the nongenotoxic agent nutlin-3 in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* 2006; **107**: 4122–4129.
21 Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, Inghirami G, Neri A, Newcomb EW *et al.* p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; **88**: 5413–5417.
22 Wilda M, Bruch J, Harder L, Rawer D, Reiter A, Borkhardt A *et al.* Inactivation of the ARF-MDM-2-p53 pathway in sporadic Burkitt's lymphoma in children. *Leukemia* 2004; **18**: 584–588.
23 Lindstrom MS, Klangby U, Wiman KG. p14 ARF homozygous deletion or MDM2 overexpression in Burkitt lymphoma lines carrying wild type p53. *Oncogene* 2001; **20**: 2171–2177.
24 Lindstrom MS, Wiman KG. Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma. *Semin Cancer Biol* 2002; **12**: 381–387.
25 Imamura J, Miyoshi I, Koeffler HP. p53 in hematologic malignancies. *Blood* 1994; **84**: 2412–2421.
26 Capoulade C, Mir LM, Carlier K, Lecluse Y, Tetaud C, Mishal Z *et al.* Apoptosis of tumoral and nontumoral lymphoid cells is induced by both MDM2 and p53 antisense oligodeoxynucleotides. *Blood* 2001; **97**: 1043–1049.
27 Thompson MP, Kurzrock R. Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 803–821.
28 Rowe M, Rowe DT, Gregory CD, Young LS, Farrel PJ, Rupani H *et al.* Differences in B cell growth phenotype reflect novel patterns of Epstein-Barr virus latent gene expression in Burkitt's lymphoma cells. *EMBO J* 1987; **6**: 2743–2751.
29 Kelly GL, Milner AE, Baldwin GS, Bell AI, Rickinson AB. Three restricted forms of Epstein-Barr virus latency counteracting apoptosis in c-myc-expressing Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 14935–14940.
30 O'Nions J, Allday MJ. Epstein-Barr virus can inhibit genotoxin-induced G1 arrest downstream of p53 by preventing the inactivation of CDK2. *Oncogene* 2003; **22**: 7181–7191.
31 Wade M, Allday MJ. Epstein-Barr virus suppresses a G(2)/M checkpoint activated by genotoxins. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 1344–1360.
32 Okan I, Wang Y, Chen F, Hu LF, Imreh S, Klein G *et al.* The EBV-encoded LMP1 protein inhibits p53-triggered apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* 1995; **11**: 1027–1031.
33 Lenoir GM, Preud'homme JL, Bernheim A, Berger R. Correlation between immunoglobulin light chain expression and variant translocation in Burkitt's lymphoma. *Nature* 1982; **298**: 474–476.
34 Yu J, Zhang L, Hwang PM, Rago C, Kinzler KW, Vogelstein B. Identification and classification of p53-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 14517–14522.
35 Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2002; **1**: 639–649.
36 Maddika S, Ande SR, Panigrahi S, Paranjothy T, Weglarczyk K, Zuse A *et al.* Cell survival, cell death and cell cycle pathways are interconnected: implications for cancer therapy. *Drug Resist Updat* 2007; **10**: 13–29.
37 Vassilev LT. MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends Mol Med* 2007; **13**: 23–31.
38 Petre CE, Sin SH, Dittmer DP. Functional p53 signaling in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lymphomas: implications for therapy. *J Virol* 2007; **81**: 1912–1922.
39 Lau LM, Nugent JK, Zhao X, Irwin MS. HDM2 antagonist Nutlin-3 disrupts p73-HDM2 binding and enhances p73 function. *Oncogene* 2008; **27**: 997–1003.
40 Tabe Y, Sebasigari D, Jin L, Rudelius M, Davies-Hill T, Miyake K *et al.* MDM2 antagonist Nutlin-3 displays antiproliferative and proapoptotic activity in mantle cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 933–942.
41 Ablashi DV, Chatlynne LG, Whitman Jr JE, Cesarman E. Spectrum of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, or human herpesvirus 8 diseases. *Clin Microbiol Rev* 2002; **15**: 439–464.
42 Jiang M, Pabla N, Murphy RF, Yang T, Yin XM, Degenhardt K *et al.* Nutlin-3 protects kidney cells during cisplatin therapy by suppressing Bax/Bak activation. *J Biol Chem* 2007; **282**: 2636–2645.
43 Carvajal D, Tovar C, Yang H, Vu BT, Heimbrook DC, Vassilev LT. Activation of p53 by MDM2 antagonists can protect proliferating cells from mitotic inhibitors. *Cancer Res* 2005; **65**: 1918–1924.
44 Kranz D, Dobbelstein M. Nongenotoxic p53 activation protects cells against S-phase-specific chemotherapy. *Cancer Res* 2006; **66**: 10274–10280.
45 Prabhu NS, Somasundaram K, Tian H, Enders GH, Satyamoorthy K, Herlyn M *et al.* The administration schedule of cyclin-dependent kinase inhibitor gene therapy and etoposide chemotherapy is a major determinant of cytotoxicity. *Int J Oncol* 1999; **15**: 209–216.
46 Chan TA, Hwang PM, Hermeking H, Kinzler KW, Vogelstein B. Cooperative effects of genes controlling the G2/M checkpoint. *Genes Dev* 2000; **14**: 1584–1588.
47 Lu Y, Tatsuka M, Takebe H, Yagi T. Involvement of cyclin-dependent kinases in doxorubicin-induced apoptosis in human tumor cells. *Mol Carcinog* 2000; **29**: 1–7.
48 Lin CS, Kuo HH, Chen JY, Yang CS, Wang WB. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 retards cell growth, induces p21(WAF1) expression, and modulates p53 activity post-translationally. *J Mol Biol* 2000; **303**: 7–23.
49 Allday MJ, Inman GJ, Crawford DH, Farrell PJ. DNA damage in human B cells can induce apoptosis, proceeding from G1/S when p53 is transactivation competent and G2/M when it is transactivation defective. *EMBO J* 1995; **14**: 4994–5005.
50 O'Nions J, Turner A, Craig R, Allday MJ. Epstein-Barr virus selectively deregulates DNA damage responses in normal B cells but has no detectable effect on regulation of the tumor suppressor p53. *J Virol* 2006; **80**: 12408–12413.

Supplementary Information accompanies the paper on the Leukemia website (http://www.nature.com/leu)

Etude des mécanismes de résistance à l'apoptose induits par le virus d'Epstein-Barr et mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement des lymphomes B

Notre équipe étudie les mécanismes de l'apoptose induite par la nutline-3, une molécule capable de se fixer sur MDM2 et d'activer la p53, dans différents types de lymphomes associés au virus d'Epstein-Barr (EBV) comme le lymphome de Burkitt (LB) ou syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation (PTLD). Nos résultats montrent que la nutline-3 induit l'apoptose des cellules de LB EBV (-) alors que les cellules EBV (+) en latence de type III sont résistantes. Mon travail de thèse a consisté à étudier les mécanismes impliqués dans ce phénomène de résistance afin de mettre en place des stratégies pour les contourner. Une première étude initiée par les résultats d'une analyse transcriptomique, effectuée après traitement avec la nutline-3 de deux lignées qui ne diffèrent que par leur statut EBV, nous a permis de montrer que : 1) l'autophagie est induite en réponse au traitement dans les cellules EBV (+) en latence de type III ; 2) ces cellules expriment fortement Bécline-1 et présentent une activation constitutive de l'autophagie ; 3) l'autophagie contribue à la résistance de ces cellules à l'apoptose. Par ailleurs, nos résultats indiquent que la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est également impliquée dans la résistance de ces cellules et que l'utilisation d'ABT-737, un inhibiteur de Bcl-2, restaure leur sensibilité à la nutline-3. L'efficacité de ce composé a donc été évaluée *in vivo*, seul ou en combinaison avec des traitements conventionnels (Cyclophosphamide pour le LB et Rituximab pour les PTLD). Les résultats obtenus lors de ces études pré-cliniques montrent que : 1) ABT-737 réduit considérablement la croissance tumorale et augmente la survie de souris xénogreffées avec des cellules d'une lignée lymphoblastoïde (LCL, utilisées comme modèle pour les PTLD) alors qu'il n'a pas d'effets chez les souris xénogreffées avec une lignée de LB ; 2) la combinaison ABT-737/Cyclophosphamide permet de limiter la croissance tumorale durant le traitement mais n'améliore pas la survie des souris xénogreffées avec une lignée de LB ; 3) l'association ABT-737/Rituximab est très efficace et induit une rémission complète chez 70% des souris xénogreffées avec la lignée de LCL.

Mots clés : Lymphome de Burkitt, Lymphomes post-transplants, EBV, apoptose, nutline-3, Bcl-2, autophagie, ABT-737

Study of mechanisms involved in the resistance to apoptosis of cells infected with the Epstein-Barr virus and development of new therapeutic strategies for treatment of B lymphomas

Our team is working on the mechanisms of apoptosis induced by nutlin-3, a small molecule which binds to MDM2 and activates p53, in different lymphomas associated with Epstein-Barr virus such as Burkitt lymphoma (BL) or Post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD). Our results show that nutlin-3 strongly induce apoptosis in EBV (-) cells whereas EBV (+) latency III cells are much more resistant. The aim of my PhD project was to study the mechanisms involved in the resistance of EBV (+) latency III cells to apoptosis and to develop new therapeutic strategies to bypass these mechanisms. A transcriptomic analysis was realized after treatment with nutlin-3 of two cell lines which only differs by their EBV status. Based on the results obtained, a study was performed which allow us to show that: 1) autophagy is induced after nutlin-3 treatment in EBV (+) latency III cells; 2) these cells strongly expressed beclin-1 and present a constitutively high level of autophagy; 3) autophagy is involved in the resistance of apoptosis observed in these cells. Furthermore, our results demonstrate that Bcl-2 also contributes to the resistance of EBV (+) latency III cells and that treatment with ABT-737, a Bcl-2 inhibitor, restores their susceptibility to nutlin-3 treatment. We thus assessed the efficiency of this compound *in vivo,* in monotherapy or associated with conventional treatments (Cyclophosphamide for BL and Rituximab for PTLD). Results obtained during these pre-clinical studies show that: 1) ABT-737 reduces tumor growth and increase the overall survival of mice xenografted with a lymphoblastoïd cell line (LCL, used as a model for PTLD studies) but has no effects on mice xenografed with BL cell lines; 2) the association ABT-737/Cyclophosphamide reduces tumor growth during treatment but doesn't improve the overall survival of mice xenografed with BL cell lines; 3) the association ABT-737/Rituximab is very efficient and induces 70% of complete remission in mice xenografted with LCL.

Key words: Burkitt lymphoma, Post-transplant lymphoproliferative disorder, EBV, apoptosis, nutlin-3, Bcl-2, autophagy, ABT-737